

УДК 543.544;547.455.632

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ И ФРУКТОЗЫ

*Купцевич Ю. Е., Ларионов О. Г., Стальная И. Д.,
Нахапетян Л. А., Пронин А. Я.*

Рассмотрены структура, мутаротация, физико-химические свойства глюкозы и фруктозы, а также способы их разделения. Подробно обсуждается хроматографическое разделение на катионитах в кальциевой форме. Описана теория комплексообразования углеводов с катионами металлов, подробно обсуждается механизм разделения глюкозы и фруктозы на катионитах в кальциевой форме. Рассмотрены также факторы, влияющие на процесс хроматографического разделения глюкозы и фруктозы на сульфокатионитах.

Библиография — 138 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	510
II. Структура и свойства глюкозы и фруктозы	510
III. Способы разделения	515
IV. Физико-химические аспекты хроматографического разделения глюкозы и фруктозы	516

I. ВВЕДЕНИЕ

Использовавшиеся ранее (до середины 70-х годов) технологии получения фруктозы были основаны на применении дефицитного и дорогостоящего сырья — инулина, полимера фруктозы. Это препятствовало широкому использованию фруктозы в пищевой и медицинской промышленности. Лишь в последние десятилетия применение хроматографических методов сделало возможным крупномасштабное производство фруктозы путем ее выделения из глюкозо-фруктозных сиропов, получаемых либо за счет инверсии сахарозы, либо за счет конверсии глюкозы с помощью глюкозоизомеразы.

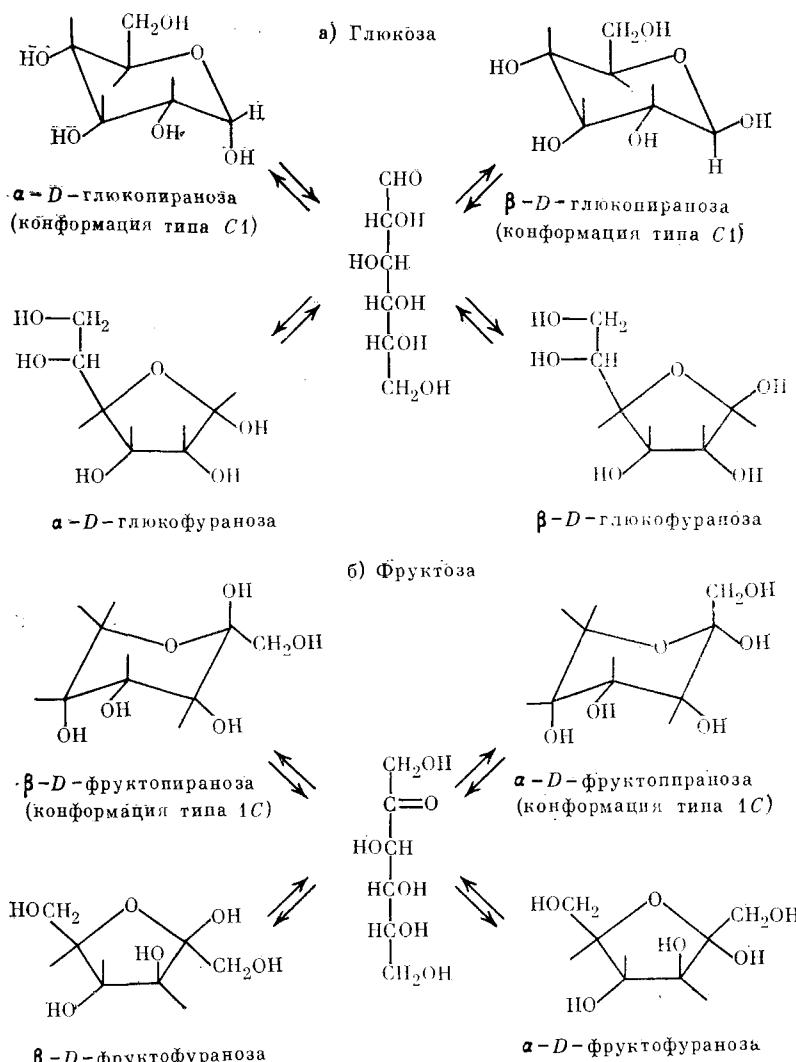
В некоторых странах уже налажено промышленное производство фруктозы, основанное на хроматографическом разделении глюкозо-фруктозных сиропов на катионообменных смолах в кальциевой форме. Фирма «Суомен Сокери» (Финляндия) является крупнейшим в мире производителем фруктозы. Ее заводы в Финляндии и США производят около $\frac{2}{3}$ всей выпускаемой в мире фруктозы, т. е. 20 тыс. т. в год. Второе место по производству фруктозы занимает Франция, далее следуют ФРГ и Австрия [1].

В связи с активной разработкой технологий получения фруктозы на основе хроматографических методов важно знать свойства и особенности поведения глюкозы и фруктозы в различных условиях, а также механизм их хроматографического разделения.

II. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ГЛЮКОЗЫ И ФРУКТОЗЫ

В растворах глюкоза и фруктоза подвергаются мутаротации, что приводит к установлению равновесия между пятью структурными формами каждого из этих соединений, как показано на схеме 1.

Схема 1



На состав равновесной смеси прежде всего влияют природа растворителя и температура. В случае D-глюкозы при 20° в водном растворе равновесная смесь состоит из 63,8% β -D-глюкопиранозы, 36,2% α -D-глюкопиранозы и следовых количеств (0,0026%) открытой ациклической структуры [2, 3].

Для D-фруктозы в водном растворе при 20° устанавливается следующее равновесное соотношение: 76,4% β -D-фруктопиранозы, 19,5% β -D-фруктофуранозы и 4,1% α -D-фруктофуранозы [4].

Увеличение температуры приводит к линейному увеличению содержания фруктофураноз и соответствующему уменьшению содержания β -D-фруктопиранозы [5]. Например, при 0° в водном равновесном растворе D-фруктозы содержится 84,8% β -D-фруктопиранозы, 11,1% β -D-фруктофуранозы и 4,1% α -D-фруктофуранозы, а при 50° — соответственно 55,8, 31,9 и 12,3% [6].

Эти данные согласуются с полученной в работе [7] температурной зависимостью равновесного состава раствора D-фруктозы в воде (рисунок). В этой же работе приведены уравнения позволяющие рассчитывать содержание каждой из форм D-фруктозы в водном растворе в зависимости от температуры (t):

$$c_1 = -0,48t + 86,72$$

$$c_2 = 0,26t + 14,32$$

$$c_3 = 0,23t - 0,55$$

где c_1 , c_2 и c_3 — содержание β -D-фруктопиранозы, β -D-фруктофуранозы и α -D-фруктофуранозы соответственно (мол. %).

