



УДК 544.545.+615

Гель универсального назначения – сефадекс LH-20 в разделении и очистке гуминовых кислот и гуминоподобных веществ

Сухих А.С., Кузнецов П.В.

ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия», Кемерово

Поступила в редакцию 26.02.2009 г.

Аннотация

Методом гель-проникающей хроматографии, с последовательным использованием полисахаридных носителей различного типа, исследованы особенности хроматографирования гуминовых кислот и гумно-подобных веществ, выделенных из природных объектов различающихся по генезису образования. Суммой методов спектрального анализа (ЯМР C^{13} , ИК, ЭПР) определены сравнительные параметры исходных гуминовых кислот и гуминоподобных веществ, а так же их хроматографических фракций.

Ключевые слова: Сефадекс LH-20, сефадекс G-100, жидкостная хроматография, гуминовые кислоты, гуминоподобные вещества

The method gel - penetrating of a chromatography, with consecutive use polycarbohydrates carriers of various type, investigates features chromatography humic and the humic - like substances allocated from natural objects differing on genesis of formation. The sum of methods of the spectral analysis (NMR C^{13} , FT-infrared, EPR) are determined comparative parameters initial humic acids and humic - like substances, and as them chromatographic fractions.

Keywords: Sephadex LH-20, Sephadex G-100, liquid chromatography, humic acids, humic - like substances

Введение

Известно, что сефадекс LH-20 (СФ-20) гель универсального назначения, представляет собой декстрановый эпоксимодифицированный адсорбент, который обладает как липофильными, так и гидрофильными свойствами. Он также характеризуется высокой стабильностью в кислых и щелочных средах, что в совокупности и обуславливает его широкое применение в химии природных соединений [1]. Так, СФ-20 находит исключительно широкое применение для разделения, выделения и очистки дубильных веществ и их аналогов, флавоноидов, антибиотиков, фенольных соединений и др. [2]. Однако в химии гуминовых веществ (ГВ) для исследования основных типов ГВ: фульвокислот, гуминовых кислот (ФК, ГК), судя по ряду обзорных работ [3,4] его практически не использовали.

Подчеркнём, что и сегодня, по нашему мнению, поиск новых хроматографических материалов для выделения и очистки ключевых компонентов

ГВ достаточно актуален. Так, в последние годы для выделения ГВ помимо, ставших классическими ионообменных смол (Amberlit, XAD) и сефадексов (G-25, G-75 и др.), стали использоваться и носители типа DAX-8, сочетающие в себе ионообменные и эксклюзионные свойства [5]. В целом исследование ГК, как классическими хроматографическими методами (гель-проникающая, ионообменная хроматографии), так и вариантами аффинной хроматографии (металлохелатная, гидрофобная) [6,7], в том числе и в разнообразных вариантах тандемных хроматографических схем, находятся всё ещё в стадии становления. В настоящей работе проведено сравнительное изучение оригинальной схемы очистки ГК и ГПВ для ряда природных объектов: гуMAT натрия фирмы «Aldrich» (ГМН), ГПВ чаги (так называемая гуминоподобная чаговая кислота (ГЧК)) и ГК, выделенная из лечебной грязи курорта Ши́ра (ГКШ). Получены сравнительные физико-химические характеристики выделенных хроматографических образцов (СНН-элементный анализ, ИК-, ЯМР C^{13} , ЭПР – спектры).

Эксперимент

В настоящей работе были исследованы ГК (экстрагированы натрия гидроксидом и очищенные 3-х кратным переосаждением хлористоводородной кислотой до pH 1-2), субстанции которых (ГМН, ГЧК, ГКШ) далее хроматографировались по схеме на рис.1. В качестве хроматографических полисахаридных матриц применяли: сефадекс G – 100 (Pharmacia, Швеция), сефадекс LH – 20 (Pharmacia, Швеция) Объем геля адсорбента 30 ± 1 мл, скорость элюирования – 0,1-0,15 мл/мин (2) и 0,5-0,6 мл/мин (3). Объем собираемых фракций: 1-1,2 мл. Детектирование фракций проводили при длине волны $\lambda=260$ нм. В качестве элюента применяли бидистиллированную воду. Выделенные на 3-ем этапе (рис. 1.), I и II ключевые фракции охарактеризованы данными элементного анализа, ИК-, ЯМР C^{13} – спектрами, а так же данными ЭПР – активности.



