



На правах рукописи

Покровский Олег Игоревич

**ПРОЦЕССЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ФУРОКУМАРИНОВЫХ
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ
ФЛЮИДАХ**

02.00.04 - физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук и на Химическом факультете Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: академик
Лунин Валерий Васильевич
кандидат химических наук
Паренаго Ольга Олеговна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Даванков Вадим Александрович
доктор технических наук, доцент
Платонов Игорь Артемьевич

Ведущая организация: ФГБУН Институт химии растворов
им. Г.А. Крестова РАН

Защита диссертации состоится «12» «декабря» 2013 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.021.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук по адресу 119991, г. Москва, Ленинский пр-т, 31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОНХ РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинский проспект, 31. Автореферат см. на сайте www.igic.ras.ru и на сайте ВАК.

Автореферат разослан «11» ноября 2013 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.х.н., доцент



Очертянова Л.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Хроматография является основным инструментом решения задач, связанных с выделением биологически активных веществ из природного сырья. Основные проблемы препаративной хроматографии заключаются в высокой длительности процессов разделения и в большом расходе дорогостоящих токсичных органических растворителей. Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) имеет ряд преимуществ перед жидкостной в указанном отношении. Сверхкритические флюиды (СКФ) как состояние вещества, промежуточное по своим свойствам между жидкостью и газом, характеризуются управляемой растворяющей способностью, высокими коэффициентами диффузии и низкой вязкостью. Эти свойства позволяют проводить многие разделительные процессы в СКФ с более высокой скоростью по сравнению с аналогичными жидкостными без потери эффективности разделений. Вместе с тем эти же свойства обуславливают и значительную сложность разработки СКФ-методов. Так, в настоящее время не существует единого универсального подхода к разработке методов разделений с помощью СФХ. Прежде всего, это связано с многообразием различных межмолекулярных взаимодействий, которые могут влиять на селективность разделения в СФХ. Разработка универсальных алгоритмов построения методик разделений сложных смесей веществ с помощью сверхкритических флюидов является актуальной задачей, решение которой будет способствовать практическому использованию этой перспективной технологии. Для ее решения необходимо наличие описания роли различных типов межмолекулярных взаимодействий в удерживании в СФХ на различных типах сорбентов, что и определяет актуальность темы данного исследования.

Объекты и предмет исследований

Фурукумарины – класс гетероциклических конденсированных соединений, замещенных фуранопроизводных бензопиранона. Эти соединения используются в лечении многих кожных заболеваний, прежде всего псориаза и витилиго, в борьбе с Т-клеточной лимфомой, а также с

различными вирусными заболеваниями. Источником фурукумаринов являются многие виды растений, преимущественно принадлежащих семействам *Зонтичные*, *Тутовые*, *Рутовые* и *Бобовые*. Выделение индивидуальных фурукумаринов из растений представляет собой одну из тех сложных сепарационных проблем, для которых характерны низкая производительность известных процессов, большой расход растворителей, сложность достижения высокой степени чистоты конечных продуктов.

Наиболее востребованными с практической точки зрения и одновременно наиболее сложными в разделении являются три метоксипроизводных простейшего линейного фурукумарина псоралена – 5-метоксипсорален (5-МОП), 8-метоксипсорален (8-МОП) и 5,8-диметоксипсорален (5,8-диМОП). Эти соединения, чьи структурные формулы представлены на рис. 1, являлись основными объектами исследований в настоящей работе.

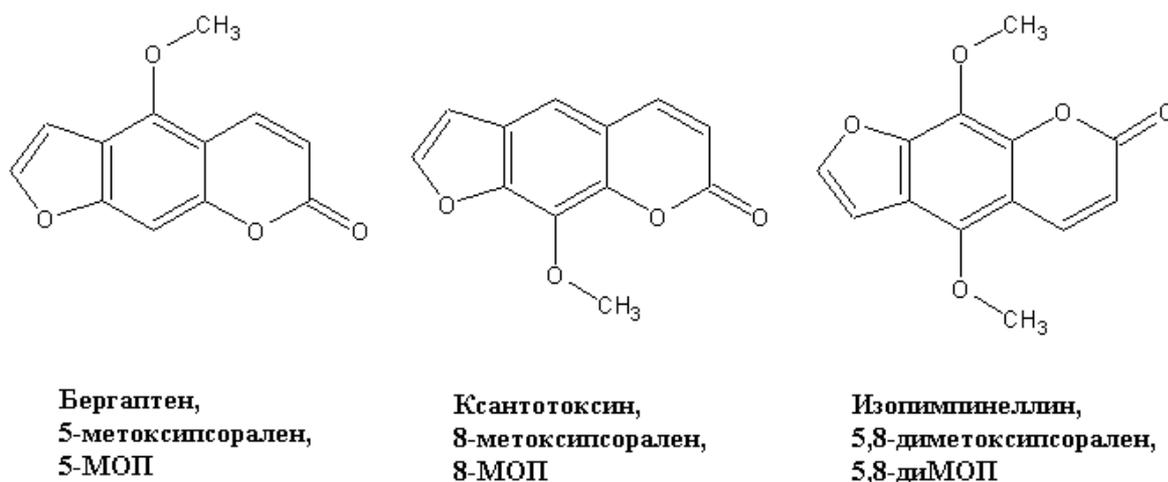


Рис. 1. Структурные формулы метоксипсораленов

Целью работы являлась разработка универсального метода выделения фурукумаринов из экстрактов растительного сырья с помощью сверхкритической флюидной хроматографии. В соответствии с поставленной целью основными задачами работы являлись:

1. Изучение селективности различных сорбентов, применяемых в сверхкритической флюидной хроматографии, по отношению к линейным фурукумаринам.
2. Выбор оптимального хроматографического режима и типа сорбента, обеспечивающих наибольшую селективность при

разделении линейных фурукумаринов в сверхкритической флюидной хроматографии.

