

УДК 544.72;544.77

## АНАЛИТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ И ОЧИСТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ КАРБОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ СОПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ N-ВИНИЛАМИДОВ

© 2019 г. В. Д. Красиков<sup>а</sup>, \*, М. С. Борисенко<sup>а</sup>, И. И. Малахова<sup>а</sup>, Н. И. Горшков<sup>а</sup>,  
М. А. Безрукова<sup>а</sup>, М. В. Соловский<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук  
199004 Россия, Санкт-Петербург, В.О., Большой просп., 31

\*e-mail: krasikov@lenchrom.ru

Поступила в редакцию 30.03.2018 г.

После доработки 26.06.2018 г.

Принята к публикации 13.02.2019 г.

Разработаны хроматографические методы анализа продуктов радикальной сополимеризации статистических сополимеров N-винил-2-пирролидона с 6-критоноиламинокапроновой кислотой и определены молекулярные характеристики сополимеров. Предложен способ очистки полученных карбоксилсодержащих водорастворимых сополимеров от примесей мономерной гидрофобной кислоты гель-проникающей хроматографией низкого давления.

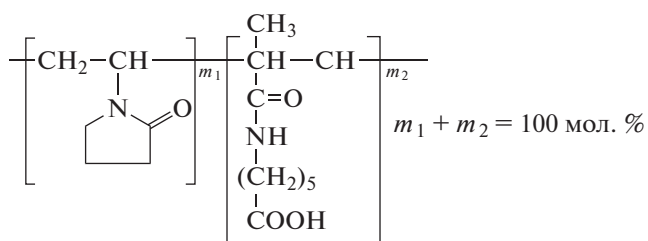
**Ключевые слова:** эксклюзионная высокоэффективная хроматография, гель-проникающая хроматография, тонкослойная хроматография, характеристическая вязкость, константы Марка–Куна–Хаувинка–Сакурады, молекулярно-массовые характеристики, N-винилпирролидон, карбоксилсодержащие водорастворимые сополимеры.

DOI: 10.1134/S0044450219080115

Карбоцепные полимеры, прежде всего, поливиниловый спирт и N-поливинилпирролидон широко используют в качестве полимеров-носителей биологически активных веществ [1, 2]. Применение водорастворимых полимеров-носителей на основе N-виниламидов позволяет создавать новые лекарственные средства с полифункциональной биологической активностью [3–6].

Необходимым этапом синтеза сополимеров медико-биологического назначения является очистка полимерного носителя лекарственных веществ от примесей катализаторов и не вступивших в реакцию мономеров [7]. Такая проблема возникла при получении новой генерации полимерных противотуберкулезных препаратов с использованием в качестве полимерных носителей водорастворимых карбоксилсодержащих сополимеров на основе N-виниламидов.

Цель настоящей работы — разработка хроматографических методов аналитического контроля и очистки, а также определения молекулярных характеристик сополимеров N-винил-2-пирролидона (ВП) с 6-критоноиламинокапроновой кислотой (6-КАКК) разного состава (схема).



Структурная формула сополимера ВП–6-КАКК ( $m_1$  и  $m_2$  – содержания звеньев ВП и 6-КАКК в сополимере).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксклюзионную хроматографию проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы “KNAUER” (Германия) семейства “Smartline” с термостатом колонок Jet Stream, спектрометрическим детектором на основе диодной матрицы K-2501 и рефрактометрическим детектором. Хроматографические пики регистрировали рефрактометрическим и спектрофотометрическим детекторами в диапазоне длин волн  $\lambda_n$  200–330 нм в соответствии с максимумами поглощения разделяемых соединений. Ультрафиолетовые спектры соединений регистрировали в режиме реального времени без остано-

ки потока с использованием детектора на основе диодной матрицы. Запись хроматограмм и расчет молекулярно-массовых характеристик проводили с помощью программного обеспечения Clarity Chrom (Германия). Разделение выполняли на хроматографической колонке  $300 \times 7.8$  мм TSK-G-3000 (ToySoda, Япония) при  $22^\circ\text{C}$ . В качестве элюента использовали 0.2 М водный раствор NaCl.

