

УДК 543.544 + 547.917

ХРОМАТОГРАФИЯ УГЛЕВОДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИОНООБМЕННЫХ СМОЛ

Ю. С. Оводов

Приведен обзор литературных данных, посвященных эффективному методу анализа смеси углеводов с использованием ионообменных смол. Разделение углеводов по этому методу основано на трех основных принципах: 1) ионный обмен, 2) адсорбция и гельфильтрация, 3) распределительная хроматография. Применение ионообменных смол позволяет получить четкие качественные и количественные результаты, причем возможна автоматизация процесса анализа. Метод отличается большой надежностью, высокой чувствительностью и хорошей воспроизводимостью.

Библиография — 81 наименование.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	764
II. Ионообменная хроматография	764
III. Адсорбционная хроматография	768
IV. Распределительная хроматография	769

I. ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных проблем химии углеводов является разделение сложных смесей моно-и олигосахаридов, идентификация и количественное определение их компонентов. Для решения этой задачи широко используются разнообразные хроматографические методы. Здесь, прежде всего, следует отметить хроматографию на бумаге^{1,2}, распределительную колоночную хроматографию на целлюлозе³, адсорбционную колоночную хроматографию с использованием смеси угля с целитами⁴, газожидкостную хроматографию⁵⁻⁸. Менее распространена тонкослойная хроматография углеводов^{9,10}, хотя во многих случаях она дает очень хорошие результаты¹⁰. Интересно также отметить, что в настоящее время достигнуты большие успехи в разделении и количественном определении углеводов хроматографией на ионообменных смолах, однако этот метод еще не привлек должного внимания исследователей. Разделение углеводов с помощью ионообменных смол зависит от трех различных процессов: 1) ионного обмена, 2) адсорбции на ионообменных смолах и 3) распределения между водной фазой смолы и органической подвижной фазой. Тем не менее во многих случаях лишь один из них играет определяющую роль, и, таким образом, можно условно рассматривать отдельно ионообменную, адсорбционную и распределительную хроматографию на ионообменных смолах.

II. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

1. Хроматография нейтральных углеводов

Впервые метод ионообменной колоночной хроматографии для разделения нейтральных моносахаридов был предложен в начале 50-х годов^{11,12}. Хорошо известно, что борат-ион реагирует с содержащими вици-

нальные гидроксильные группы углеводами с образованием отрицательно заряженных углевод-боратных комплексов. Было установлено, что можно добиться вполне удовлетворительного разделения смеси углеводов на сильноосновных анионитах, таких как Дауэкс 1, если проводить хроматографию в боратных буферах¹¹. Этим методом были разделены манноза и фруктоза, арабиноза и ксилоза, сахароза и мальтоза. Следует, однако, отметить, что недостатком метода являются слишком большие объемы элюатов (до 1,5 л), несмотря на то, что при этом используются сравнительно небольшие колонки (0,5×11 см). Впоследствии для хроматографического разделения боратных комплексов углеводов были использованы различные ионообменники и модификации метода^{12–20}.

В 1959 г. Накамура и Мори¹³ описали разделение углеводов в 50%-ном эталоне ионообменной хроматографией с использованием вышеуказанного принципа. Чтобы преодолеть основной недостаток метода (большие объемы элюатов), Галлен¹⁴ проводил элюцию растворами более высокой ионной силы (0,01–0,03 М растворами буры), анализируя фракции с помощью уксуснокислого анилина¹⁵. Метод отличается высокой чувствительностью (пригоден для разделения и определения микрограммовых количеств углеводов) и может быть непосредственно использован для количественного анализа гидролизатов. Однако, к сожалению, при использовании этого способа в ряде случаев не удается достичь удовлетворительного разделения. В частности, манноза элюируется с ликсозой, рибоза с фукозой, арабиноза с галактозой и ксилоза с глюкозой. Были предприняты попытки улучшить систему Галлена путем разделения боратных комплексов нейтральных сахаров при повышенной температуре (50°), рН 6,8¹⁶ с использованием анионита Дауэкс 2×8 в боратной форме. Анализ фракций осуществлялся с помощью уксуснокислого анилина по специально разработанному методу¹⁷. Авторам удалось достичь хорошего разделения смеси рамнозы, маннозы, фукозы, галактозы и глюкозы. Данная модификация метода отличается хорошей воспроизводимостью, позволяет проводить количественный анализ гидролизатов и была успешно применена для анализа моносахаридного состава ряда гликопротеинов¹⁷. Автоматический анализ элюатов^{18–20} и применение специального анионита²⁰ позволяет преодолеть ряд недостатков метода и достичь разделения 12–15 моно- и олигосахаридов. Ионообменные смолы были применены также для разделения полиолов, для которых бумажная хроматография дает неудовлетворительные результаты. Наиболее широкое распространение получил метод разделения полиолов в виде боратных комплексов на сильноосновных анионитах в боратной форме^{21, 22}, что дает возможность анализировать достаточно сложные смеси указанных соединений.

