

УДК 543.544.743

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ *L*-ЦИСТЕИНА НА ПЛАСТИНКИ ДЛЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Е.Н. Шаповалова, И.А. Ананьева, А.Г. Мажуга, Н.В. Зык, О.А. Шпигун

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

Применен новый способ нанесения хирального селектора на поверхность пластинок для тонкослойной хроматографии послойным нанесением наночастиц золота и *L*-цистеина. Получены новые неподвижные фаза для ТСХ, на основе силикагеля и оксида алюминия, обладающие энантиоселективностью по отношению к тетрагидрозолину, гидроксизину, кетопрофену, фенпрофену, пиндололу и флуоксетину. Изучено влияние состава подвижной фазы на величину R_f и энантиоселективность.

Ключевые слова: наночастицы золота; модифицированные силикагели; энантио-разделение; планарная хроматография.

Хроматография во всех вариантах является наиболее распространенным методом разделения оптически активных соединений, причем жидкостная хроматография используется для этих целей гораздо чаще, чем газовая, главным образом, благодаря большому разнообразию неподвижных хиральных фаз. Достаточно широко для разделения энантиомеров используется плоскостная хроматография. К ее преимуществам относятся быстрота, легкость выполнения определения и сравнительно небольшая стоимость оборудования и материалов для анализа.

Добиться разделения рацемических смесей на стандартных пластинках, где в роли сорбента выступают силикагель или оксид алюминия не представляется возможным. Для разделения энантиомеров в тонкослойной хроматографии используют модифицирование поверхностей пластинок различными хиральными селекторами [1–4]. Для модифицирования пластины погружают в раствор хирального селектора. К сожалению, в этом случае возможна деформация тонкого слоя и при прохождении подвижной фазы селектор может мигрировать, так как он иммобилизован на поверхности лишь в результате физической адсорбции. Для ковалентной иммобилизации необходима предварительная модификация сорбента, наносимого на подложку, а это достаточно длительный и дорогой процесс. Из литературных данных известно, что наночастицы золота прочно сорбируются на силикагеле или оксиде алюминия, а поверхность золота можно затем легко модифицировать различными тиолами [5–8]. Эти сведения мы использовали при получении нового типа пластинок для тонкослойной хрома-

тографии (ТСХ). Поверхность носителя (силикагеля, оксида алюминия) покрывали наночастицами золота, а затем на слой золота в качестве хирального селектора иммобилизовали *L*-цистеин.

Цель данной работы – применение нового способа нанесения хирального селектора на поверхность пластинок для ТСХ и изучение возможности разделения на них рацемических смесей.

Экспериментальная часть

Для приготовления подвижной фазы использовали метанол, изопропанол, бутанол, гексан, ацетонитрил, хлороформ (“х.ч.”). В качестве добавок в подвижную фазу применяли уксусную кислоту, триэтиламин, аммиак (“х.ч.”) и диэтиламин (“ч.д.а.”). В качестве модификатора использовали цистеин ($5 \cdot 10^{-3}$ М раствор).

Для модифицирования цистеином и хроматографирования применяли нормально-фазовые пластинки: силикагель “Сорбфил” (“Имид”, Россия), оксид алюминия (“Merck”, Германия). В работе использовали растворы (1 мг/мл) пиндолола, хлорфенирамина, алпренолола, гидроксизина, флуоксетина, тетрагидрозолина, кетопрофена, фенпрофена, флаванона, 1,1-би-2-нафтил-2,2’-диола и основания Трогера в метаноле. Все реактивы фирмы “Sigma” (США).

Для модифицирования пластинки на основе силикагеля и оксида алюминия помещали в коллоидный раствор золота на 5 мин, сушили, помещали на 5 мин в раствор *L*-цистеина, а затем сушили на воздухе.

Для получения хроматограмм растворы исследуемых веществ (2–5 мкл) наносили микрошприцем

на стартовые линии хроматографических пластинок, при этом расстояние между точками нанесения проб составляло 1 см, расстояние от края пластинки – 1,5 см. Пластинки помещали в камеру для хроматографирования, содержащую около 10 мл подвижной фазы. После того как растворитель поднимался на 8–10 см выше стартовой линии, пластинки вынимали, высушивали и обрабатывали. Подвижность соединений оценивали величиной R_f^* . Обработку полученных хроматограмм проводили методом видеоденситометрии с использованием оптического видеоденситометра “Сорбфил” (254 и 365 нм) (ООО “Имид”, Россия). Для обнаружения компонентов пластинки облучали УФ-излучением (365 нм) или обрабатывали 1%-м раствором йода в этаноле.