Гидродинамические характеристики исследовали в 0.2 М растворе NaCl. Характеристическую вязкость  $[\eta]$  измеряли с помощью вискозиметра Оствальда при  $22^\circ\text{C}$ .

Для количественной тонкослойной хроматографии (ТСХ) применяли кремнеземные пластины ПТСХ-С-А на стеклянной подложке (ООО НЦ "Ленхром", Россия). Адсорбент предварительно обрабатывали серной кислотой для получения протонированного варианта кремнеземного сорбента. Пластины после хроматографирования обрабатывали на видеоденситометре-флуориметре "ДенСкан" (Россия) с программным обеспечением Амперсенд-Ленхром (Россия).

Сополимеры очищали от низкомолекулярных продуктов с помощью препаративной гель-проникающей хроматографии низкого давления (ГПХ) в диметилформамиде на колонке ( $600 \times 30$  мм) с гелем Сефадекс LH-20. Расход элюента составлял 20 мл/ч. Фракции элюата (по 4 мл) собирали в пробирки и измеряли оптическую плотность при  $\lambda$  264 нм на приборе СФ-256 УВИ (Россия).

Содержание карбоксильных групп в сополимерах устанавливали потенциометрическим титрованием 0.1 М водным раствором NaOH на рН-метре НJ2210.

Схема синтеза 6-КАКК и возможность целенаправленного получения сополимеров ВП-6-КАКК с заданной молекулярной массой (ММ) в процессе радикальной сополимеризации описаны нами ранее [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В случае синтеза сополимеров носителей с варьируемым гидрофильно-гидрофобным балансом возникает проблема очистки их от гидрофобного сомономера, который трудно удалить методом диализа или переосаждения [9].

Для определения состава продуктов свободно-радикальной сополимеризации и удаления остаточного мономера использовали метод ГПХ низкого давления. Выходная кривая элюирования сополимера ВП-6-КАКК ( $m_2 = 11.6$  мол. %, ММ  $\sim 30000$ ) приведена на рис. 1. На хроматограмме показан пик с удерживаемым объемом 23 мл, относящийся к сополимеру. Фракции элюата (пробирки с 20-ой по 30-ю) были собраны, сконцентрированы, и сополимер был выделен в

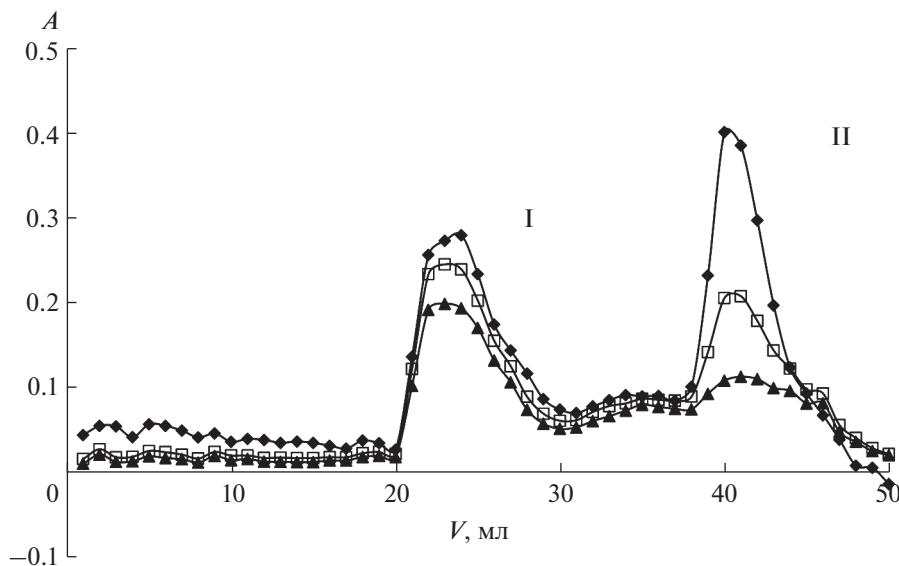
этоксигетан. Вид кривой элюирования свидетельствует о том, что методом препаративной ГПХ удается отделить основной компонент продуктов сополимеризации. Выделенный продукт по данным потенциометрического титрования содержал 8.9 мол. % карбоксильных групп. Это позволило рассчитать количество примесной 6-КАКК (II), удаленной при препаративной ГПХ сополимера (I), которое составило 23.2% от массы неочищенного сополимера.

