

УДК 543.545:547.458

## ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КВАРЦЕВЫХ КАПИЛЛЯРАХ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫМИ ЦИТРАТОМ НАТРИЯ, 6,10-ИОНЕНОМ И СУЛЬФОПОЛИСАХАРИДАМИ

А.Н. Михалюк, Е.Н. Шаповалова, А.Г. Мажуга, О.А. Шпигун, П. Г. Рудаковская

(кафедра аналитической химии, кафедра органической химии;  
e-mail: freund-for-me@mail.ru)

Наночастицы золота за последние 10 лет активно применяют в разных областях науки, в том числе в физико-химических методах разделения и определения. Получены и исследованы два кварцевых капилляра для капиллярного электрофореза (КЭ), послойно модифицированные 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, N-(3-сульфо-3-карбоксо)пропионилхитозаном (СКПХ) и сульфатом декстрана (СД) соответственно. Установлено, что разделение смеси тетрагидрозолина, пиндолола, тербуталина, надолола и гидроксизина КЭ проходит более эффективно и экспрессно при нанесении наночастиц золота по сравнению с капиллярами, модифицированными только полимерами и полисахаридом. Наиболее удачная система получена с применением СД в качестве полисахарида. При использовании СД разделены энантиомеры тетрагидрозолина.

**Ключевые слова:** капиллярный электрофорез, сульфат декстрана, N-(3-сульфо-3-карбоксо)пропионилхитозан,  $\beta$ -блокаторы.

Первые упоминания в литературе об использовании наночастиц золота в капиллярном электрофорезе (КЭ) появились в 2001 г. В работе [1] использовали кварцевые капилляры, покрытые наночастицами золота, модифицированными органическими соединениями. Наночастицы золота, адсорбированные на полимерах, активно используют в медицине для разделения методом капиллярного электрофореза фрагментов ДНК, протеинов, нейротрансмиттеров [2]. Исследовано влияние наночастиц золота, стабилизированных цитратом или меркаптопропионатом, на скорость электроосмотического потока и селективность разделения структурных изомеров ароматических кислот, оснований и ароматических аминов соответственно [3]. В обоих случаях наблюдали повышение воспроизводимости результатов анализа и эффективности капилляров. Описан пример послойно модифицированных капилляров [4]. Используются наночастицы, модифицированные 4-диметиламинопиридином (ДМАП) (заряженные положительно) и наночастицы золота, модифицированные цитратом натрия (заряженные отрицательно). Перед нанесением наночастиц кварцевые капилляры модифицировали слоями поли(диаллилдиметил)хлорида

аммония (ПАДМА), поли(4-стирен)сульфонатом натрия (ПСС). Свойства капилляров сопоставили на примере разделения смеси тиомочевины, нафталина и бифенила. Капилляры оказались очень стабильными – на них получали воспроизводимые результаты в течение 20 дней (проведено 400 анализов). Таким образом, модифицирование капилляров наночастицами золота, особенно в присутствии солей четвертичных аммониевых оснований, позволяет существенно повысить воспроизводимость результатов разделения и экспрессность анализа в КЭ. Для энантиоразделения зопиклона, тропикамида и хлорфенирамина использован капилляр, модифицированный наночастицами золота, функционализированными циклодекстрином [5]. При нанесении одного такого слоя наночастиц на кварцевую поверхность удалось разделить энантиомеры каждого из лекарственных препаратов за 8–10 мин. Ранее показано, что эффективными хиральными селекторами являются N-(3-сульфо-3-карбоксо)пропионилхитозан (СКПХ) и сульфат декстрана (СД) [6–8].

Цель данной работы – исследование в КЭ капилляров с полислоистыми покрытиями, содержащими ионы и наночастицы золота, стабилизированные ци-

тратом и сульфополисахаридами СКПХ и СД, а также изучение возможности их использования для разделения тетрагидрозолина, пиндолола, тербуталина, надолола, гидроксизина и их энантиомеров (рис. 1).

