



УДК 543.545:544.523

Адсорбция эремомицина на стенках кварцевого и модифицированных капилляров при электрофоретическом разделении энантиомеров ароматических кислот

Лебедева М.В., Прохорова А.Ф., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А., Староверов С.М., Кузнецов М.А.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 11.04.2011 г.

Аннотация

Предложены методики модифицирования поверхности кварцевого капилляра хитозаном, 3-аминопропилтриметоксисилоном, 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилоном и эремомицином. Наиболее стабильным оказалось покрытие капилляра эремомицином, иммобилизованным через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан. Изучена адсорбция эремомицина на поверхности капилляра. Показано, что модифицирование капилляра уменьшает адсорбцию эремомицина. Установлено, что на поверхности капилляра, модифицированного 3-аминопропилтриметоксисилоном, эремомицин адсорбируется в меньшей степени, чем на поверхности капилляра, модифицированного эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан. Показана возможность успешного разделения энантиомеров ряда профенов в модифицированных капиллярах при концентрации хирального селектора меньше 1 мМ.

Ключевые слова: модифицирование капилляра, эремомицин, адсорбция

Methods for the preparation of fused-silica capillaries coated with chitosan, 3-aminopropyltrimethoxysilane, 3-glicidoxypopyltriethoxysilane and eremomycin were offered. It was found that the most stable coating consisted of eremomycin covalently bonded to the silica surface through 3-glicidoxypopyltriethoxysilane. The adsorption of eremomycin on the capillary surface was studied. It was shown that capillary coating reduced the eremomycin adsorption. To reduce this phenomenon, the 3-aminopropyltrimethoxysilane-coated capillary was shown to be more effective than that with eremomycin immobilized through 3-glicidoxypopyltriethoxysilane. Four profens were enantioseparated in coated capillaries using as less as 1 mM eremomycin.

Keywords: coated capillaries, eremomycin, adsorption

Введение

Многие из биологически активных соединений, применяемых сегодня в различных областях, представляют собой рацемические смеси. Разделение энантиомеров является важным направлением в современной аналитической химии. Одним из методов разделения и определения хиральных соединений является капиллярный электрофорез (КЭ). Преимущество КЭ - высокая эффективность разделения и возможность легко варьировать условия разделения, такие как состав и

pH фонового электролита и, главное, концентрация хирального селектора, что сложно осуществить в методе ВЭЖХ на колонке с хиральной неподвижной фазой. Универсальными и селективными хиральными селекторами являются макроциклические антибиотики (МА), среди которых лучшими признаны ванкомицин и бальгимицины [1]. Эремомицин, антибиотик, предложенный российскими исследователями, не уступает по селективности ванкомицину, но пока мало исследован [2]. Применению МА в капиллярном электрофорезе препятствует их адсорбция на стенках кварцевого капилляра, что приводит к снижению эффективности и существенным искажениям результатов определения аналитов. Одним из способов уменьшения адсорбции является модифицирование стенок капилляра различными соединениями [3]. В большинстве случаев модифицирование стенок капилляра проводят в неводной среде, что значительно усложняет методику [4]. Поэтому с практической точки зрения представляет интерес разработка способов модифицирования стенок капилляра в водной среде по аналогии с методиками модифицирования силикагеля в водных растворах для получения сорбентов для ВЭЖХ [5,6]. Закрепленные на кварцевой поверхности модификаторы, содержащие различные функциональные группы, могут также выступать в качестве связующего звена между капилляром и ХС. Имобилизованный на стенках ХС изменяет заряд поверхности капилляра, уменьшает адсорбцию ХС и, возможно, способен принимать участие в энантиоразделении. Таким образом, присутствие хирального селектора на стенках капилляра позволит сократить необходимое для разделения оптических изомеров количество селектора в фоновом электролите (ФЭ).

Целью данной работы являлось получение модифицированных хитозаном, 3-аминопропилтриметоксисиланом и эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан кварцевых капилляров и изучение адсорбции эремомицина на стенках этих капилляров, а также сравнение энантиораспознавательной способности эремомицина по отношению к профенам при использовании немодифицированного и модифицированных кварцевых капилляров.

Теоретическая часть

Оценка адсорбции на поверхности кварцевого капилляра очень важна при исследовании миграции веществ в КЭ, поскольку адсорбция компонентов буферного раствора существенно изменяет поведение вещества в капилляре при наложении напряжения. Следует отметить, что количественно оценить адсорбцию достаточно сложно. В работе [7] предложено использовать зависимость электрофоретической подвижности вещества от его концентрации в водимой пробе для описания адсорбции аналитов на границе раздела жидкость-твердое вещество в кварцевом капилляре.

