

УДК 543.544

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИЛИКАГЕЛЕЙ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ХИТОЗАНОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ

Д.В. Шамшурин, Е.Н. Шаповалова, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии)

Получен ряд новых сорбентов на основе силикагелей, модифицированных хитозаном и его производными, и изучены их хроматографические свойства. Изучено влияние природы модификатора и способа его закрепления на удерживание полярных и неполярных соединений. Показано, что полученные сорбенты являются сильнополярными неподвижными фазами и могут применяться для разделения полярных соединений в нормально-фазовом варианте хроматографии. Проведена оценка энантиоселективных свойств сорбентов.

Полисахариды находят широкое применение в жидкостной хроматографии для получения новых неподвижных фаз [1]. Природное происхождение и большие возможности химической модификации полисахаридов целлюлозы и хитозана 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 [2]. Однако несмотря на доступность и высокую реакционную способность сорбенты на основе хитозана еще мало изучены и не столь широко применяются, как сорбенты на основе целлюлозы.

Целью данной работы является получение и изучение хроматографических характеристик новых неподвижных фаз на основе силикагеля, модифицированного хитозаном и его производными.

Экспериментальная часть

Для получения сорбентов использовали силикагель "Silasorb SPH 300" (средний размер частиц 5 мкм, диаметр пор 100 Å), Chemapol (Чехия). Хитозан (5 кДа, степень дезацетилирования 85%), хитозан (200 кДа, степень дезацетилирования 85%) и фталилхитозан предоставлены центром «Биоинженерии» РАН. В работе использовали (1S)-(+)-3-эндо-бромкамфаро-10-сульфоновую кислоту, модельные рацемические смеси (без дальнейшей очистки), полученные от компании "Merck", а также бензол, толуол, *трет*-бутилбензол ("х.ч.") для хроматографии. Для приготовления подвижной фазы использо-

вали гексан (сорт 1) компании "Криохром" и 2-пропанол ("х.ч.") Растворы бензола, толуола, *трет*-бутилбензола, *орто*-нитроанилина, *мета*-нитроанилина, *пара*-нитроанилина и рацемических соединений (0,1–1 мг/мл) готовили растворением указанных веществ в 2-пропаноле или в подвижной фазе. В работе использовали приборы фирмы "Shimadzu": жидкостной хроматограф "SLC-10A" со спектрофотометрическим детектором "SPD-10AV" и насосом "LC-10AT". Для записи и обработки хроматограмм использовали программное обеспечение CLASS-VP v.5.0.3. фирмы "Shimadzu". Объем петли-дозатора составлял 20 мкл. В работе использовали стальные колонки размерами 250×4,6 мм, 150×4,6 мм и 100×4,6 мм.

В качестве матрицы для получения хитозансодержащих сорбентов использовали силикагель. Модификацию силикагеля осуществляли физической адсорбцией хитозана и его производных. Общая характеристика всех рассматриваемых сорбентов по типу и содержанию модификаторов приведена в табл. 1. Сорбенты I и II получали адсорбцией низкомолекулярного хитозана на силикагелях предварительно обработанных солью меди (II) и солью железа (III) соответственно. Сорбент III получали адсорбцией фталилхитозана из фосфатно-аммиачного буфера (pH 8,5). Данные по содержанию хитозана и фталилхитозана в сорбентах приведены в табл. 1. Сорбент IV получали в две стадии. На первой стадии силикагель модифицировали адсорбцией высокомолекулярного хитозана (200 кДа) из ацетатного буфера (pH 5). На второй стадии оптически активной бромкамфаросульфо-кислотой проводили гете-

рогенную реакцию алкилирования свободных амино-групп хитозана, сорбированного на поверхности силикагеля. Содержание полученного производного хитозана в сорбенте определяли методом элементного анализа. Сорбент V, представляющий собой силикагель модифицированный хитозаном по зольгель технологии [3], был предоставлен проф. Б.Д. Кабуловым из Института химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан. Методом элементного анализа установлено, что содержание хитозана в этом сорбенте составляет 1,52%. Сорбент VI представляет собой коммерческий продукт и доступен под торговым названием "CHIRACEL-ODH" (компания *Daicel Chemical Industries, LTD*). Структурные формулы рассматриваемых селекторов приведены на рис. 1.

