

УДК 543.544

ИЗУЧЕНИЕ УДЕРЖИВАЮЩЕЙ И РАЗДЕЛЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СИЛИКАГЕЛЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИРАЛЬНЫМ СЕЛЕКТОРОМ N-(3-СУЛЬФО, 3-КАРБОКСИ)-ПРОПИОНИЛХИТОЗАНОМ

Е.В. Потехина, Е.Н. Шаповалова, С.А. Лопатин*, О.А. Шпигун

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

Синтезирован новый сорбент на основе силикагеля, модифицированного N-(3-сульфо, 3-карбокси)-пропионилхитозаном (СКПХ), и изучены его хроматографические свойства. Исследованы закономерности механизма удерживания и разделения хиральных соединений с использованием СКПХ. Проведено исследование энантиораспознавательной способности сорбента по отношению к ряду веществ основного характера, включающих лекарственные вещества (флуоксетин, хлорциклизин, пиндолол и др.).

Молекулы большинства соединений, представляющих интерес для фармакологии и биохимии, содержат один или несколько асимметрических центров. В процессе синтеза этих соединений могут получаться смеси энантиомеров. Поскольку оптические изомеры обычно различаются по фармакологической и биологической активности, интерес к проблеме разделения энантиомеров постоянно растет. Особую популярность в решении этой задачи приобрел метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), поскольку он обеспечивает высокую эффективность и селективность разделения энантиомеров при относительно невысокой стоимости анализа и незначительных временных затратах. Весьма перспективны для создания хиральных неподвижных фаз полисахариды, так как они имеют асимметрические центры в каждом структурном звене. Наименее исследованы такие полисахариды, как хитозан и его аналоги.

В качестве новой неподвижной хиральной фазы для разделения оптических изомеров ряда лекарственных веществ методом ВЭЖХ нами изучен N-(3-сульфо, 3-карбокси)-пропионилхитозан (СКПХ), в котором по аминогруппе хитозана введены дополнительный хиральный центр, сульфогруппа и карбоксильная группа (рис. 1). Впервые это соединение было предложено авторами работ [1, 2] в качестве хирального селектора в капиллярном электрофорезе. Полученные данные позволяют говорить о перспективности применения СКПХ в качестве хирального селектора в ВЭЖХ.

Методика эксперимента

Работу выполняли на жидкостном хроматографе "Shimadzu" SLC-10A (Япония) со спектрофотометрическим детектором "Shimadzu" SPD-10AV и насосом "Shimadzu" LC-10AT. Для записи и обработки хроматограмм использовали программное обеспечение

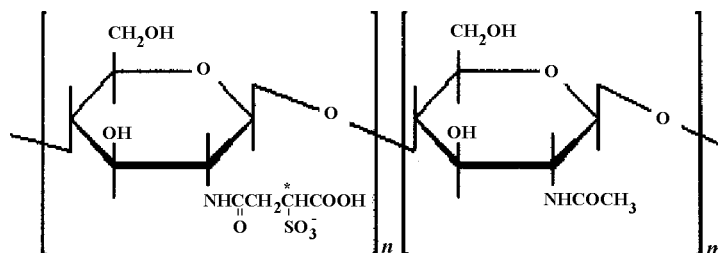


Рис. 1. Структурная формула N-(3-сульфо, 3-карбокси)-пропионилхитозана

CLASS-VP v.5.0.3. фирмы “Shimadzu”. Объем петли дозатора составлял 20 мкл. Детектирование проводили при длине волны 230 нм. В работе использовали стальную колонку размером 150 × 3,2 мм. Колонку заполняли с помощью пневматического насоса высоких давлений К-1900 фирмы “Knauer” (Германия).

Для получения сорбента использовали силикагель “Silasorb S 300” (средний размер частиц 7,5 мкм), модифицированный хитозаном (5 кДА, степень деацетилирования 85%), предоставленный центром “Биоинженерия” РАН, малеиновый альдегид, метабисульфит натрия квалификации “х.ч.”.

“Мертвое время” колонки составляло 2,25 мин. Для приготовления подвижных фаз использовали метанол и ацетонитрил (“Криохром”, Россия), уксусную кислоту и триэтиламин квалификации “для хроматографии”. Использовали также растворы (0,1–1,0 мг/мл) никотинамида квалификации “х.ч.” и рацемических смесей исследованных соединений компании “Merk” (Германия), приготовленные растворением указанных веществ в подвижной фазе.

