

УДК 543.545

## ФИЗИЧЕСКИ АДСОРБИРОВАННЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2025 г. Е. А. Колобова<sup>а,\*</sup>, Э. Р. Зиангирова<sup>а</sup>, Е. В. Соловьева<sup>а</sup>, Л. А. Карцова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии  
Университетский просп., 26, Санкт-Петербург, Петергоф, 198504 Россия

\*E-mail: ekatderyabina@mail.ru

Поступила в редакцию 11.09.2024 г.

После доработки 27.09.2024 г.

Принята к публикации 27.09.2024 г.

Сформированы покрытия внутренних стенок кварцевого капилляра на основе катионного высокомолекулярного хитозана со степенью деацетилирования 95%. Изучена зависимость скорости электроосмотического потока от pH фонового электролита, и проведена оценка стабильности покрытия при воздействии различных растворителей. Результаты сопоставлены с другим катионным покрытием на основе поли(диаллилдиметиламмоний хлорида) (ПДАДМАХ). Показано, что при разделении аминокислот, катехоламинов и органических кислот сформированные покрытия на основе хитозана незначительно уступают в эффективности покрытиям из ПДАДМАХ, но обеспечивают более высокое разрешение исследуемых биологически активных анализаторов. Установлено, что хитозан на внутренних стенках кварцевого капилляра способствует повышению энантиоселективности при разделении энантиомеров  $\beta$ -блокаторов (карведилола, пропранолола, сotalола) при наличии в фоновом электролите (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин, а также нестероидных противовоспалительных веществ (кетопрофена и кеторалака) с использованием в качестве второго хиального селектора ванкомицина.

**Ключевые слова:** капиллярный электрофорез, физически адсорбированные покрытия стенок кварцевого капилляра, хитозан, хиальное разделение.

DOI: 10.31857/S0044450225010086 EDN: abdcfk

Эволюция метода капиллярного электрофореза (КЭ) в значительной степени обусловлена поиском и применением эффективных модификаторов электрофоретических систем, обеспечивающих реализацию различных режимов КЭ и позволяющих регулировать эффективность и селективность разделения анализаторов различной природы [1–3].

Основное ограничение метода КЭ, связанное с сорбцией на стенках кварцевого капилляра основных анализаторов (катехоламинов, аминокислот, аминоспиртов, белков), устраняется формированием различных типов покрытий кварцевого капилляра: ковалентных [4, 5], динамических и физически (статически) адсорбированных [6]. Последние представляют особый интерес [7], поскольку их формирование отличается простотой и осуществляется непосредственно перед проведением электрофоретических анализов, при этом в ряде случаев не требуется присутствие

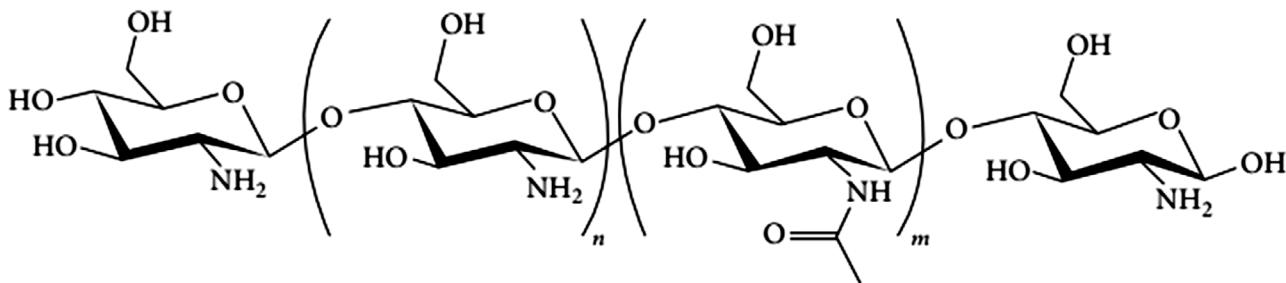
модификатора в составе фонового электролита (ФЭ) для обеспечения стабильности покрытия. Востребованными материалами для формирования подобных покрытий в настоящее время являются катионные полимеры [8–13], способствующие формированию стабильных покрытий, обращению электроосмотического потока (ЭОП) и значительному сокращению времени миграции анионных анализаторов. Такие покрытия совместимы с масс-спектрометрическим детектированием [14–16].

Хитозан представляет собой деацетилированную форму хитина (схема 1), одного из наиболее распространенных природных биополимеров, обладает высокой адсорбционной способностью и адгезией к стенкам кварцевого капилляра [17, 18]. Его физико-химические свойства существенно зависят от степени деацетилирования [19], от распределения ацильных групп и молекулярной массы. Хитозан

применили в качестве покрытия капилляров при анализе белков [20], однако отмечен узкий рабочий диапазон рН, в котором данные капилляры можно эффективно использовать. Немодифицированный хитозан растворим только в кислых водных растворах за счет протонирования аминогрупп ( $pK_b \sim 6.3$ ) [21], поэтому для разделения биологически активных соединений, в первую очередь в качестве модификаторов поверхности капилляров, используют производные хитозана [22–24], в том числе и в составе полислойных покрытий [25, 26].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Оборудование.** Измерения проводили на приборе для капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ®-105М (Люмэкс®, Россия) со спектрофотометрическим детектированием (действи- тиевая лампа; спектральный диапазон от 190 до 380 нм) с возможностью гидродинамического и электрохимического ввода пробы. Использовали кварцевые капилляры общей длиной 60 см и эффективной длиной 50 см, внутренним диаметром 50 мкм, с внешним по-



**Схема 1.** Структура хитина/хитозана.  $n$  – количество повторяющихся единиц глюкозамина,  $m$  – количество повторяющихся единиц ацетилглюкозамина,  $n + m$  – степень полимеризации,  $n/(n + m)$  – степень деацетилирования. Когда  $n$  превышает 50% от общего количества звеньев, полимер называется хитозаном [17].

Несмотря на некоторые обнаруженные ограничения применения хитозана в КЭ при создании покрытий, его аналитические возможности изучены недостаточно, учитывая, что наличие многочисленных хиральных центров может обеспечить ему функции хирального селектора аналогично другим углеводам [27, 28] при разделении энантиомеров биологически активных соединений. Так, низкомолекулярный водорастворимый хитозан использован в составе ФЭ совместно с (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклоглекстрином [29] и эремомицином [30] для электрофоретического энантиоразделения ряда ароматических кислот и профенов.

Цель настоящего исследования – получение физически адсорбированного покрытия на основе высокомолекулярного хитозана со степенью деацетилирования 95 %, выявление его аналитических возможностей при определении аналитов различной природы, а также сопоставление полученных электрофоретических параметров разделения с покрытием на основе широко используемого катионного полизелектролита поли(диаллилдиметиламмоний хлорида) (ПДАДМАХ) [31–34], активно применяемого при создании многослойных покрытий в КЭ [34–41].

лимидным покрытием. Результаты электрофоретических экспериментов обрабатывали с использованием программного обеспечения Эльфоран (Люмэкс, Россия).

Снимки внутренней поверхности кварцевых капилляров получали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью системы Zeiss Merlin (Германия).

**Средства измерения и дополнительное оборудование:** аналитические весы Shimadzu AUW (Shimadzu, Япония), деионизатор АКВИЛОН Д 301 (Аквилон, Россия), рН-метр HI 2210-2216 (Hanna, Италия), ультразвуковая ванна Сапфир ТТЦ (РМД) (Россия), центрифуга Eppendorf 5430 (Германия), мульти-вортекс V32 (Biosan, Латвия), механические микродозаторы переменного объема емк. 1–20, 20–100 и 100–1000, 500–5000 мкл (Sartorius, Германия)

**Реагенты.** Гидроксид натрия ч. д. а. (Реахим, Россия), соляная кислота ос. ч. (Реахим, Россия), борная кислота ос. ч. (Реахим, Россия), цетилtrimетиламмоний бромид (ЦТАБ) (Sigma-Aldrich, США), метанол для градиентной ВЭЖХ (Химмед, Россия), ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (Химмед, Россия), диметилсульфоксид (Sigma-Aldrich, США), бензойная кислота (БК) ч. д. а. (Sigma-Aldrich, Германия), динатриевая соль этилендиаминететрауксусной

кислоты ( $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ ) (Sigma-Aldrich, США), дигидрофосфат натрия двуводный х. ч. (Реахим, Россия), диэтаноламин (ДЭА) (Biochem, Франция), хлорид натрия (Sigma-Aldrich, США), три(гидроксиметил)аминометан (ТРИС) (Sigma-Aldrich, США), фосфорная кислота х. ч. (Реахим, Россия), уксусная кислота х. ч. (Реахим, Россия), (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклогексстрин ( $\text{ГП-}\beta\text{-ЦД}$ ) с  $M_r = 1396$  (TCI, Япония),  $\beta$ -циклогексстрин ( $\beta\text{-ЦД}$ ) (Sigma-Aldrich, США), ванкомицина гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США).

