



УДК 543.07

Сверхразветвленные полимеры – модификаторы хроматографических (ВЭТСХ) и электрофоретических (КЭ) систем

Карцова Л.А., Дзема Д.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 12.07.2013 г.

Аннотация

Проведены исследования по выявлению возможностей использования сверхразветвленных полимеров на основе полиэтиленимина, окруженных оболочкой олигосахаридных фрагментов, в условиях ВЭТСХ и КЭ на примере разделения аналитов гидрофильной природы (водорастворимые витамины группы В и аминокислоты). Оптимизирована процедура модификации стационарной фазы и рабочего электролита сверхразветвленными полимерами. Обнаружен рост эффективности в 2-5 раз рибофлавин-5-фосфата, лизина, глутаминовой кислоты и триптофана (ВЭТСХ) и факт динамической модификации стенок кварцевого капилляра дендритными полимерами (КЭ).

Ключевые слова: сверхразветвленные полимеры, высокоэффективная тонкослойная хроматография, капиллярный электрофорез, водорастворимые витамины, аминокислоты.

The experiments to identify the possibility of using functionalized by oligosaccharides hyperbranched poly(ethyleneimine) as a component of chromatographic (HPTLC) and electrophoretic (CE) systems on example of separation of hydrophilic analytes (water-soluble vitamins and amino acids) were carried out. Modification procedures of stationary phase and working electrolyte were optimized. An increase in efficiency (2-5 times) for riboflavin-5-phosphate of sodium, lysine, glutamic acid and tryptophan was observed (HPTLC) and the fact of dynamic modification of wall quartz capillary was found.

Keywords: hyperbranched polymers, high-performance thin-layer chromatography, capillary electrophoresis, water soluble vitamins, amino acids

Введение

Сферическая форма, высокое количество терминальных групп и разветвленная структура – основные свойства сверхразветвленных полимеров, которые определяют их физико-химические свойства (высокая растворимость и термическая стабильность, низкая вязкость растворов, способность к образованию комплексов с низко- и высокомолекулярными веществами) и применение в методах разделения и концентрирования [1].

Модифицируя терминальные группы, удается контролировать реакционную способность, растворимость, адгезию к поверхности, люминесцентные и электрохимические свойства дендритных структур [2].

В случае мицеллоподобных дендритных полимеров, состоящих из гидрофобного ядра и гидрофильной «периферии», является важным, что их

структура статична, и все терминальные группы ковалентно связаны с ядром [3]. Поэтому они стабильны в широком диапазоне экспериментальных условий [4].

Использование дендритных полимеров в хроматографических и электрофоретических методах уже на данный момент позволило решить ряд аналитических задач: уменьшение сорбции и значительное увеличение эффективности определения основных аналитов в условиях КЭ [5]; снижение времени анализа и рост эффективности в МЭКХ [6-9]. Дендримеры можно использовать и как хиральные селекторы в условиях жидкостной хроматографии. Большое количество терминальных функциональных групп способствует увеличению коэффициентов энантиоселективности и эффективности [10, 11]. Имеются также публикации по применению дендримеров в условиях эксклюзионной хроматографии [12].

Аналогичные работы методом ТСХ фактически отсутствуют, в то время как легкость модификации хроматографических фаз и экспрессность анализа указывает на широкие возможности этого метода в сочетании со СРП при оптимизации процедуры разделения биологически активных соединений. Поэтому целью этой работы явилось выявление возможностей использования водорастворимых СРП полимеров на основе полиэтиленимина как модификаторов хроматографических и электрофоретических систем. Одновременно в работе исследованы комплексобразующие свойства этих СРП на примере разделения аналитов гидрофильной природы.

Эксперимент

В условиях ВЭТСХ проведена модификация стационарной и подвижной фаз водорастворимыми полимерами типа «ядро - оболочка», состоящими из сверхразветвленного полиэтилениминового ядра и привитых олигосахаридных фрагментов (мальтоза, лактоза, мальтотриоза (рис.1)) различных концентраций. Эти полимеры отличаются массой ядра (5 и 25 кДа) и степенью модификации олигосахаридами (структура А – 77%, В – 32% и С – 16%) (рис.1).