2. Хроматография кислых углеводов

Хроматография сахарных кислот с использованием ионообменных смол описана в ряде работ^{14, 23–34}. В качестве смол при этом используются главным образом сильноосновные ионообменники. Ввиду неустойчивости уроновых кислот в щелочной среде (особенно при повышенных температурах) при хроматографии следует избегать высоких значений рН. Дзевятковский²⁹ использовал для разделения уроновых кислот анионит Амберлит IRA 401×2 (в ацетатной форме) с размером частиц 200–400 меш в колонке 0,9×36 см. Элюирование проводили ацетатным буфером (0,1 М раствор ацетата натрия, рН 5,9) при постоянной скорости протекания через колонку (1 мл/5 мин). При этом наблюдалось удовлетворительное разделение ряда уроновых кислот и соответствующих лактонов.

Еще более хорошие результаты получены Самуэльсоном с сотр.³⁰⁻³³, которые применили анионит Дауэкс 1×8 с очень мелкими и тщательно фракционированными частицами (вплоть до 13—17 мк) и выполняли элюцию уксусной кислотой или растворами ацетата натрия. Лучшие результаты были достигнуты при одновременном элюировании ацетатом натрия и уксусной кислотой^{30, 31}. При этом наблюдается хорошее разделение достаточно сложной смеси уроновых кислот (рис. 1). Применение очень

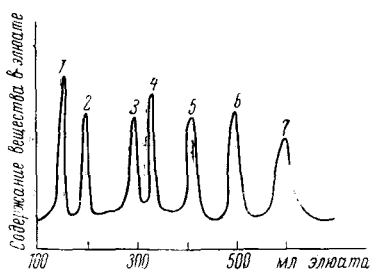


Рис. 1. Хроматография смеси уроновых кислот. Смола: Дауэкс 1×8 (амблатная форма, 15—17 мк); колонка: 6×880 мм; элюция: 1 М CH_3COOH при 30° со скоростью 0,97 мл/мин, компоненты смеси: (по 1,5—2 мг): 1 — *D*-глюкогептоновая кислота; 2 — 6- β -*D*-глюкопирануранозил-*D*-галактоза; 3 — *D*-галактуроновая кислота; 4 — *D*-гулурановая кислота; 5 — *L*-идуроновая кислота; 6 — *D*-маннуроновая кислота; 7 — *D*-глюкуроновая кислота

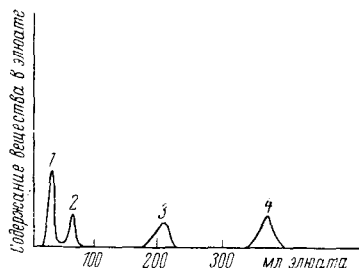


Рис. 2. Разделение смеси некоторых альдобиируновых кислот. Смола: Дауэкс 1×8 (боратная форма, 23—25 мк); колонка: 3×870 мм; элюция: 0,12 М раствор буры со скоростью 8,45 мл/см² мин компоненты смеси: 1 — 4-0-метил- α -*D*-глюкопирануранозил (1→2)-*D*-ксилоза; 2 — α -*D*-галактопирануранозил (1→4)-*D*-ксилоза; 3 — β -*D*-глюкопирануранозил (1→6)-*D*-галактоза; 4 — *D*-глюкуроновая кислота

мелких частиц и тщательное их фракционирование увеличивает эффективность колонок и приводит к лучшему разделению. Расход времени, требуемый для разделения 7 уроновых кислот, составляет 10—11 час. Для уменьшения расхода времени были использованы более крупные частицы смолы. Однако это резко ухудшило результаты. Тем не менее этот прием может быть полезным в ряде частных случаев, например для разделения смеси галактуроновой и глюкуроновой кислот³¹. Анализ элюатов в этих работах проводили автоматически карбазольным или бихроматным методом. Известно, что карбазольная реакция дает разную интенсивность окраски с различными уроновыми кислотами, что позволяет быстро идентифицировать пики. О природе уроновой кислоты можно судить также по величине отношения площадей пиков, полученных при карбазольном и бихроматном методах определения. Эта величина является постоянной и характерной для различных уроновых кислот.

В процессе ионообменной хроматографии наблюдается вполне определенный порядок элюции различных компонентов углеводной смеси. Вначале элюируются нейтральные моносахариды, которые в этих условиях практически не разделяются друг от друга³⁴, затем альдобиируновые кислоты и, наконец, простые уроновые кислоты, порядок элюции которых зависит от многих факторов и не может быть заранее предсказан.

Для разделения альдобиируновых кислот были использованы растворы ацетата натрия низкой концентрации³⁰. Затем было показано, что использование для элюции растворов буры заметно улучшает разделение альдобиируновых кислот³³. Коэффициенты распределения всех уроновых и

альдобииуоновых кислот очень быстро понижаются с увеличением концентрации раствора буры. Это типично для оксикислот, образующих боратные комплексы³⁵. Поэтому, чтобы достичь быстрого вымывания компонентов смеси, можно повысить концентрацию буры в элюирующем растворе. На рис. 2 в качестве примера приводится картина разделения смеси некоторых альдобииуоновых кислот и *D*-глюкуроновой кислоты. Хотя углеводы элюируются довольно размытыми зонами, их разделение вполне удовлетворительно. Знания о боратных комплексах оксикислот очень ограничены, однако определенные корреляции между положением на хроматограммах и структурой кислот могут быть сделаны. Одно из правил предполагает, что коэффициенты распределения оксикислот должны возрастать с ростом числа свободных гидроксильных групп. Так, следует ожидать более раннего появления 4-0-метил-*D*-глюкуроновой кислоты по сравнению с *D*-глюкуроновой кислотой, что в действительности и имеет место. Соответственно, альдобииуоновые кислоты элюируются медленнее, чем их метилированные производные.