Рис. 1. Схема тандемного хроматографирования изученных образцов ГК с использованием СФ-20 и СФ-100

Обсуждение результатов

На основании экспериментальных хроматографических данных исследования на СФ-20, можно сделать общий вывод, что на стадии (2), практически для всех образцов, получен единственный хроматографический пик в зоне 8-16 фракции. Наряду с ним наблюдается и минорный пик, элюция которого несколько отличается – см. рис.2. (в зоне 15-20 фракции у ГКШ, в зоне 21-25 фракции у ГМН, и в зоне 25-30 фракции у ГКЧ).

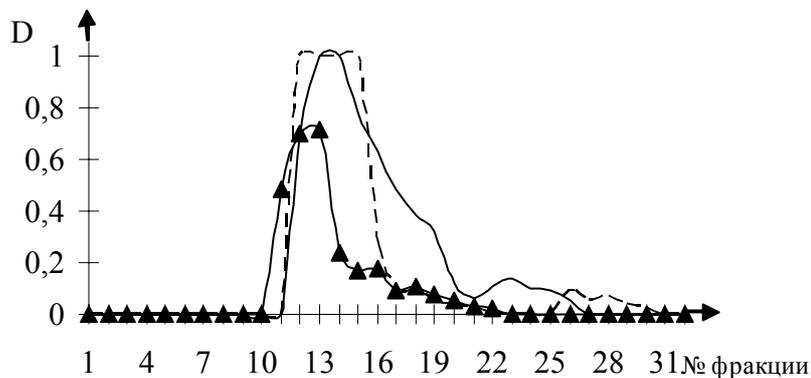


Рис. 2. Хроматограмма исследуемых образцов на СФ-20, где: ГМН (—), ГЧК (-▲-), ГКШ(---).

Интересно, что сегодня механизмы хроматографического разделения многих природных соединений на СФ-20 до сих пор окончательно не выяснены. Так, по данным [8], многие соединения разделяются на СФ-20, видимо, по общей полярности. Известно так же, что гель СФ-20 с изменением температуры претерпевает эффект Детермана-Ламберта, (резкое изменение пористости структуры геля); при этом он часто вступает в сильные взаимодействия с растворёнными веществами, вплоть до протекания возможных адсорбционных процессов [9]. В случае с ГК, которые, по данным [10], обладают не только переменной молекулярной массой, но и вероятно различными по полярности супрамолекулярными структурами (СМС) [3], эти эффекты могут усиливаться. Поэтому, показанный нами экспериментальный факт их относительно быстрого выхода на СФ-20 практически одним хроматографическим пиком (в достаточно узкой зоне фракций) вполне можно объяснить изменением СМС хроматографируемых ГК. Однако, можно считать, что эти кажущиеся изменения СМС ГК реализуется все-таки и за счёт молекулярной модификации их достаточно липофильной поверхностью самого адсорбента СФ-20. Так, недавно в работе [11] было доказано, что под влиянием микродобавок ГК происходит не только более глубокое окисление и гидролиз крахмала (в шликтующих композициях), но и почти полное разрушение отдельных коллоидных частиц в структуре крахмального геля.

После рехроматографии основных «высокомолекулярных» пиков исследуемых образцов на СФ-100, (в условиях классической гель-проникающей хроматографии) получено чёткое разделение их на ключевые I и II хроматографические фракции (рис. 3).

Как видно из рис. 3, существует некоторое различие по скорости выхода фракций, в зависимости от исходного образца. Этому способствует и процесс деионизации на стадии хроматографирования на СФ-20 водных растворов исследуемых веществ (ГМН, ГЧК, ГКШ), которые при существенном изменении ионного фона могут изменять СМС [3]. Поэтому, в условиях гель-проникающей

хроматографии (на стадии сефадекса G-100) режим разделения определяется не только молекулярным размером хроматографируемых веществ но, видимо, и общей полярностью (СМС) молекулы ГК или ГПВ. Следовательно, можно считать, что при предварительном использовании СФ-20 происходит модификация СМС молекулы исследуемых образцов ГК, фиксируемая в условиях гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-100.