В немодифицированном кварцевом капилляре скорость (v) передвижения анализируемого вещества определяется напряженностью поля (E), электроосмотической (μ_{eo}) и электрофоретической подвижностью (μ_{ep}):

$$v = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) * E \quad (1)$$

Взаимодействие вещества со стенками капилляра описывается уравнением:

$$A_s + W = A_w, \quad (2)$$

в котором A_s -свободное вещество (в растворе), A_w -вещество, адсорбированное на стенке, W - связывающий участок на стенке. Полагают, что процессы адсорбции и десорбции имеют место между стенкой и слоем раствора анализируемого вещества,

находящегося в непосредственной близости к стенке. Ширина этого слоя определена многими параметрами: коэффициентом диффузии анализируемого вещества, скоростями адсорбции и десорбции, концентрацией связывающих участков на стенке.

Из-за процессов адсорбции/десорбции перемещение исследуемого вещества замедляется, так как оно некоторое время находится на стенке. Средняя подвижность (μ^A) может быть вычислена по следующему уравнению:

$$\mu^A = f_{As} \mu_{As} + f_{Aw} \mu_{Aw}, \quad (3)$$

в котором f_{As} и f_{Aw} – доли вещества, находящегося в растворе и адсорбированного на стенке, соответственно ($f_{As} + f_{Aw} = 1$), μ_{As} – подвижность вещества в растворе ($\mu_{As} = \mu_{ep,As} + \mu_{eo}$) и μ_{Aw} – подвижность вещества, адсорбированного на стенке капилляра. Адсорбированная молекула не двигается по стенке и может мигрировать, только будучи в растворе, таким образом: $\mu_{Aw} = \mu_{ep,Aw} + \mu_{eo} = 0$, или $\mu_{ep,Aw} = -\mu_{eo}$. Замена электрофоретической подвижности на подвижность в уравнении (3) дает уравнение (4):

$$\mu_{ep}^A = f_{As} \mu_{ep,As} + f_{Aw} \mu_{ep,Aw} = f_{As} \mu_{ep,As} - f_{Aw} \mu_{eo} \quad (4)$$

Однако приведенные уравнения не могут быть использованы для определения параметров адсорбции на стенках, потому что средняя подвижность и доли свободного и адсорбированного вещества могут зависеть от экспериментальных условий и особенностей анализируемого вещества: кинетических констант, коэффициента диффузии, внутреннего радиуса капилляра, параметров стенки капилляра (концентрации связывающих участков, распределения зарядов и т.д.), электрофоретической подвижности, электроосмотического потока, начальной концентрации и величины пробы анализируемого вещества. Все эти факторы трудно учесть при проведении эксперимента. Построение зависимости электрофоретической подвижности вещества от его концентрации в водимой пробе, которую можно рассмотреть как некий аналог “изотермы адсорбции” в хроматографии, позволяет в некоторой степени оценить влияние этих факторов. Для построения зависимости предварительно получают электрофореграммы исследуемого вещества различных концентраций, рассчитывают по ним электрофоретическую подвижность компонента по формуле:

$$\mu_{ep} = LL_o(1/t_a - 1/t_{eo})/U \quad (5)$$

и строят зависимость электрофоретической подвижности от концентрации. В диапазоне высоких концентраций электрофоретическая подвижность повышается до максимального значения. При низких концентрациях электрофоретическая подвижность уменьшается почти линейно до минимального значения, поскольку концентрация исследуемого вещества стремится к 0. В области малых концентраций исследуемого вещества «изотерма адсорбции» описывается уравнением линейной регрессии.

Доля несорбированного вещества может быть вычислена из уравнения:

$$f_{As} = n_{As} / (n_{As} + n_{Aw}) = \mu^A / \mu_{As} = \mu^A / (\mu_{ep,As} + \mu_{eo}) = \mu_{ep}^A / \mu_{ep,As} \quad (6)$$

если $\mu_{eo} = 0$, в котором n_{As} и n_{Aw} – числа молей (или масса) исследуемого вещества, находящегося в растворе и адсорбированного на стенке соответственно, и $\mu_{ep,As}$ дана как максимальная подвижность.

В нашей работе подход, предложенный авторами работы [7], использован для изучения адсорбции эремомицина на стенках немодифицированного и модифицированных хитозаном, 3-аминопропилтриметоксисиланом и эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан кварцевых капилляров.

