# IVAN SAVIĆ GORAN NIKOLIĆ IVANA SAVIĆ MILORAD CAKIĆ

Tehnološki fakultet, Leskovac, Srbija

NAUČNI RAD

UDK 543.544:547.458:66.095.2 DOI: 10.2298/HEMIND0905415S

# PRIMENA HP-GFC HROMATOGRAFSKE METODE ZA ANALIZU OLIGOSAHARIDA U BIOAKTIVNIM KOMPLEKSIMA

U radu je optimizovana odgovarajuća GFC analitička metoda za analizu oligosaharida u bioaktivnim kompleksima. Iz grupe preparata mikroelemenata neophodnih organizmu, ispitivani su originalno sintetizovani bioaktivni kompleksi na bazi različitih metala (Cu, Fe i Co) sa oligosaharidima dekstrana i pululana. GFC metoda je primenjena za praćenje raspodele molarnih masa, kao i stepena polimerizacije oligosharida dekstrana i pululana, kako polazne supstance u sintezi, tako i u uzorcima različitih bioaktivnih kompleksa mikroelemenata. Pronađeno je i da stepen vezivanja metala u kompleksu prvenstveno zavisi od stepena polimerizacije liganda, njegove konstitucije, kao i učešća OH grupa liganda uske raspodele masa u koordinacionoj sferi centralnog metalnog jona. S druge strane, proučavanje interakcije polisaharida sa jonima prelaznih metala je od posebnog značaja i u stalnom je razvoju, zahvaljujući prisustvu takvih interakcija u biološkim sistemima i mnogostrukim primenama koje one nude u oblastima važnim za medicinu, poljoprivredu, veterinarsku i farmaceutsku industriju.

Bioaktivni metali kao neorganske supstance, minerali ili u obliku organsko-neorganskih jedinjenja koje organizam ne može sintetizovati, nosioci su životnih funkcija organizma. Ulaze u sastav različitih enzima ili drugih bioaktivnih kompleksa koji su neophodni za odvijanje biohemijskih procesa. Mineralne materije su neophodne organizmu, a njihov nedostatak može biti uzrok mnogih poremećaja metabolizma i različitih stanja bolesti. U organizmu su svi minerali i oligoelementi u ravnoteži i ukoliko se njihov balans poremeti u korist jednog, moguć je gubitak drugog.

Gvožđe, kao funkcionalno najvažniji biogeni element, neophodan je sastojak ćelijskih enzima i citohroma koji obezbeđuju procese ćelijskog disanja. Nedostatak gvožđa u organizmu može da se ispolji u vidu anemije, a pošto organizam nije sposoban sam da ga proizvodi, neophodno je njegovo unošenje kao dodatak ishrani ili kroz pomoćna lekovita sredstva i mineralno-vitaminske preparate. Slično tome, kobalt(II)-jon je deo vitamina B-12 i eritropoetina. Njegov deficit može da dovode do hipotiroidizma i uzrokuje pernicioznu anemiju koja se manifestuje velikim sniženjem broja eritrocita i nastanka metilmalonske kiseline. Iako je u namirnicama zastupljen u dovoljnim količinama, njegov manjak je karakterističan kod osoba na totalnoj parenteralnoj terapiji. Bakar je važan mikroelement, jer ulazi u sastav oksidoreduktivnih enzima koji imaju ulogu katalizatora pri ugradnji gvožđa u hemoglobin, tj. stvaranju eritrocita. Pojava deficita bakra u organizmu, pored stanja mikrocitne anemije, poznata je i kao hipokupremija. Ovakva stanja organizma i slične bolesti su donedavno prevazilažena tretiranjem organizma odgovarajućim solima mikroelemenata, mineralima i njihovom kombinacijom sa vitaminima. Pri tom se malo vodilo računa o sekundarnim efektima i nus pojavama u organizmu.

Pored aktivnih lekovitih supstanci (jona kobalta, raznih vitamina i dr.), za veću bezbednost i efikasnost u organizmu u poređenju sa ranije korišćenim solima mikroelemenata, neophodno je da preparati ovog tipa sadrže i bioligande makromolekularnog tipa kao nosače aktivnih supstanci. Iz ove grupe preparata od posebnog značaja mogu biti jedinjenja oligo i polisaharida sa različitim biometalima. Primenu mogu naći i u veterini i u humanoj medicini, s obzirom da u svom sastavu sadrže nenutritivni polisaharid ili oligosharide kao energetski izvor i bioelemente kao značajne faktore u metaboličkim procesima organizma.

Dominantnu ulogu liganda u bioaktivnim kompleksima, a u svojstvu nosača aktivnih supstanci u preparatima, uglavnom imaju polisaharidi dekstran, pululan i inulin. Ovi polisaharidi imaju izvanrednu sposobnost formiranja vodorastvornih kompleksa sa različitim biometalima (Fe, Cu, Co), kao i drugim elementima. Stabilnost, rastvorljivost, resorpcija i netoksičnost kompleksa važan su faktor koji mora biti zadovoljen sa stanovišta primene. U humanoj medicini i veterini koristi se veliki broj komercijalnih preparata na bazi kompleksa dekstrana i njegovih derivata sa katjonima biometala (Cu, Fe, Co). Zbog toga su ovi preparati od velikog interesa za farmaceutsku industriju. U literaturi su dobro proučena i druga kompleksna jedinjenja dekstrana sa različitim katjonima: Tb, Al, Cd, Pt, Pb, Ni i Mn.

