

УДК 543.632.9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОЗДУХА В КАЧЕСТВЕ ОКИСЛИТЕЛЯ

© 2018 г. Б. К. Зубов^{1,*}, В. Г. Филоненко¹, Д. С. Нестерович², П. Д. Поликарпова²

¹Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук
119991 Россия, Москва, ул. Косыгина, 19

²ООО “Косметический инкубатор”
127015 Россия, Москва, ул. Вятская, 47

*E-mail: zubor127@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.10.2017 г.

После доработки 17.04.2018 г.

В настоящее время весьма актуальна разработка новых методов контроля препаратов, широко применяемых в косметике и медицине. Одним из наиболее часто используемых компонентов омолаживающей косметики является гиалуроновая кислота, причем ее действие и влияние на кожу человека зависит от концентрации в растворе. Существующие методы определения концентрации гиалуроновой кислоты являются дорогостоящими, требуют сложной пробоподготовки и не могут использоваться в массовом порядке. В данной работе для экспрессного определения концентрации гиалуроновой кислоты в растворах, применяемых при изготовлении косметики для кожи человека, предложен метод окситермографии, не требующий затрат на приобретение химических реактивов. В качестве окислителя использован кислород воздуха. Абсолютный предел обнаружения гиалуроновой кислоты составляет около 4 мкг для объема пробы 5 мкл.

Ключевые слова: окситермография, гиалуроновая кислота, датчики кислорода в газовой фазе, термоокислительный спектр, высокомолекулярные соединения, низкомолекулярные соединения.

DOI: 10.1134/S0044450218100171

С развитием косметической промышленности и появлением новых активных компонентов требуются методы исследования их свойств и определения эффективной концентрации.

Гиалуроновая кислота находит все более широкое применение в косметике и считается одним из самых “приятных” косметических ингредиентов [1]. Она представляет собой белый порошок, который полностью растворяется в воде, образуя гель при концентрации более 1 мас. %. В отличие от большинства используемых косметических активов, гиалуроновая кислота проявляет все свои ценные свойства при весьма низких концентрациях (0.01–0.1 мас. % для высокомолекулярной формы, используемой в губных помадах, гелях, лосьонах после загара), поэтому важно знать концентрацию раствора кислоты в средстве, а также его эффективную концентрацию (предельная концентрация проникновения в кожу).

В настоящее время для определения таких высокомолекулярных соединений, как пептиды, синтетические полимеры, олигосахариды широко используют метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ). Его применение для определения низкомолекуляр-

ных соединений, например низкомолекулярной гиалуроновой кислоты, затруднено из-за мешающего влияния ионов матрицы в низкомолекулярной области [2]. В качестве матрицы обычно используют низкомолекулярные соединения, затрудняющие определение веществ с близкими молекулярными массами, поэтому для контроля содержания низкомолекулярных веществ применяют также метод поверхностно активированной лазерной десорбции/ионизации (ПАЛДИ), где матрицами являются углеродные материалы, порошки металлов и их оксидов и т.д. [3]. Широкое использование данных методов затруднено из-за сложности подбора матрицы, а также трудоемкости и длительности подготовки пробы для анализа.

Для определения концентрации гиалуроновой кислоты и ее молекулярной массы разработаны методы высокоэффективного капиллярного электрофореза и ВЭЖХ [4, 5]. В отличие от методов МАЛДИ и ПАЛДИ, данные методы не требуют дополнительного подбора матрицы, однако занимают длительное время, являются дорогостоящими и также характеризуются трудоемкой пробоподготовкой. Таким образом, широкое использование указанных методов в парфюмерной

промышленности и косметических салонах вряд ли возможно. Очевидно, что необходима разработка “безреагентных”, экологически чистых, экспрессных и сравнительно дешевых методов анализа косметических средств.

