

# МЕТОДЫ ХИМИИ УГЛЕВОДОВ

*Перевод с английского*

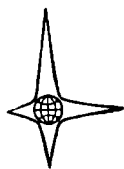
*Под редакцией*

чл.-корр. АН СССР Н. К. Кочеткова



---

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»  
МОСКВА 1967



ИЗДАТЕЛЬСТВО  
«МИР»

**METHODS  
IN  
CARBOHYDRATE CHEMISTRY**

**E d i t o r s**

**ROY L. WHISTLER**

**Department of Biochemistry  
Purdue University, Lafayette, Indiana**

**M. L. WOLFROM**

**Department of Chemistry  
The Ohio University, Columbus, Ohio**

**VOLUMES I, II, IV, V**

**ACADEMIC PRESS, NEW YORK and LONDON**

**1962—1965**

В книгу вошли избранные главы из пятитомного фундаментального руководства «Методы химии углеводов», изданного под редакцией крупнейших специалистов Уистлера и Вольфрома. Включены основные методики, касающиеся выделения, анализа, установления строения и синтеза углеводов и их производных — важнейшего класса природных соединений.

Книга предназначена для химиков, работающих в области природных соединений, биохимиков, специалистов по технологии полимерных материалов, инженеров гидролизной промышленности.

*Редакция литературы по химии*



# Предисловие

В книгу, предлагаемую вниманию читателей, вошли избранные главы из пятитомного издания «Методы химии углеводов», написанного крупнейшими специалистами и вышедшего в свет в Нью-Йорке в 1962–1965 гг.

Как известно, для одного из сложнейших разделов органической и биоорганической химии — химии углеводов вопросы методического характера имеют особое значение. Трудность выделения и очистки углеводов и получения их в чистом виде, особые проблемы, возникающие при установлении строения, и сложные, порой крайне запутанные их химические превращения делают эту область исследования одной из труднейших в современной химии природных соединений. Появление каждого нового метода исследования, примененного в этой области, обычно позволяет сделать качественный скачок в исследованиях по химии углеводов, как это имело место при введении в практику различных хроматографических методов, радиоспектроскопии и т. д.

В связи с этим появление за рубежом современного, достаточно подробного руководства по методам исследования — первого руководства такого рода — представляет очень большой интерес для широкого круга специалистов вследствие общеизвестного научного и технического значения углеводов. Отбор материала для сокращенного перевода этого пятитомника представлял довольно трудную задачу, поскольку руководство содержит очень много ценных методик.

При выборе материала для перевода мы старались дать нашему читателю наиболее нужные в повседневной практике и современные методы, имея в виду специалистов по биохимии, химии и отчасти технологии углеводов. При этом пришлось пожертвовать наиболее тривиальными и общеизвестными методами, а также методами и примерами, имеющими частное значение либо хорошо известными советскому читателю, как, например, вопросами химии целлюлозы. Наконец, имея в виду что особенно своеобразны и сложны методы исследования полисахаридов, значение которых в современной биологии, химии и технике быстро

возрастает, особое внимание при отборе материала мы уделили этому разделу.

В представляемом читателю переводе лишь кратко освещены вопросы выделения низкомолекулярных углеводов, подробнее рассмотрены методы их анализа, поскольку поиски наиболее надежных методик в оригинальной литературе требуют обычно и времени и большого опыта. Из обширного материала по синтетической химии в области моно- и олигосахаридов, представленного в оригинале, для перевода выбраны по одному или несколько примеров каждого из наиболее важных химических превращений.

Подробнее всего, как указывалось, представлены методики, касающиеся химии полисахаридов, где приведены общие и некоторые частные методы выделения, физические и химические методы исследования.

Несмотря на то что при отборе материала нам едва ли удалось полностью избежать элементов субъективизма, данное издание, несомненно, восполнит существенный пробел в отечественной химической литературе и займет прочное место на рабочем столе каждого исследователя, работы которого связаны с изучением углеводов.

Перевод выполнен Бакиновским Л. В., канд. хим. наук Бочковым А. Ф., канд. хим. наук Володиной В. С., канд. хим. наук Дмитриевым Б. А., канд. хим. наук Чижовым О. С. и канд. хим. наук Усовым А. И.

*Н. Кочетков*

# **МОНОСАХАРИДЫ И ОЛИГОСАХАРИДЫ**





# Методы выделения и очистки

---

## Кристаллизация углеводов и их производных

*А. Томпсон, М. Л. Вольфром*

Очистку и выделение неполимерных веществ класса углеводов осуществляют главным образом путем кристаллизации [1], так как методы перегонки и сублимации пригодны лишь для немногих веществ, выдерживающих нагревание. Даже если применяются хроматографические методы, при окончательном выделении вещества обязательна кристаллизация. Кристаллизация органических соединений усложняется наличием примесей, которые могут образовываться как побочные продукты реакции, и в еще большей степени — присутствием таутомеров, молекулы которых различаются строением, хотя и близки по составу.

Например, D-глюкоза кристаллизуется из воды при низких температурах в виде гидрата  $\alpha$ -формы, хотя в равновесном растворе содержится около 65%  $\beta$ -формы. Следовательно, до кристаллизации  $\beta$ -форма должна медленно превратиться в  $\alpha$ -форму, кроме того, ее присутствие, как и присутствие любого постороннего сахара, затрудняет кристаллизацию. Кристаллизация D-глюкозы из водных растворов усложняется еще и образованием моногидрата  $\alpha$ -формы, который значительно менее растворим, чем безводный сахар. Точка перехода системы соответствует 50°; при более низкой температуре D-глюкоза кристаллизуется как моногидрат, а при температуре выше 50° — в безводной форме. При температурах, близких к температуре кипения водного раствора,  $\beta$ -форма становится менее растворимой и, следовательно, она и кристаллизуется. Подобные осложнения затрудняют процесс кристаллизации даже чистых сахаров.

Небольшие различия в строении могут обуславливать заметные различия в способности к кристаллизации, и, хотя применяемые методы в общем варьируют незначительно, нельзя установить точные условия кристаллизации, пригодные для всех членов группы даже самых близких по строению углеводов.

### ВВЕДЕНИЕ «ЗАТРАВКИ»

Известно, что рост кристаллов протекает путем присоединения молекул или ионов из окружающей среды; естественно, что в такой среде уже должны быть кристаллы или зерна кристаллов. При кристаллизации углеводов введение таких затравок часто представляет серьезную проблему. Структурная единица кристалла образуется в том случае, когда минимальное число частиц растворенного вещества располагается в пространстве соответствующим образом. Не исключая элемент случайности, можно сказать, что появление кристаллической структуры зависит

от таких факторов, как размеры и форма молекул, различие в уровне энергий для кристаллического и аморфного состояний, а также от растворителя, температуры, количества и состава примесей.

Поскольку наличие примесей может задержать кристаллизацию, желательно возможно полнее очистить вещество. Положение особенно усложняется, если кристаллизация является единственным методом очистки данного вещества и если в лаборатории нет этого вещества, могущего служить затравкой. Поскольку таутомеры содержат различные типы молекул, один из них будет подавлять кристаллизацию другого. На практике часто удается получать преимущественно один из таутомеров, подобрав соответствующие условия реакции. При хроматографическом разделении часто получается вещество, достаточно чистое для того, чтобы первые кристаллы образовались самопроизвольно. Хорошей очистки в некоторых случаях можно добиться, используя молекулярную перегонку или сублимацию. Последовательное фракционное осаждение аморфного вещества из раствора путем добавления смешивающейся с растворителем жидкости, в которой нерастворимо данное вещество, приводит к выделению фракций, которые иногда вызывают кристаллизацию.