Эксперимент

Реагенты и аппаратура. В работе использовали уксусную и соляную кислоты, гидроксид калия и натрия («Germed», Германия), ацетата натрия тригидрат ч.д.а. («Лабтех», Россия), дигидрофосфат калия, гидрофосфата калия тригидрат ч.д.а. («Рехим», Россия), этанол, пропанол-2 «для хроматографии» (Россия), низкомолекулярный хитозан (степень дезацетилирования 75-85%), 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан (ЭС-1) (97%), оба Sigma-Aldrich, 3-аминопропилтриметоксисилан (95%, Acros Organics, США), глутаровый альдегид (Fluka, Швейцария). В качестве хирального селектора использовали эремомицина сульфат, предоставленный Староверовым С.М. (ЗАО «БиоХимМак С&Т», Москва, Россия).

Использовали системы «Капель-105» и «Капель-103Р» (НПФ АП «Люмэкс», Россия) со спектрофотометрическим детектором (190-380 нм) и 254 нм соответственно. Использовали кварцевые капилляры различной длины и диаметров (Polymicro Technologies, США). Образцы вводили давлением (25-30 мбар, 15-30 с). Приложенное напряжение составляло $\pm(10-25)$ кВ. Детектирование проводили при 210 нм (эремомицин в немодифицированном капилляре), во всех остальных исследованиях при длине волны 254 нм. Температура термостатирования капилляра – 20°C. Для приготовления растворов использовали очищенную воду (MilliQ). Подготовку растворов проводили в УЗИ-бане «Сапфир» (НПФ «Сапфир», Москва). Значения pH водных растворов контролировали на иономере ЭВ-74. Данные были получены и обработаны с использованием программного обеспечения «Мультихром» 1.52г (ЗАО «Амперсенд», Россия).

Техника эксперимента. Для модифицирования капилляров использовали 100 мМ ацетатный (pH 5,3; 6,5), 10 мМ фосфатный (pH 7,0) буферные растворы. В качестве ФЭ использовали 20 мМ ацетатный буферный раствор (pH 4,2; 5,5; 6,1) без и с различными добавками эремомицина.

Новый капилляр готовили к работе и к модифицированию хитозаном, последовательно промывая 0,1 М уксусной кислотой (30 мин), водой (30 мин), 0,1 М гидроксидом натрия (30 мин), водой (30 мин), раствором фонового электролита (30 мин). При модифицировании силанами новый капилляр последовательно промывали водой (30 мин), 1 М гидроксидом калия (30 мин), водой (30 мин), 1 М соляной кислотой (30 мин), продували капилляр воздухом (5 мин, 995 мбар).

Перед началом работы для приведения в состояние равновесия поверхности немодифицированного капилляра его последовательно промывали водой (5 мин), 0,1 М гидроксидом натрия (5 мин), водой (5 мин) и ФЭ (5 мин). Между анализами капилляр промывали ФЭ (5 мин). Модифицированные капилляры готовили к работе, проводя промывку ФЭ (15-20 мин). Между анализами капилляр промывали ФЭ (2-3 мин).

Раствор хитозана (0,02%) готовили по точной навеске, которую растворяли в 0,5 % уксусной кислоте. Раствор 3-аминопропилтриметоксисилана готовили, растворяя 0,1 мл аminosилана в 25 мл 100 мМ ацетатного буферного раствора (pH 6,5).

Раствор 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилана (эпоксисилана, ЭС-1) готовили, смешивая 1 мл ЭС-1 с 10 мл 100 мМ ацетатного буферного раствора (pH 5,3), к полученной эмульсии добавляли этанол до полного растворения (≈ 3 мл). Раствор эремомицина для модифицирования капилляра готовили по точной навеске эремомицина (0,1252 г), которую растворяли в 15 мл деионированной воды и доводили до pH 8,5 прибавлением 1 М КОН (≈ 70 мкл).

Методика нанесения хитозана. Новый подготовленный к модифицированию капилляр (64/56 см, 75 мкм) дважды промывали 0,02% раствором хитозана в уксусной кислоте при 40°C (по 10 мин), затем заполняли 0,02% раствором хитозана и оставляли на ночь, опустив концы в 1% уксусную кислоту. Для лучшего закрепления покрытия повторно наносили слой хитозана.

