

УДК 543.545

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХИТОЗАНА В КАПИЛЛЯРНОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ

Н.Ю. Буданова, Е.Н. Шаповалова, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии; e-mail: shapovalova@analyt.chem.msu.ru)

Низкомолекулярный водорастворимый хитозан использован в капиллярном электрофорезе для модифицирования капилляра и в качестве хирального селектора для энантиоразделения ряда ароматических кислот. Показана возможность разделения смеси кислот при использовании капилляра, модифицированного хитозаном. Времена миграции кислот незначительно зависят от концентрации хитозана. Капилляр, модифицированный хитозаном, применен для энантиоразделения кислот при использовании 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина, оптимизировано разделение энантиомеров 2-фенилпропановой кислоты.

Разделение энантиомеров остается актуальной задачей, решение которой возможно высокоэффективными хроматографическими методами анализа, а именно ВЭЖХ и капиллярным электрофорезом (КЭ). Несмотря на низкие значения коэффициентов селективности (по сравнению с ВЭЖХ), успешное применение КЭ для разделения энантиомеров возможно благодаря его высокой эффективности. Быстрое изменение условий разделения и короткое время анализа делают КЭ удобным методом оценки энантиораспознавательной способности того или иного хирального селектора. В КЭ наиболее часто используют циклодекстрины и их производные, ациклические олигосахариды и полисахариды [1–4]. При использовании заряженных полисахаридов можно разделить более широкий круг соединений, чем при использовании нейтральных полисахаридов, так как дополнительные электростатические взаимодействия способствуют энантиоразделению, хотя и не являются энантиоселективными. В основе энантиораспознавания полисахаридами лежат гидрофобные, диполь-дипольные взаимодействия, водородные связи и макроструктура полимера. Из анионных полисахаридов в КЭ часто используют хондроитин сульфат С и гепарин [2]. Из катионных полисахаридов в КЭ диэтиламиноэтилдекстран проявляет свойства хирального селектора [5]. Хитозан является катионным полисахаридом, химия которого изучена достаточно хорошо [6]. Хиральная структура хитозана, свойственная полисахаридам, и протонированная аминогруппа создают возможность хирального взаимодействия хитозана с органическими кислотами. Для полимерной цепи хитозана характерно образование системы внутримолекулярных водородных связей, повышающих жесткость цепи хитозана и уменьшающих число возможных конформаций цепи [7]. Эти предпосылки создают

возможность использования хитозана как хирального селектора.

В КЭ хитозан используют для динамического покрытия капилляра при разделении основных протеинов [8]. Однако известно, что вещества, используемые для катионного покрытия капилляра, могут не только модифицировать электроосмотический поток (ЭОП), но и изменять селективность разделения кислот [9].

Данная работа посвящена оценке энантиораспознавательной способности хлорида хитозана (MW_n 7 кДа) к некоторым кислотам (рис. 1) методом КЭ и возможности оптимизации разделения кислот и энантиомеров кислот с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином (ГП- β -ЦД) при использовании модифицированного хитозаном капилляра.

Экспериментальная часть

Использовали растворы низкомолекулярного дигидроксилированного хитозана (MW_n 7 кДа, степень деацетиляции 85%) в ацетатном буфере; растворы 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина в ацетатном буфере, приготовленные по точной навеске; ацетатный буфер (0,02 М; pH 5,4; 4,8; 3,8); растворы (2,0–3,5 мкг/мл) миндальной, α -метоксифенилуксусной, 2-фенилпропановой, 3-фенилбутановой, кетопрофена, фенопрофена, ибупрофена в фоновом электролите или в смеси фоновый электролит–пропанол-2 (“х.ч.”).

В работе использовали прибор для капиллярного электрофореза “BioRad HPE-100” (“BioRad”, USA). Детектирование проводили при $\lambda = 200$ нм, приложенное напряжение 12 кВ. Ввод пробы гидростатический.