Распространено мнение, что пониженная температура облегчает кристаллизацию, но оно справедливо лишь частично и основано только на том факте, что с понижением температуры увеличивается степень насыщения раствора. Растворы сиропообразных сахаров часто бывают пересыщенными при комнатной или повышенной температуре, и в этих условиях они кристаллизуются легче, чем в холодильнике. В некоторых случаях лучше кристаллизовать при температуре сушильного шкафа, т. е. примерно при 70—80°. Густой сироп в большинстве случаев не кристаллизуется, его приходится разбавлять подходящим растворителем. По-видимому, для кристаллизации необходима определенная степень подвижности молекул.

Чтобы получить первые зерна кристаллов — затравку, растворяют наиболее чистый из имеющихся образцов вещества в нескольких растворителях и выдерживают полученные растворы в холодильнике, при комнатной и при повышенной температурах. Самопроизвольное испарение растворителя иногда способствует кристаллизации. Не следует также пренебрегать старым методом — потирать о стенки сосуда стеклянной палочкой (можно применять и деревянную палочку).

Известно, что производные углеводов могут внезапно кристаллизоваться после стояния в течение нескольких лет. Хотя D-фруктоза может образовывать крупные кристаллы, в течение многих лет она была известна как «некристаллизуемый сахар». Производные сахаров обычно легче кристаллизуются в тех лабораториях, где они были получены. Известен пример, когда производное сахара не закристаллизовалось после стояния в течение нескольких месяцев. Все образцы кристаллического вещества, полученного двадцать лет назад в другой лаборатории, были утеряны. Но когда сиропообразное вещество оставили в открытом сосуде в лаборатории, где это вещество было приготовлено впервые, оно закристаллизовалось в течение нескольких дней. Такие примеры показывают, что, по-видимому, зерна (зародыши) кристаллизации могут «невидимо» сохраняться в комнате в течение долгого времени. Именно этим обстоятельством можно объяснить, что перекристаллизация или повторное приготовление вещества легче проходит в той лаборатории, где уже кристаллизовали подобное вещество.

Если имеется большое количество сиропообразного вещества, можно применить старый прием кристаллизации по Мичерлиху, используя изоморфизм кристаллов. Например, в каждую из  $\sim 50$  мелких порций ксилита в виде подвижного сиропа, который ранее не кристаллизовался, были внесены затравки различных веществ. Примерно через десять дней закристаллизовалась проба с затравкой из пентаэритрита.

Кристаллизация нередко усложняется полиморфизмом. Часто первыми выпадают кристаллы с наиболее высокой внутренней энергией, причем иногда они гигроскопичны; затем эти кристаллы переходят в более стабильную модификацию с меньшей энергией. Так было в случае кристаллизации ксилита, упомянутой выше. Иногда неожиданно встречаются вещества, которые кристаллизуются только в виде полиморфных модификаций.

### ВЫБОР РАСТВОРИТЕЛЯ

Наиболее подходящие растворители или смеси растворителей, применяемые для кристаллизации аморфных сахаров, приходится подбирать эмпирически для каждого случая. Для сиропообразных незамещенных сахаров рекомендуются низшие спирты, особенно метанол, а также уксусная кислота, пиридин, диоксан, целлозольны (моно- и диметилловые эфиры этиленгликоля) и N,N-диметилформамид. Производные сахаров — ацетаты, бензоаты, циклические ацетали (изопропилиденовые, этилиденовые и бензилиденовые), а также алкиловые и ариловые эфиры — очень хорошо растворяются в ацетоне, хлороформе и несколько хуже — в низших спиртах, эфире и бензоле. Как уже говорилось, иногда лучше использовать не индивидуальные растворители, а их смеси. В этом случае вещество вначале растворяют в растворителе с хорошей растворяющей способностью, а затем добавляют второй растворитель с меньшей растворяющей способностью до помутнения раствора. Первый растворитель можно даже разбавить другим, с меньшей растворяющей способностью, и уже затем добавлять осаждающий растворитель. Примером может служить система ацетон—эфир—лигроин в применении к ацетатным производным сахаров.

Системы растворителей, применяемые при кристаллизации сиропообразных веществ, не всегда являются лучшими растворителями для перекристаллизации полученных кристаллов. Например, ледяная уксусная кислота — превосходный растворитель, применяемый для кристаллизации многих сиропообразных сахаров: она легко смешивается с сиропообразными сахарами и очень мало растворяет кристаллическую фазу. Последующую перекристаллизацию осуществляют растворением в довольно большом объеме воды с последующим упариванием в вакууме и кристаллизацией путем добавления спирта.

Установлены условия кристаллизации сахаров при введении избытка затравки; найденные закономерности позволили разработать, в частности для сахарозы и моногидрата  $\alpha$ -D-глюкопиранозы, промышленную технологию [2].

### КРИТЕРИИ КРИСТАЛЛИЧНОСТИ

Иногда в результате первой кристаллизации образуются очень мелкие кристаллы, трудно отличимые от аморфного вещества. Чтобы решить, имеем мы кристаллическое или аморфное вещество, можно использовать увеличивающие устройства — от ручных луп до поляризационного микро-

скопа. Образец рассматривают, поместив его между покровными стеклами, когда он еще суспендирован в маточном растворе и содержит целые неповрежденные кристаллы. Кристаллическое вещество всегда можно отличить от аморфного с помощью рентгенограммы, так как аморфное и кристаллическое вещества дают различные дифракционные картины. Метод дифракции — это, вероятно, лучший метод характеристики кристаллической фазы; он особенно удобен для идентификации веществ и различных полиморфных модификаций. Результаты измерений межплоскостных расстояний кристалла точны и воспроизводимы. Кроме того, нет необходимости в тщательной очистке кристаллов, так как главную фазу можно отличить. Однако это обстоятельство может ввести в заблуждение, если в приготовленном образце большая примесь кристаллов распределена среди аморфной матрицы других веществ. Данные дифракционных порошковых рентгенограмм не позволяют определить степень чистоты вещества, но они очень ценны для идентификации кристаллической фазы.

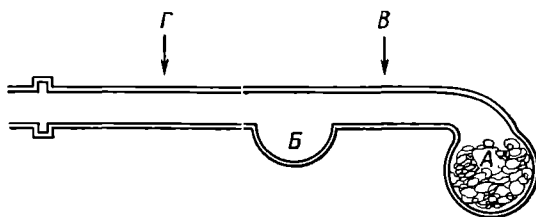
## ЛИТЕРАТУРА

1. T i p s o n R. S., Technique of Organic Chemistry, Weissberger A., Ed., Interscience Publishers Inc., New York, N.Y., 1956, vol. III, part. I, p. 395.
2. H o n i g P., Ed., Principles of Sugar Technology, vol. II, Crystallization, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1959.

## Микроперегонка производных углеводов

Д. Х о р т о н

Перегонку малых количеств, 25—500 мг, метилированных, ацетилированных и подобных им летучих производных углеводов в высоком вакууме легко осуществить, применяя простой прибор, показанный на рисунке.



Прибор для вакуумной микроперегонки.

