

УДК 547.458.7:543.544.42

*С.А. Медведева, Г.П. Александрова, А.П. Танцырев*

## ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ АРАБИНОГАЛАКТАНА

Показано, что арабиногалактан, выделенный из древесины лиственницы сибирской, способен в водной среде к образованию ассоциатов и возможно слабому проявлению полиэлектролитных свойств. Подобраны оптимальные концентрации комплексных систем элюентов, состоящих из фосфорной кислоты и бромистого лития, которые необходимо использовать для подавления полиэлектролитных эффектов и разрушения ассоциатов при определении молекулярной массы арабиногалактана.

арабиногалактан, гель-хроматография, молекулярные массы, полиэлектролитные эффекты.

Арабиногалактан – природный полисахарид растительного происхождения. В значительных количествах (10 ... 15 %) он содержится в древесине лиственницы, которая может служить источником его получения. Арабиногалактан (АГ) имеет очень хорошие перспективы применения, например, в качестве загустителя, стабилизатора, наполнителя, обволакивающего средства [2, 11]. Значительное влияние на качество этого полимера как товарного продукта (от клеящего вещества до медицинских препаратов) оказывает его молекулярная масса.

Основную макромолекулярную цепь АГ лиственницы составляет галактановый кор. Звенья галактозы связаны  $\beta(1-3)$ -связями, а боковые звенья, состоящие из галактозы, арабинозы и небольшого количества глюкуроновой кислоты, –  $\beta(1-6)$ - и  $\beta(1-3)$ -связями [1, 3]. Макромолекула АГ содержит гидроксильные, альдегидные группы, может содержать карбоксильные группы, т.е. она полифункциональна и способна проявлять полиэлектролитные свойства.

Для определения молекулярной массы АГ используют методы светорассеяния, ультрацентрифугирования и, чаще всего, гель-хроматографии. Молекулярная масса АГ, выделенного из различных источников, варьируется в больших пределах (10 ... 2000 кД) [14]. Причиной этого может быть биохимическая специфика источника, из которого выделен АГ. Однако анализ литературных данных свидетельствует о том, что численные значения молекулярных масс одного и того же образца, определенные различными методами, оказываются различными. Так, методом светорассеяния для АГ, выделенного из *Larix occidentalis*, была определена молекулярная масса 40 кД, методом гель-хроматографии – 19 кД [13]. Это вполне оправдано, поскольку гель-хроматография основана на разделении полимеров в соответствии с размерами и формой их молекул, а светорассеяние – на определении интенсивности рассеянного света от угла падающего светового пото-

ка, которая зависит от линейных размеров полимеров цепи, т.е. в основу этих методов заложены разные свойства макромолекулы АГ. Однако и одним методом, например методом гель-хроматографии, для АГ, выделенного из лиственницы сибирской (*Larix sibirica*), различными исследователями определена масса и в 40 кД [1], и в 18 ... 22 кД [15].

Подобные противоречивые сведения о молекулярной массе АГ послужили причиной настоящего исследования. Для исследования выбран метод гель-хроматографии как наиболее простой и широко используемый. Цель работы – изучить влияние состава элюента на хроматографическое поведение и наблюдаемую молекулярную массу АГ.

АГ выделяли из древесины лиственницы сибирской экстракцией водой. Частично упаренный водный экстракт для очистки АГ дважды пересаждали в этиловый спирт.

В качестве сорбента был выбран сефадекс G-100, так как сорбенты этого типа показали свое преимущество при гель-хроматографии в режиме свободного протекания [5, 9]. Хроматографирование проводили в стеклянной колонке (600 × 10 мм), заполненной сефадексом G-100 на высоту 350 мм; элюенты – дистиллированная вода, водные растворы NaCl (0,3 %), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,018 ... 0,064 М), LiBr (0,018 ... 0,064 М).