Изучение влияния скорости протекания элюирующего раствора на разделение альдобииуоновых кислот показало, что резкое уменьшение скорости протекания приводит лишь к незначительному сужению пиков, поэтому в ионообменной хроматографии альдобииуоновых кислот может быть с успехом использована достаточно высокая скорость элюции.

При повышении температуры разделение улучшается, однако при этом заметно ускоряется деградация альдобииуоновых кислот. Использование автоматического анализатора фракций значительно ускоряет и упрощает процесс. Кроме того, автоматический анализ фракций позволяет более точно определять положение пиков на хроматограммах. При этом оказывается, что отклонение положения пиков уроновых кислот на хроматограммах не превышает 2%. Характерное для каждой из кислот положение пиков можно с успехом использовать для идентификации.

Разделение альдоновых и альдобииуоновых кислот с помощью анионитов описано Самуэльсоном³⁶⁻³⁹. Метод успешно применен к анализу сульфитных жидкостей^{41, 42} и к определению концевых альдоновых кислот в целлюлозе¹² и гемицеллюлозе⁴³.

При элюции растворами ацетата в ряду оксикислот наблюдается общая тенденция, заключающаяся в том, что при одинаковом числе карбоксильных групп кислоты, содержащие большее число гидроксильных групп, элюируются быстрее кислот с меньшим числом гидроксильных групп⁴⁴. Данное правило за немногими исключениями подтверждается и в ряду альдоновых и альдобииуоновых кислот^{38, 39}. Эта зависимость указывает на то, что в данном случае размеры молекул являются основным фактором, определяющим коэффициент распределения. Исключения составляют манноновая кислота, которая появляется среди пентоновых кислот, и *D*-глицеро-*L*-манногептоновая кислота, имеющая более высокий коэффициент распределения, чем ряд гексоновых кислот. Эти исключения из правил могут быть объяснены тем, что из-за внутримолекулярной водородной связи гидратированные объемы указанных анионов меньше, чем у других диастереомеров.

С практической точки зрения интересно отметить, что один и тот же порядок элюции воспроизводится и при длительной работе колонок. Анионы, отличающиеся по коэффициенту распределения на 10% и более, могут быть успешно разделены. При элюции растворами уксусной кислоты и ацетата натрия в ряду пентоновых и гексоновых кислот наблюдается следующая зависимость между конфигурацией и порядком элюции: рибо — раньше — арабо — раньше — ксило — раньше — ликсо. Таким образом, положение на хроматограмме может дать информацию о строении

ряда альдоновых кислот и представляет интерес для их идентификации даже в том случае, если заведомый образец отсутствует. Как уже указывалось, альдобинуриновые кислоты удерживаются смолой значительно слабее альдоновых кислот. При элюции ацетатом натрия отмечены заметные различия между коэффициентами распределения меллибионовой, лактобионовой и целлобионовой кислот, в то время как различия между целлобионовой и мальтобионовой кислотами незначительны³⁸. В боратной среде альдоновые кислоты появляются в следующем порядке: ксилонная, арабионовая, манноновая, глюконовая, галактоновая^{36, 38}. Сравнение результатов хроматографии в боратной среде и в ацетатной показывает, что боратные растворы предпочтительнее в случае сложной смеси альдоновых кислот; хорошо разделяются и альдобиноуриновые кислоты. Однако в боратной среде последние элюируются практически одновременно с альдоновыми кислотами. Поэтому при необходимости разделить смеси альдоновых и альдобиноуриновых кислот следует вначале предварительно разделить кислоты на группы в ацетатной среде, а уж затем использовать боратный метод для анализа компонентов в отдельных группах. Перспективным методом является хроматография на ионообменной бумаге, которая позволяет сочетать положительные стороны ионообменной и бумажной хроматографии. Метод был успешно применен Эртелем²⁵, который использовал анионообменную бумагу для разделения уроновых кислот, лактонов и глюкуроидов и получил вполне удовлетворительные результаты, несмотря на то, что равновесие между кислотой и соответствующим лактоном усложняет хроматографическую картину. Можно отметить также применение катионообменных бумаг в H^+ форме для разделения сахарных кислот²⁴. Однако в данном случае ионообменник играет роль кислоты, которая используется в проявляющих системах при бумажной хроматографии, чтобы избежать образования «хвостов». Таким образом, использование ионного обмена позволяет анализировать смеси практически любых классов моно- и олигосахаридов.

