



УДК 541.183

Оптимизация параметров хроматографического разделения смесей дифенилполиенов

Полунин К.Е., Полунина И.А.

ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Поступила в редакцию 31.01.2017 г.

Методами ТСХ и ВЭЖХ изучено взаимодействие дифенилполиенов с поверхностью SiO_2 и $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ в органических и водно-органических средах. Обнаружена зависимость констант хроматографического удерживания дифенилполиенов от геометрической и структурной конфигурации их молекул, длины олефинового фрагмента, природы и полярности элюента. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для оптимизации параметров хроматографического разделения смесей дифенилполиенов и выделения целевых соединений в препаративных масштабах.

Ключевые слова: дифенилполиены, SiO_2 и $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$, ТСХ, ВЭЖХ, органические модификаторы.

Optimization of parameters of chromatographic separation of diphenylpolyenes mixtures

Polunin K.E., Polunina I.A.

A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

TLC and HPLC methods have been employed to study the interaction of diphenylpolyenes with SiO_2 and $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ in organic and aqueous media. Electronic absorption spectra of diphenylpolyenes have been measured in different solvents, and optimal conditions for UV detection of polyenes have been revealed. The mixtures of *n*-hexane – ethyl acetate and water – acetonitrile were used as the solvents in normal and reversed-phase TLC and HPLC. The retention constants of diphenylpolyenes have been revealed to depend on the geometry and configuration of their molecules, the length of an olefin fragment, and the nature and polarity of an eluent. The interaction of diphenylpolyenes with SiO_2 surface in a binary organic solvent and with $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ surface in a water–organic solvent has been shown to intensify in the series *cis*-1,2-diphenylethylene < *trans*-1,2-diphenylethylene < *trans*-1,4-diphenyl-1,3-butadiene < *trans*-1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene < β -carotene. It has been shown that, under the conditions of normal and reversed-phase TLC and HPLC, a rise in the fraction of ethyl acetate in *n*-hexane and acetonitrile in water, respectively, weakens the retention of diphenylpolyenes. The numerical values of the coefficients obtained can be used to optimize conditions for the practical separation of mixtures of plant extracts of diphenylpolyenes and mixtures of products of chemical synthesis.

Keywords: diphenylpolyenes, SiO_2 , $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$, organic modifiers, TLC, HPLC

Введение

Полиены и арилполиены составляют значительную часть природных биологически активных соединений. Антимикробное и противовирусное, антиоксидантное и антиканцерогенное, гормональное и кардиопротекторное действие этих веществ делает их высокоэффективными лекарственными препаратами без вредного побочного

действия [1, 2]. Простейший дифенилполиен Ph-(C=C)_n-Ph – 1,2-дифенилэтилен, или стильбен. В клетках растений дифенилполиены существуют в виде смеси *цис*- и *транс*-изомеров. Благодаря существованию быстрых и обратимых *цис-транс* переходов, индуцированных фотохимическим путем, стильбены относятся к «интеллектуальным» молекулам, которые можно рассматривать как двухбитовый информационный носитель [3]. Особенности электронного строения дифенилполиенов – гиперконъюгация всех σ - и π -электронов, благодаря чему система ведет себя как единое целое, и вдоль всей молекулы действует незатухающий и хорошо передающийся эффект сопряжения [3-5]. Стереохимия молекул *транс*-изомеров незамещенных дифенилполиенов предполагает их копланарность [5]. Молекулы их *цис*-изомеров и дифенила ($n = 0$) не лежат в одной плоскости. Это уменьшает эффект сопряжения, влияя на спектральные характеристики молекул, их полярность и донорно-акцепторные свойства [5]. По данным [4], полярные растворители способствуют изомеризации стильбенов, сольватируя *цис*-изомеры в большей степени, чем *транс*-изомеры.

