

*на правах рукописи*

**Шпак Алексей Витальевич**

**ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ КАК НОВЫЙ ТИП  
ПСЕВДОСТАЦИОНАРНЫХ ФАЗ В МИЦЕЛЛЯРНОЙ  
ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

02.00.02 - Аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук



Москва - 2005

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

***Научный руководитель:***

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник  
Пирогов Андрей Владимирович

***Официальные оппоненты:***

доктор химических наук, профессор Яшин Я.И.  
кандидат химических наук, с.н.с. Ванифатова Н.Г.

***Ведущая организация:***

Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет

Защита состоится «3» марта 2005 г. в «16» часов «15» минут в ауд. 344 на  
заседании диссертационного совета Д.501.001.88 по химическим наукам при  
Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу:  
11992, Москва, Воробьевы горы, МГУ, химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ  
имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан « 2 » февраля 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,  
кандидат химических наук



Торочешникова И.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

В последнее десятилетие метод капиллярного электрофореза получил такое же широкое распространение, как жидкостная и газовая хроматография. На сегодняшний день уже стало понятно, что капиллярный электрофорез не заменит жидкостную хроматографию, как считали многие ученые в начале девяностых годов прошлого века, а является методом, дополняющим хроматографию и имеющим свою область применения.

В классическом капиллярном зонном электрофорезе (КЗЭ), разделение основано на различии в собственных электрофоретических подвижностях определяемых соединений. Этот вариант электрофореза используется для анализа заряженных соединений в виде анионов или катионов. В методе мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) разделение основано на различном распределении определяемых компонентов пробы между псевдостационарной (мицеллярной) фазой и окружающим ее буферным раствором. МЭКХ, в отличие от варианта КЗЭ, позволяет определять как заряженные, так и незаряженные соединения и на сегодняшний день МЭКХ является одним из наиболее широко используемых вариантов капиллярного электрофореза.

**Актуальность темы.** Природа псевдостационарной фазы оказывает решающее влияние на взаимодействие между ней и разделяемыми соединениями, а, следовательно, и на селективность и эффективность электрофоретического разделения. По этой причине выбор и поиск новых псевдостационарных фаз является важной задачей. В последнее десятилетие наблюдается большой интерес к использованию псевдостационарных фаз на основе различных полимерных соединений. Применение псевдостационарных фаз на основе высокомолекулярных соединений позволяет решить многие проблемы, существующие при использовании классических мицелл: разделение смесей сильно гидрофобных смесей, высокая критическая концентрация мицеллообразования, существование точки Крафта и низкая устойчивость при большом содержании органического модификатора.

**Цель работы.** Полиэлектrolитные комплексы ионогенных поверхностно активных веществ (ПАВ) с линейными противоположно заряженными полиэлектролитами, образующиеся при смешении водных растворов исходных компонентов, представляют собой соединения, стабилизированные кооперативной системой солевых связей и гидрофобными взаимодействиями. Целью данного исследования было изучение возможности использования водорастворимых

полиэлектrolитных комплексов (ПЭК) в качестве нового типа псевдостационарных фаз в мицеллярной электрокинетической хроматографии.

**Конкретные задачи были следующими:**

- поиск области существования водорастворимых и устойчивых комплексов, образованных полиакриловой кислотой (ПАК) и солями четвертичных аммониевых оснований, в условиях электрофоретического эксперимента;

- изучение влияния приложенного внешнего напряжения в разделяющем кварцевом капилляре на полиэлектролитные комплексы, выступающие, как в качестве псевдостационарной фазы, так и в качестве определяемых соединений в варианте капиллярного зонного электрофореза;

измерение электрофоретической подвижности полиакриловых кислот и полиэлектролитных комплексов;

- апробация полиэлектролитных комплексов в качестве псевдостационарных фаз для разделения и определения ряда замещенных фенолов, дансил-, карбобензоксид- и бутоксикарбомоил-производных аминокислот;

сравнение основных электрофоретических характеристик разделения для полиэлектролитных комплексов и псевдостационарных фаз, образованных классическими мицеллообразователями (додецилсульфатом натрия (СДС) и др.);

- изучение влияния основных параметров полиэлектролитных комплексов: степени полимеризации полиакриловой кислоты ( $P_w$ ), длины алкильного радикала аммониевого основания ( $C_n$ ), состава полиэлектролитного комплекса ( $\Phi$ ) и содержания комплекса в разделяющем буфере на селективность и эффективность разделения;

- установление механизма взаимодействия разделяемых анализируемых соединений с псевдостационарной фазой на основе полиэлектролитных комплексов.

**Научная новизна.** Впервые полиэлектролитные комплексы были предложены в качестве принципиально нового типа псевдостационарных фаз в МЭКХ.

Найдена область значений основных параметров полиэлектролитных комплексов, состава буферного электролита и условий электрофоретического разделения при которых полиэлектролитные комплексы могут быть использованы в качестве псевдостационарных фаз.

Показана уникальная селективность к замещенным фенолам по сравнению с классическими псевдостационарными фазами - относительное удерживание не имеет прямой зависимости с их гидрофобностью. Найдено, что разделение дансил-

производных аминокислот происходит в основном по хроматографическому распределительному механизму, их относительное удерживание увеличивается с увеличением гидрофобности, тогда как на удерживание карбобензокси-производных аминокислот добавление полиэлектролитных комплексов в разделяющий буферный электролит не оказывает влияние. Бутоксикарбоамино-производные имеют разный порядок миграции при использовании полиэлектролитных комплексов и СДС. Ни одна из известных на сегодняшний день псевдостационарная фаза не обладает таким различием во взаимодействии с близкими по свойствам группам соединений.

Показано, что электрофоретические свойства разделения - селективность и эффективность - на новом типе псевдостационарных фаз, могут быть легко изменены путем изменения состава комплекса ( $\Phi$ ), степени полимеризации полиэлектролита ( $P_w$ ) или длины алкильного радикала алкилтриметиламмоний бромида ( $C_n$ ). Наличие большого числа степеней свободы ( $F$ ), и простой переход от одной системы к другой, является неоспоримым достоинством нового типа псевдостационарных фаз.

Проведено сравнение с наиболее широко применяемой псевдостационарной фазой на основе додецилсульфата натрия (СДС).

Практическая значимость работы. Представлены примеры разделения смесей разных производных аминокислот и замещенных фенолов. Предложен способ определения кофеина в моче (за счет уникальной селективности прочие компоненты мочи не оказывают мешающее влияние). Осуществлено разделение смеси содержащей одновременно дансил- и карбобензокси-производные аминокислот. Разделены стереоизомеры иодпроизводных  $\beta$ -фенилкарбоновых кислот в реакционной смеси. (Следует отметить, что данные задачи не решаются с использованием СДС). Показана возможность использования нового типа псевдостационарных фаз для химического контроля качества лекарственных средств методом МЭКХ на примере Цефоперабола® и Цефобола®.