Međutim, kako ishod sinteze, stabilnost i farmakobiološki učinak bioaktivnih kompleksa različitih metala sa oligosaharidima u velikoj meri zavise od stepena polimerizacije primenjenog liganda (oligosaharida) i raspodele molarnih masa kao osnovne karakteristike ponašanja polimerne supstance, javila se potreba za razvojem metoda njihove analize. Za definisanje postupaka praćenja i određivanja srednjih molarnih masa, raspodele masa i stepena polimerizacije liganda uspešnom se pokazala

Autor za prepisku: I. Savić, Tehnološki fakultet, Bulevar oslobođenja 124, 16000 Leskovac, Srbija.

E-pošta: ici\_teh@yahoo.com

Rad primljen: 15. septembar 2009.

Rad prihvaćen: 25. septembar 2009.

metoda gel filtracione hromatografije (GFC). Stoga je cilj ovog rada izbor i optimizacija odgovarajuće GFC analitičke metode za analizu oligosaharida u bioaktivnim kompleksima.

### **EKSPERIMENTALNI DEO**

#### Materijal

Standardi dekstrana poznate molarne mase za kalibraciju: dekstran,  $M_w$  2980 (T-3), 4940 (T-5), 9860 (T--10), 14790 (T-15), 24500 (T-25), 41200 (T-40), 69800 g·mol<sup>-1</sup> (T-70) (Pharmacia), kao i uzorci originalno proizvedenog hidriranog ili oksidovanog niskomolarnog dekstrana, dobijeni su od Farmaceutsko-hemijske industrije Zdravlje-Aktavis, Leskovac. Kao marker za određivanje zapremine  $V_0$  korišćen je plavi dekstran,  $M_w$  $2 \times 10^6$  g·mol<sup>-1</sup>.

Standardi pululana poznate molarne mase za kalibraciju: pululan T-5 ( $M_w$  5000), pululan T-10, pululan T-20, pululan T-30, pululan T-40, (Pharmacia), dobijeni su od Farmaceutsko-hemijske industrije Zdravlje-Aktavis, Leskovac.

Uzorci bioaktivnih kompleksa metala (Cu, Co, Fe) sa oligosaharidima dekstrana i pululana, sintetisani su po originalnom postupku [1–6].

#### Priprema standarda i rastvora za ispitivanje

Standardi dekstrana ili pululana su pripremani pojedinačnim odmeravanjem  $20\pm2$  mg uzorka u posebnim odmernim tikvicama. Dekstran u svakom sudu je rastvaran redestilovanom vodom i razblaživan do 1 cm<sup>3</sup> mobilnom fazom. Na isti način su pripremani i rastvori ispitivanih bioaktivnih kompleksa.

#### Gel hromatografija

HP-GFC analiza. Analiza uzoraka vršena je na hromatografskom sistemu HP Agilent GFC 1200 System sa DAD i RID detektorom. Separacija polisaharida, sintetisanih kompleksa i nevezanog liganda vršena je na Zorbax Eclipse PSM-300 koloni. Kolone su snabdevene specifičnim pretkolonama radi sigurnosti rada i bezbednosti od zaprljanja kolone. Eluiranje frakcija je vršeno destilovanom vodom, na temperaturi 25 °C. Protok u sistemu (1 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) je održavan konstantnim binarnom pumpom (HP, Agilent). U sistem je dozirano po 50 µL ispitivanog rastvora. UV spektri prisutnih frakcija su snimani DAD detektorom u intervalu talasnih dužina od 200 do 400 nm. Gel hromatogrami su registrovani RID detektorom i korišćeni za obradu gel-hromatografskih podataka. Kompjuterska obrada snimljenih HP-GFC hromatograma i UV spektara vršena je softverskom aplikacijom Agilent Chem Station<sup>™</sup> za LC 3D Systems (Copyright © 2006, Agilent), pod Windows XP OS podrškom, za automatsku obradu  $M_{\rm w}$ ,  $M_{\rm n}$ ,  $M_{\rm z}$ ,  $M_{\rm v}$ , D, [ $\eta$ ],  $V_{\rm p}, M_{\rm p}$  i A.