Величину удельного вращения равновесной смеси D-фруктозы при температуре t можно рассчитать по следующей формуле [7]:

$$\alpha_D' = 0,56t - 102,6$$

Скорость мутаротации тем больше, чем выше температура. При 20° в водном растворе процесс мутаротации практически заканчивается через 20 мин [4].

Температурная зависимость равновесного состава D-глюкозы имеет несколько иной характер, чем у D-фруктозы. Содержание α -D-глюкопиранозы и β -D-глюкопиранозы равно соответственно 36 и 64% при температурах от 5 до 30° , а при температуре 80° оно составляет 46 и 54% [3, 8]. К сожалению, в литературе нет данных о соотношении глюкопираноз в интервале 30 — 80° .

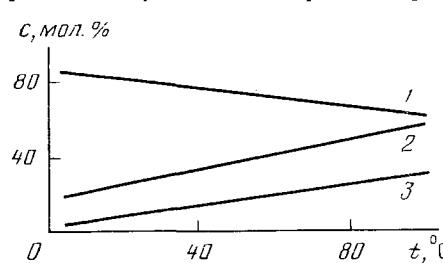


Рисунок. Температурная зависимость равновесного состава D-фруктозы в водном растворе: 1 — β -D-фруктопираноза, 2 — β -D-фруктофураноза, 3 — α -D-фруктофураноза [7]

подобным образом с увеличением концентрации D-фруктозы от 5 до 80% доля β -D-фруктопиранозы немного уменьшается и соответственно увеличивается содержание фруктофураноз [9, 10]. Указанные тенденции приводят к различию в равновесных составах D-глюкозы и D-фруктозы всего в 3—4%.

Доля всех форм, присутствующих в растворе, зависит от их относительной свободной энергии. Для D-фруктозы более стабильна та форма «кресла», в которой аномерная OH-группа находится в аксиальном положении [11, 12] т. е. конформация $1C$. Эту конформацию β -D-фруктопираноза имеет и в кристаллическом состоянии. Вообще у любой кетогексозы более стабильна та фуранозная форма, в которой атомы O(2) и O(3) находятся в *цис*-положении. В этом случае взаимодействие между O(3) и оксиметильной группой ослабляется. Поэтому в случае D-фруктозы более стабильна β -D-фруктофураноза, присутствующая в водных растворах в большем количестве, чем α -D-фруктофураноза. Стабильность фураноз увеличивается в растворе диметилсульфоксида, пиранозы более стабильны в воде [12].

Состав равновесной смеси D-фруктозы при 20° в зависимости от природы растворителя представлен в таблице. Из нее можно сделать вывод, что с увеличением полярности растворителя содержание фруктопираноз увеличивается, а содержание фруктофураноз уменьшается. Это отчасти связано с гидратацией гидроксильных групп, поскольку массивные сольватированные группы испытывают меньше пространственных затруднений, если углевод находится в растворе в виде пиранозы в конформации «кресла», а не в виде фуранозного кольца. В неводных растворителях этот эффект имеет меньшее значение, поскольку сольватирование в них является не столь значительным, как в воде, гидроксильные группы занимают меньший объем, и преимущества пиранозных конформаций по сравнению с фуранозными уменьшаются [14].

Большинство альдопираноз, в том числе и глюкопиранозы, в водном растворе существуют в конформации типа $C1$, поскольку она энергетически более выгодна. Например, в случае α -D-глюкопиранозы свободная энергия конформации $C1$ равна 2,4 ккал/моль, а энергия конформации

Таблица

Влияние природы растворителя на состав равновесной смеси
D-фруктозы при 20°

Растворитель	Содержание, мол.%		
	пиранозы	фуранозы	Ссылки
Диметилсульфоксид	18,5	81,5	[12]
Этанол (90%) + вода (10%)	43	57	[2]
Этанол (80%) + вода (20%)	49	51	[2]
Пиридин *	53	42	[13]
Вода	76	24	[4, 12]

* В растворе пиридина содержится 5% кетоформы.

$1C$ равна 6,55 ккал/моль, в случае β -*D*-глюкопиранозы свободные энергии этих конформаций составляют 2,05 и 8,0 ккал/моль соответственно [15]. Таким образом, у *D*-глюкозы преобладает конформация типа $C1$ (см. схему 1).

Свободная энергия α -*D*-глюкопиранозы несколько выше, чем β -*D*-глюкопиранозы из-за аксиального расположения аномерной OH-группы. Поэтому в водном растворе обнаруживается меньшее количество α -*D*-глюкопиранозы (36%) по сравнению с β -*D*-глюкопиранозой (64%), у которой все OH-группы экваториальны [2]. В водных растворах *D*-фруктоза существует в конформации типа $1C$ [12] (схема 1).

Равновесный водный раствор *D*-глюкозы имеет $\alpha_D^{20} = +52,7^\circ$, а для раствора *D*-фруктозы в тех же условиях $\alpha_D^{20} = -92,4^\circ$ [16].

D-Глюкоза и *D*-фруктоза — моносахара, легко подвергающиеся химическим изменениям. Под действием оснований они претерпевают взаимоизомеризацию через промежуточный енол с образованием маннозы. Так, из *D*-глюкозы в очень слабом растворе щелочи получается смесь *D*-глюкозы, *D*-фруктозы и *D*-маннозы [14]. В водных растворах щелочей при более высоких $\text{pH} \geq 9$ происходит комплексообразование сахара с щелочью, затем щелочная трансформация и разложение [17]. В работе [18], где изучали кинетику разложения фруктозы и глюкозы в щелочной среде при нагревании, отмечено, что фруктоза разлагается значительно быстрее глюкозы.

Вообще фруктоза значительно менее устойчива химически по сравнению с глюкозой. Так, нагревание при 80° в течение 20 мин щелочного раствора *D*-фруктозы, при $\text{pH} 8$ приводит к сильному пожелтению раствора, и с увеличением pH цветность быстро возрастает [19].

Изучение трансформации сахаров в растворе пиридина показало, что двойная связь может перемещаться по ендиольному механизму вдоль всей углеродной цепи. Этот же механизм лежит в основе разнообразных превращений моносахаров, в частности их расщепления под действием сильных кислот и оснований [20]. К действию кислот глюкоза и фруктоза проявляют большую устойчивость, особенно глюкоза. Таким образом, в мягких условиях возможны реакции взаимной конверсии сахаров, а в жестких условиях происходит дегидратация, приводящая к образованию фурфурола и близких ему соединений.