Результаты и их обсуждение

Для оценки удерживающей способности и закономерностей удерживания полученных сорбентов использовали модельные соединения: неполярные (бензол, толуол, *трет*-бутилбензол) и полярные (*орто*-, *мета*-, *пара*-нитроанилины и *пара*-нитрофенол). В качестве элюента использовали смесь гексан – изопропанол. Полученные данные, приведенные в табл. 2, показывают существенные различия в удерживании полярных и неполярных веществ.

На силикагелях, модифицированных хитозаном (сорбенты I, II), времена удерживания бензола, толуола, *трет*-бутилбензола малы и для всех соединений сопоставимы с временем выхода неудерживаемого компонента. Удерживание неполярных соединений несколько увеличивается на силикагелях, модифицированных производными хитозана (сорбенты III и IV), причем рост времени удерживания хорошо коррелирует с увеличением массовой доли модификатора (табл. 1, 2). В случае сорбентов V и VI наблюдается различие в величинах времен удерживания неполярных соединений, достаточное для неполного разделения бензола и *трет*-бутилбензола, что говорит о способности этих сорбентов взаимодействовать с сорбатом за счет образования комплексов включения [4].

Времена удерживания нитроанилинов на рассматриваемых сорбентах достаточно велики для их полного разделения и увеличиваются в ряду *орто*-, *мета*-, *пара*-замещенные. Для хитосиликагеля (сорбент V) характерно более сильное удерживание нитроанилинов по сравнению с остальными сорбентами. По-видимому, дополнительный вклад в удерживание вносят стерические взаимодействия между сорбентом и разделяемыми веществами, обусловленные макропористой структурой сорбента.