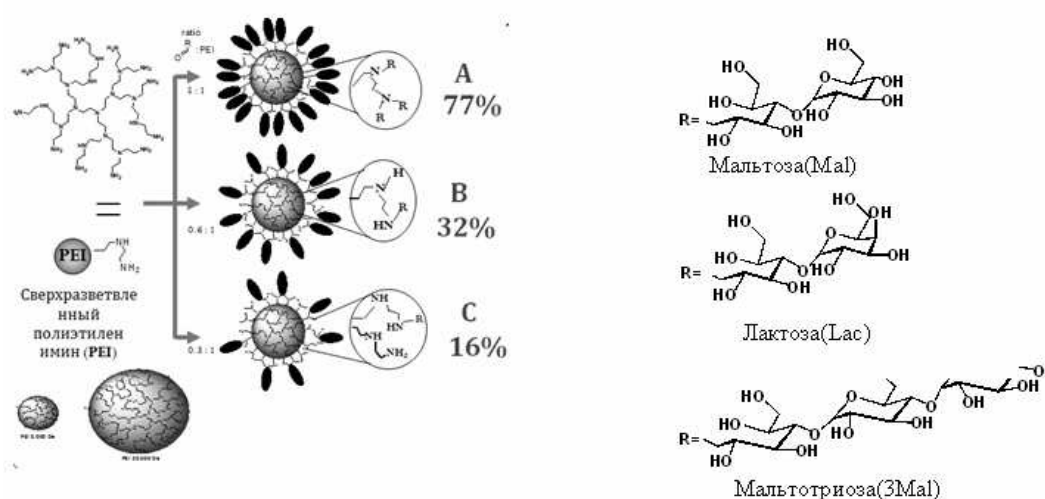


Рис. 1. Схема синтеза полимеров «ядро - оболочка» (PEI-OS)

Проведены хроматографические эксперименты с введением мальтозированных полимеров, мечеными молекулами родамина В в состав

подвижной фазы, в ходе которых установлено, что полимер сильно сорбируется на поверхности силикагелевой пластины и концентрация СРП, участвующего в разделении аналитов, ничтожно мала.

Таким образом, предпочтение отдано модификации стационарной фазы (силикагель): опрыскивание пластин раствором полимера определенной концентрации (1, 2, 3 мг/мл).

Коэффициент импрегнирования (i) оказался равным $\sim 3\text{-}5 \cdot 10^{-4}$ и рассчитывался по формуле:

$$i = (b-a)/a, \quad (1)$$

где a – масса немодифицированной пластины(г), b – масса модифицированной пластины (г).

В качестве модельных систем выбраны водорастворимые витамины группы В и аминокислоты (лизин, глутаминовая кислота, триптофан, валин, глицин). Они обладают высокой биологической активностью. Определение этих соединений является необходимым условием контроля их содержания в фармпрепаратах и пищевых продуктах.

Рабочая концентрация аминокислот составила 2 мг/мл. Растворы аналитов наносились на модифицированную СРП пластину с помощью микрошприца (1мкл).

В условиях КЭ в рабочий электролит (60 мМ боратный буферный раствор ; рН 10,2) вводились полимеры А, В, С с различной концентрацией (1, 2, 4, 8 мг/мл) и природой терминальных групп с массой ядра 5 или 25кДа.

Обсуждение результатов

В табл. 1 приведены значения параметров удерживания (R_f) и эффективностей (N) для витаминов в зависимости от природы используемого модификатора стационарной фазы (силикагель) в условиях высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Подвижная фаза – дистиллированная вода.

Влияние СРП проявилось только для фосфатной формы витамина В2 – рибофлавин-5-фосфата натрия (именно в такой форме вводится ампульный образец из-за его большей растворимости). При модификации стационарной фазы полимером А наблюдался рост эффективности в 3-4 раза для этого аналита.

В случае структур В и С отмечено увеличение сорбции аналитов и заметное снижение эффективности, что обусловлено взаимодействием отрицательно заряженного витамина с протонированными аминогруппами дендритного ядра. Полимер С характеризуется наименьшей модификацией мальтозой, а, значит, и большей доступностью его положительно заряженного ядра для аналита. В случае структуры А такое взаимодействие затруднено из-за наличия плотной олигосахаридной оболочки. Этот полимер покрывает поверхность силикагелевой пластины, нивелируя эффект взаимодействия с силанольными группами сорбента, что и привело к росту эффективности. Подобное влияние СРП наблюдалось в наибольшей степени для полимеров с мальтотриозной оболочкой (рост эффективности до $N = 8000$ т.т.).