Использовали кварцевый капилляр длиной 519×444 мм, 75 мкм и 519 мм, 75 мкм. Новый капилляр обрабатывали 1 М NaOH (1 ч), водой (1 ч)

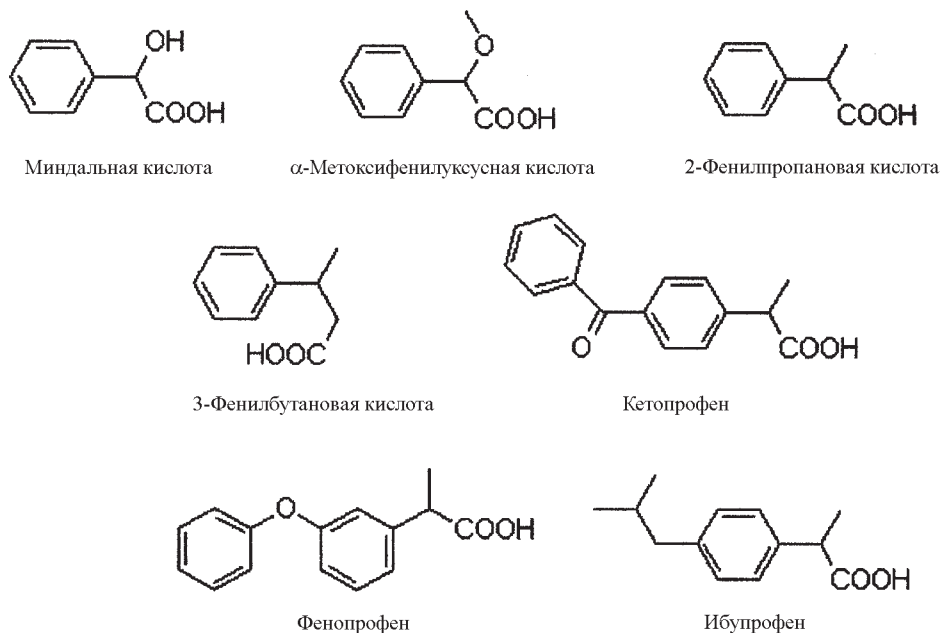


Рис. 1. Структуры исследуемых кислот

и 0,1%-м раствором хитозана в ацетатном буфере, рН 5,4 (2 ч). Между электрофоретическими определениями капилляр промывали фоновым электролитом в течение 1 мин. Фоновый электролит фильтровали через мембранный фильтр, размер пор 0,2 мкм. Пропанол-2 или вода были использованы в качестве маркера ЭОП.

Результаты и их обсуждение

Хитозан (полимер 2-амино-2-дезоксид-D-глюкозы) – поликатион, содержащий одну аминогруппу на каждый моносахаридный остаток. Как известно, присутствие в буфере четвертичных аммониевых оснований или аминов (полиаминов) приводит к адсорбции этих веществ на поверхности капилляра, что в свою очередь может привести к обращению ЭОП. Необходимо отметить, что эффективность покрытия капилляра зависит как от стерической доступности атомов азота, так и от гидрофобности заместителей, причем эффективность покрытия капилляра увеличивается при использовании более гидрофобных соединений [10]. Наличие протонированных аминогрупп в молекуле хитозана обуславливает адсорбцию хитозана на силанольных группах поверхности капилляра, что приводит к обращению ЭОП. Введение в капилляр ~50 мкг хитозана является достаточным для необратимого обращения ЭОП. Для получения стабильного покрытия хитозаном поверхности капилляра необходимо (и достаточно) использовать буфер с концентрацией хитозана не меньше 0,1%. Стабильность покрытия капилляра

хитозаном может быть охарактеризована относителем стандартным отклонением времени миграции маркера ЭОП (поскольку он отражает состояние поверхности капилляра) и для капилляра, модифицированного хитозаном, составляет 0,008. При отсутствии хитозана в буфере наблюдается низкая воспроизводимость времен миграции веществ, вызванная частичной десорбцией хитозана со стенок капилляра.