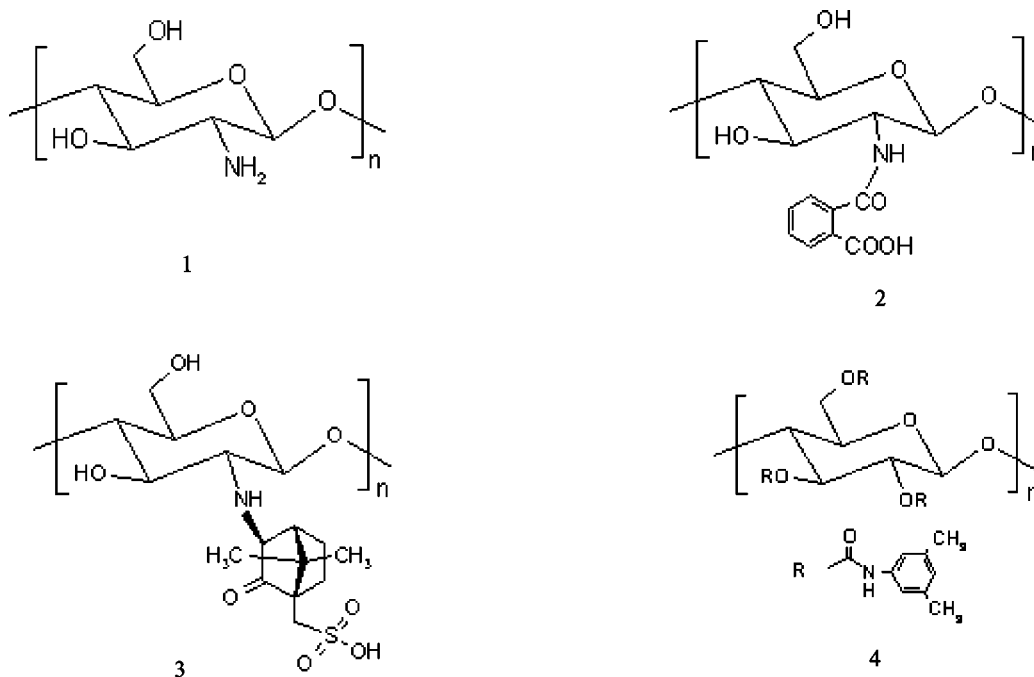


Рис. 1. Структурные формулы модификаторов: хитозан (1), фталилхитозан (2), сульфокамфарохитозан (3), *трис*-(3,5-диметилфенилкарбамат) целлюлозы (4)

Т а б л и ц а 1

Содержание модификаторов в сорбентах

| Сорбент | Модификатор | α , мг/г | Ион металла |
|-------------|--|----------------------|------------------|
| Сорбент I | хитозан | 16,0 | Cu^{2+} |
| Сорбент II | хитозан | 15,5 | Fe^{3+} |
| Сорбент III | фталилхитозан | 9,0 | Fe^{3+} |
| Сорбент IV | сульфокамфарохитозан | 34,8 | – |
| Сорбент V | хитозан | 15,2 | – |
| Сорбент VI | Трис-(3,5-диметилфенил-карбамат) целлюлозы | коммерческая колонка | |

Как видно из полученных данных, сорбенты на основе силикагелей, модифицированных хитозаном и его производными, проявляют низкую селективность к неполярным соединениям и высокую к полярным, т.е. полученные сорбенты являются полярными неподвижными фазами. Такие фазы можно успешно использовать для разделения полярных веществ в нормально-фазовом варианте высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Поскольку хитозан и его производные являются оптически активными соединениями была проведена оценка энантиоселективности сорбентов. Ее проводили на примере ряда рацемических соединений различных классов (рис. 2). Разделение оптических изомеров этих соединений хорошо изучено на полисахаридных хиральных неподвижных фазах на основе целлюлозы и амилозы [5–6]. Полученные нами данные приведены в табл. 3, 4.

Удерживание модельных соединений на силикагелях, модифицированных хитозаном, увеличивается в следующем порядке: *транс*-стильбенонксид < бензоин < метопролол < 2,2-диамино-1,1-бинафтилен < 1-би-2-нафтол.

Несмотря на сложность зависимости времени удерживания от строения анализируемых веществ следует выделить некоторые общие закономерности. При разделении веществ на полярных сорбентах преимущественный вклад в удерживание вносят полярные группы. При этом важны число, располо-

жение и природа полярных групп. В *транс*-стильбенонксиде, бензоине и метопрололе полярные группы экранированы углеводородными (гидрофобными) фрагментами, поэтому эти соединения слабо удерживаются на изучаемых сорбентах. В случае диаминобинафтилена и бинафтола полярные группы пространственно более доступны, и соответственно удерживаются эти соединения сильнее. Как видно из полученных результатов, для сорбента V порядок выхода диаминобинафтилена и бинафтола обратный по сравнению с сорбентами I и II. Большую роль при разделении различных веществ оказывают стерические взаимодействия, причем важно учитывать не только доступность полярной группы разделяемого вещества, но и структуру поверхности сорбента. В сорбентах I и II физическая адсорбция хитозана проходит с образованием монослоя полисахарида на поверхности сорбента [7]. Сорбент V получен по золь-гель-технологии, где, по-видимому, хитозан образует отличную от монослоя структуру, что и обуславливает существенные различия как в удерживании модельных соединений, так и рацемических смесей (рис. 3, 4).