### Экспериментальная часть

#### Реагенты и аппаратура

Исходные растворы (100 мкг/мл) пиндолола, атенолола, надолола, тетрагидрозолина и тербуталина («Sigma-Aldrich», США) готовили растворением точной навески в деионированной воде. Для приготовления буферных растворов использовали соли цитрата натрия, дигидрофосфата калия, гидрофосфата калия тригидрата, гидроксид натрия квалификации «ч.д.а.» («РеаХим», Россия). Все растворы готовили в деионированной воде. pH водных растворов контролировали на универсальном иономере «ЭВ-74». Подготовку растворов проводили в УЗ-бане «Сапфир» (НПФ «Сапфир», Москва). Все растворы хранили при температуре +4°C.

Перед использованием буферный раствор фильтровали через насадку на шприц «Millex®GV», мембрана «Dugapore®PVDF» («Millipore», Франция), размер пор 0,22 мкм.

Для модифицирования капилляров использовали 6,10-ионен, синтезированный на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ. По данным элементного анализа содержание азота в этом соединении составило 6,67%, углерода – 46,26%, водорода – 8,54%. Кроме того, использовали СКПХ (молекулярная масса 5 кДа), предоставленный докт. хим.

наук В.П. Варламовым, сульфат декстрана («Sigma-Aldrich», США), наночастицы золота, стабилизированные цитратом натрия (размер частиц 10 нм), синтезированные в лаборатории биологически активных соединений кафедры органической химии МГУ.

Работу проводили с помощью системы «Капель-105М» («Люмэкс», Россия) с УФ-детектором (длина волны 235 и 270 нм). Использовали кварцевый капилляр 38,7/29,3 см ( $d = 50$  мкм) («Polymicro Technologies», США). Образцы вводили гидродинамически (10 мбар, 30 с). Приложенное напряжение составляло 15 кВ. Для обработки информации использовали программу «Elforan». Рассчитывали время миграции, эффективность капилляра, разрешение пиков, селективность разделения, эффективную электрофоретическую подвижность.

#### Методика

Модифицирование капилляра проводили послойно следующим образом. Капилляр промывали 10 мин деионированной водой, 10 мин 1 М раствором КОН. После этого капилляр снова промывали 10 мин деионированной водой, затем 20 мин раствором 6,10-ионена (2 мг/мл) под давлением 1000 мбар. После этого (и после любой последующей стадии модифицирования) концы капилляра погружали в воду и оставляли на ночь. Затем капилляр промывали раствором наночастиц золота в течение 20 мин под давлением 1000 мбар и оставляли на ночь. На следующий день капилляр промывали водой 10 мин. Слои СКПХ или СД наносили в течение 40 мин, используя растворы с концентрацией 1 мг/мл.

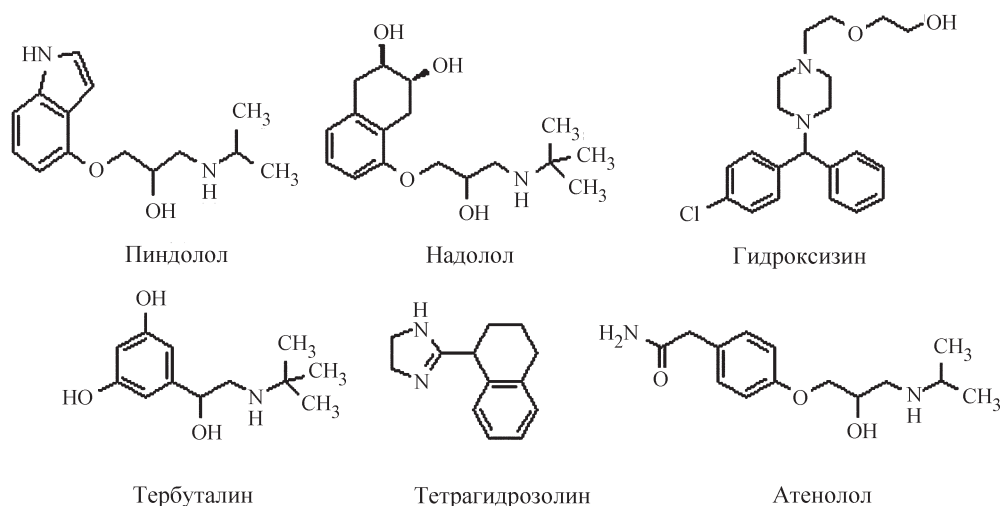


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых соединений

Новый капилляр перед работой промывали водой (10 мин), фоновым электролитом (15–30 мин). Каждые 4–5 анализов фоновый электролит (ФЭ) обновляли. Между анализами капилляр промывали по 2 мин дистиллированной водой и раствором ФЭ. В качестве ФЭ мы использовали цитратный буферный раствор с рН 6,5 концентрации 25 мМ. В качестве маркера электроосмотического потока (ЭОП) использовали воду и метилэтилкетон.