Хитозан обладает собственной электрофоретической подвижностью в направлении катода, таким образом, для изучения его хиральных свойств было целесообразно выбрать ряд кислот. Как известно, миграция хирального селектора в направлении, противоположном миграции вещества, представляет дополнительное условие для разделения энантиомеров, поскольку увеличивает разницу в электрофоретической подвижности свободного и связанного энантиомеров [11]. Кроме этого, положительно заряженная поверхность модифицированного хитозаном капилляра будет по-разному взаимодействовать с анионами кислот, что может изменить селективность разделения.

Наиболее важными факторами для хирального разделения являются рН и концентрация хирального селектора. Для полисахаридов увеличение концентрации хирального селектора приводит к улучшению разделения энантиомеров [2]. Было изучено влияние рН и влияние концентрации хитозана в интервале 0,01–1,34% на селективность и эффективность разделения кислот. Использование буфера с концентра-

цией хитозана $>1,5\%$ сопровождается увеличением тока в системе, что приводит к нагреванию буфера и нестабильности базовой линии. Исследуемый хиральный селектор позволяет варьировать кислотность в узком интервале рН. По результатам титрования, значения pK_a аминогруппы низкомолекулярного хитозана составляет 6,4. Нужно отметить, что хитозан растворим в воде только в протонированной форме, следовательно, необходимо использовать растворы хитозана при $pH \leq 6$. Однако в кислой области рН хитозан легко гидролизует, поэтому мы предполагаем, что интервал рН 4,7–5,4 является наиболее подходящим для работы с хитозаном в КЭ. Как было установлено, времена миграции веществ незначительно сокращаются при уменьшении рН от 5,4 до 4,7 (концентрация хитозана 0,45%). Так, например, времена миграции кетопрофена составляют 8,66 и 8,49 мин при рН 5,4 и 4,7 соответственно. Время миграции маркера ЭОП уменьшается значительно сильнее (9,41 и 10,59 мин при рН 4,7 и 5,4 соответственно). Таким образом, подвижности исследуемых кислот при рН 4,7 уменьшаются. Но это уменьшение, возможно, следует отнести к протонированию кислот при уменьшении рН (уменьшается доля диссоциированной кислоты и, следовательно, уменьшается подвижность) и к протонированию аминогрупп хитозана при таком уменьшении рН, приводящее к увеличению ЭОП. Влияние концентрации хитозана на электрофоретическое поведение кислот было изучено при рН 5,4, т.е. при меньшем ЭОП.

В таблице представлены данные по времени миграции веществ в зависимости от концентрации хитозана при рН 5,4. На ЭОП и, следовательно, на

время миграции исследуемых веществ основное влияние оказывают три фактора: вязкость электролита, температура и ζ -потенциал двойного электрического слоя. Увеличение концентрации полимера приводит к увеличению вязкости раствора и уменьшению подвижности всех анализируемых веществ. Можно предположить, что из-за адсорбции хитозана вязкость около стенок капилляра больше, чем в объеме раствора, что дополнительно уменьшает подвижность хлорид-ионов, создающих ЭОП. С одной стороны, увеличение ионной силы при добавлении хитозана (поскольку используется хлорид хитозана) приводит к сжатию двойного электрического слоя и уменьшению ζ -потенциала на поверхности капилляра, что вносит вклад в уменьшение ЭОП. С другой стороны, при добавлении хитозана увеличивается ток, что приводит к увеличению температуры буфера в капилляре и увеличению подвижности всех веществ. Таким образом, влияние концентрации хитозана на ЭОП и, следовательно, на подвижность анализируемых веществ достаточно сложное. Полученное уменьшение электроосмоса при увеличении концентрации хитозана определяется одновременным действием нескольких факторов. Возможно, что наиболее существенный вклад вносит увеличивающаяся вязкость растворов полимера.