Результаты и их обсуждение

Поскольку в качестве хирального селектора использовали вещества с молекулами малого размера, полученную неподвижную хиральную фазу можно отнести к группе низкомолекулярных селекторов. Структура *L*-цистеина определила выбор модельных соединений, формулы которых приведены в табл. 1. Тестовые соединения можно разделить на две группы по их полярности. К менее полярным соединениям относятся флаванон, 1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол и основание Трогера. Пиндолол, хлорфенирамин, алпренолол, гидроксизин, флуоксетин, тетрагидрозолин, кетопрофен и фенопрофен более полярны и содержат в своей структуре группы NH– или –COOH, способные взаимодействовать либо с карбоксильной, либо с аминогруппой хирального селектора. В работе применяли рацемические смеси тестовых соединений. При использовании хиральных неподвижных фаз с низкомолекулярными селекторами для элюирования соедине-

ний чаще используют смеси неполярных органических растворителей с полярными добавками. В ряде случаев можно проводить разделение при элюировании полярными органическими растворителями (ацетонитрил, метанол) с добавкой аминов и уксусной кислоты. При разделении энантиомеров на пластинке должны фиксироваться две хроматографические зоны, близкие по площади и интенсивности окраски.

Влияние состава подвижной фазы на подвижность флаванона, 1,1-би-2-нафтил-2,2'-диола и основания Трогера на модифицированных силикагелевых пластинках показано в табл. 2. Подвижность соединений увеличивается в ряду: основание Трогера < 1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол < флаванон. Как мы видим, наиболее заметно удерживается неподвижной фазой основание Трогера, содержащее два атома азота, по которым и происходит взаимодействие с хиральным селектором. Значения R_f для всех сорбатов растут с увеличением полярности компонентов подвижной фазы, что показано на рис. 1 на примере флаванона. Лучшая селективность разделения сорбатов получена для подвижных фаз на основе гексана. При использовании смесей гексана с бутанолом и пропанолом-2 возможно разделение смесей флаванона, 1,1-би-2-нафтил-2,2'-диола и основания Трогера. К сожалению, полученные тонкослойные пластинки не проявили энантиоселективности к данным соединениям.

Для разделения пиндолола, хлорфенирамина, алпренолола, гидроксизина, флуоксетина, тетрагидрозолина, кетопрофена и фенопрофена использовали подвижные фазы двух типов: 1) на основе гексана и хлороформа с добавками спиртов; 2) смеси ацетонитрила и метанола с добавками аминов и уксусной кислоты. Эта группа соединений обладает невысокой подвижностью при элюировании их смесью гексан–пропанол-2.

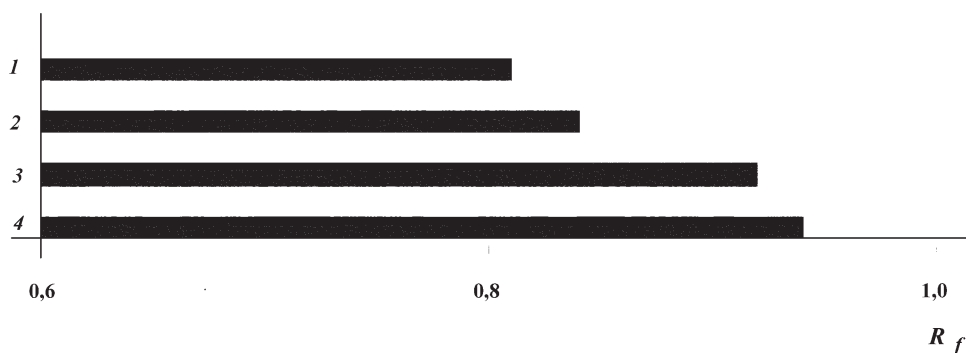


Рис. 1. Влияние полярности компонентов подвижной фазы на подвижность флаванона: 1 – гексан–бутанол, 2 – гексан–пропанол-2, 3 – хлороформ–бутанол, 4 – хлороформ–пропанол-2 (соотношение основного компонента и добавки 95:5; неподвижная фаза – пластинки с SiO_2 , модифицированные наночастицами золота и *L*-цистеином)

* R_f – величина, равная отношению расстояния, пройденного веществом, к расстоянию, пройденному растворителем.