Соединения, полярные группы которых экранированы углеводородными фрагментами, также слабо удерживаются на сорбентах, модифицированных производными хитозана (сорбенты III, IV). В то же время на сорбенте VI с закрепленным трис-(3,5-диметилфенилкарбаматом) целлюлозы времена удер-

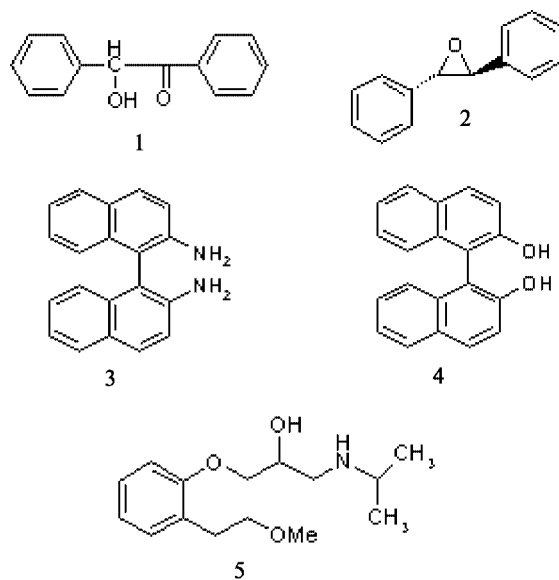


Рис. 2. Структурные формулы модельных соединений: бензоин (1), *транс*-стильбенонксид (2), 1,1-би-2-нафтол (3), 2,2-диамино-1,1-бинафтилен (4), метопролол (5)

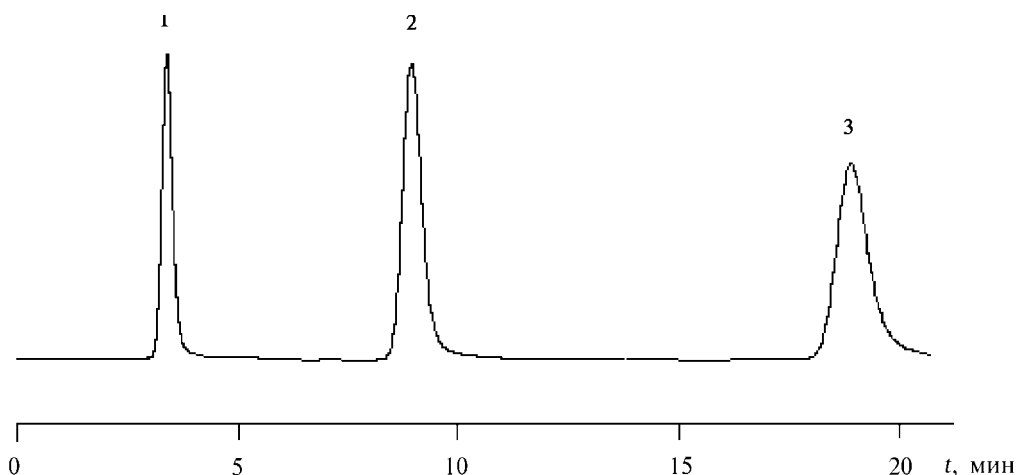


Рис. 3. Хроматограмма разделения *орто*-нитроанилина (1), *мета*-нитроанилина (2), *пара*-нитроанилина (3) на колонке с сорбентом V. Длина колонки 10 см, длина волны детектирования 254 нм, скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Подвижная фаза: гексан-изопропанол (90:10, об.%)