Широкий ассортимент коммерческих продуктов, выпускаемых на основе арилполиенов [2] – фармацевтических, косметических, пищевых, конструкционных и других материалов – требует разработки простых, доступных и эффективных методов разделения их смесей, очистки и идентификации целевых соединений. При этом широко используются адсорбционные и хроматографические методы [6-9]. Однако сорбционные свойства дифенилполиенов практически не изучены, а добиться разделения их смесей на практике очень трудно. Поэтому оптимизация процесса разделения смесей дифенилполиенов должна начинаться на аналитическом уровне путем измерения констант сорбции на гидрофильном и гидрофобном силикагеле – стандартных сорбентах, широко используемых в процессах сепарации.

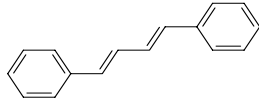
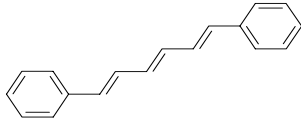
Цель исследования – выявление факторов, влияющих на поведение молекул дифенилполиенов в условиях ТСХ и ВЭЖХ с нормальными и обращенными фазами, для оптимизации параметров хроматографического разделения смесей дифенилполиенов и выделения чистых целевых продуктов.

Эксперимент

В качестве объектов исследования были выбраны синтетические дифенилполиены приведенные в табл. 1, а также дифенил, β -каротин и структурный изомер стильбена (1,1-дифенилэтилен) от фирмы Acrus (РФ) и Sigma (США) 99,5% чистоты. В качестве растворителей использовались *n*-гексан, этилацетат, вода и ацетонитрил с маркировкой «for HPLC» от фирмы Merck (Германия).

Таблица 1. Химическая структура исследованных соединений

№	Соединение	Структурная формула
1	2	3
1	дифенил C ₁₂ H ₁₀	
2	<i>цис</i> -1,2-дифенилэтилен (<i>цис</i> -стильбен) C ₁₄ H ₁₂	
3	<i>транс</i> -1,2-дифенилэтилен (<i>транс</i> -стильбен) C ₁₄ H ₁₂	

1	2	3
4	<i>транс</i> -1,4- дифенилбутадиен-1,3 C ₁₆ H ₁₄	
5	<i>транс</i> -1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен C ₁₈ H ₁₆	

Электронные спектры поглощения дифенилполиенов исследовались на двухлучевом спектрофотометре Cintra 6 (Австралия).

Сравнительный анализ удерживания дифенилполиенов на силикагеле из смеси *n*-гексана с этилацетатом проводился методом НФ ТСХ на пластинках Silica gel 60F₂₅₄ (размер частиц 5 мкм, диаметр пор $d_p=6$ нм) с люминофором (Merck). Методом ОФ ТСХ удерживание дифенилполиенов на пластинах Nanosil-C₁₈ (размер частиц 5 мкм, $d_p=16$ нм) с люминофором (Merck) исследовали из смеси воды с ацетонитрилом в стандартной камере Desaga. Соединения, нанесенные на пластинки, обнаруживались по поглощению в УФ свете ($\lambda=254$ нм).

НФ ВЭЖХ анализ дифенилполиенов проводился с помощью хроматографа Милихром–А01 (РФ), оснащенного спектрофотометрическим детектором и стальной колонкой Силасорб-600 (Lachema, Чехия) размером 80×2 мм. Расчетная масса адсорбента в колонке 140 мг, «мертвый» объем 180 мкл. Расход элюента (*n*-гексан с добавками этилацетата) составлял 50 мкл/мин.

Исследования методом ОФ ВЭЖХ проводили с помощью хроматографа Hewlett Packard-1050 (США) с колонкой Hypersil ODS (Keystone scientific, США) размером 125×4 мм, многоканальным диодно-матричным спектрофотометрическим детектором, проточным дегазатором и автоматическим пробоотборником с аналогичной предколонкой. Расход элюента (смесь воды с ацетонитрилом, подкисленная до рН=2.5) составил 1 см³/мин.