Таблица 1

Модельные соединения

№	Название	Структурная формула
1	тетрагидрозолин	
2	хлорфенирамин	
3	гидроксизин	
4	алпренолол	
4	флаванон	
6	кетопрофен	
7	фенопрофен	
8	1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол	

Окончание табл. 1

9	основание Трогера	
10	пиндолол	
11	флуоксетин	

Таблица 2

Влияние состава подвижной фазы на подвижность и селективность их разделения флаванона, 1,1-би-2-нафтил-2,2'-диола и основания Трогера

Соединение	R_f	α	Подвижная фаза
Флаванон	0,93	7,5	(90:10) гексан:пропанол-2
1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол	0,64	1,3	
Основание Трогера	0,57	–	
Флаванон	0,84	3,6	(95:5) гексан:пропанол-2
1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол	0,59	1,7	
Основание Трогера	0,46	–	
Флаванон	0,81	3,5	(95/5) гексан:бутанол
1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол	0,55	1,9	
Основание Трогера	0,39	–	
Флаванон	0,44	10,4	(95:5) гексан:этилацетат
1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол	0,07	1,8	
Основание Трогера	0,04	–	
Флаванон	0,92	1,7	(95:5) хлороформ:бутанол
1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол	0,87	1,5	
Основание Трогера	0,82	–	
Флаванон	0,50	11,5	(99,5:0,5) хлороформ:бутанол
1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол	0,92	–	
Флаванон	0,94	1,2	(95:5) хлороформ:пропанол-2
1,1-би-2-нафтил-2,2'-диол	0,93	1,5	
Основание Трогера	0,90		

Примечание. Неподвижная фаза – пластинки с SiO_2 , модифицированные наночастицами золота и *L*-цистеином.

Т а б л и ц а 3

Влияние природы и содержания полярной добавки в гексан на значения R_f модельных соединений

Соединение	Подвижная фаза		
	гексан/пропанол-2 (60/40)	гексан/пропанол-2 / метанол (50/30/20)	гексан/пропанол-2 (80/20) с добавкой 0,1% CH_3COOH
Тетрагидрозолин	0,08	$R_{f1}=0,13; R_{f2}=0,32^*$	$R_{f1}=0,3; R_{f2}=0,39^*$
Хлорфенирамин	0,05	0,29	0,02
Гидроксизин	0,05	$R_{f1}=0,20; R_{f2}=0,24^*$	$R_{f1}=0,30; R_{f2}=0,89^*$
Пиндолол	0,11	0,33	0,06
Алпренолол	$R_{f1}=0,05; R_{f2}=0,18^*$	0,38	0,07
Кетопрофен	0,91	0,16	0,88
Фенопрофен	$R_{f1}=0,12; R_{f2}=0,21^*$	0,14	0,57
Флуоксетин	0,06	0,30	0,07

Примечания. Неподвижная фаза – пластинки с SiO_2 , модифицированные наночастицами золота и *L*-цистеином; * на пластинке фиксируются два пятна энантиомеров.

Лишь при содержании пропанола-2 больше 40% значения R_f достигают 0,1–0,3. Интересные результаты получены при добавлении в смесь гексан–изопропанол (80:20) небольших количеств уксусной кислоты. Подвижность кетопрофена и фенопрофена заметно увеличивается, а пиндолола, хлорфенирамина и флуоксетина падает. Очевидно, профены связываются с селектором по аминогруппе цистеина, а пиндолол, хлорфенирамин и флуоксетин – благодаря образованию связи между карбоксильной группой цистеина и группой $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ароматических аминов. При элюировании алпренолола и фенопрофена смесью гексан–пропанол-2 (60:40), тетрагидрозолина – смесью гексан–пропанол-2–метанол (50:30:20), а гидроксизина – смесью гексан–пропанол-2 (80:20) с добавлением 0,1%-го раствора CH_3COOH на хроматограмме наблюдаются по два пятна, что свидетельствует о разделении изомеров рацемической смеси. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Для более подробного изучения возможности разделения пиндолола, хлорфенирамина, алпренолола, гидроксизина, флуоксетина, тетрагидрозолина, кетопрофена, фенопрофена и их энантиомеров использовали смеси метанола и ацетонитрила с различными добавками. Подвижность соединений увеличивается в ряду: хлорфенирамин < пиндолол \approx флуоксетин < алпренолол < тетрагидрозолин < гидроксизин < фенопрофен \approx кетопрофен. Полученный ряд свидетельствует

