



На правах рукописи



МАРКОВА ОЛЬГА ИГОРЕВНА

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА
В СИСТЕМАХ МЕТАЛЛ – ОРГАНИЧЕСКИЙ ЛИГАНД

Специальность 02 00 02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург

2007

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета и в Центре коллективного пользования «Аналитическая спектроскопия» при Санкт-Петербургском государственном политехническом университете.

Научный руководитель:	доктор химических наук, профессор Карцова Людмила Алексеевна
Официальные оппоненты	доктор химических наук, профессор Родинков Олег Васильевич доктор технических наук, профессор Воронцов Александр Михайлович
Ведущая организация:	Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

Защита состоится 15 марта 2007 г. в 15.00 ч.

на заседании диссертационного совета Д 212 232.37 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 1990034 Санкт-Петербург, Средний проспект В О , д. 41/43
Большая химическая аудитория

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан 10 февраля 2007 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

Папсуева /А.Г. Папсуева/

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность проблемы. Определение биогенных металлов и биологически активных соединений в природных объектах является одной из актуальных задач аналитической химии. В субклеточных фракциях тканей мозга, характеризующихся высоким содержанием катехоламинов, обнаружены и значительные концентрации ионов металлов. В организме биогенные металлы находятся преимущественно в виде координационных соединений с биологически активными органическими лигандами.

Все большее распространение при определении биологически активных органических соединений и катионов металлов получает метод капиллярного электрофореза (КЭ). Однако электрофоретические подвижности многих гидратированных металлических ионов близки, а чувствительность УФ-детектирования в методе КЭ недостаточна для их определения в реальных образцах.

Изменить электрофоретические характеристики определяемых ионов и снизить пределы обнаружения возможно при использовании процессов комплексообразования с органическими лигандами, поглощающими в УФ-свете либо образующими поглощающие комплексы.

Получение подобной информации могло бы представить как практическую ценность, так и теоретическую новизну в связи с установлением новых возможностей электрофоретического метода, а также решения задач клинической диагностики.

Данное исследование поддерживалось грантами НАТО (программа «Наука для мира») и Минобразования России.

Цель работы. Изучение возможностей электрофоретического определения катионов биогенных металлов и биологически активных веществ в форме их комплексных соединений.

В связи с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

1. Выбрать аналитические формы биогенных металлов (Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+}) с органическими реагентами и уточнить их фотометрические характеристики для оптимизации условий электрофоретического определения.
2. Выяснить возможности определения этих металлов с использованием традиционных фотометрических реагентов в различных режимах КЭ:
 - косвенное и прямое детектирование в УФ-области;
 - введение в кварцевый капилляр предварительно подготовленных комплексов;
 - образование комплексов металлов с фотометрическими реагентами внутри кварцевого капилляра (электроинжекционный и электрофоретически опосредованный методы анализа).

3. Оптимизировать условия *off-line* и *on-line* комплексообразования в системе *органический лиганд – металл*.
4. Оценить возможности различных вариантов электрофоретического определения биологически активных лигандов (биогенных аминов, аминокислот, полифенолов, ароматических функционально замещенных карбоновых кислот) в форме комплексных соединений с биогенными металлами
5. Предложить схемы электрофоретического анализа реальных объектов (природные воды, витамины, моча) при определении катионов металлов и/или органических лигандов в форме их комплексов.

Научная новизна

Выявлены аналитические формы и уточнены фотометрические характеристики при определении биогенных металлов с использованием фотометрических реагентов в различных режимах капиллярного электрофореза: косвенное и прямое детектирование в УФ-области; электроинжекционный и электрофоретически опосредованный варианты анализа

Обнаружена высокая комплексообразующая способность природных антиоксидантов полифенольного типа с ионами Fe^{3+} . Показано, что доминирующим фактором в образовании таких комплексов является наличие пирокатехиновых фрагментов (1,2-фенольных гидроксиллов) в составе молекул полифенолов

На примерах непоглощающих в УФ-свете аминокислот (глутаминовой, аланина, валина) и азамакроцикла (циклама) установлено, что чувствительность их определения возрастает в 10 – 30 раз при использовании ионов Cu^{2+} в составе буферного электролита.

Теоретическая значимость работы

Обоснованы преимущества и ограничения различных схем электроинжекционного метода и электрофоретически опосредованного микроанализа при определении катионов металлов в зависимости от природы реагента, относительных значений электрофоретических подвижностей реагента и комплекса, электроосмотического потока.

На примерах модельных биологически активных соединений – норадреналина (NA), 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и глутаминовой кислоты (Glu) – оптимизированы условия определения их в форме комплексов с ионами Cu^{2+} в различных режимах капиллярного зонного электрофореза

Показано, что добавление ионов Me^{n+} в состав рабочего буфера приводит к улучшению разрешения функциональных замещенных ароматических кислот. за счет процессов комплексообразования по аминному и карбоксилатному типу в случае ионов Cu^{2+} ; и с участием фенольных гидроксиллов – для ионов Al^{3+} и Fe^{3+} .

Практическая значимость работы

Разработаны способы электрофоретического определения Al^{3+} в форме комплекса с ксиленоловым оранжевым в природных и питьевых водах и ионов Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} в форме комплексов с 4-(2-пиридилазо)резорцином в витаминах «Компливит»

Предложены схемы электрофоретического анализа ванилинминдальной и гомованилиновой кислот – маркеров нейробластомы – в моче в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии (фосфатный буфер, pH 7,0, 150 мМ ДДСН) и методом капиллярного зонного электрофореза (боратный буфер, pH 8,5, 1 мМ Cu^{2+}).

Положения, выносимые на защиту:

- 1 Аналитические формы металлов (Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+}) с традиционными органическими реагентами и их фотометрические и электрофоретические характеристики
2. Обоснование преимуществ и ограничений схем электроинжекционного и электрофоретически опосредованного методов анализа при определении ионов биогенных металлов с использованием фотометрических реагентов: ксиленолового оранжевого (КО), нитрозо-Р-соли (НРС), 4-(2-пиридилазо)резорцина (ПАР)
- 3 Концентрации, состав, pH буферного электролита, соотношение реагентов в системе металл – органический лиганд при *off-line* и *on-line* комплексообразовании в режиме капиллярного зонного электрофореза.
- 4 Способы *on-line* концентрирования (стекинг с большим вводом пробы и стекинг с усилением поля) для увеличения чувствительности электрофоретического определения катионов металлов и/или их комплексов методами традиционного капиллярного зонного электрофореза, электроинжекционного и электрофоретически опосредованного методов анализа
- 5 Условия электрофоретического определения биологически активных органических соединений (биогенные амины, аминокислоты, полифенолы, ароматические функционально замещенные карбоновые кислоты) в форме комплексов с биогенными металлами
- 6 Практические приложения выявленных закономерностей в схемах анализа для определения :
 - ионов алюминия в природных и питьевых водах методами электроинжекционного анализа и капиллярного зонного электрофореза,
 - ионов кобальта, меди и цинка в витаминном комплексе «Компливит» с использованием 4-(2-пиридилазо)резорцина (ПАР) методом капиллярного зонного электрофореза,

– маркеров злокачественной опухоли – ванилинминдальной и гомованилиновой кислот методами КЗЭ и МЭКХ с введением в состав рабочего буфера катионов Cu^{2+} с оптимизированным вариантом пробоподготовки.

