

УДК 543.544

## ИЗУЧЕНИЕ УДЕРЖИВАЮЩЕЙ И РАЗДЕЛЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СИЛИКАГЕЛЕЙ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ НОВЫМ ХИРАЛЬНЫМ СЕЛЕКТОРОМ – НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ХИТОЗАНОМ

Н. Ю. Буданова, Е. Н. Шаповалова, С. А. Лопатин, В. П. Варламов, О. А. Шпигун

(кафедра аналитической химии)

Изучена адсорбция низкомолекулярного хитозана на силикагеле и силикагелях, модифицированных ионами кальция и меди. Показано, что максимальная адсорбция хитозана наблюдается для немодифицированного силикагеля. Изучено удерживание ряда аминов, аминифенолов, нитрофенолов, нитроанилинов, нитробензола, бензола, третбутилбензола, нафталина, антрацена на силикагеле, адсорбционно и химически модифицированном хитозаном и хитином. Установлено, что удерживающая способность исследованных неподвижных фаз увеличивается с ростом полярности сорбата и уменьшением полярности подвижной фазы. Рассмотрена возможность использования силикагеля, химически модифицированного хитозаном, в качестве хирального сорбента.

Хроматографическое разделение оптических изомеров происходит в результате различных молекулярных взаимодействий хиральной неподвижной фазы и энантиомерных сорбатов. Возможность разделения зависит как от связывающих, так и отталкивающих взаимодействий сорбата с поверхностью. Отталкивание определяется либо стерическими, либо диполь-дипольными взаимодействиями. Связывающие взаимодействия могут иметь разную природу (водородные связи, диполь-дипольное взаимодействие, связи, имеющие электростатическую природу, взаимодействия с переносом заряда, а также гидрофобные взаимодействия в водно-органических системах [1]). Вклад различных взаимодействий зависит от структуры хирального селектора.

В настоящее время расширились исследования по изучению свойств природного полисахарида–хитозана при создании хиральных неподвижных фаз. Наличие в его структуре гидроксильных групп и свободной аминогруппы, а также вторичной структуры полимерной частицы создает возможность различных взаимодействий хитозана с полярными органическими соединениями, что может привести к интересным хроматографическим результатам. В литературе описано применение производных хитозана для получения хиральных неподвижных фаз, но во всех описанных случаях использовали высокомолекулярный хитозан [2–5], работа с которым осложнена его плохой растворимостью в воде и органических растворителях. Водорастворимый низкомолекулярный хитозан более удобен для получения хиральных сорбентов как адсорбционных, так и химически иммобилизованных. Однако в литературе подобные сорбенты не описаны, поэтому необходимо исследование закономерностей взаимодействия сорбатов различной природы с поверхностью сорбентов. Целью данной работы является изучение удерживающей и разделяющей способности силикагелей, модифицированных хитозаном, в варианте высокоэффективной жидкостной хроматографии.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 0,2%-й раствор низкомолекулярного хитозана (5 кДа, степень дезацетилирования 85%) в 1 М уксусной кислоте; 0,05 М растворы нитратов кальция и меди, приготовленные по точной навеске; 0,1 М ацетатный буферный раствор (рН 5). Растворы (0,1–1 мг/мл) бензола, нафталина, антрацена, *трет*-бутилбензола, нитробензола, фенола, *пара*-нитрофенола, *орто*-, *мета*-, *пара*-нитроанилинов, *пара*-аминофенола, 2,4-динитрофенола, диметиламина, триметиламина, триэтиламина, изопропиламина, трибутиламина,  $\alpha$ -фенилового спирта, 1-(4-метокси)фенилэтиламина и соединения А (рис. 1) готовили растворением в 2-пропанол или в подвижной фазе. Для приготовления подвижной фазы использовали гексан, 2-пропанол, ацетонитрил, хлороформ квалификации «х.ч.».

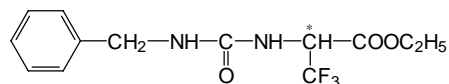


Рис. 1. Структурная формула соединения А

Фотометрическое определение хитозана проводили с кумасси G-250 методом градуировочного графика. Использовали фотоэлектроколориметр ФЭК-56 (Россия),  $\lambda = 610$  нм, толщина кюветы 1 см.

В качестве сорбентов использовали силикагель Диасорб-130 фирмы («Биохиммак», Россия), Диасорб-130, адсорбционно модифицированный хитозаном, и Силасорб 600 («Lachema»), химически модифицированный хитозаном. Размер частиц сорбентов составлял 10 мкм.