Обсуждение результатов

Определение оптимального диапазона длин волн детектирования исследуемых соединений позволяет значительно поднять порог их обнаружения. На рис. 1 и в табл. 2 приведены электронные спектры поглощения дифенилполиенов в *n*-гексане. Наблюдается bathochrome смещение поглощения при переходе от непланарной молекулы дифенила ($n=0$, угол между бензольными кольцами 45°, $\lambda_{\max}=245$ нм) к *цис*-изомеру стильбена ($n=1$, угол 29°, $\lambda_{\max}=285$ нм), планарной молекуле *транс*-стильбена ($\lambda_{\max}=295-306$ нм) и далее к *транс*-изомерам дифенилполиенов ($n=2\div 3$, $\lambda_{\max}=328\div 370$ нм) и β -каротину ($n=9$, $\lambda_{\max}=450$ нм) – растительному *транс*-изомеру дициклогексеннонаена C₄₀H₅₆). Изменение электронной структуры и геометрических характеристик молекул дифенилполиенов сказывается на их оптических, донорно-акцепторных и сорбционных свойствах.

Сорбция веществ из растворов определяется совокупностью взаимодействий между молекулами сорбатов, поверхностью твердой фазы и подвижной жидкой фазой. Подвижная фаза помимо транспортной функции, активно взаимодействует с молекулами разделяемых веществ и молекулами неподвижной фазы. В результате разделение многокомпонентных смесей можно осуществлять, изменяя физические и химические свойства подвижной фазы и регулируя константы адсорбционного равновесия в системе. В табл. 2 приведены значения константы R_f дифенилполиенов,

полученные методами НФ и ОФ ТСХ. С увеличением степени сопряжения и длины молекулы дифенилполиенов значения константы R_f в обоих случаях уменьшаются.

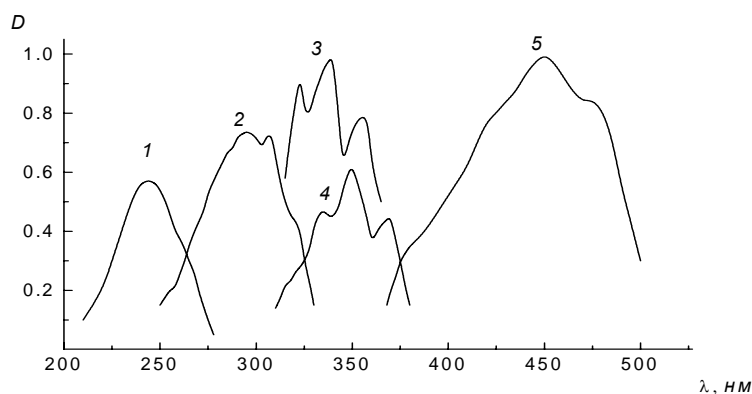


Рис. 1. Электронные спектры поглощения дифенила (1), *транс*-изомеров стильбена (2), 1,4-дифенил-1,3-бутадиена (3) и 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (4) и β -каротина (5) в *n*-гексане (0.001% растворы).

Таблица 2. Значения констант R_f дифенилполиенов, определенных методом НФ ТСХ (Silica gel 60F₂₅₄, *n*-гексан с добавками этилацетата) и ОФ ТСХ (Nanosil C₁₈, вода с добавками ацетонитрила). φ – объемная концентрация модификатора

Соединение	R_f			
	НФ ТСХ		ОФ ТСХ	
	$\varphi=5\%$	$\varphi=10\%$	$\varphi=55\%$	$\varphi=60\%$
1,1-дифенилэтилен	0.66	0.82	0.31	0.61
<i>цис</i> -1,2-дифенилэтилен	0.64	0.81	0.28	0.58
<i>транс</i> -1,2-дифенилэтилен	0.59	0.77	0.26	0.56
<i>транс</i> -1,4-дифенил-1,3-бутадиен	0.51	0.76	0.15	0.49
<i>транс</i> -1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен	0.48	0.75	0.11	0.41
β -каротин	0.39	0.70	0.05	0.12

