УДК 543. 544; 577.1:544.77

Исследование хитозана и примесных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при использовании хроматографического тракта жидкостного хроматографа в металлическом и безметаллическом исполнении

Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Буряк А.К.

Учреждение российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Поступила в редакцию 12.10.2010 г.

Аннотация

В статье представлены сравнительные данные по анализу хитозана и примесных соединений методом ВЭЖХ на колонке с высокосшитым полидивинилбензольным (ВПДВБ) сорбентом при использовании хроматографического тракта жидкостного хроматографа (насоса, инжектора, ультрафиолетового и рефрактометрического детекторов) в металлическом и безметаллическом исполнении. Достоверные результаты достигаются при определении молекулярно-массового распределения (ММР) полимерных молекул хитозана и содержания примесных соединений в препаратах хитозана на колонке с ВПДВБ сорбентом на жидкостном хроматографе с хроматографическим трактом в безметаллическом исполнении при использовании в качестве элюента – 4 %-го водного раствора уксусной кислоты.

Ключевые слова: хитозан, хиозан-хитин, хитозан-белок, хроматографическая колонка с ВПДВБ сорбентом, ВЭЖХ, жидкостные хроматографы с хроматографическим трактом в металлическом и безметаллическом исполнении, рефрактометрический и ультрафиолетовый детекторы, коррозия нержавеющей стали, уксусная кислота.

In the article the comparative data under the analysis of chitosan and admixtures by a method HPLC on a colum with highcrosslinked polydivinylbenzen (HCLPDVB) sorbent are submitted at usage of a chromatographic channel of a liquid chromatograph (pompe, injector, ultra-violet and refracktometric detectors) in metallic and metalles fulfilment. The authentic results are reached at definition molecular-mass distribution (MMD) of polymer chitosan moleculas and contents of impurity connections in chitosan preparations on a colum with highcrosslinked polydivinylbenzen sorbent on a liquid chromatograph with a chromatographic channel in metalles fulfilment at usage as eluenthe 4 % aqueous solution of acetic acid.

Keywords: chitosan, chitosan-chitin, chitosan-albumen, chromatographyc column, highcrosslinked polydivinylbenzen sorbent, HPLC, metallic chromatographyc channel, detectors, stainless steel corrosion, acetic acid

Введение

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является одним из основных методов определения молекулярно-массового

распределения (ММР) полимеров [1, 2], характеризуемое среднемассовой (M_W) и среднечисленной (M_N) молекулярными массами. ММР полимерных молекул хитозана является важной физико-химической характеристикой и определяет его биологическую активность.

В [3-6] методом ВЭЖХ определяли ММР полимерных молекул хитозана, в [7-9] методом ВЭЖХ определяли ММР хитозана и содержание примесных соединений - хитозан-хитиновых полимерных молекул и молекул хитозан-белкового комплекса в хитозане.

При определении методом ВЭЖХ ММР полимерных молекул хитозана, содержания хитозан-хитиновых полимерных молекул и молекул хитозан-белковых комплексов, аминокислот в состав элюентов входит уксусная [7-9] и трифторуксусная [10] кислоты. Элюенты, содержащие уксусную и трифторуксусную кислоты вызывают коррозию нержавеющей стали - хроматографического тракта жидкостного хроматографа. При коррозии нержавеющей стали образуются ионы металлов (Fe^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}), которые с аминными, карбонильными и гидроксильными группами хитозана и аминными группами хитозан-хитина и хитозан-белка образуют соединения, которые сорбируются и десорбируются потоком элюента в хроматографическом тракте жидкостного хроматографа.

При анализе методом ВЭЖХ биополимеров и использовании элюентов, вызывающих коррозию нержавеющей стали, к жидкостному хроматографу предъявляется ряд требований к конструкции насосов высокого давления, инжектору, креплению и герметизации кварцевой кюветы детекторов, а именно отсутствие контакта реакционноспособных элюентов с металлическими поверхностями хроматографического тракта жидкостного хроматографа.