3. Оптимизация параметров разделения фурукумаринов в сверхкритической флюидной хроматографии.
4. Установление механизмов, обеспечивающих селективность сорбции фурукумаринов в найденных условиях.
5. Разработка препаративной методики на основе лабораторной и верификация ее применимости для выделения лекарственных фурукумаринов из экстрактов растительного сырья в индивидуальном виде.

Научная новизна работы

1. Впервые получены данные о селективности разделения модельных фурукумаринов – метоксипроизводных псоралена – в сверхкритической флюидной хроматографии на широком круге силикагелевых сорбентов.
2. Предложен новый метод разделения смесей фурукумариновых фотосенсибилизаторов с использованием сверхкритической флюидной хроматографии на силикагелевом сорбенте с привитыми пентафторфенильными группами.
3. Предложено объяснение закономерностям элюирования метоксипсораленов в условиях сверхкритической флюидной хроматографии, основанное на анализе вкладов различных межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий, характерных для линейных фурукумаринов, в их удерживание на сорбентах различной природы.
4. На основе лабораторной методики разработан препаративный метод выделения лекарственных фурукумаринов из экстрактов растительного сырья, который был успешно испытан при препаративном выделении фурукумаринов псоралена и бергаптена из экстрактов листьев инжира (*Ficus carica* L.).

Практическая значимость работы

1. Разработанный метод разделения смесей фурукумаринов с помощью сверхкритической флюидной хроматографии на пентафторфенильных сорбентах применим для препаративного выделения лечебных фурукумаринов из экстрактов растительного сырья.
2. Предложенный в работе подход к выбору оптимального сорбента для разделения смесей веществ в сверхкритической флюидной хроматографии представляет перспективы для разработки методов разделения сложных практически важных смесей веществ.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Разработка метода разделения смесей фурукумаринов методом сверхкритической флюидной хроматографии на силикагелевых сорбентах с привитыми пентафторфенильными группами.
2. Описание закономерностей элюирования и разделения метоксипсораленов в сверхкритической флюидной хроматографии с использованием представлений о характерных для этих веществ межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействиях.
3. Препаративное масштабирование лабораторной методики разделения фурукумаринов, ее апробация в разделении экстрактов растительного сырья с выделением лекарственных фурукумаринов в индивидуальном виде.

Личный вклад соискателя состоял в самостоятельном выполнении экспериментальных работ по оптимизации методик сверхкритической флюидной экстракции и сверхкритической флюидной хроматографии, в активном участии в обсуждении полученных результатов, в подготовке статей и докладов по материалам работы, выступлениях на научных семинарах и конференциях.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на Всероссийском симпозиуме «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия» (г. Москва, Клязьма, 2008), V Научно-практической конференции с международным участием «Сверхкритические флюиды: основы, технологии, инновации» (г.

Суздаль, 2009), 5-ой международной конференции по сверхкритической флюидной хроматографии (г. Нью-Йорк, США, 2011), 13-ой европейской конференции по сверхкритическим флюидам (г. Гаага, Нидерланды, 2011), 6-ой международной конференции по сверхкритической флюидной хроматографии (г. Брюссель, Бельгия, 2012), 11-й международной конференции по фундаментальным основам адсорбции (г. Балтимор, США, 2013), VII Научно-практической конференции с международным участием «Сверхкритические флюиды: основы, технологии, инновации» (г. Зеленоградск Калининградской области, 2013).

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов, выводов и списка использованной литературы. Материал изложен на 137 страницах и содержит 28 рисунков, 10 таблиц и библиографию из 187 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы исследований, сформулирована основная цель работы и задачи, которые необходимо решить для ее достижения, отражены научная новизна и практическая значимость работы.

Глава 1. Литературный обзор

В этой главе представлен обзор методов выделения лечебных фурукумаринов из растительного сырья с использованием различных сепарационных технологий, таких как экстракция, перекристаллизация, винтеризация и хроматография. Проведен детальный анализ известных хроматографических методов разделения фурукумариновых смесей, как аналитических, так и препаративных. Рассмотрены подходы к разработке методов разделения в сверхкритической флюидной хроматографии с насадочными колоннами; продемонстрировано, что ключевыми факторами, определяющим селективность разделения в сверхкритической флюидной хроматографии, является выбор сорбента и, в несколько меньшей степени, природа подвижной фазы.

Глава 2. Экспериментальная часть

В этой главе приведены характеристики исходных веществ и материалов, изложены методики проведения сверхкритической флюидной экстракции растительного сырья с учетом его предварительной подготовки, методики разделений смесей веществ в сверхкритической флюидной хроматографии на всех типах использовавшегося хроматографического оборудования – лабораторного, микро-препаративного и препаративного. Приведены методики проведения квантовохимических расчетов внутримолекулярных взаимодействий в метоксипсораленах а также межмолекулярных взаимодействий метокси-псораленов с гексафторбензолом как моделью пентафторфенильного сорбента методами PBE и V3LYP в рамках теории функционала электронной плотности, а также методом Хартри-Фока с использованием теории возмущений Меллера-Плессе второго порядка с помощью программного пакета FireFly. Представлены методики физических методов анализа (1H ЯМР¹, ИК-спектроскопии², УФ-спектроскопии³) выделенных индивидуальных фурукумаринов. Описана схема масштабирования оптимизированной лабораторной методики разделения фурукумаринов для препаративных целей и проведения тестовых испытаний по выделению фурукумаринов псоралена и бергаптена из экстрактов листьев инжира *Ficus carica* L.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

