



УДК 543.544; 577.1:544.77

Механизм разделения полимерных молекул хитозана и хитозан-хитина на колонке с высокосшитым полидивинилбензольным сорбентом

Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Пыцкий И.С., Буряк А.К.

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

Поступила в редакцию 21.11.2011 г.

Аннотация

До настоящего времени работ по разделению методом ВЭЖХ полимерных молекул хитозана и хитозан-хитина в литературе не встречается. В данной работе представлены данные по механизму разделения хитозана и хитозан-хитина из креветки методом ВЭЖХ на колонке с высокосшитым полидивинилбензольным (ВПДВБ) сорбентом в водном растворе уксусной кислоты при использовании хроматографического тракта жидкостного хроматографа в безметаллическом исполнении. Элюирование из колонки с ВПДВБ-сорбентом полимерных молекул хитозана и хитозан-хитина и их комплексов с металлами в уксусной кислоте осуществляется в режиме критической ВЭЖХ по эксклюзионному механизму и по смешанному сорбционно-эксклюзионному механизму. Анализ методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой проб хитина и хитозана из креветки показал, что хитин содержат элементы – Mg, Si, P, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Sr, Cd, Hg и хитозан – Si, Ti, Mn, Fe, Co, Cu и Sr.

Ключевые слова: хитозан, хитозан-хитин, ВЭЖХ, хроматографическая колонка с ВПДВБ-сорбентом, уксусная кислота, эксклюзионный и сорбционно-эксклюзионный механизм элюирования.

Till now activities on separation by a method HPLC of polymer molecules chitosan and chitosan-chitin in the literature does not meet. In the given activity the data on the mechanism of separation chitosan and chitosan-chitin from a shrimp by a method HPLC on a column with highcrosslinked polydivinylbenzen (HCDVB) by sorbent in aqueous solution of acetic acid are shown at usage of a chromatographic channel of a liquid chromatograph in metalless fulfilment. The eluting from a column with HCDVB-sorbent of polymer molecules chitosan and chitosan-chitin and their complexes with metals in acetic acid implements in a mode critical HPLC on exclusion and on blended sorption-exclusion mechanism. The analysis by a method of mass spectrometry with inductively-bound plasma of samples of chitin and chitosan from a shrimp has shown, that the chitin is contained by members – Mg, Si, P, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Sr, Cd, Hg and chitosan-chitin – Si, Ti, Mn, Fe, Co, Cu and Sr.

Keywords: chitosan, chitosan-chitin, HPLC chromatographic column with HCDVB-sorbent, acetic acid, exclusion and sorption-exclusion mechanism of separation

Введение

В [1, 2] показано, что при использовании метода ВЭЖХ на колонке из стекла (150 x 3 мм) с ВПДВБ-сорбентом в водном растворе уксусной кислоты (4 %) разделяются полимерные молекулы хитозана, хитозан-хитина и молекулы хитозан-

белкового комплекса, что позволяет определять молекулярно-массовое распределение молекул хитозана и содержание примесей в препаратах хитозана.

Для высокоэффективных колонок с ВПДВБ-сорбентом с хроматографическим трактом в безметаллическом исполнении характерны следующие процессы:

– элюирование из колонки в водном растворе уксусной кислоты (4; 6 %) полимеров декстрана с ММ 0,504-2000 кДа протекает по эксклюзионному механизму [1];

– элюирование из колонки в абсолютном этаноле олигомеров гидролизованного и негидролизованного этилсиликата протекает в режиме критической ВЭЖХ по эксклюзионному механизму [3, 4];

– элюирование из колонки дистиллированной водой олигомеров и полимеров кремниевой кислоты протекает по эксклюзионному, а мономерной кремниевой кислоты – по сорбционному механизму [5];

– элюирование из колонки в водном растворе ацетонитрила (80%) гидратированных молекул сульфата натрия протекает по смешанному сорбционно-эксклюзионному механизму [6].