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение роли жидкостного хроматографа с хроматографическим трактом в металлическом и безметаллическом исполнении при анализе методом ВЭЖХ полимерных молекул хитозана и примесных соединений в хитозане на колонке из стекла с высокосшитым полидивинилбензольным сорбентом и элюента – 4 %-го водного раствора уксусной кислоты.

Эксперимент

При определении методом ВЭЖХ ММР полимерных молекул хитозана и содержания примесных соединений в хитозане применяли следующие жидкостные хроматографы.

1. Стандартный жидкостной хроматограф Agilent 1200 фирмы Agilent Technologies (США), в котором хроматографический тракт выполнен из нержавеющей стали (насос высокого давления, инжектор, рефрактометрический и ультрафиолетовый (диодная матрица) детекторы).

2. Нестандартный жидкостный хроматограф, в котором хроматографический тракт выполнен в безметаллическом исполнении. Для чего в рефрактометрическом детекторе RIDK 102 фирмы Laboratorni pristroje Praha (Чехословакия) крепление кварцевой кюветы выполнено с помощью термообработанного фторопласта, подводящие (вн. Ѳ 0,25 мм) и отводящие (вн. Ѳ 0,5 мм) капилляры, соединяющие аналитический канал и канал сравнения кюветы, выполнены также из фторопласта [11]. В насосе высокого давления жидкостный тракт выполнен из полиэтерэтеркетона (ПИИК) и капилляров из ПИИК (вн. Ѳ 0,25 мм) фирмы Knauer (Германия). Инжектор выполнен из ПИИК и фторопласта. Ультрафиолетовый

детектор - спектрофотометр 320 фирмы Hitachi (Япония) (с кварцевой кюветой объёмом 7 мкл) и жидкостным трактом из фторопластовых капилляров (вн. Ѳ 0,25 мм).

ВПДВБ сорбент синтезирован в АНО "Синтез полимерных сорбентов" в соответствии с [12]. Упаковку хроматографиических колонок из стекла (150 х 3 мм) с ВПДВБ сорбентом в виде моносферических зёрен диаметром (d_p) 10 мкм, Dпор 500 Å, осуществляли в водном растворе щёлочи с pH 10-11 при давлении 25 МПа в соответствии с [13]. Предложенный способ обеспечивает получение высокоэффективных хроматографических колонок (150 х 3 мм) с ВПДВБ сорбентом с эффективностью по глюкозе 15000-20000 т.т./м при скорости элюента – дистиллированной воды – 0,1 мл/мин.

Определение ММР полимерных молекул хитозана и содержания хитозан-хитиновых полимерных молекул и хитозан-белкового комплекса в хитозане проводили на колонке из стекла (150 х 3 мм) с ВПДВБ сорбентом в соответствии с [7]. В качестве подвижной фазы (ПФ) и для растворения проб пепаратов хитозана использовали 4 %-й водный раствор уксусной кислоты, в которой низко- и высокомолекулярный хитозан растворимы. Для детектирования использовали рефрактометрический и ультрафиолетовый (УФ) детекторы.

Для градуировки колонок с ВПДВБ сорбентом использовали стандарты молекулярных масс (ММ) декстранов Т-серии фирмы Serva (Германия). На рис. 1 представлен градуировочный график зависимости lg ММ стандартов полимеров декстрана от объёма удерживания (Vr, мл), который использовали для расчёта ММР хитозана с помощью программы "Экохром".

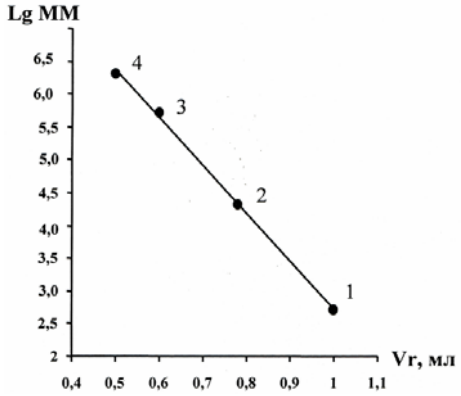

Рис. 1. Градуироваочный график зависимости lg ММ полимеров декстрана от V_r. Колонка из стекла (150 х 3 мм) с ВПДВБ сорбентом, d_p 10 мкм. ПФ – 4 %-й водный раствор уксусной кислоты, 0,2 мл/мин. 1 – мальтотриоза, 2 – Т-20, 3 – Т-500, 4 – Т-2000. Детектор – рефрактометрический RIDK−102 с жидкостным трактом из фторопласта

Из графика видно, что стандарты полимеров декстрана элюируются из хроматографической колонки в элюенте - 4 %-ном водном растворе уксусной кислоты по эксклюзионному механизму и линейный диапазон находится в пределах ММ 0,504–2000 кДа.