Публикации и апробация работы Материалы диссертации опубликованы в 2 статьях и 9 тезисах докладов. Результаты исследований докладывались на Всероссийской конференции «Актуальные проблемы аналитической химии» (2002, Москва); 1-ой Всероссийской конференции «Аналитические приборы» (2002, СПб); Международном симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии» (2002, Краснодар); Международной конференции «SIS03 Separation of Ionic Solutes» (2003, Братислава, Словакия); VI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА – 2004» с международным участием (2004, Уфа), конференции «Аналитика России» (2004, Москва, Клязьма); II Международном симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической и радиохимии» (2005, Краснодар, Россия), 29th Int Symposium on Capillary Chromatography (2006, Riva del Garda, Italy), XXXth Symposium “Chromatographic methods of investigating the organic compounds” (2006, Katowice-Szczryk, Poland).

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, четырех глав с обсуждением полученных результатов, экспериментальной части, практического применения, списка принятых сокращений, выводов и списка цитируемой литературы (200 наименований). Работа изложена на 208 страницах машинописного текста, содержит 28 таблиц и 111 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дано обоснование актуальности темы и сформулированы цели исследования. Отмечена перспективность использования метода капиллярного электрофореза при определении катионов металлов и биологически активных органических соединений в форме их комплексов.

1-я глава (Обзор литературных данных) состоит из разделов, в которых обсуждаются общие сведения о катионах металлов; формы их существования и биологические функции, физико-химические методы исследования; комплексообразование с фотометрическими реагентами, использование координационных соединений биогенных металлов с биологически активными соединениями.

Во **2-й главе** рассматриваются **общие характеристики объектов и методов исследования.**

В **3-й главе** предметом обсуждения является **выбор аналитических форм биогенных металлов (Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+}) с органическими реагентами и уточнение фотометрических характеристик** для оптимизации условий их определения.

различными вариантами капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ), включая электроинжекционный анализ (ЭИА) и электрофоретически опосредованный микроанализ (ЭОМА).

Первоначально был реализован вариант электрофоретического определения катионов металлов в режиме косвенного детектирования с использованием бензимидазольного буфера (pH 4,8) с добавкой гликолевой кислоты

Однако в этих условиях затруднительно определение ионов Al^{3+} и Fe^{3+} вследствие гидролиза. Кроме того, достигнутая чувствительность определения ($\sim 5 \times 10^{-6}$ М) недостаточна при анализе реальных объектов, поэтому были исследованы различные способы прямого детектирования с использованием фотометрических реагентов, в качестве которых взяты 4-(2-пиридилазо)резорцин (ПАР) и ксиленоловый оранжевый (КО), широко применяемые при хроматографическом и спектрофотометрическом определении ионов переходных металлов. Для оптимизации условий детектирования при электрофоретическом анализе были получены спектры поглощения реагентов и соответствующих комплексов с металлами (рис. 1, 2).

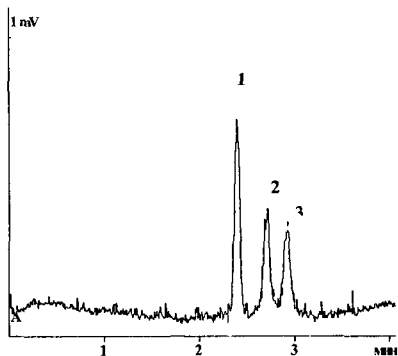
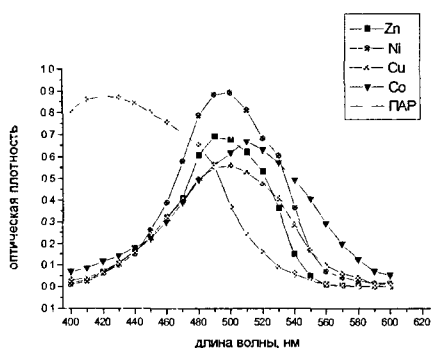


Рис. 1. Спектры поглощения ПАР и комплексов Me-ПАР
20 мМ тетраборат натрия, pH 9,18
Спектрофотометр СФ-46

Рис. 2. Электрофореграмма комплексов Co^{2+} -ПАР (1), Cu^{2+} -ПАР (2) и Zn^{2+} -ПАР (3). «Капель 105 Р». Капилляр: $L_{эфф}=30$ см, $L_{общ}=60$ см, $d_{внутр}=75$ мкм. $\lambda_{макс}=540$ нм; ввод гидродинамический – 30 мбар/10 с, + 25 кВ Рабочий электролит – 8 мМ боратный буфер (pH 7,8) + 8 мМ янтарной кислоты

Для электрофоретического определения ионов Al^{3+} и Fe^{3+} (pH < 4,0) выбран универсальный фотометрический реагент – ксиленоловый оранжевый (КО)

В 90-х г. предложен метод электроинжекционного анализа (ЭИА), позволяющий осуществлять фотометрическую реакцию непосредственно в кварцевом капилляре. Проба и реагент электрокинетически вводятся с противоположных концов капилляра и движутся навстречу друг другу (рис 3.).

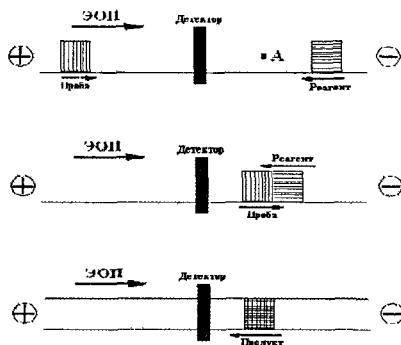


Рис. 3 Схема электроинжекционного метода анализа

Требования к ЭИА:

$$\mu_{\text{Реагент}} < 0; |\mu_{\text{Реагент}}| \gg |\mu_{\text{ЭОП}}|$$

$$\mu_{\text{Продукт}} < 0; |\mu_{\text{Продукт}}| \gg |\mu_{\text{ЭОП}}|$$

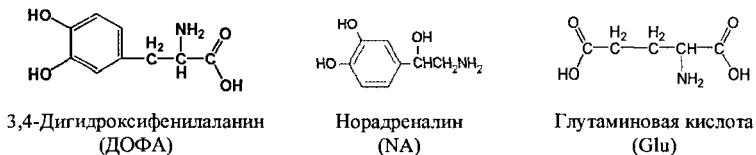
Нами показано, что в зависимости от различий в подвижностях реагента (μ_R) и образующихся комплексов металлов ($\mu_{\text{Me-R}}$) возможны два варианта ЭИА: при $\mu_{\text{Me-R}} > \mu_R$ ЭИА проводится с использованием селективного реагента; при $\mu_{\text{Me-R}} < \mu_R$ возможно применение как селективных, так и универсальных реагентов. Первый вариант был реализован при определении ионов Co^{2+} с нитрозо-Р-солью (селективный реагент) и второй – для одновременного определения Al^{3+} и Fe^{3+} с ксиленоловым оранжевым (универсальный реагент).