Навеску образца АГ (10 мг) растворяли в 2 мл элюента, выдерживали в течение 1 ч при температуре 22 °С; 0,2 мл раствора вносили в колонку. Элюирование осуществляли в изократическом режиме со скоростью 0,1 мл/мин в условиях свободного протекания при температуре 22 °С. Объем пробы на анализ 1 мл. Углеводы в пробах определяли фенол-серноокислотным методом по Дюбуа [12].

Колонку калибровали с помощью декстранов, имеющих узкое распределение молекулярных масс (2 млн, 80 тыс., 40 тыс., 20 тыс.), и галактозы. Свободный объем колонки  $V_0 = 16$  мл. Гель-хроматограммы нормировали для исключения влияния концентрации образца на их вид. Молекулярные массы рассчитывали по уравнению Мура

$$\lg M_x = f(V_x),$$

где  $V_x$  – объем выхода соответствующей фракции.

При гель-проникающей жидкостной хроматографии экспериментально определяемой величиной является объем выхода соответствующей фракции. Для электронейтральных полимеров он зависит от молекулярной массы макромолекулы и не зависит от полярности и ионной силы элюента. В случае полиэлектролитов большое влияние на форму гель-хроматограммы оказывают полиэлектролитные эффекты, обусловленные электростатическим взаимодействием ионогенных групп, расположенных на макроионе полимера и матрице сорбента (эксклюзионный эффект), ионогенных групп, расположенных на макроионе полимера (полиэлектролитное набухание), наличием ионогенных групп, способных к диссоциации (ионная инклюзия). Эти эффекты приводят к тому, что фракционирование полимера на сорбенте

зависит не только от величины частиц, т.е. от молекулярной массы, но и от наличия в нем функциональных групп [5, 8]. Изучению полиэлектролитных эффектов и условиям их подавления уделено достаточно большое внимание. Так, в большой серии работ [8–10] при исследовании лигнинов и лигноуглеводных комплексов было показано, что введение в элюент соли экранирует взаимодействие ионогенных групп макроиона полимера и матрицы сорбента. Добавление кислоты подавляет диссоциацию ионогенных групп. Для подавления адсорбции полимеров на сорбенте используют метиловый спирт, тетрагидрофуран. Количество же электролитов, вводимое в элюент, должно быть индивидуальным для различных полимеров и зависеть от его полифункциональности.

При гель-хроматографии эффекты, подобные полиэлектролитным, могут наблюдаться в случае проявления макромолекулами полимера межмолекулярных взаимодействий, сопровождающихся образованием надмолекулярных структур – сольватных комплексов и ассоциатов, размеры которых могут варьироваться в зависимости от состава элюента [4]. Для кислых АГ отмечена большая склонность к образованию высокомолекулярных агрегатов и способность удерживать большое количество молекул воды [7].

Выделенный нами из древесины лиственницы сибирской АГ по данным функционального анализа,  $^{13}\text{C}$  ЯМР и ИК спектроскопии не содержит карбоксильных групп, но имеет две-три незамещенные гидроксильные группы в расчете на одно углеводное кольцо и 0,4 ... 0,8 % альдегидных групп. Исходя из этих данных, можно ожидать, что макромолекула АГ, прежде всего, будет проявлять способность к образованию ассоциатов за счет межмолекулярного взаимодействия, которое ей обеспечат гидроксильные и альдегидные группы. Эти же функциональные группы могут участвовать и во внутримолекулярном взаимодействии, и во взаимодействии с сорбентом, что способствует проявлению полиэлектролитных свойств АГ. Очевидно, что в условиях гель-хроматографии будет наблюдаться совместное действие этих эффектов. Из этого следует, что при определении молекулярной массы АГ методом гель-хроматографии необходимо знать условия подавления эффектов, способных влиять на ее расчетную величину.

