

УДК 543.545

## РАЗДЕЛЕНИЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА СИЛИКАГЕЛЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫМИ ХИТОЗАНОМ

Е.Н. Шаповалова, И.А. Ананьева, Я.А. Елфимова, Л.А. Гринева, А.Г. Мажуга, О.А. Шпигун

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

Оценена возможность использования силикагеля, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными хитозаном в нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на примере разделения производных анилина, пиридина и триазольных фунгицидов при элюировании смеси гексана с изопропанолом, изобутанолом и хлороформом. Изучено влияние природы и содержания полярной добавки на эффективность колонки и селективность разделения. Показана возможность разделения смесей пенконазола, пропиконазола диниконазола и дифеноконазола, а также аминопиридинов.

**Ключевые слова:** нормально-фазовая ВЭЖХ, модифицированные силикагели, наночастицы золота, хитозан, анилины, аминопиридины, триазольные фунгициды.

Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) наиболее выгодно и эффективно для разделения анилинов, пиридинов, триазолов и различных производных фенолов – важнейших классов веществ в фармацевтической отрасли [1–2]. Для улучшения качества и увеличения экспрессности анализов необходима разработка и использование новых сорбентов, более эффективных и устойчивых. Полисахариды находят широкое применение в жидкостной хроматографии для получения новых неподвижных фаз. Природное происхождение и большие возможности химической модификации полисахаридов делают их весьма интересными объектами для исследования. Хитозан, представляющий собой полностью или частично дезацетилированный хитин, содержит реакционноспособные аминогруппы, что позволяет использовать его как чрезвычайно удобный исходный материал для получения сорбентов широкого назначения [3–4]. Важным является способ иммобилизации хитозана на силикагеле. Хорошие перспективы имеет использование сорбентов на основе наночастиц металлов, в частности золота. Уникальные свойства наночастиц золота, огромная площадь функциональной поверхности, возможность ее модификации различными классами органических соединений – все это позволяет «программировать» адсорбционные свойства и устойчивость сорбента.

Получен силикагель, модифицированный золотыми наночастицами, стабилизированными хитозаном. Подобные органические кремнеземные материалы соединяют в себе жесткость кремнезема и реакционную способность функциональных групп хитозана. Цель работы состояла в изучении хроматографических свойств данной новой неподвижной фазы для ВЭЖХ при разделении смесей различных азотсодержащих органических соединений.

### Экспериментальная часть

**Реагенты и аппаратура.** Рабочие растворы (100 мкг/мл) исследованных соединений готовили растворением точной навески в смеси гексана с изопропанолом (1:1). В работе использовали *орто*-, *мета*- и *пара*-нитроанилины «для хроматографии», пиридин, 2-амино-пиридин, 4-амино-пиридин, 3-амино-пиридин, 2-амино-5-бром-пиридин, 2-амино-5-метил-пиридин, 2-амино-5-хлор-пиридин, 2-амино-4-метил-пиридин, 2-(2-амино-фенил)-этил-пиридин, 3,5-дифтор-анилин, 3,4-диметил-анилин, 2-метил-5-хлор-анилин («Sumitomo»), E-(RS)-4,4-диметил-2-(1H-1,2,4-триazol-1-ил)-1-(2,4-дихлорфенил)-1-пентен-3-ол (диниконазол), (RS)-4,4-диметил-3-(1H-1,2,4-триazol-1-илметил)-1-*n*-хлорфенилпентан-3-ол (тебуконазол), предоставленные фирмой «Август», Россия), *цис*, *транс*-4-[4-Метил-2-(1H-1,2,4-триazol-1-илметил)-1,3-

диоксолан-2-ил]-3-хлорфенил-4-хлорфениловый эфир (дифеноконазол), 1-(2,4-дихлор- $\beta$ -пропилфенэтил)-1Н-1,2,4-триазол 1-(2,4-дихлор- $\beta$ -пропилфенэтил)-1Н-1,2,4-триазол (пенконазол), ( $\pm$ )-4-Пропил-1-[2-(2,4-дихлорфенил)-1,3-диоксолан-2-илметил]-1Н-1,2,4-триазол (пропиконазол) (ГСО «Эколан», Россия). Для синтеза сорбента использовали силикагель «Kromasil-100-5-SIL» (средний размер частиц 5 мкм). Для модификации сорбентов использовали низкомолекулярный хитозан (степень дезацетилирования 75–85%),  $\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  («Sigma-Aldrich», США) и уксусную кислоту («х.ч.»).