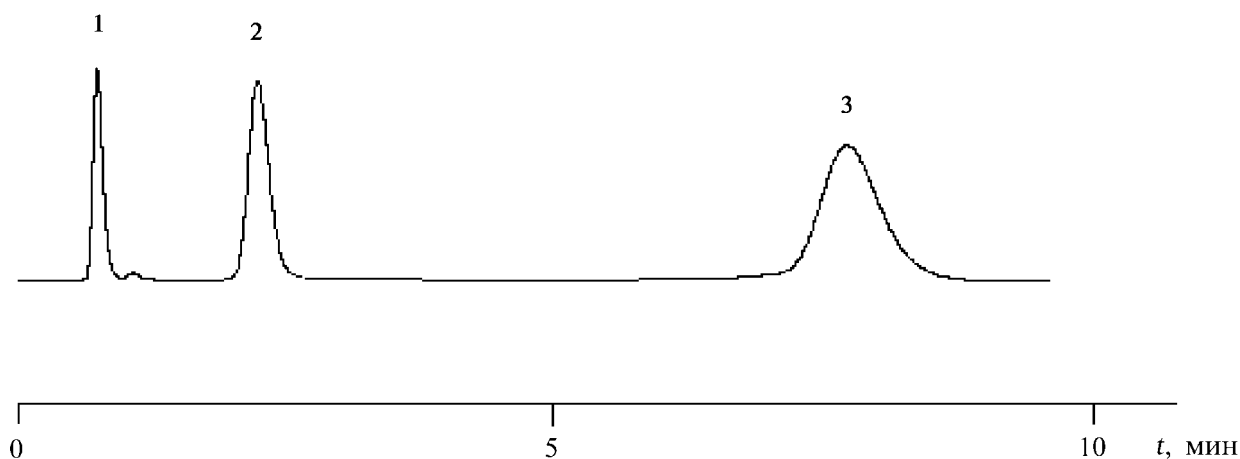


Рис. 4. Хроматограмма разделения *транс*-стильбеноксида (1), бензоина (2), 2,2-диамино-1,1-бинафтилена (3) на колонке с сорбентом V. Длина колонки 10 см, длина волны детектирования 254 нм, скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Подвижная фаза: гексан-изопропанол (95:5, об.%)

живания этих соединений существенно выше. В этом случае также может иметь значение упорядоченная структура полисахарида на поверхности силикагеля, обеспечивающая удерживание разделяемых компонентов за счет образования комплексов включения.

Существенное влияние на специфичность удерживания разделяемых компонентов оказывает природа заместителя в молекулах хитозана. Так, в случае введения в хитозан фталил-группы заместителя, содержащего ароматическое кольцо, способное к π - π -взаимодействиям, фактор удерживания для бинафтола и диаминобинафтилена значительно увеличива-

ется. В случае же сульфокамфарохитозана – объемного углеводородного заместителя, препятствующего доступу к полярным группам хитозана, наоборот, удерживание бинафтола и диаминобинафтилена уменьшается, причем изменяется также и порядок выхода. Таким образом, введение в макромолекулу хитозана различных фрагментов модифицирующих веществ позволяет изменять селективность получаемых сорбентов.

Оптические изомеры рацемических смесей, используемых для проверки энантиоселективности сорбентов, были разделены на колонке с сорбентом с закрепленным трис-(3,5-диметилфенилкарбама-

Таблица 2

**Хроматографические параметры модельных соединений для изученных сорбентов I–VI
(подвижная фаза – гексан:изопропанол (90:10, об.%), $V = 1$ мл/мин)**

| Вещество | Коэффициент k для сорбента | | | | | |
|--------------------------|------------------------------|------|------|------|-------|------|
| | I | II | III | IV | V | VI |
| Бензол | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,09 | 0,16 | 0,16 |
| Толуол | 0,05 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,14 | 0,13 |
| <i>трет</i> -бутилбензол | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,07 | 0,08 | 0,08 |
| <i>орто</i> -нитроанилин | 0,88 | 0,53 | 0,66 | 1,15 | 3,13 | 1,31 |
| <i>мета</i> -нитроанилин | 2,78 | 1,82 | 2,19 | 3,35 | 10,30 | 4,58 |
| <i>пара</i> -нитроанилин | 4,77 | 3,32 | 3,20 | 6,70 | 22,23 | 7,38 |
| <i>пара</i> -нитрофенол | 1,4 | 0,92 | 1,13 | 1,02 | 3,69 | 1,50 |