На защиту выносятся:

- Область условий, при которых полиэлектролитные комплексы, образованные полиакриловой кислотой и четвертичными основаниями существуют как устойчивые псевдостационарные фазы для МЭКХ;
- Закономерности поведения полиэлектролитных комплексов под действием приложенного напряжения в качестве псевдостационарной фазы и в качестве определяемых соединений;

- Данные по электрофоретическим подвижностям полиакриловых кислот с различными степенями полимеризации и полиэлектролитных комплексов;
- Совокупность данных по условиям разделения ряда замещенных фенолов, ПАУ и разных классов производных аминокислот;
- Результаты влияния основных параметров полиэлектролитных комплексов на селективность и эффективность разделения;
- Зависимости удерживания различных классов соединений от гидрофобности и доли заряженной формы анализируемого соединения для полиэлектролитных комплексов и додецилсульфата натрия;
- Способ определения кофеина в моче, разделение стереоизомеров иодпроизводных  $\beta$ -фенилкарбонновых кислот в реакционной смеси и пример проведения химического контроля качества лекарственных средств Цефоперабола® и Цефобола® методом МЭХ с псевдостационарной фазой на основе полиэлектролитного комплекса.

**Апробация работы.** Результаты работы докладывались на международных конференциях и симпозиумах «Euroanalysis XII» (Дортмунд, Германия, 2002), «Разделение и концентрирование в аналитической химии» (Туапсе, Россия, 2002), «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий» (Томск, Россия, 2002), SBS 2003 - "100 Years of chromatography" (Москва, Россия, 2003), «Аналитика и Аналитики» (Воронеж, Россия, 2003), 2<sup>nd</sup> Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (Шиле-Стамбул, Турция, 2003), «Современное приборное обеспечение и методы анализа почв, кормов, растений и сельскохозяйственного сырья» (Москва, Россия, 2003), НРСЕ 2004 (Зальцбург, Австрия, 2004), «Euroanalysis XIII» (Саламанка, Испания, 2004); Всероссийском симпозиуме ««Хроматография и хроматографические приборы»» (Москва, 2004), втором съезде общества биотехнологов России (Москва, 2004) и международной конференции студентов и аспирантов «Ломоносов - 2003» (Москва, 2003); научных коллоквиумах лаборатории хроматографии кафедры аналитической химии МГУ.

**Публикация результатов.** По материалам диссертации опубликованы 3 статьи и 13 тезисов докладов.

**Структура и объём работы.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, общих выводов, списков цитируемой литературы и сокращений. Материал диссертации изложен на 182 страницах машинописного текста, содержит 76 рисунков и 17 таблиц, в списке цитируемой литературы 161 наименование.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### *Обзор литературы*

Обсуждена теория селективности и эффективности разделения в МЭКХ, рассмотрены основные типы псевдостационарных фаз на основе низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений. Проанализированы данные о водорастворимых полиэлектролитных комплексах, образованных ионогенными ПАВ с линейными противоположно заряженными полиэлектролитами, на примере полиакриловой кислоты и алкилтриметиламмоний бромидов. На основе литературных данных были обоснованы и конкретизированы задачи диссертационной работы.

### *Экспериментальная часть*

Основная часть экспериментов по капиллярному электрофорезу выполнена на системе капиллярного электрофореза “HP<sup>3D</sup> CE” производства Agilent Technologies (Вальдбронн, Германия), оснащенной детектором с диодной матрицей. Также в работе были использованы системы капиллярного электрофореза серии “Капель” производства Люмэкс (Санкт-Петербург, Россия).

В работе применяли кварцевые капилляры с различным внутренним диаметром, длиной, модифицированной внутренней поверхностью, увеличенной длиной оптического пути в зоне детектирования; производства ACTG Inc. (Сан Диего, США), Agilent Technologies (Вальдбронн, Германия) и Polymicro Technologies (Феникс, США).

В процессе работы использовали следующие приборы: спектрофотометр «Shimadzu 2201» (Япония); термостат «Memmert» (Германия) и «Kater 2» (Германия); ультразвуковую ванну «Sonorex RK 225» (Германия); роторный испаритель «Buchi» (Япония); pH метры «Mettler Toledo» (Швейцария), магнитную мешалку с термостатированием.

Для получения полиэлектролитных комплексов были использованы алкилтриметиламмоний бромиды ( $\text{Alk}=\text{C}_{10}\text{-C}_{16}$ ) и полиакриловые кислоты со степенями полимеризации ( $P_w$ ) от 60 до 7200. Для приготовления фосфатных буферов использовали 200 мМ раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  или коммерческий 50 мМ фосфатный буфер (Agilent Technologies, исходный pH 7.0), оттитрованный 3 М HCl до pH равного 5.95-6.05.

### *Получение полиэлектролитных комплексов*

Полиэлектролитные комплексы ПЭК, образованные по реакции между полиакриловой или полиметакриловой кислотами (и их солями) и алкилтриметил-

аммоний бромиды, представляют собой соединения, стабилизированные образованием системы ионных связей и мицеллоподобными агрегатами. Структура и свойства получаемого комплекса зависят от ряда параметров: степени полимеризации полиакриловой кислоты ( $P_w$ ); длины алкильного радикала алкилтриметиламмоний бромида ( $C_n$ ); состава комплекса ( $\phi$ ), а он в свою очередь зависит от состава реакционной смеси ( $z$ ), pH раствора, наличия низкомолекулярных неорганических солей.

Состав реакционной смеси  $z$  выражали в виде отношения молярной концентрации ионов ПАВ к молярной концентрации звеньев полиэлектролита:  $z = [ПАВ]/[ПЭ]$ . Состав полиэлектролитного комплекса определяется отношением числа ионов ПАВ ( $nПАВ$ ) в частице ПЭК к числу звеньев полиэлектролита ( $nПЭ$ ), включенных в поликомплекс:  $\phi = nПАВ/nПЭ$ . Полиэлектролитные комплексы (рис. 1) получали, добавляя по 30-50 мкл раствора ПАВ к раствору полиакриловой кислоты при pH 6.0 и непрерывном перемешивании.

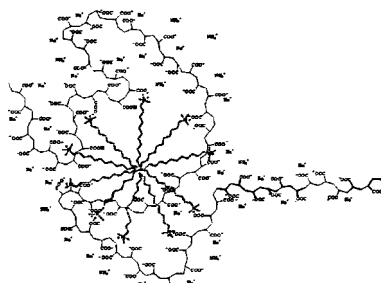


Рис. 1. Схема водорастворимого полиэлектролитного комплекса, образованного полиакриловой кислотой и бромидом додецилтриметиламмония.