В работе использовали микроколоночный хроматограф «Милихром-4» («Научприбор», Россия, г. Орел), спектрофотометрический детектор ( $\lambda = 254$  нм). Колонки стальные размером (62×2) мм, «мертвый» объем колонки

120 мкл. Для построения изотерм адсорбции навеску сорбента 0,05 г вносили в 5 мл раствора хитозана (5–200) мкг/мл в ацетатном буферном растворе (pH 5) и встряхивали в течение 30 мин, что, как было установлено предварительно, достаточно для достижения равновесия. Концентрацию хитозана ( $c_p$ ), оставшегося в растворе, определяли фотометрическим методом и рассчитывали количество сорбированного хитозана ( $a_s$ ) в мг на г сорбента по формуле:

$$a_s = 100(c_{исх} - c_p),$$

где  $c_{исх}$  – исходная концентрация хитозана в растворе.

### Результаты и их обсуждение

Для модификации силикагеля хитозаном можно использовать два способа: физическую адсорбцию хитозана или его химическую иммобилизацию. Первый способ легче реализуем, поскольку не требует длительного времени, но во втором случае получаются более стабильные сорбенты. Для выбора лучших условий адсорбционной модификации силикагеля изучена адсорбция хитозана на силикагеле Диасорб-130 и на силикагеле, модифицированном нитратом кальция или меди. На рис. 2, 3 приведены изотермы сорбции хитозана. Как видно из рисунков, характер изотерм адсорбции хитозана на силикагеле, модифицированном ионами Cu(II) и Ca(II), и немодифицированном различен. В первом случае достигается плато на изотерме, а во втором адсорбция растет непрерывно в исследованном интервале концентрации хитозана. Необходимо отметить, что емкость силикагеля, обработанного ионами Cu(II), по хитозану в 2 раза выше емкости силикагеля, обработанного ионами Ca(II), и составляет соответственно 18,5 и 10 мг хитозана на 1 г сорбента. По-видимому, адсорбция хитозана на поверхности силикагеля, обработанного ионами металлов, определяется образованием координационных комплексов при взаимодействии ионов металлов с –ОН- и –NH<sub>2</sub>-группами хитозана. Поскольку ион Ca(II) является жесткой кислотой Льюиса, он способен взаимодействовать лишь с ОН-группами (жестким основанием Льюиса) хитозана, ион Cu(II) взаимодействует как с –NH<sub>2</sub>-, так и с –ОН-группами, что и обуславливает более высокую сорбцию хитозана. Адсорбция

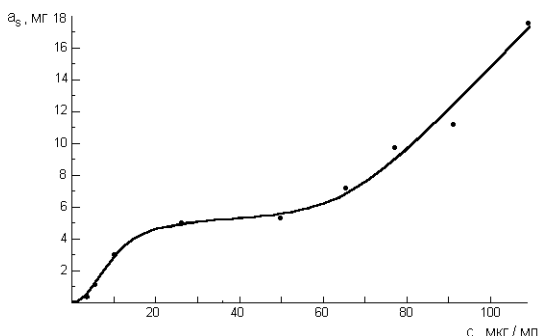


Рис. 2. Изотерма сорбции хитозана на силикагеле из ацетатного буферного раствора (pH 5). Объем раствора 5 мл, навеска силикагеля 0,05 г

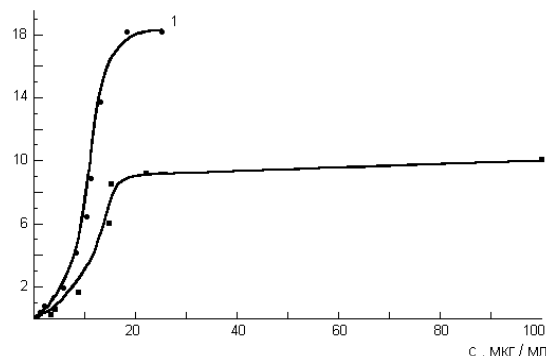


Рис. 3. Изотермы сорбции хитозана из ацетатного буферного раствора (pH 5) на силикагеле, модифицированном: 1 – ионами Cu(II), 2 – ионами Ca(II). Объем раствора 5 мл, навеска силикагеля 0,05 г

на силикагеле протекает по другому механизму: –ОН- и –NH<sub>2</sub>-группы хитозана, вероятно, образуют водородные связи с силанольными группами на поверхности силикагеля. Форма изотермы сорбции (рис. 2) свидетельствует об образовании полислоев хитозана на поверхности силикагеля, в результате чего адсорбционная емкость немодифицированного силикагеля оказывается выше. В дальнейшей работе в качестве носителя использовали диасорб-130.