Обсуждение результатов

На рис. 2 представлена хроматограмма полифракционного хитозана (степень деацетилирования (СД) 87 %) на колонке с ВПДВБ сорбентом, полученная с

использованием нестандартного жидкостного хроматографа и рефрактометрического детектора с хроматографическим трактом в безметаллическом исполнении.

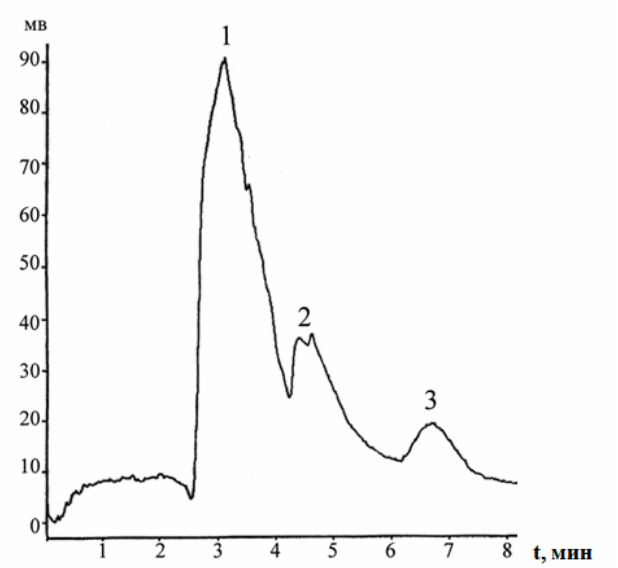

Рис. 2. Хроматограмма полифракционного хитозана, СД 87 %, ЗАО "Биопрогресс". 1 – полимерные молекулы хитозана (M_W 213420 Да, M_N 85490 Да, M_W/M_N 2,52) (V_r = 0,61 мл), 2 - гетерогенные полимерные молекулы с хитозан-хитиновыми звеньями (V_r = 0,86 мл), 3 – молекулы хитозан-белкового комплекса (V_r = 1,29 мл). Колонка из стекла (150 х 3 мм) с ВПДВБ сорбентом, d_p 10 мкм. ПФ – 4 %-й водный раствор уксусной кислоты, 0,2 мл/мин. Детектор – рефрактометрический RIDK−102 с жидкостным трактом из фторопласта

На колонке с ВПДВБ сорбентом разделение полимерных молекул хитозана и гетерогенных полимерных молекул с хитозан-хитиновыми звеньями осуществлялось по эксклюзионному механизму и молекул хитозан-белкого комплекса по сорбционному механизму.

В [7, 8] при хроматографировании хитозана на колонке с ВПДВБ сорбентом гетерогенные полимерные молекулы с хитозан-хитиновыми звеньями и молекулы хитозан-белкового комплекса в элюенте поглощают электромагнитные колебания в УФ-области при λ = 235 нм, а полимерные молекулы хитозана не поглощают в УФ-области спектра (210-480 нм).

При использовании жидкостного хроматографа с хроматографическим трактом в безметаллическом исполнении при анализе на колонке с ВПДВБ сорбентом полифракционного хитозана (СД 87 %), полимерные молекулы хитозана, гетерогенные молекулы с хитозан-хитиновыми звеньями и молекулы хитозан-белкого комплекса не образуют комплексы с ионами металлов (Fe^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}) ввиду их отсутствия.