о том, что на пластинке лучше удерживаются соединения, имеющие в своей структуре концевую группу $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$. Тетрагидрозолин и гидроксизин, содержащие вторичные аминогруппы, экранированные объемными заместителями, удерживаются слабее. Фенопрофен и кетопрофен, содержащие карбоксильную группу, имеют наименьшее сродство к неподвижной фазе. Наблюдаемые закономерности указывают, что определяющим для нашего хирального селектора является взаимодействия его карбоксильной группы с основными азотсодержащими фрагментами сорбатов. Взаимодействия между аминогруппой цистеина и кислотными фрагментами сорбатов слабее. В процессе элюирования смесью метанол–ацетонитрил на величину R_f оказывали влияние соотношение ацетонитрила и метанола, а также природа и концентрация добавки. Для всех исследованных полярных соединений характер изменения величины R_f был одинаков. Он показан на рис. 2–4. Максимальная подвижность сорбатов наблюдается при соотношении компонентов 50:50 в смеси ацетонитрил–метанол (рис. 2). При увеличении концентрации добавки ацетата триэтиламмония величина R_f незначительно уменьшается (рис. 3), исключение составляет тетрагидрозолин, для которого зависимость носит обратный характер. Подвижность соединений зависит от природы добавки амина. При увеличении размера органического радикала у азота величина R_f соединений уменьшается. Подвижность при добавле-

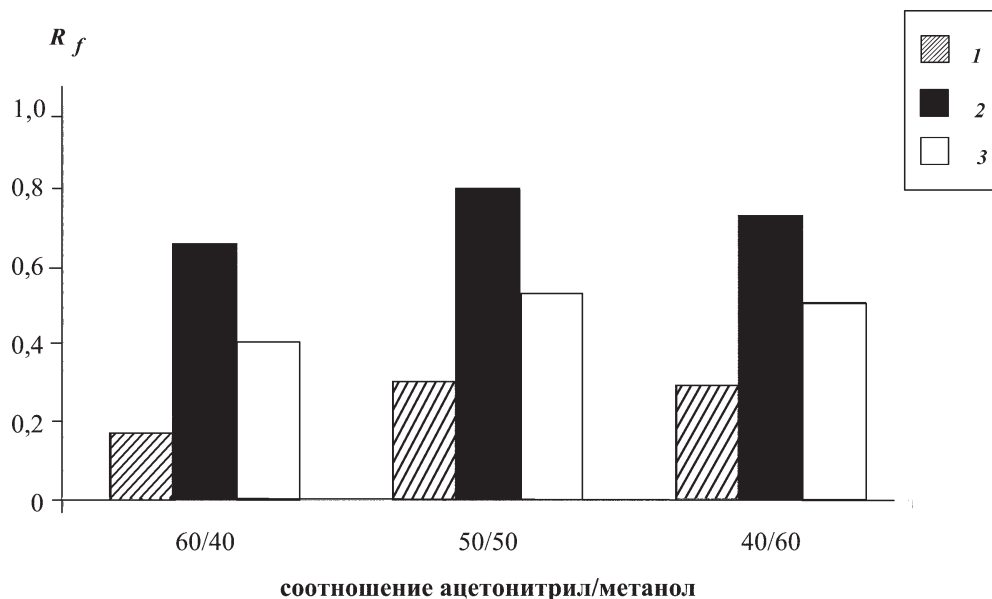


Рис. 2. Влияние соотношения ацетонитрила и метанола в подвижной фазе на значения R_f хлорфенирамина (1), кетопрофена (2) и пиндолола (3) (неподвижная фаза – пластинки с SiO_2 , модифицированные наночастицами золота и *L*-цистеином)