Модификацию внутренней поверхности кварцевых капилляров осуществляли с использованием ПДАДМАХ с  $M_w = 200\,000$ – $350\,000$ , 20 мас. % в воде (Sigma, США); высокомолекулярного хитозана со степенью деацетилирования 95% (кат. № BD120608) (BLD pharm, Германия).

**Стандарты, использованные для приготовления модельных смесей.** Карбоновые кислоты: щавелевая, муравьиная, винная, яблочная, лимонная, янтарная, молочная, уксусная, пропионовая, масляная х. ч. (Реахим, Россия).

**Аминокислоты** (Sigma-Aldrich, США): L-фенилаланин (**Phe**), >98% ВЭЖХ; D,L-тирозин (**Tyr**), >98% ВЭЖХ; D,L-триптофан (**Trp**), >98% ВЭЖХ; 3,4-дигидроксифенилаланин (**DOPA**), >98% ТСХ.

**Катехоламины** (Sigma-Aldrich, США): дофамина гидрохлорид (**DA**), >97% ВЭЖХ; эpineфрина гидрохлорид (**E**), >98%; норэpineфрина гидрохлорид (**NE**), >97% ВЭЖХ; норметанефрина гидрохлорид (**NMN**), >98%; 3-метокситирамин (**3-MT**), >97%.

**Лекарственные вещества** (Sigma-Aldrich, США): ( $\pm$ )-пропранолола гидрохлорид, >99%; ( $\pm$ )-сotalола гидрохлорид, >98%; ( $\pm$ )-карведилол, >98% ВЭЖХ; ( $\pm$ )-ибупрофен, >99%; ( $\pm$ )-кетопрофен, >98%; S-кетопрофен, >98%; ( $\pm$ )-кеторолак, >98%.

**Приготовление растворов.** Концентрированные растворы карбоновых кислот (10 мг/мл щавелевой, муравьиной, винной, яблочной, лимонной, янтарной, молочной, уксусной, пропионовой, масляной) готовили путем растворения точных навесок в дейонизованной воде в пластиковых пробирках типа Эплендорф емк. 1.5 мл, затем тщательно перемешивали до полного растворения.

Концентрированные растворы аминокислот (10 мг/мл Phe, Tyr, Trp, DOPA), катехоламинов (2 мг/мл DA, E, NE, NMN, 3-MT) и  $\beta$ -блокаторов (2 мг/мл карведилола, пропранолола, сotalола) готовили следующим образом: точные навески вносили в пластиковые пробирки типа Эплендорф емк. 1.5 мл, растворяли в 0.1 М соляной кислоте, перемешивали до полного растворения.

Концентрированные растворы нестериоидных противовоспалительных средств (2 мг/мл ибuproфена, кетопрофена, кеторолака) готовили путем растворения точных навесок в метаноле.

Подготовленные растворы хранили в морозильной камере при  $-20^\circ\text{C}$ .

Рабочие растворы смесей анализов заданной концентрации готовили путем разбавления концентрированных растворов в требуемое количество раз дейонизованной водой. Их хранили в холодильнике при  $+4^\circ\text{C}$  в течение недели.

#### Приготовление растворов модификаторов.

Рабочий раствор хитозана с концентрацией 0.1 мас. % готовили в пластиковой пробирке типа Эплендорф емк. 1.5 мл путем растворения точной навески хитозана в требуемом объеме 1 %-ной уксусной кислоты. Выдерживали в УЗ-бане в течение 5 мин и перемешивали с помощью системы вортекс 3 мин до полного растворения полимера. Приготовленный раствор хитозана оказался достаточно вязким, поэтому его разбавляли в два раза 1 %-ной уксусной кислотой и использовали далее для модификации внутренних стенок кварцевого капилляра.

Рабочий раствор ПДАДМАХ с массовой долей 0.2 мас. % готовили в мерной колбе емк. 5 мл путем разбавления точных навесок следующих компонентов: 0.0500 г 20 %-ного (по массе) раствора ПДАДМАХ, 0.0121 г ТРИС, 0.0434 г NaCl в 0.5 мл 0.1 М HCl. Полученный раствор доводили до метки дейонизованной водой.

**Приготовление растворов фоновых электролитов.** Для исследования зависимости скорости ЭОП на хитозановом покрытии в диапазоне pH 2.0–7.0 ФЭ готовили фосфатные растворы следующим образом: в мерных колбах емк. 50 мл растворяли точные навески дигидрофосфата натрия в 35 мл дейонизованной воды и доводили pH до требуемого значения 1 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$  или 1 М раствором NaOH. Таким образом готовили концентрированные фосфатные растворы следующих концентраций: 0.2 М с pH 2.0; 0.6 М с pH 4.1; 0.5 М с pH 5.6; 0.1 М с pH 7.0. Фоновые электролиты получали путем разбавления концентрированных растворов с заданным значением pH дейонизованной водой в требуемое количество раз так, чтобы значение тока было сопоставимо (32–34 мА). Маркер ЭОП – 0.05% (по объему) диметилсульфоксида (ДМСО).

Электрофоретические подвижности ЭОП ( $\mu_{\text{ЭОП}}$ ) рассчитывали по формуле:

$$\mu = \frac{l_{\text{ЭФФ}} \cdot l_{\text{общ}}}{t_{\text{ЭОП}} \cdot U}, \quad (1)$$

где  $l_{\text{ЭФФ}}$  – длина капилляра до ячейки детектирования, см;  $l_{\text{общ}}$  – общая длина капилляра, см;  $t_{\text{ЭОП}}$  – время миграции ЭОП, с;  $U$  – напряжение, В.

Для разделения карбоновых кислот на непокрытом капилляре использовали ФЭ следующего состава: 10 мМ БК, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДЭА, 0.5 мМ ЦТАБ и 0.2 об. % метанола. На модифицированных капиллярах разделение проводили в ФЭ, содержащем 10 мМ БК, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДЭА и 0.2 об. % метанола [39].

Для разделения аминокислот и катехоламинов использовали 10 мМ фосфатный буферный раствор с pH 2 (доведенный 1 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

Для разделения энантиомеров лекарственных веществ применяли фосфатные буферные растворы с концентрациями 10–50 мМ с pH 2.0, 4.2, 6.4, 7.0, 7.4. или ацетатно-аммиачный буферный раствор с pH 4.3. В состав ФЭ вводили хитозан в концентрации 0.01 мас. %, а также второй хиральный селектор (ГП-β-ЦД, β-ЦД, ванкомицин) в диапазоне концентраций 0.25–5 мМ. Для изменения гидрофобно-гидрофильного баланса в состав ФЭ вводили метанол и ацетонитрил в концентрации 5–20 об. %.

**Условия формирования физически адсорбированных покрытий стенок кварцевого капилляра.** Подготовка капилляра к работе. Новый кварцевый капилляр последовательно промывали ацетонитрилом (10 мин, 1000 мбар), деионизованной водой (10 мин, 1000 мбар), 0.1 М HCl (10 мин, 1000 мбар), деионизованной водой (5 мин, 1000 мбар), 0.5 М раствором NaOH (30 мин, 2000 мбар) и снова деионизованной водой (10 мин, 1000 мбар). Контролировали скорость ЭОП с использованием в качестве ФЭ 10 мМ боратный буферный раствор с pH 9.3 и промывали капилляр в течение 10 мин деионизованной водой.

**Покрытие на основе хитозана.** Капилляр модифицировали по схеме, описанной в работах [20, 22], с некоторыми изменениями: капилляр промывали раствором хитозана в течение 15 мин и оставляли в контакте с ним на 10 мин. Затем промывали деионизованной водой в течение 10 мин. Покрытие стабилизировали в 10 мМ фосфатном растворе (pH 2.0) при напряжении +10 кВ в течение 10 мин. Затем измеряли  $\mu_{\text{ЭОП}}$  в фоновом электролите того же состава при –20 кВ.

**Покрытие на основе ПДАДМАХ.** Капилляр модифицировали согласно разработанной ранее схеме [38]: перед модификацией раствор ПДАДМАХ выдерживали в УЗ-бане в течение 5 мин и перемешивали с помощью системы вортекс 5 мин. Далее подготовленным раствором промывали капилляр в течение 60 мин, затем промывали 10 мин деионизованной водой для удаления излишков полимера. Стабилизацию покрытия и измерение ЭОП проводили в условиях, аналогичных приведенным для хитозана.