III. АДсорбционная хроматография

Результаты, полученные рядом исследователей по адсорбции многоатомных спиртов ионообменными смолами⁴⁵⁻⁴⁸, указывают на то, что последние могут быть использованы для разделения углеводов колоночной хроматографией. С ростом размеров молекулы уменьшается их сродство к ионообменным смолам, и, таким образом, большие молекулы должны элюироваться с ионообменных смол в первую очередь. Этот порядок нарушается, однако, для метилированных производных углеводов так, что наиболее метилированные производные элюируются водой с колонки последними^{49, 50}. Несомненное влияние оказывает также эффект «молекулярных сит» и поэтому определенное значение имеет процент поперечных швов в смоле и солевая форма, в которой смола используется для хроматографии. Для разделения смеси углеводов применялись как катиониты⁴⁹⁻⁵⁵, так и аниониты⁵⁶⁻⁵⁸. В качестве элюирующего растворителя во всех случаях использовалась вода. Лучшие результаты при применении катионитов получены на Дауэкс-50W (2-8% дивинилбензола) в различных солевых формах. Бариевая форма⁵⁰ была использована для разделения моносахаридов. В одной из ранних работ⁵¹ описано успешное разделение D-ксилозы и L-арабинозы на Дауэкс-50W (Ca^{2+} -форма). С помощью этой смолы в литиевой форме⁵² были разделены смеси олигосахаридов или метилированных моносахаридов. Эта форма смолы была применена также для хроматографии смеси рафинозы, сахарозы и глюкозы⁴⁹⁻⁵². При этом наблюдалось удовлетворительное разделение

лишь в соответствии с молекулярными весами, четко разделить смеси близких углеводов не удалось. Более удовлетворительные результаты получены недавно с использованием той же ионообменной смолы в калиевой форме⁵³⁻⁵⁵. Этот метод позволил провести фракционирование олигосахаридов в соответствии с молекулярными весами и препаративное разделение ряда смесей заведомых образцов моносахаридов. Особенно хорошо разделялись моносахариды и их производные, в частности, глюкоза и ее моно- и диизопропилиденные производные. Использование анионитов не дало существенных преимуществ по сравнению с катионитами. На анионите Амберлит IRA-400 (ОН⁻-форма) были разделены восстанавливающие и невосстанавливающие сахара⁵⁶. Смесь рафинозы, сахарозы и глюкозы была фракционирована на основной смоле *De-Acidite FF*, а на смоле Даукс-1 было достигнуто предварительное разделение гликозидов⁵⁸.

Вышеописанная методика фракционирования моно- и олигосахаридов с помощью ионообменных смол во многом аналогична гельфильтрации на сефадексах и биогелях. Метод отличается быстротой и экономичностью и является полезным дополнением к другим методам разделения углеводных смесей⁵⁵.

IV. РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Распределительной хроматографии углеводов на ионообменных смолах посвящено фундаментальное исследование Самуэльсона с сотрудниками.

Предварительные работы по изучению сорбции моносахаридов и полиолов из водноспиртовых растворов ионообменными смолами⁵⁹⁻⁶¹ показали, что последние могут быть с успехом использованы для распределительной хроматографии углеводов. Ранние попытки^{62, 63} дали обнадеживающие результаты, после чего метод получил дальнейшее развитие в работах последних лет.

Так как диффузия углеводов внутрь частиц смолы происходит медленно, для хроматографии применяют смолы очень тонкого помола. Скорость сорбции быстро уменьшается с ростом концентрации этанола, поэтому слишком высокие концентрации последнего могут приводить к неудовлетворительному разделению. Уменьшение скорости протекания элюирующего раствора приводит к получению более острых пиков и заметно улучшает разделение. Более высокая скорость элюции допустима при разделении небольших количеств углеводов^{64, 65}. При распределительной хроматографии на ионообменных смолах моносахариды элюируются раньше дисахаридов, а те, в свою очередь, появляются раньше высших олигосахаридов. До настоящего времени во многих работах для распределительной хроматографии углеводов использовались сильноосновные аниониты со стирол-дивинилбензольной матрицей (Даукс-1, Даукс-21, Т4, Т5В и т. д.) в сульфатной форме с самым различным размером частиц. Так, используя колонку (10×840 мм) с Даукс-1×8 в сульфатной форме с размером частиц 45—75 мк и элюцию 74%-ным этанолом, Самуэльсон и Свенсон^{64, 65} успешно разделили глюкозу и сахарозу. При делении более сложных смесей они применяли ступенчатую градиентную элюцию. Рис. 3 демонстрирует разделение углеводов по молекулярным весам этим способом.

Использование смолы в хлоридной форме⁶⁶ обычно резко ухудшает результаты. Тем не менее манноза и ксилоза хорошо разделяются и в этом случае. В ряде работ описана хроматография моносахаридов на сильноосновных смолах в бисульфитной форме^{66, 67}. Метод обеспечивает

хорошее отделение кетоз от альдоз. Описано применение сильноосновных анионитов с более полярными матрицами, в частности, использовался декстран, содержащий в качестве ионообменных групп четвертичные аммониевые ионы⁶⁸. В ряде случаев это приводит к улучшению разделения, однако каких-либо принципиальных отличий не наблюдается. Для распределительной хроматографии углеводов были успешно использованы и катиониты^{69, 70}.

Анализ фракций первоначально^{64, 65} проводили с помощью фенолсерного метода, затем стали применять автоматический анализатор фракций^{65, 69, 71, 72}, при использовании которого часть элюата и реагенты вводятся в анализирующую систему с помощью пропорционирующего насо-

са. Автоматический анализ позволяет получать хорошо воспроизводимые результаты.