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе предпринята попытка создания новой хиральной неподвижной фазы для ВЭЖХ с использованием СКПХ.

Эффективность действия хиральных сорбентов определяется разницей в энергии образования диастереомерных комплексов субстрат–лиганд. Помимо правильного выбора хиральных лигандов важное значение имеет способ получения хиральных сорбентов. При синтезе должны сохраняться хиральная конфигурация прививаемых лигандов и реакционные способности функциональных групп. Фиксация хиральной молекулы должна происходить строго определенным

образом во избежание стерических затруднений. На практике это достигается применением длинной гибкой “ножки” или “разбавлением” привитых хиральных лигандов на поверхности носителя, уменьшением их поверхностной концентрации.

Большинство подходов к созданию хиральных неподвижных фаз основано на химическом модифицировании минеральных носителей и в первую очередь силикагелей. К преимуществам последних относятся ненабухаемость в различных растворителях, механическая прочность, термостабильность, высокая скорость массообмена, возможность выделения узких фракций, незначительная собственная каталитическая активность, хорошая изученность, доступность и относительно низкая стоимость [3].

Эффективность хроматографической колонки, заполненной сорбентом, была оценена на примере никотинамида при использовании в качестве подвижной фазы смеси (50:50) метанол–0,1%-й раствор триэтиламинацетата (ТЭАА). Она составила 16380 теоретических тарелок на 1 м колонки.

Закономерности удерживания, селективность и эффективность энантиораспознавания силикагеля, модифицированного СКПХ, изучали на примере ряда оптически активных соединений, структурные формулы которых представлены на рис. 2, в обращенно-фазовом (ОФ) и полярно-органическом (ПО) режимах жидкостной хроматографии.

Хроматографическое исследование силикагеля, химически модифицированного СКПХ в ОФ-режиме ВЭЖХ

При выборе условий энантиораспознавания в ОФ-режиме исследовали влияние на удерживание, селективность и эффективность следующих факторов:

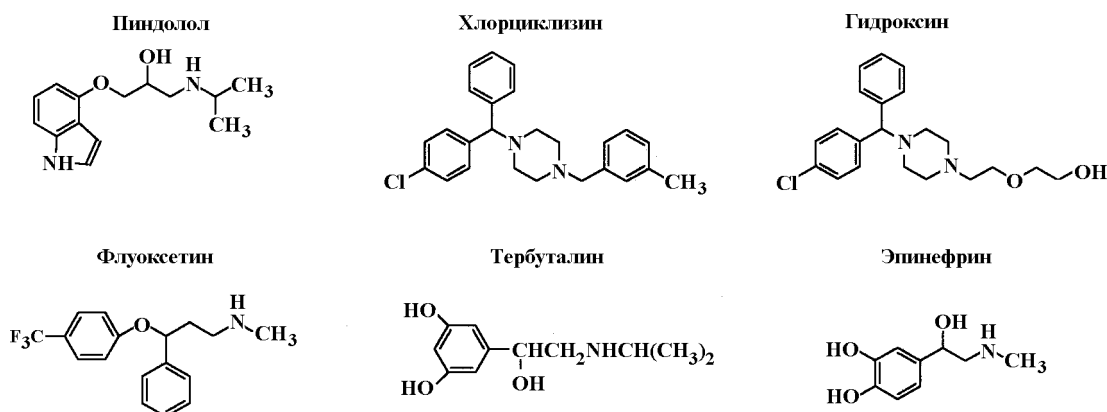


Рис. 2. Структурные формулы модельных соединений для исследования энантиоселективности силикагеля, модифицированного N-(3-сульфо, 3-карбоксо)-пропионилхитозаном

Т а б л и ц а 1

Влияние состава, концентрации и pH водного компонента подвижной фазы (ПФ), а также количества органического модификатора на хроматографические свойства силикагеля, химически модифицированного СКПХ (скорость потока 1,0 мл/мин; $\lambda = 230$ нм)