В основу подхода к поиску неподвижной фазы, обеспечивающей требуемую селективность при разделении фурукумаринов в сверхкритической флюидной хроматографии, был положен принцип ортогональной системы скрининга [1]. Этот принцип базируется на анализе вкладов различных межмолекулярных взаимодействий сорбента с аналитом с использованием метода LSER (Linear Solvation Energy Relationship) в варианте Абрахама, в рамках которого вклад различных типов взаимодействий выражается следующим уравнением:

$$\log k = c + eE + vV + aA + bB + sS,$$

¹ - Регистрация спектров ЯМР выполнена Д.Ю. Чешковым (ИОФ РАН, г. Москва)

² - Регистрация и расшифровка ИК-спектров проводилась Е.С. Шубиной (ИНЭОС РАН, г. Москва)

³ - Регистрация и интерпретация УФ-спектров проводилась С.А. Гончуковым (МИФИ, г. Москва)

где k – коэффициент удерживания аналита в определенных условиях;
 c – константа, связанная с геометрическими характеристиками хроматографической колонки и наполняющего ее сорбента;

E – избыточная мольная рефракция, обусловленная вкладами пи-электронов и неподеленных электронных пар атомов;

V – характеристический молекулярный объем Макгована;

A – кислотность аналита, обусловленная способностью выступать донором водородных связей;

B – основность аналита, обусловленная способностью выступать акцептором водородных связей;

S – общая полярность/поляризуемость молекулы аналита, определяемая наличием дипольного и более высоких мультипольных моментов;

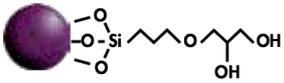
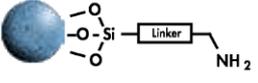
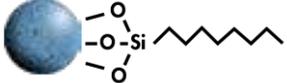
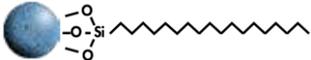
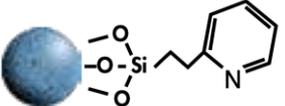
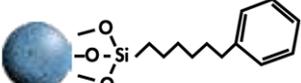
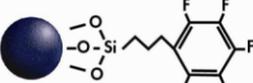
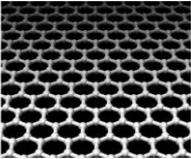
строчные буквы при заглавных обозначают долевые коэффициенты для каждого слагаемого.

Согласно этим представлениям, селективность разделения структурно близких нехиральных молекул может быть обусловлена значительным вкладом в удерживание на сорбенте одного из пяти приведенных факторов либо однонаправленным действием нескольких факторов при существенном различии разделяемых компонентов по способности к участию в таких взаимодействиях.

В настоящей работе был предложен следующий подход к выбору оптимального сорбента для разделения. С помощью LSER-анализа разделений большой группы модельных соединений в условиях СФХ возможно провести оценку вклада каждого из пяти факторов в удерживание на определённых типах сорбентов [1]. Выбирая те из сорбентов, для которых удерживание преимущественно определяется одним-двумя факторами, и проводя разделение модельных смесей на них, мы получаем оценку склонности аналитов к разным типам межмолекулярных взаимодействий с сорбентом. На базе этих данных появляется возможность направленно оптимизировать тип неподвижной фазы в СФХ, а также проводить выбор компонентов подвижной фазы, которые могут способствовать проявлению определённых взаимодействий,

либо наоборот, нивелировать их в зависимости от стоящей задачи. Типы хроматографических сорбентов, использовавшихся в данной работе, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Типы хроматографических сорбентов, использовавшихся в данной работе.

Схематическое изображение изображения модификатора поверхности сорбента	Полное название типа сорбента	Краткое название типа сорбента, используемое в тексте
	Немодифицированный силикагель	Силикагель
	Силикагель с привитыми диольными группами	«Диол»
	Силикагель с привитыми нитрильными группами	«Нитрил»
	Силикагель с привитыми аминогруппами	«Амино»
	Силикагель с привитыми бутильными группами	«C ₄ »
	Силикагель с привитыми октильными группами	«C ₈ »
	Силикагель с привитыми октадецильными группами	«C ₁₈ »
	Силикагель с привитыми 2-этилпиридиновыми группами	2ЭП
	Силикагель с привитыми фенилгексильными группами	«Фенил»
	Силикагель с привитыми пентафторфенильными группами	«ПФФ»
	Пористый графитированный углерод	«Графит»

Для установления возможности использования факторов кислотности и основности (А и В) в качестве движущей силы хроматографического

разделения фурукумаринов в СФХ были проведены испытания серии полярных силикагелевых сорбентов – немодифицированные силикагели, диольные и нитрильные фазы (см. табл. 1). При выборе водородных связей как движущей силы разделения в качестве модификаторов подвижной фазы используются протонные спиртовые сорастворители. Результаты скрининга разделений трех метоксипсораленов на таких сорбентах при использовании метанола и изопропанола как сорастворителей подвижной фазы СФХ приведены в табл. 2 и 3.

Как видно из приведенных данных, силикагелевые сорбенты с привитыми полярными группами не обеспечивают необходимой селективности в разделении фурукумаринов в СФХ. При использовании сорастворителей, которые могут выступать донорами протонов в водородных связях – метанола, изопропанола – все три метоксипсоралена элюируются с очень близкими коэффициентами удерживания даже при небольших долях сорастворителей в подвижной фазе. При содержании протонного сорастворителя выше 10-12 об. % добиться полного разделения трех компонентов не удастся. 5-МОП, элюирующийся первым, сравнительно 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.