В качестве подвижных фаз использовали смеси гексана с изопропанолом, изобутанолом, хлороформом. В качестве добавки применяли триэтиламин. Для приготовления подвижных фаз использовали гексан (сорт 1, «Криохром», Россия), изопропанол, изобутанол, хлороформ («х.ч.»), триэтиламин (99%) фирмы «Acros organics».

Работу выполняли на жидкостном хроматографе фирмы «Shimadzu» (Япония) SLC-10A, оснащенный спектрофотометрическим детектором SPD-10AV «Shimadzu» и насосом LC-10AT «Shimadzu». Запись хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения CLASS-VP v.5.0.3. фирмы «Shimadzu». Скорость подачи элюента 0,5–1,0 мл/мин, проба 20 мкл. Детектирование проводили при 254 нм.

В работе использовали стальные колонки размером 150×3,2 мм. Колонку суспензионным методом заполняли синтезированным сорбентом из смеси гексана с изопропанолом (20:80) с помощью пневматического насоса высокого давления «Knauer K-1900».

Для подтверждения модификации силикагеля в работе использовали сканирующий электронный микроскоп «JSM-6490» фирмы «Jeol», двухлучевой сканер «CS-9001PC» фирмы «Shimadzu» и спектрофотометр «U-2900» фирмы «Hitachi».

**Синтез сорбента** проводили по следующей методике: в круглодонную колбу объемом 350 мл, снабженную обратным холодильником, поместили раствор 1 мг  $\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  в 100 мл дистиллированной воды и нагрели его до 85°C. К полученному раствору при перемешивании добавили раствор 10 мг хитозана в 100 мл 1%-й уксусной кислоты, смесь оставили на 5 ч при температуре 85°C. В ходе синтеза происходит изменение цвета раствора со светло-желтого (раствор золотохлористоводородной кислоты) на вишневого. В электронном спектре раствора наночастиц золота в хитозане наблюдали

характерную полосу плазмонного резонанса в районе 525 нм, что говорит о присутствии в образце наночастиц золота.

Полученный раствор наночастиц золота охладили до комнатной температуры и добавили при постоянном перемешивании 5 г силикагеля. Смесь встряхивали на механическом вибраторе 1 ч, сорбент отфильтровали и промыли изопропанолом, а затем смесью изопропанола и гексана. Полученный сорбент исследовали методом ИК-спектроскопии. В ИК-спектре сорбента наблюдается характерная полоса колебаний ОН- и  $\text{NH}_2$ -групп в районе 3400  $\text{cm}^{-1}$ . Получены спектры диффузного отражения синтезированного сорбента и исходного силикагеля с помощью двухлучевого сканера. Для синтезированного сорбента появляется два максимума в области 220–260 нм, характерных для хитозана, что позволяет говорить об успешной модификации поверхности силикагеля. Значения  $\log R$  рассчитывали с использованием программного пакета ACDLabs 6.00 (Канада).

### Результаты и их обсуждение

Важным свойством неподвижной фазы является ее полярность. Ранее установлено, что сорбенты на основе хитозана представляют собой полярные неподвижные фазы [5]. Для элюирования сорбатов использовали смеси гексана с изопропанолом, изобутанолом и хлороформом. По мере уменьшения полярности добавки (в ряду изопропанол, изобутанол, хлороформ) удерживание сорбатов и размывание пиков увеличиваются. На примере разделения *орто*-, *мета*- и *пара*-нитроанилинов установили, что подвижная фаза гексан–изопропанол является оптимальной по длительности разделения, селективности и эффективности колонки. Время удерживания нитроанилинов увеличивается в ряду *орто*-, *мета*- и *пара*-нитроанилин, а также при уменьшении концентрации изопропанола, что подтверждает нормально-фазовый механизм разделения сорбатов [6]. Хроматографические параметры для нитроанилинов на исследованной колонке в зависимости от состава подвижной фазы приведены в табл. 1. Различия во времени удерживания достаточно велики, что позволяет их успешно разделить, об этом свидетельствуют высокие значения величины разрешения, приведенные в табл. 1. Лучшие параметры разделения получены при соотношении гексан:изопропанол, равном 90:10.

Отдельно стоит обсудить вопрос об эффективности колонки, которая оказалась не очень высокой.

