

В. А. МАЛЯВКО, В. М. РЕЗНИКОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ В ДРЕВЕСНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ ХРОМАТОГРАФИЕЙ В ТОНКОМ СЛОЕ

До недавнего времени разделение смеси сахаров проводилось с помощью либо бумажной хроматографии, либо колоночной хроматографии на угле или целлюлозе. За последние годы появился ряд работ, посвященных разделению углеводов методом тонкослойной хроматографии.

В качестве сорбентов применяются самые различные вещества: силикагель, кизельгур, целлюлоза, другие модифицированные слои [1—6]. Качественное и количественное определение сахаров в тонком слое обычно осуществляется без превращения их в производные. Для качественного определения на хроматограмме сахаров используются реактивы, дающие с ними окрашенные пятна. Количественное определение основано на их специфических реакциях или на способности сахаров к окислению.

Наиболее часто в качестве проявителей для моносахаров применяются азотнокислое серебро, кислый фталат анилина и анилиндифениламинный реактив. Лучшим из данных реактивов для проявления альдоз является кислый фталат анилина, позволяющий отличать на хроматограмме пятна альдопентоз от альдогексоз (пятна соответственно красного и коричневого цвета).

Количественное определение сахаров можно проводить непосредственно на хроматографической пластинке или после элюирования. Первый метод недостаточно точен и требует тщательной стандартизации условий хроматографии.

В настоящее время чаще всего для количественного определения сахаров используют колориметрические и титриметрические методы. При помощи колориметрических методов можно определять микрограммовые количества сахаров, и это позволяет использовать их для анализа сахаров в растворе после элюирования последних с хроматограммы.

Целью настоящей работы является разработка достаточно точного и быстрого метода определения сахаров в гидролизатах древесины с использованием хроматографии в тонком слое.

В качестве сорбента для приготовления тонкого слоя использовался гипс. Пригодный для хроматографии гипс получается при обработке хлористого кальция (раствора) эквимолекулярным количеством серной кислоты при температуре 80—90°C [7]. Выпавший осадок отфильтровывается и промывается дистиллированной водой до нейтральной реакции по универсальному индикатору. Промытый гипс сушится в сушильном шкафу в течение 48 ч при температуре 110—115°C.

Роль подложки для нанесения тонкого слоя гипса выполняли стеклянные пластинки 5×15 см.

Для приготовления хроматографической пластинки с тонким слоем гипса последний растирается в ступке с дистиллированной водой в соотношении 1:2 по весу до получения однородной массы. Полученная масса выливается на пластинку и разравнивается валиком с утолщением на краях по 0,5 мм. Приготовленная пластинка с тонким слоем гипса сушится на воздухе в течение 20—24 ч, после чего она готова к употреблению.

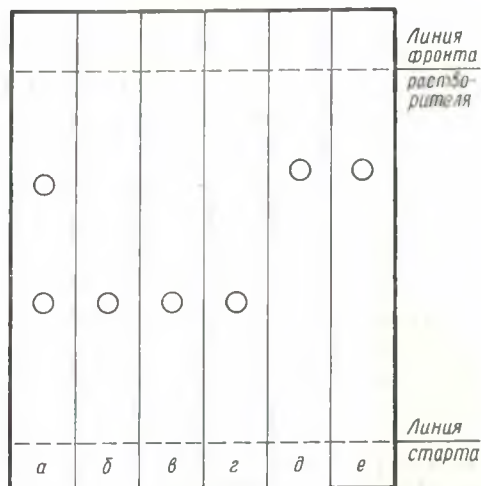


Рис. 1. Схема хроматограммы пентоз и гексоз:
а — модельная смесь; свидетели: *б* — глюкоза; *в* — галактоза; *г* — манноза, *д* — арабиноза; *е* — ксилоза

В модельных экспериментах использовалась смесь пяти моносахаридов: арабинозы, ксилозы (пентозы), галактозы, глюкозы, маннозы (гексозы). Концентрация каждого сахара в смеси составляла 5 мг/мл. В качестве свидетелей применялись растворы сахаров с концентрацией 5 мг/мл.

Растворы сахаров наносились на хроматограмму микропипеткой, снабженной микровинтом. Диаметр пятна на старте не должен быть больше 0,7 см.

Хроматография осуществлялась в хроматографической камере в системе растворителей метанол—хлороформ в соотношении 3:19. После того как фронт растворителя пройдет 10—12 см, хроматографирование прекращалось.