Таблица 2. 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	Аналит	Коэффициент удерживания					
		Содержание метанола в подвижной фазе, об. %					
		2	3	5	7	10	12
Силикагель	$k_{5\text{МОП}}$	2,29	2,04	1,72	1,66	1,46	1,06
	$k_{5,8\text{МОП}}$	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
Диол	$k_{5\text{МОП}}$	2,29	2,31	2,23	2,20	1,85	1,41
	$k_{5,8\text{МОП}}$	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
Нитрил	$k_{5\text{МОП}}$	2,80	2,56	2,18	2,04	1,76	1,35
	$k_{5,8\text{МОП}}$	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 3. 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	Аналит	Коэффициент удерживания					
		Содержание метанола в подвижной фазе, об. %					
Силикагель	$k_{5MOП}$	5,32	4,25	3,26	2,65	1,97	1,83
	$k_{5,8MOП}$	6,65	4,98	3,54	2,92	2,16	1,96
	$k_{8MOП}$	6,40	4,98	3,54	2,92	2,16	1,96
Диол	$k_{5MOП}$	3,97	3,58	3,26	2,99	1,92	2,06
	$k_{5,8MOП}$	4,61	4,00	3,54	3,23	2,05	2,21
	$k_{8MOП}$	4,61	4,00	3,54	3,13	1,92	2,06
Нитрил	$k_{5MOП}$	4,48	3,73	3,13	2,78	2,23	1,94
	$k_{5,8MOП}$	5,28	4,29	3,58	3,04	2,50	2,15
	$k_{8MOП}$	4,67	3,84	3,24	2,78	2,31	2,01

Такое поведение обусловлено превалирующим вкладом водородных связей в удерживание при использовании сорбентов данного типа и соразтворителей, которые могут выступать донорами этих связей. Данный тип межмолекулярных взаимодействий не обеспечивает селективности разделения метоксипсораленов.

При использовании апротонных соразтворителей в подвижной фазе – ацетонитрила, ацетона, этилацетата – регистрировались качественно схожие результаты с заметно бóльшими временами удерживания, меньшей эффективностью разделения и большими отклонениями формы пиков от гауссовой. Полное разделение всех трех целевых веществ с использованием сорбентов данной группы достигалось лишь при использовании таких слабополярных апротонных соразтворителей, как этилацетат. При этом наблюдались искаженные формы хроматографических пиков, а времена удерживания были неприемлемо велики. Пример такого разделения приведен на рис. 2.

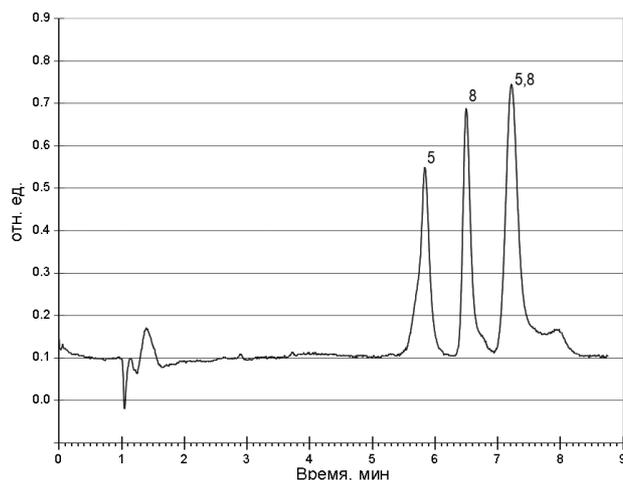


Рис. 2. Элюирование метоксипсораленов с сорбента «Силикагель»; подвижная фаза – CO_2/EtOAc 85/15, давление 150 бар, температура 25°C.
Здесь и далее: «5» – 5-МОП, «8» – 8-МОП, «5,8» – 5,8-диМОП

Таким образом, ни одна из испытанных систем с полярными сорбентами не обеспечивает требуемой селективности в разделении структурно близких фурукумаринов в СФХ, что хорошо согласуется с представлениями об участии целевых соединений во взаимодействиях типа водородная связь.

Известно, что при проведении разделения на неполярных алкилированных силикагелях в СФХ селективность преимущественно определяется факторами V (молекулярный объем) и, в меньшей степени, E (поляризуемость, определяемая вкладом π -электронов и электронов неподеленных пар).

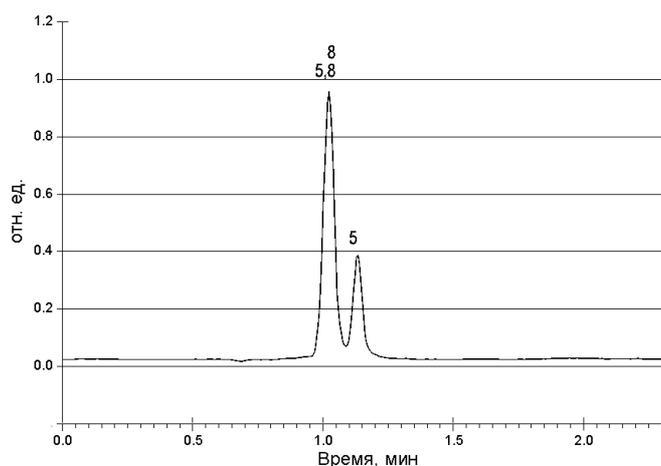


Рис. 3. Элюирование метоксипсораленов с сорбента C_{18} . Подвижная фаза $\text{CO}_2/i\text{PrOH}$ 98/2, давление 100 бар, температура 25°C

Испытанные алкильные сорбенты (силикагели с привитыми бутильным, октильным и октадецильным заместителями) показали низкую

селективность в разделении метоксипсораленов. Прежде всего, последние практически не удерживаются на неполярных алкильных фазах в СФХ. На рис. 3 приведен типичный вид хроматограмм, регистрируемых при использовании алкильных сорбентов.

