



На правах рукописи

**Анисимович Ирина Петровна**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ТРЕХ ГРУПП  
ЛИПОФИЛЬНОСТИ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
И ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ СПОСОБОМ**

02.00.02 – аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

**1 9 МАЙ 2011**

Воронеж – 2011

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Белгородский государственный национальный исследовательский университет"

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент  
**Дейнека Виктор Иванович**

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор  
**Яшин Яков Иванович**

доктор химических наук, профессор  
**Рудаков Олег Борисович**

Ведущая организация: Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН

Защита состоится «03» июня 2011 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.19 при Воронежском государственном университете, расположенном по адресу: 394006, г. Воронеж, Университетская пл.1, ауд. 439.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Воронежского государственного университета.

Автореферат разослан «28» апреля 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета



М.Ю. Крысин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Многокомпонентность природных матриц требует использования специальных методов определения индивидуальных составляющих таких смесей, в число которых входит высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в обращенно-фазовом (ОФ) варианте. Особо актуальными вследствие современных тенденций отказа от синтетических субстанций и перехода на природные соединения является разработка новых эффективных аналитических методов, предназначенных для качественного и количественного определения биологически активных веществ. При широком использовании ВЭЖХ в практике лабораторий всего мира научно обоснованный выбор условий разделения и методов качественной идентификации компонентов сложных смесей стал возможным только в настоящее время после разработки ряда новых способов обработки и сопоставления экспериментальных данных по удерживанию сорбатов. Использование научно обоснованных методов выбора условий разделения компонентов особенно актуально вследствие наличия на рынке большого числа марок стационарных фаз с различными факторами удерживания аналитов в идентичных подвижных фазах, при этом в ряде случаев возможно использование математической зависимости относительного удерживания для предварительной идентификации соединений при отсутствии соответствующих стандартных веществ. В свете развития современных технологий получения и использования супрамолекулярных комплексов «гость-хозяин» большое значение имеет установление качественных и количественных закономерностей их образования, которые могут быть установлены при использовании ОФ ВЭЖХ.

**Цель диссертационной работы.** Разработка эффективного способа определения водорастворимых кислот и разработка хроматографических систем для разделения кислот трех групп липофильности в условиях обращенно-фазовой хроматографии для предварительного качественного определения аналитов с использованием современных технологий сопоставления данных.

**Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:**

1. Разработка титриметрического способа с использованием двух электрохимических датчиков (потенциометрического и кондуктометрического) для определения кислотности и средней основности смеси кислот и их солей с сопоставлением результатов до и после обработки образца ионообменными смолами.

2. Обоснованный выбор стационарных и подвижных фаз для разработки хроматографических условий разделения и качественного определения трех групп карбоновых кислот различных диапазонов липофильности методом обращенно-фазовой хроматографии.

3. Построить карты разделения фенольных и жирных кислот для выбора условий ВЭЖХ – определения и качественного определения аналитов по методу относительного анализа удерживания.

4. Исследовать влияния двух типов заместителей (ОН- и ОСН<sub>3</sub>-групп) бензольного кольца на комплексообразование фенольных кислот с β-циклодекстрином и связанного с этим изменением удерживания в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

### **Научная новизна.**

Показано, что кислотно-основное титрование с двумя электрохимическими датчиками (потенциометрическим и кондуктометрическим) до и после обработки образца катионообменными смолами позволяет определить не только титруемую кислотность, но и среднюю основность кислот образца, а также долю солей.

Сопоставление параметров удерживания аналитов, – времен удерживания для водорастворимых кислот или логарифмов факторов удерживания для остальных групп кислот, – на стационарных фазах с различной длиной привитых алкильных радикалов позволяет предположить механизм сорбции кислот и обосновать выбор типа стационарной фазы для определения кислот в методе обращенно-фазовой хроматографии с учетом диапазонов устойчивости аналитической формы сорбатов и особенностей свойств стационарных фаз.

Построены карты разделения фенольных и жирных кислот, подтверждена их прогностическая роль для качественной идентификации компонентов сложных смесей, включая возможность переноса данных по удерживанию с одних хроматографических систем на другие, а также с группы производных бензойной кислоты на группу аналогичных производных коричной кислоты, или наоборот, и также для структурно-группового анализа высших жирных кислот.

Определены константы комплексообразования кислот с  $\beta$ -циклодекстрином в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ и определено влияние заместителей (ОН- и ОСН<sub>3</sub>-групп) на устойчивость комплексов; определены константы и особенности комплексообразования трех изомерных хлорогеновых кислот.

### **Практическая значимость.**

Использование титриметрического способа с двумя электрохимическими датчиками позволяет определять качество и устанавливать фальсификацию в случае некоторых натуральных соков, для контроля технологии их производства. Разработанные хроматографические способы могут быть использованы для поиска источников биологически активных соединений (трех изученных групп кислот) в природных материалах, для контроля наследования соответствующих свойств при выведении новых сортов растений, для установления качества, подлинности продуктов переработки растительного материала и установления фальсификации.

Методики апробированы в ООО «Таксифолия», в экспертно-криминалистическом центре УВД по Белгородской области и на кафедре химии агрономического факультета Белгородской государственной сельскохозяйственной академии.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Титриметрический способ с использованием двух электрохимических датчиков (потенциометрического и кондуктометрического) и ионного обмена позволяет определить кроме кислотности образцов, среднюю основность кислот и долю солей.