Изучение влияния различных факторов (состав и pH рабочего электролита, соотношение концентраций реагент/металл, время ввода пробы, состав буферного раствора при подготовке пробы, время взаимодействия реагента с аналитом, присутствие мешающих ионов) позволило предложить схемы определения Co^{2+} в фармацевтических препаратах и биологически активных добавках на основе бурых водорослей в диапазоне содержаний кобальта 10 – 300 мкг/л и Al^{3+} (свободного и общего) в природной воде (0,1 – 2,0 мг/л) в присутствии Fe^{3+} (III) в соизмеримых количествах (0,1 – 2,0 мг/л). Использование наряду с фотометрическими реагентами *on-line* концентрирования – стекинга с большим вводом пробы и стекинга с усилением поля – привело к снижению пределов обнаружения (6 – 10 мкг/л).

В 4-й главе обсуждаются возможности определения биологически активных органических соединений в форме их комплексов с биогенными металлами различными вариантами капиллярного электрофореза: зонного и мицеллярного.

После серии предварительных экспериментов с различными биологически активными соединениями более подробно мы остановились на изучении процессов

комплексообразования с участием 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА), норадrenalина (NA) и глутаминовой кислоты (Glu)



В качестве биогенного металла, в основном, использовались ионы меди Cu^{2+} .

Такой выбор обусловлен следующим: молекулы этих соединений, как и изученных ранее фотометрических реагентов, содержат фенольные гидроксилы (NA, ДОФА), амино- (NA, ДОФА, Glu) и карбоксильные группы (ДОФА и Glu), они являются диагностическими маркерами многих заболеваний и способны образовывать координационные соединения с различными биогенными металлами; наибольшее число публикаций, обсуждающих образование координационных соединений с лекарствами и компонентами биологических сред, посвящено меди

Логика постановки электрофоретических экспериментов была такой же, как и при использовании фотометрических реагентов:

- получение спектров поглощения исходных органических соединений и смесей каждого из них с ионами (Cu^{2+}) (см. в качестве примера Рис. 4) для установления оптимальной длины волны при электрофоретическом детектировании,
- изучение возможностей электроинжекционного (ЭИА) и электрофоретически опосредованного микроанализа (ЭОМА) для этих систем,
- использование режима традиционного КЗЭ с введением в кварцевый капилляр предварительно подготовленного комплекса *органический лиганд – металл*, так и добавление в состав буферного электролита (35 мМ боратный буфер; pH 8,6) одного из участников комплексообразования.

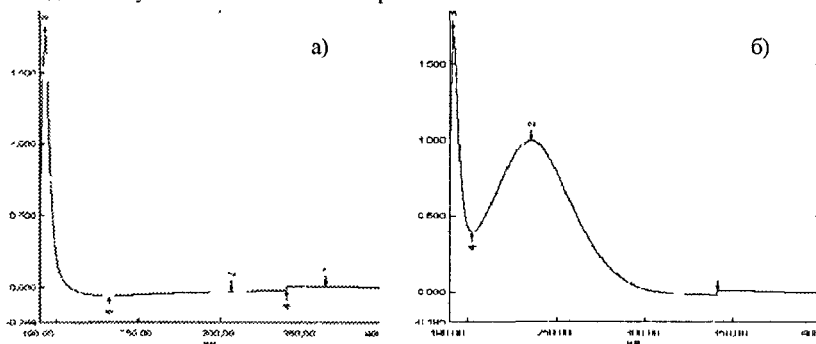


Рис. 4. Спектры поглощения глутаминовой кислоты (а) и комплекса глутаминовая кислота+ Cu^{2+} ; спектрофотометр Shimadzu UV-1700

NA и ДОФА хорошо поглощают в УФ-свете. Glu – практически нет и элюируется после электроосмотического потока (ЭОП) в форме едва заметного пика. Добавление ионов Cu^{2+} позволило увеличить чувствительность определения глутаминовой кислоты более, чем в 10 раз (рис. 5), а использование стеклинга с усилением поля или с большим вводом пробы – снизить еще предел ее обнаружения в 5 – 15 раз

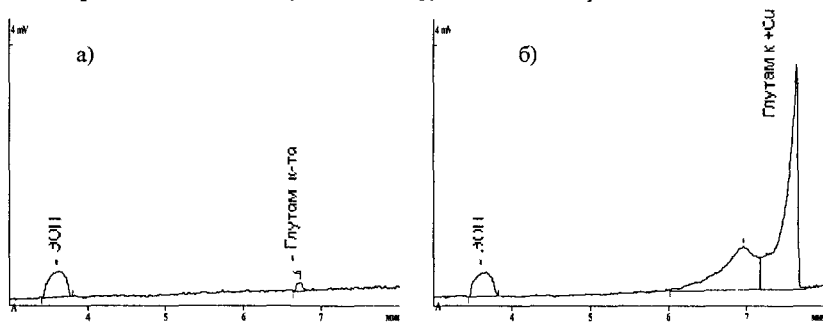


Рис. 5. Электрофореграмма глутаминовой кислоты (а) и ее комплекса с Cu^{2+} (мольное соотношение 1:1) (б). Условия: «Капель 103 РЕ», $\lambda = 254 \text{ нм}$, $L_{\text{обл}}/L_{\text{эфф}} = 60/30 \text{ см}$, $d = 75 \text{ мкм}$, ввод пробы 30 мбар, 20 с; рабочий электролит: 35мМ боратный буфер, pH 8,5.

Рассчитанные значения электрофоретических подвижностей NA, ДОФА и Glu, а также соответствующих им комплексов с ионами Cu^{2+} оказались по абсолютной величине меньшими, чем значение скорости ЭОП (табл.), что не позволяло реализовать схему электроинжекционного анализа.

Таблица. Электрофоретические подвижности ЭОП, органических лигандов и их комплексов с Cu^{2+}

pH	Электрофоретическая подвижность, $\mu \text{ (cm}^2/\text{kV c)}$						
	ЭОП	ДОФА	ДОФА+ Cu^{2+}	NA	NA+ Cu^{2+}	Glu	Glu+ Cu^{2+}
8,5	0,470 $\pm 0,002$	- 0,177 $\pm 0,001$	- 0,236 $\pm 0,002$	- 0,066 $\pm 0,001$	- 0,115 $\pm 0,002$	- 0,238 $\pm 0,002$	- 0,245 $\pm 0,003$

При этом оставалась возможность осуществления электрофоретически опосредованного микроанализа (ЭОМА), когда реагент и анализируемая проба вводятся с анодного конца капилляра «вдогонку» друг за другом. Нами исследован такой вариант образования комплекса в потоке «Медленным» реагентом выступал биологически активный органический лиганд (NA, ДОФА, Glu), вводимый в кварцевый капилляр первым «Быстрым» (догоняющим) – раствор Cu^{2+} . Между зонами реагентов вводили буферный электролит (время ввода варьировалось: 0, 10, 30, 60 с).