Для изучения хроматографических свойств модифицированных хитозаном силикагелей исследовано удерживание соединений различной полярности на силикагеле (I) и изучаемых сорбентах: II – силикагеле, адсорбционно модифицированном хитозаном (содержание хитозана 0,5 мас.%), III, IV – силикагелях, химически модифицированных хитозаном (содержание хитозана 3,5 мас.%), и V – силикагеле, химически модифицированном хитином (содержание хитина 3,0 мас.%). Сорбенты III и IV различаются содержанием 3-аминопропилэтоксисилана (в III его в 6 раз больше, чем в IV), использованного в качестве «спейсера» при модифицировании силикагеля, а условия получения сорбентов III и V одинаковы. В качестве тестовых соединений были выбраны некоторые амины, аминифенолы, нитрофенолы, нитроанилины и ароматические углеводороды. Полученные данные приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, на всех изученных сорбентах удерживание сорбатов растет с увеличением их полярности. Силикагель, адсорбционно модифицированный хитозаном, близок по своим свойствам к силикагелю, но является более полярной неподвижной фазой. Об этом свидетельствует уменьшение удерживания на нем малополярных соединений и увеличение удерживания высокополярных соединений. Например, удерживание бензола, нафталина, антрацена и *трет*-бутилбензола уменьшается, а – *мета*-, *пара*-нитроанилинов, аминифенола, нитрофенола и, особенно, 2,4-динитрофенола увеличивается. Данная закономерность еще больше проявляется при переходе к силикагелям, химически модифицированным хитозаном (III, IV) и хитином (V), т.е. при увеличении содержания модификатора на поверхности силикагеля от 0,5 до 3,5 мас.%. На этих сорбентах велико удерживание

Таблица 1

**Коэффициенты емкости стандартных веществ на силикагеле и модифицированных силикагелях.**  
**Сорбенты: I – силикагель; II – силикагель, адсорбционно модифицированный хитозаном; III – силикагель, химически модифицированный хитозаном (1); IV – силикагель, химически модифицированный хитином. Используемые подвижные фазы: 1. (80 : 20) – гексан : 2-пропанол; 2. (60 : 40) – гексан : 2-пропанол; 3. (20 : 80) – гексан : 2-пропанол; 4. (20 : 80) – хлороформ : ацетонитрил; 5. ацетонитрил**

Вещество	Коэффициенты емкости				
	I	II	III	IV	V
Бензол	0,49±0,02 <sup>1</sup>	0,41±0,02 <sup>1</sup>	0,55±0,03 <sup>2</sup>	0,53±0,03 <sup>2</sup>	0,24±0,01 <sup>2</sup>
Нафталин	0,60±0,03 <sup>1</sup>	0,50±0,03 <sup>1</sup>	0,40±0,02 <sup>2</sup>	0,58±0,03 <sup>2</sup>	0,23±0,01 <sup>2</sup>
Антрацен	0,55±0,03 <sup>1</sup>	0,50±0,03 <sup>1</sup>	0,40±0,02 <sup>2</sup>	0,51±0,03 <sup>2</sup>	0,24±0,01 <sup>2</sup>
Трет-бутилбензол	0,35±0,02 <sup>1</sup>	0,35±0,02 <sup>1</sup>	0,50±0,03 <sup>2</sup>	0,55±0,03 <sup>2</sup>	0,24±0,01 <sup>2</sup>
Фенол	0,78±0,04 <sup>1</sup>	0,60±0,03 <sup>1</sup>	1,10±0,1 <sup>2</sup>	0,80±0,04 <sup>2</sup>	0,60±0,03 <sup>2</sup>
Нитробензол	0,60±0,03 <sup>1</sup>	0,60±0,03 <sup>1</sup>	1,0±0,1 <sup>2</sup>	0,55±0,03 <sup>2</sup>	1,1±0,1 <sup>2</sup>
о-Нитроанилин	1,1±0,06 <sup>2</sup>	0,67±0,03 <sup>1</sup>	3,7±0,2 <sup>2</sup>	1,1±0,1 <sup>2</sup>	3,8±0,2 <sup>2</sup>
м-Нитроанилин	2,1±0,1 <sup>1</sup>	2,5±0,1 <sup>1</sup>	6,1±0,3 <sup>2</sup>	1,5±0,1 <sup>2</sup>	6,8±0,3 <sup>2</sup>
п-Нитроанилин	2,6±0,1 <sup>1</sup>	2,9±0,2 <sup>1</sup>	10,3±0,5 <sup>2</sup>	1,9±0,1 <sup>2</sup>	11,5±0,6 <sup>2</sup>
п-Нитрофенол	0,45±0,02 <sup>3</sup>	0,54±0,03 <sup>3</sup>	1,8±0,1 <sup>3</sup>	0,67±0,03 <sup>2</sup>	1,3±0,1 <sup>3</sup>
п-Аминофенол	1,5±0,1 <sup>3</sup>	2,3±0,1 <sup>3</sup>	3,5±0,2 <sup>4</sup>	2,6±0,1 <sup>2</sup>	4,2±0,2 <sup>5</sup>
2,4-Динитрофенол	2,4±0,1 <sup>3</sup>	3,7±0,2 <sup>3</sup>	не элюир. <sup>4</sup>	не элюир. <sup>4</sup>	не элюир. <sup>4</sup>
Диметиламин	1,7±0,1 <sup>2</sup>	1,5±0,1 <sup>2</sup>	0,58±0,03 <sup>2</sup>	0,70±0,04 <sup>2</sup>	0,71±0,04 <sup>2</sup>
Триметиламин	0,35±0,02 <sup>2</sup>	0,44±0,02 <sup>2</sup>	0,69±0,03 <sup>2</sup>	0,54±0,03 <sup>2</sup>	0,67±0,03 <sup>2</sup>
Триэтиламин	0,40±0,02 <sup>2</sup>	0,5±0,03 <sup>2</sup>	0,73±0,04 <sup>2</sup>	0,53±0,03 <sup>2</sup>	0,73±0,04 <sup>2</sup>
Изопропиламин	5,6±0,3 <sup>2</sup>	3,2±0,2 <sup>2</sup>	1,5±0,1 <sup>2</sup>	1,75±0,1 <sup>2</sup>	0,78±0,04 <sup>2</sup>
Трибутиламин	0,40±0,02 <sup>2</sup>	0,63±0,03 <sup>2</sup>	0,42±0,02 <sup>2</sup>	0,43±0,02 <sup>2</sup>	0,38±0,02 <sup>2</sup>