Вещество	<i>k</i>	<i>N</i> *	α	<i>R_S</i>
ПФ: (50:50) MeOH**·H ₂ O				
Пиндолол	11,72	840	1,0	–
Флуоксетин	***	–	–	–
Гидроксизин	***	–	–	–
Эпинефрин	20,65	600	1,0	–
ПФ: (50:50) MeOH:0,05%ТЭАА pH 4,6				
Пиндолол	2,51	2100	1,0	–
Флуоксетин	9,94	15200	1,09	0,94
Гидроксизин	12,03	1670	1,2	0,61
Эпинефрин	13,05	2030	1,17	0,25
ПФ: (50:50) MeOH:0,1%ТЭАА pH 4,6				
Пиндолол	1,30	1000	1,0	–
Флуоксетин	0,90	1000	1,36	0,44
Гидроксизин	0,92	1030	1,16	0,22
Эпинефрин	1,03	730	1,31	0,34
ПФ: (50:50) MeOH:1,0%ТЭАА pH 4,6				
Пиндолол	0,67	1020	1,0	–
Флуоксетин	0,49	1870	1,0	–
Гидроксизин	0,48	1330	1,0	–
Эпинефрин	0,56	1800	1,0	–
ПФ: (50:50) MeOH:10 ⁻³ M NH ₄ Cl pH 4,8				
Флуоксетин	23,97	5970	1,05	0,34
Гидроксизин	12,62	1510	1,0	–
Эпинефрин	16,13	30	1,26	<0,1
ПФ: (50:50) MeOH:5×10 ⁻³ M NH ₄ Cl pH 4,5				
Флуоксетин	7,46	1550	1,0	–
Гидроксизин	4,44	1540	1,0	–
Эпинефрин	8,47	720	1,0	–
ПФ: (50:50) MeOH:0,1%ТЭАА pH 3,5				
Флуоксетин	0,25	750	1,0	–
Гидроксизин	0,17	480	1,0	–
Эпинефрин	0,10	550	1,0	–
ПФ: (50:50) MeOH:0,1%ТЭАА pH 5,4				
Пиндолол	4,78	560	1,0	–
Флуоксетин	3,92	530	1,0	–
Гидроксизин	3,70	810	1,0	–
Эпинефрин	3,37	1360	1,0	–
ПФ: (70:30) MeOH:0,1%ТЭАА pH 4,6				
Пиндолол	2,09	1610	1,0	–
Флуоксетин	1,36	1090	1,0	–
Гидроксизин	1,2	1940	1,0	–
Эпинефрин	3,02	1920	1,0	–

* Число теоретических тарелок на 1 м колонки; ** метанол; *** не элюируется.

1) природа органического модификатора и его концентрация в подвижной фазе;

2) pH и состав водного компонента подвижной фазы.

Результаты, полученные при исследовании хроматографических свойств этого сорбента в OF-режиме ВЭЖХ, представлены в табл. 1. В качестве органического модификатора использовали метанол и ацетонитрил, а в качестве вводимых в подвижную фазу электролитов – ацетат триэтиламина (ТЭАА), хлорид аммония и ледяную уксусную кислоту, содержащие катион, способный конкурировать с основными группами сорбата за взаимодействие с карбоксильной группой и сульфогруппами СКПХ.

При использовании подвижных фаз, содержащих ацетонитрил, времена удерживания исследуемых модельных соединений сравнимы с “мертвым” временем колонки, поэтому работу проводили в присутствии метанола.

При использовании водно-метанольных смесей в качестве подвижной фазы наблюдались высокие времена удерживания и отсутствие энантиоселективности. Резкий спад времени удерживания происходит при добавлении в подвижную фазу (метанол–вода) электролитов (0,05%), содержащих катион, способный конкурировать за взаимодействие с карбоксильной группой и сульфогруппами СКПХ. При росте концентрации электролитов от 0,1 до 1% изменения в удерживании были невелики. С увеличением содержания метанола в подвижной фазе времена удерживания росли, но селективность энантиоразделения уменьшалась. Установлено, что при 70%-м содержании метанола в подвижной фазе разделения энантиомеров не происходит.

Неудачным оказалось использование уксусной кислоты в качестве модификатора водного компонента подвижной фазы – при концентрации 0,05% времена удерживания сравнимы с “мертвым” временем колонки. Энантиораспознавание соединений наблюдалось при введении в подвижную фазу ТЭАА (0,05 и 0,1%) и NH₄Cl (10⁻³ M). При росте концентрации ТЭАА от 0,05 до 1%, а концентрации хлорида аммония – от 10⁻³ до 5×10⁻³ M значение разрешения *R_S* снижалось до нуля.

Большее число разделений и наилучшие значения селективности и разрешения энантиомеров получены при использовании в качестве электролита ТЭАА. В качестве примера на рис. 3 представлена хроматограмма разделения энантиомеров флуоксетина.