#### *Область применимости комплексов в качестве псевдостационарных фаз*

Одной из самых главных проблем являлось нахождение параметров полиэлектролитных комплексов и электрофоретических условий, при которых ПЭК могут использоваться в качестве псевдостационарных фаз в МЭКХ. Если к основному их преимуществу следует отнести большое число степеней свободы по изменению селективности разделения, то основным недостатком можно считать ограниченную область условий, при которой полиэлектролитные комплексы могут использоваться в качестве псевдостационарных фаз, обеспечивающих воспроизводимые результаты.

В качестве ключевых параметров нами были выбраны три параметра, определяющие непосредственно молекулярные характеристики комплекса -  $P_w$ ,  $C_n$  и  $\phi$ ; и три основных параметра определяющие свойства буфера - pH; концентрация фосфата



натрия и ПЭК, мМ. Центральная часть треугольника на рис. 2 ограничивает область существования водорастворимого ПЭК, который можно в дальнейшем использовать в качестве псевдостационарной фазы в МЭКХ. Центральная часть треугольника на рис. 3, в свою очередь, определяет основные параметры разделяющего буфера.

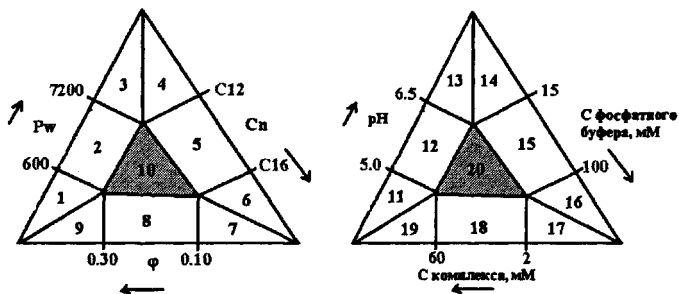


Рис. 2. Область существования водорастворимого ПЭК (10), которые можно в дальнейшем использовать в качестве псевдо-стационарной фазы в МЭКХ.

Рис. 3. Оптимальные параметры (20) разделяющего буфера.

#### *Электрофоретическая подвижность полиэлектролитных комплексов и полиакриловых кислот*

Целью данной части работы было определение подвижности полиакриловой кислоты (табл. 1) с различной степенью полимеризации, ее полиэлектролитных комплексов в варианте капиллярного зонного электрофореза. В этом случае полиэлектролитный комплекс или поликислота выступают в роли анализируемых соединений, пробы.

Эти данные необходимы для выяснения поведения полиэлектролитных комплексов под действием приложенного напряжения: происходит ли распад комплекса, изменяется ли состав. Значения подвижностей полиэлектролитных комплексов позволяют рассчитать время миграции псевдо-стационарной фазы, что необходимо для расчета и оптимизации параметров разделения в МЭКХ.

Таблица 1. Электрофоретические подвижности полиакриловых кислот ( $n=5$ ,  $P=0,95$ )

Степень полимеризации ПАК, $P_w$	Подвижность, $\mu \cdot 10^4 \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{сек}$
60	- $(3.13 \pm 0.06)$
1800	- $(3.10 \pm 0.04)$
3500	- $(3.01 \pm 0.08)$

Электрофоретические подвижности зависят от соотношения двух параметров, характеризующих образец: эффективного радиуса и эффективного заряда, а это отношение практически не отличается для полиакриловой кислоты с разной степенью полимеризации.

На рис. 4 представлена электрофореграмма разделения смеси полиакриловых кислот с тремя различными степенями полимеризации. Пики полианионов не разрешаются полностью.

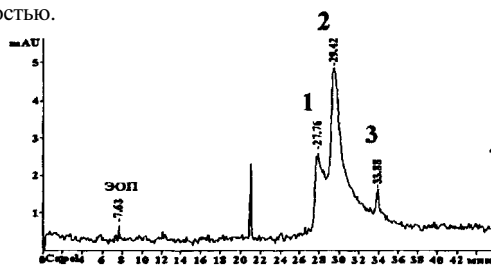


Рис. 4. Электрофореграмма смеси ПАК с разными  $P_w$ . Буферный электролит: 50 мМ борат, pH 9.3. Капилляр: 60 см (52 см) x 50 мкм. Напряжение: 25 кВ. Детектирование: 190 нм. Проба: смесь трех ПАК, каждого по 20 мкг/мл. Ввод пробы: 300 мбар\*сек. Пики: 1 -  $P_w=3500$ , 2 -  $P_w=1800$  и 3 -  $P_w=60$ .

### Производные фенола

Для оценки селективности новых псевдостационарных фаз принято использовать модельные смеси замещенных фенолов, что позволяет сравнивать селективности разных псевдостационарных фаз между собой.

При использовании фосфатного буфера pH 6.0 без добавки полиэлектролитного комплекса все фенолы выходят вместе с электроосмотическим потоком в виде одного пика. Когда же полиэлектролитный комплекс ПАК  $P_w=1800$ /ДТАБ (додецилтриметиламмоний бромид),  $\varphi=0.3$  был добавлен в буферный электролит, пики фенолов полностью разрешаются. В данном случае реализуется вариант МЭХХ, и разделение фенолов основано на их различном распределении между ПЭК и окружающей водной фазой.

Порядок выхода фенолов при использовании полиэлектролитного комплекса был следующий: фенол < резорцин < *p*-нитрофенол < *o*-аминофенол < *p*-хлорфенол. Пики всех фенолов полностью разрешены до базовой линии. Для данной системы эффективность разделения была невысокой - на уровне 35000 тт/метр. Псевдостационарная фаза на основе полиэлектролитного комплекса ПАК  $P_w=1800$ /ДТАБ

( $\varphi=0.3$ ) очень сильно отличается по селективности по отношению к фенолам по сравнению с СДС (рис. 5).

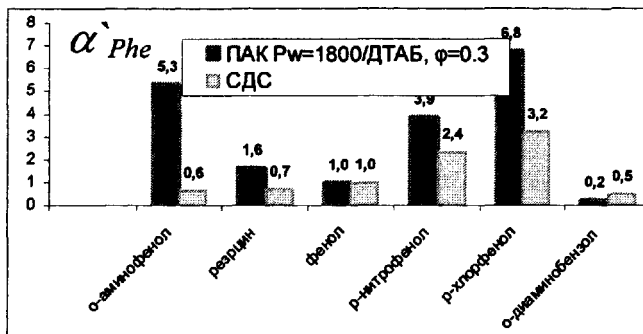


Рис. 5. Относительная селективность разделения фенолов. Буферный электролит:

▨ - 100 мМ СДС, 50 мМ фосфат, рН 6,0; ■ - 17,4 мМ ПАК P<sub>w</sub>=1800/ДТАБ ( $\varphi=0.3$ ), рН 5,9.