На рис. 3 и 4 представлены хроматограммы полифракционного хитозана на колонке с ВПДВБ сорбентом, полученные с использованием стандартного жидкостного хроматографа Agilent 1200 с рефрактометрическим и ультрафиолетовым (диодная матрица) детекторами с хроматографическим трактом из нержавеющей стали.

Из хроматограмм (рис. 3, 4) видно, что разделённые на колонке с ВПДВБ сорбентом, полимерные молекулы хитозана, гетерогенные молекулы с хитозан-хитиновыми звеньями (эксклюзионный механизм) и молекулы хитозан-белкого

комплекса (сорбционный механизм) вступают в химическое взаимодействие с ионами металлов (Fe^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}), что приводит к изменению физико-химических характеристик хитозана и примесных соединений.

При коррозии нержавеющей стали под действием уксусной кислоты в хроматографическом тракте жидкостного хроматографа образуются ионы металлов (Fe^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}), которые с аминными, карбонильными и гидроксильными группами молекул хитозана, аминными группами хитозан-хитиновых молекул и хитозан-белкового комплекса образуют комплексы, которые в УФ детекторе поглощают электромагнитные колебания при $\lambda = 254$ нм (рис. 3).

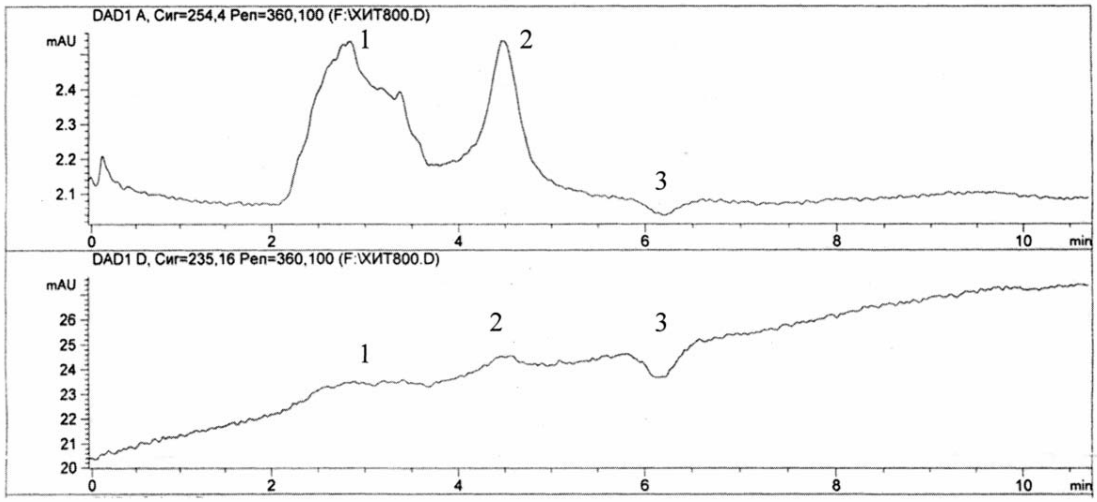

Рис. 3. Хроматограмма полифракционного хитозана, СД 86 %, ВНИТИБП. 1 – полимерные молекулы хитозана (M_W 189900 Да, M_N 70670 Да, M_W/M_N 2,69), 2 – гетерогенные полимерные молекулы с хитозан-хитиновыми звеньями, 3 – молекулы хитозан-белкового комплекса. Колонка из стекла (150 х 3 мм) с ВПДВБ сорбентом, d_p 10 мкм. ПФ – 4 %-й водный раствор уксусной кислоты, 0,2 мл/мин. УФ детектор $\lambda = 254$ нм и $\lambda = 235$ нм. В жидкостном хроматографе Agilent 1200 – хроматографический тракт насоса, инжектора, УФ детектора выполнены из нержавеющей стали

Хроматограмма полифракционного хитозана на рис. 3 также показывает, что аминные группы хитозан-хитиновых молекул и хитозан-белкового комплекса не поглощают электромагнитные колебания при $\lambda = 235$ нм, так как аминогруппы вступили в химическое взаимодействие с ионами металлов (Fe^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}).