Шарик А заполнен стеклянной ватой, объем его в 10—20 раз больше объема перегоняемого образца, а емкость углубления Б больше ожидаемого объема дистиллата. Образец вещества, растворенный в низкокипящем растворителе, вносят в шарик А с помощью изогнутой капиллярной пипетки. Растворитель отгоняют в вакууме, осторожно нагревая шарик А, чтобы избежать слишком быстрого испарения и возможного бурного



выбрасывания содержимого. Последние следы растворителя удаляют при подключении прибора к высоковакуумному насосу и нагревании шарика *A* на масляной бане до температуры  $\sim 60^\circ$ . Приемный шарик *B* охлаждают, помещая на него кусок обильно смоченной водой ваты. Масляную баню очень медленно нагревают и фиксируют температуру, при которой происходит перегонка вещества в шарик *B*. Дистиллат можно сразу же изолировать, если отпаять трубку в точках *B* и *I'*; можно также обрезать трубку в точке *B* и извлечь дистиллат с помощью изогнутого капилляра.

Так перегоняют образцы сиропообразного вещества весом 50 мг и менее, что достаточно для получения некоторой информации. После отделения небольших проб для определения элементарного состава и снятия инфракрасного спектра на образце весом 15—20 мг можно определить показатель преломления. Этот же образец повторно используют для изучения вещества методом хроматографии на бумаге и электрофореза. На оставшемся веществе с помощью поляриметра с малой трубкой измеряют оптическое вращение.

## Хроматография на колонках с углем

*Р. Л. Уистлер, Д. Н. Бемиллер*

### ВВЕДЕНИЕ

Колоночная хроматография на угле была впервые описана в 1950 г. Уистлером и Дерсо [1]. Они использовали этот метод для разделения углеводов на классы в зависимости от степени их полимеризации, т. е. на моносахариды, дисахариды, трисахариды и т. д. Эта методика является модификацией метода Тизелиуса [2].

Согласно работе [1], разделение проводилось как ступенчатое элюирование углеводов водным спиртом из колонки, содержащей смесь угля с целитом. Этот метод получил распространение [3] и особенно широко применялся для разделения серии гомологичных олигосахаридов. Однако для разделения более сложных смесей, например олигосахаридов одного и того же класса, необходимо градиентное элюирование [4, 5].

Хроматография на колонках с углем пригодна не только для разделения олигосахаридов, она также применялась для разделения кислых углеводов [6], многоатомных спиртов и их ацетатов [7], олигосахаридов, содержащих аминсахара [8], и метиловых эфиров сахаров [9]. В каждом случае хроматография на угольных колонках, по-видимому, превосходит все другие методы, так как позволяет добиться желаемого разделения; однако, если нужно разделить сложную смесь, обычно необходимо предварительное градиентное элюирование. Новый метод разделения дисахаридов был опубликован в 1955 г. [10, 11]; он основан на способности некоторых дисахаридов образовывать в мягких условиях метилфуранозиды. Эти метилглюкозиды абсорбируются сильнее свободных сахаров.

Хроматография на угольной колонке удобна еще и тем, что угольная колонка обладает высокой емкостью, а это позволяет количественно выделить компоненты и разделить большие количества материала. На эффективность разделения не влияет присутствие неорганических солей

или степень разведения раствора сахара. В лабораториях авторов и некоторых других исследователей [12] для дезактивации угля применялась концентрированная соляная кислота. Элм, Вильямс и Тизелиус [4] насыщали уголь стеариновой кислотой (1% кислоты в 96%-ном спирте). Предварительная дезактивация или насыщение увеличивает возврат введенных в колонку веществ почти до 100%, позволяет элюировать сильно адсорбирующиеся высшие олигосахариды и улучшает разрешение зон. Чтобы исключить малое количество растворенного неорганического вещества, вносимое с наполнителем, указанные авторы часто считали удобным готовить колонки без целита. Если исключить целит, проведение операций значительно упрощается в том случае, когда вместо целита применяют уголь двух степеней измельчения: смесь крупнозернистого угля и обычного дарко G-60. В работе [13] описано применение колонки, содержащей только уголь.

### МЕТОДИКА

Равные весовые части угля<sup>1</sup> дарко G-60 и целита № 535 смешивают в сухом виде, к смеси прибавляют воду и полученную жидкую пасту помещают в стеклянную хроматографическую колонку, закрытую снизу стеклянной ватой. Через колонку медленно, по каплям пропускают концентрированную соляную кислоту, чтобы дезактивировать уголь и отмыть следы железа и золы. После этого через колонку пропускают дистиллированную воду до получения нейтрального элюата. Для уменьшения длительности операций на этой и всех последующих стадиях можно применять отсасывание.

Сахара вводят в колонку в виде водного обычно 1—10%-ного раствора. Для эффективного разделения на каждый грамм смеси сахаров берут 150 мл смеси угля и целита. Разделение сахаров можно проводить как ступенчатым, так и градиентным элюированием. Например, смесь, содержащая по 1 г D-глюкозы, мальтозы и рафинозы, была разделена в колонке  $3,4 \times 17,0$  см последовательным элюированием 800 мл воды, 1500 мл 5%-ного спирта и 700 мл 15%-ного спирта [1]. Пример градиентного элюирования см. [14].

Для разделения больших количеств веществ с применением ступенчатого элюирования было создано автоматическое устройство [15]. При градиентном элюировании используются автоматические коллекторы, с помощью которых собирают малые фракции [16].

Для того чтобы избавиться от растворенного неорганического вещества, которое неизбежно сопутствует целиту, обычно применяют два метода. Так как неорганическое вещество становится относительно мало растворимым, после того как оно было высушено, исследуемый образец выпаривают досуха, смешивают с небольшим количеством воды и фильтруют. Такую операцию повторяют трижды, и этого обычно достаточно для удаления неорганического вещества. Другой способ заключается в следующем: к водному раствору прибавляют метиловый или этиловый спирт, смесь нагревают до 60° и выпавший хлопьевидный осадок удаляют фильтрованием [17].

---

<sup>1</sup> Успешно применялись и другие сорта угля: активированный древесный уголь, активный уголь № 130 и животный уголь.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Whistler R. L., Durso D. F., J. Am. Chem. Soc., **72**, 677 (1950).
2. Tiselius A., Arkiv. Kemi Mineral Geol., **14B**, No. 32, 8pp. (1941); Chem. Abstracts, **35**, 5406 (1941); Kolloid Z., **105**, 101 (1943); Tiselius A., Hahn L., *ibid.*, **105**, 177 (1943).
3. a) Whistler R. L., Durso D. F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 5140 (1952); Whistler R. L., Tu C.-C., *ibid.*, **75**, 645 (1953); Whistler R. L., Duffy J. H., *ibid.*, **77**, 1017 (1955); 6) Thompson A., Wolfrom M. L., *ibid.*, **73**, 5849 (1951); Thompson A., Anno K., Wolfrom M. L., Inatome M., *ibid.*, **76**, 1309 (1954); в) Wallenfels K., Bernt E., Limberg G., *Ann.*, **579**, 113 (1953); Roberts H. R., McFarren E. F., J. Dairy Sci., **36**, 620 (1953); r) Bailly J. N., Whelan W. J., Peat S., J. Chem. Soc., 1950, 3692.
4. Alm R. S., Williams R. J. P., Tiselius A., Acta Chem. Scand., **6**, 826 (1952); Alm R. S., *ibid.*, **6**, 1186 (1952).
5. Bacon J. S. D., Bell D. J., J. Chem. Soc., 1953, 2528; Bacon J. S. D., Biochem. J., **57**, 320 (1954).
6. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 301.
7. Lindberg B., Acta Chem. Scand., **7**, 1119 (1953).
8. Kuhn R., Gauhe A., Baer H. H., *Ber.*, **86**, 827 (1953); *ibid.*, **87**, 289 (1954); Kuhn R., Kirschenlohr W., *ibid.*, **87**, 1547 (1954); Barker S. A., Foster A. B., Stacey M., Webber J. M., J. Chem. Soc., 1958, 2218.
9. Whelan W. J., Morgan K., Chem. and Ind. (London), 78 (1954).
10. Barker S. A., Bourne E. J., O'Mant D. M., Chem. and Ind. (London), 425 (1955).
11. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, vol. I, 1962, p. 339.
12. Lindberg B., Wickberg B., Acta Chem. Scand., **8**, 569 (1954).
13. French D., J. Am. Chem. Soc., **77**, 1024 (1955).
14. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, vol. I, 1962, p. 345.
15. Durso D. F., Schall E. D., Whistler R. L., Anal. Chem., **23**, 425 (1951).
16. Hickson J. L., Whistler R. L., Anal. Chem., **25**, 1425 (1953).
17. Whistler R. L., Tu C.-C., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3609 (1952).