При большом времени ввода (60 с) буфера комплекс практически не успевал образовываться. При снижении времени от 30 с до 10 с степень конверсии увеличивалась в ~ 5 раз (рис. 6)

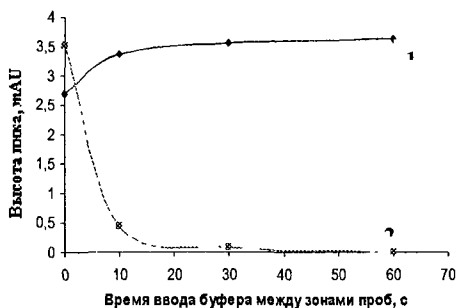


Рис. 6. Зависимость высот пиков ДОФА (1) и комплекса ДОФА+Cu²⁺ (2) от времени ввода буферного электролита между зонами проб в режиме ЭОМА

33 мМ боратный буфер (рН 8,5). Ввод пробы: 30 мбар х 20 с 2,5·10⁻⁴ М ДОФА; +20 кВ х t с буфер, 30 мбар х 20 с 1·10⁻⁴ М раствора Cu²⁺. Анализ: +20 кВ, 72 мкА. «Капель 103 РЕ», λ=254 нм

Изучено влияние соотношения концентраций *металл – лиганд* (рис. 7) и времени ввода пробы (рис. 8) на интенсивность аналитического сигнала при различных вариантах электрофоретического анализа. Общий вид электрофореграмм представлена рис. 9.

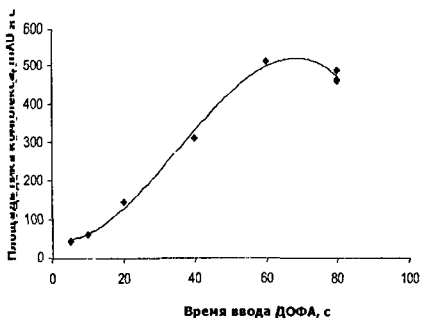
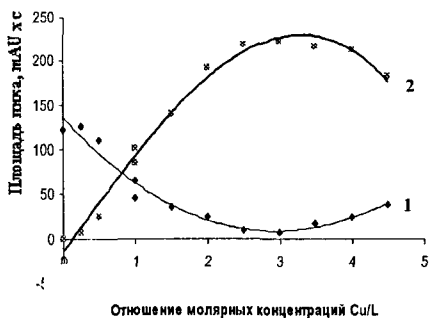


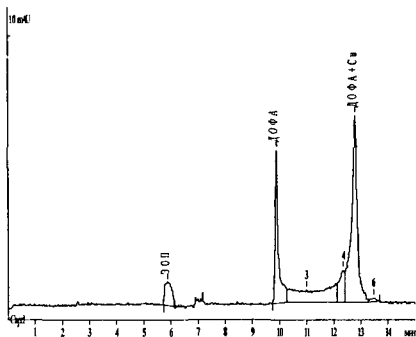
Рис. 7. Зависимость площади пика ДОФА (1) и комплекса ДОФА+Cu²⁺ (2) от молярного отношения концентраций Cu²⁺; ДОФА

35 мМ боратный буфер (рН 8,6);

«Капель 105 Р» Капилляр – L_{эф}=50 см, d_{внутр}=75 мкм; УФ-детектор, λ_{макс}=220 нм; ввод -- гидродинамический 30 мбар х 20 с, + 20 кВ

Рис. 8. Зависимость площади пика комплекса ДОФА+Cu²⁺ от времени ввода (с) пробы ДОФА (2х10⁻⁴ М)

35 мМ боратный буфер (рН 8,5) с добавкой 2х10⁻⁴ М Cu²⁺.



Максимальной степени конверсии соответствует соотношение концентраций Cu²⁺/L ~ 3 (рис. 8) и время ввода 60 с (рис. 9)

Рис. 9. Электрофореграмма комплекса ДОФА 4х10⁻⁴ М + Cu²⁺ 2х10⁻⁴ М.
Остальные условия представлены на рис. 7.

При наличии ионов Cu^{2+} в составе буферного электролита чувствительность определения ДОФА возрастает ~ в 2 раза и на электрофореграмме фиксируется только пик соответствующего комплекса (рис 10)

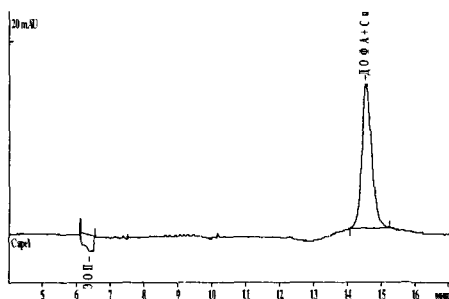


Рис. 10. Электрофореграмма полученного в капилляре комплекса ДОФА+ Cu^{2+} . Рабочий электролит 35 мМ боратный буфер (pH 8,5) с добавкой Cu^{2+} (2×10^{-4} М).

Основываясь на полученных результатах, можно предложить возможные структуры образующихся комплексов (рис 11).

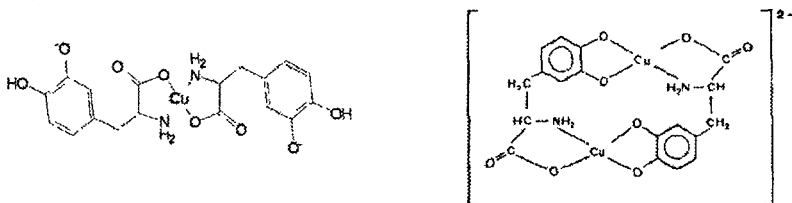


Рис. 11. Предполагаемые структуры образующихся комплексов ДОФА+ Cu^{2+}

Изменение условий электрофоретического анализа (10 мМ тетраборат натрия, pH 9,18) и варьирование концентрации ионов Cu^{2+} позволило разделить энантимеры D,L-ДОФА (рис. 12), что крайне важно при проверке энантимерной чистоты соответствующего лекарственного препарата (L-ДОФА)

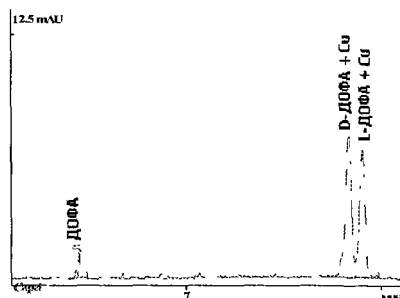


Рис.12. Разделение энантимеров (электрофореграмма пробы DL-ДОФА+ Cu^{2+})

Рабочий электролит – 10 мМ тетраборат натрия, pH 9,18 «Капель 105 Р», $\lambda = 220$ нм, $L_{\text{общ}}/L_{\text{эфф}} = 60/50$ см, $d = 75$ мкм, ввод пробы 30 мбар, 10 с

Появление интенсивного сигнала комплекса непоглощающей глутаминовой кислоты с ионами Cu^{2+} при КЭ-определении дало основание провести подобные

эксперименты и с участием других, непоглощающих в УФ- (валин, аланин) и поглощающих кислот (цистеин, цистин, тирозин, триптофан) Большинство из них ответственны за процессы комплексообразования белков, нейропептидов, лекарственных препаратов с биогенными металлами

При введении в кварцевый капилляр аланина (или валина) с Cu^{2+} в молярном соотношении 1:1 регистрируется интенсивный сигнал практически одновременно с ЭОП, что свидетельствует о нейтральном характере образующегося комплекса, состав которого 2:1 (органический лиганд металл).