При детектировании на УФ детекторе при $\lambda = 235$ нм и $\lambda = 254$ нм (рис. 3) и рефрактометрическом детекторе (рис. 4) отмечаются отрицательные пики хитозан-белкового комплекса. По-видимому, ионы металлов (Fe^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}) вступают в химическое взаимодействие с белковыми молекулами хитозан-белкового комплекса, которые детектируются на рефрактометрическом и УФ детекторах отрицательными пиками.

Хроматограмма полифракционного хитозана на рис. 4 показывает, что в рефрактометрическом детекторе комплексы ионов металлов (Fe^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}) с аминными, карбонильными и гидроксильными группами молекул хитозана, аминогруппами хитозан-хитиновых молекул детектируются в виде положительных пиков, а комплексы ионов металлов (Fe^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}) с хитозан-белковыми молекулами детектируются в виде отрицательного пика.

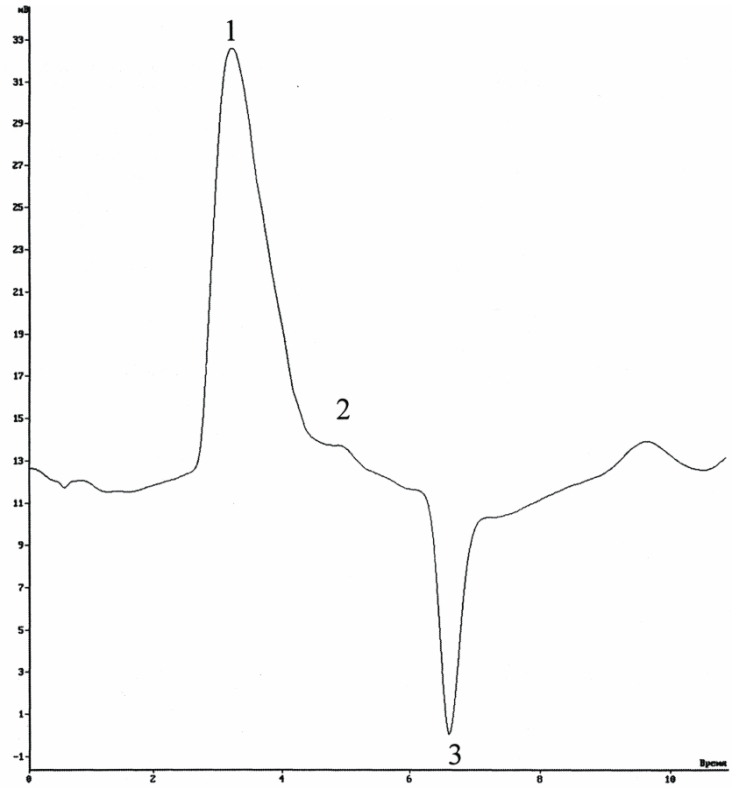

Рис. 4. Хроматограмма полифракционного хитозана, СД 86 %, ВНИТИБП. 1 – полимерные молекулы хитозана (M_W 189900 Да, M_N 70670 Да, M_W/M_N 2,69) (V_r = 0,63 мл), 2 – гетерогенные полимерные молекулы с хитозан-хитиновыми звеньями (V_r = 0,91 мл), 3 – молекулы хитозан-белкового комплекса (V_r = 1,27 мл). Колонка из стекла (150 х 3 мм) с ВПДВБ сорбентом, d_p 10 мкм. ПФ – 4 %-й водный раствор уксусной кислоты, 0,2 мл/мин. Детектор – рефрактометрический. В жидкостном хроматографе Agilent 1200 - хроматографический тракт насоса, инжектора, рефрактометрического детектора выполнены из нержавеющей стали

Заключение

Сравнительные исследования показали, что определение ММР полимерных молекул хитозана и содержание примесных соединений в хитозане методом ВЭЖХ на колонке с ВПДВБ сорбентом при использовании жидкостного хроматографа с хроматографическим трактом в безметаллическом исполнении, позволяет надёжно детектировать на рефрактометрическом и ультрафиолетовом детекторах хитозан и примесные соединения при использовании элюента, содержащего уксусную кислоту, благодаря тому, что исключается контакт элюента с металлической поверхностью хроматографического тракта жидкостного хроматографа.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований ОХНМ- 4.2 РАН (проект: "Разработка и совершенствование современных хроматографических методов молекулярного химического анализа на базе изучения и использования новейших полимерных сорбентов" 2006-2008 г.г.).