2. Водорастворимые кислоты удерживаются в условиях обращенно-фа-

зовой хроматографии за счет гидрофобного выталкивания на поверхность сорбента, поэтому длина радикала привитой фазы не имеет принципиального значения, но необходим выбор фаз, устойчивых к «коллапсу»; фенольные кислоты также удерживаются за счет поверхностной сорбции, в то время как для высших жирных кислот увеличение удерживания можно добиться за счет увеличения длины радикала привитой фазы.

3. Карты разделения фенольных и высших жирных кислот, построенные по методу относительного анализа с использованием лишь двух наборов экспериментальных данных, позволяют определять оптимальные составы подвижных фаз для полного разделения выбранных компонентов, идентифицировать аналиты сложных смесей в иных хроматографических условиях.

4. Константы комплексообразования производных бензойной и коричневой кислот растут при введении гидроксильной группы в *пара*-положение, затем снижаются при добавлении заместителя в *мета*-положение и падают почти до нуля при введении заместителей в оба *мета*-положения; при этом замена гидрофильного (ОН-группы) заместителя на гидрофобный (-ОСН<sub>3</sub>-группу) приводит к снижению стабильности комплекса.

**Апробация работы.** Основные результаты исследований были доложены на следующих конференциях: Седьмая междунар. науч.-практ. конф. «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности» (Санкт-Петербург, 2009), III Всеросс. науч. школа-семинар с междунар. участием «Хроматографические, ионообменные и мембранные процессы» (г. Воронеж, 2009), Всеросс. конфер. с эл. науч. школы «Нано- и супрамолекулярная химия в сорбц. и ионообм. проц.» (г. Белгород, 2010), Всеросс. конфер. «Хроматография – народному хозяйству» (г. Дзержинск, 2010), XII Междунар. конфер. «Физико-химические основы ионообменных процессов (ИОНИТЫ – 2010)» (г. Воронеж, 2010).

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 10 статей, 9 из которых в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ для опубликования научных трудов, и 3 тезисов и материалов конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 5 глав, списка литературы из 318 источников, приложений. Материал работы изложен на 182 страницах, содержит 87 рисунков, 35 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 дан обзор основных методов определения водорастворимых, фенольных и жирных кислот.

В главе 2 приводится описание методов, использованных в работе, и параметры метрологической аттестации разработанных методик. Работа была выполнена с использованием рН-150М, кондуктометра АНИОН 4100 и хроматографической системы, составленной из: инжектора Rheodyne 7740, насоса Altex-Beckman 110А, спектрофотометрического и рефрактометрического детекторов.

В главе 3 «Определение водорастворимых карбоновых кислот», представлены результаты исследований, и обсуждение полученных результатов определения водорастворимых карбоновых кислот (лимонной, щавелевой, винной, яблочной, янтарной) с помощью кислотно-основного титрования с применением двух электрохимических датчиков. Методом потенциометрического титрования можно определить лишь последнюю точку эквивалентности для моно-, двух- и трехосновных органических карбоновых кислот, в то время как кондуктометрический контроль позволяет определить первую точку эквивалентности, а комбинация этих методов позволяет рассчитать среднюю основность комплекса органических кислот, характеристическую для соков различных растительных материалов. Так как реальные объекты представляют собой буферные смеси кислот и их солей, перед титрованием соли необходимо перевести в кислоты обработкой катионообменной смолой в  $H^+$ -форме. Это позволяет рассчитать среднюю основность кислот образца и среднюю долю солей. Доверительный интервал результата при вероятности 0.95 составит  $\pm 1.33 \cdot 10^{-6}$  (0.96 %) и  $\pm 1.39 \cdot 10^{-6}$  (0.77 %) без и с обработкой ионообменной смолой, соответственно. Такой способ, в отличие от определения титруемой кислотности, позволит обнаружить искусственные добавки лимонной кислоты к сокам с основной двухосновной кислотой и наоборот. Разработанный способ использован для определения титруемой кислотности и средней основности кислот некоторых популярных фруктов, соков и ряда прохладительных напитков. Для контроля достоверности полученных результатов использован метод ОФ ВЭЖХ, результаты, полученные двумя методами, совпадали для всех исследованных образцов.

Первая проблема, которую необходимо решать при разработке методики определения аналитов с использованием ОФ ВЭЖХ это выбор стационарной фазы (НФ), который определяется механизмом сорбции и условиями существования стабильной формы аналита. Для выяснения механизма сорбции использовали колонки с различными НФ (Kromasil 100-5C18 и Kromasil 100-5C8), построенными на одной и той же силикагелевой матрице в нескольких различных составах подвижной фазы на основе ацетонитрила и воды.

Вторая проблема – выбор подвижной фазы (ПФ), который определяется условиями стабильности аналитической формы аналита, и может быть ограничен параметрами устойчивости НФ и зависит от липофильности аналитов, от которой зависит доля органического модификатора в ПФ. Липофильность –  $\log P$ , логарифм константы распределения аналита между октанолом-1 и водой, – в настоящее время в мировой науке рассматривается как важнейший параметр, от которого зависит биологическая активность аналитов; он используется в поиске корреляций между удерживанием и строением аналитов.

Показано, что в случае водорастворимых карбоновых кислот различий между их удерживанием на НФ C8 и C18 практически нет, что свидетельствует в пользу механизма гидрофобного выталкивания (рис. 1). Следовательно, в этом случае принципиально не важна длина радикала привитой фазы, хотя при ее уменьшении возможно дополнительное образование водородных связей с остаточными силанольными группами, которое может изменить селективность разделения.