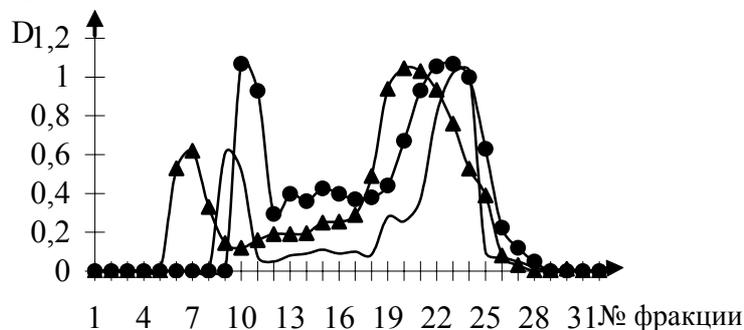


Рис. 3. Хроматограмма исследуемых образцов на СФ-100, где: ГМН (-▲-), ГЧК (-●-), ГКШ(-)

Таким образом, полученные нами пиковые I и II фракции исследуемых образцов: ГМН, ГЧК и ГКШ должны существенно различаться, на наш взгляд, именно по общей полярности молекул (или СМС).

ИК-спектры изученных образцов (выделены щелочной экстракцией) и их хроматографических фракций были получены и интерпретированы в условиях работы [12]. Как видно из спектральных характеристик (рис.4), все изученные образцы имеют подобные литературным данным [12] структурные характеристики молекулы, зависящие от их фрагментно-группового состава. Действительно, спектральные характеристики ИК-спектров I и II фракций очень близки с образцами ГК, изученными в работе [5], которые зафиксированы после их хроматографирования на смоле DAX-8 и определяются авторами статьи как гидрофильные (не сорбируемые на этом типе сорбента) и гидрофобные (сорбируемые) фракции. Так, в сравнении с данными работы [5] пик I (ГКШ) может быть охарактеризован (по типу ИК-спектров) как более гидрофильный, чем пик II. Для ГМН пик I более гидрофобен, чем пик II, так как имеет в зоне $2950-2800\text{см}^{-1}$ сильно выраженные колебания алифатического фрагмента. Однако, повышенной гидрофобностью (колебания в зоне $2950-2800\text{см}^{-1}$) видимо характеризуется и пик I ГКШ, в отличие от пика II ГКШ; хотя в целом оценить их гидрофильно – гидрофобный баланс только по данным ИК-спектров затруднительно. С другой стороны, по данным ИК-спектров (рис. 4.), только для вариантов А,В,С образца ГКШ четко регистрируется так называемая полисахаридная зона ($1065-1030\text{см}^{-1}$) [12], но которая практически отсутствует у варианта D этого же образца.

Спектры в УФ- области у полученных хроматографических фракций полностью соответствуют известным литературным данным [12].

Характерной особенностью СНЭ-элементного анализа исследуемых образцов и их хроматографических фракций, является распределение отношений водорода/углерода (H/C) и азота/углерода (N/C) представленное в таблице 1.

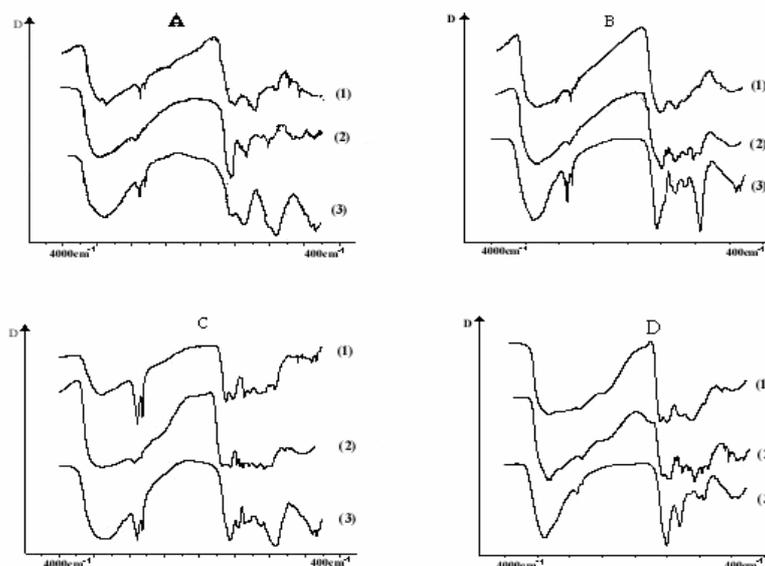


Рис. 4. ИК-спектры образцов ГМН(1); ГЧК(2); ГКШ(3) в нативном виде (А);
хроматографированных на СФ-20 (В); СФ-100, пик I (С);
СФ-100, пик II (D) в диапазоне 4000-400см⁻¹

Таблица 1. Результаты определения C,N,H -элементов в образцах и их хроматографических фракциях