Предел обнаружения со стеклингом непоглощающих в УФ кислот составил $\sim 1 \cdot 10^{-7}$ М Хорошо поглощающие в УФ- аминокислоты – тирозин и триптофан – при добавлении к анализируемой пробе Cu^{2+} увеличивают интенсивность сигнала в 1,5-2 раза ($\lambda = 214$ нм), а разрешение (R_s) \sim в 5 раз

Согласно литературным данным, для белков в составе которых содержатся серосодержащие аминокислоты (цистин, цистеин, гистидин) отмечено наиболее сильное удерживание стационарными фазами, насыщенными ионами Cu^{2+} или Zn^{2+} . Было изучено взаимодействие этих кислот с ионами металлов в разных вариантах КЭ Индивидуальные аминокислоты элюируются в форме анионов размытыми пиками малой интенсивности, которая возрастает в 4 – 5 раз при введении ионов Cu^{2+} (рис 13) Образующиеся комплексы элюируются практически вместе с ЭОП, т.е нейтральны При этом общее время анализа резко сокращается

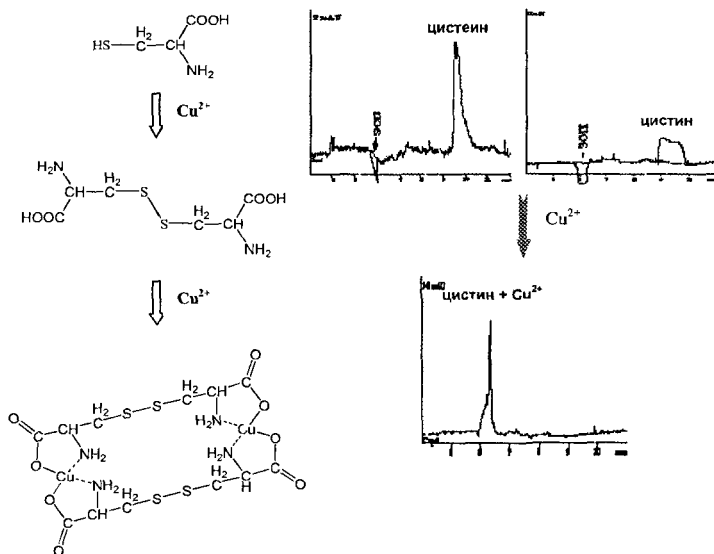
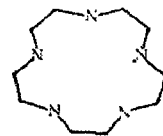


Рис. 13. Электрофореграммы цистеина и цистина и их комплекса с ионами Cu^{2+} . Возможная схема образования комплекса.

Сделано любопытное наблюдение цистеин и цистин, введенные в кварцевый капилляр, заполненный боратным буфером и содержащим ионы Cu^{2+} , образовывали один и тот же комплекс (рис 13) Было высказано предположение, что легко окисляемый цистеин в присутствии ионов Cu^{2+} переходит в цистин, и последний взаимодействует с ионами меди, находящимися в избытке, с образованием нейтрального комплекса.

Интересной моделью в качестве возможного органического лиганда явился азомacroцикл – циклам. Известно, что азотистые макроциклы входят в состав многих антибиотиков, обеспечивая селективный захват ионов металлов



Циклам

Изучено его взаимодействие с ионами Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} и Al^{3+} . Варьировались концентрации, менялись условия проведения электрофоретических экспериментов в соответствии с описанной выше логикой. Максимальное взаимодействие обнаружено для ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} (рис. 14) Образующийся комплекс характеризуется высокой интенсивностью поглощения и элюируется в форме катиона до ЭОП (рис. 14 б), сам циклам практически не поглощает в УФ-области (рис. 14 а)

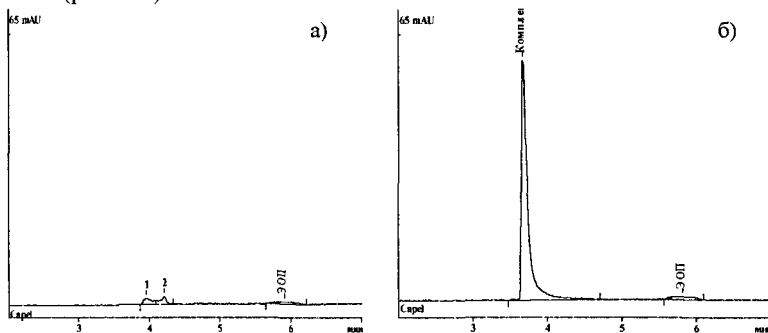


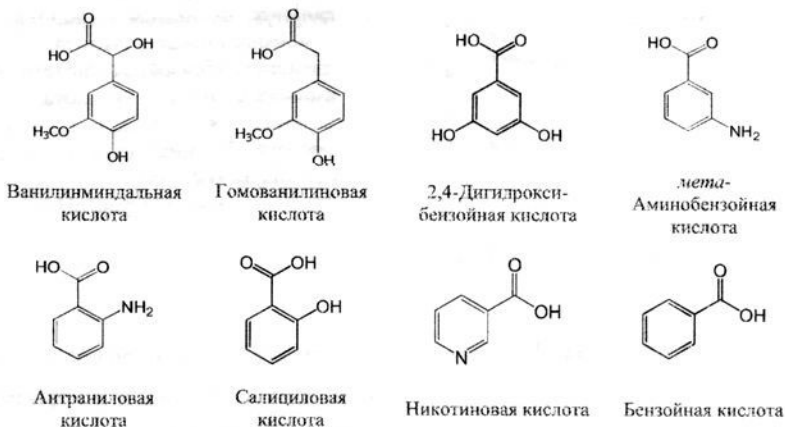
Рис. 14. Электрофореграмма циклама (а) и его комплекса с медью 1:1 (б)
35мМ боратный буфер, рН 8,5 «Капель 105 Р», $\lambda = 250$ нм, $L_{\text{общ}}/L_{\text{эфф}} = 60/50$ см, $d = 75$ мкм, ввод пробы: 30 мбар, 30 с

Полученные закономерности при изучении индивидуальных биологически активных органических лигандов позволили перейти к исследованию модельных смесей сложного состава и к реальным объектам

В рабочий буфер (35 мМ боратный буфер; рН 8,6) вводили 1 мМ Cu^{2+} . Во избежание возможной сорбции катионов меди в подобных экспериментах в буфер добавляли органический растворитель – ацетонитрил (10%) и/или ион-парный агент ДДСН (2 мМ)

В качестве модельной системы выбрана смесь ароматических органических кислот (ванилинминдальная, гомованилиновая, 2,4-дигидроксibenзойная, м-аминобензойная,

салициловая, антралиловая, аскорбиновая, бензойная), в молекулах которых наряду с карбоксильной группой и ароматическим кольцом содержатся аминогруппы и фенольные гидроксилы. Среди них – нейротрансмиттеры, лекарственные препараты, консерванты.