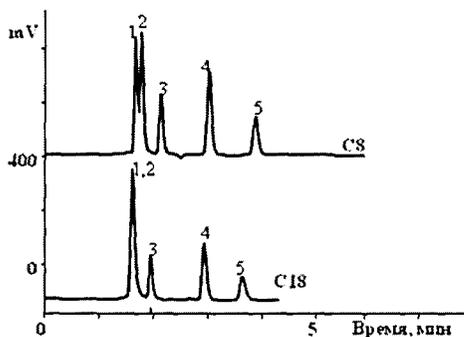


Рис. 1. Хроматограммы карбоновых водорастворимых кислот.

ПФ: 3% ацетонитрила, 0,1% фосфорной кислоты в воде на обращенных фазах 150×4,6 мм Kromasil 100-5C8; 150×4,6 мм Kromasil 100-5C18; 1 – цитрусовая, 2 – винная, 3 – яблочная, 4 – лимонная, 5 – янтарная кислоты

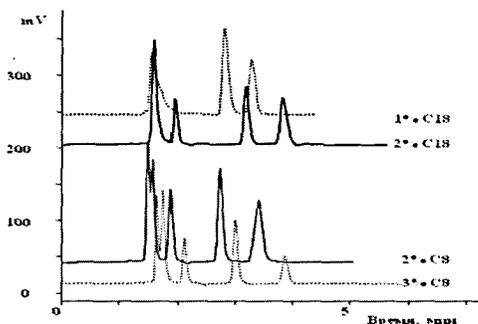


Рис. 2. Изменение удерживания водорастворимых карбоновых кислот при изменении концентрации ацетонитрила в ПФ.

ПФ: ацетонитрил, 0,1 % ортофосфорной кислоты в воде на обращенных фазах C8: 150×4,6 мм Kromasil 100-5C8, и C18: 150×4,6 мм Kromasil 100-5C18

специально разработанной НФ, для водных растворов, – марки Reprosil-PurC18-AQ.

В 4 главе «Определение фенольных кислот», обсуждены основные закономерности удерживания фенольных кислот в условиях ОФ ВЭЖХ и методы изменения селективности их разделения.

Фенольные кислоты являются умеренно полярными веществами, причем полярные группы – карбоксильная и фенольная, расположены с двух противоположных сторон плоской молекулы. Следовательно, внедрение молекулы внутрь обращенной фазы маловероятно, и удерживание таких соединений должно обуславливаться их гидрофобным выталкиванием на поверхность привитой фазы. Это было

На обеих стационарных фазах ClogP неудовлетворительно коррелирует с экспериментальными данными по удерживанию гидрофильных кислот – неверно предсказывается даже порядок элюирования кислот, поэтому прогностический характер этого параметра для сильно гидрофильных веществ невелик.

Высокая гидрофильность типичных карбоновых

кислот предполагает проводить их разделение в подкисленных водных растворах с минимальными добавками органического модификатора. Необходимость добавки органического модификатора продиктована желанием подавления возможного эффекта «коллапса фаз». По определению обращенно-фазовая хроматография характеризуется ростом удерживания при уменьшении концентрации органического модификатора. Однако на стационарных фазах марки Kromasil с уменьшением концентрации ацетонитрила в подвижной фазе время удерживания кислот уменьшается (рис. 2).

Для определения гидрофильных карбоновых кислот мы использовали колонку со

подтверждено близостью удерживания аналитов на двух различных обращенных фазах (рис. 3), зависимость удерживания сорбатов на С8-фазе относительно их удерживания на С18-фазе прямолинейна с тангенсом угла наклона близким к единице (рис. 4).

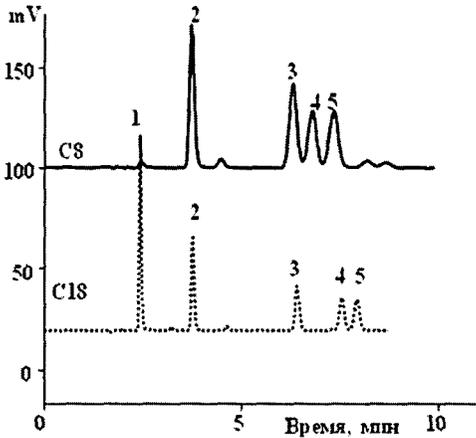


Рис. 3. Разделение коричневых и хлорогеновой кислот на обращенных фазах С8 и С18

ПФ: 17,5% ацетонитрила, 2% уксусной кислоты в воде; 1 — хлорогеновая кислота, 2 — кофейная кислота, 3 — кумаровая кислота, 4 — синаповая, 5 — феруловая кислота

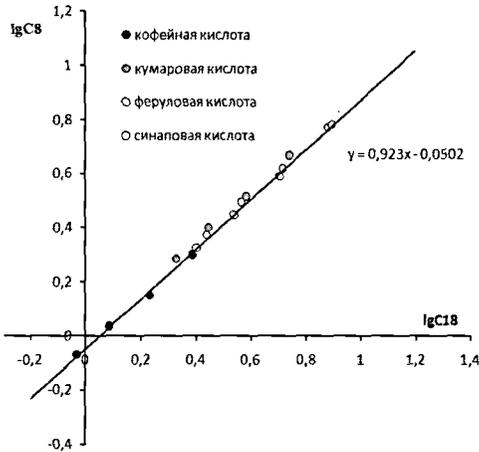


Рис. 4. Сопоставление удерживания коричневых кислот на обращенных фазах С8 и С18

ПФ: 12,5%, 15%, 17,5%, 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 2%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  в воде

При малых добавках органического модификатора порядок элюирования одготипных фенольных кислот близок для производных бензойной и коричной кислот и заметно лучше (по сравнению с водорастворимыми кислотами) коррелирует с ClogP.