Варьирование типа и доли сорбостворителей в подвижной фазе вплоть до уменьшения его до нуля не позволяет достичь удовлетворительного разделения метоксипсораленов на данных сорбентах. Объемный фактор, как ожидалось, не обеспечивает селективности при разделении структурно близких и изомерных соединений. Примечательно, что коэффициенты удерживания на сорбентах данного типа растут с удлинением цепи алкильного заместителя, и при этом появляется определенная частичная селективность в разделении. По-видимому, это связано с увеличением вклада Е-фактора в удерживание в ряду сорбентов $C_4 - C_8 - C_{18}$. Такое поведение является нехарактерным для жидкостной обращенно-фазовой хроматографии, но может наблюдаться для сверхкритической флюидной хроматографии, поскольку природа подвижной фазы в СФХ способствует проявлению межмолекулярных взаимодействий этого типа.

В отсутствие способности аналитов выступать сильными донорами либо акцепторами водородных связей факторы S и E могут управлять хроматографическим разделением и обеспечивать селективность по отношению к фурукумаринам. Вклад этих факторов в удерживание является превалирующим при использовании сорбентов с ароматическими группами в структуре модификаторов.

На рис. 4-7 приведены хроматограммы, регистрируемые при использовании сорбентов, селективность которых по отношению к аналитам определяется вкладами диполь-дипольных и пи-электронных взаимодействий – фенилгексильного, 2-этилпиридинового, пентафторфенильного и графитового.

Порядок элюирования МОПов с сорбентов 2ЭП и «фенил» - $t_r(8\text{-МОП}) < t_r(5\text{-МОП}) < t_r(5,8\text{-диМОП})$, с пентафторфенильного и графитового сорбентов - $t_r(8\text{-МОП}) < t_r(5,8\text{-диМОП}) < t_r(5\text{-МОП})$, где t_r – время удерживания.

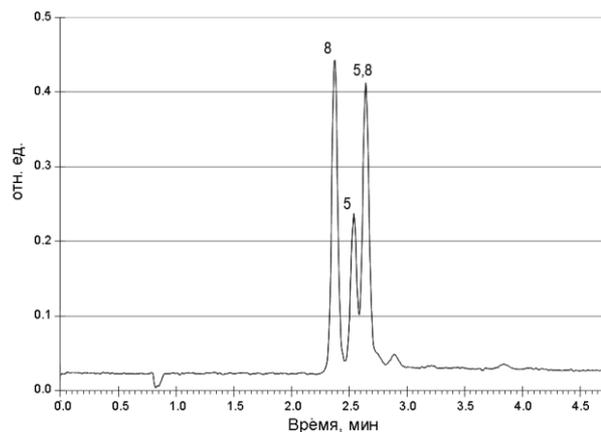


Рис. 4. Элюирование метоксипсораленов с сорбента «Фенил»; подвижная фаза - $\text{CO}_2/\text{TГФ}/\text{MeOH}$ 99/0.2/0.8, давление 100 бар, температура 25°C

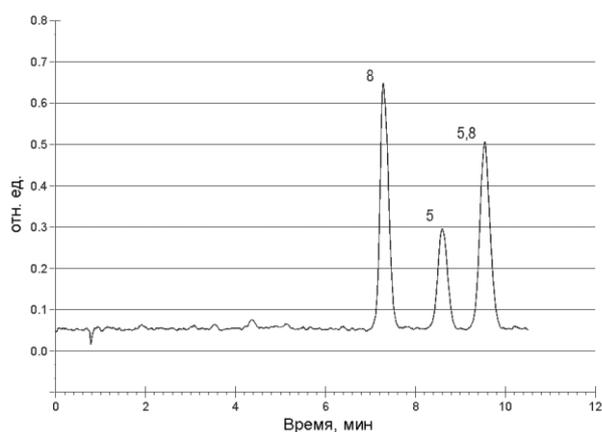


Рис. 5. Элюирование метоксипсораленов с сорбента 2ЭП; подвижная фаза - CO_2/iPrOH 95/5, давление 100 бар, температура 25°C

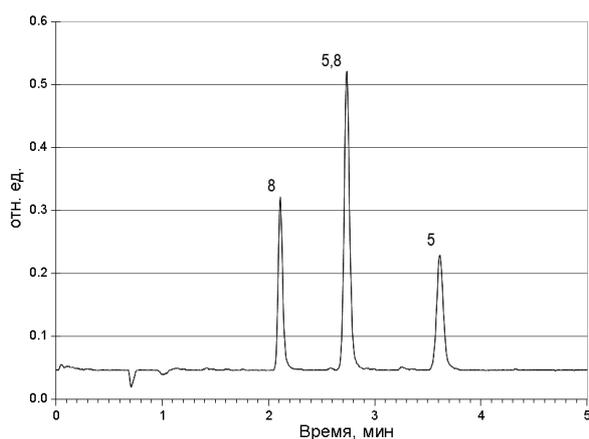


Рис. 6. Элюирование метоксипсораленов с сорбента ПФФ; подвижная фаза - CO_2/iPrOH 97/3, давление 100 бар, температура 25°C