В качестве модельных анализируемых растворов использовали смеси дансил-, карбобензокси- и бутоксикарбонил-производных аминокислот. Использование разных производных аминокислот позволяет оценить влияние дериватирующего агента на селективность и эффективность разделения при использовании псевдостационарных фаз нового типа. Параметры гидрофобности (**LogD**) и доля заряженной и нейтральной формы для использованных соединений, рассчитанные с помощью программы ACD lab® приведены в табл. 2.

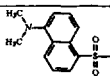


#### *Дансил-производные аминокислот*

При использовании 50 мМ фосфатного буфера рН 6,0, реализуется вариант капиллярного зонного электрофореза. Семь дансил-производных детектируются в виде разрешенных пиков (рис. 6А).

Добавка полиэлектролитного комплекса ПАК/ДТАБ в буфер приводит к разделению смеси производных на индивидуальные пики (рис. 6В). Времена миграции дансил-производных увеличиваются с увеличением содержания ПЭК в разделяющем буфере (рис. 6С). Это является одним из основных доказательств того, что реализуется механизм лежащий в основе метода МЭКХ.

В сравнении с СДС псевдостационарной фазой полиэлектролитные комплексы P<sub>w</sub>=1800/ДТАБ ( $\varphi=0.1-0.3$ ) и P<sub>w</sub>=3500/ДТАБ ( $\varphi=0.1-0.3$ ) проявляют аналогичный порядок удерживания для дансил-производных аминокислот (рис. 7).

Таблица 2. Параметры гидрофобности и отношения заряженных и нейтральных форм для производных аминокислот и фенолов, pH 6.0

Соединение	Обозначение	LogD, ACD lab®	Доля нейтральной формы, %	Доля заряженной формы, %
 <p>Дансил-производные аминокислот (DNS-AAs)</p>				
DNS серин	DNS-Ser	-1.21	7	93
DNS треонин	DNS-Thr	-0.87	11	89
DNS лейцин	DNS-Leu	1.45	90	10
DNS норлейцин	DNS-NorLeu	1.63	92	8
DNS Валин	DNS-Val	0.91	83	7
DNS метионин	DNS-Met	1.44	85	15
DNS фенилаланин	DNS-Phe	1.76	89	11
 <p>N-tert-бутоксикарбонил-производные аминокислот (BOC-AAs)</p>				
BOC серин	BOC-Ser	-2.25	1	99
BOC аланин	BOC-Ala	-0.88	12	88
BOC треонин	BOC-Thr	0.89	87	13
BOC фенилаланин	BOC-Phe	0.85	86	14
 <p>Фенолы</p>				
o-Аминофенол		0.44	96	0
Резорцин		0.88	100	0
Фенол		1.48	100	0
p-Нитрофенол		1.57	98	2
p-Хлорфенол		2.43	100	0

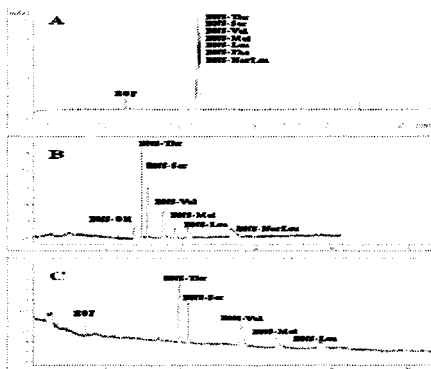


Рис. 6. Электрофореграмма дансил-производных аминокислот. Буферный электролит: (А) 50 мМ фосфат, pH 6.0; (В) 50 мМ фосфат, 7.9 мМ ПАК  $P_w=1800/DTAB$  ( $\varphi=0.3$ ) pH 6.0; (С) 50 мМ фосфат, 15.8 мМ ПАК  $P_w=1800/DTAB$  ( $\varphi=0.3$ ), pH 6.0. Капилляр: 80.5 см (72 см) x 50 мкм. Напряжение: 30 кВ. Ток: 64 мкА. Детектирование: 254 нм. Проба: смесь дансил-производных, каждого по 10 мкг/мл. Ввод пробы: 150 мбар\*сек.

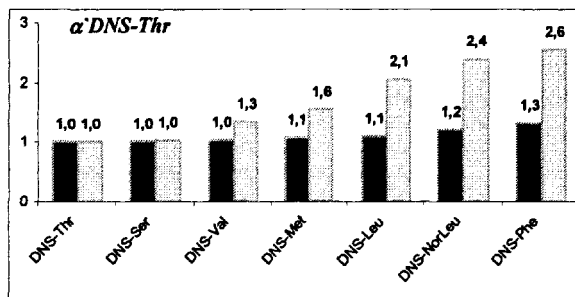


Рис. 7. Относительная селективность разделения дансил-треонина и остальных дансил - производных аминокислот. Буферный электролит: - 100 мМ СДС, 50 мМ фосфат, рН 6,0; - 2,3 мМ ПАК P<sub>w</sub>=6250/ДТАБ (φ=0,3) рН 6,0.

Зависимость относительного удерживания дансил-производных от концентрации псевдостационарной фазы P<sub>w</sub>=1800/ДТАБ (φ=0,3) представлена на рис. 8. Были получены линейные зависимости (R<sup>2</sup> = 0,995-0,999) в диапазоне содержания псевдостационарной фазы от 4,6 до 20,2 мМ.

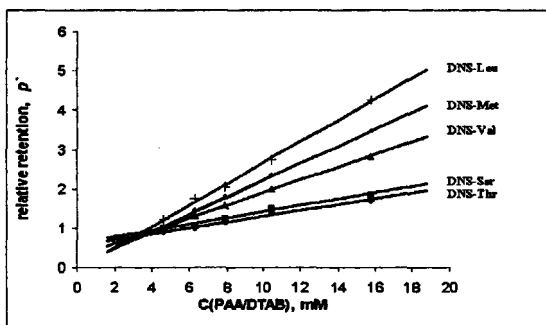


Рис. 8. Зависимость относительного удерживания дансил- производных от содержания комплекса P<sub>w</sub>=1800/ДТАБ (φ=0,3) в 50 мМ фосфатном буфере.