Цель настоящего исследования – изучение механизма разделения полимерных молекул хитозана и хитозан-хитина на высокоэффективной колонке с ВПДВБ-сорбентом в водном растворе уксусной кислоты.

Эксперимент

В работе использовали нестандартный жидкостный хроматограф, в котором хроматографический тракт выполнен в безметаллическом исполнении. Жидкостный хроматограф включал детекторы – рефрактометрический RIDK-102 фирмы Laboratorni pristroje Praha (Чехословакия) [7] и ультрафиолетовый (диодная матрица) фирмы Agilent Technologies (США) с жидкостным трактом из фторопласта [8]. В насосе высокого давления жидкостный тракт выполнен из полиэтерэтеркетона (ПЭЕК) и капилляров из ПЭЕК (вн. Ø 0,25 мм) фирмы Knauer (Германия). Инжектор выполнен из ПЭЕК и фторопласта. Масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой фирмы Agilent Technologies (США). Для разделения проб хитозана использовали колонку из стекла (150 x 3 мм) с ВПДВБ-сорбентом в виде моносферических зёрен диаметром (d_p) 10 мкм, $D_{пор}$ 500 Å. Упаковку колонок ВПДВБ-сорбентом осуществляли в водном растворе щёлочи с pH 11 при давлении 25 МПа в соответствии с [6]. Для исследования использовали образцы хитозана, полученные при деацетилировании хитина креветки щёлочью – 40 %-й водный раствор NaOH при температуре 125 °С в течение 4 часов. [9]. В качестве элюента и для растворения проб препаратов хитозана использовали 4 и 6 %-й водные растворы уксусной кислоты. Условия разделения: колонка из стекла (150 x 3 мм) с ВПДВБ-сорбентом, зёрнения 10 мкм. Скорость элюента – 4 и 6 %-го водного раствора уксусной кислоты, 0,1 мл/мин. Анализируемая проба – 10 мкл 0,05 %-го раствора препарата хитозана в элюенте. После начала выхода разделённых проб хитозана на колонке с ВПДВБ-сорбентом отбирали последовательно по одной капле (объёмом 28 мкл) 14 проб из хроматографических пиков, содержащих хитозан и хитозан-хитин. 10 мкл каждой отобранной пробы анализировали на колонке с ВПДВБ-сорбентом (см. табл. 1).

Элементный анализ проб хитина и хитозана из креветки проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Для этого пробы разлагали по

общепринятой методике. К 0,2 г хитина или хитозана добавляли 1 мл концентрированной азотной кислоты (о.с.ч.). Пробу нагревали при температуре 100 °С до растворения. В охлаждённую пробу добавляли 0,2 мл 70 %-й перекиси водорода (о.с.ч.) и нагревали при 100 °С до появления в пробирке оксидов азота. После разложения пробу охлаждали и добавляли деионизированную бидистиллированную воду до объёма 15 мл. Раствор использовали для определения элементов. Концентрацию элементов в пробе рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{в пробе}} = [C \text{ мг/л} \times 0,015 \text{ л}] : M,$$

где: $C_{\text{в пробе}}$ – концентрация элемента в пробе, мг/кг; C – концентрация элемента, мг/л; 0,015 – объём приготовленной пробы, л; M – навеска исследуемой пробы, кг.

Обсуждение результатов

Анализ результатов табл. 1 показывает, что отобранные пробы хитозана с молекулярной массой (ММ) 50,1-1047 кДа (пробы 1-7) и хитозан-хитина с ММ 1,4-29,5 кДа (пробы 8-14) на колонке с ВПДВБ-сорбентом имеют одинаковые объёмы удерживания (V_r), что указывает на элюирование молекул в режиме критической ВЭЖХ [10]. При хроматографическом анализе препаратов хитозана элюируются полимерные молекулы хитозана и хитозан-хитина из колонки с ВПДВБ-сорбентом в водном растворе уксусной кислоты (4, 6 %) в критическом режиме ВЭЖХ по эксклюзионному механизму и по смешанному сорбционно-эксклюзионному, молекулы хитозан-хитинового комплекса по сорбционному – механизму [1].