Таблица 3

**Хроматографические параметры рацемических соединений на
силикагелях, модифицированных хитозаном (подвижная фаза –
гексан:изопропанол (95:5, об.%), $V = 1$ мл/мин)**

| Вещество | Сорбент I | | Сорбент II | | Сорбент V | |
|------------------------------|-----------|-------|------------|-------|-----------|------|
| | k | N* | k | N | k | N |
| <i>Транс</i> -стильбенноксид | 0,09 | 10190 | 0,14 | 11870 | 0,23 | 5990 |
| Бензоин | 0,55 | 6090 | 0,48 | 7890 | 2,10 | 3130 |
| Метопролол | 0,97 | 4280 | 1,02 | 4600 | – | – |
| 2,2-Диамино-1,1-бинафтилен | 1,72 | 5220 | 1,40 | 3400 | 8,43 | 420 |
| 1,1-Би-2-нафтол | 1,77 | 3640 | 1,49 | 2640 | 1,56 | 620 |

* Число теоретических тарелок на метр.

том). Высокая эффективность коммерческой колонки позволила получить полное разделение энантиомеров. Полученные данные по площадям пиков разделенных изомеров подтвердили рацемический состав исследуемых смесей. Недостатком колонки с

этим сорбентом является резкое увеличение давления, возникающее в системе при переходе к более полярным подвижным фазам, в том числе и к смеси гексана с изопропанолом, в которой содержание изопропанола составляет более 10%.

Т а б л и ц а 4

Хроматографические параметры рацемических соединений для сорбентов, модифицированных хитозаном (подвижная фаза – гексан:изопропанол (95:5, об.%), V = 1 мл/мин)

| Вещество | Сорбент III | | Сорбент IV | | Сорбент VI | |
|----------------------------|-------------|------|------------|------|----------------|-------|
| | κ | N* | κ | N | κ | N |
| Транс-стильбенноксид | 0,10 | 8760 | 0,14 | 6340 | 0,97 (2,06) | 47280 |
| Бензоин | 0,74 | 7480 | 0,66 | 7990 | 3,44 (5,50) | 37270 |
| Метопролол | 0,04 | 3700 | 0,72 | 4850 | – | – |
| 2,2-Диамино-1,1-бинафтилен | 2,52 | 2040 | 1,92 | 5310 | 4,25 (5,53) | 26470 |
| 1,1-Би-2-нафтол | 6,06 | 1640 | 0,96 | 2640 | 6,12 (7,36) | 12360 |

* Число теоретических тарелок на метр.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 03-03-32164).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Okamoto Y., Yashima E. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998. **37**. P. 1020.
2. Franco P., Senso A., Minguillon C., Oliveros L. // *J. Chromatogr. A.* 1998. **796**. P. 265.
3. Naas K.H. // *Advanced Engineering Materials.* 2000. **2**. P. 571.
4. Алленмарк С. Хроматографическое разделение энантиомеров. М., 1991.
5. Okamoto Y., Aburatani R., Hatada K. // *J. Chromatogr.* 1987. **389**. N 1–2. P. 95.
5. Okamoto Y., Kawashima M., Hatada K. // *J. Chromatogr.* 1986. **363**. N 2. P. 173.
6. Chankvetadze B., Yashima E., Okamoto Y. // *J. Chromatogr.* 1995. **694**. N 1. P. 101.
7. Буданова Н.Ю., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А. и др. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер.2. Химия.* 2000. **42**. № 2. С. 112.

Поступила в редакцию 08.01.04

CHROMATOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF SILICA MODIFIED WITH CHITOSAN AND IT DERIVATIVES

D.V. Shamshurin, E.N. Shapovalova, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry)

Number of new sorbents based on *silica* modified with chitosan and it derivatives were prepared and chromatographic characteristics of the sorbents were evaluated. The effect of the nature of modifier on the retention of *polar* and *non-polar* organic substances was studied. It was pointed out that sorbents obtained are *strong-polar* stationary phases, thus, it can be used for the resolving of organic polar substances at normal-phase chromatographic conditions. Enantioselective properties of the sorbents were investigated.