Для выяснения возможности разделения различных углеводов определяются положения пиков на хроматограмме и рассчитываются коэффициенты распределения (D_r)⁶⁶. Небольшие колебания в положении пиков могут наблюдаться в зависимости от скорости протекания и концентрации элюирующего растворителя и температуры элюции. Однако отношения между коэффициентами распределения различных углеводов в мень-

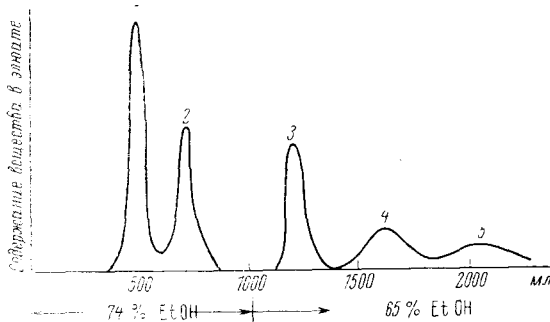


Рис. 3. Разделение смеси углеводов по молекулярным весам. Смола: Дауэкс 1Х8 (сульфатная форма, 45—75 мк); колонка: 10×840 мм; градиентная элюция спиртовыми растворами со скоростью 0,8 мл/см² мин при 28°. Компоненты смеси: 1 — глюкоза; 2 — сахароза; 3 — рафиноза; 4 — стахиоза; 5 — вербаскоза

шей степени зависят от условий эксперимента. Поэтому для идентификации различных углеводов можно использовать величины отношений их коэффициентов распределения и коэффициента распределения какого-либо выбранного в качестве стандарта моносахарида. Сорбция сахаров анионитами зависит от ряда факторов. Одним из них является распределение между ассоциированной со смолой водой и элюирующим, менее полярным растворителем⁵⁹. Влияние этого фактора должно приводить к увеличению коэффициента распределения с увеличением числа гидроксильных и уменьшением числа неполярных групп в углеводе. Можно ожидать при этом увеличения коэффициента распределения в ряду: тетрозы < пентозы < гексозы, причем дезокси- и метилированные производные должны иметь меньшие коэффициенты распределения, чем соответствующие нормальные сахара. Однако помимо этого фактора важную роль играет также взаимодействие углевода с матриксом и ионообменными группами смолы, которое может изменить приведенный выше порядок элюции⁶⁶. Таким образом, в настоящее время порядок элюции внутри каждой группы углеводов не может быть установлен *a priori* и определяется лишь эмпирически. Следует отметить, что в большинстве случаев распределительная хроматография углеводов на ионообменных смолах дает достаточно хорошее разделение, что позволяет проводить количественные определения. Единственным фактором, ограничивающим применение этого метода, является чрезвычайно низкая скорость диффузии внутрь частиц смолы. Поэтому необходимо применять очень мелкие и, по возможности, более пористые частицы. Так, при использовании

смолы с диаметром частиц 45—75 мк наблюдается лишь частичное разделение глюкозы и сахарозы, в то время как частицы размером 15—40 мк дают полное разделение⁷³. Применение мелких частиц позволяет анализировать и моносахариды⁷³, причем можно добиться количественного разделения моно- и олигосахаридов^{73, 74}. Качество анализа в значительной степени зависит от тщательности фракционирования смолы. Увеличение концентрации этанола также улучшает результаты, если уменьшение скорости диффузии, имеющее место при этом, компенсировать уменьшением размеров частиц смолы. Для того, чтобы в этом случае избежать резкого возрастания

сопротивления колонки и сократить время анализа, предложено использовать смесь ионообменной смолы с целитом⁷⁵. В целом ряде работ^{66, 69, 70, 72} показано, что коэффициенты распределения большинства углеводов в водноспиртовых смесях заметно отличаются друг от друга. На рис. 4 приведена картина разделения смеси 12 моносахаридов на анионите в сульфатной форме. Качество разделения позволяет производить количественный анализ. Небольшое перекрывание пиков рамнозы с фукозой и арабинозы с ликсозой не сказывается на его результатах и, кроме того, может быть устранено повышением концентрации этанола или увеличением размеров колонки. Установлено⁷⁶, что при количественном

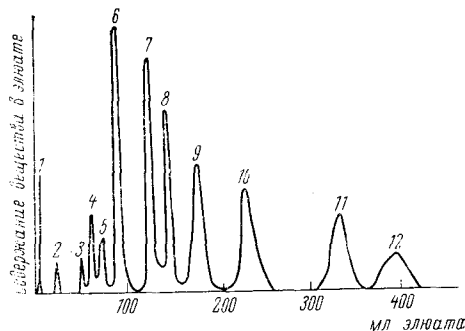


Рис. 4. Анализ смеси моносахаридов распределительной хроматографией на анионите. Смолы: Дауэкс-21К (сульфатная форма, 1—16 мк); колонка: 6×760 мм; элюция 86%-ным этанолом со скоростью 0,9 мл/см² мин при 75°; компоненты смеси (0,05—0,3 мг): 1 — дигитоксоза; 2 — 2-дезоксирибоза; 3 — 2-дезоксигалактоза; 4 — рамноза; 5 — фукоза; 6 — рибоза; 7 — ликсоза; 8 — арабиноза; 9 — ксилроза; 10 — манноза; 11 — галактоза; 12 — глюкоза