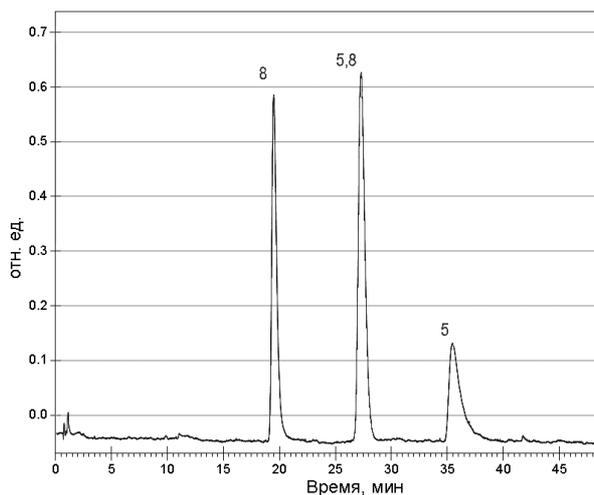


Рис. 7. Элюирование метоксипсораленов с графитового сорбента; подвижная фаза – $\text{CO}_2/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50/37.5/12.5, давление 150 бар, температура 25°C

По всей видимости, отличия порядка элюирования обусловлены различным соотношением вкладов диполь-дипольных и пи-электронных взаимодействий в удерживание на этих сорбентах. Разделение, которое достигается при использовании пентафторфенильного сорбента, представляет особый интерес с точки зрения анализа роли пи-электронных взаимодействий [2]. В диссертации было показано, что этот тип неподвижной фазы обладает самой высокой селективностью по отношению к целевым анализам. Он позволяет проводить разделение с высокой скоростью при низких долях соразтворителя в подвижной фазе. Пентафторфенильные сорбенты традиционно используются в тех случаях, когда необходимая селективность разделения может быть достигнута за счет пи-электронных взаимодействий, однако в случае СФХ метоксипсораленов полученная селективность была аномально высокая даже с учетом особой роли этих взаимодействии при использовании ПФФ.

Для объяснения высокой селективности сорбентов, содержащих ароматические группы в своей структуре, в особенности пентафторфенильного и графитового, а также необычного порядка элюирования метоксипсораленов с них, была проведена серия квантовохимических исследований внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий, характерных для 8-МОП и 5-МОП. В табл. 4 приведены данные расчетов энергий взаимодействия 5- и 8-МОП с гексафторбензолом по механизму пи-стекинга, а также T-образного аттрактивного контакта типа неподеленная пара – пи-система [3]. Из этих

данных следует, что пи-электронные взаимодействия обоих видов не могут быть причиной наблюдавшейся высокой селективности сорбентов с ароматическими привитыми группами по отношению к изомерным метоксипсораленам. И энергии взаимодействия типа пи-стэкинг, и энергии Т-образного взаимодействия для 5-МОП и 8-МОП очень близки по величине. Следовательно, данные контакты не могут обеспечивать преимущественную сорбцию одного из этих соединений.

Анализ внутримолекулярных движений в 8-МОП показал, что наличие заместителя в 8-ом положении не является препятствием для участия молекулы в Т-образном взаимодействии. Результаты расчета одномерной поверхности потенциальной энергии процесса вращения метоксигруппы в 8-МОП различными методами представлены на рис. 8. При использовании метода Хартри-Фока (HF) вычисленное значение барьера равно 2.5 ккал/моль, в методах теории функционала электронной плотности – около 1 ккал/моль (метод PBE – 1.1 ккал/моль, метод B3LYP – 0.9 ккал/моль). Полученные значения достаточно малы, чтобы можно было говорить о практически незатрудненном вращении метоксигруппы при комнатной температуре (рис. 8). При необходимости метоксигруппа в 8-МОП принимает такую конформацию, в которой может реализовываться Т-образный контакт ароматической системы с атомами кислорода псораленовой структуры.

Таблица 4. Результаты расчетов значений энергий комплексов МОПов с гексафторбензолом (ГФБ). Метод PBE, базис 6-311++G(d,p).

	ΔE взаимодействия, ккал/моль	
	8-МОП	5-МОП
Комплекс типа пи-стэкинг	-3.5	-3.8
Т-образный комплекс	-4.6	-4.5

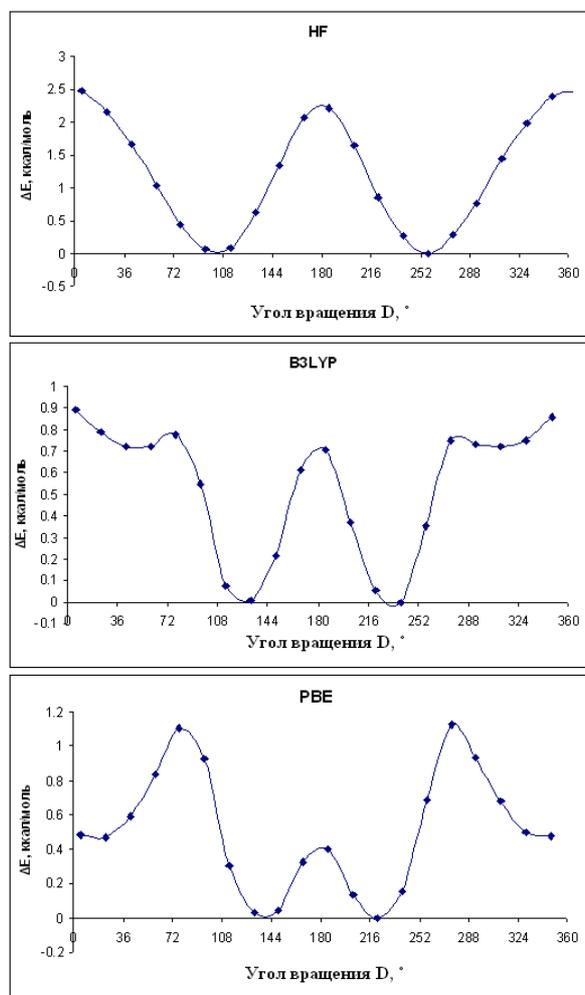


Рис. 8. Поверхность потенциальной энергии (ППЭ) вращения метоксигруппы в 8-МОП

Иное поведение наблюдается при анализе внутреннего вращения метоксигруппы в 5-МОП (рис. 9). Было обнаружено, что атом кислорода метоксигруппы участвует во внутримолекулярном аттрактивном взаимодействии с C_4-H_4 группой пиранонового кольца. В диссертации показано, что существование такой связи подтверждается литературными данными по рентгеноструктурному анализу 5-метоксипсоралена и других 5-алкоксипроизводных линейных и ангулярных фурукумаринов, а также данными спектроскопии ЯМР. Данные расчетов свидетельствуют о том, что наличие этого внутримолекулярного контакта приводит к значительному повышению дипольного момента молекулы 5-МОП, что и обуславливает его более сильную сорбцию на пентафторфенильном и графитовом сорбентах по сравнению с 8-метокси- и диметоксипсораленом.