Метод окситермографии основан на программированном высокотемпературном окислении органических веществ в потоке смеси инертный газ–кислород и количественном определении молекулярного кислорода в газовой смеси, полученной в результате высокотемпературного окисления. Метод защищен патентом РФ [6]. В данной работе на примере широко применяемой в косметологии гиалуроновой кислоты (гиалуроната натрия в водных растворах) показана возможность создания метода окситермографии и соответствующей аппаратуры в анализе косметических средств.

Цель данной работы – исследование аналитических возможностей и оптимизация метода окситермографии (термоокислительной спектроскопии) для определения концентрации гиалуроновой кислоты в водных растворах. В отличие от предыдущего исследования [7], в котором органические вещества окислялись в потоке бинарной смеси кислород–аргон, в данной работе окисление осуществляется в потоке воздуха. Это делает предлагаемый метод “безреагентным”, экологически чистым, дешевым, не требующим затрат на последующую утилизацию химических реагентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В данной работе в качестве источника гиалуроновой кислоты использовали гиалуронат натрия 3000 Да марки “Shancong Focuschem Biotech Co.”. Работу выполняли на экспериментальной установке, принципиальная схема которой представлена на рис. 1. Анализируемый объем жидкости дозируется в лодочку 1. Материал лодочки (кварц) не взаимодействует с кислородом при нагревании в воздухе. В лодочку вставлена термопара 2, контролирующая ее температуру при нагреве пробы. С помощью специально разработанной графической программы (профиль движения лодочки см. рис. 2) исследователь задает алгоритм, по которому лодочка с анализируемым образцом перемещается в кварцевый высокотемпературный реактор через входное отверстие реактора 4. Профиль – это зависимость положения лодочки (мм) от времени (с) при движении ее в реакторе. Начальное положение лодочки 0 на графике рис. 2. Реактор предварительно нагрет до температуры 700°C, которая поддерживается специальным блоком фирмы “ОВЕН”. В реактор через трубку, расположенную около входного отверстия реактора, от генератора чистого воздуха НПП “Химэлектроника” подается

воздух, который делится на два потока. Один поток воздуха выходит через входное отверстие реактора. Этот поток может быть использован для отгонки легколетучих жидкостей при нагревании лодочки в зоне А (см. рис. 1, зона отгонки А). Поток воздуха, поступающий в высокотемпературную часть реактора, используется для окисления органических веществ, находящихся в пробе, при введении лодочки в высокотемпературную часть реактора (см. рис. 1, зона окисления Б). Для полноты окисления на выходе из реактора имеется катализатор на основе платины 7. За реактором расположен датчик кислорода 9, который непрерывно контролирует содержание кислорода в потоке воздуха, выходящего из реактора. В качестве датчика кислорода используется твердоэлектродный детектор – датчик для контроля содержания кислорода в выхлопных газах [8, 9]. Информация с датчика кислорода с помощью специально созданного электронного блока и программного обеспечения выводится на экран компьютера в виде зависимости концентрации кислорода (отн. ед. в мВ) и времени.

При нахождении кварцевой лодочки с анализируемой пробой в зоне А происходит отгонка воды, присутствующей в пробе. По мере движения анализируемого образца в высокотемпературной части реактора происходит нагрев лодочки и окисление органических веществ, оставшихся на поверхности лодочки. Датчик кислорода фиксирует уменьшение содержания кислорода, выходящего из реактора. Скорость нагрева определяется скоростью перемещения лодочки; профиль движения лодочки задается в программном файле. Нахождение лодочки между зонами А и Б может приводить к возмущению газового потока, поступающего в высокотемпературную часть реактора, в процессе отгонки воды.