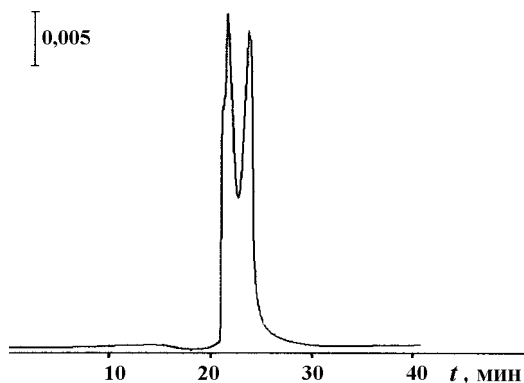


Рис. 3. Хроматограмма разделения энантиомеров флуоксетина (подвижная фаза – метанол:0,05% раствор ТЭАА (50:50), рН 4,6; скорость потока 1 мл/мин; $\lambda = 230$ нм)

Таким образом, энантиоселективность зависит от природы катиона электролита и его концентрации. Вероятно, катион электролита влияет на электростатические взаимодействия между молекулами сорбата и СКПХ, что в свою очередь обуславливает хиральную селективность сорбента. При росте рН водного компонента подвижной фазы от 3,5 до 5,4 времена удерживания модельных соединений увеличиваются. Оптимальное значение рН для разделения энантиомеров флуоксетина, гидроксизина и эpineфрина составляет 4,6. Возможно, что при этих условиях карбоксильная группа СКПХ, pK_a которой составляет 5,8 [2], незначительно диссоциирована, что благоприятно для образования водородных связей с amino- или гидроксигруппами рацематов.

Хроматографическое исследование силикагеля, химически модифицированного СКПХ в ПО варианте ВЭЖХ

Из литературных данных [4] известно, что для многих хиральных селекторов способность к энантиораспознаванию повышается при использовании подвижных фаз с высоким содержанием органического модификатора, т.е. при работе в ПО варианте ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы в ПО-варианте использовали метанол или смесь ацетонитрила и метанола с добавками ТЭАА и уксусной кислоты.

В табл. 2 представлены результаты исследования влияния на удерживание и разделение энантиомеров таких факторов, как соотношение ацетонитрила и метанола в подвижной фазе, а также природа и количество добавленного электролита.

Влияние соотношения ацетонитрила и метанола на удерживание и разделение энантиомеров изучали на примере рацемических смесей гидроксизина, флуоксетина и эpineфрина. Удерживание соединений умень-

Влияние состава подвижной фазы (ПФ) и количества добавки электролита на хроматографические свойства силикагеля, химически модифицированного СКПХ (скорость потока 1,0 мл/мин; $\lambda = 230$ нм)

Вещество	k	N^*	α	R_s
ПФ: (95:5) CAN** :MeOH, 0,1%ТЭАА				
Флуоксетин	0,40	1750	1,14	0,34
Хлорциклizin	0,33	960	1,0	–
Тербуталин	0,36	1070	1,0	–
Гидроксизин	0,39	3360	1,25	0,25
Эpineфрин	0,32	590	1,0	–
ПФ: (50:50) АСN:MeOH, 0,1%ТЭАА				
Флуоксетин	21,69	1250	1,0	–
Хлорциклizin	3,98	650	1,0	–
Тербуталин	9,76	210	1,0	–
Гидроксизин	1,65	1330	1,14	0,28
Эpineфрин	10,20	610	1,0	–
ПФ: (50:50) АСN:MeOH, 0,2%ТЭАА				
Флуоксетин	10,86	1020	1,0	–
Хлорциклizin	2,40	810	1,17	0,30
Тербуталин	2,89	430	1,0	–
Гидроксизин	0,86	680	1,20	0,23
Эpineфрин	7,65	290	1,0	–
ПФ: (50:50) АСN:MeOH, 0,5%ТЭАА				
Флуоксетин	5,08	1090	1,0	–
Хлорциклizin	1,74	1320	1,14	0,39
Тербуталин	1,25	500	1,0	–
Гидроксизин	0,85	350	1,21	<0,1
Эpineфрин	5,73	30	1,02	<0,1
ПФ: MeOH, 0,1%ТЭАА				
Флуоксетин	13,42	3570	1,0	–
Гидроксизин	3,23	1530	1,0	–
Эpineфрин	12,48	690	1,07	0,18
ПФ: MeOH, 0,5%ТЭАА				
Флуоксетин	3,87	1610	1,0	–
Гидроксизин	1,27	830	1,0	–
Эpineфрин	2,19	1440	1,0	–
ПФ: MeOH, 0,25%AcOH***				
Флуоксетин	0,72	1050	1,73	0,74
Хлорциклizin	1,47	240	1,0	–
Тербуталин	0,56	850	1,0	–
Гидроксизин	0,50	2490	1,16	0,43
Эpineфрин	2,65	170	1,0	–
ПФ: MeOH, 0,5%AcOH				
Флуоксетин	0,72	220	1,45	<0,1
Хлорциклizin	0,82	230	1,51	<0,1
Тербуталин	0,50	930	1,17	<0,1
Гидроксизин	0,45	2430	1,19	0,27
Эpineфрин	2,52	200	1,0	–
ПФ: MeOH, 1,0%AcOH				
Флуоксетин	0,22	390	1,0	–
Гидроксизин	0,46	1150	1,20	<0,1
Эpineфрин	2,22	630	1,0	–