Таким образом, было изготовлено два капилляра: кварцевый капилляр, модифицированный 6,10-иононом, наночастицами золота и N-(3-сульфо-3-карбоксии) пропионилхитозаном (Капилляр-1), и кварцевый капилляр, модифицированный 6,10-иононом, наночастицами золота и сульфатом декстрана (Капилляр-2).

Свойства полученных капилляров после нанесения очередного слоя модификатора исследовали, наблюдая за направлением и величиной электроосмотического потока (ЭОП). У кварцевого капилляра ЭОП направлен от анода к катоду (положительная полярность). После нанесения 6,10-ионена пик маркера ЭОП (метилэтилкетон) фиксировали при отрицательной полярности. Это согласуется с предполагаемой сменой заряда поверхности с отрицательного на положительный. Однако воспроизводимость миграции маркера ЭОП была невысокой ( $s_r = 0,09$ ), а ее величина достаточно низкой ( $\mu_{\text{ЭОП}} = 8,77 \times 10^{-5} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ ). После нанесения наночастиц золота пик маркера ЭОП снова фиксировали при положительной полярности ( $s_{r(\text{ЭОП})} = 0,06$ ,  $\mu_{\text{ЭОП}} = 1,24 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ ), это указывает на отрицательный заряд данных наночастиц. После нанесения полисахаридов пик маркера ЭОП также фиксировали при положительной полярности.

Величина миграции ЭОП на капилляре с СКПХ (Капилляр-1) и СД (Капилляр-2) повысилась и составила  $2,03 \times 10^{-4}$  и  $2,16 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ . Из всех предыдущих систем последние две оказались самыми стабильными ( $s_r = 0,04$  и  $s_r = 0,03$ ).

### Результаты и их обсуждение

При разделении исследованных веществ на Капилляре-1 время миграции увеличивается в ряду тетрагидрозолин < пиндолол < атенолол < надолол < тербуталин < гидроксизин. Скорость миграции соединений определяется величиной положительного заряда на азоте, а также размером частиц и структурой разделяемых веществ. Чем больше заряд и меньше размер частицы, тем больше подвижность вещества и меньше время миграции. Определенный вклад в подвижность частиц может вносить также взаимодействие веществ с модификатором (СКПХ) на стенках капилляра. Все соединения, кроме атенолола и надолола, удалось разделить за 6 мин, эффективность капилляра достигала 65650 ТТ (рис. 2, а, таблица).

Содержание СКПХ в ФЭ варьировали от 0 до 1,08%. Установлено, что с ростом содержания СКПХ время миграции тестовых соединений снижается, а эффективность и разрешение пиков увеличиваются. В случае максимального содержания СКПХ получены наиболее узкие и симметричные пики для тербуталина, тетрагидрозолина и пиндолола.

При использовании Капилляра-2, модифицированного СД, время миграции исследуемых соединений стало меньше. Порядок выхода соединений остался прежним, за исключением тербуталина, его время миграции стало меньше, чем у надолола. Смесь пяти