Образец*	%C	%H	%N	H/C	N/C
ГК фирмы Aldrich (ГМН)					
I	42,625	3,63	0,57	1,015	0,011
II	36,095	2,415	0,75	0,797	0,017
III	54,785	5,123	2,77	1,115	0,043
IV	50,246	3,125	1,72	0,742	0,029
ГК лечебной грязи (ГКШ)					
I	37,46	4,685	3,705	1,490	0,084
II	33,455	4,76	3,05	1,695	0,078
III	41,885	5,725	3,64	1,520	0,074
IV	30,456	2,993	2,865	1,171	0,08
Гуминоподобная чаговая кислота (ГЧЧ)					
I	34,765	3,075	0,2	1,054	0,004
II	47,285	3,915	0,36	0,986	0,006
III	53,345	4,83	1,8	1,078	0,028
IV	45,37	3,775	0,565	0,991	0,0106

* I-натив; II-после СФ-20; III - пик I после G-100; IV- пик II после G-100

Из данных таблицы 1 видно, что у первых хроматографических фракций (после СФ-100) с возрастанием размера молекулы наблюдается увеличение содержания азота, находящегося в аминогруппах у исследуемых фракций. Такое увеличение азота отмечается так же в высокомолекулярных фракциях ГК что, по-видимому, связано с наличием более длинных пептидных фрагментов [13].

Для всех изученных здесь образцов, отношения Н/С и N/C хорошо коррелируют, демонстрируя ассоциацию между этими двумя параметрами (рис. 5.). Точки атомных отношений образуют четкое регионарное расположение и находятся в зависимости от структурных особенностей исследуемых образцов ГК.

Так, значения координат образца ГКШ и его хроматографических фракций, имеют наиболее высокие значения N/C (рис. 5. зона 3) и расположены дистанцированно над линией диагонали. С другой стороны, зоны соответствующие ГМН и ГКЧ (рис. 5. зона 1 и 2) находящиеся в одной области, показывают самые низкие атомные отношения N/C. Особенности такого «регионарного» распределения можно объяснить спецификой генезиса образования, учитывая, что ГМН получен из бурого угля. Так, по теории образования углей это продукт анаэробного превращения древесины. С другой стороны ГКЧ – продукт грибкового разрушения лигнина.

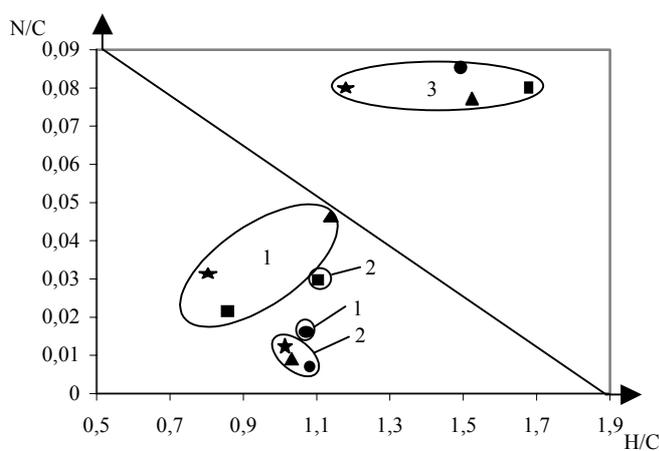


Рис. 5. Отношения атомов Н/С к N/C у нативных образцов и хроматографических фракций ГМН (1), ГКЧ (2), ГКШ (3), где: ●-натив; ▲-после СФ-20; ■-после СФ-100, пик I; ★ - после СФ-100, пик II

Спектры ЯМР C^{13} и обработка результатов были получены в условиях работы [14]. Характерной особенностью спектров ЯМР C^{13} для всех исследуемых образцов является отсутствие индивидуальных пиков и наличие суперпозиции большого числа сигналов, что согласно литературных источников характерно для ГК [15].

Как видно из рис. 6, у всех исследуемых образцов, в полном соответствии с литературными данными [16], определяется наличие основных структурных фрагментов молекулы ГК, а именно: наличие алифатического углерода (АЛУ); условно обозначаемого «полисахаридный» углерод (ПСУ), который охватывает кислородсодержащие алифатические и гетероциклические соединения; ароматического углерода (АРУ); и карбоксильно-карбонильного углерода (КАУ).