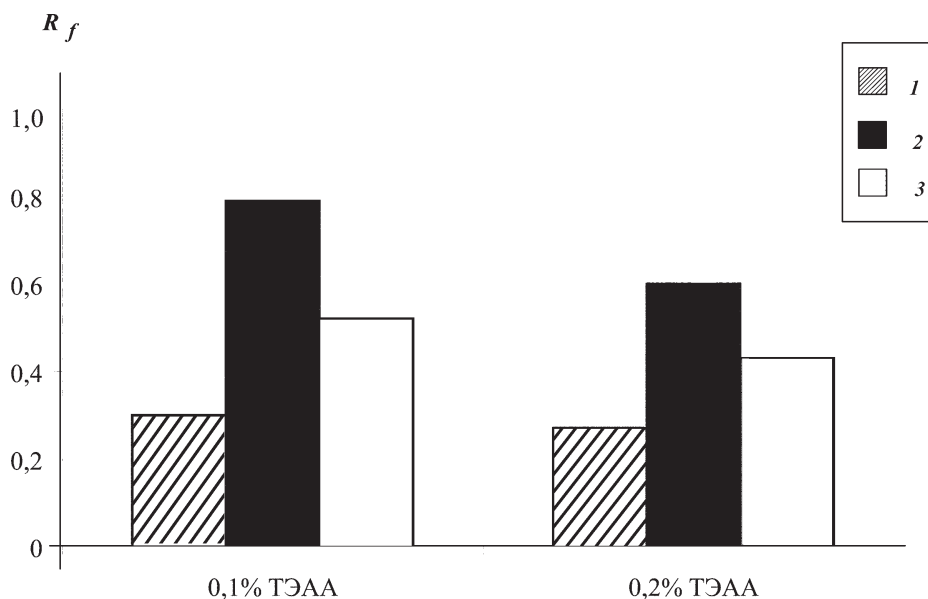


Рис. 3. Влияние концентрации ацетата триэтиламина на значения R_f хлорфенирамина (1), кетопрофена (2) и пиндолола (3) (неподвижная фаза – пластинки с SiO_2 , модифицированные наночастицами золота и *L*-цистеином; подвижная фаза – ацетонитрил:метанол (50:50))

ний ацетата аммония – промежуточная между ТЭАА (триэтиламмония ацетат) и ДЭАА (диэтиламмония ацетат) (рис. 4).

При элюировании ароматических аминов и профенов подвижной фазы на основе смеси ацетонитрила и метанола в ряде случаев удалось разделить рацемические смеси тетрагидрозолина, гидроксизина, флуоксетина и фенопрофена, как свидетельствуют данные табл. 4. Самое хорошее разделение наблюдается для

гидроксизина и фенопрофена. Следует отметить, что увеличение количества добавленной соли амина уменьшает селективность разделения смеси энантиомеров, но уменьшает размывание хроматографических зон. Мы провели сравнение поведения исследуемых соединений на модифицированных силикагелевых пластинках и модифицированных пластинках с оксидом алюминия. В качестве элюента использовали смесь метанол–ацетонитрил (50:50) с добавкой

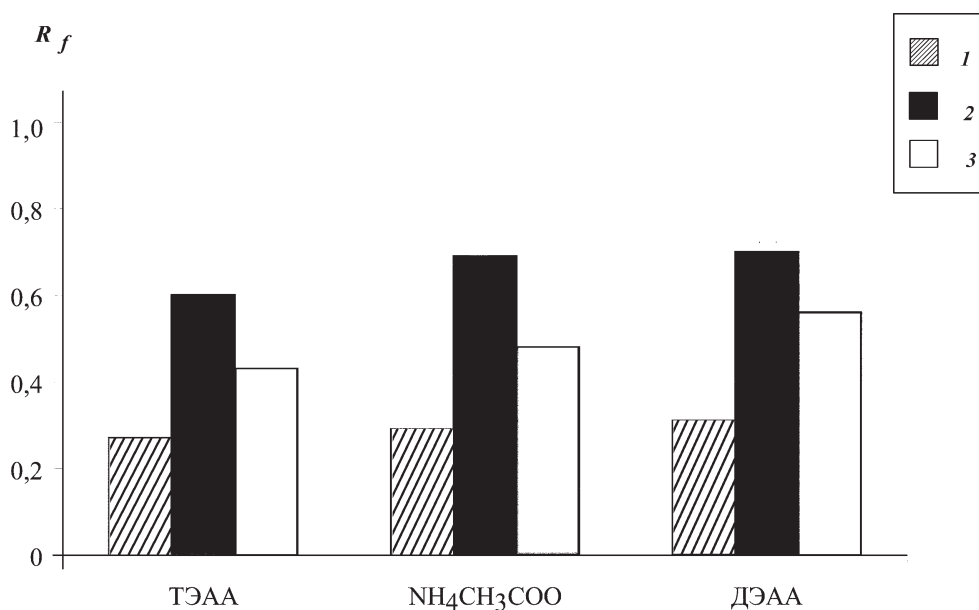


Рис. 4. Влияние природы добавки на значения R_f хлорфенирамина (1), кетопрофена (2) и пиндолола (3) (неподвижная фаза – пластинки с SiO_2 , модифицированные наночастицами золота и *L*-цистеином; подвижная фаза – ацетонитрил:метанол (50:50))