Как видно из таблицы, характер зависимости времени миграции от концентрации хитозана одинаков для разных кислот. Увеличение концентрации хитозана вызывает лишь небольшое увеличение подвижности исследуемых кислот, что говорит об отсутствии заметных ионных взаимодействий с ними хитозана. Времена миграции профенов совпадают между собой в буфере, практически не содержащем

Влияние концентрации хитозана на время миграции исследуемых кислот

Соединение	Концентрация хитозана, %			
	0,01	0,11	0,44	1,34
Пропанол-2	9,94	10,38	10,59	11,55
Миндальная кислота	5,53	6,22	7,35	8,46
α -Метоксифенилуксусная кислота	5,75	6,43	7,54	8,66
2-Фенилпропановая кислота	5,85	6,51	7,62	8,72
3-Фенилбутановая кислота	6,17	6,84	7,97	9,08
Кетопрофен	6,40	7,15	8,66	10,15
Фенопрофен	6,40	7,14	8,54	9,98
Ибупрофен	6,40	7,14	8,49	9,88

Примечание. 10 мМ ацетатный буфер (рН 5,4); капилляр 519 мм, 75 мкм.

хитозана (0,01%), однако при увеличении концентрации хитозана появляется селективность по отношению к разделению между собой профенов. Поскольку значения pK_a кетопрофена, фенопрофена и ибупрофена составляют соответственно 4,36; 4,66; 4,52 [12], т.е. они диссоциированы при pH 5,4 в значительной степени, селективность определяется ион-парными взаимодействиями профенов и хитозана. Разделения энантиомеров кислот при использовании хитозана не происходит. Можно предположить, что хитозан не проявляет свойства хирального селектора по отношению именно к исследуемым соединениям и, возможно, мог бы быть эффективным хиральным селектором по отношению к таким веществам, как бинафтилфосфорная кислота или 1,1'-бинафтил-2,2'-дикарбоновая кислота, что косвенно подтверждается литературными данными. Хлорид диэтиламиноэтилдекстрана и низкомолекулярные аминогликозидные антибиотики проявляют хиральность по отношению к этим соединениям и не разделяют, как и хитозан, энантиомеры некоторых исследованных кислот [5].

Использование капилляра, модифицированного хитозаном, позволяет разделить смесь из пяти кислот за более короткое время по сравнению с немодифицированным капилляром. Разделение кислот в 22 мМ ацетатном буфере при pH 5,4 (0,1% хитозана) происходит в течение 7 мин (рис. 2). Время миграции маркера ЭОП в 20 мМ ацетатном буфере, pH 5,4 в немодифицированном капилляре составляет 5,1 мин. Поскольку при pH 5,4 все кислоты полностью (или практически полностью) находятся в диссоциированном состоянии, то в немодифицированном капилляре кислоты будут мигрировать после

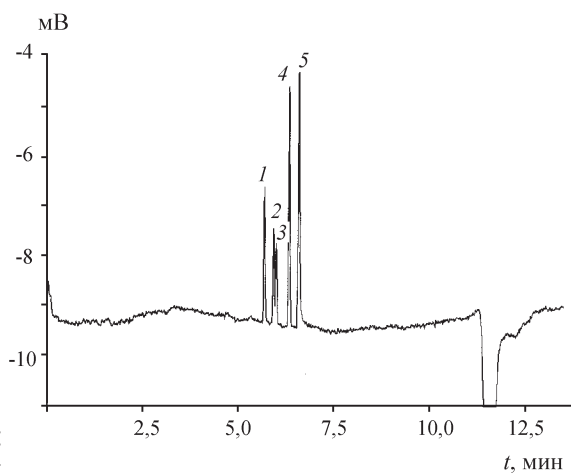


Рис. 2. Разделение смеси кислот: 1 – миндальная, 2 – α -метоксифенилуксусная, 3 – 2-фенилпропановая, 4 – 3-фенилбутановая, 5 – фенопрофен. Буфер: 22 мМ ацетатный буфер (pH 5,4) 0,1% хитозана; капилляр: 519 мм, 75 мкм