**Оценка стабильности покрытий при воздействии различных растворов и органических**

**растворителей.** Модифицированные капилляры последовательно промывали в течение 15 мин различными растворителями в следующей последовательности: ацетонитрил – метанол – ДМСО – 0.1 М раствор NaOH – 0.1 М HCl. Фиксировали время миграции ЭОП до промывки растворителями и после.

Степень изменения ЭОП (%) рассчитывали по формуле:

$$\%_{\text{изменения}} = \frac{t_{\text{ЭОП после}} - t_{\text{ЭОП до}}}{t_{\text{ЭОП до}}} \times 100 \%, \quad (2)$$

где  $t_{\text{ЭОП до}}$  – время миграции ЭОП до обработки, мин; а  $t_{\text{ЭОП после}}$  – время миграции ЭОП после обработки соответствующим растворителем, мин.

**Условия проведения электрофоретических экспериментов.** Модельные смеси аминокислот, катехоламинов и лекарственных веществ на непокрытом капилляре разделяли при напряжении +20 кВ; на модифицированных капиллярах – при напряжении –20 кВ; разделение смеси карбоновых кислот также при напряжении –20 кВ. Температура терmostатирования – 20°C; длина волны детектирования для всех анализаторов – 230 нм; время гидродинамического ввода пробы варьировали в диапазоне 2–50 с; давление ввода пробы – 30–100 мбар.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из структуры хитозана, модификация поверхности капилляра при разделении анализаторов в условиях КЭ могла бы обеспечить следующие эффекты:

– за счет протонирования аминогрупп в кислой среде и высокой молекулярной массы молекулы хитозана сформированное покрытие на поверхности капилляра должно генерировать обращенный (анодный) ЭОП, что, в свою очередь, предотвращает сорбцию основных анализаторов и способствует росту эффективности разделения;

– наличие множества функциональных групп (амино- и гидрокси-) в составе хитозана может способствовать увеличению селективности разделения определяемых соединений посредством различных взаимодействий с анализаторами;

– хитозан, в составе молекулы которого имеется много хиральных центров, может выступить в качестве хирального селектора при разделении энантиомеров лекарственных веществ.

На основании перечисленных выше ожидаемых эффектов исследование аналитических характеристик монослойного хитозанового покрытия и сопоставление с покрытием на основе ПДАДМАХ включало несколько этапов:

– построение зависимости ЭОП от pH фонового электролита и контроль стабильности

сформированных покрытий при обработке различными растворами и органическими растворителями;

— сопоставление эффективности и селективности разделения основных и кислотных анализов на сформированных покрытиях;

— выявление возможностей хитозана в качестве хирального селектора, в том числе и в составе двойных хиральных систем (расширение хирального окна) при разделении энантиомеров лекарственных веществ.

**Зависимости ЭОП от pH на сформированных покрытиях на основе хитозана и контроль их стабильности.** Формирование покрытия на основе катионного полиэлектролита должно сопровождаться изменением поверхностного заряда кварцевого капилляра и, следовательно, величины и направления электроосмотического потока (на немодифицированном капилляре регистрируется катодный ЭОП). На величину ЭОП влияют плотность покрытия и pH фонового электролита, а воспроизводимость ЭОП от анализа к анализу в ФЭ, не содержащим модификатор, является показателем стабильности покрытия. На капиллярах, модифицированных хитозаном, выявили зависимость скорости ЭОП от pH фонового электролита (рис. 1): при увеличении pH скорость ЭОП уменьшается. Поскольку хитозан при pH > 6 ( $pK_b \sim 6.3$ ) не может обеспечить отрицательный заряд, то наличие нормального (катодного) ЭОП при pH 7 достигается благодаря диссоциации остаточных сианольных групп на поверхности капилляра.

А на покрытии на основе ПДАДМАХ изменение заряда поверхности капилляра в диапазоне pH от 2 до 10 не наблюдается вовсе, что указывает на формирование плотного слоя модификатора, максимально экранирующего сианольные группы поверхности капилляра [39].

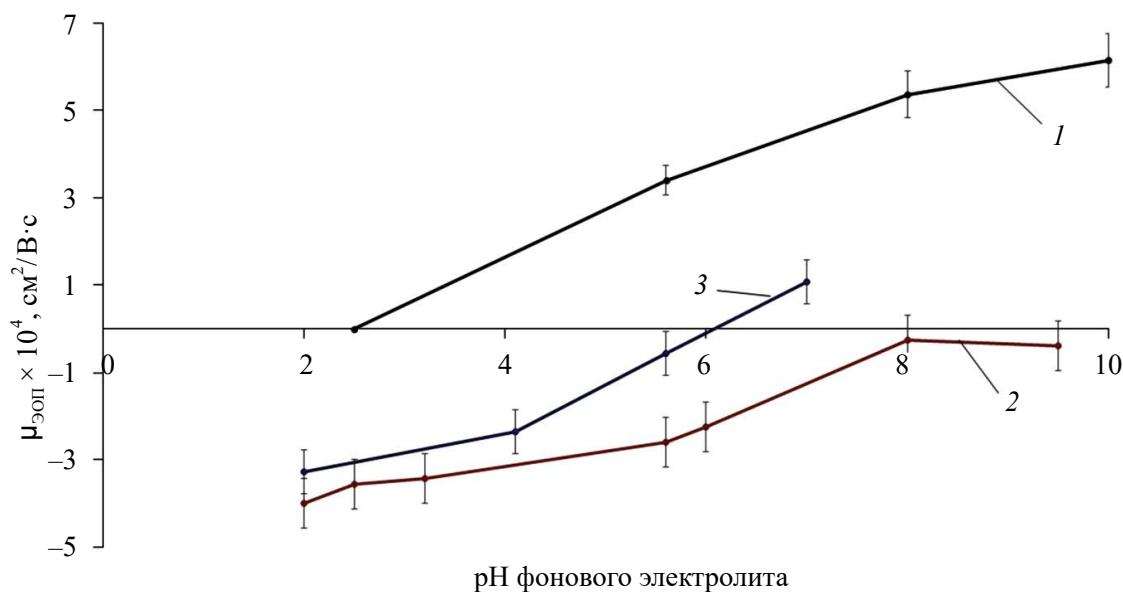
Наличие слоя хитозана после модификации независимо подтвердили методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 2). Установили, что толщина покрытия составляет 45–70 нм (рис. 2б), а покрытия на основе ПДАДМАХ – 15–20 нм (рис. 2в).

Оценили стабильность покрытий в течение дня ( $n = 10$ ), при длительном использовании и при воздействии различных органических растворителей. В качестве критерия использовали относительное стандартное отклонение ( $s_r$ ) времени миграции и степень изменения ЭОП. Ниже приведены значения  $s_r$  (%) времен миграций ЭОП на покрытиях на основе хитозана и ПДАДМАХ ( $P = 0.95$ ):

Хитозан	$n = 10; 1.9\%$	$n = 47; 7.6\%$	$n = 8; 4.3\%*$
ПДАДМАХ	$n = 10; 0.29\%$	$n = 53; 1.5\%$ [39]	$n = 6; 3.8\%$ [39]*

\* $s_r$  от капилляра к капилляру.

В табл. 1 приведены значения степени изменения ЭОП на покрытиях на основе хитозана и ПДАДМАХ. Изменение скорости ЭОП



**Рис. 1.** Зависимости электрофоретической подвижности ЭОП ( $\mu_{\text{ЭОП}}$ ) от pH фонового электролита: 1 – непокрытый капилляр; 2 – капилляр, модифицированный ПДАДМАХ [39]; 3 – капилляр с покрытием на основе хитозана.