Т а б л и ц а 4

Разделение рацемических смесей тетрагидрозолина, гидроксизина, флуоксетина и фенопрофена на пластинках с SiO_2 , модифицированных наночастицами золота и *L*-цистеином

Соединение	R_{f1}	R_{f2}	α^*
подвижная фаза – ацетонитрил–метанол (60:40) с добавкой 0,1% ТЭАА			
Гидроксизин	0,66	0,91	5,2
Фенопрофен (2)	0,60	0,67	1,4
Флуоксетин (2)	0,30	0,38	1,4
подвижная фаза – ацетонитрил–метанол (50:50) с добавкой 0,1% ТЭАА			
Тетрагидрозолин	0,37	0,42	1,3
Гидроксизин	0,46	0,82	5,3
Фенопрофен	0,43	0,81	5,7
Флуоксетин	0,38	0,51	1,7
подвижная фаза – ацетонитрил–метанол (50:50) с добавкой 0,2% ТЭАА			
Тетрагидрозолин	0,57	0,64	1,2
Гидроксизин	0,63	0,82	2,7
Фенопрофен	0,57	0,66	1,5
Флуоксетин	0,29	0,37	1,4

0,1%-го ТЭАА. Значения R_f тестовых соединений приведены в табл. 5, где показано, что при переходе к пластинкам с оксидом алюминия, модифицированным *L*-цистеином, подвижность всех сорбатов возрастает. Интересным является тот факт, что на данных пластинках повышается энантиоселективность по отношению к кетопрофену, пиндололу и тетрагидрозолину.

Таким образом, получены новые неподвижные фазы для ТСХ на основе силикагеля и оксида алюминия, покрытых наночастицами золота и модифицированных *L*-цистеином. Они обладают энантиоселективностью по отношению к тетрагидрозолину, гидроксизину, кетопрофену, фенопрофену, пиндололу и флуоксетину.

Т а б л и ц а 5

Значения R_f тестовых соединений на пластинках с Al_2O_3 , модифицированных наночастицами золота и L-цистеином

Соединение	R_{f1}	R_{f2}	α^*
Тетрагидрозолин	0,77	0,87	2
Хлорфенирамин	0,80	–	–
Кетопрофен	0,32	0,45	2,3
Фенопрофен	0,63	–	–
Пиндолол	0,44	0,68	1,7
Флуоксетин	0,65	–	–

α^* - коэффициент селективности для энантиомеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bhushan R., Martens J.* // Biomedical. chromatography. 1996. **11**. P. 280.
2. *Bhushan R., Ali I.* // Chromatographia. 1993. **35**. P. 679.
3. *Gunter K.* // J. Chromatogr. 1988. **448**. P. 11.
4. *Reich S., Eike B., Schibli P., Anne D.* // Biomedical chromatography. 2005. **23**. P. 458.
5. *Daniel M.-Ch., Didier A.A.* // Chem. Rev. 2004. **104**. P. 293.
6. *Brust M., Walker M., Bethell D., Schiffrin D.J., Whyman R.J.* // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994. P. 801.
7. *Ding Sh.-J., Chang B.-W., Wu Ch.-Ch., Lai M.-F., Chang H.-Ch.* // Anal. Chim. Acta. 2005. **554**. P.43.
8. *Chem D., Li J.* // Surface Science Reports. 2006. **61**. P.445.

Поступила в редакцию 07.07.08

APPLICATION OF GOLD NANOPARTICLES FOR THE IMMOBILIZATION OF L-CYSTEINE ON THE PLATES FOR THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

E.N. Shapovalova, I.A. Ananieva, A.G. Majouga, N.V. Zik, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry, Division of Organic Chemistry)

The new way of the immobilization of chiral selector on plates surface for thin layer chromatography by level-by-level coating with gold nanoparticles and L-cysteine was applied. New phases for TLC on the basis of silica and aluminium oxides were received. Affect of the composition of the mobile phase on R_f and enantioselectivity was studied. The separation of enantiomers of tetrahydrozoline, hydroxyzine, ketoprofen, fenoprofen, pindolol and fluoxetine was attained.

Key words: gold nanoparticles; bonded silica gel; enantioseparation; planar chromatography.

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); Мажуга Александр Георгиевич – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук; Зык Николай Васильевич – проф. кафедры органической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук; Шпигун Олег Алексеевич – профессор химического факультета МГУ, чл.-корр. РАН, докт. хим. наук (shpigun@analyt.chem.msu.ru).