Строго говоря, точных соответствий между ClogP и экспериментальными данными для производного состава подвижных фаз получить в принципе нельзя, поскольку соотношения между параметрами удерживания аналитов зависят не только от типа стационарной фазы, но и состава подвижной фазы. Эти соотношения удобнее всего исследовать с применением карты разделения, построенной по методу относительного анализа удерживания (ОАУ), с использованием одного из аналитов в качестве реперного.

Такой метод подходит для исследования целого ряда вопросов:

1) Для построения карты разделения достаточно данных в двух различных составах подвижных фаз. На полученной в настоящей работе карте для разделения девяти фенольных кислот в интервале  $0 < \lg k(p\text{-кумаровой кислоты}) < 1$ , обнаруживается инверсии порядка элюирования, и в трех зонах удерживание пар веществ практически сравнивается.

Возможные варианты составов подвижной фазы для разделения могут быть найдены по предложенной схеме на рис. 5.

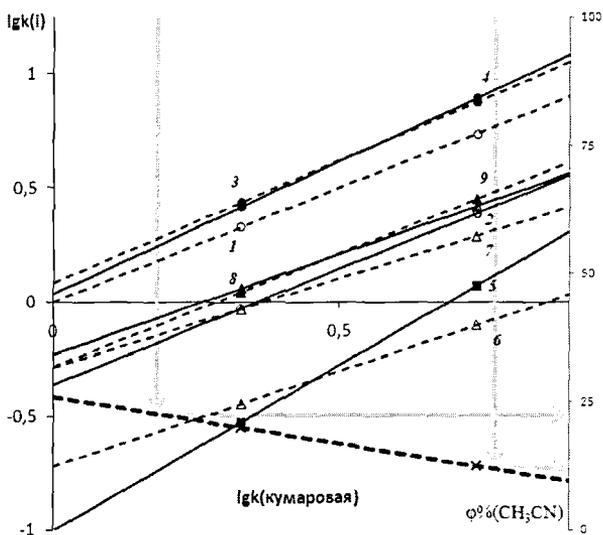


Рис. 5. Карта разделения фенольных кислот

1 – кумаровая, 2 – кофейная, 3 – феруловая, 4 – синаповая, 5 – хлорогеновая, 6 – дигидроксibenзойная, 7 – гидроксibenзойная, 8 – ванилиновая, 9 – сиреневая кислоты

2) Сопоставление линий тренда для производных коричной и бензойной кислот показывает существование определенных аналогий при однотипном изменении строения основы (рис. 6).

Следовательно, результаты, полученные для изменения удерживания фенольных кислот ряда бензойных, могут быть перенесены на изменение удерживания коричных кислот, и можно предположить возможность переноса полученных закономерностей на другие классы соединений, содержащие их фрагмент. Например, неплохое качественное соответствие получено в настоящей работе при сопоставлении ряда коричных кислот и антоцианов, поскольку общим свойством для них является наличие кольца Б, структурно

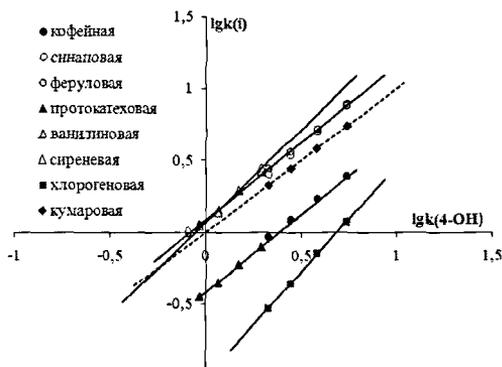


Рис. 6. Относительное удерживание фенолокислот на обращенной фазе  $250 \times 4,6$  мм Kromasil 100-5C18

могут быть перенесены на изменение удерживания коричных кислот, и можно предположить возможность переноса полученных закономерностей на другие классы соединений, содержащие их фрагмент. Например, неплохое качественное соответствие получено в настоящей работе при сопоставлении ряда коричных кислот и антоцианов, поскольку общим свойством для них является наличие кольца Б, структурно

аналогичного ароматическому кольцу производных бензойной и коричной кислот (рис.7, 8).

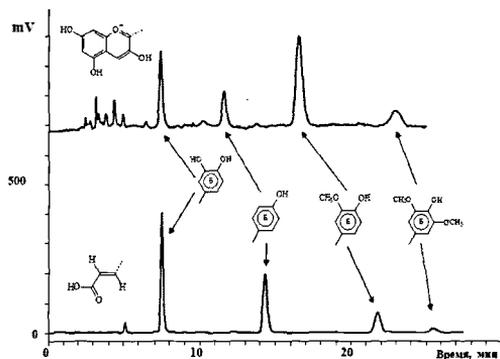


Рис. 7. Хроматограммы фенольных кислот и антоцианов; ПФ: 8%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10%  $\text{HCOOH}$  в воде на обращенной фазе Symmetry C18

сommение убеждение о непереносимости результатов исследования хроматографического поведения сорбатов с одних стационарных фаз на другие по предложенному методу. Отметим, что при адсорбционном механизме разделения фенольных кислот в семейство октадецилсилановых фаз можно включить и октильные обращенные фазы.