В условиях капиллярного электрофореза в рабочий электролит (боратный буфер; рН 10,2) и в состав пробы (смесь витаминов) — вводились дендритные полимеры в различной концентрации. Наличие полимера А в составе рабочего буфера привело лишь к незначительному уменьшению времен миграции пиридоксина и аскорбиновой кислоты.

Таблица 1. Значения параметров удерживания и эффективностей водорастворимых витаминов в зависимости от структуры СРП используемого как модификатора стационарной фазы

	B1		B2*		B6		B12		C	
	R_f	N(т.т.)	R_f	N(т.т.)	R_f	N(т.т.)	R_f	N(т.т.)	R_f	N(т.т.)
Отсутствие модификатора	0.03	20	0.92	2300	0.61	1800	0.24	800	0.98	3300
PEI-Mal-A 25kDa	0.03	90	0.97	5500	0.65	1200	0.29	300	0.95	4000
PEI-Mal-B 25kDa	0.03	70	0.96	3700	0.64	1000	0.29	600	0.97	5000
PEI-Mal-C 25kDa	0.03	90	0.71	200	0.64	400	0.26	600	0.97	5000
PEI-Mal-A 5 kDa	0.05	60	0.94	3800	0.66	900	0.25	500	0.98	3200
PEI-Mal-B 5 kDa	0.05	60	0.94	3300	0.66	800	0.23	400	0.98	4300
PEI-Mal-C 5 kDa	0.05	60	0.95	3700	0.64	900	0.22	500	0.97	3100
PEI-Lac-A 5 kDa	0.03	70	0.94	3500	0.745	1000	0.29	600	0.96	4100
PEI-Lac-B 5 kDa	0.03	80	0.93	3500	0.65	900	0.29	600	0.96	3300
PEI-Lac-C 5 kDa	0.03	70	0.91	2900	0.69	1000	0.3	400	0.96	1800
PEI-3Mal-A 25kDa	0.02	60	0.97	7800	0.69	400	0.26	700	0.97	4500
PEI-3Mal-B 25kDa	0.03	70	0.97	5000	0.64	100	0.25	700	0.96	3300
PEI-3Mal-C 25kDa	0.02	70	0.35	200	0.45	50	0.23	800	0.96	4100

* рибофлавин-5-фосфат натрия

В случае полимеров с меньшим содержанием терминальных олигосахаридных групп детектируются только витамины B1 и B12. Причем, эффективность для B12 увеличивается в три раза, что можно объяснить уменьшением взаимодействия аналита со стенками капилляра (от N = 4000 до N=12000 т.т.). Ниже приведены соответствующие электрофореграммы (рис.2-4).

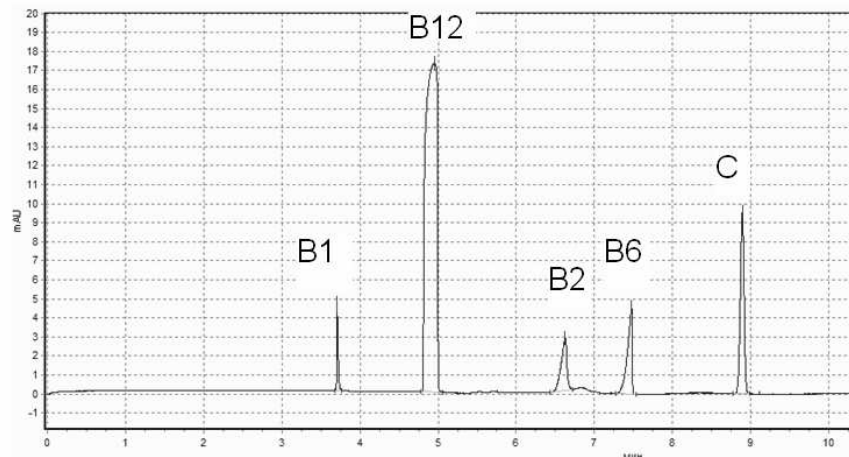


Рис. 2. Электрофореграмма смеси витаминов группы В
Условия: система КЭ «КАПЕЛЬ 105м» с УФ-детектированием ($\lambda = 254$ нм), ввод пробы гидродинамический (Зс.), рабочее напряжение 20кВ, рабочий электролит 0.06 М боратный буферный раствор (рН = 10.2).