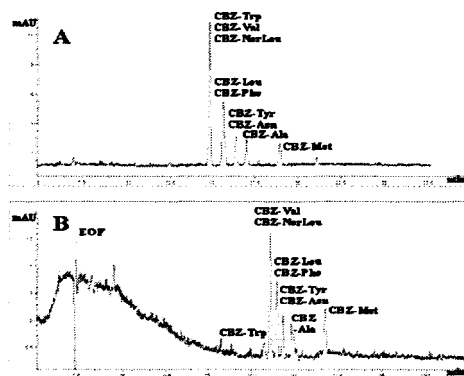
При экстраполяции линии зависимостей для всех производных пересекаются в точке с концентрацией равной 3,2 мМ. Экспериментально было подтверждено, что добавка ПЭК в буферный электролит на уровне 3 мМ и менее не влияет на удерживание дансил-производных аминокислот.

Полученные результаты для дансил-производных аминокислот позволяют сделать вывод о том, что в данном случае реализуется вариант МЭХ и основной вклад в

механизм удерживания на полиэлектролитных комплексах вносят гидрофобные взаимодействия между мицелло-подобной фазой ПЭК и разделяемыми соединениями.

### *Карбобензокси-производные аминокислот*

Разделение девяти карбобензокси-производных с двумя разными 50 мМ фосфатными буферами (рН 6.0), с добавкой 7.9 мМ полиэлектролитного комплекса ПАК  $P_w=1800/DTAB$  ( $\varphi=0.3$ ) и без нее представлено на рис. 9.



**Рис. 9.** Электрофореграмма карбобензокси-производных аминокислот. Буферный электролит: (А) 50 мМ фосфат, рН 6,0; (В) 50 мМ фосфат, 7,9 мМ ПАК  $P_w=1800/DTAB$  ( $\varphi=0.3$ ) рН 5,9. Капилляр: 80,5 см (72 см) x 50 мкм. Напряжение: 30 кВ. Ток: 62 мкА. Детектирование: 210 нм. Проба: каждого по 6 мкг/мл. Ввод пробы: 150 мбар\*сек.

Времена миграции карбобензокси-производных увеличились на несколько минут в случае добавки комплекса, что связано с увеличением вязкости буферного электролита.

Относительное удерживание карбобензокси производных повышается при увеличении содержания комплекса, но на порядок меньше, чем в случае дансил-производных, что связано с увеличением гидродинамической вязкости буфера. Графики зависимостей относительного удерживания карбобензокси-производных параллельны и не имеют общей точки пересечения, в отличие от аналогичных зависимостей для дансил-производных.

Таким образом найдено, что добавка полиэлектролитного комплекса не влияет на электрофоретическое поведение карбобензокси-производных аминокислот. Вариант мицеллярной электрокинетической хроматографии не реализуется.

### *Бутоксикарбомил-производные аминокислот*

Порядок миграции бутоксикарбомил-производных аминокислот при использовании ПО мм СДС следующий: **BOC-Ser < BOC-Ala < BOC-Thr = BOC-Phe**. Пики **BOC-Thr** и **BOC-Phe** не разрешаются, несмотря на то, что эффективность разделения превышает 1 млн. тт/м.

В сравнении с СДС псевдостационарной фазой добавка 2.3 мм полиэлектролитного комплекса **P<sub>w</sub> = 6250/ДТАБ (φ=0.2)** в 50 мм фосфатный буфер pH 5.8 приводит к полному разделению пиков четырех бутоксикарбомил-производных. Порядок миграции с полиэлектролитным комплексом следующий: **BOC-Ala < BOC-Ser < BOC-Phe < BOC-Thr**. Происходит изменение порядка миграции **BOC-Ala** и **BOC-Ser**, и полностью разрешаются пики **BOC-Thr (LogD 0.89)** и **BOC-Phe (LogD 0.85)**.

Следовательно, разделение ароматических производных аминокислот и изменение порядка их удерживания, обусловлено специфическими взаимодействиями соединений с полиэлектролитным комплексом. Эффективность разделения на псевдостационарной фазе на основе ПЭК в разы ниже чем при использовании СДС, что не мешает, однако, полному разрешению пиков всех компонентов смеси.

\* \* \*

Разная селективность псевдостационарных фаз на основе полиэлектролитных комплексов является их достаточно уникальным свойством, поскольку система, не имеющая в своем составе каких-либо специфических функциональных групп, взаимодействует с одним типом производных (дансил), не взаимодействует с другим типом (карбобензокси) и проявляет отличную от СДС селективность по отношению к фенолам и бутоксикарбомил-производным аминокислот. Причиной этого является, по-видимому, реализация нескольких механизмов миграции.

### *Зависимость электрофоретических параметров разделения от характеристик комплексов*

Свойства псевдостационарной фазы на основе ПЭК напрямую зависят от молекулярных характеристик ПЭК, а его строение и структура является функцией таких параметров как - степень полимеризации (**P<sub>w</sub>**), длина алкильного радикала (**C<sub>n</sub>**) и состав комплекса (**φ**).

Число возможных комплексов (**F**) с разными молекулярными характеристиками, образующими псевдо-стационарные фазы с различными электрофоретическими характеристиками разделениями,  $\Delta\varphi=0.05$  приведено в табл. 3.

Таблица 3. Число комплексов (**F**) с различными молекулярными характеристиками

Алкильный радикал триметиламмоний бромид	Число комплексов, F, ( $\Delta\varphi = 0.05$ )	
	Возможно	Изучено
C <sub>10</sub>	30	6
C <sub>12</sub>	24	22
C <sub>14</sub>	18	4
C <sub>16</sub>	12	4

### Состав полиэлектролитного комплекса ( $\varphi$ )

Электрофореграмма смеси шести фенолов с использованием буферных электролитов, различающихся только составом полиэлектролитного комплекса,  $\varphi$ , представлено на рис. 10. Оба буфера содержат 50 мМ фосфата pH 6.0, первый буфер содержал 9.3 мМ ПЭК  $P_w=1800/ДТАБ$  состава  $\varphi=0.05$  (рис. 10А); а второй, 10.4 мМ ПЭК  $P_w=1800/ДТАБ$ , но состава  $\varphi = 0.3$  (рис. 10Б). При составе  $\varphi = 0.3$  пики всех фенолов полностью разрешены и мы имеем следующую последовательность выхода: фенол < резорцин < *p*-нитрофенол < *o*-аминофенол < *p*-хлорфенол. При использовании комплекса с  $\varphi=0.05$  на электрофореграмме регистрируется четыре пика и другой порядок выхода: фенол < *o*-аминофенол < резорцин = *p*-нитрофенол < *p*-хлорфенол.