Для нативных образцов (рис. 6А) характерны следующие особенности. Так, образец ГМН характеризует самое низкое содержание ПСУ и относительно высокое содержание АРУ. Образец ГКШ характеризует относительно высокое содержание АЛУ и самое низкое содержание АРУ и КАУ. Для образца ГКЧ характерны некоторые «средние» параметры указанных фрагментов. Специфические изменения происходящие с образцами после хроматографирования на СФ-20 (рис. 6Б) следующие: образец ГМН характеризует увеличение содержания АРУ и ПСУ и существенное (около 8-10%) уменьшение АЛУ и КАУ. Иные изменения происходят

у образца ГКШ. Так, у него значительно (в два раза) увеличивается содержание АЛУ и достаточно резко снижено содержание АРУ и ПСУ. В наименьшей степени изменились углеродные отношения образца ГКЧ. Однако, после на СФ-20 для него характерно незначительное увеличение АЛУ и уменьшение АРУ. Хроматографические пики, полученные при фракционировании с использованием СФ-100, обнаружили следующую закономерность. Так, хроматографические пики (I) (рис. 6В) исследуемых образцов характеризуются относительно высоким содержанием АЛУ где: $ГКШ > ГЧ > ГМН$. Чётко видна (см. рис. 6В) и закономерность изменения АРУ, где: $ГМН \gg ГЧ > ГКШ$. Наконец, пик (I) образца ГКЧ имеет самый слабый сигнал КАУ. С другой стороны, хроматографический пик (II) (рис. 6Г), в целом, характеризует заметно низкое содержание АЛУ и достаточно высокое содержание АРУ и КАУ, особенно в образце ГМН. Интересно, что показатель КАУ пика (II) ГКШ тоже заметно увеличился.

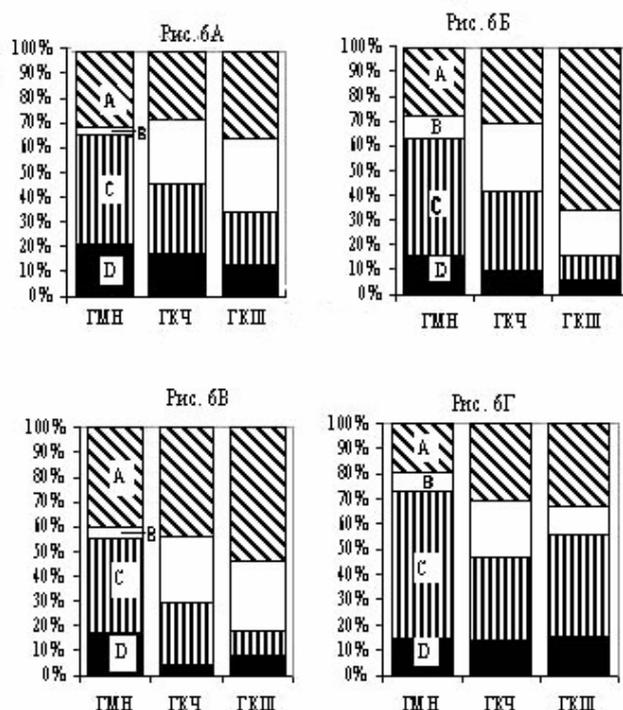


Рис. 6. Содержание атомов углерода в структурных фрагментах нативных образцов и хроматографических фракций ГМН, ГЧ, ГКШ по данным ЯМР C^{13} (относительная интенсивность % отношений), где область: А- углерод алифатический (65-0 м.д.); В- углерод полисахаридных структур (110-65 м.д.); С- углерод ароматический (160-110 м.д.); D- углерод карбоксильный (200-160 м.д.)

Фундаментальное свойство ГК – их электронный парамагнетизм [16]. Отмечено, что парамагнитная активность, под которой понимается концентрация свободных радикалов, в наибольшей степени может характеризовать общий уровень биохимической активности и биотермодинамической устойчивости ГК [17]. Для получения информации о ЭПР активности у фракций ГК, выделенных на СФ-100, снимали ЭПР- спектры в режиме работы [14]. По данным ЭПР – активности пиковых фракций, представленных в таблице 2, видно, что наибольшая интенсивность присутствует у образца ГКШ II, далее в порядке убывания ЭПР активности расположены в ряд: ГКШ I, ГМН I, ГМН II, ГЧ I, ГЧ II.