### **REZULTATI I DISKUSIJA**

#### Optimizacija GFC sistema i hromatografskih uslova

Tokom optimizacije HP-GFC sistema korišćene su gel kolone različitog tipa: Zorbax PSM-60 (M<sub>w</sub> 500- $-10000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), Zorbax PSM-300 ( $M_{\rm w}$  3000–300000 g mol<sup>-1</sup>), Zorbax PSM Bimodal-S ( $M_w$  500–1×10<sup>6</sup> g·mol<sup>-1</sup>). Na kolonama su eluirani standardi: dekstran T-5, dekstran T-10, dekstran T-40. Testirana kolona Zorbax PSM-60 je pokazala dobru separaciju uzoraka ali je njeno ograničenje analize molarnih masa do 10000 g mol<sup>-1</sup> bio nedostatak u razvoju metode za kontrolu kvaliteta kliničkog dekstrana T-40 i T-70 koji imaju parenteralnu primenu [35,36]. Adekvatna separacija standardnih uzoraka postignuta je i upotrebom Zorbax PSM-300 gel kolone ( $M_w$  3000–300000 g mol<sup>-1</sup>), pa je ova kolona, uzimajući u obzir očekivane molarne mase ispitivanih uzoraka, usvojena kao sastavni deo sistema za dalja ispitivanja. Nedostatak ove kolone je nemogućnost separacije i analize eventualno prisutnih oligosaharida mase manje od 3000 g mol<sup>-1</sup>. Prema očekivanju, PSM Bimodalna-S kolona nije pokazala zadovoljavajući odziv na hromatogramu analiziranih komponenti, s obzirom na to da se radi o deaktiviranom pakovanju u koloni koje je namenjeno analizi nepolarnih polimernih jedinjenja. Čak je i preveliki opseg razdvajanja molarnih masa pokazao negativan ishod u separaciji jedinjenja približnih molarnih masa.

Imajući u vidu da su standardi dekstrana i pululana, kao i njihovi bioaktivni kompleksi sa različitim metalima veoma dobro rastvorni u vodi, a sa druge strane činjenicu da je PSM-300 gel kolona namenjena za analizu polimera pretežno u vodenim rastvorima, redestilovana voda je izabrana kao optimalna mobilna faza. S obzirom na definisano pakovanje i svojstva primenjene kolone od strane proizvođača, nije bilo neophodno dodavati razne soli u vodi radi optimizovanja uticaja jonske jačine na zrna gela u koloni, kako se često postupak hromatografisanja opisuje u literaturi. U par primera kombinovanja Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ili NaCl sa mobilnom fazom nisu uočene značajne promene hromatografskih parametara, pa je u daljem radu korišćena samo redestilovana voda.

Radi optimizacije sistema, ispitivan je uticaj brzine protoka mobilne faze na razdvajanje analiziranih komponenti u opsegu 0,5–1,5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Najbolja separacija ispitivanih supstanci, sa zadovoljavajućom rezolucijom pikova, pri ekonomičnom utrošku mobilne faze i optimalnom retencionom vremenu, postignuta je pri protoku 1,0 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Ova vrednost je usvojena kao optimalna za sva dalja ispitivanja.

Temperatura kolone je optimizovana u opsegu 25– -40 °C. Rezultati analize su pokazali da se sa povećanjem temperature menjaju eluacione zapremine posmatranog pika standarda, pa je za dalji rad odabrana kao optimalna sobna temperatura, tj. 25 °C. Referentna talasna dužina detekcije, u slučaju primene UV-DAD detektora ispitivana je u opsegu 200– -400 nm. Imajući u vidu UV spektrofotometrijsku analizu vodenih rastvora dekstrana i pululana, kao i njihovih kompleksa [7–9], najbolji odziv signala s obzirom na intenzitet apsorpcionih traka dobijen je u užem opsegu, 250–300 nm. Kao optimalna referentna talasna dužina UV-DAD detektora odabrana je i podešena vrednost na 280 nm za dalja ispitivanja.

# Primena HP–GFC metode u ispitivanju biokompleksa

Radi definisanja i implementiranja kao farmakopejske metode za kontrolu kvaliteta ili analizu oligo- i polisaharida kao farmaceutski aktivnih supstanci (analogno kliničkom dekstranu-40 u parenteralnim rastvorima), u radu je za definisanje i praćenje promena raspodele molarnih masa kao i ponašanja primenjenih oligosaharida (dekstrana i pululana,  $M_w$  5.000–10.000 g·mol<sup>-1</sup>) u biokompleksima sa različitim metalima, primenjena HP–GFC metoda. Optimizovani su i odabrani parametri GFC sistema za uspešno razdvajanje frakcija molekula različitih masa sa što užom raspodelom masa. Za određivanje raspodele molarnih masa pojedinih frakcija, kao ključni parametar kvaliteta oligosaharida bitan za njihovu primenu u sintezi bioaktivnih kompleksa sa metalima, definisana je procedura za GFC kalibraciju.