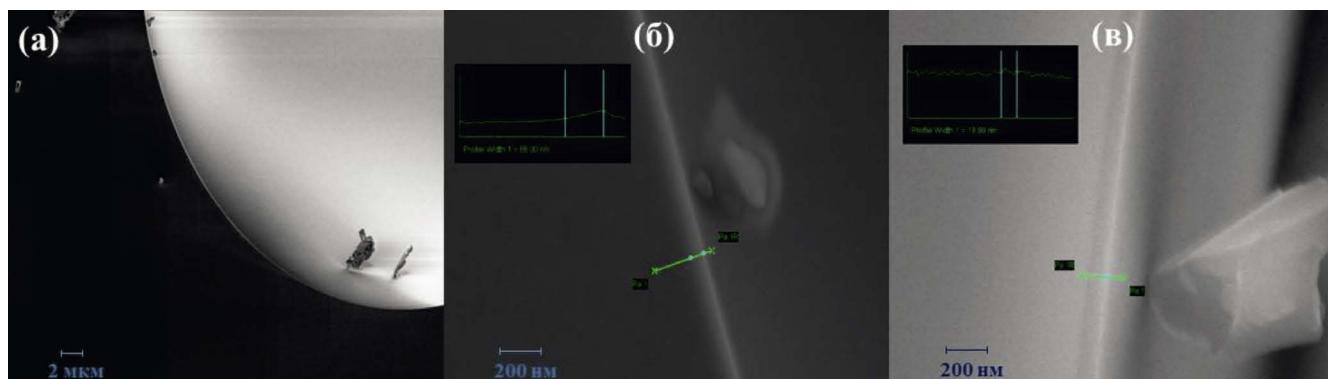


Рис. 2. СЭМ-снимки поперечного среза капилляра с покрытием (а), (б) на основе хитозана и (в) ПДАДМАХ, полученные при различном увеличении с масштабной риской: (а) 2 мкм; (б), (в) 200 нм. Прибор: Zeiss Merlin, изображение во вторичных электронах.

**Таблица 1.** Значения степени изменения электроосмотического потока на покрытиях на основе хитозана и ПДАДМАХ

Растворитель	Хитозан			ПДАДМАХ		
	$t_{\text{ЭОП до}}$ , мин	$t_{\text{ЭОП после}}$ , мин	изменение, %	$t_{\text{ЭОП до}}$ , мин	$t_{\text{ЭОП после}}$ , мин	изменение, %
Ацетонитрил	6.78	6.77	-0.2	7.00	7.05	0.7
Метанол	6.77	6.80	0.4	7.05	6.99	-0.9
ДМСО	6.80	6.86	0.9	6.99	6.39	-8.6
1 М раствор NaOH	6.86	6.89	0.5	6.39	6.65	4.1
0.1 М HCl	6.89	7.03	2.1	6.65	6.63	-0.4

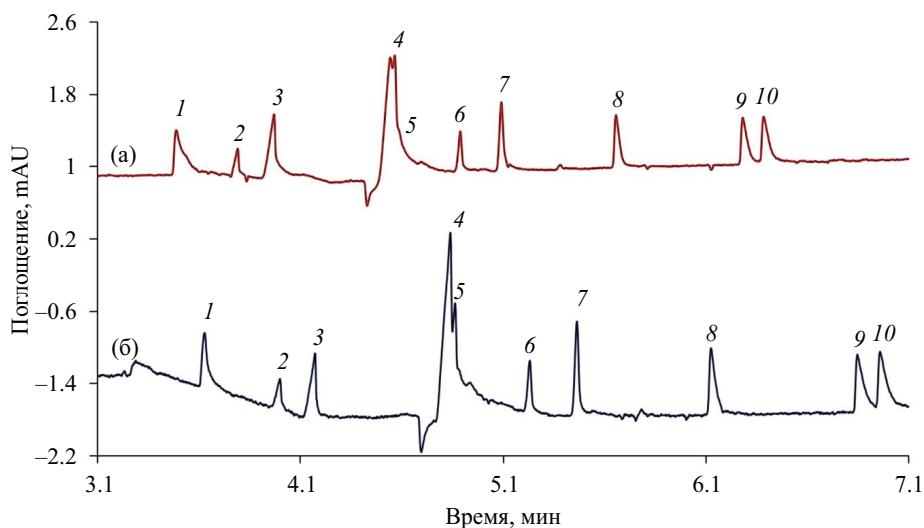
может свидетельствовать как о разрушении покрытия, так и в случае полимерных модификаторов об изменении конформации или толщины слоя полимера на стенках капилляра. Следует отметить, что оба покрытия являются достаточно стабильными, поскольку времена миграции ЭОП практически не меняются при длительном использовании (табл. 1). Установили, что покрытие на основе хитозана является более устойчивым по отношению к действию различных растворителей и позволяет проводить анализы в фоновых электролитах с их высоким содержанием, что важно при контроле гидрофильно-гидрофобного баланса в системе.

**Применение сформированных монослойных покрытий для разделения органических кислот, аминокислот и катехоламинов.** Ранее [39] испытаны физически адсорбированные покрытия на основе ПДАДМАХ при разделении органических кислот, поэтому на примере этих анализаторов в первую очередь исследовали аналитические возможности покрытия на основе хитозана.

При разделении органических кислот эффективность на двух разных покрытиях сопоставима (рис. 3, табл. 2), в то время как разрешение  $R_s$  анализаторов на хитозановом покрытии примерно в два раза выше, чем на ПДАДМАХ. Такой эффект может наблюдаться из-за того, что при одинаковом значении pH генерируемый хитозаном ЭОП слабее: времена миграции органических кислот увеличиваются и селективность разделения растет. По значениям пределов обнаружения (ПО) кислот покрытие на основе хитозана незначительно уступает ПДАДМАХ (табл. 2).

Определение яблочной (малат) и лимонной (цитрат) кислот на сформированных покрытиях затруднено наложением системного пика.

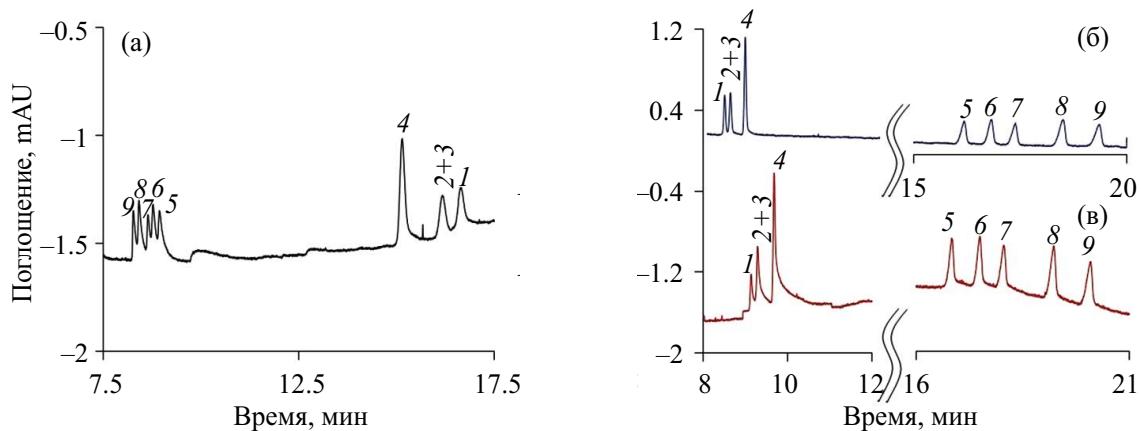
Эффективность экранирования остаточных силианольных групп на поверхности капилляра можно оценить при разделении основных анализаторов в кислой среде. Так, при pH 2 фонового электролита на немодифицированном капилляре для катехоламинов и аминокислот значения эффективности и селективности разделения существенно ниже, чем полученные на обоих сформированных покрытиях (рис. 4, табл. 3).



**Рис. 3.** Электрофорограммы модельной смеси органических кислот: (а) капилляр, модифицированный ПДАДМАХ; (б) капилляр, модифицированный хитозаном. Фоновый электролит: 10 мМ бензойная кислота, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДЭА. Модельная смесь карбоновых кислот 25 мкг/мл: 1 – щавелевая, 2 – муравьиная, 3 – винная, 4 – лимонная, 5 – яблочная, 6 – молочная, 7 – янтарная, 8 – уксусная, 9 – пропионовая, 10 – масляная.

**Таблица 2.** Значения эффективности ( $N$ ), разрешения ( $R_s$ ) и пределов обнаружения карбоновых кислот, достигнутых на исследуемых покрытиях

Аналит	$N$ , тыс. т. т.		$R_s$		ПО, мкг/мл	
	ПДАДМАХ	хитозан	ПДАДМАХ	хитозан	ПДАДМАХ	хитозан
Щавелевая	117	42	2.5	6.1	0.74	0.96
Муравьиная	163	236	1.9	4.4	1.27	1.50
Винная	205	97	–	–	0.82	0.63
Молочная	450	477	2.6	6.8	0.79	1.02
Янтарная	492	427	7.8	16.0	0.43	0.60
Уксусная	231	325	7.2	13.4	0.61	0.77
Пропионовая	193	218	0.9	1.9	0.72	0.88
Масляная	182	225	–	–	0.74	0.91



**Рис. 4.** Электрофорограммы модельной смеси аминокислот и катехоламинов (50 мкг/мл): (а) немодифицированный капилляр; (б) капилляр, модифицированный хитозаном; (в) капилляр, модифицированный ПДАДМАХ. Фоновый электролит: 10 мМ фосфатный буферный раствор с pH 2.0. Аналиты: 1 – DOPA, 2 – Туг, 3 – Phe, 4 – Trp, 5 – E, 6 – NMN, 7 – NE, 8 – 3-MT, 9 – DA.