Результат анализа представляет собой окситермограмму (термоокислительный спектр) – зависимость изменения содержания кислорода в потоке газа, выходящего из реактора, от времени или от температуры образца в ходе его нагрева в высокотемпературной части реактора. Окситермограммы характерны для органических и других окисляемых веществ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап работы включал оптимизацию объема раствора, дозируемого в кварцевую лодочку, и выбор профиля нагрева пробы. Применяли двухступенчатый нагрев пробы раствора при непрерывной регистрации концентрации кислорода в потоке воздуха, выходящего из высокотемпературного реактора. На первой ступени происходила отгонка воды при температуре менее 100°C (см. рис. 2, график изменения температуры), на второй – при быстром перемещении ло-

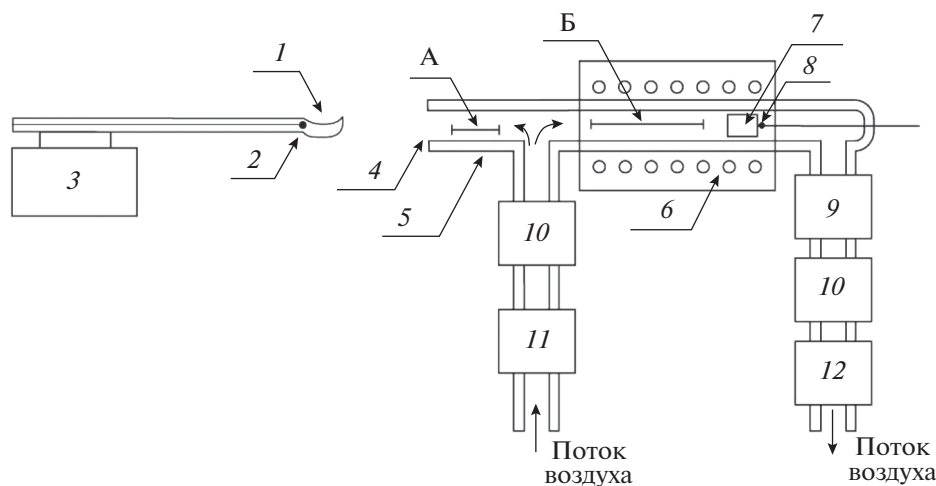


Рис. 1. Принципиальная схема установки оксистермографа: 1 – кварцевая лодочка, 2 – термопара для контроля температуры лодочки, 3 – механизм перемещения лодочки по программе “Профиль движения”, 4 – входное отверстие высокотемпературного реактора, 5 – реактор – кварцевая трубка с отростком, 6 – высокотемпературная печь для нагрева реактора, 7 – катализатор, 8 – термопара для контроля температуры в реакторе, 9 – датчик кислорода, 10 – ротаметр, 11 – газовый компрессор, 12 – побудитель газового потока, А – зона отгонки воды, Б – высокотемпературная часть реактора, зона окисления.

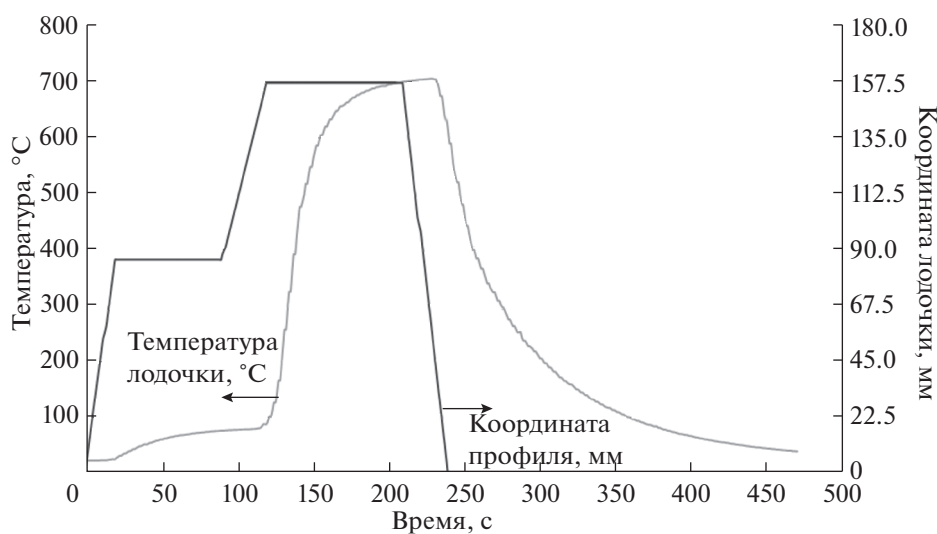


Рис. 2. Оптимальный профиль движения лодочки и график зависимости изменения температуры лодочки от времени ее движения.