#### Kalibracija GFC metode

Imajući u vidu da su za sintezu biokompleksa korišćene prečišćene i standardizovane frakcije oligosaharida dobijene kiselom hidrolizom nativnih polisaharida pod odgovarajućim uslovima (T, t, pH) [10], bilo je realno izvršiti kalibraciju GFC sistema standardima dobijenim na sličan način. U ovom slučaju realnog sistema, biće znatno lakše definisati odgovarajuće promene oligosaharida kod biokompleksa sa aspekta eliminisanja uticaja prisutnih primesa u vidu frakcija različitih molarnih masa. Molarne mase standarda su određivane, definisane i proveravane standardnim metodama fotometrije rasipanja svetlosti (light-scattering fotometry) i viskozimetrije, relevantnim za karakterisanje polimera [11]. Hromatogrami i odgovarajući 3D dijagram UV spektara standarda dekstrana dobijeni pri optimalnim uslovima, prikazani su na slici 1.

Sve dobijene hromatograme standarda dekstrana karakteriše visoka moć rezolucije, pravilna pomeranja pikova u funkciji eluacione zapremine, kao i uska raspodela masa frakcije koja karakteriše srednju molarnu masu ispitivanog uzorka.

Srednje molarne mase dekstrana i pululana u funkciji eluirane zapremine uzoraka omogućile su konstrukciju kalibracionih dijagrama (slike 2 i 3), koji će biti korišćeni u daljem radu za analizu bioaktivnih kompleksa. Postupak kalibracije se sastoji u definisanju svakog pojedinačnog hromatograma standrarda koji se kao kalibracioni fajl zadaje i koristi prilikom određivanja raspodele masa pomoću softvera Agilent ChemStation LC–GFC. Statističkom obradom hromatografskih parametara, pored kalibracionog dijagrama, dobijena je i regresiona jednačina za određivanje molarnih masa sa regresionim parametrima greške.

Odgovarajući hromatogram pululana, korišćenog u sintezi biokompleksa sa različitim mikroelementima, prikazan je na slici 4 kao i 3D dijagram UV spektara.

## GFC analiza kompleksa Fe sa oligosaharidima

GFC ispitivanja vršena su na uzorcima kompleksa Fe-dekstran (kod koga je kao ligand korišćen hidrirani niskomolarni dekstran ( $M_w$  5000 g·mol<sup>-1</sup>)), i kompleksa



Slika 1. GFC hromatogrami standarda dekstrana,  $M_w$ : 41200 (a), 24500 (b), 9860 (c), 4940 (d) i 2980 g·mol<sup>-1</sup> (e), sa odgovarajućim 3D dijagramom UV spektara.

Figure 1. GFC chromatograms of dextran standards,  $M_w$ : 41200 (a), 24500 (b), 9860 (c), 4940 (d) and 2980 g mol<sup>-1</sup> (e), with properly 3D diagram of UV spectrum.



Slika 2. GFC kalibracioni dijagram standarda dekstrana T-3 do T-70. Figure 2. GFC calibration diagram of dextran standards from T-3 to T-70.



Slika 3. GFC kalibracioni dijagram standarda pululana T-3 do T-70. Fig. 3. GFC calibration diagram of pullulan standards from T-3 to T-70.



Slika 4. Hromatogrami pululana,  $\mathbf{M}_{w}$  6000 g mol<sup>-1</sup>, sa odgovarajućim 3D dijagramom. Figure 4. The chromatograms of pullulan,  $\mathbf{M}_{w}$  6000 g mol<sup>-1</sup>, with properly 3D diagram.

Fe-pululan (kod koga je kao ligand korišćen hidrirani niskomolarni pululan ( $M_w$  6000 g·mol<sup>-1</sup>)).

U okviru GFC ispitivanja, radi poređenja konstitutivno različitih liganda, posebno su razmatrani: domaći komercijalni parenteralni rastvor kompleksa gvožđa(III) sa HNMD ("Fedex", Zdravlje-Leskovac, sa sadržajem gvožđa(III) od 75 mg cm<sup>-3</sup>), inostrani kompleks Fe-dekstran ("Imferon", Pharmaceuticals Inc. US [12]) i originalno sintetizovan kompleks Fe-pululan [7]. Odgovarajući GFC hromatogrami prezentovani su na slici 5.

Ispitivani preparat imferon uključuje vodene koloidne suspenzije ili rastvore kompleksa feri-oksihidroksida sa dekstranom, za koji je light-scattering metodom utvrđeno da u zavisnosti od postupka sinteze ima srednju molarnu masu u opsegu 100–600 kg mol<sup>-1</sup>, kao i suštinski važnu uniformnu raspodelu masa [13]. Na osnovu dobijenog eluograma (slika 5b) zaključeno je da prioritetan opseg molarnih masa kompleksa između 250 i 300 kg mol<sup>-1</sup>, s obzirom na to da ne postoje odgovarajući standardi iz ove grupe kompleksa za poređenje veličine molekula. Slično drugim kompleksima i ovde su uočljive frakcije nevezanog dekstrana, sa manjim udelom u odnosu na obojenu frakciju kompleksa, koje svojim prisustvom stabilizuju polinuklearni sistem. Ko-



Slika 5. Hromatogrami kompleksa: Fedex-Zdravlje (a), Imferon-Inc.US (b) i Fe-pululan (c). Fig. 5. The chromatograms of complexes: Fedex-Zdravlje (a), Imferon-Inc.US (b) and Fe-pullulan (c).

mercijalni preparat fedex (slika 5, kriva a) sadrži veći udeo nevezanih oligosaharida, niže molarne mase (oko 1000—3000 g mol<sup>-1</sup>), ali je i sam kompleks heterogeniji po svom sastavu. Sličnih karakteristika je i kompleks Fe-pululan (slika 5, kriva c), kod koga nevezane sekundarne frakcije imaju nešto višu molarnu masu nego kod dekstranskog kompleksa, što je i očekivano s obzirom na veću polaznu masu liganda u sintezi i strukturnu razliku polimaltotrioze (pululana) od linearnog poliglukozana (dekstrana).

