

В. А. ДЕРЕВИЦКАЯ, Н. П. АРБАТСКИЙ,
член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ СЛОЖНЫХ СМЕСЕЙ ОЛИГОСАХАРИДОВ

Известно, что выделение в индивидуальном состоянии сложных и часто близких по строению олигосахаридных фрагментов из смеси продуктов частичной деградации углеводсодержащих биополимеров является очень трудной задачей. Эта проблема, как правило, успешно разрешимая в случае ди-тетрасахаридов, значительно усложняется при работе с высшими олигосахаридами (ОС), включающими 5—10 моносахаридных остатков. Обычно применяемые методы разделения и очистки таких ОС — гельфильтрация, хроматография на угле и бумаге не всегда приводят к желаемому

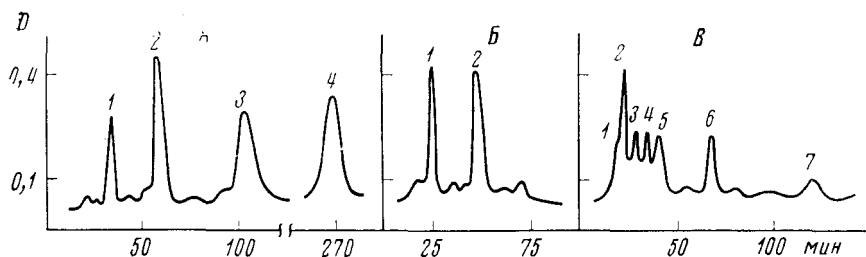


Рис. 1. Аналитическая хроматография фракций ОС-10 (А), ОС-11 (Б) и ОС-15 (В) на колонке 0,6×30 см с анионитом ДА×4. Скорость 0,5 М боратного буфера рН 8,5 — 40 мл/час, скорость проявляющего реагента (0,1% орцин в 85%-ной H_2SO_4) — 100 мл/час

результату и очень трудоемки. Недостаточно эффективным является и электрофорез боратных комплексов ОС. Ионообменная хроматография углеводов в боратном буфере применяется, в основном, для аналитических целей — количественного определения моносахаридов и некоторых дисахаридов.

В данной работе впервые использована анионообменная хроматография для препаративного выделения высших ОС из сложной смеси, образующейся при деградации группового вещества крови Н (ГВК Н).

Как нами показано ранее ⁽¹⁾ деградация ГВК Н в щелочном растворе $NaBH_4$ ⁽²⁾ приводит к большому набору ОС с 2-ацетамидо-2-дезоксидульцитом на восстанавливающем конце. Полученная смесь ОС была разделена гельфильтрацией на биогелях Р-2 и Р-4 и препаративной хроматографией на бумаге на ряд сложных по составу фракций ⁽¹⁾. Фракции ОС с наиболее высоким молекулярным весом (фракции 10—16), полученные при хроматографии на бумаге, исследовались далее с помощью аналитической анионообменной хроматографии на анионите ДА×4 (фирма Durrum, США) в 0,5 М боратном буфере рН 8,5 с использованием агрегатного жидкостного хроматографа (АЖХ) типа 71 100 А (ЧССР). Аналитическая хроматография фракций 10 и 11 показала, что они являются смесями соответственно четырех и двух ОС, при этом компоненты смесей хорошо отделяются друг от друга (рис. 1А, В). Фракции 12—16 оказались сложными смесями ОС, причем наиболее сложную смесь представляла собой

фракция 15 (рис. 1В), включающая компоненты с очень близкой подвижностью. Фракции 10, 11 и 15, представляющие для дальнейшей работы наибольший интерес, использовались далее для препаративного разделения.

Препаративная хроматография проводилась на колонке 60×0,8 см со скоростью боратного буфера (0,5 М, рН 8,5) 100 мл/час, при этом время выхода компонентов смеси оставалось практически таким же, как при аналитической хроматографии. На колонку наносили, в зависимости от сложности смеси, 10–30 мг фракций ОС и собирали фракции по 4 мл. Наличие в хроматографе двух каналов позволяет работать одновременно на двух колонках — препаративной и аналитической, параллельно разделяя смесь ОС и анализируя фракции. Препаративная хроматография фракций 10 и 11 не вызвала затруднений и после деионизации дауэксом 50 (H⁺-форма) и последующего упаривания элюата с метанолом были получены олигосахариды ОС-10-1, ОС-10-2, ОС-10-3, ОС-10-4, ОС-11-1 и ОС-11-2 (см. табл. 1). При хроматографии фракции 15 компоненты 1–5 (рис. 1В) разделялись не полностью и получалось большое число смешанных фракций. В этом случае фракции, содержащие компоненты с близкими временами удерживания, объединяли, деионизовали и повторно хроматографировали в 0,2 М боратном буфере, рН 8,5. На рис. 2 в качестве примера представлена выходная кривая повторной хроматографии фракций, содержащих компоненты 1 и 2 (рис. 1В). Таким образом, в результате разделения фракции 15 выделены еще семь хроматографически однородных ОС (см. табл. 1).