нитроанилинов, аминофенола и нитрофенола, а 2,4-динитрофенол сорбируется необратимо. Различия в удерживании нитроанилинов и фенолов на сорбентах III и V незначительны, таким образом, силикагели, модифицированные хитозаном и хитином, содержащие свободную и ацелированную аминогруппы, имеют близкие хроматографические параметры по отношению к сорбатам, содержащим –ОН-, –NH<sub>2</sub>- и –NO<sub>2</sub>-группы. Более заметно, чем природа модификатора, на хроматографические свойства сорбентов влияет количество «спейсера». Удерживание полярных соединений заметно выше при большем содержании «спейсера», и этот эффект растет с увеличением полярности тестируемого вещества. Например, значения коэффициентов емкости *орто*-нитроанилина при уменьшении количества 3-аминопропилсилана в 6 раз уменьшаются от 3,7 до 1,1, а для *пара*-нитроанилина – от 10,3 до 1,9.

Необходимо отметить, что модифицирование силикагеля, особенно химическим путем, ухудшает эффективность хроматографических колонок (табл. 2), снижение количества 3-аминопропилэтоксисилана в процессе модификации позволяет уменьшить это негативное влияние.

Важным фактором, определяющим величину удерживания сорбатов и селективность их разделения, является состав подвижной фазы. В работе использовали подвижные фазы на основе гексана и хлороформа с добавками 2-пропанола и ацетонитрила. Установлено, что для всех исследованных сорбентов удерживание тестовых веществ уменьшалось с увеличением полярности подвижной фазы. При использовании в качестве подвижной фазы водно-ацетонитрильных смесей сорбаты практически не удерживаются на хроматографической колонке. Полученные закономерности указывают, что вещества удерживаются преимущественно по нормально-фазовому механизму.