Анализ исходных и очищенных ГПХ образцов сополимеров методом ВЭЖХ подтвердил наличие низкомолекулярных соединений в исходном сополимере (рис. 2). Для идентификации пиков 1 и 2 на хроматограмме исследовали хроматографическое поведение реперного образца 6-КАКК (пик 2). Сравнение исходных сополимеров после синтеза образцов сополимеров, препаративно выделенных методом колоночной жидкостной хроматографии низкого давления, и реперных образцов 6-КАКК свидетельствует об очистке сополимера ВП-6-КАКК от примесей исходного мономера 6-КАКК.

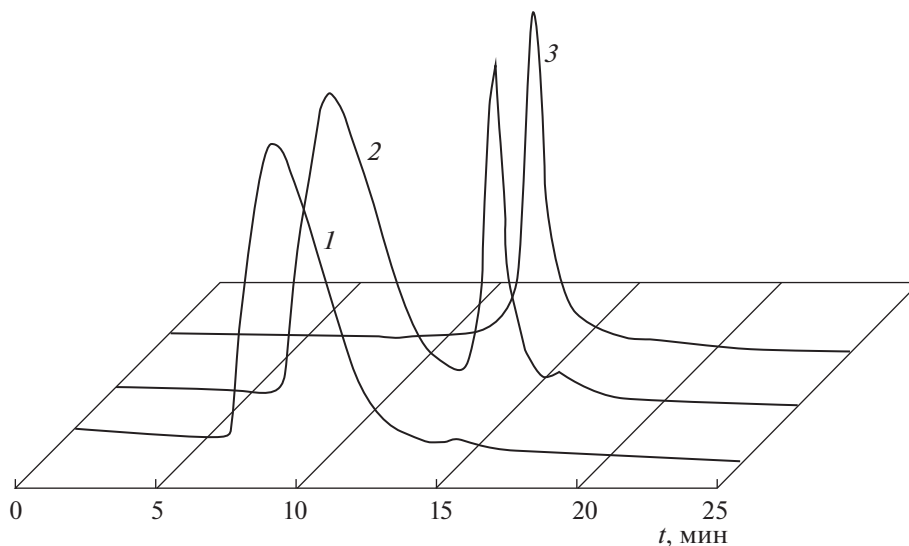
Данные ТСХ также показывают, что сополимер ВП-6-КАКК после очистки не содержит примеси 6-КАКК (рис. 3). В качестве элюента использовали смесь этанол-вода-25%-ный раствор аммиака (10 : 1.2 : 1.6, по объему). Детектирующим специфическим реактивом служил раствор бромкрезолового зеленого в этиловом спирте, доведенный до рН 8-9 раствором NaOH. В этих условиях зона 6-КАКК движется с  $R_f = 0.1-0.2$ , сополимер - с  $R_f = 0.7$ , а ПВП с ММ = 40000 - с  $R_f = 0.9$ .

При оценке молекулярно-массовых характеристик и полидисперсности ряда функциональных сополимеров N-виниламидов необходимо учитывать, что они могут являться полиэлектролитами [10, 11]. Сополимеры ВП с 6-КАКК как полианионы обнаруживают эффект "полиэлектrolитного" набухания в растворах и полиэлектролитной "инклюзии" при эксклюзионной хроматографии [12]. Для нивелирования этих эффектов при исследованиях сополимеров методами ВЭЖХ, молекулярной гидродинамики и оптики использовали водные растворы сополимеров в 0.2 М растворе NaCl [13].

Как известно, в методе ГПХ разделение макромолекул происходит согласно их гидродинамическим размерам  $V_h \sim [\eta]M^{2/3}$  [14]. Изучение гидродинамических характеристик сополимеров в 0.2 М водном растворе NaCl показало, что при разбавлении растворов полиэлектролитные эффекты (в виде возрастания приведенной вязкости  $(\eta_0 - 1)/c$ ) не наблюдались (рис. 4). По величине наклонов прямолинейных зависимостей приведенной вязкости (константа Хаггинса  $K'$ ) [15] можно судить о термодинамическом качестве



**Рис. 1.** Кривая элюирования в методе гель-проникающей хроматографии сополимера ВР–6–КАКК при разных длинах волн, нм: (♦) – 265, (□) – 277, (▲) – 286; I – сополимер ВР–6–КАКК, II – 6–КАКК.