**Таблица 3.** Значения эффективности ( $N$ ) и разрешения ( $R_s$ ) аминокислот и катехоламинов, достигнутые на различных капиллярах

Аналит	$N$ , тыс. т. т.			$R_s$		
	немодифицированный	ПДАДМАХ	хитозан	немодифицированный	ПДАДМАХ	хитозан
DOPA	63	228	193	1.7	0.8	0.9
Tyr + Phe	53	140	162	4.0	1.3	2.1
Trp	68	183	187	33.2	22.4	30.2
E	64	138	95	1.4	2.1	2.0
NMN	96	126	98	1.2	2.1	1.8
NE	115	134	113	2.1	3.9	3.5
3-MT	80	148	84	1.2	2.7	2.5
DA	85	114	85	—	—	—

Как и следовало ожидать, покрытие на основе ПДАДМАХ (рис. 4в), содержащее в структуре аммонийные катионы, обеспечило эффективность примерно в 1.5 раза выше, чем хитозановое покрытие с протонированными аминогруппами (рис. 4б).

Таким образом, покрытие на основе хитозана при разделении аминокислот, катехоламинов и органических кислот незначительно уступает в эффективности, при этом разрешение, как правило, выше по сравнению с покрытием на основе ПДАДМАХ. Это указывает на дополнительные взаимодействия между анализаторами и поверхностью модифицированного хитозаном капилляра, которые приводят к увеличению селективности разделения.

**Возможности хитозана в качестве хирально-го селектора.** В отличие от ПДАДМАХ, хитозан обладает множеством хиральных центров и может выступать в качестве хирального селектора. Серия экспериментов включала выявление возможностей энантиомерного разделения:

- на модифицированных хитозаном капиллярах;
- с использованием хитозана в составе ФЭ;
- применение физически адсорбированных покрытий на основе хитозана в сочетании с другим хиральным селектором в фоновом электролите (двойные хиральные системы).

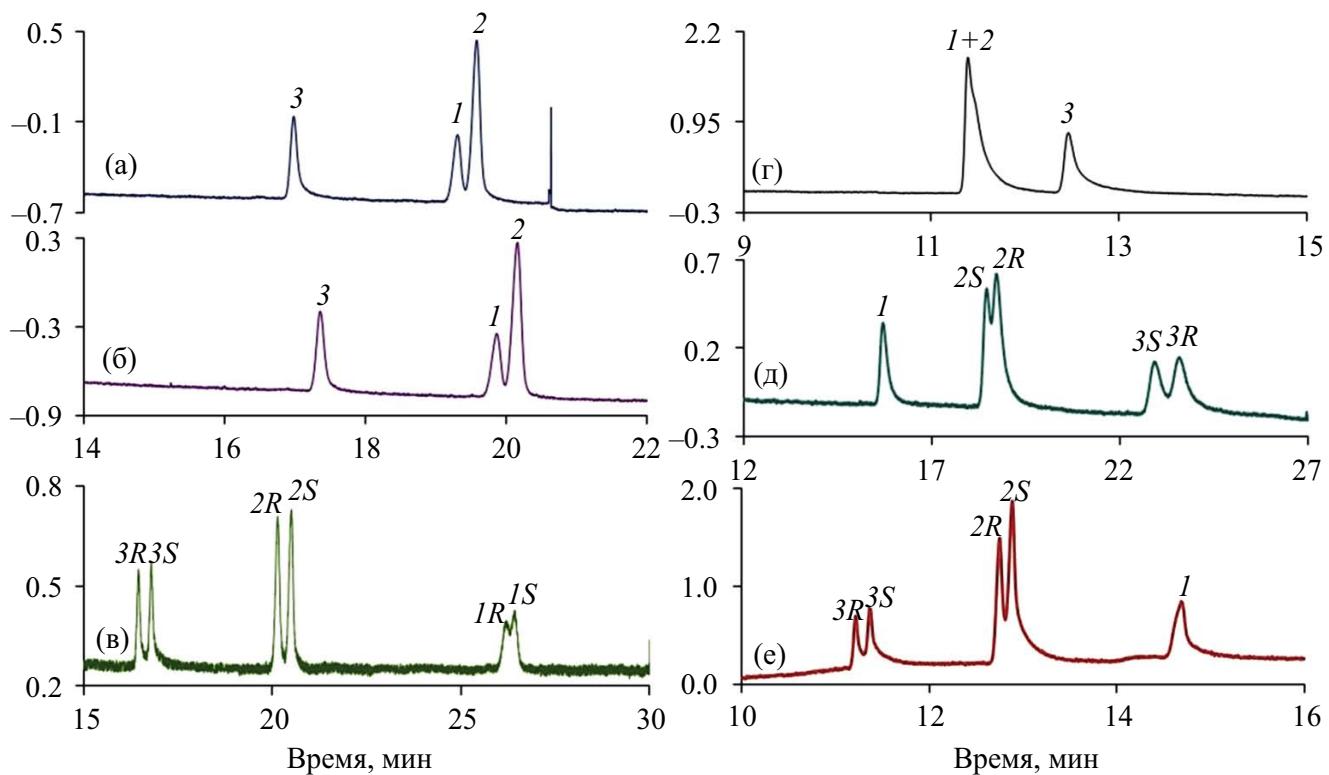
В качестве анализаторов выбрали рацематы лекарственных веществ:  $\beta$ -блокаторы (пропранолол, сotalол и карведилол) и нестериоидные противовоспалительные средства (кетопрофен и кеторолак, ибупрофен).

Выбор рН ФЭ является важнейшей задачей при разделении энантиомеров биологически

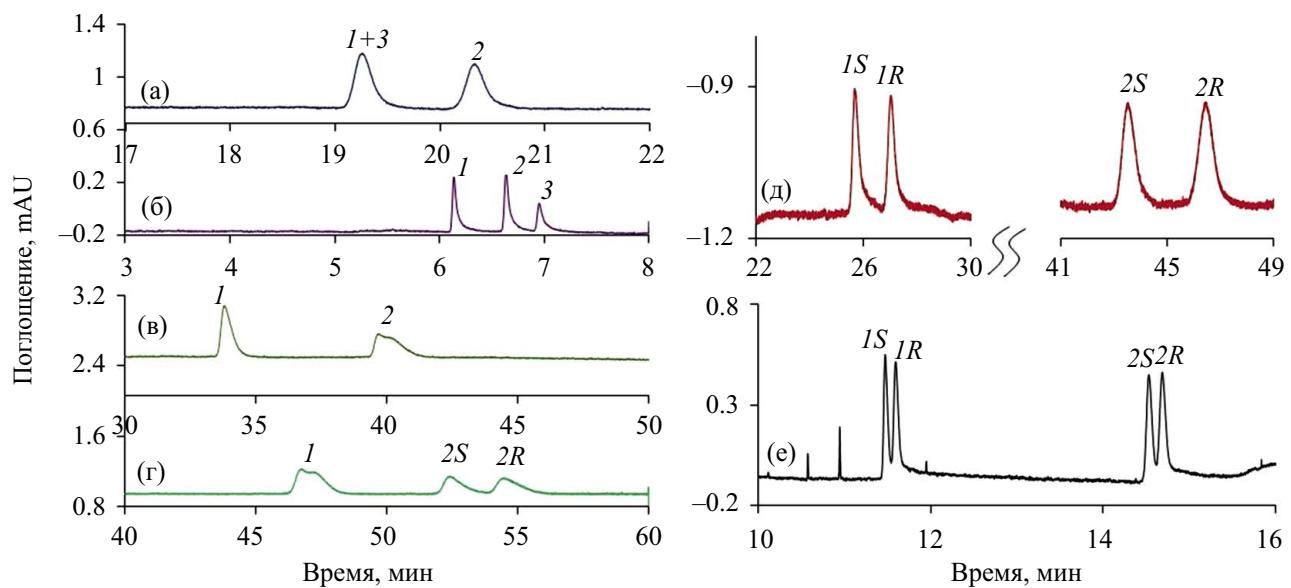
активных веществ. При  $\text{pH} < 6$  покрытие на основе хитозана заряжено положительно,  $\beta$ -блокаторы также находятся в катионной форме, следовательно, взаимодействие с хиральными центрами ограничено электростатическим отталкиванием. В случае кислотных анализаторов — профенов, наоборот, может наблюдаться сильная сорбция на поверхности модифицированного капилляра. По этой причине поиск условий хирального разделения проводили в ФЭ со значением  $\text{pH}$ , близким к нейтральному. В этом случае, как показано выше, наблюдается слабый катодный ЭОП и анализаторы мигрируют практически за счет собственных электрофоретических подвижностей.