Таблица 1. Результаты анализа проб из хроматографических пиков, содержащих хитозан и хитозан-хитин из креветки, разделённых на колонке с ВПДВБ-сорбентом в водном растворе уксусной кислоты (4, 6 %), 0,1 мл/мин

| № пробы | Наименование пробы – № капли | *ММ, кДа | V_r , мл | Высота пика, мв | V_r , мл | Высота пика, мв |
|--------------------|------------------------------|----------|------------------------------------------|-----------------|------------|-----------------|
| | | | Элюент – водный раствор уксусной кислоты | | | |
| | | | 4 % | | 6 % | |
| Пик хитозана | | | | | | |
| 1 | 1-я | 1047.0 | 0.50 | 0.8 | 0.45 | 0.6 |
| 2 | 2-я | 631.0 | 0.50 | 1.3 | 0.46 | 1.5 |
| 3 | 3-я | 371.5 | 0.50 | 2.8 | 0.45 | 2.5 |
| 4 | 4-я | 213.8 | 0.50 | 4.3 | 0.46 | 3.2 |
| 5 | 5-я | 141.3 | 0.51 | 4.8 | 0.46 | 3.6 |
| 6 | 6-я | 83.2 | 0.51 | 4.7 | 0.46 | 3.9 |
| 7 | 7-я | 50.1 | 0.50 | 6.8 | 0.46 | 4.3 |
| Пик хитозан-хитина | | | | | | |
| 8 | 1-я | 29.5 | 0.51 | 7.8 | 0.46 | 4.3 |
| 9 | 2-я | 18.2 | 0.51 | 6.5 | 0.46 | 3.6 |
| 10 | 3-я | 11.0 | 0.51 | 6.5 | 0.46 | 3.2 |
| 11 | 4-я | 6.3 | 0.51 | 6.1 | 0.50 | 2.7 |
| 12 | 5-я | 3.2 | 0.51 | 3.2 | 0.50 | 2.2 |
| 13 | 6-я | 2.3 | 0.51 | 1.5 | 0.50 | 1.2 |
| 14 | 7-я | 1.4 | 0.51 | 1.4 | 0.50 | 0.9 |

*Молекулярные массы определяли по градуировочному графику (рис. 1).

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 (V_r , мл), который использовали для расчёта молекулярно-массового распределения хитозана.

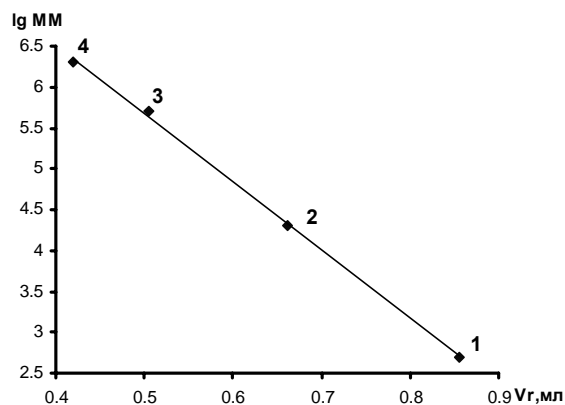


Рис. 1. Градуировочный график зависимости \lg ММ полимеров декстрана от V_r . Колонка из стекла (150x3 мм) с ВПДВБ-сорбентом, зерна 10 мкм. Элюент – 4 %-й водный раствор уксусной кислоты 0,1 мл/мин. 1 – мальтотриоза, 2 – Т-20, 3 – Т-500, 4 – Т-2000. Детектор – рефрактометрический RIDK-102 с жидкостным трактом из фторопласта