Методика закрепления 3-аминопропилтриметоксисилана. Новый подготовленный капилляр (45/35 см, 50 мкм) модифицировали по представленной схеме (рис. 1). Капилляр промывали под напряжением +10 кВ раствором 3-аминопропилтриметоксисилана (3 ч), после этого промывали 100 мМ ацетатным буферным раствором (рН 6,5) (30 мин), затем 10 мМ фосфатным буферным раствором (рН 7,0) (30 мин). Процедуру обработки проводили дважды. Для получения более стабильного покрытия заменили промывку под напряжением выдерживанием капилляра, заполненного аminosиланом, в муфельной печи при температуре 90°C в течение 3 ч., а также слои аminosилана связали через глутаровый альдегид. Для этого через капилляр, модифицированный аminosиланом, пропускали глутаровый альдегид (7 мин), выдерживали (15 мин) и промывали водой (10 мин). Активированный таким образом капилляр промывали аminosиланом под напряжением 10 кВ (3 ч), затем промывали 10 мМ фосфатным буферным раствором с рН 7 (10 мин) и 20 мМ ацетатным буферным раствором с рН 5,5 (20 мин).

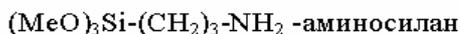
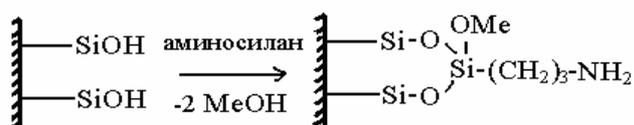


Рис. 1. Схема модифицирования капилляра 3-аминопропилтриметоксисиланом

Методика иммобилизации эремомицина через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан. Новый капилляр (45/35 см, 50 мкм) модифицировали по представленной схеме (рис.2). Подготовленный капилляр промывали раствором ЭС-1 в ацетатном буферном растворе (10 ч), заполняли раствором и оставляли на ночь, опустив концы капилляра в этиловый спирт. Из литературных данных [8] известно, что наибольший выход реакции закрепления эпокисилана на кварцевой поверхности капилляра достигается при модифицировании из водного раствора (рН≈5). После этого промывали капилляр этанолом (5 мин), затем водой (20 мин) до нейтральной реакции (контроль по индикаторной бумажке). Полученный капилляр промывали раствором эремомицина (рН 8,5) в течение 8,5 ч и оставляли на ночь. После этого капилляр промывали водой (5 мин) и ФЭ (30 мин).

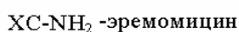
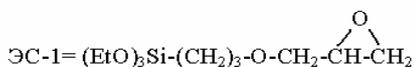
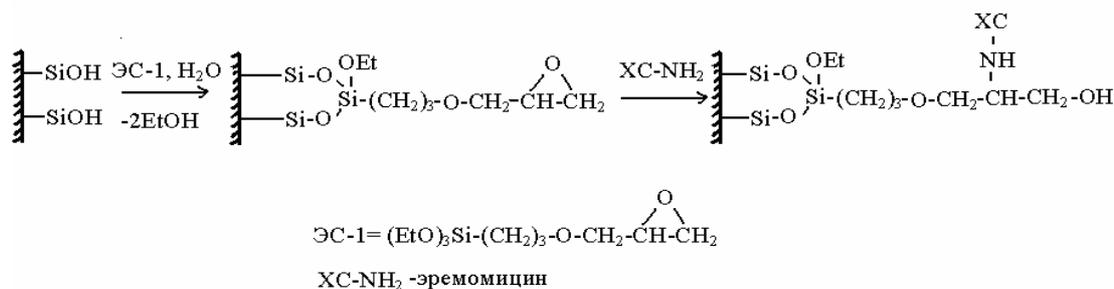


Рис. 2. Схема модифицирования капилляра эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан

Для определения параметров пика соединения на электрофореграмме пробу вводили в капилляр и регистрировали времена миграции. Для определения μ_{eo} и μ_{ep} в пробу добавляли маркер ЭОП – пропанол-2 (3-5 об.%). Пропанол-2 в данных условиях не ионизируется, не поглощает при выбранной длине волны и четко фиксируется на электрофореграмме в виде отрицательного пика. По измеренным временам миграции рассчитывали электрофоретическую подвижность по формуле (5).

Результаты и их обсуждение

Влияние модифицирования капилляра на ЭОП. Охарактеризовать покрытие капилляра особенно сложно из-за ее малой площади и относительной недоступности поверхности. Обычно для изучения свойств модифицированных капилляров измеряют величину скорости ЭОП. В немодифицированном капилляре (при $pH > pK_a$ силанольных групп) стенки заряжены отрицательно за счет диссоциированных силанольных групп кварца, и направление ЭОП определяется движением положительно катионов. Подвижность ЭОП в немодифицированном капилляре при pH 4,2 (20 мМ ацетатный буферный раствор) составляет $0,31 \text{ см}^2/\text{кВ}\cdot\text{с}$ (среднее из трех измерений), относительное стандартное отклонение для времен миграции ЭОП составляет 3,3%. С ростом pH следует ожидать увеличения подвижности ЭОП, т.к. степень диссоциации ОН-групп на поверхности капилляра увеличивается.