Так как относительное удерживание фенольных кислот predetermined, то возможности изменения селективности за счет изменения концентрации органического модификатора в подвижной фазе ограничено, поэтому для изменения селективности разделения, что необходимо для разработки методик определения аналитов в сложных матрицах природного происхождения, необходимо воспользоваться рядом специальных хроматографических режимов.

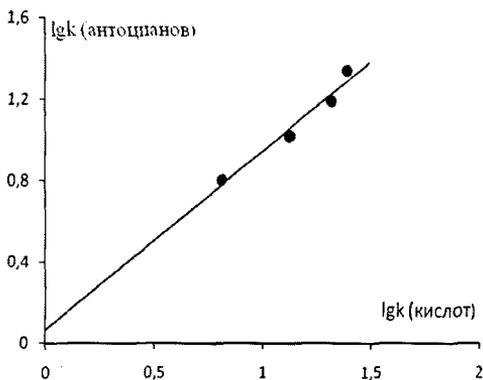


Рис. 8. Сопоставление удерживания антоцианов и коричных кислот

3) По методу ОАУ поставлены данные полученные для различных составов подвижных фаз выбранной системы и различных марок стационарных фаз. Так удерживание кофейной, феруловой, синаповой кислот относительно кумаровой с небольшой погрешностью описывается общей линейной зависимостью для стационарных фаз Kromasil и Diasphere, исследованных в настоящей работе, и литературных данных для колонки Biosil (рис.9), что ставит под

вопрос о возможности изменения селективности за счет изменения концентрации органического модификатора в подвижной фазе ограничено, поэтому для изменения селективности разделения, что необходимо для разработки методик определения аналитов в сложных матрицах природного происхождения, необходимо воспользоваться рядом специальных хроматографических режимов.

В работе показано, что введение ион-парной добавки цетилтриэтиламмония нитрата привело к замене механизма удерживания на ионообменный с обращением порядка элюирования кислот.

Другим способом изменения удерживания фенольных кислот является образование супрамолекулярных комплексов в подвижной фазе. Изучено образование комплексов включения фенольных кислот с  $\beta$ -циклодекстрином ( $\beta$ -CD), это важно, поскольку, как было показано ранее, полученные закономерности могут быть пере-

несены на другие типы соединений, содержащие аналогичные структурные элементы. Подобные исследования имеют и практическое значение, поскольку полифенольные соединения большей частью мало растворимы в воде, а образование комплексов включения (интеркалатов) с  $\beta$ -CD увеличивает растворимость «гостя», его биодоступность, и способствует увеличению стабильности химически лабильных соединений.

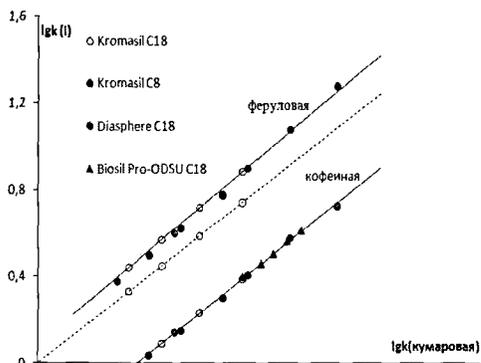


Рис. 9. Относительное удерживание кофейной, феруловой кислот относительно кумаровой на различных колонках

Экспериментальные данные для колонки Biosil Pro-ODSU взяты из литературных данных.

вдвое при добавлении второй гидроксильной группы в *мета*-положение. Еще большее уменьшение константы наблюдается при замене ее на гидрофобную, но более объемную, метокси-группу. Введение двух метокси-групп в оба *мета*-положения приводит к ослаблению комплексобразования практически до нуля (табл. 1).

Таблица 1. Константы комплексобразования фенольных кислот с  $\beta$ -CD

Кислоты	Объемная доля $\text{CH}_3\text{CN}$ в подвижной фазе, %			СlogP*
	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-гидроксibenзойная	233	113	-	1.42
3,4-дигидроксibenзойная (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.

Константы комплексобразования  $\beta$ -CD с фенольными кислотами в подвижной фазе рассчитывали с использованием известного подхода<sup>1</sup>.

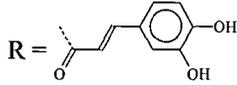
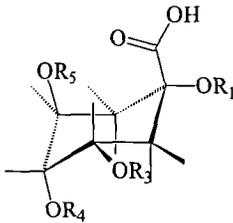
Наши исследования показали, что экспериментальные данные соответствовали прямолинейной зависимости, что подтверждает гипотезу об образовании комплексов 1:1 для всех исследованных бензойных и коричных кислот. Введение гидрофильного заместителя, –ОН-группы в *пара*-положение в случае бензойной и коричной кислот приводит к росту константы комплексобразования, которая уменьшается примерно

<sup>1</sup>Kazumi Fujimura, Teruhisa Ueda, Masashi Kitagawa, Hiroaki Takayanagi, Teiichi Ando Reversed-phase retention behavior of aromatic compounds involving  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex formation in the mobile phase // Anal. Chem. – 1986. – V.58. – P. 2668–2674

Полученные данные свидетельствуют об определяющей роли стерических факторов как основных параметров, регулирующих комплексообразование.

Особый интерес представляет исследование комплексообразование  $\beta$ -CD с хлорогеновыми кислотами (рис. 10).

Эти кислоты являются основными пищевыми антиоксидантами, поэтому комплексообразование хлорогеновых кислот и  $\beta$ -CD было объектом исследования в



	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
1CQA	R	H	H	H
3CQA	H	R	H	H
4CQA	H	H	R	H
5CQA	H	H	H	R

Рис.10. Изомерные хлорогеновые кислоты

ряде работ, в которых получены не совсем согласующиеся результаты. Кроме того, в этих работах обойдены вниманием изомерные хлорогеновые кислоты, присутствующие в кофе и других природных источниках.

