

ПРЕПАРАТИВНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ МЕТОКСИПРОИЗВОДНЫХ ПСОРАЛЕНА С ПОМОЩЬЮ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹О. И. Покровский*, ¹А. А. Крутикова, ¹К. Б. Устинович,
¹О. О. Паренаго, ²М. В. Мошнин, ²С. А. Гончуков, ¹В. В. Лунин

¹ФГБУН Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН,
Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ,
Москва, Россия

*oleg.pokrovskiy@igic.ras.ru

Поступила в редакцию 20.01.2012 г.

Разработан метод разделения смесей трех метоксипроизводных псоралена — бергаптена, ксантотоксина и изопимпинеллина. Проведенный скрининг сорбентов позволяет утверждать, что их разделение в сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) целесообразно осуществлять в нормально-фазовом режиме. Анализ механизмов разделения метоксипсораленов (МОПов) показал, что на всех сорбентах на основе силикагеля с привитыми полярными группами, за исключением 2-этилпиридинового и пентафторфенильного, осуществляется один и тот же механизм удерживания. Предложено возможное объяснение наблюдаемых закономерностей элюирования родственных МОПов. В случае пентафторфенильного сорбента ключевую роль в разделении играют π -электронные межмолекулярные взаимодействия. Предположительно, тот же эффект ответственен за особый порядок элюирования, наблюдаемый при использовании 2-этилпиридинового сорбента.

К л ю ч е в ы е с л о в а: сверхкритическая флюидная хроматография, фурукумарины, метоксипсоралены, механизмы удерживания.

ВВЕДЕНИЕ

Фурукумарины — природные соединения, издавна использовавшиеся в народной медицине для лечения кожных заболеваний. В современной медицине препараты, изготовленные из растений, богатых фурукумаринами, также применяются в качестве противовирусных, антипролиферативных (подавляющих разрастание тканей путем деления клеток) средств, антикоагулянтов и, главным образом, фотосенсибилизаторов [1]. Некоторые из линейных фурукумаринов — псораленов — нашли применение в методе лечения кожных заболеваний, таких как псориаз, витилиго, атопический дерматит и др., называемом ПУФА-терапией (Псорален УФ-А). Он заключается в приеме псораленового препарата с последующим воздействием УФ-излучения диапазона А (320—400 нм) на участок кожи, пораженный заболеванием. Попадая в пораженную клетку, фурукумарины стремятся проникнуть в ДНК, а при поглощении кванта света они могут образовывать ковалентные сшивки между спиралями ДНК, препятствуя делению клетки и вызывая ее апоптоз (саморазрушение) [2].

Препаративное разделение метоксипроизводных псоралена с помощью сверхкритической флюидной хроматографии

Лечебные фурукумарины производят либо синтетическим путем, либо выделением из растительного сырья. Синтетический путь применяется для соединений, не встречающихся в природе в заметных количествах. Основные же фурукумарины, используемые в ПУФА-терапии, — псорален, бергаптен (5-метоксипсорален, 5-МОП), ксантотоксин (8-метоксипсорален, 8-МОП) и изопимпинеллин (5,8-диметоксипсорален, 5,8-диМОП) (см. рис. 1) получают из тканей различных растений семейств зонтичных и рутовых. Это связано как с высокой распространенностью растений, содержащих данные вещества в больших количествах, так и с относительной дороговизной синтетических методов.

Принятые в настоящее время способы выделения фурукумаринов из растительного сырья в основном базируются на экстракции жидкими органическими растворителями с последующей многоступенчатой очисткой. В настоящий момент в производственной практике преобладают два подхода к созданию средств для ПУФА-терапии — (1) выделение одного фурукумарина, выбор которого обусловлен клинической практикой и рекомендациями врачей, и (2) использование смеси всех фурукумаринов, имеющихся в выбранном исходном сырье, в качестве основы для препарата. В первом случае выбирается растительное сырье с высоким содержанием либо самого искомого фурукумарина, либо его предшественника. Это вещество выделяется с помощью сочетания различных методов экстракции, избирательной адсорбции, хроматографии и затем либо непосредственно используется для создания лекарственного средства, либо химически превращается в вещество, нужное для изготовления лекарства [3]. Основной плюс этого подхода — предсказуемость и воспроизводимость терапевтического действия фармпрепарата и его побочных эффектов; основной недостаток — трудоемкость выделения индивидуального вещества из сложных смесей растительных экстрактов. Второй подход заключается в выборе источника, в составе которого присутствуют всего 2—3 фурукумарина, и выделении этих веществ из него с помощью экстракции и последующей сравнительно простой очистки [4]. Сами фурукумарины при этом не разделяются, а лекарственное средство изготавливается на основе их смеси. Преимущество такого метода заключается, прежде всего, в относительной простоте и дешевизне технологии изготовления лекарственной субстанции. Но очевидно, что использование ПУФА-препаратов второго типа в клинической практике сопряжено с определенными сложностями. Состав этих средств меняется от партии к партии; соответственно, меняется и их терапевтическое действие.

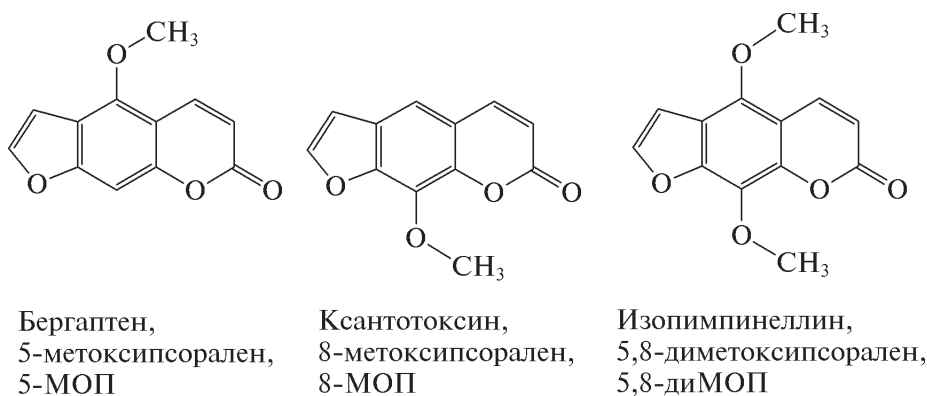


Рис. 1. Структурные формулы лечебных метоксипсораленов

В большинстве современных ПУФА-препаратов действующим веществом является 8-метоксипсорален. Так сложилось исторически — в основном благодаря тому, что из веществ, испытывавшихся в качестве фотосенсибилизаторов на ранних стадиях становления этого вида терапии (рис. 1), 8-МОП оказывал наиболее сильное терапевтическое действие [5]. При этом в настоящий момент в дерматологическом сообществе нет единства в вопросе о целесообразности использования именно 8-МОПа в качестве основного фотосенсибилизирующего агента.

Известно, что ПУФА-препараты обладают весьма неприятными побочными эффектами, как кратковременными (необходимость защищать глаза от ультрафиолетового компонента солнечного света во время прохождения курса фототерапии), так и долговременными, связанными с неспецифической токсичностью фотосенсибилизаторов при долгом употреблении. Многие болезни, с проявлениями которых борются с помощью ПУФА-терапии, прежде всего псориаз, неизлечимы. Поэтому за жизнь пациент многократно проходит один и тот же курс лечения, и негативные эффекты от приема псораленов накапливаются. Ряд исследователей полагает, что 5-МОП обладает существенно меньшей фототоксичностью (способность понижать устойчивость клеток к неблагоприятному воздействию света) по сравнению с 8-МОПом и псораленом [5—7]. Кроме того, подвергаются пересмотру и бытующие представления о превосходстве 8-МОПа по эффективности фотовозбуждения и фотоактивности [8]. Таким образом, 5-МОП является привлекательным кандидатом на роль основного фотосенсибилизатора в ПУФА-препаратах, но для окончательного решения данного вопроса необходимо произвести клинические испытания и сравнительные исследования активности однокомпонентных препаратов на основе 5-МОПа и 8-МОПа.

Насколько нам известно, в настоящее время препараты на основе чистого 5-МОПа не производятся. Для создания такого препарата необходим метод выделения 5-МОПа в чистом виде. Очевидно, что для проведения сравнительных исследований второй подход из вышеперечисленных к производству ПУФА-препаратов не может быть использован. Наличие даже незначительных примесей иных фурукумаринов нарушит чистоту экспериментов по сравнению величин побочных эффектов родственных фотосенсибилизаторов.

подавляющее большинство описанных в литературе методов разделения смесей кумаринов относится к адсорбционной либо распределительной элюентной хроматографии с жидкими подвижными фазами. При этом высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) применяется практически исключительно для аналитических разделений смесей кумаринов (см. [9—13] и ссылки в них). В то же время препаративное разделение фурукумаринов, как правило, осуществляется либо при помощи низкоэффективной адсорбционной жидкостной хроматографии [14—18], либо с использованием высокоскоростной противоточной хроматографии [19, 20]. Примеры использования ВЭЖХ для препаративного выделения кумаринов редки и преимущественно относятся к работам лабораторного масштаба, проводимым для выделения новых веществ в количествах, достаточных для установления их структуры [21, 22].