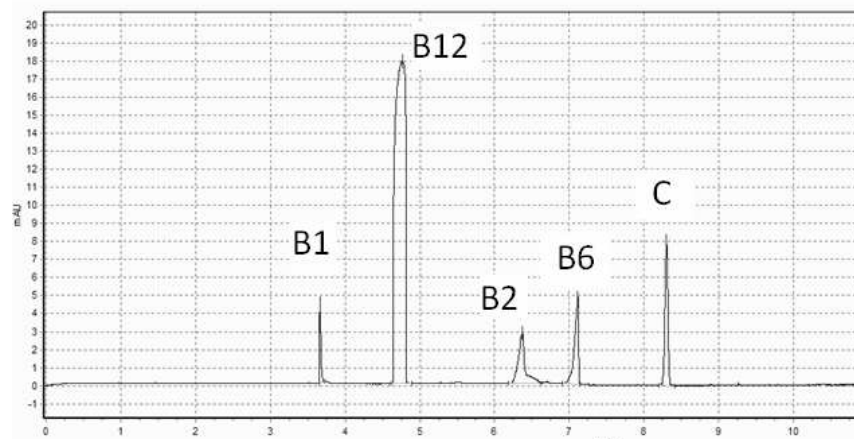


Рис. 3. Электрофореграмма смеси витаминов группы В.
Условия: см. рис.2, рабочий электролит PEI-3Mal-A 25 kDa 1мг/ мл 0.06 М боратного буферного раствора.

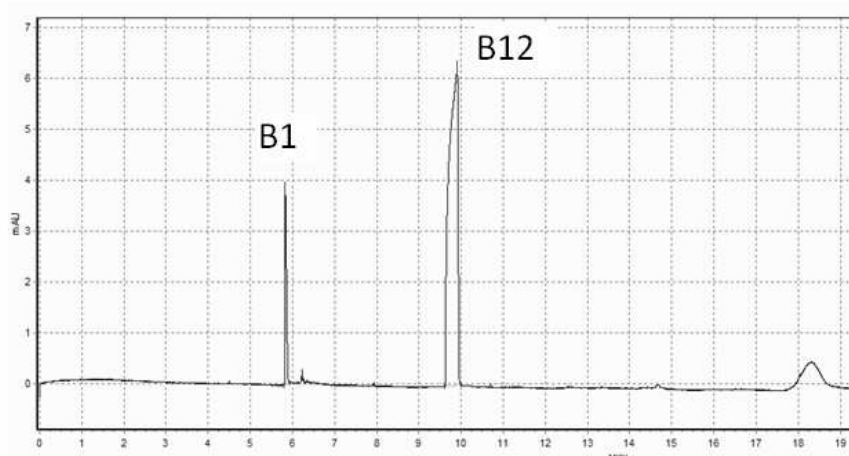


Рис. 4. Электрофореграмма смеси витаминов группы В.
Условия: см. рис.2, рабочий электролит PEI-3Mal-B 25 kDa 1мг/ мл 0,06 М боратного буферного раствора.

Высказано предположение, что введение полимеров в состав ведущего электролита приводит к динамической модификации стенок кварцевого капилляра. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению электроосмотического потока (ЭОП) и, следовательно, к значительному снижению скорости миграции отрицательно заряженных аналитов (рис.5). Факт модификации стенок капилляра указывает на возможность использования этих полимеров в целях увеличения эффективности при определении положительно заряженных или аналитов основной природы.

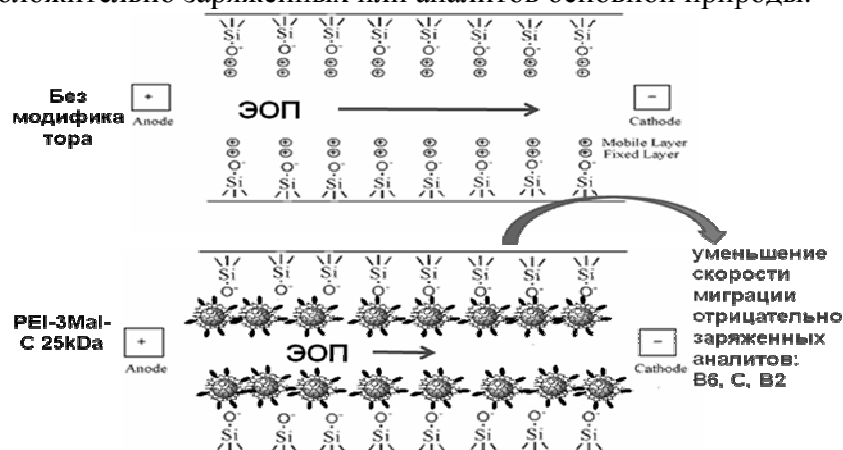


Рис. 5. Схематическое изображение внутренних стенок кварцевого капилляра без модификатора (СРП) и с ним

Некоторые интересные результаты получены и для других гидрофильных аналитов – аминокислот. В табл.2 приведены значения параметров удерживания (R_f) и эффективностей (N , т.т.) аминокислот в зависимости от природы выбранного модификатора стационарной фазы. Подвижная фаза – дистиллированная вода.