определении моносахаридов, присутствующих в гидролизатах древесины, распределительная хроматография на анионитах с автоматическим определением концентрации сахаров в элюатах является более удобным и точным методом, чем бумажная хроматография. Использование орцинового метода и тщательно фракционированного анионита Т5В (размер частиц 10—15 мк) в сульфатной форме дало возможность разработать автоматический микрометод для анализа смеси моносахаридов с содержанием 6—30 мкг каждого компонента⁷⁷. Распределительная хроматография на анионитах была использована также для разделения метилгликозидов и метилированных производных моносахаридов⁷⁸. Было найдено, что оптимальным для элюции является 94%-ный этанол (по весу), обеспечивающий полное разделение ряда вышеуказанных производных⁷⁸. Хорошее разделение моносахаридов достигнуто на катионите Дауэкс-50W × 8 с очень мелким размером частиц (14—17 мк) при элюции смесями этанол — вода^{69, 70}. Ионная форма катионита оказывает большое влияние на коэффициенты распределения. Для моносахаридов последние заметно возрастают в ряду $Li < Na < K$. Для всех сахаров и ионных форм катионообменной смолы коэффициенты распределения понижаются с повышением температуры. Этот факт находится в соответствии с результатами, полученными на анионитах⁷¹. За небольшим исключением коэффициенты распределения возрастают с увеличением числа гидроксильных групп в моносахариде. Одна из типичных хроматограмм приведена на рис. 5, из которого видно, что на катионите до-

стигается очень хорошее разделение 7 различных моносахаридов, в том числе рамнозы и 2-дезоксиглюкозы, не разделяющихся на анионитах в сульфатной форме. Кроме того, в отличие от анионитов, на катионитах получены хорошие результаты для кетоз. Литиевая форма смолы дает лучшее разделение дезоксисахаров, чем натриевая и калиевая формы, однако при работе на литиевой форме требуется значительно более высокое давление для поддержания постоянной скорости элюции. Одним из

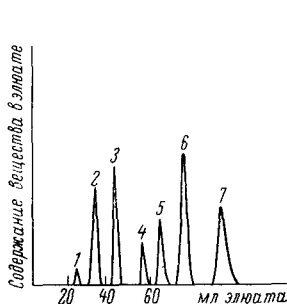


Рис. 5.

Рис. 5. Разделение моносахаридов на катионите. Смола: Амберлит IR-120 (Li⁺-форма); элюция 92,4%-ным этанолом со скоростью 1,2 мл/см² мин при 75°. Компоненты смеси: 1 — рамноза 0,2 мг; 2 — 2-дезоксиглюкоза 0,4 мг; 3 — ксилоза 0,6 мг; 4 — арабиноза 0,4 мг; 5 — тагатоza 0,4 мг; 6 — глюкоза 0,8 мг; 7 — галактоза 1,5 мг

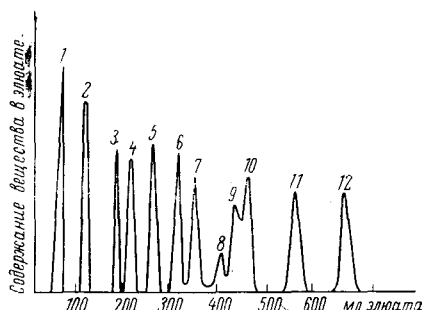


Рис. 6

Рис. 6. Анализ смеси полиолов и альдоз. Смола: ТВ (сульфатная форма, 3—17 м); колонка: 6×852 мм; элюция 86%-ным этанолом со скоростью 2,51 мл/см² мин при 75,5°. Компоненты смеси: 1 — глицерин, 2 — эритрит, 3 — ксилит, 4 — арабит, 5 — арабиноза, 6 — ксилоза, 7 — сорбит, 8 — манноза; 9 — дульцит; 10 — маннит; 11 — галактоза; 12 — глюкоза

существенных недостатков катионитов в сравнении с анионитами является плохое деление глюкозы и маннозы. Распределительная хроматография успешно применяется также для анализа смесей полиолов. Для количественного определения компонентов Самуэльсон и Стремберг⁷⁹ предложили использовать в этом случае периодатное окисление с последующим определением образующегося формальдегида с помощью пентан-2, 4-диона. Метод позволяет проводить автоматический анализ фракций, отличается высокой точностью, хорошей воспроизводимостью и пригоден для микроаналитической работы. Последовательное использование орцинового метода, который не дает цветной реакции с полиолами, и периодатного окисления позволяет анализировать смеси, содержащие одновременно альдозы и полиолы. Разделение различных полиолов проводят в условиях, которые описаны для углеводов. Типичная хроматограмма, полученная для полиолов и альдоз на колонке (8×852 мм) с сильноосновным анионитом Т5В в сульфатной форме с размером частиц 3—17 мк, приведена на рис. 6. При проявлении 86%-ным этанолом при 75,5° время анализа составляет 11 час. При этом наблюдается очень хорошее разделение большинства полиолов и альдоз, и только пики дульцита и маннита перекрываются, что не позволяет проводить точного количественного определения этих полиолов. Наблюдается также неполное разделение маннозы и дульцита. Для улучшения результатов используют элюирование более высокими концентрациями этанола и несколько более длинные колонки. Это приводит к полному разделению дульцита и маннозы, однако время анализа увеличивается. Для сокращения расхода