По-видимому, описанное положение вещей связано с тем, что внедрение ВЭЖХ вместо обычной жидкостной хроматографии (ЖХ) не оправдывает себя в препаративной работе с данными веществами. Ее возможности востребованы лишь в случае разделения родственных кумаринов, близких по своей структуре и свойствам, например, для выделения вышеназванных популярных ПУФА-сенсибилизаторов — 8-МОПа и 5-МОПа. При этом для достижения нужной селективности

необходимо проводить трудоемкую оптимизацию состава подвижных фаз (ПФ) как в нормально-фазовом [12, 14, 15], так и в обращенно-фазовом (ОФ) [11, 23] режимах. Методики тяжело поддаются масштабированию в силу того, что полностью воспроизвести все условия, устанавливающиеся при конкурентной сорбции 4—5 компонентов элюента на неподвижной фазе (НФ) при изменении скоростей потока, геометрии колонок и прочих параметров, невозможно. Содержащиеся в ПФ легколетучие (CH_2Cl_2 , диэтиловый эфир, тетрагидрофуран и проч.) компоненты по-разному сорбируются при разных скоростях потока, так как перепад давлений через колонку, влияющий на сорбцию, зависит от скорости потока и геометрии колонки [24]. Это приводит к иногда непредсказуемому изменению времен удерживания при переносе методик с использованием таких сложных элюентов на препаративные объемы [24]. Кроме того, в данном случае при достижении нужной селективности выигрыш в производительности препаративного метода при переходе с ЖХ на ВЭЖХ становится несущественным.

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) известна как метод, превосходящий ВЭЖХ именно по производительности на одинаковых хроматографических колонках при необходимости проведения разделений смесей близких по структуре соединений [25—28]. Сочетание высоких коэффициентов диффузии и низкой вязкости позволяет проводить одни и те же разделения за время в 3—5 раз меньшее, чем в ВЭЖХ. Управляемая растворяющая способность сверхкритического флюида либо сжатого газа позволяет избежать проблем, связанных с поиском оптимального состава 4—5-компонентной подвижной фазы, заменив их тонкой настройкой плотности сверхкритического флюида путем вариации давления. Подавляющее большинство работ в области СФХ, как и во многих других сферах применения сверхкритических флюидов в транспортных процессах, ведется с использованием сверхкритического диоксида углерода (СК-CO_2) в качестве основного компонента подвижной фазы, чем обусловлена, помимо всего прочего, и экологическая привлекательность данного метода. Предварительные сведения, полученные в работах [29, 30], позволяют утверждать, что СФХ хорошо подходит и для разделения смесей изомерных фурукумаринов. Внедрение этого хроматографического метода в технологию получения индивидуального ПУФА-препарата исключит образование токсичных отходов органических растворителей, повысит производительность процесса выделения и позволит наладить промышленное производство очищенного 5-МОПа из растительных экстрактов.

Для создания такого метода необходимо разработать методики разделения смесей фурукумаринов, получаемых из доступных растительных материалов. Известны сотни кумариновых веществ, синтезируемых растениями [31]. Выделение многих из них не представляет особых трудностей, однако смеси кумаринов, в избытке присутствующие в природных экстрактах, часто весьма трудны для хроматографического разделения [11, 30]. В практике ВЭЖХ для этого применяют подвижные фазы сложного состава с включением токсичных и пожароопасных реагентов [11]. Благодаря широкому диапазону возможного варьирования НФ и управлению растворяющей способностью сверхкритического флюида путем изменения его плотности СФХ предоставляет больше возможностей для разделения веществ близкой структуры. Однако для того чтобы воспользоваться этими возможностями, не снижая технологическую и экологическую привлекательность данного метода, необходимо изучить хроматографическое поведение разделяемых веществ в условиях СФХ. В первую очередь это касается исследования селектив-

ности различных сорбентов по отношению к разделяемым веществам. Целью настоящей работы являлся скрининг различных сорбентов в условиях сверхкритической флюидной хроматографии и разработка метода разделения трех основных фотосенсибилизирующих метоксипсораленов (8-МОПа, 5-МОПа и изопимпинеллина), который можно использовать в препаративной практике для выделения любого из этих трех соединений из природных смесей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве смеси трех метоксипсораленов использовали экстракт препарата аммифурина производства ЗАО «Вилар». 50 мл вязкого жидкого препарата экстрагировали 50 мл хлороформа в аппарате Сокслетта в течение суток, экстракт упаривали на роторном испарителе до объема ~15 мл. Раствор представлял собой прозрачную, слегка желтоватую жидкость. До проведения экспериментов по разделению раствор хранили в холодильнике при температуре +2 °С. Перед началом экспериментов 100 мкл раствора помещали в хроматографическую виалу объемом 2 мл и разбавляли до 1 мл тем растворителем, который в соответствующем опыте использовался в качестве модификатора, во избежание искажения формы пиков вследствие эффектов сильной сорбции растворителей [32].

Были испытаны следующие хроматографические сорбенты: Kromasil Silica, Kromasil Diol, Kromasil CN, Kromasil C₁₈, Kromasil C₈, Kromasil C₄ производства компании AkzoNobel; Luna PhenylHexyl и Luna PFP производства компании Phenomenex; Viridis Silica-2EP производства компании Waters. Все колонки были заполнены сорбентом с диаметром частиц 5 мкм и имели геометрические размеры 250 мм (длина) × 4,6 мм (внутренний диаметр). Средний диаметр пор части сорбентов (Kromasil Silica, Kromasil CN, Kromasil Diol) — 60 Å, средний размер пор остальных сорбентов — 100 Å.

В качестве основного компонента подвижной фазы использовался пищевой диоксид углерода (99,8 %, ГОСТ 8050-85, ОАО «Линде Газ Рус»). В качестве модификаторов (соразтворителей) использовали метанол, изопропанол, ацетон, тетрагидрофуран (Sigma-Aldrich).

Все опыты проводили с помощью лабораторного сверхкритического флюидного хроматографа Investigator (Thar, Waters Corp.). Общее устройство прибора и схема хроматографического эксперимента подробно описаны в [29]. Если не указано иное, опыты проводили при температуре 25 °С, давлении 150 бар. Объемная скорость потока подвижной фазы в соответствии с калибровкой производителя оборудования составляла 5 мл/мин (она относится к компонентам подвижной фазы в том состоянии, в котором они подаются в насосный модуль; в данном случае температура и давление входящего в насос диоксида углерода поддерживались равными соответственно +2 °С и 60 бар). Состав подвижной фазы варьировался и был одним из основных оптимизируемых параметров при поиске подходящих условий разделения. При использовании многокомпонентных соразтворителей их подачу проводили одним насосом из емкости, в которой предварительно смешивали компоненты в нужном соотношении. Типичный объем вводимой пробы аналита был 10 мкл. Детектирование проводили при помощи монохроматического УФ-детектора на длине волны 310 нм. Мертвым временем считали время появления первого возмущения базовой линии, как правило, выглядевшего как небольшой «отрицательный» пик, связанный с выходом с колонки растворителя, в котором была приготовлена введенная проба. Все хроматографические параметры рассчи-

тывали как среднее арифметическое минимум для трех опытов, в которых расхождение времен удерживания всех трех компонентов не превышало 5 %. Идентификация пиков была проведена для системы силикагель — метанол путем микропрепаративного накопления индивидуальных веществ с последующей регистрацией спектров ^1H ЯМР. Для всех остальных систем — по относительным содержаниям трех основных метоксипсораленов в использовавшейся тестовой смеси, достаточно различающимся для установления однозначного соответствия. В случае возникновения сомнений в отнесении пиков 5-МОПа и 8-МОПа, близких по площадям, идентификация 8-МОПа производилась по времени удерживания внешнего стандарта, в качестве которого использовался раствор препарата оксоралена (ICN Pharmaceuticals).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полярные неароматические сорбенты

В первую очередь были протестированы традиционные для нормально-фазовой ВЭЖХ полярные сорбенты — чистый силикагель (Kromasil Silica), фазы Kromasil Diol и Kromasil CN, представляющие собой тот же силикагель, но химически модифицированный поверхностными диольными и CN-группами. С данной группой сорбентов были испытаны подвижные фазы, содержащие различные органические сорастворители — как протонные (метанол, изопропанол), так и апротонные (ацетонитрил, ацетон, этилацетат, толуол). Величины коэффициентов удерживания, полученные в экспериментах с метанолом и изопропанолом, приведены в таблицах 1 и 2.

Количественные результаты для апротонных растворителей не приводятся. На качественном уровне они, как правило, не отличались от систем со спиртовыми сорастворителями, но характеризовались заметно большими временами удерживания, меньшей эффективностью разделения и нередко искажениями формы пиков. В тех условиях, в которых удавалось зарегистрировать хотя бы частичное

Таблица 1

Коэффициенты удерживания метоксипсораленов на силикагеле и сорбентах с полярными алифатическими группами при использовании метанола в качестве сорастворителя в СФХ (относительная погрешность определения коэффициентов селективности $\Delta_r = 0,02$)

Колонка	Коэффициент удерживания	Содержание метанола в подвижной фазе, % об.					
		2	3	5	7	10	12
Kromasil Silica	$K_{5\text{-МОП}}$	2,29	2,04	1,72	1,66	1,46	1,06
	$K_{5,8\text{-диМОП}}$	2,72	2,35	1,94	1,83	1,58	1,15
	$K_{8\text{-МОП}}$	2,72	2,46	1,94	1,93	1,68	1,28
Kromasil Diol	$K_{5\text{-МОП}}$	2,29	2,31	2,23	2,20	1,85	1,41
	$K_{5,8\text{-диМОП}}$	2,60	2,54	2,37	2,20	1,85	1,41
	$K_{8\text{-МОП}}$	2,60	2,54	2,48	2,35	2,01	1,61
Kromasil CN	$K_{5\text{-МОП}}$	2,80	2,56	2,18	2,04	1,76	1,35
	$K_{5,8\text{-диМОП}}$	3,34	2,97	2,50	2,30	1,95	1,52
	$K_{8\text{-МОП}}$	2,93	2,67	2,29	2,15	1,88	1,52

Таблица 2

Коэффициенты удерживания метоксипсораленов на силикагеле и сорбентах с полярными алифатическими группами при использовании изопропанола в качестве соразтворителя в СФХ (относительная погрешность определения коэффициентов селективности $\Delta_r = 0,02$)