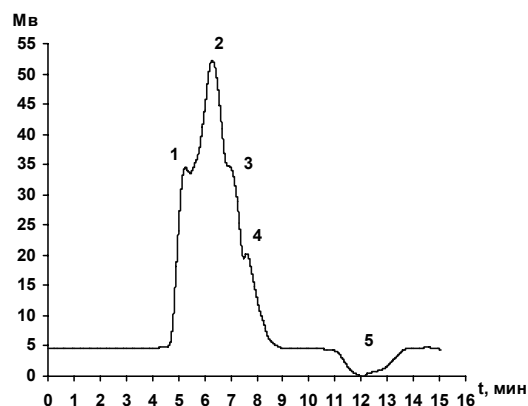


Рис. 2. Хроматограмма хитозана из креветки: 1-2 – полимерные молекулы хитозана, 3-4 – полимерные молекулы с хитозан-хитиновыми звеньями, 5 – вода. Колонка из стекла (150x3 мм) с ВПДВБ-сорбентом, зерна 10 мкм. Элюент – 4 %-й водный раствор уксусной кислоты, 0,1 мл/мин. Детектор – рефрактометрический RIDK-102 с жидкостным трактом из фторопласта

На рис. 2 представлена хроматограмма хитозана и хитозан-хитина, элюируемых из колонки с ВПДВБ-сорбентом в водном растворе уксусной кислоты в критическом режиме по эксклюзионному механизму.

На хроматограмме видно, что из колонки с ВПДВБ-сорбентом элюируются в водном растворе уксусной кислоты молекулы хитозана и хитозан-хитина, а на месте выхода хитозан-белкового комплекса детектируется отрицательный пик, который соответствует выходу пика воды с V_r 1,24 мл. Это связано с тем, что при растворении пробы хитозана в 4 %-м водном растворе уксусной кислоты, кислота реагирует с аминогруппами хитозана и образуется вода, которая детектируется в виде отрицательного пика. На УФ-детектор при $\lambda = 254$ нм и $\lambda = 280$ нм молекулы хитозан-белкового комплекса детектируются в виде положительного пика (рис. 3).

В [1] показано, что в хитозане хитозан-белковый комплекс (16 %) на рефрактометрическом детекторе определяются в виде положительного пика, то есть хитозан-белковый комплекс поглощает пик воды, которая образуется при растворении хитозана в 4 %-м водном растворе уксусной кислоты.

Эксклюзионный механизм подтверждается тем, что объёмы выхода хитозана и хитозан-хитина меньше колоночного объёма (1 мл), а в случае чистого сорбционного механизма объёмы выхода превышают колоночный объём.

Для заключения о механизме разделения полимерных молекул хитозана и хитозан-хитина нужно учитывать следующее:

– чистый хитозан содержит только аминогруппы ($-\text{NH}_2$), которые не поглощают УФ [11, с. 147] (при $\lambda = 210\text{-}400$ нм) и не взаимодействуют с ВПДВБ-сорбентом, благодаря чему элюируются из колонки по эксклюзионному механизму;

– полимерные молекулы хитозан-хитина содержат амидоацетильные группы ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$), в которых группировка $-\text{NH}-\text{CO}-$ ответственна за поглощение УФ при $\lambda = 235$ нм [11] и ответственна за сорбционные взаимодействия с сорбентом, поэтому эти молекулы элюируются с объёмом больше, чем объём удерживания чистого хитозана [1];

– эксперимент показывает, что молекулы хитозан-хитина из креветки выходят с объёмом меньше колоночного и меньше чем он наблюдается с хитозан-хитином из краба [1], что может быть объяснено образованием комплексов металлов (Si, Ti, Mn, Fe, Co, Cu, Sr), обнаруженных в препаратах хитозана креветки, благодаря чему поглощение УФ сдвигается в область при $\lambda = 254$ нм и $\lambda = 280$ нм, а эти комплексы очень слабо удерживаются сорбентом.