Результаты по образованию комплексов  $\beta$ -CD с хлорогеновыми кислотами,

полученные для двух составов подвижных фаз, представлены в табл. 2.

Таблица 2. Константы устойчивости комплексов включения  $\beta$ -CD с кофейной и хлорогеновыми кислотами

№	Объемная доля модификатора, %			$K_{(5,5)}/K_{(6,5)}$
	$\text{CH}_3\text{CN}$	5,5	6,5	
	$\text{CH}_3\text{COOH}$	5,0	5,0	
Кислоты		Константы устойчивости комплексов, моль/л		
1	Кофейная	$98 \pm 6$	$72 \pm 8$	1.36
2	3-Кофеилхиновая (3CQA)	$51 \pm 6$	$37 \pm 4$	1.37
3	4-Кофеилхиновая (4CQA)	$81 \pm 6$	$60 \pm 4$	1.35
4	5-Кофеилхиновая (5CQA)	$146 \pm 12$	$116 \pm 9$	1.26

Константа комплексообразования для 5CQA оказывается больше, чем для кофейной кислоты, что свидетельствует в пользу одновременного присутствия в растворе двух вариантов комплексов, с различной ориентацией этой кислоты по отношению к  $\beta$ -циклодекстрину:



где KX – кофеилхиновая кислота;

CD –  $\beta$ -циклодекстрин;

$\text{K}[\text{XCD}]$  – комплекс, в котором полость  $\beta$ -CD занята фрагментом хиновой кислоты;

$[\text{CDK}]\text{X}$  – комплекс, в котором полость  $\beta$ -CD занята фрагментом кофейной кислоты.

Действительно, методом компьютерного моделирования (в среде HyperChem 8) только для 5CQA нами обнаружена компактная конформация, при которой *цис*-заместители – радикал кофейной кислоты и полярная карбоксильная группа в аксиальных положениях относительно циклогексанового кольца хиновой кислоты – направлены в одну сторону и не препятствуют вхождению этого фрагмента в полость  $\beta$ -CD.

Подтверждение двоякого механизма внедрения в полость  $\beta$ -CD 5CQA получено использованием метода  $^1\text{H}$ -ЯМР. При анализе химических сдвигов мы учитывали их изменения при добавлении в раствор не только  $\beta$ -CD, но и глюкозы. При таком подходе характеристичными оказываются изменения химических сдвигов сигналов протонов при переносе 5CQA из водно-глюкозного раствора в водно-

циклодекстриновый: наибольшему смещению подвержены сигналы протонов в положении 2, 6 и 5 (рис. 11, табл. 3).

Таблица 3. Химические сдвиги протонов кофеоильного радикала 5CQA

№ атома Н	$\delta_{D_2O}$	$\delta_{CD}$	$\delta_{+ \text{ глюкоза}}$	$\delta_{D_2O} - \delta_{CD} / \delta_{D_2O} - \delta_{CD}$
2	7.1918	7.2089	7.2607	+0.0518 / +0.0171
5	6.9760	6.9722	7.0093	+0.0371 / -0.0038
6	7.1240	7.1200	7.1894	+0.0694 / -0.0040
7	7.6089	7.7078	7.6882	-0.0196 / +0.0989
8	6.3525	6.4398	6.4349	-0.0049 / +0.0873

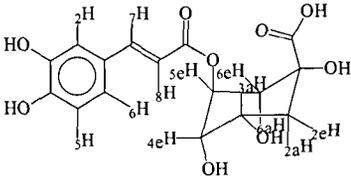


Рис. 11. Структурная формула хлорогеновой кислоты

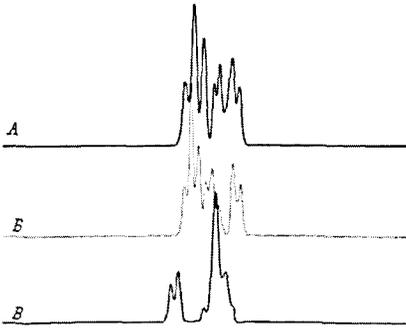
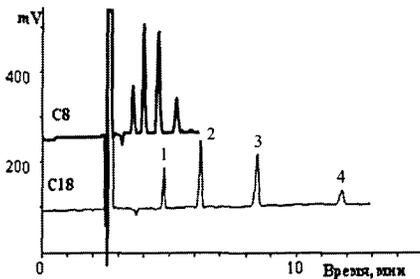


Рис. 12. Фрагмент  $^1\text{H}$ -ЯМР спектра в области метиленовых протонов

Сигналы протонов двух  $\text{CH}_2$  групп фрагмента хиной кислоты: А) 5CQA в  $\text{D}_2\text{O}$ ; Б) смеси глюкозы и 5CQA в  $\text{D}_2\text{O}$ ; В) смеси  $\beta$ -циклодекстрина и 5CQA в  $\text{D}_2\text{O}$ .



Подобные изменения обнаружены и для кофейной кислоты.

Химические сдвиги протонов метиленовых групп фрагмента хиной кислоты изменяются намного меньше при переносе 5CQA из водного в водно-глюкозный раствор по сравнению с переносом в раствор  $\beta$ -CD (рис.12).