После двойного покрытия капилляра хитозаном произошла перезарядка поверхности, т.к. пик маркера ЭОП выходит при обратной полярности приложенного напряжения. Из литературы [9] известно, что капилляр, дважды покрытый хитозаном, обеспечивает более устойчивый электроосмотический поток, большую продолжительность жизни и лучшую воспроизводимость. Никакой существенной разницы не наблюдается между капилляром, покрытым два раза, и тем, который был покрыт три раза. В ходе работы с капилляром, модифицированным хитозаном, замечено, что времена миграции маркера ЭОП с каждым последовательным экспериментом увеличивались. Так, при проведении 4-х последовательных опытов время миграции изменялось более чем на 10 мин (s_T времени миграции маркера ЭОП составляло 19,9%). Это свидетельствует о частичной десорбции хитозана с поверхности капилляра. Для улучшения стабильности покрытия и повышения воспроизводимости в ФЭ добавляли 0,005% хитозана. В этом случае относительное стандартное отклонение s_T времени миграции маркера ЭОП составляло 1,76% (время миграции $\approx 10,5$ мин), что свидетельствует о достаточно устойчивом покрытии капилляра, что хорошо согласуется с литературными данными [10].

Покрытие капилляра аminosиланом оказалось нестабильным в растворах, близких к нейтральным (20 мМ ацетатный буферный раствор, pH 6,2). После модифицирования капилляра направление ЭОП осталось без изменений, а время миграции маркера ЭОП уменьшалось, что свидетельствует о том, что покрытие постепенно смывалось со стенок капилляра. Непосредственно после модифицирования капилляра с использованием глутарового альдегида в качестве агента, сшивающего слои аminosилана, направление ЭОП поменялось на противоположное по сравнению с немодифицированным капилляром (20 мМ ацетатный буферный раствор, pH 5,5). Но после нескольких параллельных анализов направление ЭОП поменялось снова и в течение 5 анализов его скорость уменьшилась в 2 раза, но затем стабилизировалась после 10 последовательных

вводов пробы (рис.3). Уменьшение скорости ЭОП со временем можно объяснить постепенным смыванием привитого слоя с поверхности капилляра в водных растворах с нейтральной или щелочной реакцией среды в связи с тем, что с локальным повышением pH в привитом слое происходит расщепление Si-O-Si связи. В капилляре, модифицированном сшитым аminosиланом, при переходе от pH 5,5 к pH 4,2 время миграции маркера ЭОП выросло более чем в два раза. По-видимому, это связано с повышением числа протонированных аминогрупп, и как следствие, уменьшением суммарного отрицательного заряда стенки капилляра. При использовании ФЭ с pH 4,2 значение ЭОП не изменяется в течение 50 и более анализов (рис.3).

Нами установлено, что в капилляре, модифицированном эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан, ЭОП мигрирует при положительной полярности, следовательно, при модифицировании капилляра его поверхность не перезарядилась. Это можно объяснить тем, что иммобилизация эремомицина через эпоксисилан, вероятно, проходит по первичной аминогруппе селектора и возможной низкой плотностью прививки эремомицина и, как следствие, доступностью силанольных групп. После модифицирования время миграции ЭОП было нестабильно (относительное стандартное отклонение времени миграции маркера ЭОП составило примерно 10 %). Примерно после 5-10 анализов время миграции ЭОП стабилизировалось (относительное стандартное отклонение времени миграции маркера ЭОП составило 3,3 %) (20 мМ ацетатный буферный раствор, pH 5,5).

Несмотря на катодное направление ЭОП в модифицированных силанами капиллярах, мы полагаем, что модифицирование поверхности все же произошло, об этом свидетельствует изменение ЭОП. На рис. 3 приведена зависимость значения ЭОП от числа ввода пробы для немодифицированного и модифицированных силанами капилляров.