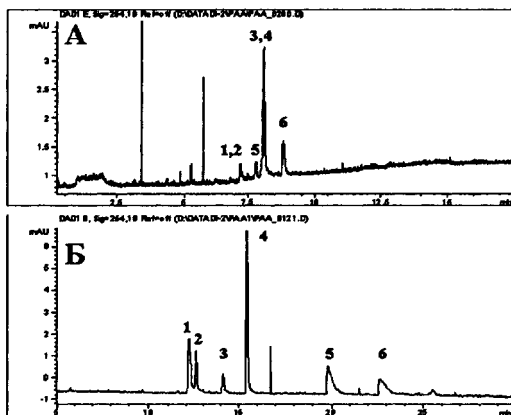


Рис. 10. Электрофореграмма фенолов. Буферный электролит: (А) 50 мМ фосфат, 9.2 мМ ПЭК  $P_w=1800/ДТАБ$  ( $\varphi=0.05$ ) pH 5.9; (Б) 50 мМ фосфат, 17.4 мМ ПЭК  $P_w=1800/ДТАБ$  ( $\varphi=0.3$ ) pH 6.0; Капилляр: 68.5 см (60 см) x 50 мкм. Напряжение: 25 кВ. Детектирование: 254 нм. Проба: каждого по 2 мкг/мл. Ввод пробы: 100 мбар\*сек. Пики: 1 = *o*-диаминобензол, 2 = фенол, 3 = резорцин, 4 = *p*-нитрофенол, 5 = *o*-аминофенол и 6 = *p*-хлорфенол.



Зависимость относительной селективности разделения дансил-производных от состава комплекса для комплексов, образованных полиакриловыми кислотами с  $P_w=1800/P_w=6250$  и ДТАБ, представлена на рис. 11. Было найдено, что оптимальные условия для разделения достигаются при  $\phi = 0.3$  для ПЭК  $P_w=1800$ /ДТАБ и  $\phi = 0.2$  при использовании ПЭК  $P_w=6250$ /ДТАБ.

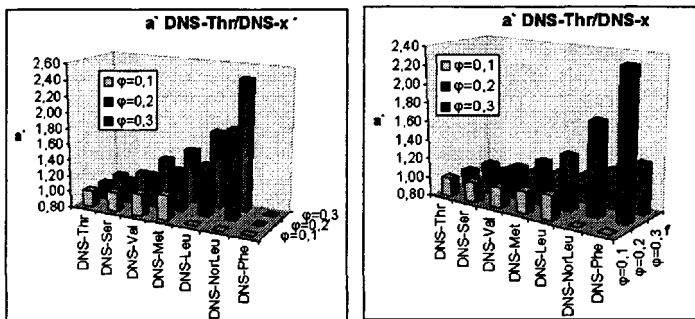


Рис. 11. Зависимость относительной селективности разделения дансил-треонина и остальных дансил-производных ( $\alpha'$ ) от состава комплекса ( $\phi$ ) для комплексов; (А)  $P_w=1800$ / ДТАБ, (Б)  $P_w=6250$ /ДТАБ.

### Степень полимеризации полиакриловой кислоты ( $P_w$ )

Зависимость относительной селективности разделения дансил-треонина и остальных дансил-производных ( $\alpha'$ ) от степени полимеризации полиакриловой кислоты, образующей комплекс, представлена на рис. 12. Селективность разделения пары **DNS-Thr/DNS-Phe** существенно уменьшается при использовании полиакриловой кислоты с большей степенью полимеризации: 3.2 для  $P_w=1800$ , 2.2 для  $P_w=3500$  и 1.3 в случае  $P_w=6250$ .

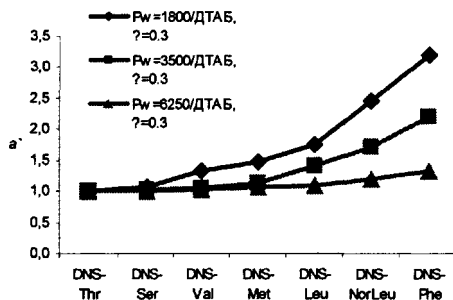


Рис. 12. Зависимость относительной селективности разделения дансил-треонина и остальных дансил производных ( $\alpha$ ) от степени полимеризации полиакриловой кислоты, образующей полиэлектролитный комплекс с ДТАБ.

### Длина алкильного радикала

На разделение фенолов изменение длины алкильного радикала влияет в меньшей степени, чем на разделение дансил-производных. Изменения порядка миграции не происходит. Замена ДТАБ на ТТАБ (рис. 13Б) приводит к тому, что ухудшается селективность разделения - не разделяются пики *o*-диаминобензола и фенола и уменьшается эффективность пиков *o*-аминофенола и *p*-хлорфенола; а при использовании ЦТАБ (рис. 13В) не детектируются пики *o*-диаминобензола и резорцина.

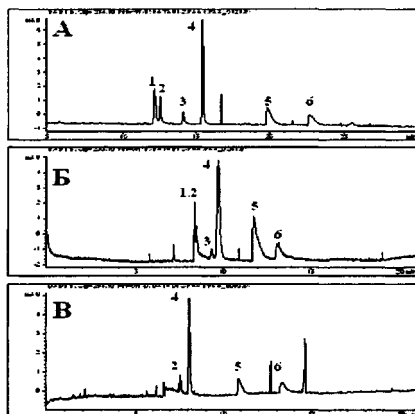
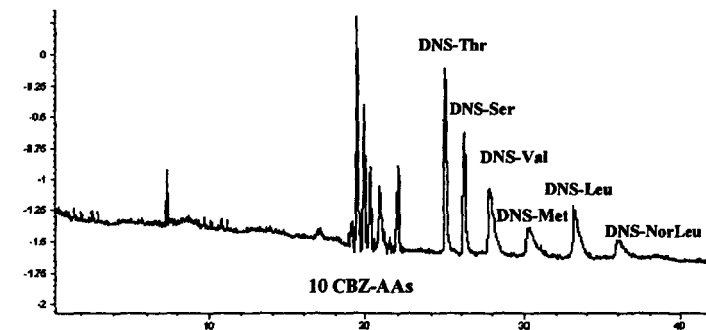


Рис. 13. Электрофореграмма фенолов (254 нм). Буферный электролит: (А) 17.4 мМ ПАК  $P_w=1800$ /(ДТАБ  $C_{12}$ ),  $\varphi=0.2$  рН 6.0; капилляр: 68.5 см (60 см)  $\times$  50 мкм. (Б) 10.0 мМ ПАК  $P_w=1800$ /(ТТАБ  $C_{14}$ ),  $\varphi=0.2$  рН 5.9; капилляр: 80.5 см (72 см)  $\times$  50 мкм. (В) 9.3 мМ ПАК  $P_w=1800$ /(ЦТАБ  $C_{16}$ ),  $\varphi=0.2$  рН 6.0; капилляр: 80.5 см (72 см)  $\times$  50 мкм. Проба: смесь фенолов, каждого по 2-5 мкг/мл. Идентификация пиков: 1 = *o*-диаминобензол, 2 = фенол, 3 = резорцин, 4 = *p*-нитрофенол, 5 = *o*-аминофенол и 6 = *p*-хлорфенол.