Нагревание *D*-глюкозы в разбавленном растворе серной кислоты при 100° приводит к образованию *D*-фруктозы, *D*-арabinозы, небольших количеств *D*-маннозы и *D*-ксилозы. Фруктоза в тех же условиях подвергается альдозо-кетозной изомеризации [21].

Продуктами конверсии *D*-глюкозы под действием различных разбавленных кислот являются *D*-фруктоза, *D*-манноза, изомальтоза, гентиобиоза и др. Состав смеси зависит от природы применяемого катализатора [22]. Аналогичные результаты получены в работе [23], где однако, подчеркивается, что олигомеры образуются только в 10%-ных растворах глюкозы при использовании 0,01–0,2 N раствора соляной кислоты.

В более жестких условиях преобладающим процессом становится дегидратация. Дегидратация гексоз в кислой водной среде приводит к об-

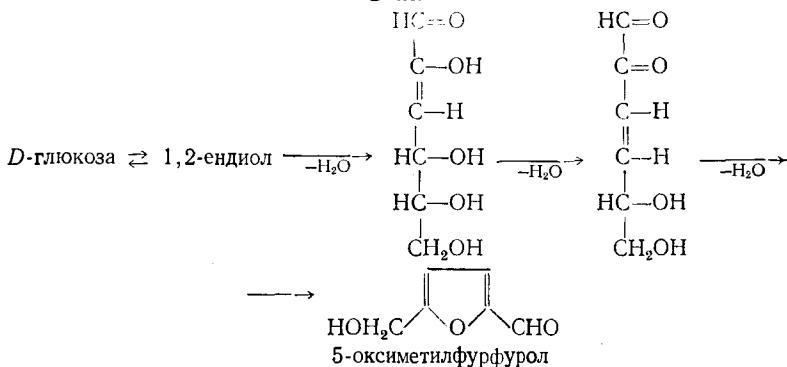
разованию не только 5-оксиметилфурфурола, но и 2-оксиацетилфурана [24]. Кроме того, может образовываться дифуриловый эфир [25].

Фруктоза подвергается конденсации в кислой среде в основном при умеренных температурах ($\sim 60^\circ$) и $\text{pH} 1,3\text{--}3,5$ с образованием леванобиозы, инулобиозы и других продуктов [26]. При $\text{pH} \geq 3,9$ дегидратация *D*-фруктозы проходит без образования 5-оксиметилфурфурола, а при $\text{pH} > 4,5$ происходит ее изомеризация в *D*-глюкозу [27].

Таким образом, при конверсии глюкозы и фруктозы в щелочных и кислых средах могут образовываться самые разнообразные продукты, состав которых зависит от значения pH среды, длительности реакции, температуры, природы катализатора, концентрации моносахарида и катализатора.

Процесс дегидратации *D*-глюкозы при нагревании в водном растворе может быть описан схемой 2 [28]:

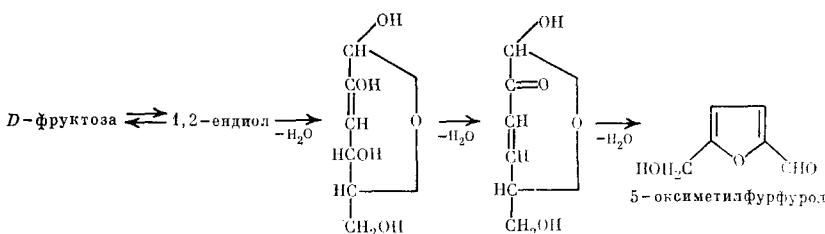
Схема 2



Из *D*-глюкозы может также образовываться 2,3-ендиол, который в конечном счете превращается в 2-оксиацетилфуран.

Процесс дегидратации *D*-фруктозы при нагревании в водном растворе может быть описан схемой 3 [29]:

Схема 3



D-Фруктоза чрезвычайно легко подвергается химическим превращениям, что продемонстрировано в работе [30]. После выдерживания *D*-фруктозы в абсолютном эталоне при комнатной температуре через некоторое время в растворе обнаруживаются метилглиокаль, дифруктозоангириды, дигетеролевулозаны, β -метилфруктопиранозид и два производных глюкозы. Таким образом, в этих условиях *D*-фруктоза подвергается ангидризации, изомеризации, димеризации и разложению на фрагменты, содержащие по три углеродных атома. *D*-Глюкоза в тех же условиях не претерпевает никаких изменений [30].

Фруктоза в холодном водном растворе обладает в 1,6 раза большей сладостью, чем сахароза; однако в горячем водном растворе сладость фруктозы заметно снижается. В работах [2, 4] показано, что сладость фруктозы зависит от соотношения таутомерных форм. Фруктофуранозы практически не имеют сладкого вкуса, носителем его является именно β -*D*-фруктопираноза. Если принять сладость сахарозы за 100%, то сладость β -*D*-фруктопиранозы равна 180—200%, а фруктофураноз — 0%.

Сладкий вкус β -D-фруктопиранозы определяется наличием тройной группировки, включающей аномерную гидроксильную группу, атом кислорода в первичной спиртовой группе и кольцевой метиленовый атом углерода [31]. Поскольку показано [7], что с повышением температуры количество β -D-фруктопиранозы снижается и соответственно возрастает количество фураноз, то становится понятным ослабление сладкого вкуса фруктозы в горячем водном растворе.

III. СПОСОБЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Существует много способов разделения глюкозо-фруктозных смесей. Можно выделить пять основных групп методов.

1. Методы, основанные на диализе с использованием ионообменных мембран [32, 33]. Эти методы требуют применения очень сложного оборудования, а также больших затрат электроэнергии [33]. Поэтому они являются чрезвычайно дорогостоящими.

2. Методы, основанные на химических реакциях с одним из компонентов смеси (глюкозой или фруктозой). При этом используют окисление глюкозы до глюконовой кислоты с последующим осаждением ее солями кальция и удалением из фруктозного раствора [34, 35], образование гидразонов с одним из сахаров и последующий их гидролиз [36, 37], взаимодействие сахаров с карбонильными соединениями металлов и последующий гидролиз одного из полученных продуктов [38], образование химических соединений фенолсодержащих смол с глюкозой [39] и т. д. Получаемая этими методами фруктоза требует тщательной очистки, а такой ценный сахар, как глюкоза, превращается в отходы.

3. Методы, основанные на раздельной кристаллизации глюкозы и фруктозы. Существует большое число этих методов. Применяют, например, охлаждение инвертного сиропа с последующим внесением затравочных кристаллов глюкозы, кристаллизацией глюкозы и ее отделением от фруктозного раствора [40]; образование комплекса глюкозы с хлоридом натрия, кристаллизующегося из раствора [41]; предварительную раздельную кристаллизацию глюкозы и фруктозы с последующим разделением на катионите [42]; раздельную кристаллизацию в метаноле с использованием разницы температур кристаллизации глюкозы и фруктозы [43, 44]. Однако с помощью этих методов не удается получить совершенно чистых глюкозы и фруктозы.

4. Методы, основанные на выделении фруктозы в виде комплексов с каким-либо соединением кальция, например, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [45—47] или CaCl_2 [48—52]. Эти методы малоэффективны из-за небольшого выхода конечного продукта (10—20%).

5. Группа ионообменных хроматографических методов, которую можно в свою очередь подразделить на три основные подгруппы:

а) хроматографическое разделение глюкозы и фруктозы на цеолитах, в том числе цеолите X, содержащем катионы K^+ и селективно сорбирующем глюкозу [53—56]; на цеолите, содержащем катионы NH_3^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} и селективно сорбирующем фруктозу [57]; на цеолитах X, Y или L, содержащих катионы Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Be^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} и др. [58—60], а также на минеральном сорбенте типа «Сорбекс» [61].

б) разделение глюкозы и фруктозы на анионообменных смолах. Разделение обычно ведут при 40—60° на анионитах, чаще всего типа Дауэкс I, в бисульфитной или сульфитной формах, элюентом служит вода [62—76]. Однако использование анионита в указанных формах приводит к тому, что в получаемых глюкозе и фруктозе содержатся ионы SO_3H^- и SO_3^{2-} , поскольку они легко вымываются водой [65]. Чтобы избавиться от этих примесей, приходится применять добавочные очистные колонки с анионитом в OH -форме, а это вызывает дополнительное разбавление растворов сахаров. В работе [77] использована смесь анионита в бисульфитной форме с 5% катионита в натриевой и водородной формах, что позволило улучшить разделение глюкозо-фруктозной смеси.

в) разделение глюкозы и фруктозы на катионообменных смолах. Обычно используют полистиролсульфонатные смолы, поперечно сшитые дивинилбензолом (ДВБ) и содержащие катионы щелочного или щелочноземельного металла. Применяют и другие формы. При разделении глюкозы и фруктозы на катионите Дауэкс 50×4 в Са-форме пики глюкозы и фруктозы оказались сильно размытыми, на Ag-форме наблюдалось слабое, а на Sr-форме довольно хорошее разделение [78]. Использование натриевой формы катионита [79] не позволяет разделить глюкозо-фруктозные смеси, однако наблюдалось частичное разделение моно-, ди- и трисахаридов. Сравнение эффективности различных форм катионитов приводит к заключению, что для разделения глюкозы и фруктозы наиболее благоприятен катион Ca^{2+} . Такой же вывод следует из работы [80].

В большинстве работ [81—97] используют катиониты в Са-форме со степенью сшивки, равной 2—8% ДВБ, элюентом служит вода, разделение ведут при 50—70°, концентрация вводимого сиропа в расчете на сухие вещества составляет 50% и более. Обычно применяют смолу в виде зерен размером 0,2—0,5 мм, причем стараются использовать как можно более узкую фракцию. Немаловажным фактором, влияющим на эффективность хроматографического разделения, является плотность и равномерность упаковки слоя смолы в колонке. Этому вопросу посвящена работа [98], в которой предложен способ достижения плотной упаковки смолы в Са-форме зернением 0,3—0,6 мм, основанный на свойстве полистиролсульфонатных смол набухать в концентрированном растворе CaCl_2 (20%) в меньшей степени, чем в воде. Суспензию смолы подают в колонку в растворе хлористого кальция, а затем промывают водой.

В работах [81—98] использованы катиониты типа Дауэкс 50. Однако применяют и другие катиониты, например Дуолит С20×4 [99], Амберлит 1R—120 В [100], Пермутит Q [111], Дуолит С25 [102], в кальциевой форме в условиях, аналогичных указанным выше.

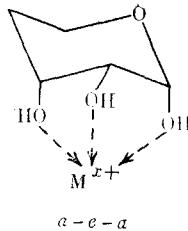
В ряде работ [103—107] для разделения глюкозы и фруктозы использовали полунепрерывные процессы: метод «моделированного движущегося слоя» [103] на сульфокатионите в Са-форме; метод «кипящего слоя» [104] на сильнокислотном катионите в Са-форме; метод «циклического зонального разделения» [105] на производном аминоэтилцеллюлозы; метод «движущегося ввода» [106] на катионите в Са-форме. Разработан также способ, в котором используется колонка, содержащая последовательно чередующиеся реакционные и адсорбционные зоны [107]. При этом в реакционной зоне глюкоза изомеризуется во фруктозу, а в адсорбционной зоне адсорбируется фруктоза.

IV. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ И ФРУКТОЗЫ

Фруктоза, глюкоза, сахароза, другие углеводы образуют с основаниями молекулярные комплексы состава 1:1. Редуцирующие сахара, к которым относятся глюкоза и фруктоза, дают более прочные комплексы, чем нередуцирующие, например сахароза [108—110]. Катионы металлов обладают различной комплексообразующей способностью, зависящей от их валентности и размеров. Так, согласно [111], по своей комплексообразующей способности одновалентные катионы металлов располагаются в ряды: для глюкозы $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$, для фруктозы $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$. Порядок расположения двухвалентных катионов следующий: для глюкозы $\text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$, для фруктозы $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. Однако не все углеводы образуют комплексы с катионами в водном растворе, а сами комплексы имеют разную степень прочности. С помощью методов ЯМР и электрофореза удалось доказать, что комплексообразование с катионами металлов возможно при наличии трех ОН-групп, находящихся в благоприятном стерическом положении. Такое положение возникает, когда три соседних ОН-группы располагаются в последовательности

тельности аксиальная — экваториальная — аксиальная ($a-e-a$) [112—115].

В 1975 г., основываясь на данных ЯМР и электрофореза, Гоулдинг [116] предложил свою теорию комплексообразования углеводов с катионами металлов. Наиболее прочные комплексы образуются при наличии $a-e-a$ последовательности трех соседних OH-групп в пиранозном кольце или *цис-цис* последовательности трех OH-групп в фуранозном кольце:



$a - e - a$

Константа устойчивости (K_y) таких комплексов равна 1—5 моль⁻¹. В случае $a-e$ (*цис*) последовательности $K_y=0,1$ моль⁻¹. Последовательность $e-a-e$ дает менее прочный комплекс. Наконец, $e-e$ последовательность еще менее благоприятна, чем $a-e$, и при $a-a$ последовательности комплексы вообще не образуются. Отсюда следует важный вывод: чем больше в молекуле углевода число благоприятно ориентированных пар OH-групп, тем прочнее комплексы. Например, α -D-глюко- и α -D-фруктопиранозы имеют по одной паре расположенных в $a-e$ последовательности OH-групп, β -D-фруктопираноза — 2 пары, а β -D-глюко-пираноза таких пар не имеет.

В работе [112] на примере аллозы показано, что комплексы фураноз всегда менее стабильны, чем комплексы пираноз.

Оптимальный для комплексообразования радиус катиона составляет $\sim 1,0 \text{ \AA}$. Чем больше заряд катиона, тем легче образуется комплекс: Na^+ имеет размер $0,97 \text{ \AA}$, Ca^{2+} — $0,99 \text{ \AA}$ и La^{3+} — $1,02 \text{ \AA}$ [112].

Из данных Гоулдинга [116], который определил коэффициенты емкости сахаров (k') на катионите Амиекс А-5 с размером частиц $11 \pm 2 \text{ мкм}$ при использовании различных катионов, следует, что фруктоза образует довольно прочные комплексы с K^+ , Ag^+ , Tl^+ , Ca^{2+} и чуть менее прочные с Sr^{2+} . В то же время на катионите, содержащем катионы K^+ , Ag^+ , Tl^+ , значения k' для глюкозы также довольно высоки и, следовательно, при использовании этих катионов нельзя добиться хорошего разделения глюкозо-фруктозных смесей. Поскольку стронций токсичен, можно сделать вывод, что наиболее подходящим катионом для селективного комплексообразования с фруктозой в присутствии глюкозы является кальций.

Механизм разделения глюкозы и фруктозы скорее всего основан на наличии у β -D-фруктофуранозы двух *цис*-OH-групп на пятивленном кольце [117]. Две пары $a-e$ расположенных OH-групп у β -D-фруктопиранозы вряд ли существенно влияют на разделение, поскольку могут обеспечить образование только очень слабых комплексов с катионами. Глюкоза, для которой из всех возможных изомеров только α -D-глюкопираноза имеет одну пару $a-e$ расположенных OH-групп, образует еще более слабый комплекс. В процессе разделения в колонке происходит мутаротация сахаров. Связывание β -D-фруктофуранозы с кальцием вызывает сдвиг мутаротационного равновесия в жидкой фазе. Чем быстрее идет этот процесс, тем уже пик элюирируемой фруктозы.

Аналогичное явление происходит и с глюкозой. При неблагоприятных условиях, когда мутаротация протекает медленно, пики глюкозы и особенно фруктозы могут быть сильно размыты; это объясняется тем, что вначале элюируется β -D-глюкопираноза, затем α -D-глюкопираноза, далее β -D-фруктопираноза и наконец β -D-фруктофураноза. Подтвержде-

нием могут служить известные данные о заметном сужении пиков углеводов при повышении температуры [83, 84, 118]. В случае фруктозы повышение температуры, во-первых, ускоряет сам процесс мутаротации, а во-вторых, сдвигает равновесие в сторону фураноз [7]. Однако при этом начинает действовать и другой фактор — устойчивость комплекса фруктозы с катионом; повышение температуры уменьшает устойчивость комплекса. Для наилучшего разделения необходимо подобрать такую температуру, при которой достигается оптимальное соотношение между устойчивостью комплекса, скоростью мутаротации и составом первоначальной равновесной смеси. Кроме того, имеются и другие факторы, о которых будет сказано ниже.

Наличие ионов H^+ , а также OH^- резко ускоряет процесс мутаротации, и они способствуют разделению глюкозы и фруктозы [92]. Интересно отметить, что при переводе катионита в кальциевую форму по стандартной методике 10%-ным раствором хлористого кальция часть смолы обязательно остается в H^+ -форме (3—5%). Если же смола полностью переведена в Са-форму (а это возможно при повышенной температуре или при использовании щелочного раствора хлористого кальция), то разделение глюкозы и фруктозы ухудшается. Это доказывает важность мутаротационных процессов, происходящих в хроматографических колонках. Кроме ионов H^+ и OH^- мутаротацию резко ускоряют триэтил- и триметиламины. Добавление очень малых количеств триэтиламина в элюент (воду) приводит к сужению пиков фруктозы и особенно глюкозы [119]. Действие триэтиламина, по-видимому, объясняется тем, что он придает раствору слабую щелочность и это резко ускоряет мутаротацию.

Отмечено также, что на прочность комплексов сахаров с катионами металлов оказывает влияние природа элюента. Известно, что константы стабильности комплексов в этаноле значительно выше, чем в воде [120, 121]; однако из-за близости коэффициентов распределения глюкозы и фруктозы в этаноле обычно не удается достичь их удовлетворительного разделения.

Использование анионитов для разделения глюкозо-фруктозных смесей приводит к нежелательным превращениям индивидуальных сахаров [122, 123]. На сильноосновных анионитах, например на Амберлите IRA-400, наблюдался даже распад глюкозы и фруктозы с образованием гликолевой и лимонной кислот [124].

При хроматографии на зернистых материалах, в том числе на катионитах, определяющим процессом является диффузия сахара в частицах смолы [125], в свою очередь зависящая от скорости подвижной фазы, температуры, размера зерен смолы, степени ее сшивки, природы растворителя и сахара.

Увеличение температуры ускоряет диффузию [126], но, приводя к сужению пиков разделяемых компонентов, не всегда улучшает разделение смеси, так как одновременно уменьшается k' [127]. С другой стороны, при низких температурах сахара адсорбируются более сильно и, следовательно, разрешение может быть улучшено, если влияние снижения скорости массопереноса мало, а влияние мутаротации подавляется [119]. В работах [117, 128] отмечено, что понижение температуры улучшало разделение глюкозы и фруктозы на катионите в Са-форме.

Одним из важных факторов в процессе хроматографического разделения сахаров является скорость подвижной фазы. Она ограничивается диффузией сахаров внутрь частиц смолы [129—131]. При большой скорости движения подвижной фазы пики разделяемых веществ становятся асимметричными, появляются длинные «хвосты», наличие которых объясняется тем, что часть сахаров продолжает дифундировать из частиц смолы в подвижную фазу.

Уменьшение размера частиц смолы увеличивает скорость массопереноса. Например, в работе [129] изменение зернения смолы Дауэкс 21 (К) от 45—75 до 15—40 мкм улучшало разделение глюкозы, сахарозы и рафинозы более чем в 3 раза, резко сужая пики веществ. Большая эффективность катионита Дауэкс 50×8 в Ва-форме [132] по сравнению с

Са-формой [133] объясняется меньшим размером использованных частиц смолы в первом случае (0,038—0,075 мм против 0,15—0,30 мм). В работе [134] обнаружена зависимость между размером зерен катионита и выходом чистой фруктозы: чем меньше зернение, тем больше выход. Кроме того, использование более узких гранулометрических фракций смолы дополнительно улучшает разделение веществ, что в значительной степени, видимо, связано с более равномерной упаковкой зерен в слое. Использование смолы крупного зернения вынуждает применять очень низкие скорости подвижной фазы из-за малой скорости массопереноса в крупных зернах смолы и не позволяет добиться удовлетворительного разделения глюкозо-фруктозной смеси [135].

Поскольку молекулы сахаров имеют сложную пространственную конфигурацию и для комплексообразования с активным центром катионита им необходимо занять определенное положение, которое обеспечивает возникновение связей примерно равной длины между металлом и комплексообразующими ОН-группами углевода [114, 136], то ясно, что пространственная структура катионита должна влиять на хроматографическое разделение. В свою очередь, пространственная структура катионита определяется степенью поперечной сшивки. Степень поперечной сшивки катионита не должна превышать определенный предел [79, 84, 88, 90, 92, 101, 137]. В то же время анализ указанных работ приводит к заключению, что степень поперечной сшивки не должна быть ниже определенного предела. Наиболее благоприятные условия, по-видимому, обеспечивает степень сшивки ДВБ, равная 4—8%. Применение катионитов с меньшей степенью сшивки, например катионита КУ-2-2 (Са), имеющего степень сшивки 2% [138], снижает эффективность разделения глюкозы и фруктозы, что показано в работе [137]. Причины этого не совсем ясны, однако главный недостаток катионитов с малой степенью сшивки (2% ДВБ и ниже) заключается в их низкой механической прочности.

* * *

Итак, при создании различных технологий производства фруктозы, основанных на хроматографических методах разделения глюкозо-фруктозных смесей на катионообменных смолах, следует учитывать несколько наиболее важных моментов.

Во-первых, глюкоза и особенно фруктоза являются крайне нестабильными в химическом отношении углеводами и любые операции с ними требуют использования мягких условий (рН 5—7, температура $\leq 60^\circ$). Во-вторых, катионы кальция наиболее пригодны для селективного комплексообразования с фруктозой в присутствии глюкозы, а механизм их разделения на катионитах в Са-форме скорее всего основан на образовании относительно прочного комплекса β -D-фруктофуранозы с кальцием. В-третьих, степень сшивки катионита, равная 4—8% ДВБ, по-видимому, обеспечивает наилучшее разделение глюкозы и фруктозы. И, наконец, при обработке катионита раствором хлористого кальция не следует стремиться к 100%-ному его переводу в Са-форму; не менее 3—5% сульфогрупп катионита должны оставаться в Н-форме.

При оптимизации условий хроматографического разделения глюкозы и фруктозы необходимо учитывать, что повышение температуры процесса в данном случае приводит не только к ускорению массообмена углеводов в зернах катионита, но и к сдвигу мутаротационного равновесия сахаров в жидкой фазе и к уменьшению прочности комплексов моносахаридов с кальцием. Существенного повышения эффективности процесса разделения глюкозы и фруктозы можно добиться за счет использования зерен катионита минимально возможного размера. Последнее позволит улучшить разрешение пиков глюкозы и фруктозы, увеличить скорость подвижной фазы и нагрузку на колонку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fructose. Fruit Sugar. Helsinki: Finnish Sugar Co., 1973.
2. Heyns K. Starke, 1978, B. 30, S. 345.
3. Horton D., Walaszek Z. Carbohydr. Res., 1982, v. 105, p. 145.
4. Shallenberger R. S. Pure Appl. Chem., 1978, v. 50, p. 1409.
5. Mauch W., Farhoudi E. O. Z. Zuckerind., 1976, B. 26, S. 767.
6. Farhoudi E. O., Mauch W. Forschungsber.— Inst. Zuckerind. Berlin, 1976, B. 4, S. 87.
7. Shallenberger R. S. Carbohydr. Res., 1977, v. 58, p. 209.
8. Hyvonen L., Varo P., Koivistoisten P. J. Food Sci., 1977, v. 42, p. 654.
9. Hyvonen L., Varo P., Koivistoisten P. Ibid., 1977, v. 42, p. 652.
10. Hyvonen L., Varo P., Koivistoisten P. Ibid., 1977, v. 42, p. 657.
11. Angyal S. J., Bethell G. S. Austral. J. Chem., 1976, v. 29, p. 1249.
12. Perlin A. S., Harve du Penhoat P., Isbell H. S. Adv. Chem. Ser., 1973, v. 117, p. 39.
13. Funcke W., Klemer A. Carbohydr. Res., 1976, v. 50, p. 9.
14. Степаненко Б. Н. Химия и биохимия углеводов. Моносахариды. М.: Высшая школа, 1977, с. 71.
15. Angyal S. J. Austral. J. Chem., 1968, v. 21, p. 2737.
16. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1976, с. 258.
17. Moulik S., Basu D., Bhattacharya P. K. Carbohydr. Res., 1978, v. 63, p. 165.
18. Колесников В. А., Горюхов Г. И. Изв. вузов СССР. Пищ. технол., 1982, № 5, с. 65.
19. Candida D. R. Cent. azuc. Rev. Min. educ. super. Rep. Cuba, 1981, v. 8, p. 109.
20. Fedoronko M., Linek K. Coll. Czech. Chem. Commun., 1967, v. 32, p. 2177.
21. Koisumi K., Hashimoto K. Yakugaku Zasshi, 1972, v. 92, p. 1133; C. A., 1973, v. 77, 152469.
22. Soler A., Martinez Sanchez M. C., Garcia Ruiz P. A. Ion (Madrid), 1976, v. 36, p. 527.
23. Soler A., Garcia Ruiz P. A., Martinez Sanchez M. C. Ann. Quim. 1976, v. 72, p. 957.
24. Miller R. E., Cantor S. M. J. Amer. Chem. Soc., 1952, v. 74, p. 5236.
25. Anet E. F. L. J. Austral. J. Chem., 1965, v. 18, p. 240.
26. Krol B. Acta Aliment. Pol., 1978, v. 4, p. 287.
27. Kuster B. F. M., Temmink H. M. G. Carbohydr. Res., 1977, v. 54, p. 185.
28. Heyns K. Deut. Lebensmitt.-Rundschau, 1977, B. 73, S. 111.
29. Anet E. F. L. J. Chem. and Ind., 1962, № 6, p. 262.
30. Shamgar A. H., Leibowitz J. J. Org. Chem., 1961, v. 26, p. 285.
31. Lemieux R. U., Brewer J. T. Adv. Chem. Ser., 1973, v. 117, p. 121.
32. Singo K., Atty O., Taganory N. Пат. Японии 549576 (1979); РЖХим., 1980, 13P435.
33. Kalyanasundram V., Surendar J. M., Anthony G. J. Пат. США 4299677 (1981); РЖХим., 1982, 19P308.
34. Müller H. R., Kundig N., Hedinger A. Пат. Швейцарии 631428 (1982); РЖХим., 1983, 8P502.
35. Krol B. W. Zesz. nauk. Todzkiej. Technol. Chem. spoz., 1980, v. 35, p. 187.
36. Quitensky H. Пат. Австрии 263660 (1968); C. A. 1969, v. 69, 53047.
37. Quitensky H. Пат. США 3471329 (1969); C. A., 1970, v. 71, 30672.
38. Jary J., Nemec J., Lubes J. Пат. ЧССР 135078 (1970); C. A., 1972, v. 75, 20903.
39. Isamu J., Tosyo A., Sabu J. Пат. Японии 54118488 (1979); РЖХим., 1980, 13P456.
40. Kubo T., Naito F. Пат. Японии 7548146 (1975); C. A. (1976), v. 82, 149478.
41. Tatuki R. Пат. США 3671316 (1972); C. A. (1973), v. 77, 90364.
42. Takasaki Y., Shiraki K. Пат. Японии 7391232 (1973); C. A., 1974, v. 80, 122661.
43. Nitsch E. Пат. Австрии 278676 (1970); C. A. 1971, v. 72, 113048.
44. Nitsch E. Пат. Австрии 271344 (1969); C. A., 1970, v. 71, 40555.
45. Kazuo H. Пат. Японии 7018936 (1970); C. A., 1972, v. 74, 42591.
46. Sturm W., Kittel H. Пат. 109236 (1974); C. A., 1975, v. 83, 43682.
47. Assai S., Yarita K., Matsushita K. Пат. Японии 77133915 (1977); РЖХим., 1978, 20P485.
48. Ozaki Y., Hagiwara H. Пат. Японии 7377039 (1973); C. A., 1974, v. 80, 122656.
49. Kazuo H. Пат. Японии 7227942 (1972); C. A., 1973, v. 77, 154236.
50. Kazuo H., Toshimoto B. Брит. Пат. 1173340 (1969); C. A., 1972, v. 72, 56974.
51. Kazuo H. Пат. Японии 7137848 (1971); C. A., 1972, v. 77, 90365.
52. Toshimoto B. Брит. Пат. 1357399 (1974); C. A. 1975, v. 82, 88012.
53. Neuzil R. W., Priegnitz J. W. Пат. США 4349668 (1982); C. A., 1983, v. 97, 182798.
54. Neuzil R. W., Priegnitz J. W. Пат. США 4024331 (1977); C. A., 1978, v. 87, 184896.
55. Biesser H., De Rosset A. J. Starke, 1977, B. 29, S. 392.
56. Wortel T. M., Van Bekkum H. Rec. trav. chim. Pays-Bas, 1978, v. 97, p. 156.
57. Neuzil R. W., Priegnitz J. W. Пат. США 4340724 (1982); C. A., 1983, v. 97, 1872797.
58. Odawara H., Ono M. Брит. Пат. 1516435 (1978); РЖХим., 1979, 3P5669.
59. Odawara H., Noguchi Y., Ono M. Пат. Японии 76110048 (1976); C. A., 1977, v. 86, 73066.
60. Odawara H., Ono M., Yamazaki T., Kanaoka M. Пат. Японии 7826336 (1978); C. A., 1979, v. 89, 6134.
61. Broughton D. B., Bieser H. J., Berg R. C., Connell E. D., Korous D. J. Sucr. Belge Sugar Ind. Abstr., 1977, v. 96, № 5, p. 155.
62. Takasaki Y. Пат. ФРГ 2160919 (1972); C. A., 1973, v. 77, 141690.
63. Takasaki Y. Пат. Японии 7348650 (1973); C. A., 1974, v. 79, 116470.

64. *Takasaki Y.* Пат. Японии 7396736 (1973); С. А., 1975, в. 81, 26814.

65. *Takasaki Y., Oshara M., Okuda Y.* Пат. Японии 7412047 (1974); С. А., 1975, в. 81, 154953.

66. *Takasaki Y.* Пат. США 3806363 (1974); С. А., 1975, в. 81, 14938.

67. *Takasaki Y.* Пат. Японии 7546848 (1975); С. А. (1976), в. 83, 117559.

68. *Takasaki Y.* Пат. Японии 7601657 (1976); С. А. 1977, в. 84, 152569.

69. *Osamu K.* Пат. Японии 7641448 (1976); С. А., 1977, С. А., в. 85, 65142.

70. *Hiroshi K.* Пат. Японии 7641449 (1976); С. А. 1977, в. 85, 65143.

71. *Takasaki H.* Пат. Японии 7702985 (1977); С. А., 1978, в. 86, 141969.

72. *Kubota H.* Пат. Японии 78104744 (1978); С. А., 1979, в. 90, 7966.

73. *Takasaki Y.* Agric. Biol. Chem., 1972, в. 36, р. 2575.

74. *Takasaki Y., Okamura B.* Kagaku to Kogyo (Chem. and Chem. Ind.). 1978, в. 31, р. 534.

75. *Hiroto Y.* Japan Chem. Ind. Assoc. Mon., 1980, в. 33, № 3, р. 14.

76. *Hiroto T.* Chem. Eng., 1982, в. 27, р. 435.

77. *Kubota H.* Пат. Японии 78148551 (1978); С. А.; 1979, в. 90, 185208.

78. *Lefevre L. J.* Пат. США 3044905, 3044906 (1962); С. А. 1963, в. 57, 11441.

79. Густав Э., Аминофф К. Авт. свид. СССР 912046 (1982); Бюл. изобр., 1982, № 9, с. 94.

80. *Mountfort C. B. et al.* Пат. США 3416961 (1968); С. А., 1969, в. 69, 32869.

81. *Kubota H., Higashikubo S.* Пат. Японии 75142743 (1975); С. А., 1977, в. 84, 76095.

82. *Krol B., Lagrodski S.* Пат. ПНР 91516 (1977); РЖХим., 1978, 21Р532.

83. *Melaja A.* Пат. ФРГ 2037656 (1971); С. А., 1972, в. 74, 127945.

84. *Melaja A.* Пат. США 3692582 (1972); С. А., 1973, в. 76, 13303.

85. *Melaja A.* Пат. США 3928193 (1975); С. А., 1977, в. 84, 76084.

86. *Boehringer M.* Пат. Бельгии 817880 (1975); С. А., 1976, в. 83, 134269.

87. *Lauer K., Weber M., Stocek G.* Пат. США 3483931 (1966); С. А., 1967, в. 66, 11232.

88. *Sutthoff R. F., Nelson W. J.* Пат. США 4022637 (1977); С. А., 1978, в. 87, 7837.

89. *Yabuki S., Hanatani T., Yamada S.* Пат. Японии 7673140 (1976); С. А., 1978, в. 86, 16893.

90. *Boehringer M.* Брит. пат. 1083500 (1967); С. А.; 1968, в. 67, 101240.

91. *Melaja A.* Пат. СРР 62056 (1977); РЖХим., 1978, 21Р525.

92. *Boehringer C. F.* Брит. пат. 1085696 (1967); С. А., 1968, в. 68, 16799.

93. *Boehringer C. F.* Пат. Нидерландов 610981 (1967); С. А., 1968, в. 67, 3993.

94. *Lauer K.* Starch, 1980, в. 32, р. 11.

95. Пат. Японии 80118400 (1980); С. А., 1982, в. 84, 67591.

96. *Yoritomi K., Kezuka T., Moriya M.* Пат. США 4267054 (1981); С. А., 1982, в. 94, 171788.

97. *Fickel R. G.* Пат. США 4319929 (1982); С. А., 1983, в. 96, 163110.

98. *Leiser R. S., Liaw G. C.* Пат. ФРГ 2802711 (1978); С. А., 1979, в. 90, 40611.

99. *Yoritomi K., Kezuka T., Moriya M.* Пат. ФРГ 2822721 (1978); С. А., 1979, в. 90, 73580.

100. *Ozaki Y., Oshara M., Kojima N., Nagata H.* Пат. Японии 7570537 (1975); С. А., 1976, в. 83, 149479.

101. *Serbia G. R.* Пат. США 3044904 (1962); С. А., 1963, в. 57, 11440.

102. *Kenzaburo Y., Tsukasa L., Kaoru K.* Пат. Японии 7368752 (1973); С. А., 1974, в. 80, 61362.

103. *Hirota T.* Sugar y azucar, 1980, в. 75, р. 245.

104. *Hirota T., Shioda K., Hotta H.* Пат. Японии 7888335 (1978); С. А., 1979, в. 89, 217102.

105. *Busbice M. E., Wankat P. C.* J. Chromatogr., 1975, в. 114, р. 369.

106. *Barker P. E., Chuah C. H.* Chem. Eng., 1981, р. 389.

107. *Hashimoto K., Yasudazu S., Noshima H.* Пат. Японии 56166905 (1980); РЖХим., 1983, 3Р494.

108. *Moulik S. P., Khan D. P.* Carbohydr. Res., 1975, в. 41, р. 93.

109. *Boruch M., Makuch J.* Lesz. nauk. Plodz., 1977, № 280, р. 19.

110. Гребенников В. Н., Выскребцов В. Б., Бударин Л. И. Журн. неорган. химии, 1984, т. 29, с. 51.

111. *Dangre A. J. J.* Univ. Poona, Sci. Technol., 1973, № 44, р. 217.

112. *Angyal S. J.* Austral. J. Chem., 1972, в. 25, р. 1957.

113. *Angyal S. J.* Adv. Chem. Ser., 1973, в. 117, р. 106.

114. *Angyal S. J.* Tetrahedron, 1974, в. 30, р. 1695.

115. *Angyal S. J., Bodkin C. L., Mills J. A., Pojer P. M.* Austral. J. Chem., 1977, в. 30, р. 1259.

116. *Goulding R. W. J.* Chromatogr., 1975, в. 103, р. 229.

117. *Angyal S. J., Bethell G. S., Beveridge R. J.* Carbohydr. Res., 1979, в. 73, р. 9.

118. *Verhaar L. A. T.* Starch., 1982, в. 34, р. 351.

119. *Verhaar L. A. T., Kuster B. F. M. J.* Chromatogr., 1981, в. 210, р. 279.

120. *Samuelson O., Stromberg H.* Acta Chem. Scand., 1968, в. 22, р. 1252.

121. *Samuelson O., Stromberg H.* Carbohydr. Res., 1966, в. 3, р. 89.

122. *Zill L. P., Khym J. X., Cheniae G. M. J.* Amer. Chem. Soc., 1953, в. 75, р. 1339.

123. *Jandera P., Churacek J. J.* Chromatogr., 1974, в. 98, р. 55.

124. *Franzke C. L., Grunert K. S., Ullrich E.* Nahrung, 1966, B, 10, S. 557.

125. Скотт Ч. В кн.: Современное состояние жидкостной хроматографии/Под ред. Киркленда Дж. М.: Мир, 1974, с. 219.

126. *Jonsson P., Samuelson O.* Anal. Chem., 1967, в. 39, р. 1156.

127. Купцевич Ю. Е., Стальня И. Д., Нахапетян Л. А., Пронин А. Я., Ларионов О. Г. Сахарная пром-сть, 1985, № 12, с. 47.

128. Mihailovic J., Petrov L. Ind. Secera, 1981, v. 35, p. 50.

129. Dahlberg J., Samuelson O. Acta Chem. Scand., 1966, v. 17, p. 2136.

130. Samuelson O., Swenson B. Ibid., 1965, v. 16, p. 2056.

131. Купцевич Ю. Е., Стальня И. Д., Нахапетян Л. А., Пронин А. Я., Соседов О. Н., Ларионов О. Г. Прикл. биохим. и микробиол., 1985, т. 21, с. 129.

132. Jones J. K. N., Wall R. A. Canad. J. Chem., 1960, v. 38, p. 2290.

133. Felicetta V. F. et al. Tappi, 1959, v. 42, № 6, p. 496.

134. Welstein H., Sauer C. Ion Exchange Technol., 1984, p. 463.

135. Кроссинг В. А., Талвари А. А., Нахапетян Л. А. Труды Таллинского политехнич. ин-та. Кинетические и технологические характеристики биокатализаторов. Таллин, 1982, т. 526, с. 87.

136. Saunders R. M. Carbohydr. Res., 1968, v. 7, p. 76.

137. Купцевич Ю. Е., Стальня И. Д., Пронин А. Я., Нахапетян Л. А., Ларионов О. Г. Пластич. массы, 1985, № 3, с. 36.

138. Ананичев А. В., Галицкая Н. Б., Улезло И. В., Егоров А. М. Прикл. биохим. и микробиол., 1985, т. 21, с. 260.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт биотехнологии, Москва
Институт физической химии АН СССР, Москва