Na slici 6 prikazani su hromatogram kompleksa Fe-pululan dobijen DAD detektorom i njegov 3D dijagram UV spektara.



*Slika 6. Eluogram kompleksa Fe-pululan (a), sa odgovarajućim 3D dijagramima UV spektara (b). Figure 6. The eluogram of complex Fe-pullulan (a), with 3D diagrams of UV spectrum (b).* 

#### GFC analiza kompleksa Cu sa oligosaharidima

Radi razjašnjavanja strukture kompleksa dvovalentnog jona bakra sa oligosaharidima, sintetizovanih pri različitim pH vrednostima (pH 7,5; 8,0; 10,0 i 12,0), kao i uticaja konstituciono različitih liganda na ishod sinteze i stabilnost kompleksa, GFC metodom vršena je analiza sintetisanih kompleksa Cu-dekstran i Cu-pululan. Promena hromatografskih parametara liganda, molarna masa oligosaharida i njihovih odgovarajućih kompleksa, praćena je na HP–GFC sistemu sa RID i DAD detektorom. Vršena je automatska obrada eluograma i definisani su parametri:  $M_w$ ,  $M_n$ ,  $M_z$ , D,  $V_p$ ,  $M_p$  i A. Na slici 7 prikazani su DAD eluogrami Cu(II)–HNMD kompleksa sintetisanih na pH vrednostima u intervalu od 7,5 do 12,0.

Analizom DAD eluograma ispitivanih kompleksa Cu-dekstran (slika 7a), u svim slučajevima osim kod kompleksa dobijenog pri pH 10, mogu se uočiti dve glavne frakcije (na 3 i 5 min). Homogeni pik niskomolarne frakcije (na 5 min) odgovara polaznom ligandu. Karakterističan je i različiti udeo ove frakcije u funkciji pH sinteze. Visokomolarna frakcija (na 3 min) je vrlo je heterogena i potiče verovatno od samog kompleksa. Na slici 7b selektovana su dva karakteristična eluograma sa kojih se može jasno uočiti da kod kompleksa pri pH 10 niskomolarna frakcija ne pokazuje UV apsorpciju ili se potpuno gubi.

Homogena niskomolarna frakcija, vrlo uske raspodele masa ( $M_w \approx 5000 \text{ g mol}^{-1}$ ), karakteristična je kod kompleksa na pH 8 i 10, a po retencionim parametrima odgovara polaznom ligandu dekstranu. Kod kompleksa na pH 7,5 i 12 dva preklopljena pika ukazuju na postojanje dve frakcije vrlo bliskih molarnih masa, verovatno nastalih delimičnom hidrolizom dekstrana pod uticajem reakcionih uslova sinteze. Karakterističan je različiti udeo ovih frakcija u funkciji pH sinteze. Visokomolarna frakcija, vrlo heterogena po masi, potiče verovatno od samog kompleksa. Kompleks na pH 8 karakteriše vrlo mali udeo frakcije samog kompleksa.

Na slici 8 prikazani su GFC hromatogrami kompleksa bakra sa pululanom, sintetisanih na pH vrednostima 7,5–12,0. dobijeni kao odziv RID detektora.

Analizom GFC hromatograma ispitivanih kompleksa Cu-pululan (slika 8) u svim slučajevima se može uočiti postojanje dve frakcije različitih molarnih masa. Homogena niskomolarna frakcija, vrlo uske raspodele masa ( $M_{\rm w} \approx 6.000 \text{ g mol}^{-1}$ ) karakteristična je kod svih analiziranih kompleksa, a po retencionim parametrima odgovara polaznom ligandu pululanu. Karakterističan je različiti udeo ovih frakcija u funkciji pH sinteze. Visokomolarna frakcija, vrlo heterogena po masi, potiče verovatno od samog kompleksa. Kod kompleksa na pH 10 i 12 dva preklopljena pika ukazuju na postojanje dve visokomolarne frakcije, vrlo bliskih molarnih masa. Imajući u vidu hromatogram polaznog liganda pululana (slika 4), gde se pri sličnom retencionom vremenu javlja pik verovatno od zaostale neprečišćene visokomolarne frakcije hidrolizovanog pululana. Ova pojava se može objasniti verovatno preklapanjem pikova nečistoće polaznog liganda i kompleksa.