**Рис. 2.** Хроматограмма сополимера ВР–6–КАКК с молекулярной массой в диапазоне ~30000–41000: 1 – очищенный сополимер, 2 – сополимер после реакции сополимеризации, 3 – 6–КАКК. Колонка – (300 × 7.8 мм) TSK-G-3000, элюент – 0.2 М раствор NaCl, 22°C, 254 нм.

растворителей. Установлено, что в данном случае существует конкуренция электростатических и термодинамических взаимодействий при ухудшении термодинамического качества растворителя при увеличении содержания соли. Отличие значений приведенной вязкости для сополимеров с различным мольным составом указывает на то, что при увеличении в сополимере содержания 6-КАКК средневязкостная ММ существенно уменьшается.

Сополимеры ВР относятся к карбоцепным бионедegradуемым носителям лекарственных веществ. К ним как носителям биологически активных веществ предъявляют жесткие требования не только по чистоте препарата, но и по ММ, которая не должна превышать 40000 Да – критического значения ММ синтетических полимеров, пропускаемых почками [16, 17].

Для расчета молекулярно-массовых распределений и средних ММ методом ВЭЖХ проведена

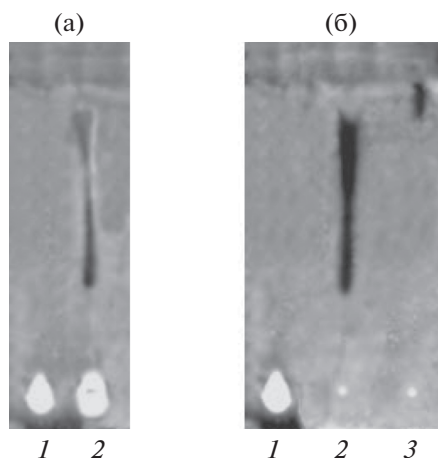


Рис. 3. Хроматограммы сополимера ВП–6–КАКК до (а) и после очистки (б). 1 – 6–КАКК, 2 – сополимер ВП–6–КАКК, 3 – поливинилпирролидон 40000 Да.

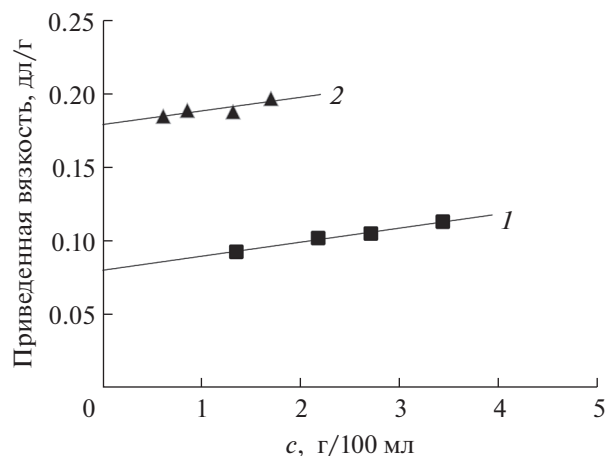


Рис. 4. Концентрационная зависимость приведенной вязкости сополимеров (I)-2 (1) и (I)-1 (2) в 0.2 М растворе NaCl.

Таблица 1. Гидродинамические и молекулярные характеристики сополимеров ВП–6–КАКК в 0.2 М NaCl

Образец	$[\eta]$ , дл/г	$k'$	$M_N \times 10^{-3}$	$M_W \times 10^{-3}$	$M_W/M_N$
(I)-2 (33.6 мол. % КАКК)	0.08	1.5	7.6	16.0	2.1
(I)-1 (11.6 мол. % КАКК)	0.18	0.25	15.0	30.0	2.0
(I)-1* (8.9 мол. % КАКК)	0.195	0.28	14.4	33.0	2.3

\* После очистки.