## Хроматография на колонке с целлюлозой

*Р. Л. Уистлер, Д. Н. Бемиллер*

### ВВЕДЕНИЕ

Распределительная хроматография была впервые применена для разделения углеводов в 1949 г. [1]. С тех пор этот метод широко используется в препаративной химии углеводов и ему посвящено несколько превосходных обзоров [2, 3]. Область применения этого метода в химии углеводов настолько обширна, что нет необходимости рассматривать частные примеры его использования.

### МЕТОДИКА

#### *Колонки*

В качестве колонок можно использовать обычные хроматографические трубки. Успех всякого разделения на распределительной колонке с целлюлозой зависит от четкости границ зон и объемного разделения между зонами. Четкость границ возрастает, если диаметр колонки уменьшается. Объемное разделение между зонами улучшается при возрастании высоты колонки. Но по мере того как высота колонки возрастает и уменьшается ее диаметр, уменьшается и количество материала, которое можно разделить на колонке, возрастает капиллярное сопротивление и уменьшается скорость потока жидкости, орошающей колонку. Эмпирически найдено, что соотношение высоты и диаметра колонки должно быть равно 9 : 1.

Количество вещества, которое можно ввести в колонку, зависит от легкости разделения компонентов. Загрузка для каждого индивидуального компонента приблизительно пропорциональна величине его  $R_f$ . В литературе можно найти много примеров разделения на колонках этого типа. Однако допустимую величину загрузки при работе с данным образцом и данным растворителем всегда нужно оценить эмпирически по разделению на бумаге.

#### *Наполнение колонки*

Эта операция является наиболее важной при проведении хроматографии на целлюлозе. На фарфоровый фильтровальный диск, который служит дном обычной хроматографической колонки, вначале помещают либо кусочки фильтровальной бумаги, либо стеклянное волокно. После этого в колонку загружают промытый водой и высушенный стандартный порошок целлюлозы. Для заполнения колонки можно применять либо сухой порошок целлюлозы, либо суспензию целлюлозы, причем последний способ в настоящее время предпочитают большинство исследователей. Для приготовления суспензии обычно используют ацетон. Порошок целлюлозы смешивают с ацетоном в гомогенизаторе Уоринга до тех пор, пока не получится однородная суспензия средней консистенции. Полученную суспензию переносят в стеклянную трубку. Ацетон стекает через дно трубки, а суспензию медленно перемешивают стеклянной палочкой как раз над линией оседания для равномерного заполнения трубки и что-



бы предупредить образование трещин. Хроматографическая трубка все время должна быть почти доверху заполнена суспензией. Когда колонка заполнена на нужную высоту, ацетону дают стечь, тщательно следя за тем, чтобы не обнажалась поверхность целлюлозы. Сверху на слой целлюлозы помещают кусочек пористой фильтровальной бумаги. После этого колонку в течение нескольких дней тщательно промывают растворителем, который будет применяться для орошения колонки при хроматографировании. Колонка должна быть всегда заполнена жидкостью, так как, если она стечет или испарится, объем целлюлозы может уменьшиться и у стенок трубки могут образоваться зазоры. Когда растворитель проходит через колонку, частички целлюлозы поглощают воду и разбухают, образуя плотный слой. Плотность заполнения определяется консистенцией применяемой суспензии. Если суспензия слишком жидкая, набивка будет слишком плотной и возможно частичное фракционирование целлюлозы по размерам частиц.

Если нужно приготовить колонку для хроматографирования с большей скоростью потока, при заполнении ее вместо ацетона можно применить более вязкий растворитель *n*-бутанол. Для колонок с менее плотной набивкой некоторые исследователи предпочитают готовить суспензию на том же растворителе, который будет применяться для колонки при хроматографировании.

При работе с препаративными колонками, в частности с колонками значительной высоты, в тех случаях, когда желательно увеличить скорость тока раствора, лучше применять избыточное давление, а не отсасывание растворителя. Применение вакуума в последнем случае часто приводит к уменьшению количества растворителя в нижней части колонки и последующему нарушению разделения в этой зоне.

Равномерность заполнения колонки можно проверить, пропуская через нее раствор красителя, например метилрога, в растворителе, который будет применяться. Для этого растворителю дают стечь с верха колонки, после чего добавляют из медицинской капельницы приготовленный раствор красителя, равномерно распределяя его по поверхности целлюлозы, а затем вымывают растворителем, возвращая на место резервуар с растворителем, как только окрашенная зона начнет двигаться вниз вдоль колонки. Если краситель движется вдоль колонки как горизонтальная окрашенная зона, колонка заполнена равномерно и годна к употреблению. Если окрашенная зона движется неровно, колонка заполнена неправильно и ее нужно заполнить снова.

### **Растворители для колонки**

Наиболее удобные растворители для колонки определяются посредством хроматографии на бумаге. Большинство растворителей, применяемых в хроматографии на бумаге, можно использовать для колонки при хроматографировании на целлюлозе. Однако муравьиная кислота, если ее применять в течение длительного времени для колонки с целлюлозой, вызывает деструкцию целлюлозы и колонка становится непригодной для дальнейшей работы. Кроме того, муравьиную кислоту трудно удалить из элюата, поэтому применения ее следует избегать.

Если используемый растворитель содержит кислоту (например, уксусную) или основание (например, пиридин), их следует удалить из элюата, прежде чем начать упаривание последнего, чтобы избежать изменений выделяемых сахаров или их производных. С этой целью

элюат обычно встряхивают в делительной воронке с равным объемом воды, а затем водный слой экстрагируют эфиром в течение нескольких часов в экстракторе. Эта методика не применима к таким производным сахаров, как, например, метиловые эфиры, и в этих случаях для удаления кислот и оснований нужны особые методы.

Все органические растворители, которые применяются для колонок при хроматографировании на целлюлозе, перед употреблением следует перегнать, чтобы избежать появления масел и смол при последующем концентрировании фракций.

### *Температура*

Колонку помещают в комнате с постоянной температурой — обычно 20—25°, хотя иногда необходима и более высокая температура, так как при этом возрастает скорость погоя и можно использовать более высокие концентрации реагентов [4]. Необходимо избегать колебаний температуры, так как понижение температуры может привести к выделению воды из раствора и нарушить разделение. Это обстоятельство особенно существенно при применении в качестве растворителя *n*-бутанола, насыщенного водой.