ЭОП, и время их разделения будет больше. Как и предполагалось, положительно заряженная поверхность капилляра взаимодействует с анионами кислот, что выражается в некотором снижении эффективности разделения (например, для миндальной кислоты 122877 т.т./м). При использовании капилляра, модифицированного хитозаном, для разделения основных протеинов отсутствие взаимодействий с положительно заряженной поверхностью капилляра привело к эффективности ≥ 400000 т.т./м [8].

Известно, что вещества, используемые для катионного покрытия капилляра, могут изменять селективность разделения кислот [9]. Представляло интерес использовать капилляр, модифицированный хитозаном, для энантиоразделения кислот с ГП- β -ЦД, поскольку, во-первых, ЭОП, направленный к аноду, должен уменьшить время анализа кислот, и,

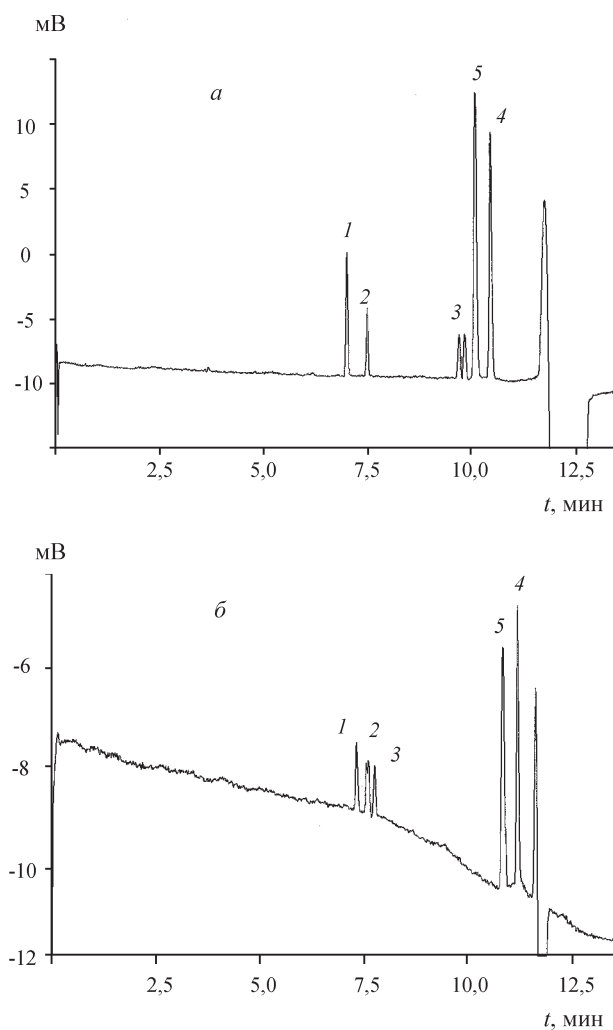


Рис. 3. Разделение смеси кислот: 1 – миндальная, 2 – D,L α -метоксифенилуксусная, 3 – D,L 2-фенилпропановая, 4 – 3-фенилбутановая, 5 – фенопрофен. Буфер: 20 мМ ацетатный буфер, 30 мМ 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина, 0,1% хитозана. pH: а – 4,8; б – 3,8; капилляр: 519 мм, 75 мкм