Хроматографическая кривая АГ, полученная при использовании в качестве элюента воды (рис. 1), имеет мономодальный профиль, что свидетельствует об однородной функционализации макромолекул АГ, совпадение же объема выхода АГ ( $V_x$ ) с  $V_0$  (исключенный объем колонки) – о проявлении полиэлектролитных эффектов [8] и (или) возможном образовании ассоциатов. Подтверждением полиэлектролитных свойств АГ могла бы быть наблюдаемая нами

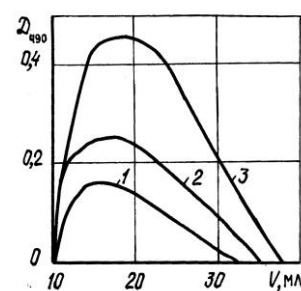


Рис. 1. Совмещенные гель-хроматограммы водных растворов АГ разных концентраций: 1 – 5, 2 – 10, 3 – 20 мг/мл ( $D_{490}$  – оптическая плотность,  $V$  – объем элюента)

аномальная зависимость формы гель-хроматограммы и удерживаемого объема от концентрации АГ (рис. 1): с увеличением концентрации АГ гель-хроматограмма сдвигается в область более низких молекулярных масс [6, 9]. Однако выявить полиэлектролитные свойства АГ в разбавленных растворах (концентрация АГ < 1 %), определяя их вязкость, не удалось. Зависимость приведенной вязкости растворов от концентрации АГ имеет выраженный экспоненциальный, а не экстремальный характер (рис. 2, а). При более же высоких концентрациях АГ (рис. 2, б) эта зависимость проходит через минимум, свидетельствуя о межмолекулярных взаимодействиях в данной системе [4]. Отсюда следует, что АГ способен скорее участвовать в образовании межмолекулярных ассоциатов, чем проявлять полиэлектролитные свойства. Однако исключить полностью полиэлектролитные свойства АГ нельзя.

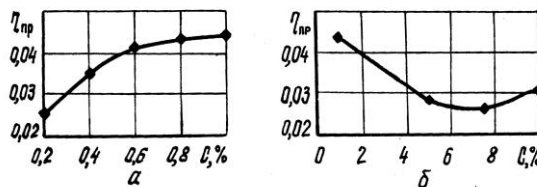


Рис. 2. Зависимость приведенной вязкости  $\eta_{пр}$  водных растворов АГ от их концентрации  $C$ :  
а – 0,2...1,0 %; б – 0...10 %

В качестве элюентов для гель-хроматографии арабиногалактана были выбраны водные растворы электролитов, хорошо себя зарекомендовавшие при исследовании лигноуглеводных комплексов [9], которые, как мы полагали, способны не только погашать полиэлектролитные эффекты, но и разрушать межмолекулярные ассоциаты.

Введение в элюент  $H_3PO_4$  приводит к изменению положения хроматографической кривой АГ, которая сдвигается в область меньших молекулярных масс, т.е.  $V_x$  становится больше (рис. 3, а). Для стабильного эффекта достаточно 0,036 М  $H_3PO_4$ . Однако хроматографическая кривая остается асимметричной: с вытянутым передним фронтом и резко падающим задним фронтом, что может являться признаком проявления ионной эксклюзии [9]. Наибольший эффект достигается введением в элюент LiBr (рис. 3, б),

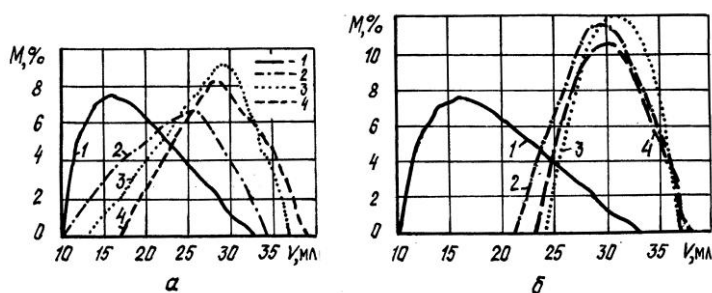
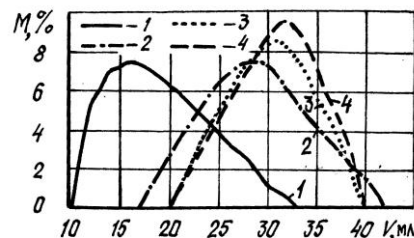