### *Введение образца*

Образец, свободный от неорганических солеобразных веществ [5], растворяют в минимальном количестве воды (фиксируя ее объем). К раствору добавляют сухой порошок целлюлозы в таком количестве, чтобы порошок был увлажнен, и к полученной смеси прибавляют дополнительное количество органических компонентов элюента. Полученную суспензию помещают в колонку поверх слоя целлюлозы. После того как образец немного осядет, поверх него осторожно помещают слой сухого порошка целлюлозы толщиной 2,5 см, накрывают кружком из пористой фильтровальной бумаги и начинают пропускать растворитель для колонки.

### *Отбор фракций*

Отбор фракций производится с помощью различных автоматических коллекторов; они работают по принципу измерения веса, объема фракций или времени элюирования. Обсуждение этих устройств не входит в нашу задачу, они рассматриваются в целом ряде работ, например [2, 3] (см. также предыдущую статью).

### *Определение компонентов*

Компоненты можно определить с помощью различных общих цветных реакций (см. стр. 20 и далее). Гарделл [6] применял построение концентрационных кривых элюата и сравнивал их с аналогичными кривыми, полученными для стандартных растворов сахара в том же самом растворителе.

Наиболее простой качественной пробой, по-видимому, является капельная проба: на фильтровальную бумагу помещают каплю элюата и обрабатывают бумагу щелочным раствором нитрата серебра [7].

Во многих случаях желательно помещать капли вытекающего элюата на хроматографическую бумагу и проявлять ее обычным способом [7].

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. H o u g h L., J o n e s J. K. N., W a d m a n W. H., Nature, **162**, 448 (1948); J. Chem. Soc., **1949**, 2511.
2. H o u g h L., Methods of Biochem. Anal., **1**, 205 (1954).
3. L e d e r e r E., L e d e r e r M., Chromatography, Elsevier Publishing Co., New York, N.Y., 2nd English Ed., 1957.
4. C o u n s e l l J. N., H o u g h L., W a d m a n W. H., Research (London), **4**, 143 (1951).
5. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 3.
6. G a r d e l l S., Acta Chem. Scand., **5**, 1011 (1951); **7**, 201 (1953).
7. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 21.

# Методы анализа

---

## Цветные реакции углеводов

### ВВЕДЕНИЕ

#### *З. Д и ш е*

Группа специфических цветных реакций для углеводов основана на их способности давать фурфурол или его гомологи при взаимодействии с сильными кислотами, особенно при нагревании. Эти производные фурана или продукты их превращений, образующиеся в сильных кислотах в результате процессов окисления, восстановления и конденсации, могут давать цветные реакции с самими сахарами или с такими органическими веществами, как тиолы, мочевины и уреиды, фенолы, ароматические амины и гетероциклические соединения. В эти реакции вступают как моносахариды, так и олигосахариды и полисахариды. Различные классы сахаров и даже индивидуальные сахара внутри некоторых классов часто отличаются по интенсивности и качеству окраски в некоторых реакциях в зависимости от концентрации реагентов, температуры и продолжительности нагревания.

Было описано большое число таких реакций и исследована их специфичность и спектры поглощения. Применение нескольких цветных реакций для каждого класса сахаров и определение оптической плотности полученных неизвестных веществ поможет при определении, выделении и идентификации углеводов.

При такого рода испытаниях одновременно ставится холостой опыт: в реакционную смесь вводят все реагенты, необходимые для определения образца, но вместо раствора сахара прибавляют растворитель. При количественных определениях, в тех случаях когда требуется высокая точность, одновременно с испытуемым образцом должно проводиться определение со стандартным раствором. Если сахара находятся в растворе в присутствии большого количества других органических веществ, нужно также приготовить контрольные пробы, содержащие испытуемый образец и кислоту без цветообразующего реагента.

Кроме того, для аналитических целей применяется ряд цветных реакций, основанных на восстанавливающих свойствах моносахаридов и олигосахаридов с короткими цепями. Эти реакции, конечно, не специфичны, и их можно применять только после удаления из смеси других восстанавливающих органических веществ.



## Общие цветные реакции

### 3. Д и ш е

Чувствительность углеводов различных классов, например моно- и полисахаридов, к некоторым групповым специфическим цветным реакциям имеет один и тот же порядок, и максимумы поглощения различных классов углеводов в этом случае очень близки. Такая группа реакций, в частности, важна для идентификации вещества как углевода и для определения общего содержания углеводов. Среди реакций имеются и такие, которые для каждого класса углеводов дают различные спектры поглощения, что позволяет дифференцировать их с помощью спектрофотометрии. Эти реакции можно применить для определения класса углеводов, присутствующих в данном образце.

#### РЕАКЦИИ С $\alpha$ -НАФТОЛОМ (РЕАКЦИЯ МОЛИША [1])

Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся под действием серной кислоты, конденсируясь с 2 молями сульфированного  $\alpha$ -нафтола, дают триарилметановый хромоген, который окисляется в серной кислоте в окрашенное хиноидное соединение [2].

*Качественная реакция.* К 1 мл раствора сахара добавляют 2 капли спиртового 15%-ного раствора  $\alpha$ -нафтола и 1 мл концентрированной серной кислоты (с низким содержанием нитритов и нитратов), так чтобы она оказалась под водной фазой. На поверхности раздела появляется красно-фиолетовое кольцо. Эту реакцию обычно считают общей для углеводов; как специфическая реакция она, по-видимому, может быть отнесена только к гексозам и альдопентозам. Относительно реакционной способности углеводов других классов нет достаточно достоверных данных.

Эта реакция была модифицирована [3] с целью повышения чувствительности и воспроизводимости. В последней модификации [4] применяется предварительно сульфированный  $\alpha$ -нафтол.

*Количественное определение.* К 2 мл раствора, содержащего 10  $\gamma$  или более гексозы или пентозы, добавляют 5 мл реагента, приготовленного растворением 0,4 г  $\alpha$ -нафтола в 100 мл концентрированной серной кислоты, и оставляют раствор на 8 час при комнатной температуре в темноте. Использование сульфированного  $\alpha$ -нафтола повышает чувствительность реакции и делает окраску более одинаковой для всех гексоз и пентоз. Смесь охлаждают в течение получаса при комнатной температуре, после чего нагревают 10 мин на кипящей водяной бане; при этом появляется красно-фиолетовая окраска, которой соответствует максимум поглощения при  $\sim 550$  м $\mu$ . Максимальное поглощение составляет приблизительно 0,9 для 50  $\gamma$  D-глюкозы и D-фруктозы и даже выше для пентоз. Реакция подчиняется закону Бера при содержании указанных углеводов  $>10$   $\gamma$ . Поведение других углеводов не исследовалось.

#### РЕАКЦИЯ С АНТРОНОМ И СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

*Качественное определение* [5]. К 2 мл раствора, содержащего 10—100  $\gamma$  углевода в 1 мл, добавляют 4 мл 0,2%-ного раствора антрона в концентрированной серной кислоте; раствор выдерживают несколько

минут при комнатной температуре. Появляется зеленая окраска, которая медленно переходит в сине-зеленую. Максимум поглощения при 620 *мк*. Гексозы, альдопентозы, 6-дезоксигексозы и гексуриновые кислоты дают положительную реакцию.