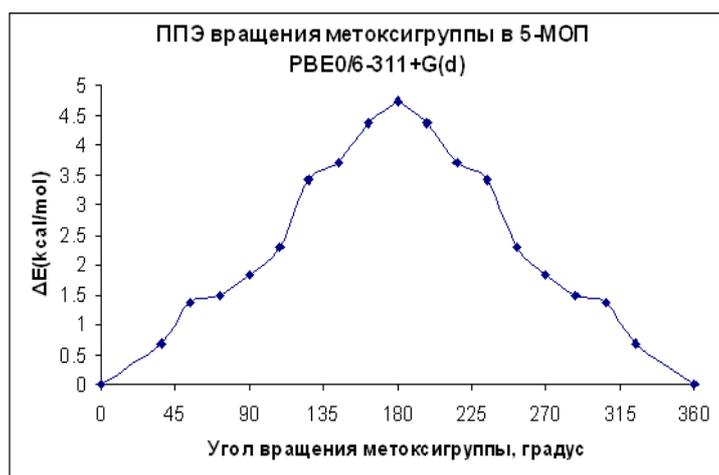


Рис. 9. Поверхность потенциальной энергии вращения метоксигруппы в 5-МОП

Масштабирование лабораторной методики было успешно проведено с переносом с аналитических колонок геометрией 100 мм (длина) на 3 мм (внутренний диаметр), заполненных сорбентом с размером частиц 1.7 мкм, на препаративные колонки 250 мм (длина) на 30 мм (диаметр), заполненных сорбентом с размером частиц 5 мкм. На рис. 10 и 11 приведены хроматограммы, соответственно, аналитического и препаративного разделения экстрактов листьев инжира с помощью созданных методик.

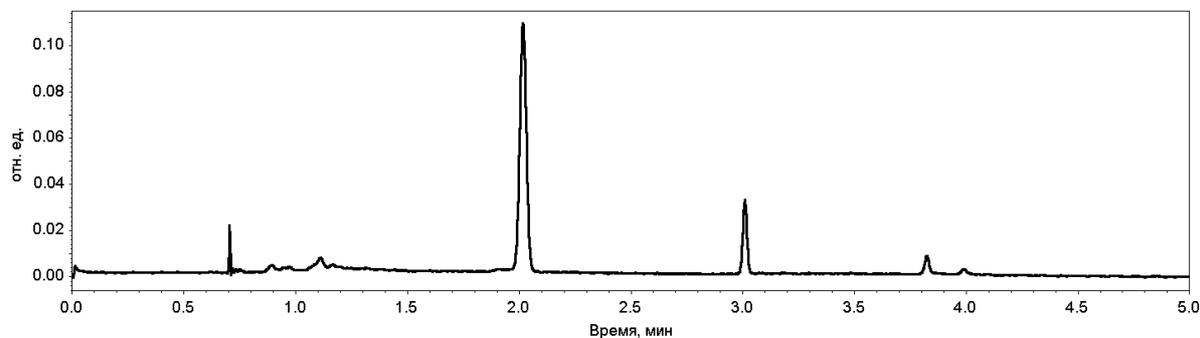


Рис. 10. Аналитическое СФХ-разделение экстракт листьев инжира

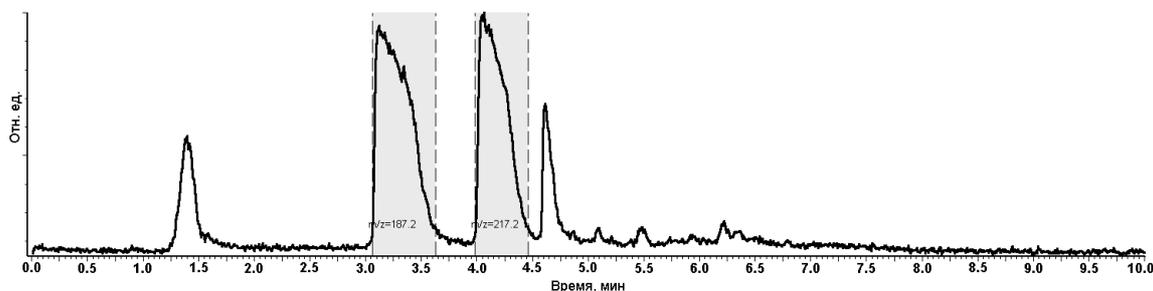


Рис. 11. Препаративное СФХ-разделение экстракт листьев инжира с накоплением фурукумаринов псоралена и 5-МОП в индивидуальном виде

Препаративная методика позволила вести накопление двух основных фурукумариновых компонентов листьев инжира – псоралена и 5-МОП – с

чистотой 99% и производительностью порядка 1 г в день. С использованием данной методики была наработана тестовая партия субстанций псоралена и 5-МОПа для создания препаратов для ПУФА-терапии и проведения испытаний их биоэквивалентности имеющимся на рынке аналогам.