дочки в высокотемпературную часть реактора – окисление гиалуроновой кислоты, оставшейся на поверхности лодочки, при температуре около 700°C. Особенность выбранного режима перемещения лодочки (профиль движения) состояла в том, что положение лодочки с водным раствором в режиме отгонки воды специально подбирали так, чтобы при испарении малая часть паров воды попадала в высокотемпературную часть реактора. Это приводило к нарушению газового потока в высокотемпературной части и появлению при регистрации в спектре первого отрицательного пи-

ка. Такой прием позволял контролировать полноту отгонки воды из анализируемой пробы.

Варьировали объем дозируемого в лодочку раствора гиалуроновой кислоты с концентрацией 1.0 мас. % в диапазоне 5–20 мкл и время нахождения пробы в зоне отгонки воды в пределах от 30 до 120 с. Установили, что для определения гиалуроновой кислоты в водном растворе достаточно объема пробы 5 мкл и времени отгонки 70 с. Увеличение объема пробы сверх 5 мкл приводит к увеличению времени отгонки и, соответственно, к увеличению продолжительности анализа.

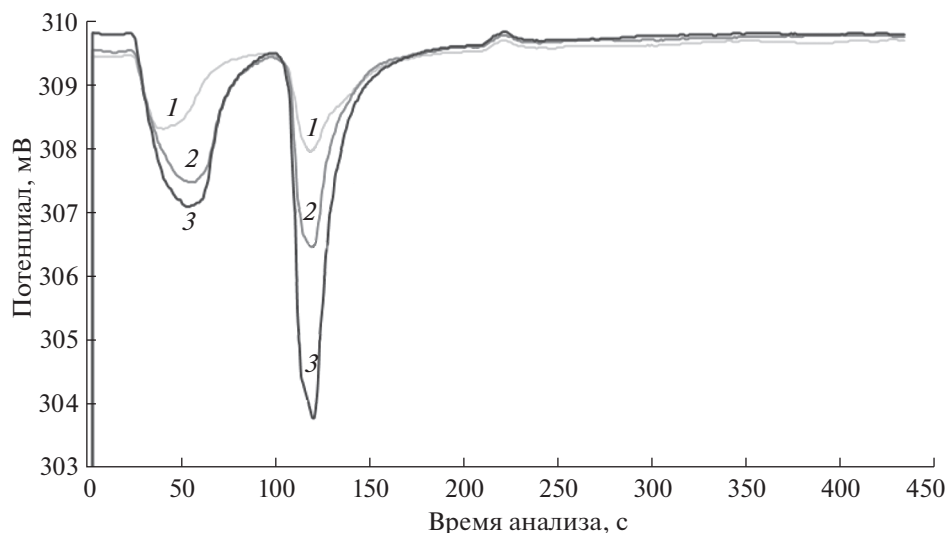


Рис. 3. Окситермограммы – термоокислительные спектры растворов гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 3000 Да. Объем анализируемой пробы 5 мкл. Концентрация раствора гиалуроната натрия, мас. %: 1 – 0.5, 2 – 1.0, 3 – 2.0.

Уменьшение объема пробы приводит к уменьшению аналитического сигнала относительно базовой линии. Оптимальный профиль движения лодочки и, соответственно, нагрев пробы в зависимости от времени представлены на рис. 2.