#### РЕАКЦИЯ УГЛЕВОДОВ С L-ТРИПТОФАНом И СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ В ПРИСУТСТВИИ БОРНОЙ КИСЛОТЫ [6]

Гексозы, пентозы, 6-дезоксигексозы и гексуриновые кислоты при нагревании с L-триптофаном в серной кислоте дают фиолетовую и коричнево-фиолетовую окраску. Если в реакционной смеси присутствуют достаточные количества борной кислоты, все классы углеводов дают одинаковую фиолетовую окраску с максимумом поглощения между 540 и 560 *мк*.

К 2 *мл* раствора сахара с концентрацией 50 *г/мл* или более добавляют 7 *мл* реагента, приготовленного растворением 50 *г* борной кислоты в растворе 230 *мл* воды и 770 *мл* концентрированной серной кислоты. Смесь охлаждают, погрузив ее в воду со льдом, и при встряхивании добавляют 1 *мл* раствора L-триптофана (хранившегося не более 10 дней при 4°). Одновременно ведут обработку пробы холостого опыта с водой вместо раствора сахара. Реакционную смесь и пробу холостого опыта нагревают 20 *мин* на кипящей водяной бане, охлаждают текущей водопроводной водой и оставляют на 30 *мин* при комнатной температуре. Поглощение подчиняется закону Бера, и это можно использовать для количественного определения углеводов. Коэффициенты экстинкции D-глюкозы и D-маннозы почти идентичны, для D-галактозы и для D-гексуриновой кислоты они ниже соответственно на ~15 и 40%. Реакция применяется главным образом для определения углеводов гликопротеинов, которые не дают полос вблизи области максимума поглощения. Максимум поглощения в холостом опыте достигает только 0,05, что соответствует приблизительно содержанию D-глюкозы 0,7 *г/мл*.

#### РЕАКЦИЯ УГЛЕВОДОВ С L-ЦИСТЕИНОМ И СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ [7]

Большинство углеводов с пятью и более углеродными атомами образует фулфурол или его гомологи, если к их растворам добавлять серную кислоту при охлаждении льдом или водой. Производные фурана устойчивы в серной кислоте в течение нескольких часов. После добавления L-цистеина или других тиосоединений производные фурана вступают во взаимодействие с реагентом при комнатной температуре, причем немедленно образуются вещества со спектрами поглощения, характерными для каждого класса сахаров с максимумом поглощения в пределах от 375 до 430 *мк*.

К 1 *мл* раствора, содержащего 5—50 *г* сахара, добавляют при охлаждении водой 4 *мл* концентрированной серной кислоты, не содержащей следов тяжелых металлов и восстанавливающих веществ. Тотчас же по добавлении кислоты смесь энергично перемешивают встряхиванием и оставляют на 1 час при комнатной температуре, изредка встряхивая, но так, чтобы избежать попадания пузырьков воздуха, мешающих спектрофотометрическим измерениям. К реакционной смеси добавляют при встряхивании 0,1 *мл* 3%-ного раствора аналитически чистого моногидрата солянокислого L-цистеина. Спектрофотометрические измерения проводят через 15—20 *мин*.

Максимумы поглощения пентоз и гексуроновых кислот соответствуют 390 *ммк*; гексозы дают желтое окрашивание с максимумом при 412—414 *ммк*, пентозы—оранжевое окрашивание с максимумом поглощения при ~430 *ммк*, быстро переменяющимся в сторону волн большей длины, пока через несколько часов он не достигнет 510 *ммк* и соответственно устойчивой пурпурной окраски. 6-Дезоксигексозы через 15 *мин* дают только незначительное поглощение с максимумом при 400 *ммк*. Величина поглощения непрерывно возрастает в течение 24 *час* при комнатной температуре. 2-Дезокси-пентозы не дают спектров поглощения в течение 15—30 *мин* после добавления L-цистеина, но через 24 *час* появляется очень острый максимум при 375 *ммк*.

Устойчивость продуктов реакции для различных классов сахаров зависит от содержания воды в реакционной смеси. Различие в положении максимума поглощения и устойчивость по отношению к воде дают возможность определить сахара различных классов в их смеси.

Если реакционную смесь, содержащую производные пентоз, оставить на ночь в отсутствие воды, окраска смеси исчезнет. Продукты реакции гексоз значительно более устойчивы, а интенсивность поглощения производных 6-дезоксигексоз и 2-дезокси-пентоз в этих же условиях возрастает. Если после первых спектрофотометрических определений через 15 *мин* после прибавления L-цистеина добавить при охлаждении 2 *мл* воды, поглощающие производные пентоз и гексоз исчезают, а для 6-дезокси-гексоз максимальная интенсивность поглощения будет достигнута уже через несколько минут.

Образование характерных продуктов реакции с L-цистеином сопровождается увеличением поглощающей способности между 300 и 330 *ммк*, т. е. в области, характерной для фурфурола, 5-метилфурфурола и 5-окси-метилфурфурола, которые образуются соответственно из пентоз, 6-дезокси-гексоз и гексоз после добавления серной кислоты. Для каждого класса сахаров реакция подчиняется закону Бера в пределах концентраций между 5 и 50  $\gamma/\text{мл}$  для гексоз, пентоз и 6-дезокси-гексоз и между 100 и 500  $\gamma/\text{мл}$  для 2-дезокси-пентоз.

Реакция с L-цистеином отличается высокой специфичностью, особенно если используется различная устойчивость окрашенных продуктов реакции по отношению к воде. В этом случае можно определить углеводы нескольких различных классов, одновременно присутствующих в растворе.

Хотя многие органические соединения при обработке их серной кислотой поглощают в ультрафиолетовой части спектра и дают коричневую окраску, как правило, эти неспецифические окрашенные продукты не реагируют характерным образом с L-цистеином и не изменяются после добавления воды.

#### РЕАКЦИЯ С ДИФЕНИЛАМИНОМ И СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ [3, 8]

К 1 *мл* раствора с концентрацией сахара 20—250  $\gamma/\text{мл}$  добавляют 2 *мл* реагента, приготовленного смешиванием 10 *мл* 10%-ного раствора дифениламина (дважды перекристаллизованного из 70%-ного спирта) в абсолютном спирте с 90 *мл* ледяной уксусной кислоты и 100 *мл* концентрированной соляной кислоты. Реакционную смесь нагревают 10—30 *мин* на кипящей водяной бане. Проба холостого опыта, которая содержит 1 *мл* воды вместо раствора сахара, имеет только слабый зеленоватый оттенок.

Почти все углеводы дают с дифениламином окрашенные соединения, но интенсивность окраски весьма различна. Для гексоз характерна голубая окраска с двумя максимумами при 635 и 520 мкм и минимумом при 560 мкм. Производные пентоз и тетроз окрашены в зеленовато-желтый цвет. Гексуроновые кислоты дают коричневатую-красную окраску с максимумом поглощения при 520—522 мкм и вторым максимумом в фиолетовой части спектра. При стоянии при комнатной температуре красный компонент обесцвечивается и коричнево-красная окраска переходит в коричневую. Гептозы дают голубовато-фиолетовую окраску с острым пиком максимума поглощения при 560 мкм. 2-Дезоксипентозы и дезоксирибонуклеиновые кислоты дают голубую окраску с двумя максимумами поглощения при 520 и 600 мкм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Molisch H., Monatsch. Chem., 7, 108 (1886).
2. Brederick H., Ber., 65, 1110 (1932).
3. Dische Z., Mikrochemie, 7, 33 (1929).
4. Devor A. W., Anal. Chem., 24, 1626 (1948).
5. Dreywood R., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 18, 499 (1946).
6. Badin J., Clifford J., Schubert M., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 84, 288 (1953).
7. Dische Z., J. Biol. Chem., 181, 379 (1949).
8. Ihl A., Chem. Zentr., 9, 451 (1885).