во-вторых, капилляр, модифицированный хиральным катионным покрытием, может изменить энантиоселективность разделения. При использовании ГП-β-ЦД энантиомеры всех исследуемых кислот (кроме α-метоксифенилуксусной) могут быть разделены [13]. Все кислоты взаимодействуют с ГП-β-ЦД, что выражается в уменьшении подвижности кислот по сравнению с буфером, не содержащим ГП-β-ЦД. Наиболее прочные комплексы образует 3-фенилбутановая кислота (по разнице подвижностей в присутствии ГП-β-ЦД и в его отсутствие). На рис. 3, а, б показано разделение кислот в буфере, содержащем 30 мМ ГП-β-ЦД при рН 4,8 (а) и 3,8 (б)). Получено разделение энантиомеров 2-фенилпропановой кислоты ($\alpha = 0,922$; $R_S = 1,15$) и частичное разделение энантиомеров α-метоксифенилуксусной ($\alpha = 0,981$, $R_S = 0,64$). Тот факт, что разделения энантиомеров α-метоксифенилуксусной кислоты при более

высоком значении рН (4,8) не происходит, свидетельствует о том, что разделение энантиомеров этой кислоты происходит в недиссоциированном состоянии, а энантиомеров 2-фенилпропановой кислоты – в диссоциированном. Необходимо отметить отсутствие даже частичного разделения энантиомеров 2-фенилпропановой кислоты при рН 3,8. Коэффициент селективности, полученный для 2-фенилпропановой кислоты при использовании 30 мМ ГП-β-ЦД в капилляре, модифицированном хитозаном, незначительно отличается от коэффициента селективности в буфере, содержащем 50 мМ ГП-β-ЦД [12] (0,922 и 0,917 соответственно), т.е. для достижения разделения энантиомеров достаточно использовать 30 мМ ГП-β-ЦД. Сравнение полученных данных с литературными [12, 14] показывает, что наличие катионного покрытия на основе хитозана позволяет сократить время анализа и расход хирального селектора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fanali S. // J. Chromatogr. A. 2000. **875**. P. 89.
2. Nishi H., Kuwahara Y. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2001. **48**. P. 89.
3. Du Y., Taga A., Suzuki S., Liu W., Honda S. // J. Chromatogr. A. 2002. **947**. P. 287.
4. Du Y., Taga A., Suzuki S., Liu W., Honda S. // J. Chromatogr. A. 2002. **962**. P. 221.
5. Nishi H., Nakamura K., Nakai H., Sato T. // Chromatographia. 1996. **43**. P. 426.
6. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М., 2002.
7. Горбачева И.Н., Скорикова Е.Е., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С., Бабиевский К.К. // Высокомолекулярные соединения. 1991. **33**. С. 1899.
8. Yao Y.L., Li S.F.Y. // J. Chromatogr. 1994. **663**. P. 97.
9. Sebastiano R., Gelfi C., Righetti P.G., Citterio A. // J. Chromatogr. A. 2000. **894**. P. 53.
10. Sebastiano R., Gelfi C., Righetti P.G., Citterio A. // J. Chromatogr. A. 2001. **924**. P. 71.
11. Wren S.A.C., Rowe R.C. // J. Chromatogr. 1992. **603**. P. 235.
12. Wolbach J.P., Lloyd D.K., Wainer I.W. // J. Chromatogr. A. 2001. **914**. P. 299.
13. Handbook of Capillary Electrophoresis Applications / Eds. H. Shintani, J. Polonsky. L., Weinheim, N.Y., Tokyo, Melbourne, Madras. 1997.
14. Belder D., Schomburg G. // J. Chromatogr. 1994. **666**. P. 351.

Поступила в редакцию 04.01.05

LOOKING INTO THE POSSIBILITY OF USING OF CHITOSAN IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

N.Yu. Budanova, Ye.N. Shapovalova, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry)

Some possibilities for application in capillary electrophoresis of low-molecular water-soluble chitosan as chiral selector for enantioseparation of aromatic acids and for the modification of fused-silica capillary surface are discussed. The chitosan coated capillary performance is demonstrated by fast separation of aromatic acids. The migration times of acids depend slightly on chitosan concentration. The chitosan coated capillary is used for chiral separations of acids with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, the enantioseparation conditions of 2-phenylpropionic acid are optimized.