градуировка хроматографической системы по ранее полученным образцам узкодисперсных стандартов водорастворимого полимера поли-N-винилформамида в 0.2 М водных растворах NaCl. Полидисперсность и средние ММ сополимеров ВП–6–КАКК определяли через универсальную градуировочную зависимость (УГЗ) Бенуа  $\lg K_d = f(\lg M \eta)$ , где  $K_d$  – коэффициент распределения [18]. Молекулярные массы рассчитывали с помощью УГЗ [13] с использованием констант в уравнении Марка–Куна–Хаувинка–Сакурады  $[\eta] = KM^\alpha$  (дл/г) для поли-N-винилформамида ( $K = 1.1 \times 10^{-4}$ ,  $\alpha = 0.76 \text{ см}^3/\text{г}$ ) [19] и поли-N-винилпирролидона ( $K = 6.76 \times 10^{-4}$ ,  $\alpha = 0.55 \text{ см}^3/\text{г}$ ) в 0.2 М растворе NaCl [20].

Величину “относительных” ММ сополимеров оценивали по поли-N-винилпирролидону в тех случаях, когда содержание второго сомономер не превышало 35 мол. % [21]. Значения “относительных” средних ММ и полидисперсность исследованных статистических сополимеров с различным содержанием 6-критоноиламинокапроновой кислоты приведены в табл. 1.

\*\*\*

Таким образом, разработаны хроматографические методы аналитического контроля препаративной очистки сополимера от примесей гидрофобной 6-КАКК, а также оценки ММ и полидисперсности сополимеров ВП–6–КАКК.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wessel W., Schoog M., Winkler E. Polyvinylpyrrolidone (PVP), its diagnostic, therapeutic and technical application and consequences thereof. // *Arzneimit. Forsch.* 1971. V. 21. № 10. P. 1468.
2. Кириш Ю.Э. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды. М.: Наука, 1998. 252 с.
3. Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф. Антимикробные полимеры. СПб: Гиппократ, 1993. 261 с.
4. Горшков Н.И., Шатик С.В., Токарев А.В., Гаврилова И.И., Назарова О.В., Мурко А.Ю., Красиков В.Д., Панарин Е.Ф. Синтез комплексов сополимеров n-винилпирролидона с винили аллиламином, содержащих макроциклический полилиганд 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраацетат (ДОТА), с изотопом галлия-68 и оценка их распределения in vivo // *Изв. АН. Сер. хим.* 2017. № 1. С. 156. (Gorshkov N.I., Gavrilova I.I., Nazarova O.V., Murko A.Y., Krasikov V.D., Panarin E.F., Shatik S.V., Tokarev A.V.)