## Цветные реакции кетоз с карбазолом и серной кислотой [1]

### 3. Диче

Известно несколько реакций, позволяющих отличить кетогексозы от альдогексоз, но кетозы других классов в этих реакциях не испытывались. Единственной реакцией, в которой систематически исследовалась реакционная способность кетоз различных классов, является реакция с L-цистеином и карбазолом в серной кислоте. Эту реакцию можно применять для обнаружения различных кетоз, а также для их количественного определения.

Хотя альдозы также реагируют с L-цистеином и карбазолом в серной кислоте, но эта реакция идет гораздо медленнее; коэффициенты экстинкции образующихся веществ в этом случае тоже намного ниже. Поэтому при тщательной работе вполне возможно использовать эту реакцию для определения кетоз.

К 1 мл раствора, содержащего 1—20 γ кетозы, добавляют вначале 0,2 мл 2,4%-ного раствора моногидрата солянокислого L-цистеина и затем 6 мл 75%-ной (по объему) серной кислоты. Смесь энергично встряхивают, тотчас же добавляют 0,2 мл 0,1%-ного раствора карбазола в спирте и снова энергично встряхивают. Через несколько минут при комнатной температуре появляется красное или сине-фиолетовое окрашивание, интенсивность которого возрастает в течение некоторого времени. Для

рибулозы (*D*-эритро-пентулозы) интенсивность окраски достигает максимума через 15 мин [2] и остается постоянной в течение нескольких часов; для ксилулозы (*D*-трео-пентулозы) интенсивность окраски достигает максимума через 3 час.

Максимум поглощения для кетопентоз наблюдается при 540 мк. Для *D*-фруктозы, *L*-сорбозы и *D*-тагатозы максимальное поглощение при комнатной температуре достигается через 16—18 час при 560 мк. Коэффициенты экстинкции этих трех кетогексоз отличаются друг от друга не более чем на 10%. Фосфаты *D*-фруктозы и инулин реагируют так же, как и сама фруктоза. Кетогептозы дают сине-фиолетовую окраску с максимумом поглощения при 590 мк. Кетогептоза дает окраску быстрее кетогексозы. Седогептулозо-7-фосфат реагирует так же, как и седогептулоза, но седогептулозан реагирует слабее. Гликолевый альдегид, глицериновый альдегид, диоксиацетон и метилглиоксаль дают пурпурную или синюю окраску с максимумом поглощения между 600 и 650 мк. Очень часто удается исключить влияние таких веществ дихроматическими отсчетами при двух длинах волн, при которых эти вещества дают идентичные коэффициенты экстинкции. Например, влияние триоз можно исключить, проводя измерения при 560 и 750 мк. Коэффициенты молярной экстинкции кетогексоз и кетопептоз при максимальной интенсивности окраски почти идентичны, а поглощение соответствует закону Бера в пределах концентраций от 2 до 20 г/мл. Если присутствуют триозы, оптическая плотность  $D_{560} - D_{750}$  для *D*-фруктозы остается неизменной при концентрации триозы ниже 5 г/мл.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dische Z., Borenfreund E., J. Biol. Chem., **192**, 583 (1951).
2. Cohen S. S., J. Biol. Chem., **201**, 71 (1953).

## Цветные реакции тетроз

### 3. Дисхе

Тетрозы и низшие гомологи не могут образовывать производные фурана и не дают окрашенных продуктов при добавлении серной кислоты и *L*-цистеина, если они являются единственными сахарами в растворе. Однако тетрозы могут сочетаться с продуктами распада высших сахаров, образуя вещества с характерными спектрами поглощения в видимой части спектра.

### РЕАКЦИЯ ТЕТРОЗ С *D*-ФРУКТОЗОЙ, СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ И *L*-ЦИСТЕИНОМ [1]

К 0,5 мл раствора тетроз с концентрацией 10—50 г/мл добавляют при охлаждении водой со льдом 0,5 мл 0,1%-ного раствора *D*-фруктозы и 4,5 мл смеси из 1 части воды и 6 частей концентрированной серной кислоты. Смесь оставляют на несколько минут, после чего в течение нескольких минут охлаждают водой со льдом, затем несколько минут водопроводной водой и, наконец, нагревают точно 3 мин на сильно кипя-

щей водяной бане. Одновременно проводят холостой опыт, где вместо раствора тетрозы используют воду. Горячую реакционную смесь немедленно охлаждают водопроводной водой. К приготовленной таким образом смеси раствора тетрозы и серной кислоты добавляют 0,1 мл 3%-ного раствора моногидрата солянокислого L-цистеина. Смесь оставляют на ночь при комнатной температуре, по окончании выдержки добавляют 1,2 мл воды. Первоначальная желтая окраска раствора изменяется до зеленовато-желтой с максимумом поглощения при 458 мμ; максимум достигается приблизительно через 10 час и остается постоянным в течение длительного времени. Отсчеты сравнивают с пробой холостого опыта, которая имеет слабую фиолетовую окраску.

Все тетрозы — D-эритроза, D-треоза и D-глицеро-тетрулоза (D-эритролоза) — дают в этих реакциях почти идентичные кривые поглощения. Другие моносахариды также влияют на вторичную реакцию D-фруктозы с цистеином и дают различные окраски, которые, однако, значительно менее интенсивны, чем те, которые дают тетрозы, и совершенно различны по своим спектрам поглощения. Из низших членов ряда только у гликолевого альдегида кривая поглощения имеет такую же форму, как и кривая тетроз, но величина его коэффициента молярной экстинкции равна только  $1/20$  его величины для D-эритрозы. Триозы и их фосфаты не образуют окрашенных продуктов. Формальдегид дает нехарактерное коричневое окрашивание с почти постоянным поглощением между 400 и 500 мμ, которое не влияет на определение тетроз.

Оптическая плотность при 458 мμ и разность  $D_{458} - D_{480}$  пропорциональны концентрации тетроз в пределах между 10 и 40 γ/мл. Коэффициенты молярной экстинкции D-эритрозо-4-фосфата и D-эритрозы имеют одинаковую величину, у D-треозы и D-эритролозы они соответственно на 21 и 26% выше, чем у D-эритрозы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dische Z., Dische M. R., Biochim. et Biophys. Acta, 27, 184 (1958).

## Цветные реакции пентоз

### 3. Дисхе

Цветные реакции для пентоз, за одним-единственным исключением, были испытаны только на альдопентозах. Гексуроновые кислоты реагируют как пентозы, хотя в некоторых реакциях коэффициенты экстинкции гексуроновых кислот намного меньше, чем у пентоз.

### ОБЩИЕ ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ПЕНТОЗ

Кетопентозы образуют в этих реакциях окрашенные продукты, идентичные или очень похожие на те, которые дают альдопентозы. Во всех таких реакциях, согласно литературным данным, гексуроновые кислоты реагируют как пентозы, но образуют вещества с менее интенсивной окраской.

### **Реакция с анилином и соляной кислотой [1]**

Пентозу нагревают с соляной кислотой, образующийся при этом фурфурол непрерывно экстрагируется ксилолом и конденсируется с анилином; продукт конденсации окрашен в красный цвет.