Это относится не только к протонам  $\text{CH}$ -групп, но и к сложной суперпозиции сигналов протонов двух метиленовых групп, что подтверждает образование комплексов включения 5CQA –  $\beta$ -CD с заполнением полости «хозяина» фрагментом хиной кислоты.

В 5 главе «Определение жирных кислот», обсуждены основные закономерности удерживания высших жирных кислот (ВЖК).

По предложенному ранее способу тестирования механизма удерживания (сопоставление удерживания на C8 и C18 фазах), было получено большое различие в удерживании для одного и того же элюента, следовательно механизм удерживания (в отличие от двух ранее рассмотренных случаев) близок

к распределительному (рис.13) и октадецилсилановые стационарные фазы предпочтительнее фаз с более короткими углеводородными радикалами.

Рис. 13. Хроматограммы разделения высших жирных кислот. ПФ: 5% ацетона, 1% уксусной кислоты в ацетонитриле на обращенных фазах Kromasil 100-5C8 и Kromasil 100-5C18; 1-лауриновая кислота, 2 – миристиновая кислота, 3 – гальматинная кислота, 4 – стеариновая кислота

Корреляция между параметрами удерживания кислот и  $\text{ClogP}$  далека от идеальной не только в элюентах на основе ацетонитрила, но и для рекомендуемых для определения  $\log P$  хроматографическим методом элюентах на основе метанола. Т.е. прогностическая роль  $\text{ClogP}$  весьма ограничена и для липофильных аналитов. В этом случае метод относительного анализа позволяет выполнить неразрушающий контроль числа двойных связей в исследуемой кислоте – по положению точки конвер-

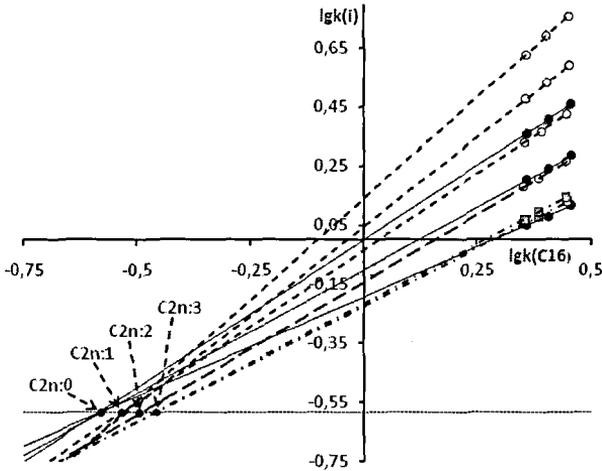


Рис. 14. Карта разделения и положение точек конвергенции для жирных кислот

генции на карте разделения. В настоящей работе установлено, что точки конвергенции оказались одинаковыми лишь в пределах рядов гомологов с сохранением ординаты, но со смещением по оси абсцисс при добавлении каждой непредельной  $\text{C}=\text{C}$ -связи, рис.14.

На хроматограмме разделения гидролизата рыбьего жира среди основных кислот имеются две, для которых нет растительных источников, с эквивалентными углеродными числами 10, по положению точек конвергенции предварительно идентифицируемых как эйкозопентаеновая и докозагексаеновая, рис.15.

разделения гидролизата рыбьего жира среди основных кислот имеются две, для которых нет растительных источников, с эквивалентными углеродными числами 10, по положению точек конвергенции предварительно идентифицируемых как эйкозопентаеновая и докозагексаеновая, рис.15.

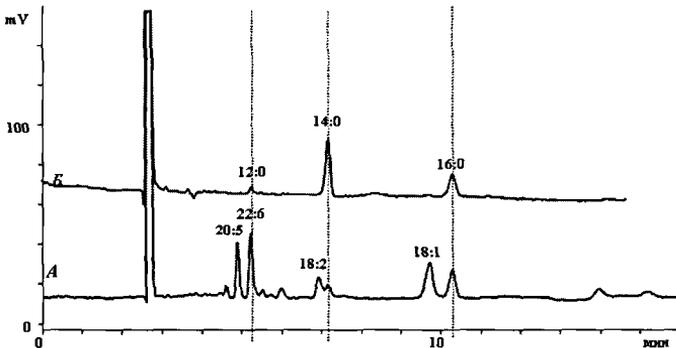


Рис. 15. Хроматограмма разделения гидролизата рыбьего жира. ПФ: 5% ацетона, 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (детектор рефрактометрический)

Такое предположение полностью подтвердилось исследованием масс-спектров MALDI фракций, выделенных методом ВЭЖХ. Были детектированы сигналы  $\text{Na}^+$  Acid-ионов с  $M/z = 325.325$  и  $351.330$ , соответственно.

### **Выводы**

1. Титриметрический способ с использованием двух электрохимических датчиков (потенциометрического и кондуктометрического) и ионного обмена позволяет различить одно-, двух-, трехосновные карбоновые кислоты.

2. Водорастворимые кислоты могут быть определены методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, причем вследствие поверхностной сорбции длина привитого радикала не имеет значения, но необходим выбор стационарных фаз устойчивых к «коллапсу». Аналогично и для фенольных кислот длина радикалов привитой фазы не имеет значение, но принципиально важна для разделения высших жирных кислот, распределительный механизм удерживания которых подтверждается выполненными исследованиями.

3. Для построения карт разделения фенольных кислот достаточно набора экспериментальных данных для двух различных составов подвижных фаз, причем полученные закономерности для C18-стационарных фаз могут быть перенесены на некоторые аналогичные фазы других производителей и даже на C8-стационарные фазы. Особенность карт разделения высших жирных кислот – различие в абсциссах точек конвергенции в зависимости от степени ненасыщенности, – может быть использована для определения количества двойных связей в высших жирных кислотах.