На капиллярах, модифицированных хитозаном, в указанных условиях не достигнуто разделение энантиомеров  $\beta$ -блокаторов и профенов, поэтому для увеличения количества активных центров хитозан независимо вводили в состав фонового электролита с различным  $\text{pH}$  (0.01 мас. %). При этом селективность разделения кеторолака и ибупрофена ( $\text{pH} 6.4$ ) возросла, однако наличие хитозана в ФЭ не привело к разделению энантиомеров этих соединений (рис. 5б, 6б).

Последний этап исследования включал изучение покрытий на основе хитозана в двойных хиральных системах с участием ГП- $\beta$ -ЦД,  $\beta$ -ЦД и ванкомицина в составе ФЭ. При разделении  $\beta$ -блокаторов в качестве второго хирального селектора использовали ГП- $\beta$ -ЦД [42–44], который вводили в состав ФЭ. На немодифицированном капилляре с ГП- $\beta$ -ЦД в ФЭ наблюдается частичное разделение энантиомеров пропранолола и карведилола, и полностью отсутствует



**Рис. 5.** Электрофорограммы модельной смеси  $\beta$ -блокаторов на различных капиллярах: (а)–(в) капилляр, модифицированный хитозаном; (г), (д) немодифицированный капилляр; (е) капилляр с покрытием на основе ПДАД-MAX. Фоновый электролит: (а), (г) 25 мМ фосфатный буферный раствор (ФБР) с pH 2.0; (б) 25 мМ ФБР с pH 2.0, 0.01 мас. % хитозана; (в), (д), (е) 25 мМ ФБР с pH 2.0, 5 мМ ГП- $\beta$ -ЦД. Аналиты: 1 – сotalол, 2 – пропранолол, 3 – карведилол.



**Рис. 6.** Электрофорограммы модельной смеси нестероидных противовоспалительных средств (25 мкг/мл). Капель-105М; капилляр, модифицированный хитозаном. Фоновый электролит: (а) 25 мМ фосфатный буферный раствор (ФБР) с pH 6.4; (б) 25 мМ ФБР с pH 6.4, 0.01 мас. % хитозана; (в) 25 мМ ФБР с pH 6.4, 0.5 мМ ГП- $\beta$ -ЦД; (г) 25 мМ ФБР с pH 6.4, 0.5 мМ  $\beta$ -ЦД; (д) 25 мМ ФБР с pH 4.2, 2.5 мМ ванкомицин, 10 об. % метанола; (е) немодифицированный капилляр, 25 мМ ФБР с pH 4.2, 2.5 мМ ванкомицин, 10 об. % метанола. Аналиты: 1 – кеторолак, 2 – кетопрофен, 3 – ибупрофен.

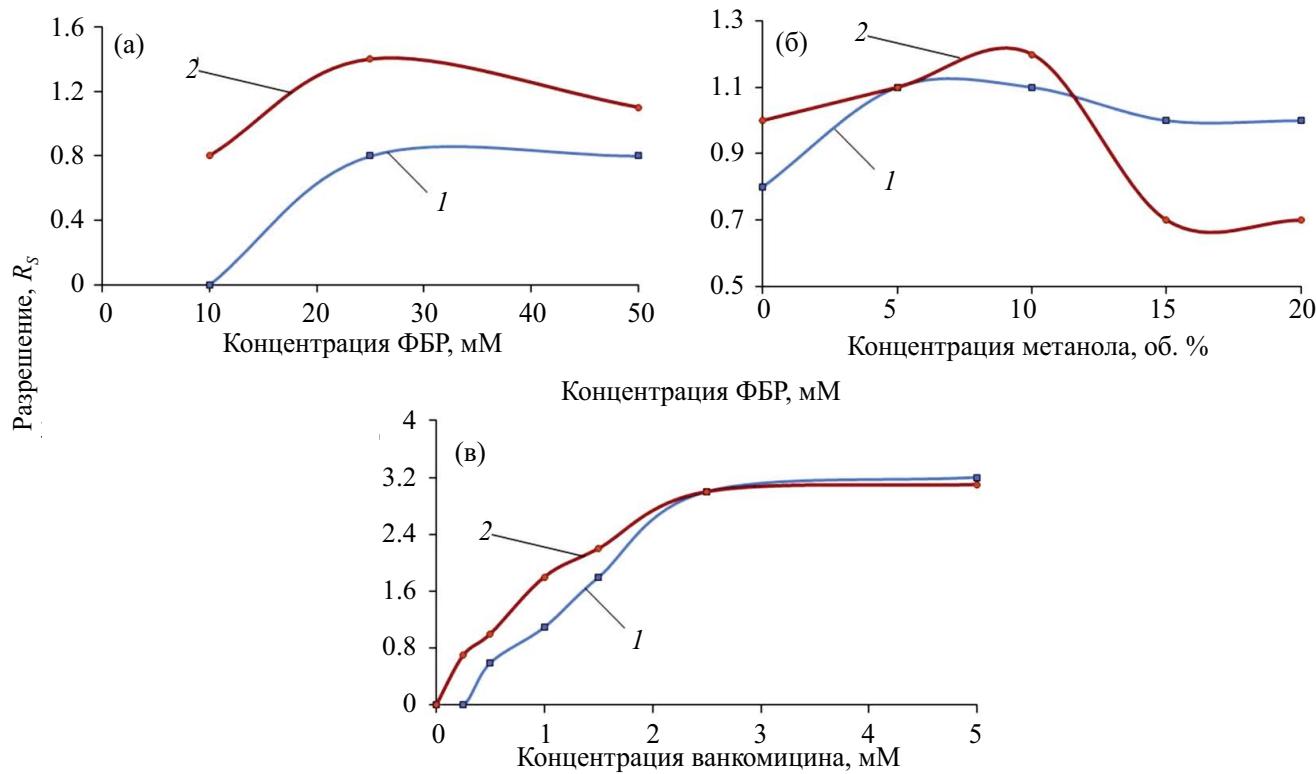
разделение энантиомеров сotalола (рис. 5д). Поскольку ПДАДМАХ и хитозан генерируют обращенный ЭОП, происходит изменение порядка миграции энантиомеров, что является большим преимуществом при определении примесей менее активных R-изомеров на фоне высоких концентраций S-изомера. Установили, что хитозан в составе двойной хиральной системы обеспечивает наибольшие значения селективности разделения энантиомеров пропранолола ( $\alpha = 1.04$ ) и карведилола ( $\alpha = 1.05$ ). При этом наблюдалось также частичное разделение энантиомеров сotalола ( $\alpha = 1.02$ ), которое не достигалось в других вариантах: на немодифицированном капилляре и на капилляре, покрытом ПДАДМАХ (рис. 5). Энантиомеры идентифицировали методом стандартной добавки.

При разделении энантиомеров нестериоидных противовоспалительных средств в качестве второго хирального селектора ранее [45] выявлены возможности  $\beta$ -ЦД, ГП- $\beta$ -ЦД и ванкомицина, наиболее часто используемых для данной цели. Нами установлено, что при pH 6.4 фонового электролита наблюдается разделение энантиомеров кетопрофена в присутствии  $\beta$ -ЦД (рис. 6).  $\beta$ -ЦД из выбранных хиральных селекторов наиболее гидрофобен, поэтому с его участием образуются более прочные

комpleксы – аналит-хиральный селектор, что приводит к разделению энантиомеров кетопрофена.

Ванкомицин благодаря наличию в его структуре как амино-, так и карбоксильных групп может использоваться в виде незаряженного или заряженного хирального селектора в зависимости от значения pH фонового электролита. По этой причине разделение энантиомеров профенов независимо проводили также при pH ~ 4. Когда покрытие на основе хитозана заряжено положительно, ванкомицин также имеет положительный заряд, в результате возможны конкурентные взаимодействия с отрицательно заряженными аналитами ( $pK_a \sim 3.5$ –3.8). В эксперименте варьировали природу ФЭ (ацетатно-аммиачный буферный раствор с pH 4.3; фосфатный буферный раствор с pH 4.2), его концентрацию (10–50 мМ), а также добавку в ФЭ органических растворителей (ацетонитрил, метанол; 5–20 об. %).