Полученная хроматограмма проявлялась анилинфталатным реактивом (АФР) [8]. Для проявления она опрыскивалась АФР и помещалась на 5—7 мин при 105—110°C в сушильный шкаф. Пентозы проявились в виде пятна красного цвета, гексозы — коричневого. Схема хроматограммы модельной смеси пяти сахаров приведена на рис. 1.

Для количественного определения сахаров используются проявленные хроматограммы. Участок слоя гипса, соответствующий пятну, снимают и помещают в центрифужную пробирку, добавляют 0,5 мл анилинфталатного реактива и ставят на 1 ч в сушильный шкаф при 105—110°C. После этого пробирку охлаждают, растирают кусочки гипса и приливают 4 мл смеси ацетона и концентрированной HCl (100:4). Содержимое пробирки для экстракции окрашенного вещества тщательно переме-

шивают и затем центрифугируют. Прозрачный окрашенный раствор колориметрируют.

Пентозы с анилифталатным реактивом дают красную окраску (максимум поглощения 360 мкм), гексозы — коричневую (максимум поглощения 390 мкм). Оптическая плотность этих растворов изменяется в соответствии с законом Бера в области 0—0,15 мг. После определения оптической плотности раствора по предварительно построенному калибровочному графику определяется количественное содержание сахара в растворе.

Калибровочные графики строились для сахаров в области 0—0,15 мг. Как оказалось, калибровочные кривые для пентоз (арабиноза и ксилоза) совпадают ($\lambda=360$ мкм). Так же совпадают калибровочные кривые и для гексоз ($\lambda=390$ мкм). Это позволяет после хроматографического разделения определять суммарное количество пентоз и гексоз.

Были исследованы две модельные смеси — арабиноза с маннозой и ксилоза с глюкозой с концентрацией каждого сахара 5 мг/мл. Хроматография и количественное определение проводилось описанным выше способом. Полученные данные представлены в табл. 1, 2.

Таблица 1

Определение количества арабинозы (в числителе) и маннозы (в знаменателе) в модельной смеси арабиноза — манноза

Нанесено, мг	Определено, мг	Ошибка определения, %
0,05	0,054	+8,0
0,04	0,041	+2,0
0,075	0,078	+4,0
0,07	0,074	+5,0
0,1	0,108	+8,0
0,08	0,085	+6,0
0,04	0,036	-9,0
0,05	0,054	+8,0
0,05	0,054	+8,0
0,095	0,097	+2,0
0,08	0,076	-5,0
0,050	0,047	-6,0
0,04	0,04	0,0
0,07	0,078	+4,0
0,04	0,04	0,0
0,05	0,047	-6,0
0,07	0,071	+1,0
0,075	0,08	+6,0
0,08	0,076	-5,0
0,1	0,094	-4,0

Наряду с этим был проведен количественный анализ модельной смеси арабиноза — ксилоза — глюкоза — манноза с концентрацией каждого сахара в растворе 2,5 мг/мл. Результаты количественного определения пентоз и гексоз при их совместном присутствии представлены в табл. 3 и 4.

Статистической обработкой большого числа определений была найдена средняя квадратическая относительная ошибка опыта $\sigma = \pm 4\%$. Если относительную ошибку анализа принять равной 3σ , то, согласно таблиц Стюдента, единичное определение сахаров с точностью $\pm 12\%$ производится с доверительной вероятностью 99,7%. При проведении ря-

да параллельных определений относительная ошибка анализа не будет выходить из значения $\sigma = \pm 4\%$ [9].

Количественный анализ модельных растворов сахаров показал достаточно высокую точность их определения при совместном присутствии. Это дает возможность определять суммарно пентозы и суммарно гексозы в древесных гидролизатах методом хроматографии в тонком слое гипса.

Таблица 2

Определение количества ксилозы (в числителе) и глюкозы (в знаменателе) в модельной смеси ксилоза — глюкоза

Нанесено, мг	Определено, мг	Ошибка определения, %
0,07	0,067	— 5,0
0,08	0,079	— 2,0
0,05	0,045	—10,0
0,05	0,052	+ 4,0
0,04	0,038	— 5,0
0,04	0,037	— 8,0
0,04	0,036	—10,0
0,15	0,145	— 4,0
0,07	0,071	+ 1,0
0,08	0,079	— 2,0
0,05	0,054	+ 8,0
0,04	0,038	— 5,0
0,05	0,054	+ 8,0
0,1	0,104	+ 4,0
0,05	0,051	+ 2,0
0,05	0,05	0,0
0,075	0,0725	— 4,0
0,05	0,0505	+ 1,0
0,04	0,043	+ 7,0
0,04	0,041	+ 2,0