При введении ионов Cu^{2+} увеличивается разрешение и наблюдается полное разделение всех компонентов (рис 15).

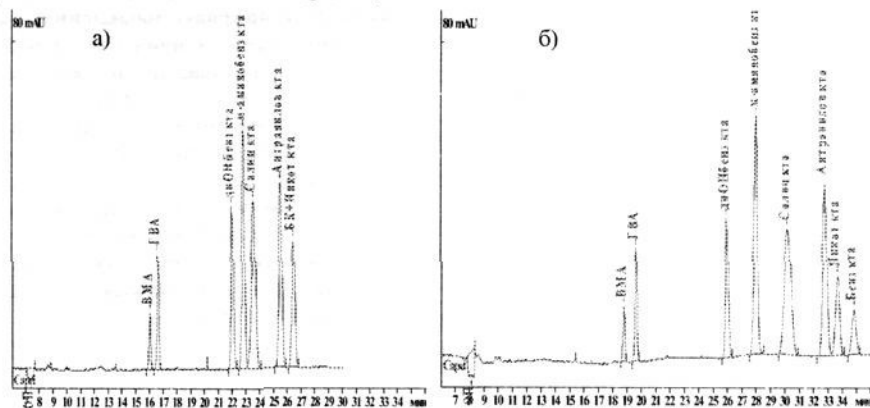


Рис. 15. Электрофореграмма модельной смеси ароматических кислот

а) 35 мМ боратный буфер (pH 8,5), 10 % ацетонитрила;

б) 35 мМ боратный буфер (pH 8,5), 10 % ацетонитрила: 1 мМ Cu^{2+} .

«Капель 105 Р». Капилляр – $L_{\text{эфф}}=50$ см, $d_{\text{внутр}}=75$ мкм; УФ-детектор, $\lambda_{\text{макс}}=214$ нм; + 20 кВ; ввод – гидродинамический 30 мбар, 20 с.

На рис. 16 представлена зависимость разрешения (Rs) от добавления ионов меди в буферный электролит. Видно, что для пары никотиновая – бензойная кислота Rs изменяется с 0 до 2; для *м*-аминобензойной - салициловой кислот – в 2 раза; 2,4-дигидроксибензойной - *м*-аминобензойной кислот более, чем в 2 раза.

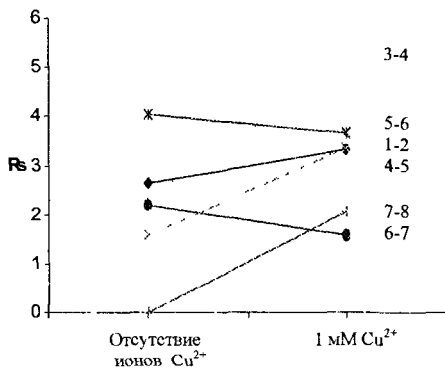


Рис. 16. Разрешение различных пар органических кислот (1 – ванилинминдальная кислота; 2 – гомованилиновая кислота; 3 – 2,4-дигидроксибензойная кислота; 4 – м-аминобензойная кислота; 5 – салициловая кислота; 6 – антраниловая кислота; 7 – никотиновая кислота; 8 – бензойная кислота) 35 мМ боратный буфер, рН 8,5

Изучено влияние ряда факторов (время ввода пробы, напряжение и длина волны детектирования) на интенсивность аналитического сигнала, разрешение и эффективность, влияние на эти характеристики других катионов металлов (рис 17)

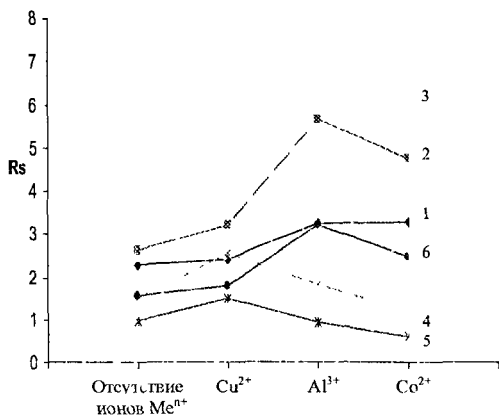


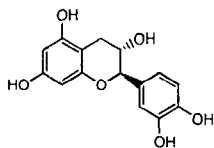
Рис. 17. Зависимость разрешения (Rs) различных пар органических кислот от природы добавленного в рабочий буфер катиона Meⁿ⁺ (1 мМ) (1 – ванилинминдальная кислота/ гомованилиновая кислота; 2 – дигидроксибензойная к-та/ м-аминобензойная кислота; 3 – м-аминобензойная кислота/ салициловая кислота; 4 – салициловая кислота/ антраниловая кислота; 5 – антраниловая кислота/ никотиновая кислота; 6 – никотиновая кислота/ бензойная кислота)

Влияние ионов Cu²⁺, в первую очередь, сказывается на поведении кислот, в молекулах которых присутствуют аминогруппы или атом азота в составе гетероцикла, а наличие ионов Al³⁺ значительно изменяет электрофоретические характеристики кислот, содержащих фенольные гидроксилы.

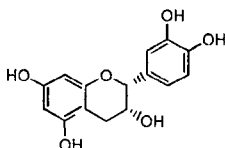
Последнее обстоятельство явилось причиной электрофоретического изучения возможности взаимодействия биогенных металлов Me³⁺ (Al³⁺, Fe³⁺) с природными антиоксидантами – полифенолами, которые обладают противораковыми и антибактериальными свойствами.

Из литературных данных известно, что полифенолы образуют комплексы с ионами металлов, в первую очередь ионами Fe^{3+} и Al^{3+} , предотвращая их участие в окислительных процессах.

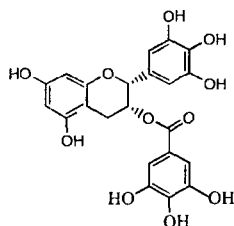
В качестве стандартов были выбраны важнейшие: катехин (С), эпикатехин (ЕС) и эпигаллокатехин галлат (EGCG) Последний – обладает максимальной антиоксидантной активностью.