# GFC analiza kompleksa Co sa oligosaharidima

Na slici 9 prikazani su GFC hromatogrami Co(II) dekstran kompleksa, sintetisanih na pH u intervalu 7,5– -12,0 i odgovarajući 3D dijagram UV spektra kompleksa na pH 7,5.



Slika 7. DAD eluogrami Cu(II)–dekstran kompleksa sintetisanih na različitim pH vrednostima (A); poredbeni eluogami kompleksa na pH 7,5 i pH 10 (B).

Figure 7. DAD eluograms of Cu(II)-dextran complex synthesized at different pH values (A); eluograms of compared complexes at pH 7.5 and pH 10 (B).



*Slika 8. GFC hromatogrami Cu(II)–pululan kompleksa sintetisanih na različitim pH vrednostima u opsegu 7,5 do 12. Figure 8. GFC chromatograms of Cu(II)–pullulan complexes synthesized at different pH values in the range from 7.5 to 12.* 

Na slici 10 prikazani su GFC hromatogrami Co(II) pululan kompleksa, sintetisani na pH u intervalu 7,5– -12,0 i odgovarajući 3D dijagram UV spektra kompleksa na pH 7,5. Analizom GFC hromatograma ispitivanih kompleksa Co–dekstran (slika 9), kao i kompleksa Co–pululan (slika 10), u svim slučajevima se može uočiti postojanje dve frakcije različitih molarnih masa. Homogena



*Slika 9. GFC hromatogrami i 3D dijagram Co(II)–dekstran kompleksa na pH u opsegu 7,5 do 12. Figure 9. GFC chromatograms and 3D diagrams of Co(II)–dextran complexes in pH range from 7.5 to 12.* 



Slika 10. GFC hromatogrami i 3D dijagram Co(II)–pululan kompleksa na pH u opsegu 7,5 do 12. Figure 10. GFC chromatograms and 3D diagrams of Co(II)–pullulan complexes in pH range from 7.5 to 12.

niskomolarna frakcija, vrlo uske raspodele masa ( $M_w \approx 5000-6000 \text{ g mol}^{-1}$ ), karakteristična je kod svih analiziranih kompleksa, a po retencionim parametrima odgovara polaznom ligandu. Karakterističan je različiti udeo ovih frakcija u funkciji pH sinteze. Visokomolarna frakcija, u ovom slučaju vrlo homogena i znatno manjeg udela, potiče verovatno od samog kompleksa ili nečistoća polaznog liganda, kako je već ranije komentarisano kod drugih tipova kompleksa.

### Diferencijalne i integralne krive raspodele masa

Kod svih GFC analiziranih kompleksa dekstrana i pululana sa Cu, Co i Fe automatskom obradom snimljenih eluograma i korišćenjem definisanog kalibracionog dijagrama za određivanje molarnih masa, dobijene su u formi izveštaja diferencijalne i integralne krive raspodele masa. Odgovarajuće krive raspodele masa dekstrana i pululana kao polaznog liganda u sintezi kompleksa, kao i krive raspodele masa pojedinih kompleksa, prezentovane su na slici 11 radi ilustracije širine raspodele masa i mogućnosti određivanja udela svake frakcije uzorka.

Matematičkom obradom dobijenih kriva raspodele definisane su vrednosti asimetrije pikova eluograma, A, indeks polidisperznosti, D, i stepen polimerizacije,  $P_n$ , oligosaharida, kako kod polaznog liganda, tako i kod odgovarajućeg kompleksa sa bakrom i kobaltom u funkciji pH sinteze (slika 12).

Promene srednjih molarnih masa  $M_w$ ,  $M_n$  i  $M_z$  oligosaharida kod odgovarajućih kompleksa bakra i kobalta, u funkciji pH sinteze kompleksa, prikazane su adekvatnim dijagramima zavisnosti na slici 13.



Slika 11. Diferencijalne i integralne krive raspodele masa: dekstrana (a), pululana (b), kao i njihovih kompleksa: Cu–dex (c), Cu–pul (d), Co–dex (e), Co–pul (f).

Figure 11. Differential and integral curve of weight distribution for: dextran (a), pullulan (b), as well as its complexes: Cu-dex (c), Cu-pull (d), Co-dex (e), Co-pull (f).

### Analiza

Osnovni podaci o molekulskim karakteristikama ispitivanih oligosaharida, kao i poznavanje strukture samog oligosaharidnog lanca, omogućuju predviđanje mnogih osobina, ne samo polaznog liganda, već i njihovih biokompleksa sa različitim mikroelementima (Cu, Co i Fe). S obzirom na to da su polazni ligandi za sintezu kompleksa dobijeni depolimerizacijom u kiselim vodenim rastvorima (kiselom hidrolizom pri odgovarajućim T, t i pH), dobijeni depolimerizati pululana ili dekstrana mogu se posmatrati u odnosu na indeks polidisperznosti kao heterogene smeše makromolekula istog hemijskog sastava, a promenljive dužine lanca (stepen polimerizacije). Zato su bitni parametri u njihovoj karakterizaciji, koji se mogu dobiti GFC analizom: stepen polimerizacije, srednja molarna masa i udeo pojedinih masa u ukupnoj frakciji (iskazano preko diferencijalne i integralne krive raspodele molarnih masa).