### *Разделение смеси дансил- и карбобензокси-производных аминокислот*

При разделении смеси, содержащей 6 дансил- и 10 карбобензокси- производных аминокислот, с использованием СДС в качестве модификатора, на электрофореграмме в виде неразрешающихся пиков в диапазоне времени 14.0-14.5 мин выходят пять производных: **CBZ-Val**, **CBZ-Ser**, **CBZ-Ala**, **DNS-Thr** и **DNS-Ser**; на 17.6 мин: **DNS-Met** и **CBZ-Tyr**; на 21.5 мин **DNS-Leu** и **CBZ-NorLeu**. Пики девяти из шестнадцати производных не удастся разделить.

Используя уникальную селективность нового типа фаз удалось добиться полного разделения дансил-производных в смеси карбобензокси- и дансил-производных (рис. 14). Карбобензокси-производные не удерживаются полиэлектролитным комплексом - десять производных выходят в виде шести близко стоящих пиков от 19 до 22 мин, и не совпадают по миграции времени с дансил-производными, как это происходит в случае СДС.



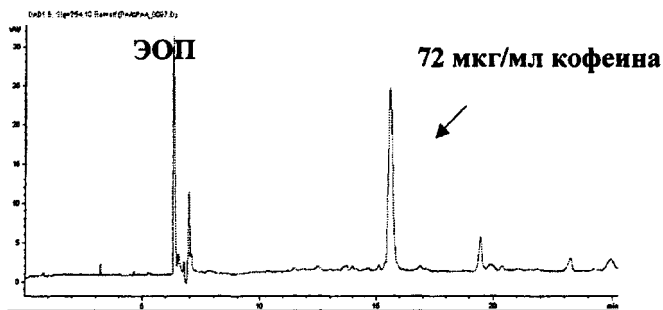
**Рис. 14.** Электрофореграмма смеси дансил и карбобензокси производных аминокислот. Буферный электролит: 30 мМ фосфат, 18 мМ ПАК  $P_w = 1800/ДТАБ$  ( $\varphi = 0.3$ ) pH 5.8. Капилляр: 80.5 см (72 см) x 50 мкм. Напряжение: 25 кВ. Детектирование: 254 нм. Проба: каждого по 5 мкг/мл. Ввод пробы: 250 мбар\*сек.

Конечно, данный пример нельзя в полной мере назвать аналитическим приложением, которое получит широкое распространение в аналитической практике. Однако, его цель - показать уникальную селективность псевдостационарных фаз на основе полиэлектролитных комплексов.

### *Определение кофеина в моче*

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) является стимулятором центральной нервной системы. Это соединение входит в список запрещенных препаратов международного олимпийского комитета. Предложен способ определения кофеина в моче с

использованием псевдостационарной фазы на основе ПЭК. Электрофореграмма образца мочи пациента, принимавшего кофеин в больших дозах с целью достижения наркотического эффекта представлена на **рис. 15**.



**Рис. 15.** Электрофореграмма образца мочи пациента, принимавшего кофеин в больших дозах с целью достижения токсического эффекта. Буферный электролит: 50 мМ фосфат, 9,3 мМ ПАК  $R_w = 1800/ДТАБ$  ( $\varphi = 0.2$ ) pH 6.0. Капилляр: 82 см (73.5 см) x 50 мкм. Напряжение: 30 кВ. Детектирование: 273 нм. Проба: моча разбавленная в два раза 20 мМ фосфатным буфером. Ввод пробы: 100 мбар\*сек.. Найдено  $74 \pm 7$  мкг/мл кофеина ( $n=5$ ,  $P=0,95$ ).

Следует отметить, что при использовании псевдостационарной фазы на основе СДС время удерживания кофеина совпадает со временем удерживания некоторых эндогенных соединений и данная задача не решается.

#### *Контроль качества лекарственных средств Цефопераболо® и Цефоболо®*

Метод МЭКХ с псевдостационарной фазой на основе ПЭК был использован для химического контроля качества действующих веществ цефоперазона (Цефоперабол®) и цефотаксима (Цефоболо®). На представленной электрофореграмме водного раствора содержащего 2000 мкг/мл лекарственного средства Цефопераболо® (цефоперазон) (**рис. 16**) видно 7 пиков, принадлежащих примесям. Общее содержание примесей - 4.1%.

Содержание цефоперазона в препарате для приготовления инъекционного раствора Цефоперабол®, содержащем цефоперазон в чистом виде, составило  $95.9 \pm 0.3\%$  ( $n=5$ ,  $P=0,95$ ). В препарате Цефоболо® (цефотаксима) было найдено 4 пика, принадлежащих примесям; содержание цефотаксима  $98.1 \pm 0.4\%$  ( $n=5$ ,  $P=0,95$ ).

В методе жидкостной хроматографии с фотометрическим детектированием некоторые примеси элюировались вместе с пиком действующего вещества, что

приводило к неверному результату испытания на чистоту и допустимые пределы примесей.

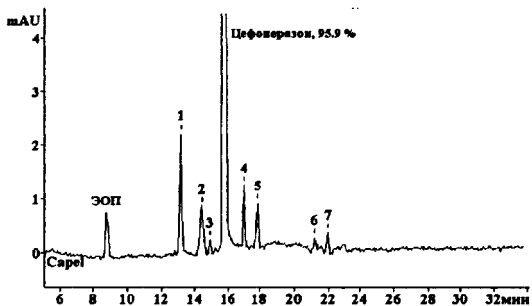


Рис. 16. Электрофореграмма раствора содержащего 2000 мкг/мл Цефоперазола® (цефоперазон). Буферный электролит: 40 мМ фосфат, 21 мМ ПАК  $P_w = 6250/ДТАБ$ ,  $\varphi = 0.2$  pH 6.0; капилляр: 60 см (52 см до детектора) x 75 мкм. Напряжение: 25 кВ. Детектирование: 254 нм. Ввод пробы: 600 мбар\*сек.