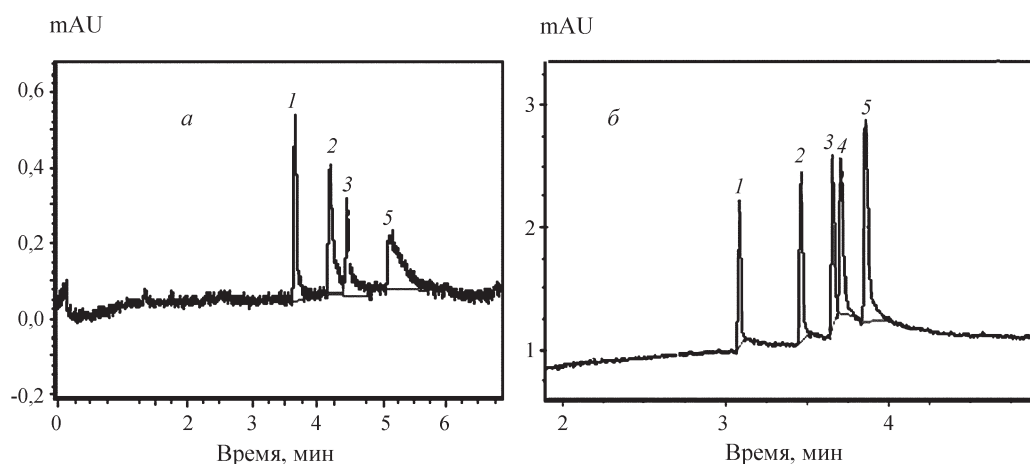


Рис. 2. Электрофореграмма смеси 1-тетрагидрозолина, 2-пиндолола, 3-тербуталина, 4-надолола, 5-гидроксизина: а – Капилляр-1 (концентрация компонентов 25 мкг/мл); б – Капилляр-2 (концентрация компонентов 20 мкг/мл); ФЭ – 25 мМ цитратный буферный раствор (рН 6,5),  $U = 15 \text{ кВ}$ ,  $\lambda = 235 \text{ нм}$

## Сопоставление свойств модифицированных капилляров\*

Капилляр	Соединение	$t_m$ , мин	$N$ , ТТ	$S/S_{\text{кв}}^{**}$	$\alpha$	$R_s (n, n+1)$
Капилляр-1	Тетрагидрозолин	3,63	65700	1,10	1,17	2,8
	Пиндолол	4,17	31300	1,49	1,05	1,1
	Тербуталин	4,42	47900	0,22	1,16	1,7
	Гидроксизин	5,11	2100	1,51	–	–
	Атенолол	4,23	61700	0,82	–	–
	Надолол	4,35	43800	0,36	–	–
Капилляр-2	Тетрагидрозолин	3,09	297200	1,88	1,13	5,9
	Пиндолол	3,47	198100	4,89	1,03	3,1
	Тербуталин	3,64	220800	1,48	1,03	0,7
	Надолол	3,71	140200	2,33	1,05	0,7
	Гидроксизин	3,86	132000	1,76	–	–
	Атенолол	3,60	60900	1,68	–	–

\*Условия см. в подписи к рис. 2.

\*\*Отношение площади пика соединения на электрофореграмме на модифицированном капилляре к площади пика на кварцевом капилляре.

соединений разделили за 4 мин (рис. 2, б, таблица), эффективность Капилляра-2 (до 297220 ТТ) выше, чем Капилляра-1 при сопоставимой селективности. Влияние концентрации СД в ФЭ (0,00–1,08%) на разделение исследованных соединений аналогично влиянию СКПХ. Следует отметить, что при содержании 1,08% СД в ФЭ получена максимальная эффективность, например, по тетрагидрозолину она достигает 438030 ТТ.

Меньшее по величине время миграции соединений на капилляре, модифицированном СД обусловлено, вероятно, большим отрицательным зарядом поверхности капилляра, что ускоряет ЭОП. В молекуле СД больше сульфогрупп, и они менее экранированы, чем в молекуле СКПХ. Таким образом, на Капилляре-2 можно разделить модельные соединения за меньшее время и с бóльшим разрешением (таблица). Важно отметить, что высота и площадь пиков определяемых соединений на электрофореграмме, полученной для Капилляра-2, существенно выше, чем для кварцевого капилляра и капилляра-1 (таблица), что повышает чувствительность их определения.

Предварительно в лаборатории исследованы модифицированные капилляры, покрытые 6,10-ио-

неном и полисахаридами без наночастиц золота. Воспроизводимость миграции маркера ЭОП в модифицированных золотом капиллярах выше, чем в случае их аналогов без наночастиц (для капилляров без наночастиц золота с СКПХ и СД  $\mu = 1,24 \times 10^{-4}$  и  $2,00 \times 10^{-4}$  см<sup>2</sup>/(В×с) соответственно с  $s_r = 0,18$  и  $0,05$ ). На данных капиллярах разделение смеси требует меньше времени. Капилляр-2 значительно превосходит по эффективности свой аналог (до 197970 ТТ в цитратном буферном растворе). Таким образом, Капилляр-2 можно рекомендовать к применению в КЭ для быстрого и эффективного разделения бета-блокаторов и других азотсодержащих соединений.