Хроматографическое разделение в ТСХ обусловлено переносом компонентов подвижной фазы вдоль слоя сорбента с разными скоростями в соответствии с коэффициентами распределения разделяемых компонентов. Удерживание на силикагеле в НФ ТСХ возрастает с увеличением размера молекулы дифенилполиена и падает с увеличением полярности элюента. При увеличении доли этилацетата в *n*-гексане до значений $\varphi=10\%$ разделение смеси дифенилполиенов на силикагеле становится практически невозможным. Удерживание неполярных соединений в ОФ ТСХ преимущественно определяется степенью сольватофобного взаимодействия дифенилполиенов с элюентом. С увеличением концентрации органического модификатора в водной среде всего на 5% наблюдается двойное увеличение константы R_f дифенилполиенов на SiO₂-C₁₈, причем R_f уменьшается почти в 2 раза при переходе от *транс*-стильбена ($n=1$) к *транс*-гексатриену ($n=3$) и в 5 раз при переходе к β -каротину ($n=9$), что значительно эффективнее, чем в НФ ТСХ (табл. 2). Аналогичные результаты были получены методом ОФ ВЭЖХ (табл. 3), где значения фактора удерживания k' *транс*-стильбена выше, чем *цис*-стильбена, и уменьшались почти в 7 раз при увеличении концентрации ацетонитрила в воде с 40 до 60%. Также экспериментально обнаружено, что фактор удерживания k' *транс*-стильбена в при добавлении в воду ацетонитрила в 2.5 раза меньше, чем при использовании метанола (6.4 и 16.9, соответственно, при $\varphi=70\%$ модификатора). Препаративное разделение растительных

экстрактов и синтетических смесей часто проводится методом нормально-фазовой жидкостной хроматографии на силикагеле. Для оптимизации процессов препаративного разделения смесей дифенилполиенов их хроматографические свойства были исследованы в системе Силасорб-600 – *n*-гексан – этилацетат. На рис. 2 приведены экспериментально полученные зависимости удельных удерживаемых объемов дифенилполиенов (V_{rm}) от мольной доли этилацетата в *n*-гексане (X_m). Значения V_{rm} рассчитывались по формуле $V_{rm} = (V_r - V_0) / m$, где V_r – объем удерживания (мкл); V_0 – «мертвый объем» (мкл); m – масса сорбента в колонке (г). Приведенные на рис. 2 результаты, обработанные с помощью уравнения Снайдера: $\lg k = a - n \lg X_m$ [8], были аппроксимированы линейной функцией методом наименьших квадратов (рис. 2). Значения эмпирических коэффициентов уравнения Снайдера (зависимости фактора удерживания k от состава бинарной подвижной фазы X_m) приведены в табл. 4. Как видно на рис. 2, линейные зависимости всех *транс*-изомеров дифенилполиенов (кривые 2–4) идут достаточно близко и практически параллельно, т.е. имеют близкие хроматографические свойства в НФ ВЭЖХ. Соответственно, значения константы n и параметра a почти одинаковы для всех *транс*-дифенилполиенов (табл. 4), что затрудняет их разделение в широкой области значений X_m . Удерживание на силикагеле *цис*-стильбена (рис. 2, кривая 1) слабее и в меньшей степени зависит от полярности растворителя. При увеличении доли этилацетата в смеси с *n*-гексаном ($X_m \rightarrow 1$) происходит значительное снижение константы Генри (удельного удерживаемого объема), вплоть до значений, близких к нулю.

Таблица 3. Зависимость фактора удерживания k' стильбенов на силикагеле Hypersil ODS от объемной доли ацетонитрила в воде (φ)

Соединение	k'				
	$\varphi=40\%$	$\varphi=45\%$	$\varphi=50\%$	$\varphi=55\%$	$\varphi=60\%$
<i>транс</i> -стильбен	50.1	31.3	16.6	10.2	7.7
<i>цис</i> -стильбен	47.5	30.1	16.1	9.9	6.9