Таблица 2. ЭПР - активность I и II хроматографических фракций после СФ-100

<i>Образец</i>	Поле линии эталона, Гс	Поле образца, Гс	g-фактор линии эталона	g-фактор образца	DI	DI/нав, Инт.ед./мг
ГМН I	3437,173	3484,865	2,02983	2,00224	6,88350	1,7650
ГМН II	3437,155	3484,847	2,02983	2,00205	5,64000	1,20000
ГЧК I	3437,35	3484,02	2,02983	2,00264	3,09800	1,06828
ГЧК II	3437,33	3484,51	2,02983	2,00235	5,28200	0,88033
ГКШ I	3437,08	3485,39	2,02983	2,00170	3,84800	1,24129
ГКШ II	3437,13	3485,02	2,02983	2,00194	9,09800	3,36963

Заключение

В целом можно заключить, что тандемный хроматографический вариант выделения ключевых фракций I и II изученных образцов, различных по общей полярности молекул, может являться альтернативой способу разделения, описанному в работе [7], благодаря своей простоте и доступности. В перспективе после накопления, полученные ключевые фракции I и II могут быть изучены различными вариантами классической аффинной хроматографии [19].

Список литературы

1. Микеш О. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам Кн. I. / М.: Мир, 1982. 400с.
2. Теслов Л.С., Кузнецов П.В., Энгельман Е.В Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ XVII. Разделение флавоноидов и некоторых родственных соединений методом неклассической аффинной хроматографии. // Растительные ресурсы. 2001. Вып.4. –С.130-140.
3. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science // Advances in agronomy, -2002. V.75. P. 57-134.
4. Janoš P. Separation methods in the chemistry of humic substances (Review) // J. Chromatography A. - 2003. V. 983. P. 1–18.
5. Peuravuori J., Monteiro A., Eglite L., et all. Comparative study for separation of aquatic humic –type organic constituents by DAX-8, PVP and DEAE sorbing solids and tangential ultrafiltration: elemental composition, size-exclusion chromatography, UV-vis and FT-IR // Talanta. 2005. V. 65. N.2. P. 408-422.
6. Милановский Е.Ю. Амфифильные компоненты гумусовых веществ почв // Почвоведение. -2000. -№6. -С. 706-715
7. Burba P., Jakubowski B., Kuckuk R. et all. Characterization of aquatic humic substances and their metal complexes by immobilized metal-chelate affinity chromatography on iron (III) – loaded ion exchangers // Fresenius J. Anal. Chem. -2000. V. 368. P. 689-696.
8. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высш. Школа, 1974. С.74-75.

9. Дейл З., Мацек К., Янак Я. Жидкостная колоночная хроматография / М.: Мир, 1978. С. 259-270.
10. Perminova I.V. Molecular weight characteristics of humic substances from different environments as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation. // Environ. Sci. technol. 2003. P.2477-2485.
11. Вашурина И.Ю., Кочкина Н.Е., Калинин Ю.А. Влияние торфяных гумусовых кислот на структуру крахмальных шликтующих гелей //ЖПХ. 2006. Т. 79. Вып.2. С.322-325.
12. Орлов Д.С. Гуминовые вещества в биосфере /. М.: Наука, 1993. 237 с.
13. Алябина Г.А., Жигунов А.В., Шурухина С.И. Использование метода геле-хроматографии в изучении гуминовых веществ почвы (обзор)// Почвоведение. 1975. №9.- С. 55-62.
14. Юдина Н.В., Тихова В.И. Структурные особенности гуминовых кислот торфов, выделенных разными способами // Химия растительного сырья. –2003. -№1. С. 93-96.
15. Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот: Автореф. докт. дис. М., 2000. 56с.
16. Чуков С.Н., Талашкина В.Д., Надпорожская М.А. Физиологическая активность ростовых стимуляторов и гуминовых кислот почв // Почвоведение. 1995. №2. С.169-174.
17. Елин Е.С. Фенольные соединения в биосфере //Новосибирск. СО РАН. 2001. 392с.
18. Кузнецов П.В. Эпоксидированные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. Кемерово. Кузбассвузиздат, 2002. 104с.

Сухих Андрей Сергеевич – к.фарм.н., ст.научный сотрудник Центральной научно-Исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) Кемеровской государственной медицинской академии, Кемерово, тел. (3842) 38-04-16

Кузнецов Петр Васильевич – д.фарм.н., проф., зав.кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ГОУ ВПО КемГМА, Кемерово, тел. (3842) 52-96-00

Sukhikh Andrey S. - The candidate of pharmaceutical sciences, the senior scientific employee of Central Scientifically research laboratory state medical academy Kemerovo, Kemerovo, Voroshilova 22a street, KemSMA, e-mail: Suhih_as@list.ru

Kuznetsov Petr V. - The doctor of pharmaceutical sciences, the professor managing faculty of pharmaceutical and toxicological chemistry state medical academy Kemerovo, Kemerovo, e-mail: diss@kemsma.ru