С использованием оптимального профиля движения лодочки изучены возможности метода окситермографии для определения концентрации гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 3000 Да. Приготовили водные растворы гиалуроновой кислоты различных концентраций в диапазоне от 0.1 до 2.0 мас. %. Типичные окситермограммы – термоокислительные спектры анализируемых растворов – представлены на рис. 3. Видно, что при использовании оптимального профиля движения лодочки отгонка воды проходит полностью. Первый отрицательный пик, характеризующий процесс отгонки воды, в момент времени 100 с практически выходит на фоновые значения. Второй отрицательный пик обусловлен наличием в пробе гиалуроновой кислоты. Аналитическим сигналом является площадь отрицательного пика, которая зависит от концентрации гиалуроновой кислоты в пробе.

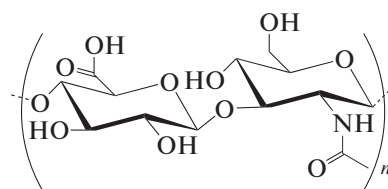
Площади полученных пиков соотносили с соответствующим количеством гиалуроновой кислоты в объеме пробы 5 мкл. Получили линейную зависимость площади пика гиалуроновой кислоты от ее количества для объема пробы 5 мкл. Уравнение градуировочной зависимости имеет вид: $y = (770 \pm 0.5)x + (240 \pm 20)$, где x – концентрация гиалуроновой кислоты в пробе, мас. %; y – площадь пика, мВ с. Относительное стандартное отклонение составило 0.05.

Абсолютный предел обнаружения рассчитывали с помощью статистических методов с применением неравенства Чебышева по выражению [10]:

$$c_{\min} = \frac{3s_{\text{хол}}}{S},$$

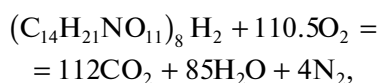
где $s_{\text{хол}}$ – стандартное отклонение аналитического сигнала фона, S – предел чувствительности. Минимальное количество гиалуроновой кислоты, которое можно обнаружить данным методом, составляет 4 мкг в пробе объемом 5 мкл. Это значение позволяет использовать метод окситермографии для диагностики кожи человека при контактном отборе органического вещества на поверхность специального пробоотборника [11].

Исследовали влияние молекулярной массы гиалуроновой кислоты (ГК) на процесс ее окисления кислородом. Теоретический расчет количества кислорода, затраченного на окисление гиалуроновой кислоты молекулярной массы 3000 и 750000 Да, показал, что ГК со средней молекулярной массой 3000 Да в среднем содержит 8 мономерных звеньев (схема) и, следовательно, отвечает формуле $C_{14}H_{21}NO_{11}$ и молекулярной массе 3034 г/моль.



Структурная формула мономерного звена гиалуроновой кислоты.

Исходя из уравнения реакции:



количество кислорода, затраченного на окисление, в 110.5 раз больше количества ГК. При окислении 5 мкл пробы гиалуроновой кислоты с концентрацией 1.0 мас. % количество кислорода, участвующего в реакции, составляет 1.82 мкмоль. Аналогичные расчеты для окисления гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 750000 Да показали, что количество затрачиваемого кислорода равно 1.81 мкмоль. Таким образом, очевидно, что молекулярная масса кислоты практически не влияет на количество потребляемого кислорода.

Влияние молекулярной массы ГК на количество кислорода, расходуемого на ее окисление, оценили также экспериментально. Выбрали растворы низкомолекулярной (3000 Да) и высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (>500 кДа) с концентрацией 1.0 мас. %. Показано, что при увеличении молекулярной массы гиалуроната натрия количество кислорода, затрачиваемого на окисление, увеличивается незначительно для одинаковых масс. Из полученных результатов (S – площадь пика кислорода для низкомолекулярной кислоты равна 972 ± 49 мВ с, для высокомолекулярной – 1175 ± 22 мВ с) видно, что площади низкомолекулярной и высокомолекулярной кислот отличаются не более чем на 17%.