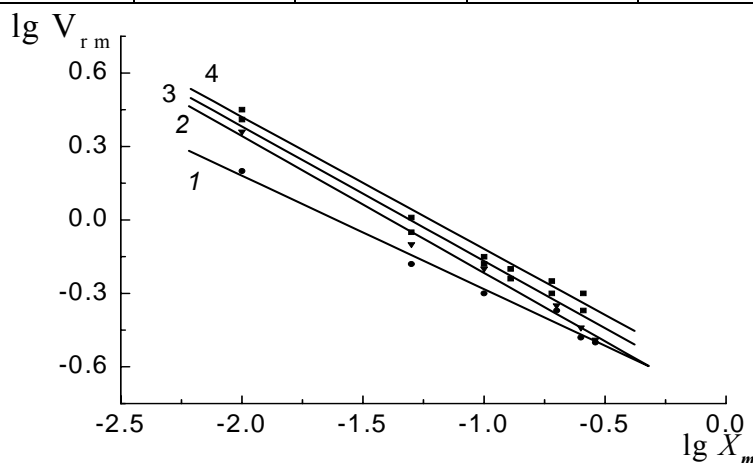


Рис. 2. Зависимость удельного удерживаемого объема V_{rm} (мкл/мг) *цис*-стильбена (1), *транс*-стильбена (2), *транс*-1,4-дифенил-1,3-бутадиена (3) и *транс*-1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (4) от мольной доли X_m этилацетата в *n*-гексане.

В соответствии с моделями Снайдера и Сочевиньского [8-9], коэффициент n представляется как число молекул подвижной фазы, вытесняемых при адсорбции одной молекулы хроматографируемого вещества. Т.е. примерно 2.5 молекулы *транс*-изомеров любой величины вытесняют с поверхностных центров силикагеля

одну молекулу этилацетата (табл. 4). Для того же результата требуется три молекулы *цис*-изомера. Однако в этих предположениях совершенно не учтена разная полярность молекул изомеров и их склонность к ассоциации и сольватации в растворе [6].

Таблица 4. Экспериментальные значения констант уравнения Снайдера и относительные изменения свободной энергии $\Delta(\Delta G)$ дифенилполиенов в системе Силасорб 600 – этилацетат – *n*-гексан

Соединение	X_m	a	n	r^2	$\Delta(\Delta G)$, Дж/моль $X_m=0.25$
<i>транс</i> -стильбен*	0.01÷0.25	-0.72	0.39	0.98	0
<i>цис</i> -стильбен	0.01÷0.25	-0.75	0.34	0.99	150
<i>транс</i> -1,4-дифенил-1,3-бутadiен	0.055÷0.35	-0.71	0.41	0.99	-290
<i>транс</i> -1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен	0.055÷0.35	-0.69	0.45	0.99	-610

*стандартное вещество

На основании экспериментальных данных по хроматографическому удерживанию дифенилполиенов на силикагеле были рассчитаны относительные изменения свободной энергии: $\Delta(\Delta G) = -RT \ln(V_{rmi} / V_{rmst})$, где V_{rmi} – удерживаемый объем сорбата, V_{rmst} – удерживаемый объем стандартного вещества. Как видно в табл. 4, увеличение длины олефинового фрагмента в молекуле *транс*-стильбена (выбран в качестве стандартного вещества) на одну (*транс*-1,4-дифенил-1,3-бутadiен) или две (*транс*-1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен) двойные связи приводит к увеличению относительной свободной энергии $\Delta(\Delta G)$ на величину -290 и -610 Дж/моль, соответственно. Т.е. вклад в значение $\Delta(\Delta G)$ одной двойной связи дифенилполиена можно оценить примерно в -300 Дж/моль.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить зависимость параметров хроматографического разделения смесей дифенилполиенов от длины олефинового фрагмента, геометрической и структурной конфигурации их молекул, качественного и количественного состава бинарного элюента, а также природы неподвижной фазы. Установлен оптимальный состав подвижной фазы для препаративного разделения смесей дифенилполиенов. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для оптимизации процессов адсорбционного разделения смесей природных и синтетических дифенилполиенов, а также выделения полиенов из растительного сырья в препаративных масштабах.