Т а б л и ц а 1

## Влияние состава подвижной фазы на хроматографические параметры нитроанилинов

Соединение	$t_R$	$\alpha$	$N/m$	$R_s$
гексан–изопропанол (80:20)				
<i>o</i> -Нитроанилин	1,50	—	820	—
<i>m</i> -Нитроанилин	2,44	4,1	2380	4,6
<i>n</i> -Нитроанилин	2,66	1,2	2340	1,1
гексан–изопропанол (90:10)				
<i>o</i> -Нитроанилин	1,76	—	1100	—
<i>m</i> -Нитроанилин	3,85	1,1	3000	8,4
<i>n</i> -Нитроанилин	5,15	2,4	2940	3,9
гексан–изопропанол (95:5)				
<i>o</i> -Нитроанилин	2,26	—	80	—
<i>m</i> -Нитроанилин	5,87	4,4	1230	4,3
<i>n</i> -Нитроанилин	9,45	1,8	2290	4,9
гексан–изопропанол (92,5:2,5)				
<i>o</i> -Нитроанилин	3,39	—	460	—
<i>m</i> -Нитроанилин	10,92	8,2	1200	7,9
<i>n</i> -Нитроанилин	23,96	2,3	410	4,4
гексан–изопропанол–триэтиламин (89,9:10:0,1)				
<i>o</i> -Нитроанилин	1,97	—	4040	—
<i>m</i> -Нитроанилин	3,99	3,6	5820	11,4
<i>n</i> -Нитроанилин	5,89	1,7	4800	6,7

При элюировании смесями гексана и изопропанола число теоретических тарелок не превышает 3 000 на метр. Причиной относительно невысокой эффективности колонки может быть «островковое» покрытие силикагеля, при котором не все силанольные группы экранированы, и поверхность становится гетерогенной. Нитроанилины удерживаются на поверхности не только за счет взаимодействия с хитозаном, но и с остаточными силанольными группами. Повысить эффективность колонки удастся при введении в подвижную фазу триэтиламина (ТЭА), который взаимодействует с силанольными группами на поверхности, экранирует их и уменьшает адсорбционную активность неподвижной фазы

Так как полученный сорбент проявляет высокую селективность к полярным соединениям, изучено поведение ряда анилинов, аминопиридинов и их производных. Полученные хроматографические параметры для этих соединений при элюировании подвижной фазой гексан–изопропанол (90:10) приведены в табл. 2. Производные анилина, содержащие метильные группы и атомы галогенов, удерживаются

значительно меньше, чем нитроанилины и выходят практически с «мертвым» временем, что соответствует нормально-фазовому механизму разделения. Факторы емкости пиридина и его производных выше, порядок элюирования зависит от полярности молекулы и положения заместителей. Время удерживания увеличивается в ряду пиридин < 2-аминопиридин < 3-аминопиридин < 4-аминопиридин, что подтверждает заметное влияние положения аминогруппы в пиридиновом кольце. Как видно из табл. 2, увеличение факторов емкости аминопиридинов в ряду 2-амино-5-бромпиридин < 2-амино-5-хлорпиридин < 2-амино-5-метилпиридин < 2-амино-4-метилпиридин < 2-(2-амино-фенил)-этил-пиридин хорошо коррелирует с уменьшением гидрофобности (увеличением полярности) исследуемых соединений. Следует отметить, что 2-амино-4-метилпиридин удерживается больше 2-амино-5-метилпиридина, что может быть связано с различным положением метильной группы.

При добавлении ТЭА в подвижную фазу параметры удерживания аминопиридинов уменьшаются,

Таблица 2

## Хроматографические параметры пиридинов и анилинов

Вещество	log <i>P</i>	Фактор емкости	<i>N</i> /м	Фактор емкости	<i>N</i> /м
		гексан–изопропанол (90:10)		гексан–изопропанол–ТЭА* (89,9:10:0,1)	
Пиридин	0,73	1,7	8000	1	1930
2-Амино-пиридин	0,53	4,3	5340	3,1	1950
4-Амино-пиридин	0,32	не элюируется	–	7,7	850
3-Амино-пиридин	0,35	8,8	3720	6,5	7400
2-Амино-5-бром-пиридин	1,36	1,7	6830	1,9	3980
2-Амино-5-метил-пиридин	0,94	4,0	25700	2,8	3880
2-Амино-5-хлор-пиридин	1,68	1,7	2190	2,5	5320
2-Амино-4-метил-пиридин	1,21	4,5	1910	3,0	3780
2-(2-Амино-фенил)этил-пиридин	0,91	4,5	3320	0,5	110
3,5-Дифтор-анилин	1,87	0,8	630	1,1	1550
3,4-Диметил-анилин	1,86	0,9	1310	0,8	2350
2-Метил-5-хлор-анилин	2,27	0,5	450	3,0	36100