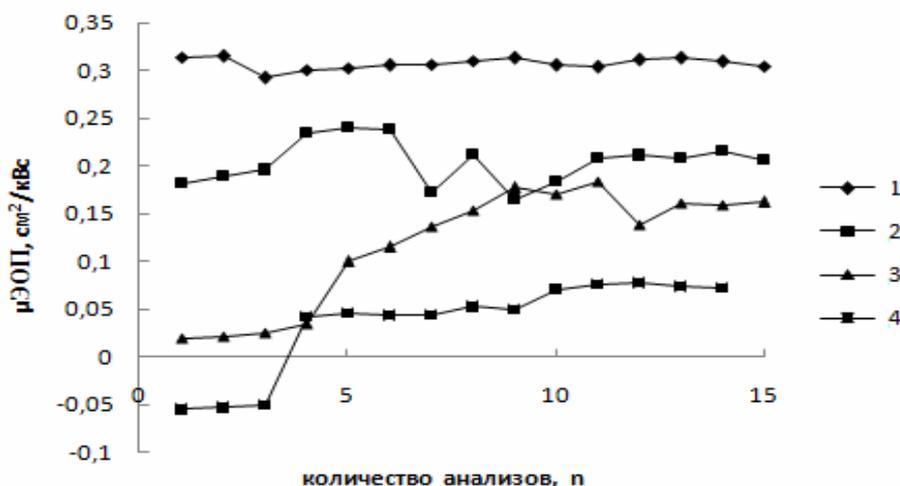


Рис. 3. Зависимость подвижности маркера ЭОП от числа ввода пробы (1 – немодифицированный капилляр, pH 4,2; 2 – капилляр, покрытый эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан, pH 5,5, 3 – несшитый аminosилан, pH 6,2;

4 – сшитый через глутаровый альдегид аminosилан, pH 5,5). ФЭ: 20 мМ ацетатный буферный раствор; ввод пробы 25 мбар, 15 с, +20кВ, 254 нм; капилляр 45/35 см, 50 МКМ

В капиллярах, модифицированных аminosиланом и сшитым аminosиланом, значения подвижности ЭОП (0,16 см²/кВ·с и 0,08 см²/кВ·с соответственно) меньше,

чем в немодифицированном кварцевом капилляре ($0,31 \text{ см}^2/\text{кВ}\cdot\text{с}$ при pH 4,2; с ростом pH следует ожидать увеличение подвижности ЭОП в связи с увеличением степени депротонированных силанольных групп), следовательно, абсолютная величина суммарного заряда поверхности уменьшилась при модифицировании аminosиланом.

В капилляре, модифицированном эремомицином через 3-глицидил-оксипропилтриэтоксисилан, скорость ЭОП по сравнению с немодифицированным капилляром уменьшилась (абсолютная величина заряда поверхности уменьшилась) и составила $0,10 \text{ см}^2/\text{кВ}\cdot\text{с}$ (20 mM ацетатный буферный раствор, pH 5,5). Сравнивая значения ЭОП, можно предположить, что капилляр, модифицированный эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан, по степени закрытия силанольных групп на поверхности уступает капилляру, модифицированному сшитым аminosиланом.

Изучение адсорбции эремомицина. В исследуемых условиях (20 mM ацетатный буфер, pH 5,5) молекула эремомицина имеет положительный заряд, поэтому ХС мигрирует до электроосмоса в немодифицированном и модифицированном силанами капиллярах. В капилляре, модифицированном хитозаном, направление ЭОП определяется движением отрицательно заряженных частиц, поэтому ХС мигрирует после маркера ЭОП при отрицательной полярности. Для всех исследованных капилляров с увеличением концентрации эремомицина наблюдается уменьшение эффективности и увеличение асимметрии пика ХС, что связано с адсорбцией эремомицина на поверхности капилляра.

В капиллярном электрофорезе количественно оценить адсорбцию можно, исследуя изменение электрофоретической подвижности сорбата и маркера ЭОП. Мы предлагаем несколько параметров, которые могут охарактеризовать величину адсорбции, и позволяют сравнить ее в различных условиях. Зависимость электрофоретической подвижности сорбата от его концентрации можно использовать как аналог изотермы сорбции в хроматографии. В области малых концентраций вещества изотерма адсорбции описывается уравнением прямой ($\mu_{\text{ep}} = A \cdot v + B$, где v – концентрация вещества или количество введенного вещества). Константа A (тангенс угла наклона начального участка изотермы) характеризует скорость изменения подвижности от количества ХС, чем она больше, тем больше скорость заполнения поверхности капилляра из-за адсорбции эремомицина. В диапазоне высоких концентраций (количества введенного вещества) электрофоретическая подвижность увеличивается до своего максимального значения и далее остается постоянной. За максимальную подвижность выбрано среднее значение электрофоретической подвижности при максимальной концентрации эремомицина. Очевидно, что чем больше максимальная подвижность, тем меньше взаимодействие эремомицина со стенкой капилляра. В табл. 1 приведены параметры адсорбции на стенках капилляров, исследованных в работе.