Заключение

Методами ТСХ и ВЭЖХ изучено взаимодействие дифенилполиенов с поверхностью SiO_2 и $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ в органических и водно-органических средах, соответственно. Определены оптимальные диапазоны длин волн детектирования дифенилполиенов, что позволило значительно поднять порог их обнаружения. Установлена зависимость констант хроматографического удерживания дифенилполиенов от геометрической и структурной конфигурации их молекул, длины олефинового фрагмента, природы и полярности элюента. Дана оценка вклада одной двойной связи дифенилполиена в значение относительной свободной энергии $\Delta(\Delta G)$ удерживания их молекул на силикагеле в -300 Дж/моль. Установлено усиление взаимодействия дифенилполиенов с поверхностью SiO_2 из смеси *n*-гексана с этилацетатом и увеличе-

ние факторов их удерживания из смеси воды с ацетонитрилом в системе $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ в последовательности *цис*-1,2-дифенилэтилен – *транс*-1,2-дифенилэтилен – *транс*-1,4-дифенилбутadiен-1,3 – *транс*-1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен – β -каротин (растительный *транс*-изомер дициклогексеннонаена $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$). Показано, что в условиях жидкостной хроматографии увеличение доли этилацетата в *n*-гексане или ацетонитрила в воде приводит к уменьшению факторов хроматографического удерживания дифенилполиенов на поверхности гидрофильного или гидрофобного силикагеля, соответственно. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для оптимизации процессов препаративного разделения смесей дифенилполиенов, очистки и идентификации целевых соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 15-08-08006 и 17-08-00315).

Список литературы

1. Головкин Б.Н., Руденская Р.Н., Трофимова И.А. Биологически активные вещества растительного происхождения. М. Наука. 2001. 764 с.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М. Новая волна. 2000. 539 с.
3. Waldeck D.H. // *Chem. Rev.* 1991. Vol. 91. pp.415-456.
4. Грандберг И.И. Органическая химия. М. Дрофа. 2004. 672 с.
5. Потапов В.М. Стереохимия. М. Химия. 1988. С. 116.
6. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига. Зинатне. 1988. 390 с.
7. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии / Под ред. В.Г. Берёзкина. М. Мир. 1999. 753 с.
8. Snyder L.R., Kirkland J.J. Introduction to modern liquid chromatography. New York. Wiley. 1979. 125 p.
9. Sochewinski E. // *Chromatogr.* 1973. Vol. 6. No 6. pp. 269-276.

References

1. Golovkin B.N., Rudenskaja R.N., Trofimova I.A., Biologicheski aktivnye veshchestva rastitel'nogo proishozhdenija, M., Nauka, 2001, 764 p.
2. Mashkovskij M.D. Lekarstvennye sredstva. M., Novaja volna, 2000, 539 p.
3. Waldeck D.H., *Chem. Rev.*, 1991, Vol. 91, pp.415-456.
4. Grandberg I.I. Organicheskaja himija. M., Drofa, 2004, 672 p.
5. Potapov V.M. Stereohimija. M., Himija, 1988, p. 116.
6. Shatc V.D., Sahartova O.V. Vysokojefektivnaja zhidkostnaja hromatografija, Riga, Zinatne, 1988, p. 390 p.
7. Geiss F. Fundamentals of Thin Layer Chromatography (Planar Chromatography). 1987. Heidelberg, VCH, 753 p.
8. Snyder L.R., Kirkland J.J., Introduction to modern liquid chromatography., New York, Wiley, 1979, 125 p.
9. Sochewinski E., *Chromatogr.*, 1973, Vol. 6., No 6, pp. 269-276.

Полунина Ирина Александровна – к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН (ИФХЭ РАН), Москва, (495) 955-46-90

Полунин Константин Евгеньевич – к.х.н., старший научный сотрудник, ИФХЭ РАН, Москва, (495) 955-46-35

Polunina Irina A. – Ph.D. (chemistry), associate prof., senior researcher, A.N.Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences (IPCE RAS), Moscow, polunina@phyche.ac.ru

Polunin Konstantin E. – Ph.D. senior researcher, IPCE RAS, Moscow, polunin@mail.ru