Колонка	Коэффициент удерживания	Содержание метанола в подвижной фазе, % об.					
		2	3	5	7	10	12
Kromasil Silica	$K_{5-МОП}$	5,32	4,25	3,26	2,65	1,97	1,83
	$K_{5,8-диМОП}$	6,65	4,98	3,54	2,92	2,16	1,96
	$K_{8-МОП}$	6,40	4,98	3,54	2,92	2,16	1,96
Kromasil Diol	$K_{5-МОП}$	3,97	3,58	3,26	2,99	1,92	2,06
	$K_{5,8-диМОП}$	4,61	4,00	3,54	3,23	2,05	2,21
	$K_{8-МОП}$	4,61	4,00	3,54	3,13	1,92	2,06
Kromasil CN	$K_{5-МОП}$	4,48	3,73	3,13	2,78	2,23	1,94
	$K_{5,8-диМОП}$	5,28	4,29	3,58	3,04	2,50	2,15
	$K_{8-МОП}$	4,67	3,84	3,24	2,78	2,31	2,01

разделение всех трех компонентов, порядок их элюирования в большинстве случаев был следующим: 5-МОП < 8-МОП < 5,8-диМОП. Исключение составляют комбинации Kromasil Silica — метанол и Kromasil Diol — метанол (см. ниже). В подавляющем большинстве систем при содержании протонного соразтворителя выше 10—12 % об. добиться полного разделения трех компонентов не удается. 5-МОП, элюирующийся первым, достаточно легко отделяется от оставшихся 8-замещенных метоксипсораленов на всех испытанных алифатических полярных сорбентах. Разделение же 8-МОПа и 5,8-диМОПа представляется затруднительным в таких системах. Последние два компонента элюируются совместно при содержании протонных соразтворителей выше 10 % об. При малом же содержании для всех соразтворителей, кроме метанола, наблюдается существенное уширение пиков, и даже при достижении разделения оно недостаточно для масштабирования на препаративные объемы (см. таблицы 1 и 2).

Полное разделение всех трех целевых веществ с использованием сорбентов данной группы достигалось лишь при использовании слабополярных апротонных соразтворителей, при этом формы получаемых пиков были очень далеки от гауссовых, а времена удерживания становились неприемлемо велики. Пример такого разделения приведен на рис. 2. Воспроизводимость времен удерживания и в особенности форм пиков элюируемых компонентов при использовании апротонных соразтворителей с полярными сорбентами была крайне низкой, при этом наиболее значительные расхождения в результатах экспериментов наблюдались в ходе анализа воспроизводимости не в рамках одного рабочего дня, а в течение нескольких дней.

Для чистого силикагеля наблюдалась инверсия порядка элюирования двух последних компонентов, 8-МОПа и 5,8-диМОПа, при смене соразтворителя с изопропанола на метанол. Соответствующие хроматограммы показаны на рис. 3. При использовании метанола первым элюируется 5,8-диМОП, в случае изопропанола — 8-МОП. Аналогичный, хотя и менее надежно регистрируемый, порядок

**Препаративное разделение метоксипсораленов
псоралена с помощью сверхкритической флюидной хроматографии**

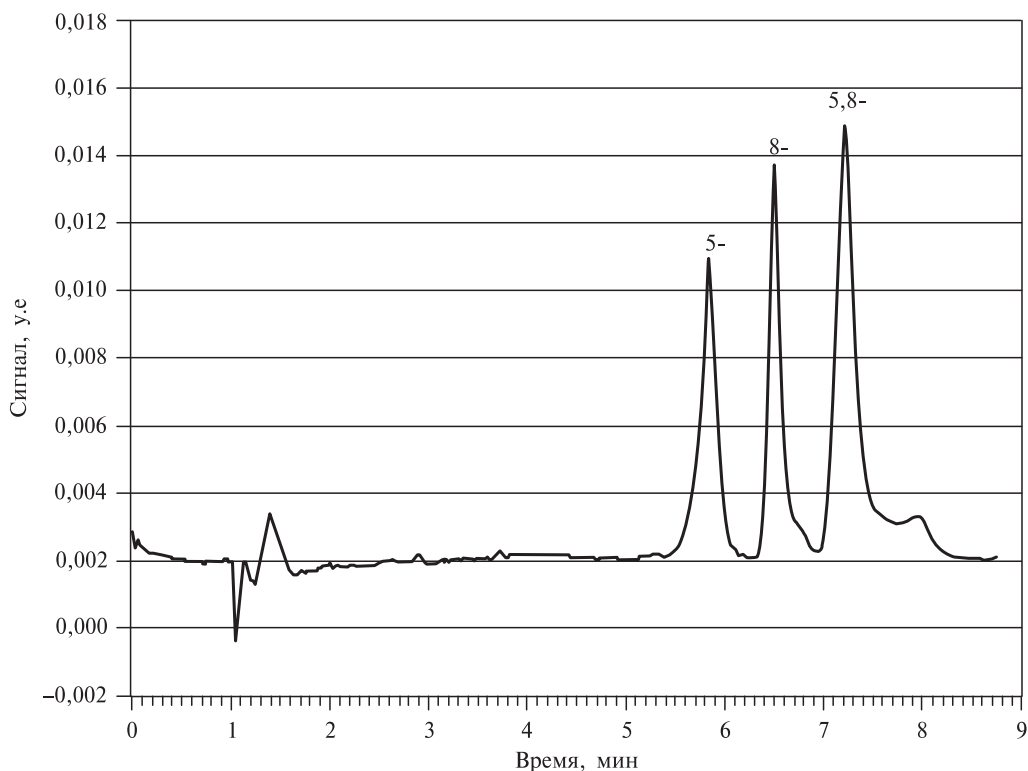


Рис. 2. Разделение трех метоксипсораленов в СФХ на чистом силикагеле с апротонным соразтворителем; Kromasil Silica, отношение CO_2 : EtOAc = 85: 15, скорость потока 4 мл/мин, давление 150 бар, температура 25 °С; здесь и далее обозначения пиков: «5-» — 5-МОП, «8-» — 8-МОП, «5,8-» — 5,8-диМОП

элюирования наблюдается при использовании системы Kromasil Diol—метанол. При этом селективности разделения соседних пиков в этих двух системах по-разному изменяются при росте содержания соразтворителя в составе элюента. На Kromasil Silica по мере увеличения содержания метанола сливаются между собой пики 5,8-диМОПа и 8-МОПа; на Kromasil Diol в тех же условиях происходит постепенный дрейф центрального пика (5,8-диМОП) от 8-МОПа в сторону 5-МОПа. При высоком содержании метанола ($\geq 10\%$) на этом сорбенте пики 5-МОПа и 5,8-диМОПа сливаются между собой.

Хотя аналитическое разделение 5-МОПа от остальных компонентов исследуемой смеси достигается на некоторых полярных неароматических сорбентах, но оно не подходит для дальнейшего масштабирования до препаративных объемов. Во-первых, достигнутое разрешение неоптимально для препаративной хроматографии: коэффициенты селективности между 5-МОПом и ближайшим соседом не превышали значений 1,3 (см. таблицы 1 и 2), что недостаточно для масштабирования на планируемые объемы [25]. Во-вторых, так как 5-МОП элюируется первым с таких сорбентов, то искажение пиков с уширением правого фронта, неизбежное в препаративных разделениях вследствие работы в области нелинейной адсорбции, будет элиминировать даже то разделение, которое достигается в аналитическом масштабе. Соответственно, добиться требуемой полноты выделения 5-МОПа на данных сорбентах будет затруднительно.

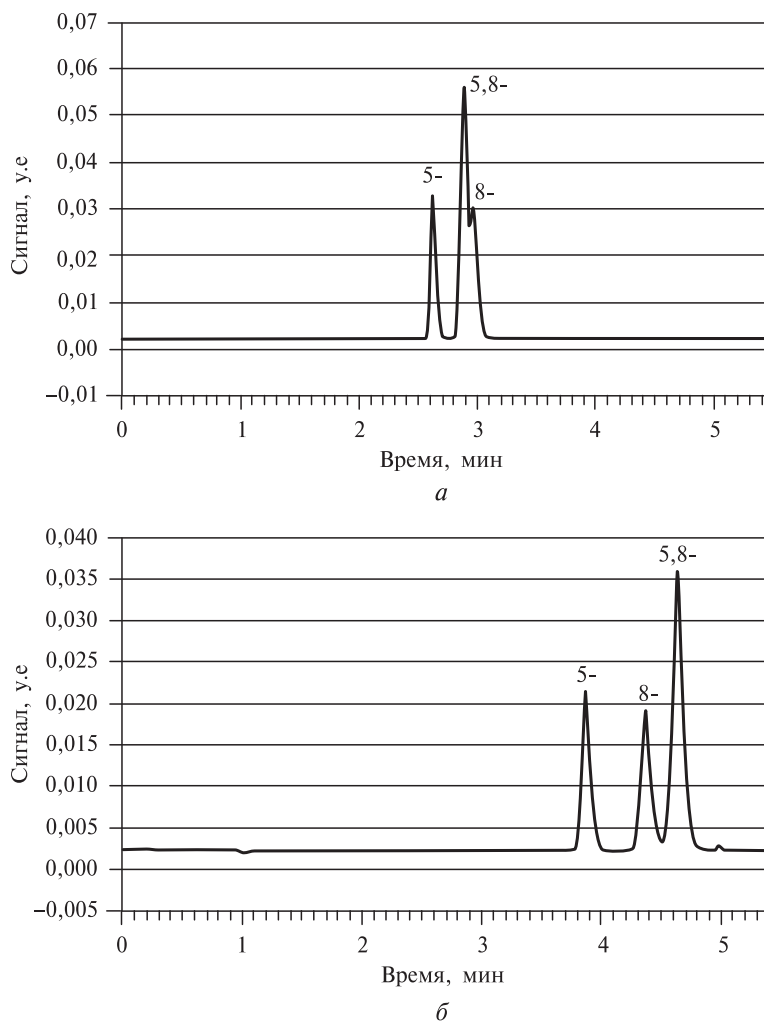


Рис. 3. Инверсия порядка элюирования 8-МОПа и 5,8-диМОПа при использовании метанола и изопропанола на чистом силикагеле. Kromasil Silica, отношение CO_2 : соразтворитель = 98 : 2; *a* — соразтворитель метанол, *б* — изопропанол

Обращенно-фазовые сорбенты

Испытанные обращенно-фазовые сорбенты (C_{18} и C_8) показали низкую селективность при разделении метоксипсораленов прежде всего потому, что последние практически не удерживаются на неполярных алкильных фазах в СФХ. На рис. 4 приведен типичный вид таких хроматограмм.