времени требуется очень тщательное фракционирование смолы. Как и в случае альдоз, коэффициенты распределения полиолов находятся в зависимости от концентрации спирта и увеличиваются с ее ростом, порядок же элюции от концентрации спирта не зависит. Более высокая емкость смолы приводит к увеличению коэффициентов распределения к улучшению разделения. Как и в случае альдоз, коэффициенты распределения растут с ростом числа гидроксильных групп в полиолах. Большинство полиолов элюируется ранее соответствующих альдоз. Исключение составляют лишь рибит и маннит.

Для разделения полиолов были использованы и катиониты⁷⁰. Лучшие результаты дает использование смол в литиевой форме. В этом случае также достигается хорошее разделение сложной смеси полиолов.

* *
*

Таким образом, применение хроматографии на ионообменных смолах позволяет проводить количественное разделение очень сложных смесей моносахаридов и олигосахаридов. Не вызывает сомнения, что метод будет очень полезен в определении количественного моносахаридного состава самых различных углеводсодержащих биополимеров, хотя возможности метода в применении к анализу природных полисахаридов до настоящего времени изучены недостаточно^{80, 81}.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. М. Хайс, К. Мацек, Хроматография на бумаге, ИЛ. М., 1962, стр. 254—300.
2. G. N. Kowkabany, Adv. in Carbohydrate Chem., **9**, 303 (1954).
3. L. Hough, Methods of Biochem. Anal., **1**, 205 (1954).
4. W. W. Binkley, Adv. in Carbohydrate Chem., **10**, 55 (1955).
5. C. T. Bishop, Там же, **19**, 95 (1964).
6. C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, W. W. Wells, J.-Am. Chem. Soc., **85**, 2497 (1963).
7. M. B. Perry, R. K. Hulyalkar, Canad. J. Biochem., **43**, 573 (1965).
8. M. Vilkas, H. Jan, G. Boussac, M. Bonnard, Tetrahedron Letters, **1966**, 1441.
9. E. Stahl, H. Kaltenbach, J. Chromatog., **5**, 351 (1961).
10. M. Lato, B. Brunelli, G. Ciuffini, T. Mezzetti, J. Chromatog., **39**, 407 (1969) и литература к статье.
11. J. X. Khyrn, L. P. Zill, J. Am. Chem. Soc., **73**, 2399 (1951).
12. L. P. Zill, J. X. Khyrn, G. M. Cheniac, J. Am. Chem. Soc., **75**, 1339 (1953).
13. N. Nakamura, K. Mori, Biochim. biophys. acta, **34**, 546 (1959).
14. A. Hallén, Acta chem. Scand., **14**, 2249 (1960).
15. S. Gardell, Там же, **7**, 201 (1963).
16. E. F. Walborg, L. Christensson, S. Gardell, Anal. Biochem., **13**, 177 (1965).
17. E. F. Walborg, L. Christensson, Anal. Biochem., **13**, 186 (1965).
18. J. G. Green, N. G. Anderson, Fed. Proc., **24**, 606 (1965).
19. J. G. Green, Natl. Cancer Inst. Monograph., **21**, 447 (1966).
20. J. I. Ohms, J. Zec, J. V. Benson, мл., J. A. Patterson, Anal. Biochem., **20**, 51 (1967).
21. J. X. Khyrn, L. P. Zill, J. Am. Chem. Soc., **74**, 2090 (1952).
22. N. Spencer, J. Chromatog., **30**, 566 (1967).
23. J. X. Khyrn, D. G. Doherty, J. Am. Chem. Soc., **74**, 3199 (1952).
24. D. V. Myhre, F. Smith, J. Org. Chem., **23**, 1229 (1958).
25. G. W. Oertel, J. Chromatog., **8**, 486 (1962).
26. J. K. Gillham, T. E. Timell, Canad. J. Chem., **36**, 1467 (1958).
27. B. Larsen, A. Haug, Acta chem. Scand., **15**, 1397 (1961).
28. T. E. Timell, Methods Carbohydr. Chem., **1**, 802 (1962).
29. D. Dziewiatkowski, Biochim. biophys. acta, **56**, 167 (1962).
30. O. Samuelson, L. Victorin, Svensk. Papperstidn., **67**, 555 (1964).
31. S. Johnson, O. Samuelson, Anal. chim. acta, **36**, 1 (1966).
32. S. Johnson, O. Samuelson, Svensk. Papperstidn., **69**, 664 (1966).
33. O. Samuelson, L. Victorin, Carbohydr. Res., **4**, 139 (1967).
34. L. N. Lewis, C. W. Coggins, мл. J. C. F. Knapp, J. Chromatog., **20**, 421 (1965).