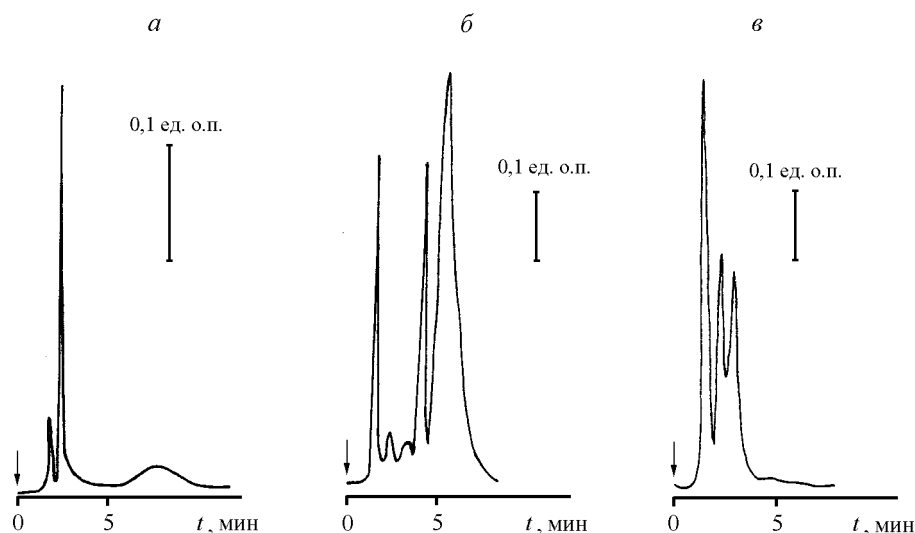


Рис. 4. Хроматограммы некоторых тестовых соединений на силикагеле, химически модифицированном хитозаном: *а* –  $\alpha$ -фенилового спирта; *б* – 1-(4-метокси) фенилэтиламина; *в* – соединения А (подвижная фаза: (80:20) – гексан:2-пропанол,  $\lambda = 254$  нм)

Анализ экспериментальных и литературных данных по механизмам удерживания веществ на полисахаридных сорбентах [6, 7] позволяет заключить, что при взаимодействии веществ с силикагелями, модифицированными хитозаном, происходит образование водородных связей и вероятны диполь-дипольные взаимодействия и образование комплексов с переносом заряда. Это подтверждается высоким удерживанием сорбатов, имеющих две полярные группы, особенно  $-\text{NH}_2$ - и  $-\text{NO}_2$ -группы. Стерические взаимодействия проявляются слабо, а образование комплексов включения маловероятно. Об этом свидетельствует тот факт, что удерживание бензола, нафталина, антрацена и *трет*-бутилбензола практически одинаково и не зависит от способа модифицирования силикагеля. А также то, что селективность разделения *мета*- и *орто*-нитроанилинов и *пара*- и *мета*-нитроанилинов практически не различается: коэффициенты селективности варьируются в пределах от 1,2 до 1,9, а их отношение не превышает 1,1.

Видно, что наибольшей селективностью по отношению к полярным сорбатам обладает силикагель, химически модифицированный хитозаном. Поэтому была оценена способность этого сорбента к хиральному распознаванию

на примере  $\alpha$ -фенилового спирта, 1-(4-метокси) фенилэтиламина и соединения А. Полученные хроматограммы представлены на рис. 4. Анализ хроматограмм и спектров поглощения сорбатов, зарегистрированных в максимуме полученных пиков, свидетельствует о наличии примесей в исследованных образцах  $\alpha$ -фенилового спирта и 1-(4-метокси)фенилэтиламина и разделении рацемической смеси соединения А. Как показывает проведенное исследование, энантиоселективность хитозана невысока. В соответствии со строением его молекулы, энантиоселективность может определяться образованием комплексов с переносом заряда при участии аминогрупп в качестве электронодонорного компонента, водородных связей с гидроксильными группами, гидрофобными взаимодействиями, образованием стерически селективных комплексов включения или различными комбинациями этих взаимодействий. Для изученных сорбентов характерны лишь первые два фактора, что недостаточно для эффективного разделения оптических изомеров. Очевидно, необходимо изменение структуры модификатора как с целью повышения гидрофобности сорбента, так и возможности образования комплексов включения.

Таблица 2

**Влияние природы сорбента на эффективность хроматографических колонок (использованные сорбенты приведены в табл. 1, подвижная фаза: (60 : 40) – гексан : 2-пропанол)**

Вещество	Число теоретических тарелок				
	I	II	III	IV	V
<i>о</i> -Нитроанилин	350	460	115	350	280
<i>м</i> -Нитроанилин	860	520	92	580	195
<i>п</i> -Нитроанилин	1090	1020	80	485	160

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алленмарк С. Хроматографическое разделение энантиомеров. М., 1991.
2. Okamoto Y., Kawashima M., Hatada K. // J. Am. Chem. Soc. 1984. **106**. P. 5357.
3. Yoshida A., Kuroda K., Kuraushi Y., Inoue T., Ohga K. // Kichin, Kitosan Kenkyu. 1999. **5**. P. 188.
4. Ohga K., Oyama H., Muta Y. // Anal. Sci. 1991. **7**. P. 653.
5. Senso A., Oliveros S., Minguillon C. // J. Chromatogr. 1999. **839**. P. 15.
6. Okamoto Y., Yashima E. // Angew. Chem. Int. Ed. 1998. **37**. P. 1020.
7. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига, 1988.