Варьирование содержания спиртовых соразтворителей в подвижной фазе, равно как и типа соразтворителя, не позволило достичь более удовлетворительного разделения метоксипсораленов на данных сорбентах. Примечательно, что полный отказ от соразтворителей в данном случае не только не помогает добиться лучшего разделения, но даже приводит к ухудшению ситуации. Разделение, которое достигается при использовании малых долей соразтворителя, пропадает, а форма пиков становится заметно асимметричной — появляется отклонение заднего края пика от гауссовой формы — так называемый «хвост».

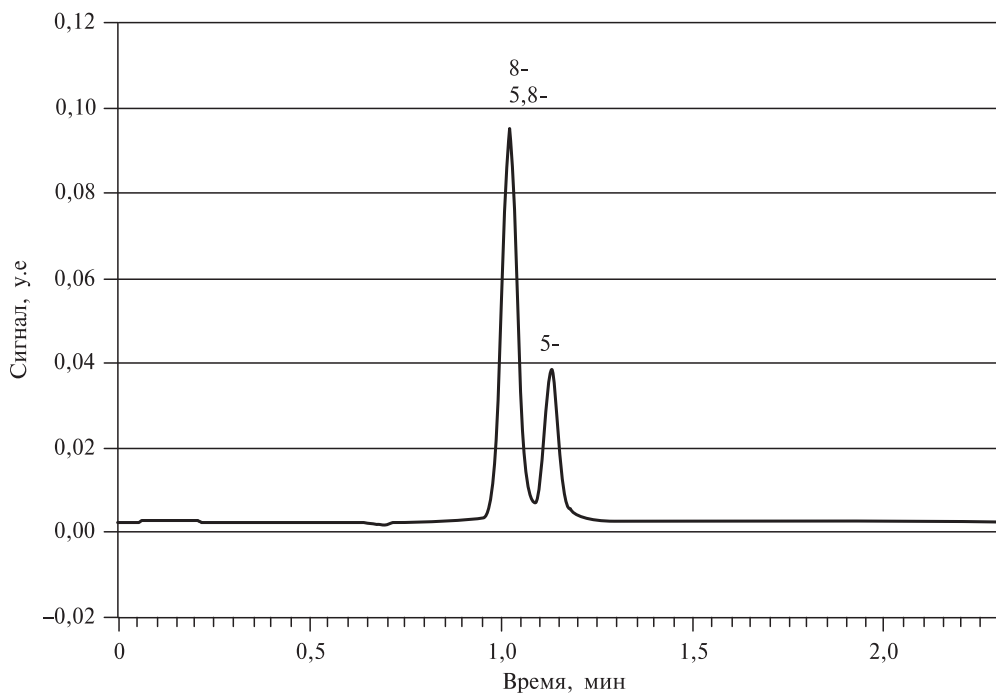


Рис. 4. Пример разделения метоксипсораленов на обращенно-фазовых сорбентах; колонка Kromasil C₁₈ 100-5 250 × 4,6 мм, отношение CO₂ : изопропанол = 98 : 2, скорость потока 5 мл/мин, давление 100 бар, температура 25 °С

В случае использования обращенно-фазовых сорбентов с более короткими алкильными группами удерживание фурукумаринов становится еще меньше, чем в случае с C₁₈. На рис. 5 показано элюирование смеси МОПов с сорбента Kromasil C₄ чистым CO₂. Как видно, фурукумарины практически не удерживаются на данной колонке и элюируются за 1 минуту, не разделяясь.

Сорбенты с ароматическими привитыми группами

В ходе исследования применимости сорбентов с привитыми арилалкильными группами было протестировано несколько колонок с фенилгексилными группами, традиционно также причисляемых к обращенно-фазовым в ВЭЖХ. Неожиданно эти сорбенты показали отличное от алкильных поведение, в особенности при использовании смешанных протонно-апротонных соразтворителей. Удерживание метоксипсораленов в таких условиях по-прежнему невелико, но появляется селективность, недоступная на алкильных фазах. При использовании малых количеств апротонных соразтворителей в составе ПФ наблюдалась невысокая воспроизводимость времен удерживания, однако удается добиться разделения всех трех компонентов исследуемой смеси. Полученная в одном из таких экспериментов хроматограмма приведена на рис. 6.

Ввиду низкой воспроизводимости времен удерживания идентификация пиков не производилась, но площади пиков соответствуют следующему порядку элюирования метоксипсораленов в данной системе: 8-МОП < 5-МОП < 5,8-диМОП.

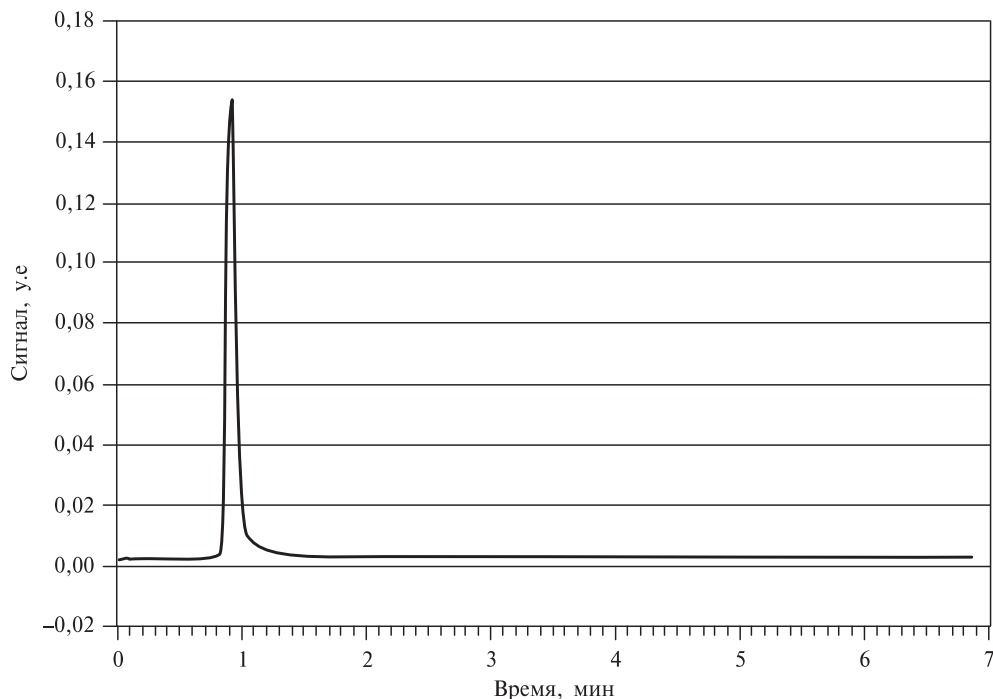


Рис. 5. Элюирование метоксипсораленов с обращенно-фазовых сорбентов с короткими алкильными группами; колонка Kromasil C₄ 100-5 250 × 4,6 мм, чистый СО₂, скорость потока 5 мл/мин, давление 100 бар, температура 25 °С

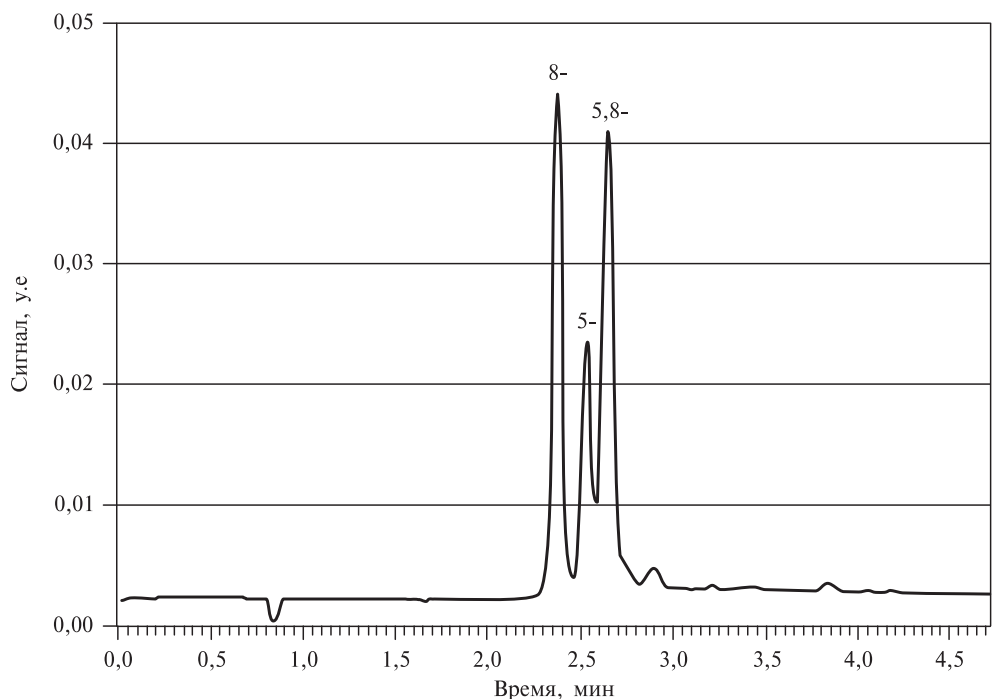


Рис. 6. Разделение трех МОПов на фенилгексильном сорбенте. Luna PhenylHexyl, СО₂/ТГФ/МеОН 99/0,2/0,8, 100 бар, 25 °С, 4 мл/мин