Список литературы

1. Беленький Б.Г., Виленчик Л.З. Хроматография полимеров. – М.: Химия, 1978, 343 с. (с. 139-188).

2. Yau W. W., Kirkland J.J., Bly D.D. Modern Size-Exclusion liquid chromatograhy. Practice of Gel permleation and Gel Filtration Chromatograhy. New York – Chichester – Brisban - Toronto, 1979. 465 P (p. 318-322).

3. Brugnerotto J., Desbrieres J., Roberts G., Rinaudo M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography // J. Polymer, 2001, v. 42, p. 9921-9927.

4. Лопатин С.А., Дербенёва М.С., Куликов С.Н., Варламов В.П., Шпигун О.А. Фракционирование хитозана методом ультрафильтрации // ЖАХ. 2009.Т. 64. № 6. С. 666-670.

5. Лопатин С.А. Проблемы определения молекулярно-массовых характеристик хитозана // Рыбпром. Технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. 2010. № 2. С. 82-85.

6. Хитин и хитозан: природа, получение и применение. Материалы проекта CYTED, IV 14; " Хитин и хитозан из отходов переработки ракообразных". Под редакцией M.Sc. Ana Pastor de Abram (Перу). Перевод с испанского К.М. Михлиной, Е.В. Жуковой, Е.С. Крыловой. Научные редакторы: В.П. Варламов, С.В. Немцев, В.Е. Тихонов. Издано российским хитиновым обществом, 2010, с. 156-158.

7. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Самуйленко А.Я., Гринь А.В. Способ определения полимерных молекул хитозана в препаратах хитозана // Пат. РФ № 2295127. МПК[7] G01N 30/02. Бюл. 2007. № 7.

8. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Буряк А.К., Самуйленко А.Я. Возможности молекулярного химического анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при использовании полимерного сорбента на основе высокосшитого полидивинилбензола. // ДАН. 2009. Т. 427. № 1. С. 57-60.

9. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Самуйленко А.Я., Буряк А.К., Гринь А.В. Изучение методом ВЭЖХ физико-химических характеристик препаратов хитозана при их изготовлении и хранении. // Доклады РАСХН. 2009. № 4. С. 58-60.

10. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: "Наука", 1985, 536 с.

11. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Панина Л.И., Буряк А.К. Устройство крепления и герметизации кварцевой кюветы в рефрактометрическом детекторе для жидкостной хроматографии // Пат. РФ № 2362143. МПК[7] G01N 21/05. Бюл. 2009. № 20.

12. Сочилина К.О., Сочилин В.А. Способ получения сорбентов для хроматографии // Пат. РФ № 2163911. МКИ С 08 F 257/02; G 01 N 30/48. Бюл. 2001. № 7.

13. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Ермаков В.В., Буряк А.К., Хабаров М.В. Способ приготовления высокоэффективных колонок с полимерными сорбентами для жидкостной хроматографии // Пат. РФ № 2278379. МПК G01N 30/56. Бюл. 2006.№ 17.

Хабаров Виктор Борисович – к.х.н. ст. научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, тел.: 8(495) 9554668

Пронин Александр Яковлевич - к.х.н., вед. научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Буряк Алексей Константинович – д.х.н., проф., зав. лаборатории, Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Khabarov Victor B. – Candidat of Chemistry, senior research worker, Institution Russian Academy of Science A.N. Frumcin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of RAS, Moscow, e-mail: Khabarov@phyche.ac.ru

Pronin Alexander Ya. - Candidat of Chemistry, senior research worker, Institution Russian Academy of Science A.N. Frumcin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of RAS, Moscow

Buryak Aleksey K. - Doctor of Chemical sciens, professor, chief of laboratory, Institution Russian Academy of Science A.N. Frumcin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of RAS, Moscow