Проведенные электрофоретические эксперименты показали, что в фосфатном буферном растворе происходит частичное разделение энантиомеров кеторолака, в то время как в ацетатно-аммиачном буферном растворе они мигрируют совместно. Построили графические зависимости разрешения энантиомеров профенов от состава фонового электролита (рис. 7).



**Рис. 7.** Зависимости разрешения ( $R_s$ ) энантиомеров (1) кеторолака и (2) кетопрофена от состава фонового электролита. Условия: капилляр, модифицированный хитозаном; фоновый электролит: (а) 10–25 мМ ФБР с pH 4.2, 1 мМ ванкомицин; (б) 25 мМ ФБР с pH 4.2, 1 мМ ванкомицин, 0–20 об. % метанола; (в) 25 мМ ФБР с pH 4.2, 0–5 мМ ванкомицин, 10 об. % метанола. Аналиты: 1 – кеторолак, 2 – кетопрофен.

Селективность разделения энантиомеров аналитов увеличивается при повышении концентрации буферного раствора и содержания ванкомицина в ФЭ. Такая зависимость обусловлена снижением скорости ЭОПа в первом случае и увеличением количества хиральных центров для дискриминации энантиомеров – во втором. Среди испытанных органических растворителей в составе ФЭ метанол в большей степени влияет на электрофоретические параметры миграции энантиомеров, а максимальные значения эффективности и селективности разделения достигнуты при его концентрации в ФЭ 10 об. %. Наибольшее разрешение энантиомеров кетопрофена ( $R_s = 3.0$ ) и кеторолака ( $R_s = 3.0$ ) наблюдалось в следующих условиях: 25 мМ фосфатный буферный раствор с pH 4.2, 2.5 мМ ванкомицина, 10 об. % метанола (рис. 6д).

Для выявления роли покрытия на основе хитозана при хиральном разделении энантиомеров нестериоидных противовоспалительных средств сопоставили миграционные характеристики анализаторов, полученные на покрытом хитозаном капилляре и немодифицированном капилляре, с использованием ванкомицина в составе ФЭ. Установили, что ванкомицин в последнем случае обеспечивает в аналогичных условиях разделение энантиомеров кеторолака и кетопрофена с разрешением 1.3 и 1.4 соответственно (рис. 6д).

\*\*\*

Таким образом, хитозан образует равномерное стабильное покрытие на поверхности кварцевого капилляра. При разделении аминокислот, катехоламинов и органических кислот сформированные покрытия на основе хитозана незначительно уступают в эффективности покрытиям из ПДАДМАХ, но обеспечивают более высокое разрешение исследуемых биологически активных анализаторов. Хитозан вносит значительный вклад в разделение энантиомеров лекарственных веществ (профенов и  $\beta$ -блокаторов) в присутствии в составе фонового электролита второго хирального селектора (ванкомицина и ГП- $\beta$ -ЦД соответственно).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 24-13-00378 (электрофоретические эксперименты), и Санкт-Петербургского государственного университета, НИР № 122040800256-8 (формирование и характеристизация физически адсорбированных покрытий внутренних стенок кварцевого капилляра). Эксперименты проведены с использованием инфраструктуры Санкт-Петербургского государственного

университета (кафедра органической химии, лаборатория плазмонно-усиленной спектроскопии и биоимиджинга, ресурсный центр по направлению “Нанотехнологии”). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карцова Л.А., Макеева Д.В., Бессонова Е.А. Современное состояние метода капиллярного электрофореза // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 12. № 75. С. 1059.  
<https://doi.org/10.31857/S0044450220120087>  
(Kartsova L.A., Makeeva D.V., Bessonova E.A. Current status of capillary electrophoresis // J. Anal. Chem. 2020. V. 12. № 75. P. 1497.  
[https://doi.org/10.1134/S1061934820120084\)](https://doi.org/10.1134/S1061934820120084)
2. Voeten R.L. C., Venturi I.K., Haselberg R., Sommen G.W. Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances // Anal. Chem. 2018. V. 90. № 3. P. 1464.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00015>
3. Gao Z., Zhong W. Recent (2018–2020) development in capillary electrophoresis // Anal. Bioanal. Chem. 2022. V. 414. № 1. P. 115.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03290-y>
4. Hajba L., Guttman A. Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins // TrAC, Trends Anal. Chem. 2017. V. 90. P. 38.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.02.013>
5. Карцова Л.А., Кравченко А.В., Колобова Е.А. Ко-валентные покрытия кварцевых капилляров для электрофоретического определения биологически активных анализаторов // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 8. С. 563.  
<https://doi.org/10.31857/S0044450221090061>  
(Kartsova L.A., Kravchenko A.V., Kolobova E.A. Co-valent coatings of quartz capillaries for the electro- phoretic determination of biologically active analytes // J. Anal. Chem. 2019. V. 74. № 8. P. 729.  
[https://doi.org/10.1134/S1061934819080100\)](https://doi.org/10.1134/S1061934819080100)
6. Znaleziona J., Petr J., Knob R. Dynamic coating agents in CE // Chromatographia. 2008. V. 67. P. 5.  
<https://doi.org/10.1365/s10337-007-0509-y>
7. Robb C.S. Applications of physically adsorbed polymer coatings in capillary electrophoresis // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2007. V. 30. № 5–7. P. 729.  
<https://doi.org/10.1080/10826070701191029>
8. Guo X.F., Guo X.M., Wang H., Zhang H.S. One step physically adsorbed coating of silica capillary with excellent stability for the separation of basic proteins

- by capillary zone electrophoresis // *Talanta*. 2015. V. 144. P. 110. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.080>
9. *McGettrick J.R., Palmer C.P.* Evaluation of poly([2-(acryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride) cationic polymer capillary coating for capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography separations // *J. Sep. Sci.* 2017. V. 40. № 20. P. 4060. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700461>
10. *Duša F., Witos J., Karjalainen E., Viitala T., Tenhunen H., Wiedmer S.K.* Novel cationic polyelectrolyte coatings for capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2016. V. 37. № 2. P. 363. <https://doi.org/10.1002/elps.201500275>
11. *Sola L., Chiari M.* Tuning capillary surface properties by charged polymeric coatings // *J. Chromatogr. A*. 2015. V. 1414. P. 173. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.032>
12. *Zandkarimi M., Shafaati A., Foroutan S.M., Lucy C.A.* Improvement of electrophoretic enantioseparation of amlodipine by polybrene // *Iran. J. Pharm. Res.* 2012. V. 11. № 1. P. 129.
13. *Pei L., Lucy C.A.* Insight into the stability of poly(diallydimethylammoniumchloride) and polybrene poly cationic coatings in capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1365. P. 226. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.013>
14. *Ullsten S., Zuberovic A., Bergquist J.* Adsorbed cationic polymer coatings for enhanced capillary electrophoresis/mass spectrometry of proteins // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 384. P. 631. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-376-9\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-376-9_25)
15. *Huhn C., Ramautar R., Wuhrer M., Somsen G.W.* Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 396. № 1. P. 297. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3193-y>
16. *Pattky M., Barkovits K., Marcus K., Weiergräber O.H., Huhn C.* Statically adsorbed coatings for high separation efficiency and resolution in CE-MS peptide analysis: Strategies and implementation // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1483. P. 53. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6403-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6403-1_4)
17. *Ribeiro J.C. V., Vieira R.S., Melo I.M., Araújo V.M. A., Lima V.* Versatility of chitosan-based biomaterials and their use as scaffolds for tissue regeneration // *Sci. World J.* 2017. V. 2017. Article 8639898. <https://doi.org/10.1155/2017/8639898>
18. *Sahariah P., Måsson M.* Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure-activity relationship // *Biomacromolecules*. 2017. V. 18. № 11. P. 3846. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01058>
19. *Thevarajah J.J., Van Leeuwen M. P., Cottet H., Castignolles P., Gaborieau M.* Determination of the distributions of degrees of acetylation of chitosan // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. V. 95. P. 40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.056>
20. *Yao Y.J., Li S.F. Y.* Capillary zone electrophoresis of basic proteins with chitosan as a capillary modifier // *J. Chromatogr. A*. 1994. V. 663. № 1. P. 97. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80500-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80500-8)
21. *Kumar M.N., Muzzarelli R.A., Muzzarelli C., Sashaw H., Domb A.J.* Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives // *Chem. Rev.* 2004. V. 104. № 12. P. 6017. <https://doi.org/10.1021/cr030441b>
22. *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. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.10.015>
23. *Jia Y., Cao J., Zhou J., Zhou P.* Methyl chitosan coating for glycoform analysis of glycoproteins by capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2020. V. 41. № 9. P. 729. <https://doi.org/10.1002/elps.201900333>
24. *Porpiglia N.M., Tagliaro I., Pellegrini B., Alessi A., Tagliaro F., Russo L. et al.* Chitosan derivatives as dynamic coatings for transferrin glycoform separation in capillary electrophoresis // *Int. J. Biol. Macromol.* 2024. V. 254. Article 127888. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127888>
25. *Vitali L., Della Betta F., Costa A.C., Vaz F.A., Oliveira M.A., Vistuba J.P. et al.* New multilayer coating using quaternary ammonium chitosan and  $\alpha$ -carrageenan in capillary electrophoresis: Application in fast analysis of betaine and methionine // *Talanta*. 2014. V. 123. P. 45. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.047>
26. *Zhou L.P., Chen Y., Hu H., Yu B., Wang G.W., Cong H.L.* Novel diazoxyresin/carboxymethyl chitosan capillary coating for the analysis of proteins by capillary electrophoresis // *Ferroelectrics*. 2018. V. 529. № 1. P. 24. <https://doi.org/10.1080/00150193.2018.1448184>
27. *Nishi H., Kuwahara Y.* Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing noncyclic mono-, oligo- and polysaccharides as chiral selectors // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2001. V. 48. № 2. P. 89. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(01\)00142-7](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(01)00142-7)
28. *Yu R.B., Quirino J.P.* Chiral selectors in capillary electrophoresis: Trends during 2017–2018 // *Molecules*. 2019. V. 24. № 6. Article 1135. <https://doi.org/10.3390/molecules24061135>
29. *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. № 3. С. 177–181. (Budanova N., Shapovalova E., Shpigin O. Study of possible application of chitosan in capillary electrophoresis // *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2006. V. 61. P. 20.)
30. *Prokhorova A.F., Kuznetsov M.A., Shapovalova A.N., Staroverov S.M., Shpigin O.A.* Enantioseparations of aromatic carboxylic acid by capillary