Основные результаты и выводы

1. Впервые проведен скрининг сорбентов различной природы с целью поиска наиболее селективных условий разделения смесей структурно близких линейных фурукумаринов методом сверхкритической флюидной хроматографии.
2. Для обеспечения высокой селективности разделения фурукумаринов в СФХ предложено использовать сорбенты с ароматическими привитыми группами, среди которых оптимальными являются силикагелевые сорбенты с пентафторфенильными модификаторами.
3. Разработан новый метод разделения фурукумариновых смесей на пентафторфенильных сорбентах с помощью сверхкритической флюидной хроматографии. Метод успешно опробован при анализе составов экстрактов различных перспективных растительных источников лечебных фурукумаринов.
4. Показана применимость разработанного метода для масштабирования до препаративных объемов. С использованием масштабированного СФХ-метода проведено выделение в индивидуальном виде фурукумаринов псоралена и бергаптена из экстракта листьев инжира (*Ficus carica* L.) в количествах, необходимых для изготовления пробной партии препаратов для проведения испытаний биоэквивалентности.
5. Наличие внутримолекулярного аттрактивного взаимодействия в 5-оксипроизводных псоралена является структурной особенностью, которая обуславливает высокую селективность сорбентов с ароматическими группами по отношению к изомерным метоксипсораленам.

Список публикаций

1. Аносов А.К., Гончуков С.А., Марколия А.А., Мошнин М.В., Паренаго О.О., Покровский О.И. К вопросу об эффективности ПУФА терапии // Альманах клинической медицины. - 2008. - Т.17. - ч.2. - С. 26-29.
2. Покровский О.И., Марколия А.А., Лепешкин Ф.Д., Кувыкин И.В., Паренаго О.О., Гончуков С.А. Выделение линейных фурукумаринов из семян *Ammi Majus* с помощью сверхкритической флюидной экстракции и хроматографии // Сверхкритические флюиды: Теория и Практика. - 2009. - Т. 4. - № 4. - С. 61-72.
3. Покровский О.И., Крутикова А.А., Устинович К.Б., Паренаго О.О., Мошнин М.В., Гончуков С.А., Лунин В.В. Препаративное разделение метоксипроизводных псоралена с помощью сверхкритической флюидной хроматографии // Сверхкритические флюиды: теория и практика. - 2013. - Т. 8. - № 1. - С. 14-35.
4. Покровский О.И., Устинович К.Б., Паренаго О.О., Лунин В.В. Возможность существования внутримолекулярных водородных связей в 8-метоксипсоралене // Журн. физ. хим. - 2013. - Т. 87. - № 8. - С. 1-4.
5. Кувыкин И.В., Лепёшкин Ф.Д., Марколия А.А., Паренаго О.О., Покровский О.И., Гончуков С.А., Мошнин М.В. Разработка методики получения сверхкритического флюидного экстракта семян Амми большой (*Ammi majus* L.) и анализ полученного экстракта // V Международная научно-практическая конференция «Сверхкритические флюиды: основы, технологии, инновации», г. Суздаль, 15-18 сентября 2009 г., Сборник тезисов, С. 84.
6. O. Pokrovskiy, K. Ustinovich, O. Parenago, S. Gonchukov, V. Lunin. Isolation of Furocoumarins from *Ammi Majus* by SFE and SFC // Materials of the 5th International conference on Packed Column SFC, 20-22 July 2011, New York, USA.
http://greenchemistrygroup.org/pdf/2011/Pokrovskiy_SFC_2011_Poster.pdf
7. O.O. Parenago, K.B. Ustinovich, F.D. Lepeshkin, O.I. Pokrovskiy, V.V. Lunin. SFE/SFC of photosensibilizing furocoumarins from Umbelliferae

plant // Proceedings of the 13th European meeting on supercritical fluids, 9-12 October 2011, Hague, 8 p.

8. O. Pokrovskiy, A. Krutikova, K. Ustinovich, O. Parenago, V. Lunin. Role of aromatic intermolecular interactions in SFC isolation of skin disease PUVA-therapy agents from SFE extracts of Umbelliferae plants // Materials of the 6th International conference on Packed Column SFC, 3-5 October 2012, Brussels, Belgium.

<http://greenchemistrygroup.org/pdf/2012/Pokrovskiy.pdf>

9. Oleg I. Pokrovskiy, Alla A. Krutikova, Konstantin B. Ustinovich, Olga O. Parenago, Valeriy V. Lunin. Separation of isomeric furocoumarins from *Umbelliferae* plants extracts for PUVA-therapy of psoriasis by supercritical fluid chromatography // Proceedings of the 11th International conference on the fundamentals of Adsorption, 19-24 May 2013, Baltimore, USA. 2 p.
10. О.И. Покровский, К.Б. Устинович, А.А. Крутикова, О.О. Паренаго, В.В. Лунин. Роль ароматических взаимодействий в разделении метоксипроизводных псоралена методом сверхкритической флюидной хроматографии // VII Научно-практическая конференция с международным участием "Сверхкритические флюиды: основы, технологии, инновации", 16-21 сентября 2013 г., г. Зеленоградск Калининградской области, Сборник тезисов, С. 39-41.

Список цитируемой литературы

1. West C., Lesellier E. Orthogonal screening system of columns for supercritical fluid chromatography // J. Chromatogr. A. - 2008. - Vol. 1213. - P. 105-113.
2. Huff E.M. Interactions of Polar and Charged Molecules with Pi-electron Systems - ProQuest, 2009. - 212 p.
3. Grimme S. Do special noncovalent pi-pi stacking interactions really exist? // Angew. Chem. Int. Ed. - 2008. - Vol. 47. - P. 3430-3434.