(+)-Катехин
(С)



(-)-Эпикатехин
(ЕС)



(-)-Эпигаллокатехин галлат
(EGCG)

Сами полифенолы и их комплексы элюируются в форме анионов с различными электрофоретическими подвижностями Эпигаллокатехин галлат в выбранных условиях и при соотношении молярных концентраций $EGCG \cdot Fe^{3+}$ равном 1:1 расходуется практически полностью (рис 18)

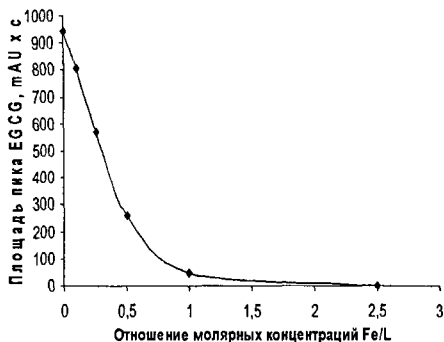


Рис. 18. Зависимость уменьшения высоты пика EGCG при добавлении ионов Fe^{3+} к пробе

25мМ боратный буфер (pH 8,5)
Концентрация EGCG – 1×10^{-4} М
Прибор. «Капель 105 Р», $\lambda = 200$ нм,
 $L_{обл}/L_{эфф} = 60/50$ см , $d = 50$ мкм, ввод
пробы 30 мбар, 60 с

В большей степени эта тенденция выражена для ионов Fe^{3+}

Получив эти результаты, перешли к реальному объекту – зеленому чаю, в составе которого наряду с полифенолами (катехинами) содержится кофеин В режиме зонного капиллярного электрофореза смесь указанных катехинов полностью не разделяется, поэтому был выбран мицеллярный вариант (25 мМ фосфатный буфер; pH 7,0; 25 мМ ДДСН).

Все полифенолы образуют комплексы с ионами железа (III), которые детектируются в видимой области. На электрофореграмме регистрируется только пик кофеина (рис. 19), что может быть использовано при определении последнего в случае плохого разрешения остальных компонентов.

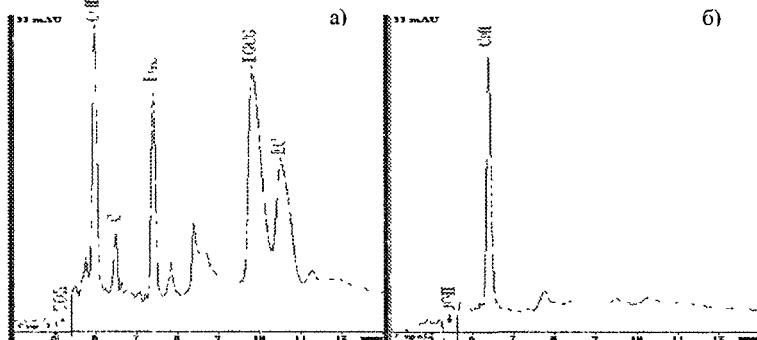


Рис. 19. Электрофореграмма водного экстракта зеленого чая
а) водный экстракт зеленого чая; б) водный экстракт зеленого чая с добавкой в пробу ионов Fe^{3+}
 25ММ фосфатный буфер, рН 7,0; 25 ММ ДДСН. $\lambda = 200$ нм. Остальные условия см. рис. 18

Оставалось непонятным, что доминирует в наблюдаемом комплексобразовании: 1,2-диольные фенольные гидроксилы (пирокатехиновые) или 1,3- (резорциновые). Именно поэтому нами была проведена серия специальных экспериментов с простейшими фенолами: резорцином и пирокатехином.

При взаимодействии ионов Fe^{3+} со смесью указанных фенолов наблюдается резкое снижение пика пирокатехина и лишь незначительное – резорцина. Таким образом, в первую очередь, в комплексобразовании участвуют пирокатехиновые (1,2-диольные) фенольные гидроксилы.

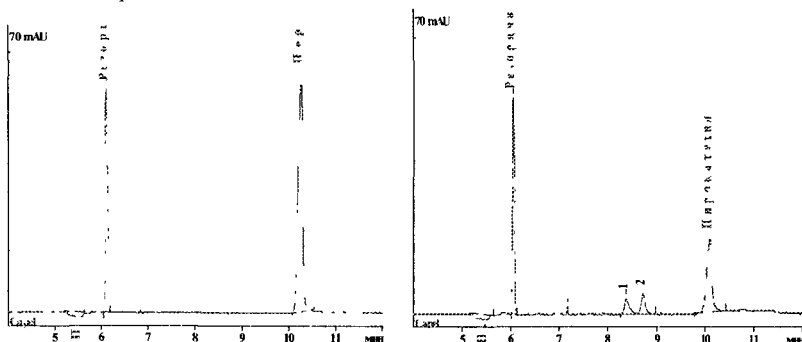


Рис. 20. Электрофореграмма смеси резорцина и пирокатехина (а) и этой же смеси после добавления ионов железа (III) к этой пробе (б)
 Концентрация органических лигандов – 1×10^{-4} М. Концентрация ионов железа – 1×10^{-4} М
 $\lambda = 214$ нм. Остальные условия см. рис. 18

В 5-ой главе рассматриваются основные практические приложения.

Предложены схемы определения ионов Al^{3+} в форме комплекса с ксиленоловым оранжевым в природных водах в присутствии главной мешающей примеси ионов Fe^{3+} и определения ионов Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} в форме комплексов с 4-(2-пиридилазорезорцином) в витаминах «Компливит» (ПО 6 – 10 мкг/л).

Одним из важных результатов является влияние ионов Cu^{2+} в составе буферного электролита для количественного определения гомованилиновой (ГВА) и ванилинминдальной (ВМА) кислот – диагностических маркеров опухоли (нейробластомы, феохромоцитомы). Хорошего разрешения удается достигнуть только в случае смеси стандартов при использовании рабочего буфера, содержащего β -циклодекстрин. Реальный объект имеет значительно более сложный электрофоретический профиль. Поэтому был предложен альтернативный подход при определении ВМА и ГВА в таком объекте: добавление ионов Cu^{2+} в состав рабочего буфера (в режиме КЗЭ). Полученные результаты подтвердили возможность одновременного качественного и количественного определения ВМА и ГВА с хорошим разрешением ($R_s \sim 2$) от мешающих пиков, чего не удавалось добиться ранее (рис. 21).