Максимальная электрофоретическая подвижность эремомицина в капиллярах, модифицированных амино- и эпоксисиланом различаются незначительно. Изменение значения эффективной подвижности также может быть использовано для характеристики изменения поверхности при адсорбции ХС. В случае капилляра, модифицированного аminosиланом, $\Delta\mu_{\text{ep}}$ меньше в 1,75 раз, чем в капилляре с иммобилизованным эремомицином через эпоксисилан. Таким образом, можно сделать предположение, что покрытие аminosиланом в большей степени уменьшает адсорбцию, чем покрытие эремомицином через эпоксисилан.

Таблица 1. Параметры адсорбции эремомицина на стенках исследованных капилляров

Капилляр	Диапазон количества введенного эремомицина v , нмоль	Диапазон линейности изотермы, нмоль	$L/L_{до}$ дет, см. d , мкм	A , $см^2/(кВ \cdot нмоль \cdot с)$	$max \mu$ $ср$, $см^3/кВ \cdot с$
№ 1	0.001÷0.092	0.001÷0.012	64/56 75	0.45	0.11
№ 2	0.001÷0.092	0.001÷0.092	64/56 75	0.40	-0.16
№ 3	0.007÷0.295	0.007÷0.06	45/35 50	0.32	0.20
№4	0.011÷0.295	0.011÷0.09	44/35 50	0.71	0.21

№ 1 – немодифицированный капилляр, № 2 – капилляр, покрытый хитозаном, № 3 – капилляр, покрытый сшитым 3-аминопропилтриметоксисиланом, № 4 – капилляр, модифицированный эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан.

Практическое применение модифицированных капилляров. Из литературы известно [11], что использование капилляра, модифицированного хитозаном, позволяет разделить смесь миндальной, α -метоксифенилуксусной, 2-фенилпропановой, 3-фенилбутановой кислот и профенов (в ФЭ, содержащем 0.01% хитозана, времена миграции профенов совпадают между собой), при этом сократив время разделения по сравнению с немодифицированным капилляром. Разделение кислот в 22 мМ ацетатном буферном растворе с pH 5,4, содержащем 0.01% хитозана, происходит в течение 7 мин.

Смесь миндальной, 2-феноксипропионовой, 3-фенилбутановой кислот и флурбипрофена полностью разделяется в капиллярах, модифицированных силанами менее чем за 15 минут в ацетатном буфере (pH 5,5 и pH 6,1). Молекулы карбоновых кислот заряжены отрицательно, следовательно, они должны двигаться в сторону анода, в направлении противоположном ЭОП. В модифицированных капиллярах собственные подвижности кислот оказываются больше, чем скорость ЭОП, именно поэтому кислоты детектируются при отрицательной полярности. Однако в немодифицированном капилляре вклад ЭОП преобладает, поэтому кислоты выходят после маркера ЭОП при положительной полярности и разделяются за значительно большее время (>1 ч). Анионы мигрирует против ЭОП, поэтому крупные анионы, собственная подвижность которых меньше, мигрируют быстрее.

Как нами показано ранее с использованием немодифицированного капилляра [2], эремомицин обладает хорошей энантиоселективностью по отношению к профенам, но даже при использовании внешнего давления разделение энантиомеров занимает 30–40 минут. В модифицированных капиллярах время миграции профенов заметно меньше, для разделения энантиомеров достаточно 12 мин. В табл. 2 показано сравнение разрешения энантиомеров флурбипрофена, кетопрофена, фенопрофена и ибупрофена в различных капиллярах. Концентрация ХС, при которой достигается энантиоразделение, в модифицированных капиллярах намного меньше, чем заявленная в литературе, которая составляет от 1 до 5 мМ. Следует отметить, что разрешение энантиомеров профенов в капилляре, модифицированном эремомицином через эпоксисилан, больше, чем в аминированном капилляре. Так, в

капилляре, модифицированном эремочином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан, частичное разделение энантиомеров флурбипрофена ($R_s=0,52$) и кеторпрофена ($R_s=0,35$) получено уже при концентрации 0,1 мМ ХС в ФЭ. Для капилляра, модифицированного 3-аминопропилтриметоксисиланом, минимальная концентрация ХС, при которой наблюдается энантиоразделение, составляет 0,25 мМ, при этом при разделении энантиомеров кеторпрофена R_s равно 0,54. Интересно отметить, что характер модифицирования влияет на селективность и разрешение пиков оптических изомеров. Амнированный капилляр более селективен к кеторпрофену, чем к флурбипрофену, в отличие от модифицированного эпоксисиланом капилляра.