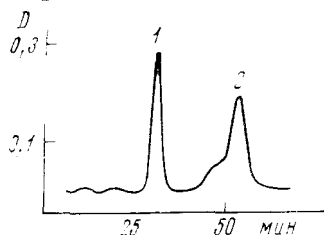


Рис. 2. Повторная аналитическая хроматография фракций, содержащих компоненты 1 и 2 (см. рис. 1В) в 0,2 М боратном буфере рН 8,5. Условия — см. подпись к рис. 1

15 компоненты 1–5 (рис. 1В) разделялись не полностью и получалось большое число смешанных фракций. В этом случае фракции, содержащие компоненты с близкими временами удерживания, объединяли, деионизовали и повторно хроматографировали в 0,2 М боратном буфере, рН 8,5. На рис. 2 в качестве примера представлена выходная кривая повторной хроматографии фракций, содержащих компоненты 1 и 2 (рис. 1В). Таким образом, в результате разделения фракции 15 выделены еще семь хроматографически однородных ОС (см. табл. 1).

Таблица 1

Времена выхода при хроматографии и состав ОС

Шифр ОС	Время выхода, мин. (молярность буфера)	Выход моносахаридов в $\mu\text{мол/мг}$ (соотношение моносахаридов)			
		2-амино-2-дезоксидульцит	гликозамин	галактоза	фукоза
ОС-10-1	35(0,5), 45(0,4)	0,89(1,0)	1,48(1,7)	1,81(2,0)	0
ОС-10-2	58(0,5)	0,92(1,0)	1,39(1,5)	1,42(1,5)	0,73(0,8)
ОС-10-3	105(0,5)	0,84(1,0)	0,86(1,0)	2,03(2,4)	0,92(1,1)
ОС-10-4	276(0,5)	0,98(1,0)	1,07(1,1)	2,24(2,3)	2,10(2,1)
ОС-11-1	26(0,5), 57(0,2)	0,86(1,0)	1,69(2,0)	1,27(1,5)	0
ОС-11-2	48(0,5)	0,59(1,0)	1,24(2,1)	1,37(2,3)	0,69(1,2)
ОС-15-1	21(0,5), 37(0,2)	0,64(1,0)	1,45(2,3)	1,25(2,0)	0
ОС-15-2	24(0,5), 56(0,2)	0,45(1,0)	1,00(2,2)	0,88(2,0)	0
ОС-15-3	27(0,5), 48(0,3)	0,55(1,0)	1,52(2,8)	1,48(2,7)	0
ОС-15-4	34(0,5), 46(0,4)	0,68(1,0)	1,51(2,2)	1,62(2,4)	0,52(0,8)
ОС-15-5	40(0,5), 71(0,4)	0,47(1,0)	1,56(3,3)	1,86(4,0)	0,62(1,3)
ОС-15-6	65(0,5)	0,48(1,0)	1,01(2,1)	1,76(3,7)	0,53(1,1)
ОС-15-7	120(0,5)	0,39(1,0)	0,81(2,1)	1,38(3,5)	0,78(2,0)

Как известно, окончательное суждение об индивидуальности сложного по составу и строению высшего олигосахарида можно вынести лишь после полного установления его структуры. Однако достаточно надежной характеристикой степени гомогенности ОС является и соотношение входящих в их состав моносахаридов. Определение такого соотношения для ОС столь сложного состава, как ОС ГВК представляет собой трудную задачу, вследствие большого различия в устойчивости фукозидной, галактозидной и глюкозаминидной связей, а также различия в степени деградации моносахаридов в ходе гидролиза.

Количественный анализ моносахаридов, входящих в состав выделенных ОС, проводился с помощью анализатора аминокислот (ААК) типа 6020 А (ЧССР) и АЖХ. 0,6 мг каждого ОС гидролизovali 0,6 мл 4н F_2CSOON 14 час. при 100° , после упаривания гидролизат растворяли в 0,6 мл воды и в одной аликвоте (0,2 мл) определяли содержание аминокислота и аминосахара (ААК), а в другой — галактозы и фукозы (АЖХ). Контрольный опыт обработки эквимольной смеси 2-ацетамидо-2-дезоксидульцита, N-ацетилглюкозамина, галактозы и фукозы показал, что аминокислота и аминополлиол разрушаются менее чем на 10%, потери галактозы и фукозы составляют при этом ~20%. Это было учтено в соответствующих расчетах. Кроме того, при гидролизе в принятых условиях ОС, в гидролизате остается около 10% дисахарида галактозил (1→3) 2-амино-2-дезоксидульцита, высокая устойчивость которого к гидролизу отмечалась нами ранее⁽³⁾. Поскольку оказалось, что этот дисахарид входит в состав всех выделенных ОС, этот факт также учитывался при расчете количества галактозы и 2-амино-2-дезоксидульцита.

Как видно из данных табл. 1, соотношение моносахаридов для многих выделенных ОС позволяет считать их индивидуальными веществами, что как указывалось, окончательно может быть доказано только после установления их структуры. Некоторые ОС, возможно, содержат еще небольшую примесь других ОС и их состав следует рассматривать как предварительный.

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют высокую разрешающую способность анионообменной хроматографии в боратном буфере при разделении смесей сложных ОС. Этот метод представляется достаточно перспективным и может быть использован для выделения ОС различного типа.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР
Москва

Поступило
4 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Деревицкая, Н. П. Арбатский, Н. К. Кочетков, Изв. АН СССР, сер. хим., № 5, 1163 (1975). ² J. W. Moye, D. M. Carlson, Carbohydr. Res., v. 15, 300 (1970).
³ В. А. Деревицкая, Н. П. Арбатский, Н. К. Кочетков, Изв. АН СССР, сер. хим., № 6, 1411 (1975).