* Число теоретических тарелок на 1 м колонки; ** ацетонитрил; *** уксусная кислота.

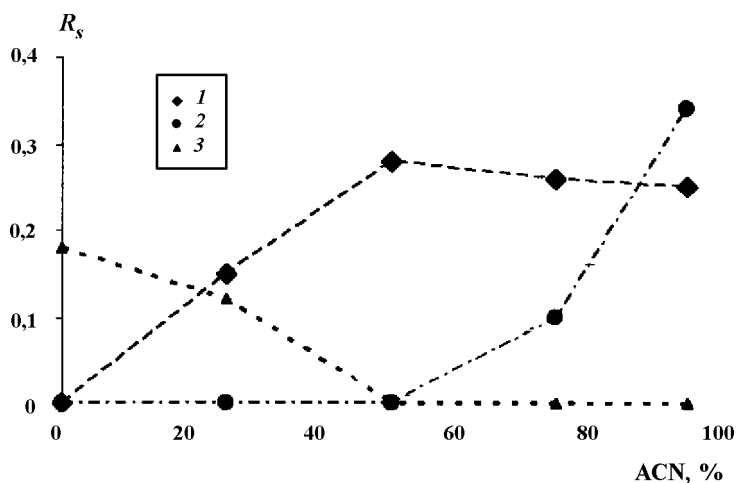


Рис. 4. Зависимость величины разрешения R_s энантимеров гидроксизина (1), флуоксетина (2) и эпинефрина (3) от содержания ацетонитрила в подвижной фазе (ацетонитрил:метанол, 0,1% ТЭАА)

шается при увеличении содержания ацетонитрила в подвижной фазе. Это связано прежде всего с более высокой полярностью ацетонитрила.

На рис. 4 показана зависимость величины разрешения R_s от содержания ацетонитрила в подвижной фазе. При высоких концентрациях ацетонитрила и при меньшем удерживании наблюдается лучшее разделение энантимеров флуоксетина и гидроксизина, а энантимеры эпинефрина частично делятся лишь при высоком содержании метанола. Возможно, это обусловлено разным характером взаимодействия сорбатов с хиральными центрами селектора. Для объемных молекул флуоксетина и гидроксизина большую роль играют гидрофобные взаимодействия и стерическая дискриминация, а для молекул эпинефрина, содержащего три ОН-группы, – водородные связи. Следовательно, подобный эффект может вызвать сочетание гидрофоб-

ных взаимодействий, образования водородных связей, стерических препятствий и конкурентного взаимодействия катионов ТЭАА с селектором. Таким образом, влияние природы органического растворителя и его содержания в подвижной фазе на удерживание и разделение рацемических соединений неоднозначно и определяется прежде всего структурой сорбатов.

Проведено исследование влияния природы добавки электролита, в качестве которого использовали ТЭАА и уксусную кислоту, и ее количества на удерживание и разделение модельных соединений. Увеличение концентрации ТЭАА и уксусной кислоты в подвижной фазе уменьшает времена удерживания веществ, причем влияние ТЭАА намного больше. Это можно объяснить тем, что при введении катиона $N^+(C_2H_5)_3$ в ПО-варианте более заметно конкурентное взаимодействие с кислотными группами селектора.