Таблица 2. Значения параметров удерживания и эффективностей аминокислот в зависимости от структуры СРП, используемого как модификатора стационарной фазы

	Lys		Val		Glu		Gly		Trp	
	R_f	N	R_f	N	R_f	N	R_f	N	R_f	N
-	0.13	16	0.75	1800	0.9	1020	0.93	1500	0.84	1800
PEI-Mal-A 25kDa	0.06	60	0.78	1400	0.93	3600	0.85	1100	0.82	1800
PEI-Mal-B 25kDa	0.06	50	0.86	1300	0.93	3300	0.92	1500	0.82	1900
PEI-Mal-C 25kDa	0.09	60	0.84	1500	0.94	3200	0.88	1500	0.83	2000
PEI-3Mal-A 25kDa	0.05	80	0.79	1500	0.93	4800	0.91	1200	0.79	2200
PEI-3Mal-B 25kDa	0.11	70	0.81	1700	0.97	4900	0.9	1200	0.83	2400
PEI-3Mal-C 25kDa	0.06	70	0.79	2200	0.95	3500	0.92	960	0.8	2900

Наиболее интересные результаты получены в случае аминокислот лизина, триптофана и глутаминовой кислоты. В большей степени влияние полимера отмечено для структур с мальтотриозной оболочкой.

Модификация такими полимерами стационарной фазы вызвала рост эффективности диаминокислоты лизина в 3-4 раза. Сорбция аналита увеличивается, что указывает на сильное взаимодействие его с полимером.

Причина увеличения сродства лизина к стационарной фазе обусловлено взаимодействием с мальтотриозной оболочкой (межмолекулярные водородные связи). Для глутаминовой кислоты и триптофана отмечен рост эффективности в пять раз и 2 раза, соответственно (рис. 6-7).

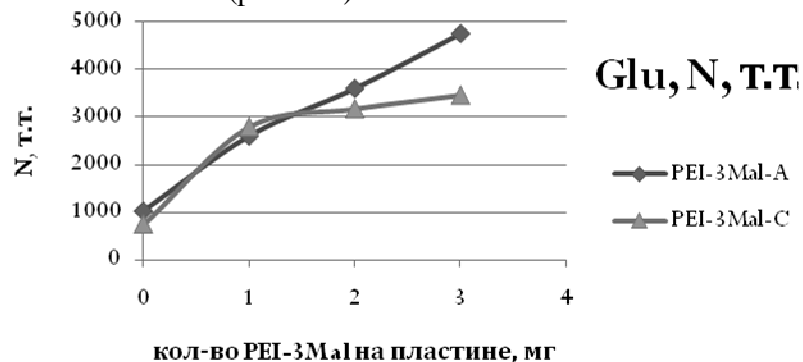


Рис. 6. Зависимость эффективности глутаминовой кислоты от концентрации и структуры (А или С) полимера в составе стационарной фазы

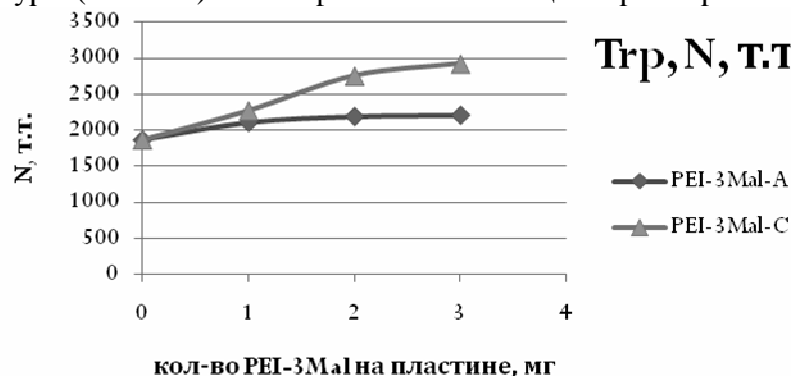


Рис. 7. Зависимость эффективности глутаминовой кислоты от концентрации и структуры (А или С) полимера в составе стационарной фазы

Все эти результаты открывают перспективы использования СРП для концентрирования этих аналитов в условиях пробоподготовки и анализа.