\*Триэтиламин

особенно изменяется удерживание 2-(2-амино-фенил)-этил-пиридина. В отличие от этого удерживание метил- и галоген-анилинов несколько возрастает. Эффективность колонки, особенно для 2-метил-5-хлор-анилина, увеличилась. Следует отметить, что влияние ТЭА на эффективность колонки при разделении производных пиридина оказалось неоднозначным – в ряде случаев, особенно при элюировании 2-(2-амино-фенил)-этил-пиридина, эффективность резко уменьшилась. Таким образом, для разделения производных пиридина лучше использовать в качестве подвижной фазы смесь гексан–изопропанол (90:10). Пример разделения приведен на рис. 1.

Производные триазолов представляют важную группу системных фунгицидов – химических препаратов, подавляющих развитие спор грибов или мицелия и убивающих их [7]. Они используются и как фармацевтические средства. Активное использование триазолов ставит перед исследователями задачу их определения и контроля в продуктах питания и объектах окружающей среды. Практически все соединения данного класса, используемые в качестве фунгицидов, имеют в своей структуре один и более хиральных центров. В данной работе исследовано удерживание и разделение ряда триазольных пестицидов: диниконазола, дифеноконазола, пропиконазола, тебуконазола и пенконазола. Молекула диниконазола содержит один асимметричный атом углерода и тризамещенную двойную связь (С–С),

вследствие чего соединение может существовать в виде четырех изомеров. Диниконазол содержит R- и S-изомеры E-формы. Дифеноконазол и пропиконазол могут существовать в форме четырех оптических изомеров, которые образуют два диастереомерных комплекса. Молекулы тебуконазола и пенконазола содержат один асимметричный атом углерода, что

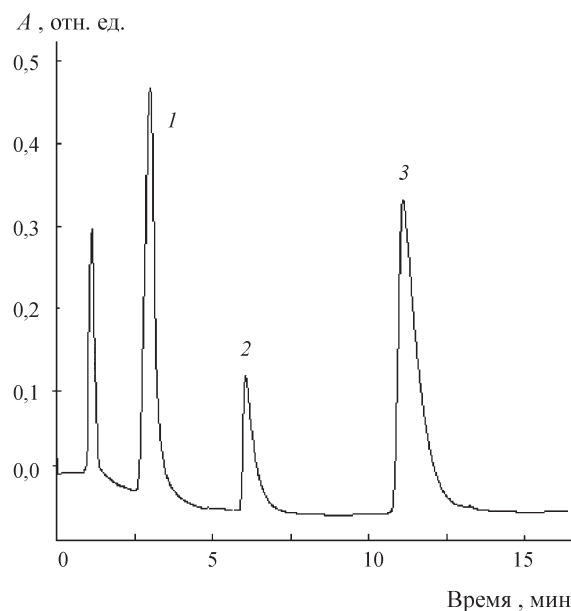


Рис. 1. Хроматограмма смеси аминопиридинов: 1 – 2-амино-5-бром-пиридин; 2 – 2-амино-4-метил-пиридин; 3 – 3-амино-пиридин. Подвижная фаза гексан-изопропанол (90:10); скорость потока 1 мл/мин,  $\lambda = 254$  нм

обуславливает существование двух оптических изомеров, в табл. 3 приведены структурные формулы пестицидов [8]. Триазольные пестициды, несмотря на заметную гидрофобность (табл. 4), удерживаются на сорбенте лучше, чем производные анилина. Время удерживания сорбатов увеличивается в ряду диниконазол > пропиконазол > тебуконазол > дифеноконазол > пенконазол, что хорошо согласуется с особенностями их структуры. Значительное влияние оказывает количество атомов хлора в бензольном кольце фунгицидов. Молекулы, содержащие два атома хлора, имеют большое время удерживания. С другой стороны, на удерживание влияет «подвижность» молекулы. Поэтому, несмотря на схожесть

структуры диниконазола и пенконазола, первая молекула имеет самое маленькое значение времени удерживания, что объясняется присутствием двойной связи, которая делает структуру более жесткой. Такое соединение элюируется быстрее. Молекулы тебуконазола и дифеноконазола содержат по одному атому хлора и имеют довольно близкие значения времени удерживания.