*Препаративное разделение метоксипроизводных
соралена с помощью сверхкритической флюидной хроматографии*

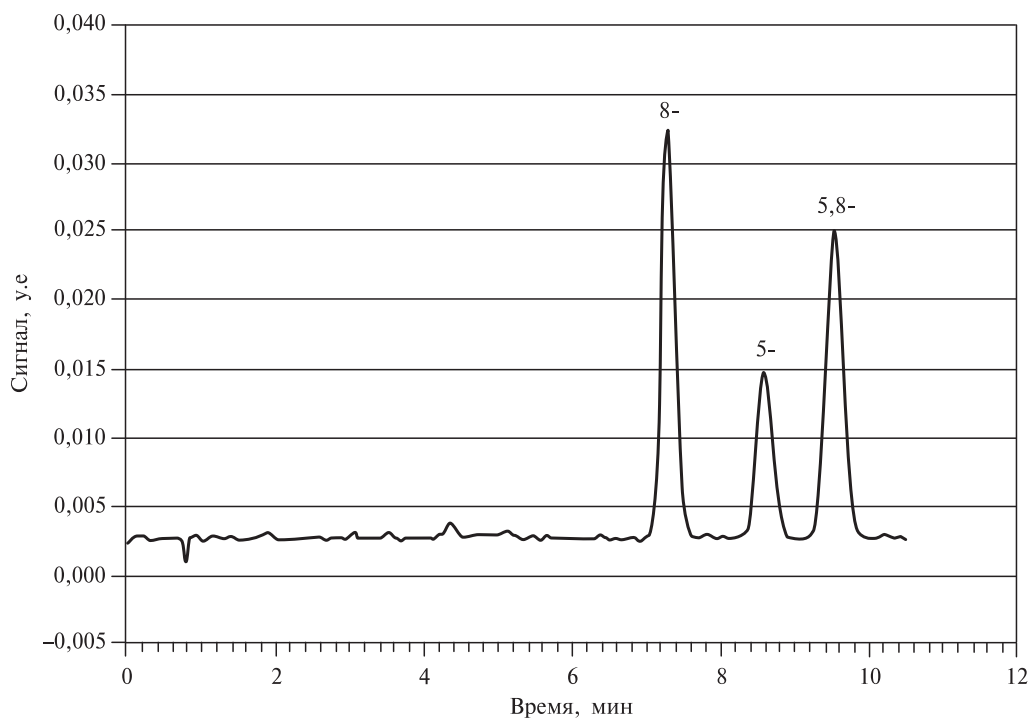


Рис. 7. Разделение на 2-этилпиридиновом сорбенте. Viridis Silica-2EP, CO₂/iPrOH 95/5, 100 бар, 25 °С, 5 мл/мин

Следующим исследованным сорбентом с ароматическим заместителем в привитой к силикагелю группе был 2-этилпиридиновый. Наилучший результат, достигнутый с его использованием, приведен на рис. 7.

Порядок элюирования метоксипсораленов в данной системе совпадает с тем, что наблюдался при использовании фенилгексильных НФ: 8-МОП < 5-МОП < 5,8-диМОП. В таблицах 3 и 4 приведены коэффициенты удерживания трех МОПов при различном содержании метанола и изопропанола в подвижной фазе. При использовании метанола в качестве соразтворителя по мере роста его доли в элюенте помимо общего уменьшения времен удерживания всей группы веществ была отмечена «миграция» пика 5-МОПа в сторону сближения с 8-МОПом. При содержании метанола в ПФ от 3 % до 7 % пики двух монометоксипсораленов сливаются друг с другом, но еще отделяются от 5,8-диМОПа до базовой линии. При использовании же изопропанола наблюдалась в некоторой степени обратная тенденция — с ростом процента соразтворителя коэффициент селективности между 5-МОПом и 5,8-диМОПом падает быстрее, чем коэффициент селективности между 5-МОПом и 8-МОПом. Времена удерживания, селективность и содержание соразтворителя в элюенте, характеризующие оптимальное разделение фурукумаринов, достигаемое при использовании 4—8 % об. изопропанола, достаточны для масштабирования на большие объемы и проведения препаративных разделений смесей метоксипсораленов.

Пентафторфенильный (ПФФ) сорбент Luna PFP, испытанный в рамках предположения о положительном влиянии наличия ароматических заместителей на поверхности сорбентов для разделения фурукумаринов в СФХ, показал наиболь-

Таблица 3

Коэффициенты удерживания метоксипсораленов на ароматических (этилпиридиновом и пентафторфенильном) сорбентах при использовании метанола в качестве соразтворителя в СФХ (относительная погрешность определения коэффициентов селективности $\Delta_r = 0,02$)

Колонка	Коэффициент удерживания	Содержание метанола в подвижной фазе, % об.					
		2	3	5	7	10	12
Viridis-2EP	$k_{5-МОП}$	6,15	3,65	2,98	2,27	1,84	—
	$k_{5,8-диМОП}$	7,11	4,08	3,25	2,39	1,84	—
	$k_{8-МОП}$	5,84	3,65	2,98	2,27	1,84	—
Luna PFP	$k_{5-МОП}$	3,71	3,04	2,18	1,73	1,32	1,15
	$k_{5,8-диМОП}$	2,80	2,31	1,66	1,31	1,03	0,91
	$k_{8-МОП}$	1,97	1,67	1,24	1,02	0,82	0,72

Таблица 4

Коэффициенты удерживания метоксипсораленов на ароматических (этилпиридиновом и пентафторфенильном) сорбентах при использовании изопропанола в качестве соразтворителя в СФХ (относительная погрешность определения коэффициентов селективности $\Delta_r = 0,02$)

Колонка	Коэффициент удерживания	Содержание метанола в подвижной фазе, % об.					
		2	3	5	7	10	12
Viridis-2EP	$k_{5-МОП}$	15,37	11,81	8,05	6,11	4,52	—
	$k_{5,8-диМОП}$	17,98	13,40	8,86	6,59	4,79	—
	$k_{8-МОП}$	12,26	9,62	6,74	5,21	3,93	—
Luna PFP	$k_{5-МОП}$	4,99	4,27	3,20	2,59	1,97	1,64
	$k_{5,8-диМОП}$	3,48	2,99	2,19	1,74	1,28	1,04
	$k_{8-МОП}$	2,37	2,08	1,48	1,18	0,86	0,69

шую селективность по отношению к метоксипсораленам из всех изученных нами НФ. Практически вне зависимости от вида и процентного содержания соразтворителя в ПФ данный сорбент позволяет получить полное разделение всех трех исследовавшихся МОПов (см. таблицы 3 и 4). На рис. 8 приведен типичный результат, получаемый на пентафторфенильном сорбенте.

Порядок элюирования МОПов в этой системе не совпадает ни с одним из регистрировавшихся ранее: $8-МОП < 5,8-диМОП < 5-МОП$. Это единственная из изученных нами систем, в которой 5-МОП сильнее всех остальных компонентов удерживается в условиях сверхкритической хроматографии. При этом коэффициенты селективности его разделения с ближайшим соседом достаточно велики, чтобы позволить вести препаративные разделения с высокой степенью перегрузки сорбента, приводящей к «нелинейности» сорбции и, соответственно, появлению больших хвостов пиков, без риска загрязнения продукта следами элюирующегося рядом компонента при сборе 5-МОПа (см. таблицы 3 и 4).

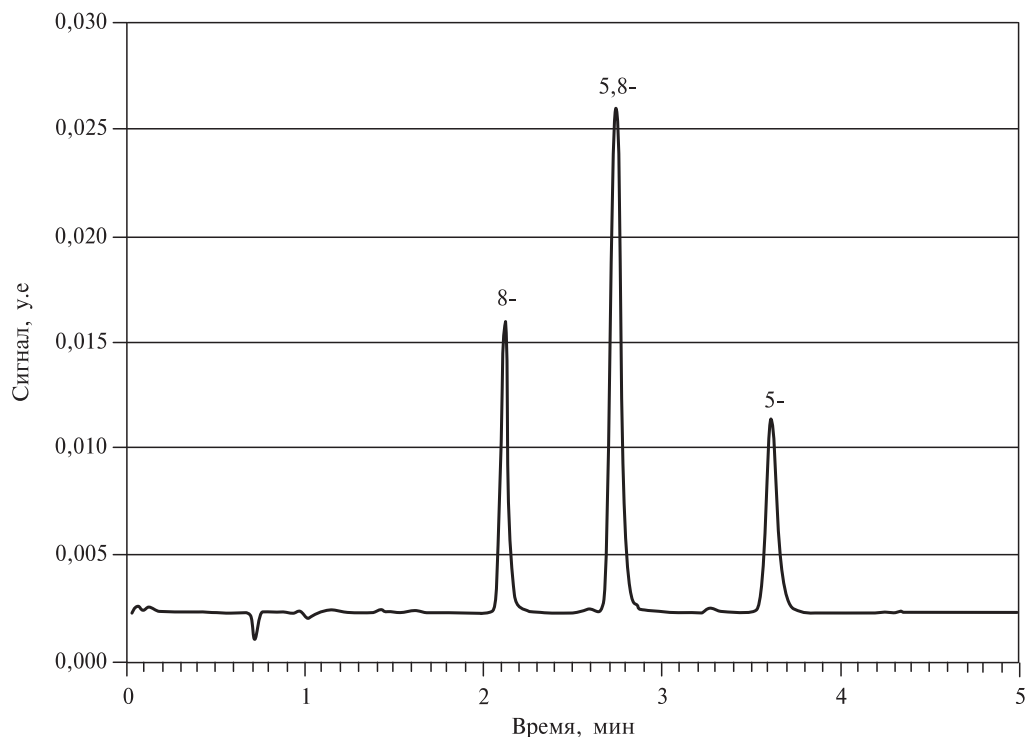


Рис. 8. Разделение метоксипсораленов на пентафторфенильном сорбенте. Luna PFP, CO₂/iPrOH 97/3, 100 бар, 25 °С, 5 мл/мин