Анализ проб хитозана из креветки методом ВЭЖХ на колонке с ВПДВБ-сорбентом показал, что при детектировании на УФ-детекторе с жидкостным трактом из фторопласта (диодная матрица) полимерные молекулы хитозана, хитозан-хитина и хитозан-белкового комплекса поглощают УФ при $\lambda = 254$ нм и $\lambda = 280$ нм (рис. 3). Это по-видимому связано с тем, что аминогруппы хитозана и хитозан-хитина образует комплексы с Si, Ti, Mn, Fe, Co, Cu и Sr (см. табл. 2).

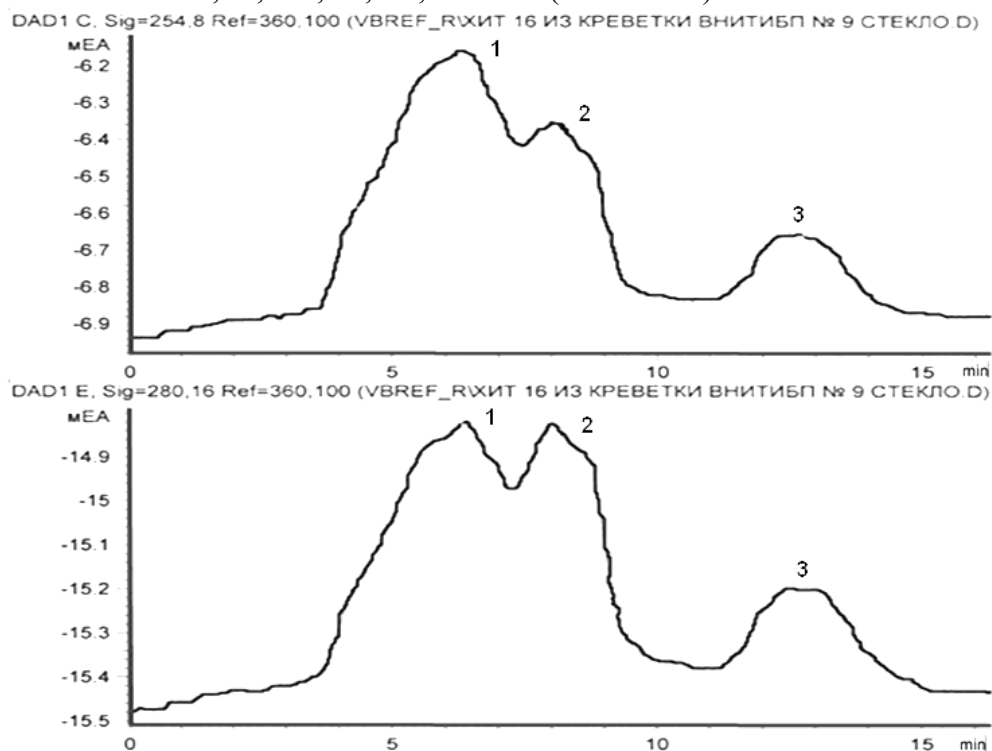


Рис. 3. Хроматограмма хитозана из креветки: 1 – полимерные молекулы хитозана, 2 – полимерные молекулы с хитозан-хитиновыми звеньями, 3 – молекулы хитозан-белкового комплекса. Колонка из стекла (150 x 3 мм) с ВПДВБ-сорбентом, зернения 10 мкм. Элюент – 4 %-й водный раствор уксусной кислоты, 0,1 мл/мин. УФ-детектор при $\lambda = 254$ нм и $\lambda = 280$ нм с жидкостным трактом из фторопласта

Анализ методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой проб хитина и хитозана креветки показал, что хитин содержат элементы – Mg, Si, P, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Sr, Cd, Hg и хитозан – Si, Ti, Mn, Fe, Co, Cu и Sr (см. табл.

2). При деацетилировании хитина креветки щёлочью комплексы Mg, P, Ca, Cr, Zn, Cd и Hg с аминогруппами хитина разрушаются, а комплексы Si, Ti, Mn, Fe, Co и Sr разрушаются частично. Хитозан из креветки по сравнению с хитином содержит меньше кремния в 1,07 раза, титана в 2,7 раза, марганца в 4 раза, железа в 1,7 раза, кобальта в 6 раз и стронция в 39,7 раза.