Opisom raspodele molarnih masa pululana ili dekstrana, dobijenih kiselom hidrolizom, mogu se predvideti optimalni uslovi uspešne sinteze vodorastvornih Cu(II) ili Co(II) kompleksa, kao i variranje stabilnosti sintetisanih kompleksa u funkciji pH vrednosti reakcione sredine. Eksperimentalna zapažanja kod ovih kompleksa, slično kompleksima Fe(III), potvrđuju da se promenom stepena polimerizacije liganda i njegove polidisperznosti, menja i sam kapacitet vezivanja metalnih jona.



Slika 12. Zavisnost asimetrija pika, A, indeksa polidisperznosti, D, i stepena polimerizacije liganda,  $P_{n}$  od pH vrednosti sinteze odgovarajućih kompleksa sa bakrom i kobaltom.

Figure 12. Dependences of pick asymmetry, A, polydispersion index, D, and polymerisation degree of the ligand,  $P_m$  on pH values of in the synthesis of corresponding complexes with Cu or Co.



Slika 13. Zavisnost srednjih molarnih masa oligosaharida od pH sinteze kompleksa: a) Cu–dex, b) Cu–pul, c) Co–dex i d) Co–pul. Figure 13. Dependences of oligosaccharide average molar weight on the pH of the synthesis of complexes: a) Cu–dex, b) Cu–pull, c) Co–dex and d) Co–pull.

Na osnovu datih primera, može se zaključiti da parametri kao što su: polidisperznost, stepen polimerizacije, srednja molarna masa i raspodela molarnih masa analiziranih pululana i dekstrana zavise od primenjenih reakcionih uslova (pH vrednost), načina i postupka sinteze kompleksa. Sva ova razmatranja su bila neophodna s obzirom na činjenicu da se u pripremi liganda za sintezu kompleksa sirovi pululan ili dekstran podvrgavaju procesu depolimerizacije, a da se u toku sinteze primenjuju i drastični reakcioni uslovi. Tako je npr. kod kompleksa Cu(II) sa dekstranom i pululanom (slika 11b) uočeno da je indeks polidisperznosti najveći na pH 8, a sa daljim porastom pH vrednosti isti opada. Slično tome i stepen polimerizacije oligosaharida je najveći kod Cu(II) kompleksa pri pH 8, a najmanji kod kompleksa pri pH 10. Nasuprot tome, kod kompleksa Co-pululan stepen polimerizacije oligosaharida je najmanji na pH 8 a raste sa povećanjem pH vrednosti. Ova činjenica govori o uticaju vrste metalnog jona na hidrodinamičku zapreminu sintetizovanog kompleksa sa istim početnim ligandom.

I srednje molarne mase  $(M_w, M_n)$  dekstrana ili pululana kod odgovarajućih Cu(II) kompleksa su u funkciji pH sinteze kompleksa (slika 13a i 13b). Maksimalne srednje vrednosti za  $M_w$  i  $M_n$  pokazuju oligosaharidi kod kompleksa pri pH 8, a minimalne kod kompleksa pri pH 10. Nasuprot tome, maksimalne srednje  $M_w$  vrednosti oligosaharida pokazuje Co(II)–dekstran kompleks pri pH 10 (slika 13c). U slučaju primene pululana kao liganda kod Co(II) kompleksa minimalne srednje  $M_w$  vrednosti se postižu pri pH 8, a sa daljim porastom pH povećavaju se i  $M_w$  vrednosti (slika 13c). Analogno tome, na isti način dolazi do promena i  $M_n$  vrednosti.

Imajući u vidu rezultate ranijih ispitivanja ovih kompleksa savremenim instrumentalnim metodama, ovakva GFC zapažanja se mogu objasniti sledećim činjenicama. Promenom reakcione pH vrednosti (7,5-12) u toku sinteze, dobijaju sa Co(II) kompleksi sa različitim sadržajem kobalta. Imajući u vidu da jedinična ćelija kompleksa sadrži 2 antiparalelna dekstranska lanca i da u kompleksu kobalt može imati različitu koordinaciju ligandom, moguća su dva modela kompleksa sa oktaedarskom i tetragonalnom konfiguracijom u funkciji pH. Tako se pri većim pH kobalt vezuje sa tri glukopiranozne jedinice (dekstran kao dimerni ligand) pa se i očekuju veće  $M_w$  vrednosti na pH 10, kao i veći sadržaj Co u kompleksu, a što utiče na porast hidrodinamičke zapremine molekula kompleksa. Suprotna očekivanja potvrđena su kod Co kompleksa sa pululanom kao trimernim ligandom, gde se Co(II) jon vezuje sa dve glukopiranozne jedinice, pa  $M_w$  vrednosti imaju minimum na pH 8, a povećavaju se sa porastom pH.