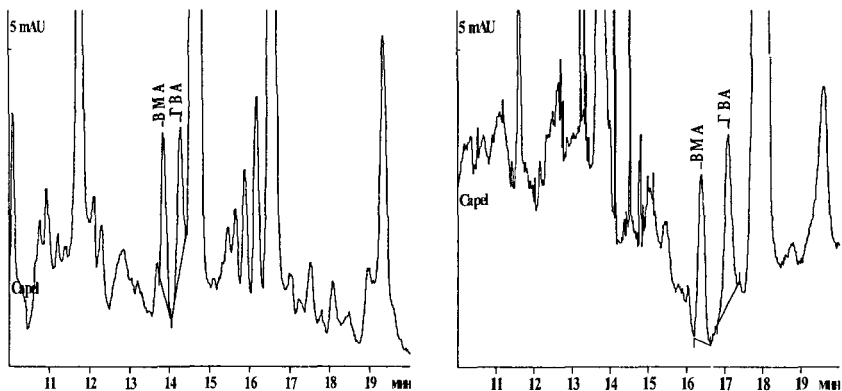


Рис. 21. Электрофореграмма реальной пробы мочи в режиме КЗЭ на буфере без добавления меди (а) и с добавлением в рабочий буфер 1 мМ ионов меди (б) «Капель-105Р» Капилляр: $L_{эфф}=50$ см, $d_{внутр}=50$ мкм, УФ-детектор, $\lambda_{макс}=200$ нм. Буферный электролит 35 мМ боратный буфер pH 8,6, 10% ацетонитрила; ввод – гидродинамический 30 мбар, время ввода 10 с, + 20 кВ.

ВЫВОДЫ

1. Обоснован выбор аналитических форм биогенных металлов (Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) с фотометрическими реагентами (пиридилазорезорцин, ксиленоловый оранжевый, нитрозо-Р-соль) для их электрофоретического определения.
2. Выявлены преимущества и ограничения различных схем электроинжекционного метода и электрофоретически опосредованного микроанализа при определении биогенных металлов в зависимости от природы реагента, относительных значений электрофоретических подвижностей реагента, комплекса, электроосмотического потока. Использование различных вариантов стеклинга (стекинг с большим вводом пробы и стеклинг с усилением поля) с пределом обнаружения 6 – 10 мкг/л.
3. Реализованы различные варианты и режимы электрофоретического анализа смесей биологически активных соединений (биогенные амины, аминокислоты, гидроксикарбоновые кислоты, полифенолы) в форме их комплексов с биогенными металлами: с введением в кварцевый капилляр предварительно приготовленного комплекса или при наличии одного из участников комплексообразования в составе буферного электролита.
4. На примерах непоглощающих в УФ-свете аминокислот (глутаминовой, аланина, валина) и азомакроцикла (циклама) установлено, что чувствительность их определения возрастает в 10 – 30 раз при использовании ионов меди в составе буферного электролита.
5. Установлены закономерности влияния ионов Me^{n+} в составе рабочего электролита на эффективность, селективность и коэффициенты разрешения ароматических органических кислот с гидроксильными и аминогруппами. Показано, что добавление ионов Cu^{2+} позволяет разделить никотиновую и бензойную кислоты, добавление ионов Al^{3+} приводит к улучшению разрешения (R_s) (в 2 раза) всех компонентов системы органических кислот.
6. Обнаружена высокая комплексообразующая способность природных антиоксидантов полифенольного типа с ионами Fe^{3+} . Показано, что доминирующим фактором в образовании таких комплексов является наличие пирокатехиновых фрагментов (1,2-фенольных гидроксильных групп) в составе молекул полифенолов.
7. В соответствии с установленными закономерностями предложены схемы электрофоретического анализа:
 - определение ионов Al^{3+} в форме комплекса с ксиленоловым оранжевым в природных водах (ПО 10 мкг/л);
 - определение ионов Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} в форме комплексов с 4-(2-пиридилазорезорцинном) в витаминах «Компливит» (ПО 6 мкг/л)
 - определение ванилинминдальной и гомованилиновой кислот – маркеров нейроblastомы – в моче в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии (фосфатный буфер (рН 7,0), 150 мМ ДДСН) и методом капиллярного зонного электрофореза (боратный буфер (рН 8,5), 1 мМ Cu^{2+})Показана возможность одновременного количественного определения этих кислот как в норме, так и в патологии (диагностика, контроль лечения),

Основные материалы диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Маркова О.И., Никитина Т.Г., Москвин Л.Н., Андреев В.П. Электроинжекционное определение алюминия в водных растворах // Журнал аналитической химии. 2006. Т.61 №2. С.192 – 198.
2. Карцова Л.А., Попова А.М., Сидорова А.А., Маркова О.И. Оценка констант устойчивости органических веществ кислотного и основного характера с 18-краун-6 и β -циклодекстрином методом капиллярного зонного электрофореза // Журнал аналитической химии. 2007. Т. 62. № 2. С. 198 – 203.
3. Никитина Т. Г., Маркова О. И., Андреев В. П. Определение микроконцентраций кобальта методом электроинжекционного анализа // 1-ая Всероссийская конференция «Аналитические приборы» СПб 2002 С. 15.
4. Маркова О. И., Андреев В. П., Никитина Т. Г. Применение «Капели-103РЕ» для определения катионов металлов методами электроинжекционного анализа и электрофоретически опосредованного микроанализа // Всероссийская конференция «Актуальные проблемы аналитической химии». Москва 2002. С. 259
5. Маркова О. И., Никитина Т. Г., Крашенинников А. А., Андреев В. П. Разделение катионов тяжелых металлов методом электрофоретически опосредованного микроанализа // Международный симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии» Краснодар 2002. С. 282
6. Никитина Т. Г., Маркова О. И., Андреев В. П., Москвин Л. Н. Determination of toxic cations by electroinjection analysis // Международная конференция «SIS03 Separation of Ionic Solutes» Братислава 2003
7. Маркова О. И., Никитина Т. Г., Москвин Л. Н. Электроинжекционное определение алюминия в природных объектах // VI Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА – 2004» с международным участием. Уфа 2004 С. 197.
8. Маркова О. И., Никитина Т. Г., Москвин Л. Н., Андреев В. П. Электроинжекционное определение катионов металлов в природных объектах. // Конференция «Аналитика России» Москва, Клязьма 2004 С. 91 – 92.
9. Маркова О.И., Карцова Л.А., Сидорова А.А. Определение гомованилиновой и ванилинминдальной кислот методом зонного капиллярного электрофореза с β -циклодекстрином в составе буферного электролита // Материалы II Международного симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической и радиохимии». Краснодар. 2005 С. 371-372
10. Markova O.I., Kartsova L.A. Electrophoretic studying of complexation processes of copper with biologically active organic ligands // The Jubilee XXXth Symposium "Chromatographic methods of investigating the organic compounds". Katowice-Szczyrk, Poland, 12 – 14 June 2006 Book of Abstracts P. 116
11. Kartsova L. A., Markova O. I. The electrophoretic investigation of complexation processes of biogenic metals with biologically active ligands // 29th International Symposium on Capillary Chromatography. Palazzo dei Congressi, Riva del Garda, Italy. May 29 – June 2 2006. H. 17

Подписано в печать 06.02.2007.

Формат бумаги $60 \times 84 \frac{1}{16}$. Бумага офсетная

Печать ризографическая Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ 3930.

Опечатано в отделе оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ.

198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр.26

14

- - - - -