35. O. Samuelson, *Svensk. Kem. Tidskr.*, **76**, 635 (1964).
36. O. Samuelson, K. J. Ljungqvist, C. Parck, *Svensk Papperstidn.*, **61**, 1043 (1958).
37. O. Samuelson, R. Simonson, Там же, **65**, 363 (1962).
38. O. Samuelson, L. O. Wallenius, *J. Chromatog.*, **12**, 236 (1963).
39. O. Samuelson, L. Thede, Там же, **30**, 556 (1967).
40. O. Samuelson, R. Simonson, *Svensk Papperstidn.*, **65**, 685 (1962).
41. S.-I. Nord, O. Samuelson, R. Simonson, Там же, **65**, 767 (1962).
42. B. Alfredsson, W. Czerwinsky, O. Samuelson, Там же, **64**, 812 (1961).
43. E. Eriksson, O. Samuelson, Там же, **66**, 298 (1963).
44. B. Alfredsson, S. Bergdahl, O. Samuelson, *Anal. chim. acta*, **28**, 371 (1963).
45. R. M. Wheaton, W. C. Bauman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **57**, 159 (1953).
46. H. Rückert, O. Samuelson, *Svensk Kem. Tidskr.*, **66**, 12 (1954).
47. M. Mattisson, O. Samuelson, *Acta chem. Scand.*, **12**, 1386, 1404 (1958).
48. G. Franzke, K. S. Grunert, E. Ullrich, *Nahrung*, **10**, 557 (1966).
49. J. K. N. Jones, R. A. Wall, A. O. Pittet, *Chem. a. Ind.*, **1959**, 1196.
50. J. K. N. Jones, R. A. Wall, *Canad. J. Chem.*, **38**, 2290 (1960).
51. V. F. Felicetta, M. Lung, J. L. McCarty, *Tappi*, **42**, 496 (1959).
52. J. K. N. Jones, R. A. Wall, A. O. Pittet, *Canad. J. Chem.*, **38**, 2285 (1960).
53. R. M. McCready, J. C. Goodwin, *J. Chromatog.*, **22**, 195 (1966).
54. R. M. Saunders, N. G. Walker, Joint Meeting of American Association of Cereal Chemists and American Oil Chemists' Society, Washington, D. C., March 31 — April 4, 1968.
55. R. M. Saunders, *Carbohydr. Res.*, **7**, 76 (1968).
56. S. Roseman, R. H. Abeles, A. Dorfman, *Arch. biochem. biophys.*, **36**, 232 (1952).
57. L. Hough, J. E. Priddle, R. S. Theobald, *Chem. a. Ind.*, **1960**, 900.
58. P. W. Austin, F. E. Hardy, J. G. Buchanan, J. Baddiley, *J. Chem. Soc.*, **1960**, 5350.
59. H. Rückert, O. Samuelson, *Acta chem. Scand.*, **11**, 315 (1957).
60. M. Mattisson, O. Samuelson, Там же, **12**, 1325 (1958).
61. H. Rückert, O. Samuelson, *Svensk Kem. Tidskr.*, **66**, 337 (1954).
62. O. Samuelson, E. Sjöström, Там же, **64**, 305 (1952).
63. O. Samuelson, Nordiske Kemikermøde, Aarhus, 1956.
64. O. Samuelson, B. Swenson, *Acta chem. Scand.*, **16**, 2056 (1962).
65. O. Samuelson, B. Swenson, *Anal. chim. acta*, **28**, 426 (1963).
66. O. Samuelson, Ion Exchange separations in analytical chemistry, Almquist and Wiksell, Stockholm and Wiley, N. Y., 1963.
67. B. Lindberg, K. N. Slessor, *Carbohydr. Res.*, **5**, 286 (1967).
68. P. Jonsson, O. Samuelson, *J. Chromatog.*, **26**, 194 (1967).
69. P. Jonsson, O. Samuelson, *Anal. Chem.*, **39**, 1156 (1967).
70. O. Samuelson, H. Strömberg, *Acta chem. Scand.*, **22**, 1252 (1968).
71. B. Arwidi, O. Samuelson, *Svensk Kem. Tidskr.*, **77**, 84 (1965).
72. L.-I. Larsson, O. Samuelson, *Acta chem. Scand.*, **19**, 1357 (1965).
73. J. Dahlberg, O. Samuelson, Там же, **17**, 2136 (1963).
74. J. Dahlberg, O. Samuelson, *Svensk Kem. Tidskr.*, **75**, 178 (1963).
75. B. Arwidi, O. Samuelson, *Anal. chim. acta*, **31**, 462 (1964).
76. B. Arwidi, O. Samuelson, *Svensk Papperstidn.*, **68**, 330 (1965).
77. L.-I. Larsson, O. Samuelson, *Mikrochim. acta*, **1967**, 328.
78. L.-I. Larsson, O. Ramnäs, O. Samuelson, *Anal. chim. acta*, **34**, 394 (1966).
79. O. Samuelson, H. Strömberg, *Carbohydr. Res.*, **3**, 89 (1966).
80. S. A. Barker, M. J. How, P. V. Peplow, P. J. Somers, *Anal. Biochem.*, **26**, 219 (1968).
81. Y. C. Lee и др., *Anal. Biochem.*, **27**, 559, 567 (1969).

Институт биологически активных веществ
ДВНЦ АН СССР,
Владивосток