- Synthesis of complexes of N-vinylpyrrolidone–vinylamine or N-vinylpyrrolidone–allylamine containing macrocyclic polyligand 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate (DOTA) with gallium-68 isotope and estimation of their in vivo distribution // Russ. Chem. Bull. 2017. V. 66. № 1. P. 156.)
5. *Борисенко М.С., Захарова Н.В., Тарабукина Е.Б., Соловский М.В.* Синтез сополимеров N-винил-2-пирролидона с 3-бутеновой кислотой – носителей лекарственных веществ // Журн. прикл. химии. 2015. Т. 88. № 11 С. 1579. (*Borisenko M.S., Zakharova N.V., Tarabukina E.B., Solovskii M.V.* Synthesis of N-vinyl-2-pyrrolidone-3-butenoic acid copolymers as drug carriers // Russ. J. Appl. Chem. 2015. V. 88. № 11. P. 1793.)
  6. *Gorshkov N.I., Bezrukova M.A., Kipper A.I., Andreeva L.N., Pokhvoshchev Yu.V., Gavrilova I.I., Murko A.Y., Krasikov V.D., Panarin E.F.* Study of complexation between perchlorate ion and N-vinylpyrrolidone/N-vinylamine copolymers. // Int. J. Polym. Anal. Charact. 2017. V. 22. № 4. P. 330.
  7. *Панарин Е.Ф., Лавров Н.А., Соловский М.В., Шальнова Л.Н.* Полимеры носители биологически активных веществ. СПб: Профессия, 2014. 304 с.
  8. *Соловский М.В., Захарова Н.В., Тарабукина Е.Б., Борисенко М.С., Власова Е.Н., Алексеева П.Е.* Синтез 6-критоноиламинокапроновой кислоты и ее сополимеров с N-винилпирролидоном // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2013. Т. 56. № 9. С. 74.
  9. *Золотова Ю.И., Некрасова Т.Н., Назарова О.В., Добродумов А.В., Диденко Е.В., Панарин Е.Ф.* Сополимеры N-метил-N-винилацетамида с N,N-диметили N,N-диэтиламиноэтилметакрилатами // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2014. Т. 57. № 8. С. 31.
  10. *Павлов Г.М., Окатова О.В., Гаврилова И.И., Ульянова Н.Н., Панарин Е.Ф.* Размеры и конформации гидрофильных и гидрофобных полиэлектролитов в растворах разной ионной силы // Высокомолекул. соединения. Сер. А. 2013. Т. 55. № 12. С. 1395. (*Pavlov G.M., Okatova O.V., Gavrilova I.I., Ulyanova N.N., Panarin E.F.* Sizes and conformations of hydrophilic and hydrophobic polyelectrolytes in solutions of various ionic strengths // Polym. Sci. Ser. A. 2013. V. 55. № 12. P. 699.)
  11. *Павлов Г.М., Окатова О.В., Ульянова Н.Н., Гаврилова И.И., Панарин Е.Ф.* Особенности поведения заряженных гидрофильных и гидрофобных макромолекул в растворах разной ионной силы // Докл. АН. 2013. Т. 448. № 2. С. 170. (*Pavlov G.M., Okatova O.V., Ulyanova N.N., Gavrilova I.I., Panarin E.F.* Characteristic features of the behavior of charged hydrophilic and hydrophobic macromolecules in solutions of different ionic strength // Dokl. Chem. 2013. V. 448. № 1. P. 16.)
  12. *Беленький Б.Г., Виленчик Л.З.* Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978. 344 с.
  13. *Красиков В.Д., Горшков Н.И., Малахова И.И., Егорова О.С., Похвощев Ю.В.* Эксклюзионная жидкостная хроматография поли-N-винилформамидов в водных растворах // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 4. С. 381. (*Krasikov V.D., Gorshkov N.I., Malakhova I.I., Egorova O.S., Pokhvoshchev Y.V.* Size-exclusion liquid chromatography of poly(N-vinylformamide)s in aqueous solutions // J. Analyt. Chem. 2017. V. 72. № 4. P. 460.)
  14. *Hiromi Yamakawa.* Modern Theory of Polymer Solutions. New York: Harper and Row, 1971. 419 p.
  15. *Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я.* Структура макромолекул в растворах. М.: Наука, 1964. 718 с.
  16. *Платэ Н.А., Васильев А.В.* Физиологически активные полимеры М.: Мир, 1986. 240 с.
  17. *Hulme B., Hardwicke J.* Human glomerular permeability to macromolecules in health disease. // Clin. Sci. 1968. V. 34. № 3. P. 515.
  18. *Benoit H., Grubisic Z., Rempp P., Decker D., Ziliox J.G.* Etude par chromatographie en phase liquide de polystyrenes lineaires et ramifies de structures // J. Chim. Phys. 1966. V. 63. № 11-12. P. 1507.
  19. *Павлов Г.М., Корнеева Е.В., Ebel С., Гаврилова И.И., Нестерова Н.А., Панарин Е.Ф.* Гидродинамические характеристики, молекулярная масса и конформационные параметры молекул поливинилформамида // Высокомолекул. соединения. Сер. А. 2004. Т. 46. № 10. С. 1732. (*Pavlov G.M., Korneeva E.V., Gavrilova I.I., Nesterova N.A., Panarin E.F., Ebel С.* Hydrodynamic behavior, molecular mass, and conformational parameters of poly(vinylformamide) molecules // Polym. Sci. Ser. A. 2004. V. 46. № 10. P. 1063.)
  20. *Levy G.B., Frank H.P.* Determination of molecular weight of polyvinylpyrrolidone. II // J. Polym. Sci. 1955. V. 17. P. 247.
  21. *Панарин Е.Ф., Гаврилова И.И., Горбунова О.П.* Новые биологически активные полимеры и иммобилизованные ими стероиды / Под ред. Неженцева М.В. Л.: ЛПМИ, 1988. С. 17.