- electrophoresis using eremomycin as a chiral selector in a chitosan-modified capillary // Procedia Chem. 2010. V. 2. P. 9.  
<https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.12.004>
31. Liu Q., Lin F., Hartwick R.A. Poly(diallyldimethylammonium chloride) as a cationic coating for capillary electrophoresis // J. Chromatogr. Sci. 1997. V. 35. № 3. P. 126.  
<https://doi.org/10.1093/chromsci/35.3.126>
32. Tseng W.L., Chen S.M., Hsu C.Y., Hsieh M.M. Online concentration and separation of indolamines, catecholamines, and metanephrines in capillary electrophoresis using high concentration of poly(diallyldimethylammonium chloride) // Anal. Chim. Acta. 2008. V. 613. № 1. P. 108.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.049>
33. Szabó Z.I., Benkő B.M., Bartalis-Fábián Á., Iványi R., Varga E., Szőcs L., Tóth G. Chiral separation of Apremilast by capillary electrophoresis using succinyl- $\beta$ -cyclodextrin—reversal of enantiomer elution order by cationic capillary coating // Molecules. 2023. T. 28. № 8. Article 3310.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28083310>
34. Nehmé R., Perrin C., Cottet H., Blanchin M.D., Fabre H. Stability of capillaries coated with highly charged polyelectrolyte monolayers and multilayers under various analytical conditions – Application to protein analysis // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. № 22. P. 3537.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.040>
35. Kamande M.W., Kapnissi C.P., Zhu X., Akbay C., Warner I.M. Open-tubular capillary electrochromatography using a polymeric surfactant coating // Electrophoresis. 2003. V. 24. № 6. P. 945.  
<https://doi.org/10.1002/elps.200390137>
36. Qu Q., Liu D., Mangelings D., Yang C., Hu X. Permanent gold nanoparticle coatings on polyelectrolyte multilayer modified capillaries for open-tubular capillary electrochromatography // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 42. P. 6588.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.057>
37. Neiman B., Grushka E., Lev O. Use of gold nanoparticles to enhance capillary electrophoresis // Anal. Chem. 2001. V. 73. № 21. P. 5220.  
<https://doi.org/10.1021/ac0104375>
38. Dhellelmes L., Leclercq L., Höchsmann A., Neusüß C., Biron J.P., Roca S., Cottet H. Critical parameters for highly efficient and reproducible polyelectrolyte multilayer coatings for protein separation by capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 2023. V. 1695. Article 463912.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463912>
39. Макеева Д.В., Антипова К.С., Соловьева Е.В., Моргачева В.П., Колобова Е.А., Кацова Л.А. Полислойные покрытия на основе стабилизированных цитратом наночастиц золота и полидiallyldimethylammonium хлоридом для электрофоретического разделения карбоновых кислот // Журн. анализ. химии. 2023. Т. 78. № 3. С. 241.  
<https://doi.org/10.31857/S0044450223030088>  
(Makeeva D.V., Antipova K.S., Solovyeva E.V., Morgacheva V.P., Kolobova E.A., Kartsova L.A. Multilayer coatings based on citrate-stabilized gold nanoparticles and polydiallyldimethylammonium chloride for the electrophoretic separation of carboxylic acids // J. Anal. Chem. 2023. V. 78. № 3. P. 241.  
[https://doi.org/1010.1134/S1061934823030085\)](https://doi.org/1010.1134/S1061934823030085)
40. Моргачева В.П., Макеева Д.В., Соловьева Е.В., Колобова Е.А., Кацова Л.А. Новые подходы к формированию покрытий на основе альбумина и наночастиц золота для хирального разделения методом капиллярного электрофореза // Аналитика и контроль. 2023. Т. 27. № 1. С. 21.  
<https://doi.org/1010.15826/analitika.2023.27.1.002>
41. Makeeva D., Morgacheva V., Kolobova E., Solovyeva E., Kartsova L. Multilayer coatings based on gold nanoparticles and polymers with bovine serum albumin as a functional layer for the chiral separation in capillary electrochromatography // J. Sep. Sci. 2024. V. 47. № 2. Article e2300864.  
<https://doi.org/10.1002/jssc.202300864>
42. Pak C., Marriott P.J., Carpenter P.D., Amiet R.G. Enantiomeric separation of propranolol and selected metabolites by using capillary electrophoresis with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as chiral selector // J. Chromatogr. 1998. V. 793. P. 357.  
[https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(97\)00919-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)00919-9)
43. Hancu G., Cărje A., Iuga I., Fülop I., Szabó Z.I. Cyclodextrine screening for the chiral separation of carvedilol by capillary electrophoresis // Iran. J. Pharm. Res. 2015. V. 14. P. 425.
44. Колобова Е.А., Кацова Л.А., Аlopина Е.В., Смирнова Н.А. Разделение энантиомеров тирозина, триптофана и  $\beta$ -блокаторов методом капиллярного электрофореза с участием аминокислотной ионной жидкости 1-бутил-3-метилимидазолий L-пролинат [C<sub>4</sub>MIM][L-PRO] в качестве хирального селектора // Аналитика и контроль. 2018. Т. 22. № 1. С. 51.  
<https://doi.org/1010.15826/analitika.2018.22.1.004>
45. Podar A., Oprean R., Suciu S. Review – Recent enantiomer separation strategies of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by capillary electrophoresis // Farmacia. 2016. V. 64. № 2. P. 159.

# PHYSICALLY ADSORBED COATINGS BASED ON CHITOSAN FOR ELECTROPHORETIC SEPARATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

E. A. Kolobova<sup>a</sup>, \*, E. R. Ziangirova<sup>a</sup>, E. V. Solovyova<sup>a</sup>, L. A. Kartsova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>St. Petersburg State University, Institute of Chemistry

St. Petersburg, Russia

\*E-mail: ekatderyabina@mail.ru

**Abstract.** Coatings of the inner walls of a quartz capillary based on cationic high-molecular chitosan with a deacetylation degree of 95% were formed. The dependence of the electroosmotic flow rate on the pH of the background electrolyte was studied, and the stability of the coating under the influence of various solvents was assessed. The results were compared with another cationic coating based on poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC). It was shown that when separating amino acids, catecholamines, and organic acids, the formed coatings based on chitosan are slightly inferior in efficiency to coatings made of PDADMAC, but provide a higher resolution of the studied biologically active analytes. It was found that chitosan on the inner walls of a quartz capillary promotes an increase in enantioselectivity in the separation of  $\beta$ -blocker enantiomers (carvedilol, propranolol, sotalol) in the presence of (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin in the background electrolyte, as well as non-steroidal anti-inflammatory drugs (ketoprofen and ketorolac) using vancomycin as the second chiral selector.

**Keywords:** capillary electrophoresis, physically adsorbed coatings of quartz capillary walls, chitosan, chiral separation.