К сожалению, при использовании Капилляра-1 и Капилляра-2 даже в присутствии СКПХ и СД в ФЭ не удалось разделить энантиомеры большинства модельных соединений. Удалось разделить энантиомеры тетрагидрозолина с  $R_s = 0,6$  ( $s_r = 0,002$ ) за 3 мин (содержание СД в ФЭ составило 1,08%). При использовании капилляра, модифицированного 6,10-иононом и СД без наночастиц золота разделены энантиомеры тетрагидрозолина, атенолола, доксиламина, хлорфенирамина, орфенадрина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-03-00405а) и Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 8245).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Neiman B., Grushka E., Lev O.* // J. Anal. Chem. 2001. **73**. P. 5220.
- Chung-Shu Wu, Fu-Ken Liu, Fu-Hsiang Ko.* // Anal. Bioanal. Chem.. 2011. **399**. P.103.
- Kasicka V., Miksik I., Rezanka P.* // J. Sep. Sci. 2010. **33**. P. 372.
- Qishu Qua, Dengping Liu, Debby Mangelings, Chun Yang, Xiaoy Hu.* // J. Chromatogr. A. 2010. **1217**. P. 6588.
- Min Li, Xi Liu, Fengyi Jiang, Liping Guo, Li Yang.* // J. Chromatogr. A. 2011. **1218**. P. 3725.
- Budanova N., Shapovalova E., Lopatin S., Varlamov V., Shpigun O.* // Chromatographia. 2004. **59**. P. 709.
- Буданова Н. Ю., Шапиурин Д. В., Шаповалова Е.Н.* / Сб. Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии. М., 2006. С. 386.
- Phinney K.W., Sander L.C.* // Anal. Bioanal. Chem. 2003. **375**. P. 763.

Поступила в редакцию 12.03.13

**SEPARATION OF NITROGEN-CONTAINING COMPOUNDS ON SILICA CAPILLARIES MODIFIED WITH CITRATE-STABILIZED GOLD NANOPARTICLES, 6,10-IONENE, N-(3-SULFO-3 CARBOXY) PROPIONILECHITOSAN AND DEXTRAN SULPHATE**

**A.N. Mikhalyuk, E.N. Shapovalova, A.G. Maguga, O.A. Shpigun, P.G. Rudakovskaja**

*(Division of Analytical Chemistry; Division of Organic Chemistry)*

Gold nanoparticles are applied in different fields of science for a last 10 years, e.g. physicochemical separation methods. Two fused-silica capillaries for capillary electrophoresis (CE) modified layer-by-layer with citrate-stabilized gold nanoparticles, 6,10-ionene, N-(3-sulfo-3-carboxy) propionylchitosan (SCPH) and dextran sulfate (DC) are prepared and investigated. It is found out that separation of tetrahydrozoline, pindolol, terbutalin, nadolol, hydroxyzine is most effective and fast in case of modifying with gold nanoparticles and polysaccharide in comparison with case of polysaccharide only. The most successful system for CE with utilization of dextran sulfate as polysaccharide is received. The enantiomers of tetrahydrozoline are separated on capillary modified with gold nanoparticles, 6,10-ionene and dextran sulfate.

**Key words:** capillary electrophoresis, dextran sulfate, N-(3-sulfo-3-carboxy)propionylchitosan,  $\beta$ -blockers.

**Сведения об авторах:** *Михалюк Анна Николаевна* – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ ([freund-for-me@mail.ru](mailto:freund-for-me@mail.ru)); *Шаповалова Елена Николаевна* – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук ([shapovalova@analyt.chem.msu.ru](mailto:shapovalova@analyt.chem.msu.ru)); *Мажуга Александр Григорьевич* – доцент кафедры органической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук. ([mazuga@mail.ru](mailto:mazuga@mail.ru)); *Шпигун Олег Алексеевич* – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, чл.-корр. РАН, докт. хим. наук ([shpigun@analyt.chem.msu.ru](mailto:shpigun@analyt.chem.msu.ru)); *Рудаковская Полина Григорьевна* – аспирант кафедры органической химии ([polinagu@list.ru](mailto:polinagu@list.ru)).