ОБСУЖДЕНИЕ

Сорбенты с полярными неароматическими группами

Разделения на сорбентах с полярными неароматическими группами обычно обусловлены водородными связями, кислотно-основными и диполь-дипольными взаимодействиями [33]. Развитию подхода к синтезу и модифицированию хроматографических сорбентов, основанному на прививке модификаторов, преимущественно способных участвовать в образовании водородных связей и сильных кислотно-основных взаимодействиях, традиционно способствовало устоявшееся понимание механизмов разделения в нормально-фазовой жидкостной хроматографии. В ней традиционно происходит сорбция сравнительно полярных веществ на полярных сорбентах, а элюирование осуществляется сравнительно неполярным растворителем. Поскольку исторически сверхкритическая флюидная хроматография с насадочными колонками развивалась как вариант нормально-фазовой техники [34], в ней использовались в основном полярные сорбенты, и поиск оптимальных условий разделения во многом продолжал описанную выше практику, что до некоторой степени сужало круг решавшихся задач. Однако одно из преимуществ сверхкритической флюидной хроматографии перед жидкостной как раз и заключается в возможности проводить селективные разделения на основе иных, более тонких эффектов, чем образование водородных связей и кислотно-основные взаимодействия. В обращенно-фазовой хроматографии такие эффекты не могут проявиться в полной мере на фоне мощных сольвофобных взаимодействий, обус-

ловленных стремлением наиболее часто используемого растворителя — воды — поддерживать свою сеть водородных связей ненарушенной. В практике же нормально-фазовой хроматографии зачастую, несмотря на теоретическую применимость «тонких» решений, для их реализации необходимо создание и поддержание трудноосуществимых условий: создание стабильной и воспроизводимой системы НФ — ПФ при малых долях полярного сорбента в элюенте, чувствительное детектирование на фоне большого количества углеводородного растворителя в составе ПФ и др. Кроме того, как уже упоминалось, это требует больших расходов токсичных органических растворителей как на само элюирование, так и на длительное уравнивание системы при смене условий.

Разделение смесей близких по структуре фурукумаринов, в том числе метоксипсораленов, — типичная хроматографическая задача, для решения которой желательно привлечь более тонкие инструменты, нежели сильные водородные связи, так как в структуре большинства фурукумаринов отсутствуют доноры протона, участвующего в образовании водородных связей такого типа. Мы полагаем, что недостаточное разделение связано именно с неспособностью полярных фаз (Kromasil Silica, Kromasil Diol, Kromasil CN) вступать в иные взаимодействия, кроме образования водородных связей, кислотно-основных (в некоторых случаях) и диполь-дипольных. Разделение метоксипсораленов на этих полярных сорбентах в СФХ управляется лишь дипольным моментом, молекулярной массой аналита и его способностью выступать в качестве слабого акцептора протона. Все эти свойства недостаточно различаются в исследуемых метоксипроизводных псоралена, чтобы на их основе можно было построить качественное хроматографическое разделение.

Инверсия порядка элюирования 8-МОПа и 5,8-диМОПа с силикагеля, наблюдавшаяся при замене изопропанола на метанол, — любопытное хроматографическое явление, причины которого не вполне ясны. В целом, инверсия порядка элюирования при качественных и даже количественных изменениях в составе элюента неоднократно наблюдалась — как в практике ВЭЖХ, так и в СФХ, в том числе и при проведении разделений близких по структуре веществ, например, энантиомеров [35—37]. Как правило, если аналиты обладают сравнимой растворимостью в элюенте и не вступают с ним в какие-либо специфические взаимодействия, то инверсия порядка элюирования при изменении состава ПФ бывает обусловлена изменениями характера или степени модификации поверхности сорбента элюентом. В данном случае мы предполагаем, что причиной обращения порядка элюирования является различная адсорбция спиртов на поверхности силикагеля. Компоненты подвижной фазы СФХ могут образовывать полимолекулярный адсорбционный слой на поверхности сорбента [34, глава 4, пункт 4], тем самым обуславливая реализацию как минимум двух механизмов удерживания аналита на сорбенте — адсорбционного и распределительного. Различный вклад этих двух механизмов в удерживание при использовании разных спиртов может обуславливать наблюдавшуюся инверсию. С одной стороны, 5,8-диМОП обладает большей массой, большим молекулярным объемом и, главное, содержит большее число атомов кислорода, способных служить акцепторами протона, что должно приводить к большей энергии его сорбции на немодифицированном силикагеле. С другой стороны, 8-МОП обладает более высоким дипольным моментом, поскольку все атомы кислорода в его структуре ближе друг к другу. Присутствующая в 5,8-диМОПе метоксигруппа в 5-м положении выравнивает распределение электронной плотности в молекуле, приводя к понижению дипольного момента, что

может уменьшать время удерживания этого анализата, если разделение обусловлено фактором полярности. Соответственно, при значительном вкладе распределительного механизма в удерживание, обусловленное образованием слоя неподвижной жидкой фазы на сорбенте, 8-МОП может удерживаться дольше 5,8-диМОПа за счет большей энергии сольватации метанолом. Мы полагаем, что при малых долях спиртового соразтворителя в элюенте в условиях СФХ вклады адсорбционного и распределительного факторов сопоставимы. И разница в энергии сорбции метанола и изопропанола на силикагеле может быть достаточной для того, чтобы определять баланс между двумя механизмами удерживания и, как следствие, вызывать обращение порядка элюирования двух близких по структуре анализатов.

Примечательно, что отличный от стандартного порядок элюирования МОПов наблюдался только для сорбентов, в которых активные группы на поверхности представлены только гидроксильными (силикагель и диольная фаза), и при использовании метанола в качестве соразтворителя. Это косвенно свидетельствует о наличии вклада распределительного механизма в разделение фурукумаринов в СФХ на полярных сорбентах. Возможность реализации в СФХ механизмов разделения, основанных на распределении между подвижной и неподвижной жидкими фазами, подобно тому, как это происходит в гидрофильной хроматографии, в последнее время часто обсуждается различными группами исследователей [38, 39]. Как правило, эти взаимодействия рассматриваются для ПФ, содержащих воду, но небезосновательны предположения о возможности реализации аналогичных механизмов в СФХ при использовании полярных спиртов без добавок воды. В то же время, неопровержимых доказательств главенствующей роли именно распределительного механизма в отсутствие воды в современной литературе нет. Для ответа на вопрос о влиянии полимолекулярного адсорбированного слоя полярного спиртового растворителя на порядок элюирования фурукумаринов с полярных колонок потребуется более детальное исследование природы наблюдаемой инверсии, возможно, с привлечением иных типов ПФ, склонных к участию в гидрофильных взаимодействиях (аминной, амидной, полиольной, поливинилспиртовой и т. п.).

Высказанные предположения дискутируемы, их проверка в рамках описываемой работы представлялась трудноосуществимой и избыточной. Сила взаимодействий, которые могли бы обусловить инверсию порядка элюирования МОПов, невелика, особенно в сравнении с силой водородных связей, характерных для силикагеля. Однако и наблюдавшаяся разница в коэффициентах удерживания также отвечает небольшим различиям в энергии связывания различных соединений на данном сорбенте (см. рис. 3). Некоторые из высказанных предположений в дальнейшем могут быть проверены, например, с использованием сорбентов с короткими алкильными группами (C_1), а также с помощью опытов по СФХ разделению иных 5- и 8-производных псоралена.

Обращенно-фазовые сорбенты

Сорбенты с привитыми длинными неразветвленными алкильными группами чрезвычайно широко используются в обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Как уже отмечалось, в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с их помощью реализуются, прежде всего, сольвофобные и неспецифические ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Первый тип взаимодействий неосуществим в СФХ и не представляет интереса, второй же вряд ли позволит набрать необходимую разницу в удерживании метоксипроизводных псоралена, чтобы обеспечить эффективное хроматографическое разделе-

ние на стандартных колонках. Полученные экспериментальные данные подтверждают это предположение. Большинство успешных разделений, осуществляемых в СФХ с помощью фаз типа C_{18} , реализуются либо за счет значительного вклада липофильных взаимодействий (разделение углеводов, триглицеридов жирных кислот, терпеноидов и т.п.), либо за счет фракционирования аналитов по молекулярным объемам [25, 34]. В случае метоксипсораленов одних этих факторов, по-видимому, недостаточно для успешного разделения.

В практике аналитической ОФ-ВЭЖХ разделение сложных фурукумариновых смесей осуществляется с помощью многокомпонентных подвижных фаз, как правило, включающих апротонные растворители сравнительно невысокой полярности — ТГФ, этилацетат и т.п. Это продиктовано желанием подобрать ПФ, максимально чувствительную к малым различиям в структуре фурукумаринов, ввиду неэффективности использования НФ как фактора селективности удерживания. Как отмечают сами авторы таких исследований [11, 12], несмотря на наработанные навыки оптимизации состава ПФ, разделение трех метоксипроизводных, рассматриваемых в данной работе, представляет собой сложную задачу для ОФ-ВЭЖХ.