Гидролизат перед нанесением на хроматограмму фильтруют для удаления механических примесей. Нанесение точного объема гидролизата производят микропипеткой на 0,1 мл с делениями через 0,001 мл; 0,04—0,08 мл гидролизата наносится в виде пятна диаметром не более 0,7 см. Пятно подсушивают 15—20 мин на воздухе. Хроматографирование проводят в камере в системе растворителей метанол — хлороформ (3:19). После того как фронт растворителей пройдет 10—12 см от старта, хроматографирование прекращают. После проявления хроматограммы обнаруживаются два пятна красного и коричневого цвета с $R_f = 0,75$ и 0,45 (соответственно пентозы и гексозы). Количественное определение пентоз и гексоз производят описанным выше способом. Количество сахара (пентоз или гексоз) определяется по калибровочному графику. Процентное содержание сахара в гидролизате рассчитывается по формуле

$$\frac{a}{V \cdot 10},$$

где a — количество сахара, определенное по калибровочному графику и соответствующее данной оптической плотности, мг; V — объем гидролизата, нанесенный на хроматограмму, мл.

В табл. 3 дан анализ одного из образцов гидролизата Бобруйского гидролизного завода.

Статистическая обработка результатов эксперимента показывает, что средние квадратичные отклонения от среднего значения составляют для пентоз $\pm 0,03\%$, а для гексоз $\pm 0,04\%$.

Таблица 3

Раздельное определение пентоз (суммарно)
и гексоз (суммарно) в гидролизате
Бобруйского гидролизного завода

Пентозы, %	Гексозы, %
0,75	2,12
0,76	2,2
0,83	2,2
0,80	2,16
0,82	2,22
0,78	2,24
Среднее 0,79	2,19

Во втором эксперименте в тот же гидролизат было дополнительно внесено по 0,5% глюкозы и ксилозы и проведен его анализ (см. табл. 4).

Таблица 4

Раздельное определение пентоз и гексоз в гидролизате Бобруйского гидролизного завода
с доставкой 0,5% пентоз и гексоз

Среднее содержание, %		Добавлено пентоз и гексоз, %	Пентозы, %		Гексозы, %		Относительная ошибка, %	
пентоз	гексоз		найдено	рассчитано	найдено	рассчитано	пентоз	гексоз
0,79	2,19	0,5	1,24	1,29	2,55	2,69	-3	-5
0,79	2,19	0,5	1,19	1,29	2,60	2,69	-7	-3
0,79	2,19	0,5	1,32	1,29	2,66	2,69	+2	-1
0,79	2,19	0,5	1,26	1,29	2,68	2,69	-2	-0,4

Определение пентоз и гексоз в гидролизате осуществляется с высокой точностью, и этот метод может быть применен для анализа их в гидролизатах. В случае большого содержания сахаров в гидролизате (более 3%) последний следует разбавлять.

Следует подчеркнуть, что определение сахаров в гидролизатах методом тонкослойной хроматографии отличается простотой, хорошей воспроизводимостью результатов и требует всего около 2 ч для выполнения анализа. Все это выгодно отличает разработанный метод анализа от обычно используемой бумажной хроматографии и позволяет рекомендовать его для использования в заводских лабораториях.

Выводы

1. Разработан метод хроматографического разделения пентоз и гексоз в тонком слое гипса.

2. Разработан качественный и количественный методы суммарного определения пентоз и суммарного определения гексоз в древесных гидролизатах.

Л и т е р а т у р а

- [1] *F. Stahl, U. Kaltenbach*. *J. Chromatogr.*, 3, 351 (1961). [2] *G. Pastyska*. *Z. Anal. Chem.*, 179, 427 (1961). [3] *Л. Бергельсон и др.* ДАН СССР, 149, 1319 (1963). [4] *P. G. Pifferi*. *Analyt. Chem.*, 37, 7, 925 (1968). [5] *S. Vaar*. *J. Chromatogr.*, 22, 2, 474 (1966). [6] *I. O. Deferrari, R. Muchnik*. *J. Chromatogr.*, 9, 283 (1962). [7] *Лабораторная техника органической химии*. М., 1966. [8] *Хроматография на бумаге*. М., 1962. [9] *Г. А. Лайтинен*. *Химический анализ*. М., 1966.