Как и при разделении анилинов и пиридинов, с увеличением концентрации и полярности добавки время удерживания триазольных фунгицидов уменьшается. Подобрать условия разделения всех пяти фунгицидов невозможно из-за близких значений времени удерживания пенконазола и дифеноконазола, но различия в удерживании тебуконазола, пропиконазола диниконазола и дифеноконазола позволяют проводить разделение их смеси. Лучшее разделение получено для подвижной фазы гексан-изопропанол (90:10) (рис. 2). Следует отметить, что на исследованной колонке практически на всех подвижных фазах пропиконазол и дифеноконазол элюируются двумя пиками, которые соответствуют двум стереоизомерам (рис. 3). Добавка ТЭА повышает селективность и эффективность при разделении стереоизомеров пропиконазола и негативно влияет на разделение стереомеров дифеноконазола и смеси фунгицидов.

Таким образом, силикагель, модифицированный наночастицами золота, стабилизированными хитозаном, обладает достаточно хорошей селективностью для разделения полярных соединений. В работе

Таблица 3

## Структурные формулы триазольных пестицидов

Вещество	Структурная формула
Диниконазол	
Пропиконазол	
Тебуконазол	
Дифеноконазол	
Пенконазол	

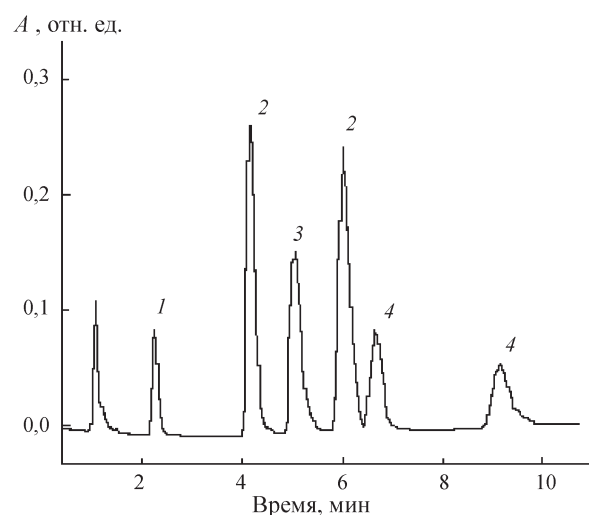


Рис. 2. Хроматограмма смеси триазольных пестицидов: 1 – диниконазол, 2 – пропиконазол, 3 – тебуконазол, 4 – дифеноконазол. Подвижная фаза гексан-изопропанол (90:10); скорость потока 1 мл/мин,  $\lambda = 254$  нм.

Т а б л и ц а 4

**Хроматографические параметры для триазольных пестицидов**

Вещество	log P	$t_R$ , мин	Фактор емкости	N/m
гексан–изопропанол (90:10)				
Диниконазол	3,91	2,09	0,9	730
Пропиконазол	2,81	3,81	2,5	3530
		5,33	3,8	1330
Тебуконазол	3,75	4,59	3,2	6670
Дифеноконазол	4,24	6,26	4,7	10500
		8,54	5,7	14600
Пенконазол	4,25	7,89	6,2	3130
гексан–изопропанол–триэтиламин (89,9:10:0,1)				
Диниконазол	3,91	1,95	0,8	800
Пропиконазол	–	2,73	1,5	3940
		3,60	2,3	8200
Тебуконазол	3,75	3,58	2,3	2130
Дифеноконазол	4,24	3,84	2,5	3930
		5,27	3,8	10140
Пенконазол	4,25	5,44	3,9	4200