Таким образом, показано, что применение псевдостационарных фаз на основе водорастворимых полиэлектролитных комплексов позволяет изменить (и в ряде случаев, значительно улучшить) селективность определения веществ в методе МЭХХ и повысить правильность анализа.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые полиэлектролитные комплексы были использованы в качестве нового типа псевдостационарных фаз в мицеллярной электрокинетической хроматографии для разделения замещенных фенолов и различных классов производных аминокислот.
2. Найдены параметры полиэлектролитного комплекса полиакриловой кислоты с алкилтриметиламмоний бромидом; и основных электрофоретических условий, при которых они могут использоваться как псевдостационарные фазы.
3. Изучено влияния приложенного внешнего напряжения в разделяющем кварцевом капилляре на полиэлектролитные комплексы, выступающие как в качестве псевдостационарной фазы, так и в качестве анализируемых соединений в варианте капиллярного зонного электрофореза.
4. Найдены электрофоретические подвижности полиакриловых кислот и образованных ими полиэлектролитных комплексов.
5. Изучено влияние основных параметров полиэлектролитных комплексов: степени полимеризации полиакриловой кислоты, длины алкильного радикала аммониевого

основания, состава полиэлектролитного комплекса и содержания комплекса в разделяющем буферном электролите на селективность и эффективность разделения. Проведено их сравнение с додецилсульфатом натрия.

6. Найдено, что псевдостационарные фазы на основе полиэлектролитных комплексов проявляют уникальную и легко изменяемую селективность по сравнению с додецилсульфатом натрия: фенолы и бутоксикарбомил-производные аминокислот имеют другой порядок удерживания, а на разделение карбобензоксипроизводных добавка комплекса в буфер не оказывает влияния.

7. Предложен способ определения кофеина в моче. За счет изменения селективности устранено мешающее влияние компонентов матрицы. Осуществлено разделение смеси, содержащей одновременно дансил- и карбобензоксипроизводные. Разделены стереоизомеры иодпроизводных р-фенилкарбоновых кислот в реакционной смеси. Показана возможность использования нового типа псевдостационарных фаз для контроля качества лекарственных средств методом МЭХХ. (Данные задачи не решаются с использованием СДС).

Основные результаты изложены в следующих публикациях:

1. Pirogov A.V., Shpak A.V., Shpigun O.A., Application of polyelectrolytes complexes as novel pseudostationary phases in CE and MEKC. / European Conference on Analytical Chemistry «Euroanalysis XII». Dortmund, Germany, 2002. September 8-13. P. 136.
2. Шпак А.В., Пирогов А.В., Шпигун О.А., Определение аминокислот методом капиллярного электрофореза без предварительной дериватизации. / Материалы Международного симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии». Туапсе. 2002. 6-11 октября. С. 244.
3. А.В. Шпак, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун, Использование полиэлектролитных комплексов полиакриловой кислоты и четвертичных аммониевых солей в качестве новых псевдостационарных фаз в мицеллярной электрокинетической хроматографии. / Материалы Международной конференции «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий». Томск. 2002. 26-28 ноября. ч. II. с. 234-237.
4. Шпак А.В., Псевдо-стационарные фазы для МЭХХ на основе полиэлектролитных комплексов. / Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов - 2003» (секция химия). Москва 2003. 15-18 апреля. ч.1. С. 51.
5. A.V. Pirogov, A.V. Shpak, O.A. Shpigun, Application of polyelectrolyte complexes as novel pseudo-stationary phases in MEKC // Anal. Bioanal. Chem. 2003. V. 375. P. 1199-1203.
6. A.V. Shpak, A.V. Pirogov, O.A. Shpigun, Micellar electrokinetic chromatography with polyelectrolyte complexes as a micellar pseudo-stationary phase. / Proceedings of the 3rd

- International Symposium on Separations in BioSciences - SBS 2003 "100 years of chromatography". Moscow, Russia. 2003. May 13-18. Moscow. 2003. P. 264.
7. А.В. Шпак, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун, Электрофоретические методы определения аминокислот. / Материалы международного форума «Аналитика и Аналитики». Воронеж. Россия. 2-6 июня 2003 г. С. 192.
  8. A.V. Shpak, A.V. Pirogov, O.A. Shpigun, Application of polyelectrolytes complexes as a pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography. / Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry. Sile-Istanbul. Turkey. 2003. September 14-17. P. 41.
  9. А.В. Шпак, А.В. Пирогов, Определение водорастворимых форм неорганических анионов в почвах методом капиллярного электрофореза. / Материалы международной конференции «Современное приборное обеспечение и методы анализа почв, кормов, растений и сельскохозяйственного сырья». Москва. ВНИИА. 2-4 декабря 2003. Издательство ВНИИА. 2003. с. 42-44.
  10. Шпак А.В., Пирогов А.В., Шпигун О.А., Определение аминокислот методом капиллярного электрофореза без предварительной дериватизации. // Журн. аналит. химии. 2003. Т. 58. № 7. С. 729.
  11. A.V. Shpak, A.V. Pirogov, O.A. Shpigun, Micellar electrokinetic chromatography with polyelectrolyte complexes as micellar pseudo-stationary phases // J. Chromatogr. B 2004. V. 800. P. 91-100.
  12. A.V. Shpak, A.V. Pirogov, O.A. Shpigun, Application of polyelectrolyte complexes as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography. / Proceedings of the 17th International Symposium on Microscale Separations and Capillary Electrophoresis - HPCE 2004. Salzburg. Austria 2004. February 8-12. Salzburg. 2004. P. 94.
  13. А.В. Пирогов, А.В. Шпак, О.А. Шпигун, Полиэлектrolитные комплексы в ионной хроматографии и капиллярном электрофорезе. / Материалы Всероссийского симпозиума «Хроматография и хроматографические приборы». Москва. 15-19 марта 2004. Москва С. 48.
  14. А.В. Шпак, Д.С. Немцева, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун, Определение подвижности полиакриловой кислоты и ее полиэлектролитных комплексов методом капиллярного электрофореза / Материалы Всероссийского симпозиума «Хроматография и хроматографические приборы». Москва 15-19 марта 2004. Москва С. 117.
  15. Shpigun O.A., Shpak A.V., Pirogov A.V., The unique selectivity of a pseudo-stationary phases in MEKC based on polyelectrolyte complexes. / European Conference on Analytical Chemistry «Euroanalysis XIII». Salamanca Spain. 2004. September 5-10. P. PS2-205.
  16. Шпак А.В., Шамшурин Д.В., Комарова Н.В., Зинченко В.И., Асанов А.Н., Возможности и перспективы метода капиллярного электрофореза в медицине. / Материалы второго съезда «Общества биотехнологов России». Москва 13-15 октября 2004. с. 122-123.

02,00

Подписано в печать 28 января 2005 г.

Заказ 455. Формат 60 x 90/16.

Тираж 100 экз.

Отпечатано в салоне оперативной печати ПКФ.  
Москва, Садовая-Черногрязская, 3Б. Тел. 778-97-47



22 MAR 2005