Таблица 2. Результаты элементного анализа содержания металлов методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой в твёрдых пробах хитина и хитозана из креветки, мг/кг

| Элемент | Атомная масса | Хитин креветки | *Хитозан из креветки |
|---------------|---------------|---------------------|----------------------|
| | | Концентрация, мг/кг | |
| Mg (магний) | 24 | 105.0 | - |
| Si (кремний) | 29 | 360.0 | 336.7 |
| P (фосфор) | 31 | 589.5 | - |
| Ca (кальций) | 43 | 887.3 | - |
| Ti (титан) | 47 | 6.7 | 2.5 |
| Cr (хром) | 53 | 0.40 | - |
| Mn (марганец) | 55 | 5.95 | 1.44 |
| Fe (железо) | 57 | 290.00 | 174.50 |
| Co (кобальт) | 59 | 0.30 | 0.05 |
| Cu (медь) | 63 | 5.20 | 5.20 |
| Zn (цинк) | 66 | 5.30 | - |
| Sr (стронций) | 88 | 27.80 | 0.70 |
| Cd (кадмий) | 111 | 0.02 | - |
| Hg (ртуть) | 202 | 0.04 | - |

*Хитозан содержит полимерные молекулы с хитозан-хитиновыми звеньями

Заключение

Метод ВЭЖХ анализа на колонке с ВПДВБ-сорбентом обеспечивает элюирование полимерных молекул хитозана и хитозан-хитина и их комплексов с металлами в уксусной кислоте (4 и 6 %) в режиме критической ВЭЖХ по эксклюзионному механизму и по смешанному сорбционно-эксклюзионному механизму.

Список литературы

1. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Самуйленко А.Я., Гринь А.В. Способ определения полимерных молекул хитозана в препаратах хитозана. Пат. РФ № 2295127. МПК⁷ G01N 30/02. Бюл. 2007. № 7.
2. 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.
3. Пронин А.Я., Хабаров В.Б., Оспенникова О.Г., Пикулина Л.В., Антипин Л.М., Ларионов О.Г. Способ определения молекулярно-массового распределения олигомеров этоксисилоксанов в гидролизованных и негидролизованных этилсиликатах. Пат. РФ № 2280252. МПК⁷ G01N 30/26. Бюл. 2006. № 20.

4. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Буряк А.К., Оспенникова О.Г., Пикулина Л.В. Молекулярный химический анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии олигомеров этоксисилоксанов, получаемых при кислотном гидролизе этилсиликата. // ДАН. 2009. Т. 429. № 4. С. 1-4.
5. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Буряк А.К. Способ определения форм существования и молекулярно-массового распределения полимерных молекул кремниевой кислоты в геотермальных водных растворах. Пат. РФ № 2330280. МПК⁷ G01N 30/26. Бюл. 2008. № 21.
6. 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. МПК⁷ G01N 30/56. Бюл. 2006. № 17.
7. 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. МПК⁷ G01N 21/05. Бюл. 2009. № 20.
8. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Буряк А.К. Исследование хитозана и примесных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при использовании хроматографического тракта жидкостного хроматографа в металлическом и безметаллическом исполнении // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т.11. Вып. 3. С. 292-298.
9. Быкова В.М., Немцев С.В. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана. В кн.: Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П. Москва. Наука, 2002, с. 7-23.
10. Горшков А.В. Евреинов В.В. Критическая хроматография макромолекул. // 100 лет хроматографии / Отв. ред. Б.А. Руденко. – М.: Наука, 2003. С. 136-184.
11. Химическая энциклопедия. Москва, 1988. Т. 1. С. 147, 250.

Хабаров Виктор Борисович – к.х.н., старший 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., ведущий научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

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

Пыцкий Иван Сергеевич – аспирант, 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

Pytsky Ivan S. – post graduate student, Institution Russian Academy of Science A.N. Frumcin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of RAS, Moscow