Suprotno ovim Co(II) kompleksima ponašaju se Cu(II) kompleksi sa oligosaharidima. Kod dekstranskog kompleksa, u prvoj koordinacionoj sferi Cu(II) jona nalazi se glukopiranozna jedinica kao bidentantni ligand, koordinirana preko dva kiseonikova atoma. Na taj način, Cu(II) jon u kompleksu može zauzeti kvadratnoplanarnu ili tetragonalno deformisanu oktaedarsku konfiguraciju pri nižim pH vrednostima, kada jon bakra dopunjuje koordinacioni broj 6 sa još dva molekula vode. Sa povećanjem baznosti rastvora broj molekula vode u strukturi kompleksa opada pa je neophodno prisustvo liganda manjih  $M_w$  vrednosti (slika 12a i 12b). Ovakva zapažanja su u saglasnosti sa literaturnim podacima [1] o stepenastom kompleksiranju u funkciji pH, pri čemu sinteza kompleksa započinje na pH 7, do preuređenja kompleksa dolazi na pH 8, a razgradnja kompleksa se odvija na pH većim od 12.

### ZAKLJUČAK

Izvršena je optimizacija GFC sistema i hromatografskih uslova za analizu oligosaharida pululana i dekstrana i njihovih kompleksa na bazi mikroelemenata Cu, Co i Fe. Metoda se pokazala uspešnom u definisanju i praćenju promena stepena polimerizacije i raspodele molarnih masa, kao i ponašanju primenjenih oligosaharida u biokompleksima sa različitim metalima u funkciji pH.

## LITERATURA

- M. Cakić, Ž. Mitić, G.S. Nikolić, Lj. Ilić, G.M. Nikolić, Spectosc. Int. J. 22 (2–3) (2008) 177–185.
- Ž. Mitić, G.S. Nikolić, M. Cakić, P. Premović, Lj. Ilić, J. Mol. Struct. 924–926 (2009) 264–273.
- [3] Ž. Mitić, G. Nikolić, M. Cakić, R. Nikolić, Lj. Ilić, Hem. ind. 61 (5) (2007) 257–262.
- [4] G. Nikolić, M. Cakić, Lj. Ilić, S. Ristić, Ž. Cakić, Pharmazie 57 (3) (2002) 155–158.
- [5] M. Cakić, G. Nikolić, Lj. Ilić, Bull. Chem. Technol. Macedonia 21(2) (2002) 135–146.
- [6] Lj. Ilić, S. Ristić, M. Cakić, G. Nikolić, S. Stanković, WO Pat. 02/46241 A2, Int. Fil. Date 7 December 2001; Appl. No. PCT/YU01/00031; Int. Pub. date 13 June 2002. EP Pat. 1363951, Int. Pub. Date 26 November 2003. (Int.Cl. C08B 37/00).
- [7] G. Nikolić, M. Cakić, Ž. Mitić, Lj. Ilić, SRB Pat. P-0223, 16.05.2008.
- [8] Ž. Mitić, G. Nikolić, M. Cakić, R. Nikolić, Lj. Ilić, Rus. J. Phys. Chem. A 81 (9) (2007) 1433–1437.
- [9] M. Cakić, G. Nikolić, D. Cvetković, Lj. Ilić, Kompleksi Fe(III) sa oligosaharidima – Antianemici, Tehnološki fakultet, Leskovac, 2007.
- [10] S. Jovanović, K. Jeremić, Karakterisanje polimera, TMF, Beograd, 2007, str. 85–104.
- [11] R. Lawrence, R. Lange, C. Wu, M. Helenek, U.S. Patent 5,624,668, 1997.
- [12] G. Nikolić, M. Cakić, Colloid J. 69 (4) (2007) 464-473.
- [13] G. Nikolić, M. Cakić, Ž. Mitić, Lj. Ilić, Russ. J. Coord. Chem. 34 (5) (2008) 322–328.

# SUMMARY

# THE APPLICATION OF HP–GFC CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE ANALYSIS OF OLIGOSACCHARIDES IN BIOACTIVE COMPLEXES

Ivan Savić, Goran Nikolić, Ivana Savić, Milorad Cakić

Faculty of Technology, Bulevar oslobodjenja 124, Leskovac 16000, Serbia

(Scientific paper)

The aim of this work was to optimize a GFC method for the analysis of bioactive metal (Cu, Co and Fe) complexes with olygosaccharides (dextran and pullulan). Bioactive metal complexes with olygosaccharides were synthesized by original procedure. GFC was used to study the molecular weight distribution, polymerization degree of oligosaccharides and bioactive metal complexes. The metal bounding in complexes depends on the ligand polymerization degree and the presence of OH groups in coordinative sphere of the central metal ion. The interaction between oligosaccharide and metal ions are very important in veterinary medicine, agriculture, pharmacy and medicine.

Ključne reči: Bioaktivni kompleksi • Raspodele molarnih masa • Stepen polimerizacije • Gel-filtraciona hromatografija

Key words: Bioactive complexes • Molecular weight distribution • Polymerization degree • Gel-filtration chromatography