Для проверки правильности полученных данных проанализировали гиалуроновую кислоту марки DNCSSwiss, купленную в аптеке с заявленной концентрацией 1.0%. В связи с тем, что на упаковке и на сайте данного средства не указана молекулярная масса кислоты, для проведения исследования использовали градуировочную кривую для низкомолекулярной гиалуроновой кислоты (3000 Да), так как в таких средствах применяют в основном низкомолекулярные вещества. Получили площадь термоокислительного пика кислоты, равную 959 ± 42 мВ с, что позволило по градуировочной зависимости определить концентрацию кислоты 0.98 ± 0.04 мас. %, совпадающую с паспортным значением 1.0% гиалуроновой кислоты в препарате, изготовленном в Швейцарии.

Таким образом, доказана возможность экспрессного определения гиалуроновой кислоты методом окситермографии в водных растворах без применения химических реактивов, определен абсолютный предел определения на уровне 4 мкг, что дает возможность использовать метод для диагностики кожи человека при изучении трансдермальных свойств препарата.

Так как гиалуроновая кислота является активным компонентом омолаживающих средств, наносимых на кожу, проведенные исследования не-

обходимы для изучения кинетики проникновения (построения профиля проницаемости) данного вещества в кожу человека. В дальнейшем планируется разработка методики исследования проникновения других активных компонентов косметических средств в кожу методом окситермографии в сочетании с иными методами анализа вещества.

Методическая часть работы поддержана грантом РФФИ №17-0300854.

Экспериментальная установка создана по Государственному заданию №0137-2018-0020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сеньоре Ж.-М. Гиалуроновая кислота в коже и косметике // Косметика и медицина. 1998. № 5. С. 7.
2. Чамян К.Р., Парамонов С.А., Ревельский И.А., Бурак А.К. Влияние поверхности при масс-спектрометрическом исследовании пентоксицилина в условиях лазерно-десорбционных методов ионизации // Физикохимия поверхности и защита материалов. 2011. Т. 47. № 6. С. 641. (Chamyan K.R., Paramonov S.A., Revel'skii I.A., Buryak A.K. Influence of surface in the course of mass spectrometry studies of pentoxifylline in the course of laser desorption ionization // Prot. Met. Phys. Chem. Surf. 2011. V. 47. № 6. P. 641.)
3. MALDI MS: A practical guide to instrumentation methods and applications / Eds. Hillenkamp F., Catalinit P.J. WILEY-VCH, 2007. P. 363.
4. Hayase S., Oda Y., Honda S., Kakehi K. High-performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid: determination of its amount and molecular mass // J. Chromatogr. A. 1997. V. 768. № 2. P. 295.
5. Hardingham T.E., Adams P. A method for the determination of hyaluronate in the presence of other glycosaminoglycans and its application to human intervertebral discs // Biochem. J. 1976. V. 159. P. 143.
6. Зуев Б.К. Патент № 2411509 РФ // Б. и. 2011. № 4.
7. Роговая И.В., Зуев Б.К., Титова Т.В., Моржухина С.В., Сараева А.В., Филоненко В.Г. Оптимизация условий определения органического вещества в воде "безреагентным" методом окситермографии и его применение для анализа природной воды // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 10. С. 1069. (Rogovaya I.V., Zuev B.K., Titova T.V., Morzhuhina S.V., Saraeva A.V., Filonenko V.G. Optimization of conditions for the determination of the organic matter content of waters by reagentless oxithermography and its application to the analysis of natural waters // J. Analyt. Chem. 2016. V. 71. № 10. P. 1069.)
8. <https://www.ngkntk.co.uk/index.php/technical-centre/lambdasensors/how-does-the-lambda-sensor-work/> (14.01.2013).
9. http://www.waltech.com/open-source-designs/wbo2_report/ (10.09.2017).
10. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии в двух книгах. М.: Академия, 2014. С. 57.
11. <http://www.dncswiss.eu/ru/catalog/130.html> (11.09.2017).