Заключение

В работе выявлено влияние новых водорастворимых сверхразветвленных полимеров типа «ядро - оболочка» на хроматографические характеристики витаминов группы В и аминокислот. Обнаруженный рост эффективности в 2-5 раз для глутаминовой кислоты, лизина, триптофана и витамина В₂ открывает перспективы использования этих СРП для концентрирования аналитов в условиях ВЭТСХ при определении их в сложных матрицах. Факт динамической модификации стенок кварцевого капилляра полиэтилениминовыми полимерами также указывает на возможность дальнейшего применения этих структур при разделении положительно заряженных аналитов или соединений основного характера в условиях КЭ.

Список литературы

1. Berzelius, J.J. Annual Report of Advances in Physics and Chemistry. 1847.-26
2. Jiang G., Chen W., Xia W. Chromophore-Containing Polymers for Trace Explosive Sensors // *Designed Monomers & Polymers*. 2008. V.11. P.105.
3. Gopidas K.R., Leheny A.R., Caminetti G., Turro N.J., Tomalia D.A. Photophysical Investigation of Similarities between Starburst Dendrimers and Anionic Micelles // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 113. P. 7335.
4. Tanaka N., Tamagawa T., Hosoya K., Kimata K., Araki T., Terabe S. Starburst Dendrimers as a Carriers in Electrokinetic Chromatography // *Chem. Lett.* 1992. V. 21. P. 959.
5. Chong-Qi Shou, Chang-Li Zhou, Chun-Bin Zhao, Zhi-Liang Zhang, Guan-Bin Li, Li-Ren Chen. Preparation and evaluation of non-bonded hyperbranched polymer-coated columns for capillary electrophoresis. *Talanta* 63 (2004) 887–891.
6. Pim G.H.M. Muijselaar, Henk A. Claessens, and Carel A. Cramers, Johan F.G.A. Jansen and E.W. Meijer, Ellen M.M. de Brabander-van den Berg and Sjoerd van der Wal. Dendrimers as Pseudo-Stationary Phases in Electrokinetic Chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* V. 18, 1995. P.121-123.
7. Kuzdzal S.A., Monnig C.A., Newkome G.R., Moorefield C.N. Dendrimer Electrokinetic Capillary Chromatography: Unimolecular Micellar Behavior of Carboxylic Acid Terminated Cascade Macromolecules// *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994. P. 2139.
8. Castagnola M., Cassiano L., Lupi A., Messina I., Patamia M., Rabino R., Rossetti D., Giardina B. Ion-exchange electrokinetic capillary chromatography with starburst (PAM-AM) dendrimers – a rout towards high-performance electrokinetic capillary chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1995. V. 694. P. 463.
9. Haynes J.L., Shamsi S.A., Dey J., Warner I.M. Use of a New Diaminobutane Dendrimer in Electrokinetic Capillary Chromatography // *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 1998. V. 21. P. 611.
10. Ling F.H., Lu V., Svec F., Fréchet J.M.J. Effect of multivalency on the performance of enantioselective separation media for chiral HPLC prepared by linking multiple selectors to a porous polymer support via aliphatic dendrons. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 1993.
11. Huang S.H., Li S.R., Bai Z.W., Pan Z. Q., Yin CQ. Synthesis of polymer-type chiral stationary phases and their enantioseparation evaluation by high-performance liquid chromatography // *Chromatographia*. 2006. V. 64. P. 641.
12. Sakai K., Teng T.C., Katada A., Harada T., Yoshida K., Yamanaka K., Asami Y., Sakata M., and Kunitake M. Designable Size Exclusion Chromatography Columns Based on Dendritic Polymer-Modified Porous Silica Particles // *Chem. Mater.* 2003. V. 15. P. 4091.

Карцова Людмила Алексеевна – д.х.н. профессор кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, тел.(812) 428-40-44

Дзема Дарья Валерьевна – бакалавр кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Kartsova Ludmila A. – Dr. Sc. Chem. The professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg, e-mail: kartsova@gmail.com

Dzema Daria V. – bachelor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg, e-mail: dasha.dzema@gmail.com