Таблица 2. Разделение энантиомеров профенов в немодифицированном и модифицированных капиллярах в присутствии эремочицина

Соединение	Капилляр 1 ¹⁾		Капилляр 2 ²⁾		Капилляр 3 ³⁾	
	ФЭ	R_s	ФЭ	R_s	ФЭ	R_s
Флурбипрофен	20 мМ ацетатный БР рН 4,2 0,75 мМ ХС - 20 кВ	1.4	20 мМ ацетатный БР рН 5,5 0,25 мМ ХС - 20 кВ	1.1	50 мМ фосфатный БР рН 5,3 2,5 мМ ХС + 10 кВ внешн. давл. 10 мбар	1.1
Кеторпрофен		2.2		0.9		2.8
Фенопрофен		0.8		0.2		0.6
Ибупрофен		1.8		-		2.7

БР – буферный раствор, ¹⁾капилляр, покрытый сшитым 3-аминопропилтриметоксисиланом, ²⁾капилляр, модифицированный эремочином через 3-глицидилоксипро-пилтриэтоксисилан, ³⁾немодифицированный капилляр [2].

Список литературы

- 1.Prokhorova A.F, Shapovalova E.N., Shpigun O.A.. Chiral analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selectors // J. Pharm. Biomed. Anal. 2010. V.53. P.1170–1179.
- 2.Prokhorova, A.F., Shapovalova, E.N., Shpak, A.V. et al. Enantio-recognition of profens by capillary electrophoresis using a novel chiral selector eremomycin // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. P. 3674-3677.
- 3.Weinberger R. Practical Capillary Electrophoresis. 2nd ed. 2000. N.-Y.: Academic Press. 462 p.
- 4.Horvath J., Dolnik V. Polymer wall coatings for capillary electrophoresis // Electrophoresis. 2001. V. 22. P. 644-655.
- 5.Ворошилова О.И., Киселев А.В., Никитин Ю.С. Синтез и исследование кремнеземных носителей с поверхностью, модифицированной γ – аминопропильными группами// Коллоидн. журн. 1980. Т. 42. С.223-229.
- 6.Staroverov S. M.; Kuznetsov M. A.; Nesterenko P.N. et al. New chiral stationary phase with macrocyclic glycopeptide antibiotic eremomycin chemically bonded to silica // J. Chromatogr. A. 2006. V.1108. P.263-267.
- 7.Fang N., Zhank H., Li J., Li H.-W. Mobility-based wall adsorption isotherms for comparing capillary electroforesis with single-molecule observations. // Anal. Chem. A. 2007. V.79. P.6047-6054.

8. Shao X., Shen Y., O'Neill K., Lee M.L. Capillary electrophoresis using diol-bonded fused-silica capillaries // *J. Chromatogr. A*. 1999. V.830. P.415-422.

9. Huang X., Wang Q., Huang B. Preparation and evaluation of stable coating for capillary electrophoresis using coupled chitosan as coated modifier // *Talanta*. 2006. V.69. P.463-468.

10. Буданова Н.Ю., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А. Изучение возможности использования хитозана в капиллярном электрофорезе // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2006. Т.47. С.177-181.

11. Буданова Н.Ю. Капиллярное электрофоретическое разделение энантиомеров при использовании олиго- и полисахаридных хиральных селекторов. Дисс. ... канд. хим. наук. М.: МГУ. Хим. фак, 2005, 161 с.

Лебедева Маргарита Владимировна – аспирантка 1 г/о кафедры аналитической химии химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва

Прохорова Александра Федоровна – к.х.н., младший научный сотрудник кафедры аналитической химии химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва

Шаповалова Елена Николаевна – к.х.н., доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, тел. (495) 939-54-64

Шпигун Олег Алексеевич – чл.-корр. РАН, д.х.н., проф., заведующий лабораторией хроматографии кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, тел. (495) 939-13-82

Староверов Сергей Михайлович – д.х.н., заведующий лабораторией «Новые химические технологии для медицины» кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, тел. (495) 939-59-67

Кузнецов Михаил Александрович – к.х.н., старший научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, тел. (495) 939-59-67

Lebedeva Margarita V. – postgraduate student (1st year of studies), Analytical Chemistry division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: margoL87@mail.com

Prokhorova Aleksandra F. – junior researcher, Analytical, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Shapovalova Elena N. – associate professor, Analytical Chemistry division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Shigun Oleg A. –corresponding member of Russ. Acad. Sci., Head of the Chromatography Laboratory, Analytical Chemistry division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Staroverov Sergei M. – Head of the Laboratory of new chemical technologies for medicine, Chemical Enzymology division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Kuznetsov Mikhail A. – senior researcher, Chemical Enzymology division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow