

В. В. РАЧИНСКИЙ и Е. И. КНЯЗЬТОВА

**АНАЛИЗ САХАРОВ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ
РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 V 1952)

В последнее время метод бумажной хроматографии стал широко применяться в области биохимических исследований⁽¹⁾. Особенно хорошо разработана методика анализа аминокислот⁽²⁾. В отношении других групп соединений, в том числе и углеводов, методика получения и анализа бумажных хроматограмм разработана еще недостаточно.

Как известно, успех получения четкой бумажной хроматограммы в значительной мере зависит от качества применяющейся фильтровальной бумаги. Фильтровальная бумага для распределительной хроматографии должна удовлетворять следующим требованиям: 1) она не должна адсорбировать хроматографируемые вещества; 2) должна быть достаточно однородной по плотности; 3) должна иметь минимум зольных, а также различных других растворимых в органических растворителях примесей.

Особенно большие затруднения возникают при разделении методом бумажной распределительной хроматографии диссоциирующих соединений, так как последние могут сильно адсорбироваться бумагой.

Так как сахара являются недиссоциирующими соединениями, то можно было ожидать, что имеющиеся в продаже отечественные сорта обычной фильтровальной бумаги могут оказаться вполне пригодными для получения бумажных хроматограмм сахаров. Нами были испытаны следующие сорта фильтровальной бумаги: «Лальская первый сорт», «Маяк революции первый сорт» и беззольная бумага «Синяя лента» МХТИ.

Общий вид аппаратуры, применявшейся нами в опытах по хроматографированию сахаров, показан на рис. 1 и 2. В качестве подвижного растворителя использовался фенол, насыщенный водой.

После того как фронт растворителя пройдет по полосе бумаги расстояние 40—50 см, полоса или лист бумаги высушивались сначала на открытом воздухе, а затем в сушильном шкафу при 100—105°.

Сахара проявлялись на бумаге путем опрыскивания ее из стеклянного пульверизатора раствором реактива, дающего цветную реакцию с сахарами.

Приводим рецептуру некоторых испытанных нами для проявления сахаров реактивов.

1. Аммиачный раствор азотнокислого серебра. Перед употреблением смешиваются в соотношении 1:1 0,1 N раствор AgNO_3 и 5 N раствор NH_3 . Этот проявитель служит для проявления редуцирующих сахаров. После опрыскивания бумага переносится в сушильный шкаф с температурой 105°. Через 5 мин. бумага приобретает

светлокоричневый цвет, на фоне которого в местах расположения редуцирующих сахаров появляются темнокоричневые пятна. Реакция имеет чувствительность порядка 20 γ .



Рис. 1. Простая камера для бумажной хроматографии. Герметическое пространство создается при помощи двух вегетационных сосудов, соединяющихся открытыми частями. Место соединения сосудов замазывается пластилином. Внутри камеры находится металлический треножник, на котором установлена фарфоровая чашка с растворителем. В нее погружены концы подготовленных для хроматографирования полос фильтровальной бумаги. Свободные концы полос бумаги свисают

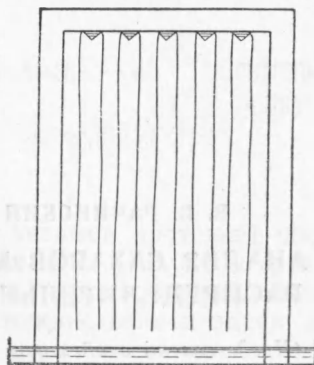


Рис. 2. Большая хроматографическая камера. Стекланный колпак размером 50 × 70 × 70 см погружен открытой частью в цинковую ванну, заполненную водой. Под колпаком находится металлический каркас, на котором устанавливаются ванночки, чашки или желобки с растворителями и погруженными в них концами полос или листов фильтровальной бумаги

2. Резорциновый проявитель. Перед употреблением смешиваются в соотношении 1:1 1% спиртовой раствор резорцина и 0,2 N HCl. После опрыскивания бумага переносится в сушильный шкаф с температурой 80—90°. Через 5 мин. на бледно-розовом фоне в местах расположения зон сахаров появятся цветные пятна. Цвет пятен и чувствительность реакции для некоторых важных в биологическом отношении сахаров приводится в табл. 1.

3. Нафтоловый проявитель. Перед употреблением смешиваются в соотношении 1:10 15% спиртовой раствор α -нафтола и 0,01 N спиртовой раствор H₂SO₄. При 60—70° на светлофиолетовом фоне появляются фиолетовые пятна раффинозы, сахарозы и фруктозы. Для этих сахаров чувствительность реакции порядка 10 γ . Другие

Таблица 1
Характеристика резорцинового проявителя

| Сахар | Окраска | Чувствительность реакции* |
|-----------|-----------------|---------------------------|
| Раффиноза | Бордово-розовая | 10 |
| Мальтоза | Розовая | 100 |
| Глюкоза | Розовая | 100 |
| Лактоза | Розовая | 100 |
| Сахароза | Бордово-розовая | 10 |
| Галактоза | Желто-оранжевая | 100 |
| Манноза | Желто-оранжевая | 100 |
| Ксилоза | Серо-синяя | 100 |
| Фруктоза | Бордово-розовая | 10 |
| Арабиноза | Серо-зеленая | 100 |

* Дан порядок величины чувствительности реакции в μ г.

сахара также могут быть проявлены этим проявителем, но чувствительность реакции очень мала — порядка 500 γ .

В процессе хроматографирования фенол вымывает из бумаги какие-то окрашенные в желтый цвет продукты, которые образуют затеки. Особенно большие затеки образуются на бумаге «Синяя лента». В наших опытах, однако, эти затеки не мешали получению хорошей хроматограммы, так как все исследованные нами сахара имели коэффициенты движения R_F , не превышающие 0,6, и располагались на бумаге вне области затеков. Путем предварительного промывания бумаги фенолом можно получить достаточно чистую бумагу, на которой не будут образовываться темные затеки.

Значение коэффициентов движения R_F для некоторых сахаров приводится в табл. 2.

Необходимо отметить, что коэффициенты R_F несколько варьируют в зависимости от условий опыта: от состава подвижного растворителя, от направления движения растворителя и от аппаратуры. Так, например, добавка к фенолу аммиака приводит к увеличению значений R_F . При восходящем движении растворителя коэффициенты R_F несколько больше, чем при нисходящем движении. Из табл. 2 очевидна зависимость коэффициентов R_F от аппаратуры. Зависимость коэффициентов R_F от сорта бумаги, в пределах испытанных нами сортов бумаги, не была нами обнаружена.

После того как были определены коэффициенты R_F для индивидуальных сахаров, были проведены опыты по разделению искусственных смесей. Были получены четкие разделения следующих четырех компонентных смесей: раффиноза — лактоза — ксилоза — арабиноза; раффиноза — сахароза — манноза — арабиноза; раффиноза — глюкоза — ксилоза — арабиноза; раффиноза — глюкоза — ксилоза — фруктоза.

Разработанная нами методика получения бумажных хроматограмм была применена к анализу содержания сахаров в растениях. Хроматографировались спиртовые и водные вытяжки различных полевых культур (злаки, бобовые, масличные).

С помощью метода бумажной хроматографии можно определить не только качественный состав сахаров растений, но и дать приближенную их количественную оценку. Для этого на лист фильтровальной бумаги наносят в ряд, в порядке возрастания концентрации, отдельные сахара и затем получают хроматограммы.

Площадь пятна и интенсивность его окраски зависят от концентрации сахара в исходном растворе. Путем визуального сопоставления окраски и величин пятен «хроматографической шкалы» с анализируемой хроматограммой можно приближенно определить количество сахаров.

Методика исследования состава сахаров в вытяжках растений заключается в следующем.

Таблица 2

Коэффициенты R_F для сахаров* (Бумага «Лальская первый сорт», растворитель — насыщенный водой фенол)

| Сахар | Цилиндрич. сосуд, нисходящее движение | Большая камера | |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | | нисходящее движение | восходящее движение |
| Раффиноза | 0,18 | 0,24 | 0,29 |
| Мальтоза | 0,27 | 0,31 | 0,35 |
| Глюкоза | 0,24 | 0,32 | 0,37 |
| Лактоза | 0,25 | 0,32 | 0,34 |
| Сахароза | 0,28 | 0,35 | 0,36 |
| Галактоза | 0,28 | 0,38 | 0,39 |
| Манноза | 0,25 | 0,39 | 0,44 |
| Ксилоза | 0,30 | 0,39 | 0,43 |
| Фруктоза | 0,39 | 0,45 | 0,52 |
| Арабиноза | 0,38 | 0,52 | 0,54 |

* Относительная ошибка для значений R_F составляет в среднем $\pm 5\%$.

3—5 г свежего растительного материала после фиксации горячим паром растирается в фарфоровой чашке. Растертая масса переносится 15—20 мл теплой воды в колбочку на 25 мл и ставится на экстракцию на водяную баню при температуре 60—80° в течение 30 мин. Затем содержимое колбочки фильтруется через стеклянный фильтр № 4. Осадок на фильтре промывается 3—4 мл воды. Фильтрат и промывные воды собирают в мерную колбочку на 25 мл, и объем раствора доводится до 25 мл. 10 мл вытяжки выпаривается при 60° в фарфоровой чашке досуха. Остаток от выпаривания растворяется в 1 мл воды. На бумагу для хроматографирования наносится 0,01 мл такого концентрированного раствора.

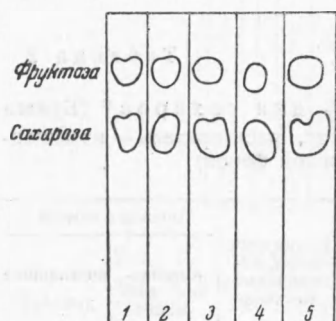


Рис. 3. Схемы бумажных хроматограмм водной вытяжки из листьев растений: 1—овес, 2—ячмень, 3—озимая пшеница, 4—яровая пшеница, 5—ветвистая пшеница. Бумага Лальская I сорт. Растворитель — фенол, проявитель резорциновый

Для получения более четкой хроматограммы 10 мл исходной водной вытяжки пропускались через колонки катионита и анионита для удаления солей и пигментов. Фильтрат и промывные воды также выпаривались досуха и остаток растворялся в 1 мл воды. Полученный концентрированный раствор хроматографировался.

В качестве примера приведем краткое описание хроматограмм сахаров одного из опытов с анализом водных вытяжек из убранных одновременно листьев ветвистой пшеницы (сорт Кахетинская).

Хроматограмма для 2-го листа: фруктоза и глюкоза < 0,5 мг/г сырого материала; сахароза ~ 2,5 мг/г сырого материала.

Хроматограмма для 3-го листа: фруктоза и глюкоза ~ 2,5 мг/г сырого материала; сахароза ~ 5 мг/г сырого материала.

Хроматограмма для 4-го листа: фруктоза и глюкоза ~ 2,5 мг/г сырого материала;

сахароза ~ 10 мг/г сырого материала.

Хроматограмма для 5-го листа: фруктоза и глюкоза ~ 0,5 мг/г сырого материала; сахароза ~ 5 мг/г сырого материала.

Характерной особенностью всех исследованных нами хроматограмм для злаков (пшеница, рожь, овес, ячмень) является появление на бумажной хроматограмме при проявлении ее резорцином «розовых хвостов», которые тянутся от места нанесения капли анализируемого раствора до места расположения сахарозы. Природа этих «розовых хвостов» исследуется.

Метод бумажной хроматографии является новым весьма тонким экспериментальным средством изучения углеводного обмена. Отечественные сорта фильтровальной бумаги вполне пригодны для получения бумажных хроматограмм сахаров.

В заключение выражаем благодарность И. И. Гунару за поддержку в данной работе.

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

Поступило
28 II 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ В. В. Рачинский, Усп. хим., 19, 445 (1950). ² Т. С. Пасхина, Усп. биол. хим., 1 (1950).