Рис. 3. Нормированные гель-хроматограммы АГ, полученные при различной концентрации в элюенте  $H_3PO_4$  (а) и LiBr (б): 1 – 0; 2 – 0,018; 3 – 0,036; 4 – 0,054 М (М – массовая доля фракции)

Рис. 4. Нормативные гель-хроматограммы АГ, полученные при совместном присутствии в элюенте  $H_3PO_4$  и LiBr различных концентраций: 1 – 0; 2 – 0,018 М  $H_3PO_4$  + 0,018 М LiBr; 3 – 0,036 М  $H_3PO_4$  + 0,036 М LiBr; 4 – 0,054 М  $H_3PO_4$  + 0,054 М LiBr



который экранирует взаимодействие ионогенных групп на макроионе и матрице сорбента и разрушает ассоциаты: происходит значительное изменение  $V_x$  и хроматографическая кривая приобретает форму гауссовой кривой. При концентрациях LiBr более 0,036 М изменения характера хроматографической кривой уже не происходит.

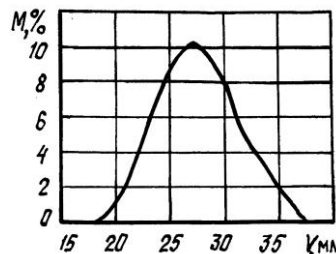
Опираясь на то, что сочетание добавок LiBr и  $H_3PO_4$  позволяет создать слабую буферную систему, которая подавляет полиэлектролитные эффекты в более широком диапазоне концентраций анализируемых веществ [9], было исследовано поведение АГ в условиях хроматографирования с использованием различного сочетания добавок (рис. 4). Применение электролитов ( $H_3PO_4$  и LiBr) концентрацией 0,036 М оказалось достаточным для стабильного подавления полиэлектролитных эффектов и межмолекулярного взаимодействия. Для этих условий хроматографирования было получено уравнение Мура:  $\lg M_x = 6,5 - 0,084 V_x$  и по нему рассчитаны среднемассовая  $M_w$  и среднечисловая  $M_n$  молекулярные массы АГ, которые сравнивали с молекулярными массами того же АГ, рассчитанными из гель-хроматограмм, когда в качестве элюентов была использована вода и 0,3 %-й водный раствор NaCl (см. таблицу). Раствор NaCl был выбран на основании исследования ряда авторов [1, 2, 5].

Анализ полученных результатов показывает, что воду нельзя использовать в качестве элюента при хроматографировании АГ, так как при этом проявляются полиэлектролитные эффекты и реализуется межмолекулярное взаимодействие, в результате чего получаются завышенные значения молекулярных масс. Водный 0,3 %-й раствор NaCl значительно, но не полностью, подавляет эти эффекты (рис. 5). Молекулярные массы АГ в этом случае достаточно близки, но не одинаковы с полученными в нашем эксперименте. Наилучший результат достигается при использовании комплекса электролитных добавок.

#### Зависимость молекулярных масс арабиногалактана от состава элюента

Элюент	$M_w$	$M_n$
Вода	32 100	16 030
Раствор NaCl (0,3 %)	14 130	7 790
Раствор с электролитными добавками (0,036 М LiBr + 0,036 М $H_3PO_4$ )	12 900	7 630

Рис. 5. Нормированная гель-хроматограмма АГ, полученная при использовании в качестве элюента 0,3 %-го раствора NaCl