4. Для изменения порядка элюирования фенольных кислот может быть использовано введение в подвижную фазу ион-парной или супрамолекулярной добавок. Константы комплексообразования производных бензойной и коричной кислот зависят от строения аналитов и составов подвижной фазы, уменьшаясь с ростом концентрации ацетонитрила, что свидетельствует о конкуренции органического модификатора подвижной фазы и аналита за место в полости  $\beta$ -циклодекстрина. Константы комплексообразования для производных бензойной и коричной кислот растут при введении гидроксильной группы в *пара*-положение, затем снижаются при добавлении заместителя в *мета*-положение и падают почти до нуля при введении заместителей в оба *мета*-положения; при этом замена гидрофильного (ОН-группы) заместителя на гидрофобный (-OCH<sub>3</sub>-группу) приводит к снижению стабильности комплекса. Из изомерных хлорогеновых кислот только 5-кофеоилхиновая кислота образует два типа комплексов включения состава 1:1, что и объясняет ее наибольшую зависимость удерживания от концентрации  $\beta$ -циклодекстрина в подвижной фазе.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

1. Анисимович И.П. Модулирование селективности разделения сорбата за счет образования супрамолекулярных комплексов в подвижной фазе / Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Селеменев В.Ф. // Сорбц. и хроматогр. процессы. – 2010. – Т.10, Вып. 3. – С. 401-408.

2. Анисимович И.П. Сорбционное разделение фенольных кислот в условиях ион-парной ОФ ВЭЖХ / Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Симаков С.В., Селеменев В.Ф. // Сорбц. и хроматогр. процессы. – 2010. – Т.10, Вып. 4. – С. 572-577.

3. Гостищев И.А. Каротиноиды, хлорогеновые кислоты и другие природные соединения плодов рябины / Дейнека В.И., Анисимович И.П., Третьяков М.Ю., Мясникова П.А., Дейнека Л.А., Сорокопудов В.Н. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. – 2010. – №3 (74), Вып. 10. – С. 83-93.

4. Васильев Г.В. Исследование супрамолекулярных комплексов: взаимодействие резерватрола с  $\beta$ -циклодекстрином в некоторых растворителях / Анисимович И.П., Михеев А.Ю., Дейнека В.И., Новиков О.О. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. – 2010. – № 9 (80), Вып. 11. – С. 111-119.

5. Гостищев И.А. Оценка высушенных бархатцев в качестве доступного источника диэфиров лютеина для целей хроматографической идентификации / Третьяков М.Ю., Анисимович И.П., Дейнека Л.А., Дейнека В.И. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. – 2010. – №15(86), Вып. 12. – С. 140 – 144.

6. Туртыгин А.В. Масло с конъюгированными двойными связями: масла косточек вишен и родственных семейства Rosaceae / Анисимович И.П., Дейнека Л.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Шевченко С.М. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. – 2010. – №21(92), Вып. 13. – С. 135-143.

7. Дейнека В.И. Некоторые аспекты исследования супрамолекулярных взаимодействий методом ВЭЖХ / Анисимович И.П., Дейнека Л.А. // Всеросс. конф. «Хроматография – народному хозяйству». – 2010, Дзержинск. – С. 43.

8. Анисимович И.П., Дейнека В.И. Особенности сорбции супрамолекулярных комплексов изомеров хлорогеновых кислот с  $\beta$ -циклодекстрином на обращено-фазовых сорбентах // Материалы Всеросс. конф. с эл. науч. шк. «Нано- и супрамолекулярная химия в сорбционных и ионообменных процессах». – 2010, Белгород. – С. 14-18.

9. Дейнека Л.А. Определение кислотности соков плодов растений с использованием двух электрохимических датчиков / Анисимович И.П., Новоженова Т.Г., Дейнека В.И. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. – 2009. – №11(66), Вып.9. – С. 111-118.

10. Анисимович И.П. Исследование образования комплексов включения  $\beta$ -циклодекстрина с фенольными кислотами методом ВЭЖХ/Лапшова М.С., Дейнека Л.А., Дейнека В.И. // Высокие технологии, фонд. исслед., образование: сборник трудов Седьмой междунар. научно-практич. конф. «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности». – 2009, Санкт-Петербург. – С. 159-161.

11. Дейнека В.И. Хлорогеновая кислота плодов и листьев некоторых растений семейства Berberidaceae / Хлебников В.А., Сорокопудов В.Н., Анисимович И.П. // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С. 57-61.

12. Дейнека В.И. Использование обращено-фазовой ВЭЖХ в установлении подлинности жиров и масел/Дейнека Л.А., Анисимович И.П., Перистый В.А., Туртыгин А.В.// Зав. лаб. Диагностика мат. – 2008. – Т. 74, № 3. – С. 15-19.

13. Сорокопудов В.Н. Антоцианы плодов некоторых видов рода *Rubus* L. из коллекции ботанического сада БелГУ / Дейнека В.И., Лукина И.П. (Анисимович И.П.), Дейнека Л.А. // Химия растительного сырья. – 2005. – № 4. – С. 61-65.

Работы 1-6, 11-13 опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертации.

Подписано в печать 25.04.2011. Гарнитура Times New Roman.  
Формат 60×84/16. Усл. п. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ 50.  
Оригинал-макет подготовлен и тиражирован в ИПК НИУ «БелГУ»  
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85