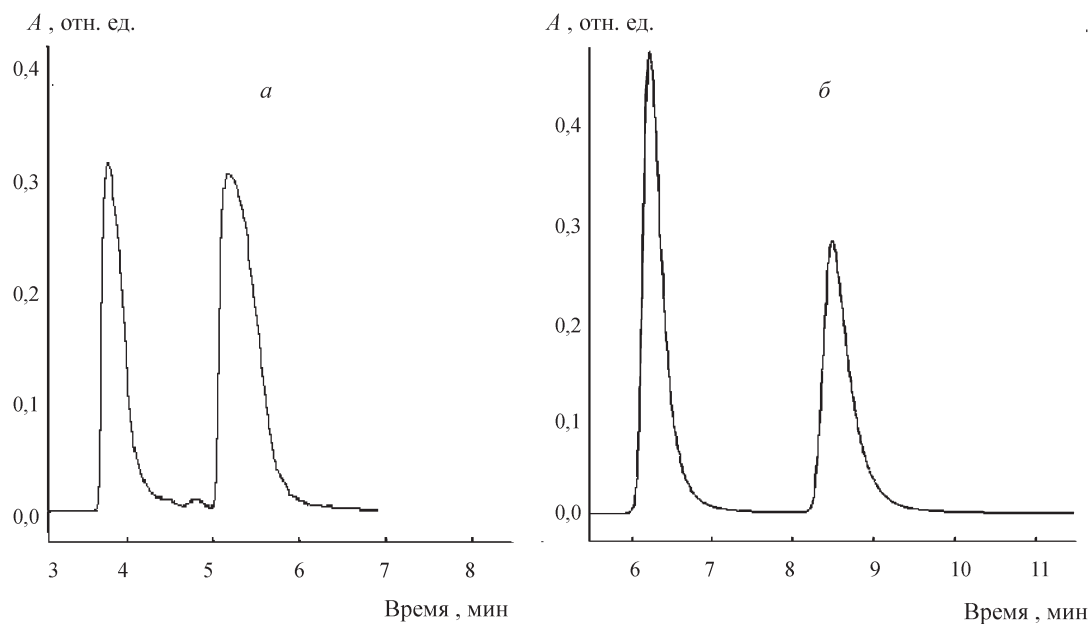


Рис. 3. Хроматограммы смеси стереомеров: *а* – пропиконазола; *б* – дифеноконазола. Подвижная фаза гексан:изопропанол (90:10); скорость потока 1 мл/мин,  $\lambda = 254$  нм



показана возможность разделения нитроанилинов, жиме нормально-фазовой хроматографии в течение ряда пиридинов и триазольных фунгицидов в ре- 10–15 мин.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 09-03-00519-а) и Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт №14.740.11.0614).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhao L., Zhu L., Lee H.K. // J. Chromatogr.A. 2002. **963**. P. 87.
2. Pino V., Alonso A.V., Gonzalez V., Hinze W.L. // J. Liquid Chromatogr. Relat. Techn. 2003. **26**. P. 1.
3. Rashidova S.Sh., Shakarova D.Sh., Ruzimuradov O.N., Satubaldieva D.T., Zalyalieva S.V., Shpigun O.A., Varlamov V.P., Kabulov B.D. // J. Chromatogr. B. 2004. **800**. P. 49.
4. Carunchio V., Girelli A., Messina A., Sinibaldi M. // Chromatographia. 1987. **23**. P.731.
5. Буданова Н.Ю., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А., Варламов В.П., Шпигун О.А. // Вестн. Моск. ун-та Сер. 2. Химия. 2000. **42**. С. 112.
6. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига, 1988.
7. Тольшин Н.М. Фунгициды. М., 1993.
8. Tombo G.M.R., Belluš D. //Angewandte Chemie. 1991. **30**. P.1193.

Поступила в редакцию 10.09.11

### HPLC SEPARATION OF NITROGEN-CONTAINING COMPOUNDS ON SILICA GEL MODIFIED WITH GOLD NANOPARTICLES STABILIZED BY CHITOSAN

E.N. Shapovalova, I.A. Ananieva, Y.A. Elfimova, L.A. Grineva, A.G. Majouga, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry; Division of Organic Chemistry)

The possibilities of using silica gel modified with gold nanoparticles stabilized by chitosan in normal-phase HPLC for the separation of aniline and pyridine derivatives, and triazole fungicides by eluting with the mixtures of hexane with isopropanol, isobutanol or chloroform are evaluated. The influence of the nature and content of polar additive on the effectiveness of the column and separation selectivity is studied. The possibility of separation of mixtures containing penkonazol, propikonazol, dinikonazol and difenokonazol as well as aminopyridines is shown.

**Key words:** normal-phase HPLC, modified silica gels, gold nanoparticles, chitosan, anilines, aminopyridines, triazole fungicides.

**Сведения об авторах:** Шаповалова Елена Николаевна – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (shapovalova@analyt.chem.msu.ru); Ананьева Ирина Алексеевна – ст. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (irishan@mail.ru); Елфимова Яна Андреевна – аспирант кафедры аналитической химии (elfimova\_16@list.ru); Гринева Любовь Андреевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (dont\_worry); Мажуга Александр Георгиевич – доцент кафедры органической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (maguga@mail.ru); Шпигун Олег Алексеевич – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, чл.-корр. РАН, докт. хим. наук (shpigun@analyt.chem.msu.ru).