Таким образом, показано, что в воде АГ способен к межмолекулярному взаимодействию и возможно проявляет полиэлектролитные свойства, за счет чего определяемые методом гель-хроматографии молекулярные массы имеют завышенные значения. Определение молекулярной массы АГ необходимо проводить в условиях деструкции ассоциатов и подавления полиэлектролитных эффектов с помощью использования комплексных систем элюентов, состоящих, в частности, из фосфорной кислоты и бромистого лития, для которых подобраны оптимальные концентрации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонова Г.Ф. Исследование фракционного состава полисахарида арабиногалактана древесины лиственницы сибирской // Химия древесины. – 1997. – № 4. – С. 97–100.
2. Антонова Г.Ф., Тюкавкина Н.А. Водорастворимые вещества лиственницы и возможности их использования // Химия древесины. – 1983. – № 2. – С. 89–96.
3. Антонова Г.Ф., Усов А.И. Структура арабиногалактана древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) // Бионеорганическая химия. – 1984. – Т. 10, 12. – С. 1664–1669.
4. Бартнев Г.М., Френкель С.Я. Физика полимеров. – Л.: Химия, 1990. – 430 с.
5. Детерман Г. Гель-хроматография. – М.: Мир, 1970. – 252 с.
6. Нефедов П.П., Лавренко П.Н. Транспортные методы в аналитической химии полимеров. – Л.: Химия, 1979. – 232 с.
7. Оводов Ю.С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 7. – С. 483–501.
8. Полиэлектролитные эффекты в эксклюзионной хроматографии лигнинов, лигноуглеводных комплексов и полисахаридов / П.П. Нефедов, А.Е. Русаков, М.А. Иванов и др. // Химия древесины. – 1979. – № 6. – С. 108–109.
9. Полиэлектролитные эффекты в эксклюзионной хроматографии лигнинов, лигноуглеводных комплексов и полисахаридов. 1. Влияние полиэлектролитной природы лигнинов и лигноуглеводных комплексов на их элюионное поведение при эксклюзионной жидкостной хроматографии в N,N-диметилформамиде / П.П. Нефедов, А.Е. Русаков, М.А. Иванов и др. // Химия древесины. – 1981. – № 4. – С. 66–72.
10. Полиэлектролитные эффекты в эксклюзионной хроматографии лигнинов, лигноуглеводных комплексов и полисахаридов. 2. Эксклюзионная жидкостная хроматография лигнинов и лигноуглеводных комплексов в N,N-диметилформамиде

и диметилсульфоксиде / П.П. Нефедов, А.Е. Русаков, М.А. Иванов и др. // Химия древесины. – 1982. – № 5. – С. 89–95.

11. Arabinogalactan for hepatic drug deliver / L. Josephon, E.V. Groman, C. Jung, P.M. Enriquez // *Bioconjugate Chem.* – Vol 5, N 6. – P. 547–556.

12. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton et al. // *Analyt. Chem.* – 1956. – Vol. 28, N 3. – P. 350–356.

13. *Nazareth M.R., Kennedy C.E., Bhatia V.N.* Studies on arabinogalactan // *J. Pharmac. Sci.* – 1961. – Vol. 50, N 7. – P. 546–547.

14. Pat. 5478576. US. Arabinogalactan derivatives and uses thereof / L. Josephon, P.M. Enriquez, C. Jung et al. – 1995.

15. *Willfor S., Sjöholm R., Holmbom B.* Isolation and characterization of water-soluble arabinogalactans from the heartwood of Norway spruce and scots pine // 10<sup>th</sup> International Symposium on Wood Pulp Chemistry. – Yokohama, Japan, 1999. – Vol. 2. – P. 32–34.

Иркутский институт химии  
СО РАН

Поступила 5.09.01

*S.A. Medvedeva, G.P. Alexandrova, A.P. Tantsyrev*

### **Gel-penetrating Chromatography of Arabinogalactan**

Arabinogalactan isolated from Siberian larch wood is shown to be capable of intermolecular interaction and acting as low polyelectrolyte in aqueous solution. The optimal concentrations of eluent complex systems consisting of phosphoric acid and lithium bromide have been selected. These systems are to be used for reducing polyelectrolytic effects and breaking associates when determining molecular mass of arabinogalactan.

---