Примечательно, тем не менее, что какое-то проявление липофильных взаимодействий МОПов с C_{18} наблюдается в сравнении с короткоалкильными сорбентами. Неудерживание фурукумаринов на C_4 — характерный признак того, что обращенно-фазовый режим не годится для разделения этих смесей с помощью СФХ. Возможно, если бы фактор липофильных взаимодействий удалось многократно увеличить, например, за счет использования еще более длинных алкильных цепочек (сорбенты типа C_{30}) либо путем применения неполярных полимерных НФ, то этот механизм разделения можно было бы осуществить. Однако полученные данные свидетельствуют о том, что для создания успешного сепарационного процесса на основе липофильного взаимодействия потребуется действовать только с помощью экстенсивных факторов — использовать очень длинные колонки и большие объемы сорбента. Это в известной мере обесценит внедрение такой тонкой технологии как сверхкритическая хроматография в процесс выделения лечебных фурукумаринов из растительного сырья.

В целом можно заключить, что ни полярные неароматические, ни алкильные алифатические группы на поверхности силикагельных сорбентов не обеспечивают нужной селективности по отношению к исследуемым метоксипсораленам в сверхкритической флюидной хроматографии. В дальнейшем следует сосредоточить усилия на иных способах достижения селективности в разделении позиционных изомеров соединений, не склонных к образованию водородных связей.

Сорбенты с ароматическими группами

Коэффициенты удерживания МОПов на фенилгексильных сорбентах не сильно отличаются от таковых на чисто алкильных обращенно-фазовых сорбентах, но, в отличие от последних, фенилгексильные колонки дают возможность разделить все три компонента исследуемой смеси. Это может быть связано лишь с реализацией некоего дополнительного механизма удерживания, селективного по отношению к МОПам. В случае фенилгексильной группы таким механизмом могут быть только ароматические π -электронные взаимодействия. Однако сам по себе факт наличия таких взаимодействий еще не объясняет появления у сорбента селективности в разделении метоксипроизводных псоралена. Первоначально напрашивающееся предположение о природе такого взаимодействия — π - π -стекинг фенильного кольца и ароматической π -системы псоралена — не дает ответа на

вопрос о селективности и изменении порядка элюирования МОПов. В частности, предположение не объясняет такого разительного отличия в удерживании позиционных изомеров — 8-МОП и 5-МОП, которые практически эквивалентны с точки зрения кольцевых π -электронных систем.

Аналогичная картина наблюдается и при использовании 2-этилпиридинового сорбента. На нем реализуется тот же порядок элюирования, что и на фенолгексильном (8-МОП < 5-МОП < 5,8-диМОП), хотя и с заметно большими коэффициентами удерживания. Логично предположить, что аналогичность результатов свидетельствует о родстве механизмов межмолекулярного взаимодействия, обеспечивающих селективность разделения на этих двух сорбентах. Единственная особенность структуры, присущая обоим этим сорбентам, — наличие ароматического кольца. Мы полагаем, что порядок элюирования МОПов с этилпиридиновой колонки, отличающийся от характерного для других полярных сорбентов, а также более высокая селективность разделения обусловлены именно вкладом ароматических взаимодействий, обеспечиваемых пиридиновой группой.

Насколько нам известно, ранее вклад ароматических взаимодействий никогда не учитывался при рассмотрении механизмов удерживания на этилпиридиновых колонках. Этот популярный сорбент, разработанный около 10 лет назад специально для сверхкритической флюидной хроматографии, в основном применяется для разделения сильных органических оснований. Пиридиновая группа в его структуре призвана обеспечить условия сорбции оснований, позволяющие добиться формы пика, близкой к гауссовой, без применения динамических модификаторов, подавляющих кислотно-основную диссоциацию [40]. Соответственно, чаще всего эта фаза применяется в условиях, благоприятствующих проявлению лишь сильных межмолекулярных взаимодействий, так как для элюирования основных соединений в СФХ требуются элюенты с высоким содержанием полярного сорбителя. Тем не менее, анализ работ, посвященных исследованию механизмов удерживания различных сорбатов в СФХ на разных сорбентах, позволяет предположить, что наблюдение вклада π -электронных взаимодействий в селективность на этилпиридиновых сорбентах, сделанное в ходе настоящего исследования, не является единичным. Так, например, в работах [41, 42] при использовании в качестве одной из групп тестовых соединений орто-, мета- и паранитрофенолов регистрировались значительные различия в коэффициентах селективности мета/пара производных при использовании 2-этилпиридинового и остальных полярных сорбентов. Сорбенты на основе силикагеля с привитыми к нему полярными группами (циано, диольная), а также с адсорбированными на нем полярными полимерными группами (полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт) показывали практически идентичную селективность по отношению к данной группе позиционных изомеров; 2-этилпиридиновый же сорбент позволял добиться существенно большей селективности и в целом большего удерживания нитрофенолов. Мы полагаем, что такое поведение можно объяснить, если учесть возможность осуществления различных ароматических взаимодействий между π -электронами и неподеленными электронными парами нитрофенолов и ароматической π -системой пиридинового кольца сорбента. Также другие исследователи (см. пункт 3.5 работы [43] и ссылки в нем) отмечали, например, неожиданно высокую селективность этилпиридиновых колонок по отношению к гомологам алкилбензолов в сравнении с другими полярными фазами, инверсию порядка элюирования ряда компонентов в одинаковых условиях на циано- и этилпиридиновых фазах и некоторые другие особенности поведения 2-этилпиридиновых сорбентов, позволя-

ющие предполагать участие π -электронов ароматической системы пиридина в удерживании.

Разделение метоксипсораленов на пентафторфенильном сорбенте представляет особый интерес с точки зрения анализа роли ароматических взаимодействий при работе с этими соединениями в СФХ. Как показано, данная НФ обладает самой высокой селективностью по отношению к целевым анализам, позволяет проводить разделения, масштабируемые до препаративных объемов, с высокой скоростью при низких долях соразтворителя в ПФ. ПФФ-колонки традиционно используют в обращенно-фазовой ВЭЖХ в тех случаях, когда необходимо получить иную селективность по сравнению с алкильными сорбентами, прежде всего, за счет большой склонности пентафторфенильных фрагментов вступать в диполь-дипольные и ароматические π -электронные взаимодействия. В литературе нам удалось обнаружить один случай применения ПФФ-сорбентов для разделения сложной смеси фурукумаринов с помощью СФХ [30]. Авторы пришли к аналогичным выводам относительно оптимального соответствия ПФФ задаче разделения фурукумаринов в СФХ и предложили качественное объяснение этому явлению, заключающееся в высокой роли π - π -взаимодействий в такой системе. Однако остается открытым вопрос о неожиданном порядке элюирования на таком сорбенте, не совпадающем ни с одной из иных исследованных систем НФ—ПФ. Анализ данных, приведенных в [30], показывает, что наблюдавшаяся нами закономерность воспроизводится и для других видов фурукумаринов. Первыми в системе ПФФ — $\text{CO}_2/\text{РОН}$ элюируются 8-монозамещенные фурукумарины, следом за ними — 5,8-дизамещенные и последними — 5-замещенные. При этом между тремя группами производных наблюдается весьма существенная разница в удерживании, особенно заметная, если учесть градиентный характер элюирования в [30].

Предварительный анализ этих фактов, проведенный нами с привлечением квантовохимических расчетов [44], показывает, что такое поведение плохо объясняется в предположении о π - π -стекинге пентафторфенильных и псораленовых кольцевых систем как основном механизме ароматического взаимодействия ПФФ-сорбента и МОПов. Мы полагаем, что гораздо большую роль в данном случае играют взаимодействия электрононедостаточной π -системы пентафторфенила и неподеленных электронных пар кислорода, входящих в структуру метоксипсораленов. В структуре псоралена три атома кислорода способны вступать в такие взаимодействия, и в отсутствие препятствий, а также более сильных факторов типа водородных связей они могут управлять удерживанием и разделением фурукумаринов. Но в производных псоралена, замещенных в 8-е положение, образованию таких связей мешает стерическое препятствие в виде заместителя в положении, равно близком и к фурановому, и к пирановым кислородам. Проведенные расчеты показывают, что в 8-МОПе метоксигруппа склонна к образованию слабых внутримолекулярных водородных связей типа $\text{C}—\text{H}\cdots\text{O}$ с обоими ближайшими кислородами кольца. Несмотря на кажущуюся малую вероятность подобных взаимодействий, слабые водородные связи с участием метильных групп нередки в органических молекулах [45]. Подобные связи участвуют в стабилизации структуры как небольших молекул [46], так и биологических полимеров [47]. В различных фурукумарилах также регистрировались меж- и внутримолекулярные водородные связи с участием метильных групп [48—51]. Ситуация, наиболее близкая к описываемой в настоящей работе, изложена в [51], где было обнаружено взаимодействие протона метильной группы, входящей в состав алкильного заместителя

в 8-м положении, с кислородом фуранового кольца. В данном случае, а также в случае связи метиленового протона циклогексеновой группы с кислородом заместителя в молекуле архангелина [50] во взаимодействие такого типа вступают даже менее кислые атомы водорода, чем атом водорода метоксильной группы 8-МОПа. В 5,8-диалкоксипроизводных этот фактор также присутствует, и они удерживаются больше 8-монопроизводных: во-первых, за счет большей массы и большего объема молекул, а во-вторых, за счет наличия дополнительного кислородсодержащего заместителя в 5-м положении, способного вступать во взаимодействие с пентафторфенильной группой либо с остаточными силанолами. В случае же 5-монозамещенных фурукумаринов перекрывание электронных облаков неподеленных пар кислорода ароматической системы псоралена и π -орбиталей ПФФ осуществляется наиболее свободно, что приводит к значительному росту коэффициентов удерживания этих веществ на данном сорбенте.