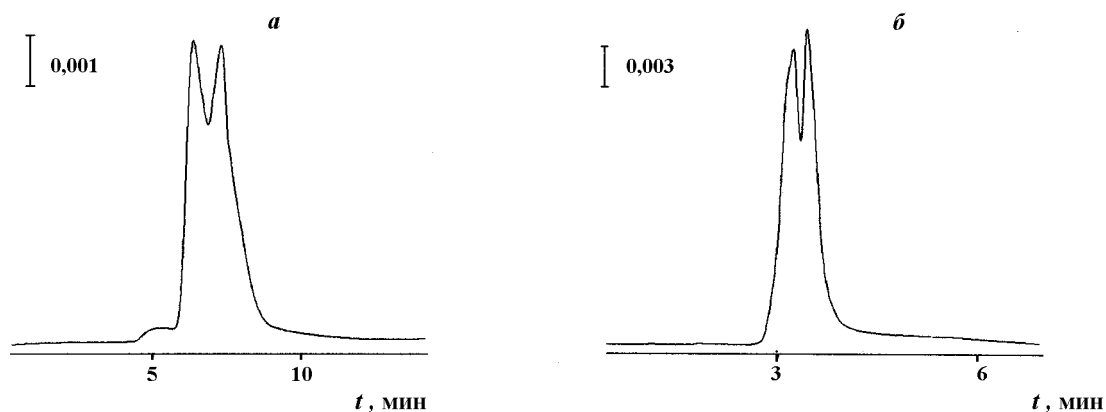


Рис. 5. Хроматограммы разделения энантимеров: а – хлорциклizина (подвижная фаза – ацетонитрил:метанол (50:50), 0,5% ТЭАА); б – гидроксизина (подвижная фаза – метанол, 0,25% уксусной кислоты); скорость потока 1 мл/мин; $\lambda = 230$ нм

Увеличение количества добавки ТЭАА от 0,1 до 0,5% в подвижной фазе ацетонитрил–метанол (50:50) в случае эpineфрина ухудшает разделение энантиомеров, а в случае, например, хлорциклизина разделение, наоборот, улучшается. Следовательно, влияние количества добавленного ТЭАА в подвижную фазу также определяется структурой сорбата. Увеличение добавки уксусной кислоты до 1% уменьшает разрешение пиков энантиомеров.

Природа добавки определяет также круг разделяемых веществ. Например, в присутствии уксусной кислоты разделения эpineфрина не происходит, зато к частично разделенным рацематам прибавились хлорциклизин и тербуталин.

Таким образом, на силикагеле, модифицированном СКПХ, получено частичное разделение флуоксетина, гидроксизина, хлорциклизина, эpineфрина и

тербуталина. При этом селективность в ПО-варианте в целом лучше, чем в ОФ-варианте. На рис. 5, а и 5, б показаны хроматограммы разделения энантиомеров хлорциклизина и гидроксизина в ПО-варианте ВЭЖХ. Невысокие значения разрешения связаны, очевидно, с низкой эффективностью хроматографической колонки. В результате проведенной работы было показано, что N-(3-сульфо, 3-карбокси)-пропионилхитозан, химически иммобилизованный на силикагель, проявляет энантиоселективность по отношению к ряду лекарственных препаратов основной природы. Для повышения эффективности и селективности разделения необходимо детальное исследование условий модификации силикагеля и свойств матрицы. С нашей точки зрения, перспективным является использование силикагелей меньшего диаметра с более крупными и однородными по объему порами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 03-03-32164.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буданова Н.Ю., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А., Варламов В.П., Шпигун О.А. / Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Мат. 7-й Междунар. конф. СПб., Репино. 2003. С. 282.
2. Budanova N., Shapovalova E., Lopatin S., Varlamov V., Shpigun O. // *Chromatografia*. 2004. **59**. N 11–12. P. 709.
3. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Г.В. Лисичкина. М., 2003.
4. Chang S.C., Reid G.L., Chen S., Chang C.D., Armstrong D.W. // *Trend. Anal. Chem.* 1993. **12**. N 4. P. 143.

Поступила в редакцию 08.09.05

AN INVESTIGATION OF RETANTIVITY AND SEPARABILITY OF SILICA MODIFIED BY CHIRAL SELECTOR N-(3-SULFO, 3-CARBOXY)-PROPIONYLCHITOSAN

Ye.V. Potekhina, Ye.N. Shapovalova, S.A. Lopatin, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry)

New sorbent based on silica modified N-(3-sulfo, 3-carboxy)-propionylchitosan (SCPC) has been synthesized and its chromatographic properties have been studied. Laws of the mechanism of retention and resolution of chiral compounds with use SCPC have been investigated. Research of enantioselectivity of the sorbent in relation to a number of substances of the basic character including medicinal substances (fluoxetine, chlorcyclizine, pindolol, etc.) has been carried out.