Возможно, эти же соображения помогут объяснить и порядок элюирования МОПов с других ароматических колонок. К влиянию полярных факторов, превалявавших на полярных сорбентах с алифатическими заместителями, в случае этилпиридиновой колонки добавляется влияние ароматических взаимодействий. Поэтому при малых процентах полярного соразтворителя в системе 8-МОП элюируется первым, а 5-МОП выходит с заметным отставанием от него. Впрочем, для полного обоснования такого вывода необходим более детальный анализ вклада различных взаимодействий в удерживание апротонных ароматических соединений на этилпиридиновых сорбентах. К тому же, как уже отмечалось, этилпиридиновая группа способна вступать в различные ароматические взаимодействия, например, взаимодействия типа катион — π -система или типа неподеленная пара азота — π -система, что заметно усложняет интерпретацию хроматографических данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен скрининг ряда полярных нормально-фазовых и неполярных обращенно-фазовых сорбентов, а также ряда соразтворителей в составе подвижной фазы. Показано, что для разделения МОПов целесообразно использовать нормально-фазовый режим разделения с сильной специфической сорбцией фурукумаринов на неподвижной фазе, однако стандартные полярные сорбенты не обеспечивают такой селективности. Показано, что неароматические сорбенты не обладают необходимой селективностью по отношению к фурукумаринам. Выдвинуто предположение о преваляющей роли ароматических взаимодействий в удерживании фурукумаринов на этих двух сорбентах, предложено возможное объяснение порядка элюирования метоксипсораленов с них.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 11-02-01046.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Santana L., Uriarte E., Roleira F., Milhazes N., Borges F.* Curr. Med. Chem. 2004. Vol. 11. No. 24. P. 3239.
2. *Godar D.E.* J. Invest. Dermatol. 1999. Vol. 112. No. 1. P. 3.
3. *Sittig M.* Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia. 2nd edition. New Jersey, USA: Noyes Publications, 1988. P. 1016.
4. *Минина С.А., Каухова И.Е.* Химия и технология фитопрепаратов. М.: ИД «Гэотар-Медиа», 2004. С. 476.
5. *Fitzpatrick T.B., Pathak M.A.* J. Invest. Dermatol. 1959. Vol. 32. No. 2. P. 229.

6. McNeely W., Goa K.L. *Drugs*. 1998. Vol. 56. No. 4. P. 667.
7. Eisenbrand G. *Mol. Nutr. Food Res*. 2007. Vol. 51. P. 367.
8. Serrano-Perez J.J., Gonzalez-Luque R., Merchan M., Serrano-Andres L. *J. Photophys. Photochem A: Chem*. 2008. Vol. 199. P. 34.
9. Hiserodt R., Chen L. An LC/MS method for the analysis of furocoumarins in citrus oil. In *Recent Advances in the Analysis of Food and Flavours*, Toth. S. et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2012.
10. Kaminski M., Kartanowicz R., Kaminski M.M., Krolicka A., Sidwa-Gorycka M., Lojkowska E., Forzeri W. *J. Sep. Sci*. 2003. Vol. 26. P. 1287.
11. Erdelmeier C.A.J., Meier B., Sticher O. *J. Chromatogr. A*. 1985. Vol. 346. P. 456.
12. Wawrzynowicz T., Waksmundzka-hajnos M. *J. Liq. Chromatogr*. 1990. Vol. 13. No. 20. P. 3925.
13. Frerot E., Decorzant E. *J. Agric. Food Chem*. 2004. Vol. 52. P. 6879.
14. Шкаренда В.В., Кузнецов П.В. *Химия природных соединений*. 1992. № 2. С. 155.
15. Шкаренда В.В., Кузнецов П.В. *Химия природных соединений*. 1993. № 2. С. 171.
16. Zogg C.G., Nyiredy Sz., Sticher O. *Chromatographia*. 1989. Vol. 27. P. 591.
17. Пат. США 2889337 (1959).
18. Польский патент 253758 (1989).
19. Liu R., Sun Q., Shi Y., Kong L. *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1076. P. 127.
20. Yan J., Tong Sh., Sheng L., Luo J. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2006. Vol. 29. P. 1307.
21. Erdelmeier C.A.J., Sticher O. *Planta Medica*. 1985. Vol. 51. No. 5. P. 407.
22. Castele K.V., Geiger H., Van Sumere Ch.F. *J. Chromatogr*. 1983. Vol. 258. P. 111.
23. Vourela H., Lehtonen P. *J. Liq. Chromatogr*. 1989. Vol. 12. No. 1—2. P. 221.
24. Bidlingmeyer B.A. *Preparative Liquid Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 1987.
25. Самохин А.С., Ревельский И.А., Чепелянский Д.А., Паренаго О.О., Покровский О.И., Лепешкин Ф.Д., Устинович К.Б., Ревельский А.И. *СКФ-ТП*. 2011. Т. 6. № 4. С. 22.
26. Miller L. *J. Chromatogr. A*. 2012. Vol. 1250. P. 250.
27. Sekhon B.S. *Int. J. Pharm. Tech. Res*. 2010. Vol. 2. No. 2. P. 1595.
28. Cole J., Chen R., Day B.W., Korotchenko V.N. Profiling the Isomerization of Biologically Relevant (E)-(Z) Isomers by Supercritical Fluid Chromatography (SFC). *LCGC North America. The Application Notebook*. June 1, 2009.
29. Покровский О.И., Марколия А.А., Лепешкин Ф.Д., Кувыкин И.В., Паренаго О.О., Гончуков С.А. *СКФ-ТП*. 2009. Т. 4. № 4. С. 61.
30. Desmotreux C., Rothaupt M., West C., Lesellier E. *J. Chromatogr. A*. 2009. Vol. 1216. P. 7088.
31. Кузнецова Г.А. *Природные кумарины и фурокумарины*. Наука, Ленинградское отделение. 1967. 246 с.
32. Carlsson D., Strode J.T., Gyllenhaal O., Karlsson A., Karlsson L. *Chromatographia*. 1997. Vol. 44. P. 289.
33. Lesellier E. *J. Sep. Sci*. 2008. Vol. 31. P. 1238.
34. Berger T.A. *Packed column SFC*. The Royal Society of Chemistry. 1995. 254 p.
35. Gyllenhaal O., Stefansson M. *Chirality*. 2005. Vol. 17. P. 257.
36. Писарев О.А., Кручина-Богданов И.В., Глазова Н.В. *Журн. физич. химии*. 1999. Т. 73. № 3. С. 526.
37. Лебедев Ю.Я. *Журн. физич. химии*. 1997. Т. 71. № 6. С. 1124.
38. Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T., Seest E. *J. Chromatogr. A*. 2012. Vol. 1229. P. 237.
39. West C., Khater S., Lesellier E. *J. Chromatogr. A*. 2012. Vol. 1250. P. 182.
40. Berger T.A., Berger C., Majors R.E. *LCGC North America*, May 1, 2010. <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=669950>
41. West C., Lesellier E. *J. Chromatogr. A*. 2006. Vol. 1110. P. 200.
42. Lesellier E. *User meeting SFC Mettler Toledo, Zermatt*. 2007. <http://www.univ-orleans.fr/icoa/communications/com2007/lesellier4.pdf>
43. Lesellier E. *J. Chromatogr. A*. 2009. Vol. 1216. P. 1881.
44. Zheng J., Taylor L.T., Pinkston J.D. *Chromatographia*. 2006. Vol. 63. P. 267.
45. Jensen S.J.K., Tang T.-H., Csizmadia I.G. *J. Phys. Chem. A*. 2003. Vol. 107. P. 8975.
46. Gosling M.P., Pugliesi I., Cockett M.C.R. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2010. Vol. 12. P. 132.
47. Horowitz S., Yesselman J. D., Al-Hashimi H.M., Triebel R. C. *J. Biol. Chem*. 2011. Vol. 286. No. 21. P. 18658.

*Препаративное разделение метоксипроизводных
псоралена с помощью сверхкритической флюидной хроматографии*

48. Wolska I., Borowiak T., Gawron M. Acta Cryst. 1990. Vol. C46. P. 2146.
49. De Oliveira P.E.S., Conserva L.M., De Simone C.A., Pereira M.A., Malta V.R.S., Imbroisi D.O. Acta Cryst. 2004. Vol. C60. P. o900.
50. Magotra D.K., Gupta V.K., Rajnikant, Goswami K.N., Thappa R. Acta Cryst. 1995. Vol. C51. P. 2196.
51. Padha N., Subramanian E., Dass A.K., Mazumdar S.K., Goswami K.N. Cryst. Res. Technol. 1995. Vol. 30. No. 2. P. 205.
-
-

**PREPARATIVE SEPARATION OF PSORALEN METHOXY-DERIVATIVES
BY SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY**

**¹O.I. Pokrovskiy, ¹A.A. Krutikova, ¹K.B. Ustinovich, ¹O.O. Parenago,
²M.V. Moschnin, ²S.A. Gonchukov, ¹V.V. Lunin**

¹*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of RAS, Moscow, Russia*

²*National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia*

A method for separation of isomeric psoralen methoxy-derivatives, namely bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin, is developed. The results of sorbent screening allow one to consider a normal phase elution regime as optimal for separation of these compounds in SFC. The analysis of methoxypsoralen (MOP) retention mechanisms showed that the same one is responsible for MOP's separation on all tested silica sorbents containing polar groups, except 2-ethylpyridine and pentafluorophenyl. A possible explanation of the observed MOP's retention phenomena is given. In the case of pentafluorophenyl sorbent π -electron intermolecular interactions play a key role in separation of closely related MOPs. It is likely that the same effects are responsible for a specific order of MOP's elution observed when 2-ethylpyridine sorbent is used.

Key words: supercritical fluid chromatography, furocoumarin, methoxypsoralen, retention mechanisms.