1 мл раствора пентозы (10—80 γ сахара) нагревают 2,5 час с 2 мл 5,55 н. соляной кислоты и 5 мл ксилола при 100° в пробирке с воздушным холодильником. Закрыв пробирку притертой пробкой, реакционную смесь энергично перемешивают, водную фазу удаляют и к смеси добавляют ксилол до конечного объема 7 мл. Ксилольный раствор сушат безводным сульфатом натрия. Затем 5 мл этого раствора смешивают с 5 мл свежеприготовленного 4,5%-ного (по объему) раствора анилина в смеси ледяной уксусной кислоты и спирта (4 : 1). Смесь ставят точно на 18 мин в баню со льдом и измеряют спектр поглощения против пробы холостого опыта и стандартного раствора при 540 мμ; 45 γ пентозы дают оптическую плотность 0,2.

Эта реакция была опробована только на альдопентозах, но так как она основана на образовании фурфурола, то можно предполагать, что кетопентозы будут реагировать точно так же. Реакция не полностью специфична, поскольку оксиметилфурфурол при нагревании его с кислотой образует малые количества фурфурола. Коэффициент экстинкции для D-глюкозы составляет только  $1/1000$  его величины для пентозы. Однако 6-дезоксигексозы дают желто-коричневую окраску, и в их присутствии реакция может применяться, несмотря на ее трудоемкость и относительно малую чувствительность.

### **Реакция пентоз с L-цистеином и серной кислотой [2]**

Реакция проводится по методике, описанной выше, как общая реакция углеводов с L-цистеином и серной кислотой.

Максимальная интенсивность окраски раствора при комнатной температуре достигается через 15—20 мин после прибавления L-цистеина, максимум поглощения наблюдается при 390 мμ. Поглощение у максимума медленно, но непрерывно, падает и полностью исчезает примерно через 24 час.

Все альдопентозы и кетопентозы дают одинаковые спектры поглощения. Оптическая плотность растворов изменяется в соответствии с законом Бера в пределах концентраций пентозы от 5 до 50 γ/мл. Коэффициенты экстинкции кетопентоз в несколько раз выше, чем у соответствующих альдопентоз. Коэффициенты экстинкции D-рибозы, D-арабинозы и D-ликсызы очень мало отличаются друг от друга. Для D-ксилозы он примерно на 80% выше, чем для D-рибозы. Фосфаты D-рибозы, замещенные в положении 3, реагируют как свободный сахар. Однако коэффициент экстинкции D-рибозо-5-фосфата, так же как и D-рибулозо-5-фосфата, примерно в 18 раз ниже, чем у D-рибозо-3-фосфата. Коэффициент экстинкции рибонуклеиновой кислоты несколько выше, чем это соответствует пуриновым нуклеотидам. Гексозы, если они присутствуют в растворе, увеличивают поглощение при 390 мμ, однако их влияние можно исключить, применив дихроматические измерения при 390 мμ и в интервале 420—426 мμ в зависимости от способа приготовления кисло-

ты и температуры, при которой стандартный раствор гексозы имеет такую же оптическую плотность, как и при 390 мкм.

Для пентоз поглощение при 424 мкм является малой частью их поглощения при 390 мкм. 2-Дезокси-пентоза и дезоксирибонуклеиновая кислота незначительно влияют на поглощение при 390 мкм, за исключением тех случаев, когда они присутствуют в 10-кратном избытке. Однако 6-дезоксигексозы мешают количественному определению пентоз, и, если это необходимо, поправку на их присутствие вычисляют по количеству 6-дезоксигексозы, определенной отдельно.

Гексуроновые кислоты дают идентичные кривые поглощения, но с коэффициентом экстинкции приблизительно в 10 раз меньшим, чем для пентоз.

### *Реакция пентоз с орсином по Биалю*

Эта реакция впервые была применена в спектрометрии в 1937 г. [3]; в дальнейшем она широко использовалась для количественного определения нуклеотидов и рибонуклеиновых кислот. Эти определения можно проводить несколькими способами. Один из них, наиболее часто применяемый, был предложен Мойбаумом [4]; он приводится ниже.

К 1 части раствора испытуемого вещества добавляют равный объем концентрированной соляной кислоты с уд. весом 1,19, содержащей 0,1% гексагидрата хлорного железа и 0,1% орсина. Смесь нагревают 20 или, согласно Альбауму и Умбрайт [5], 45 мин. Стандартные растворы и пробу холостого опыта обрабатывают одновременно и измеряют оптическую плотность растворов при максимуме поглощения 670 мкм.

Реакция Биаля неспецифична. 6-Дезоксигексозы, гексуроновые кислоты, гептозы, триозы и при больших концентрациях D-манноза и D-галактоза дают зеленое окрашивание с максимумом поглощения между 650 и 670 мкм. Эта реакция отличается высокой чувствительностью: она позволяет определить пентозы в растворах, где концентрация их составляет всего 1 γ/мл. Однако, как уже говорилось выше, реакция Биаля неспецифична, и получить надежные результаты, используя эту реакцию, можно только при условии, что влияние других сахаров полностью исключено, или если вводить соответствующую поправку на их присутствие.

Если в растворе присутствует D-глюкоза или D-фруктоза, которые дают коричневое или красновато-коричневое окрашивание с орсином, их влияние можно исключить, проводя дихроматические измерения при 670 мкм и несколько ниже 600 мкм. При длине волны 600 мкм соответствующие гексозы имеют те же коэффициенты экстинкции, что и при 670 мкм. Четыре альдопентозы в этой цветной реакции имеют почти одинаковые коэффициенты экстинкции, а коэффициенты экстинкции пуринных рибонуклеотидов и свободной пентозы идентичны. Однако скорость появления окраски для D-рибозо-5-фосфата много выше, чем для свободной D-рибозы или D-рибозо-3-фосфата, что можно использовать для дифференциации и количественного определения двух типов D-рибозофосфатов [5]. Пиримидиновые рибонуклеотиды не вступают в эту реакцию, за исключением тех случаев, когда пиримидины до введения в реакцию подвергаются бромированию и продолжительному кислотному гидролизу при 105° [6]. Кетопентозы дают зеленую окраску с максимумом поглощения при 670 мкм.



### ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ АЛЬДОПЕНТОЗ

Из всех известных цветных реакций пентоз только одна позволяет отличить пентозы от гексуроновых кислот качественно по видимой окраске. Эта реакция не проверялась для кетопентоз.

#### *Реакция альдопентоз с $\beta$ -нафтолом и серной кислотой [7]*

К 3—4 мл 0,3%-ного раствора  $\beta$ -нафтола в концентрированной серной кислоте осторожно добавляют 1 мл раствора пентозы (100—1000  $\gamma$ /мл) так, чтобы он остался над тяжелым сернокислотным слоем. На поверхности раздела появляется темно-синее кольцо. После осторожного встряхивания окрашенный в синий цвет продукт реакции диффундирует в слой серной кислоты.

Гексуроновые кислоты дают в этих условиях красно-коричневую окраску; гексозы — от желто-зеленой до коричневой; D-эритроза и D-эритрулоза — зеленую; фурфурол — оранжевую. Следовательно, окраска не обязана своим появлением фурфуролу, и поэтому кетопентозы могут и не реагировать так же, как альдопентозы.

#### *Реакция альдопентоз с флороглюцином и соляной кислотой*

*Качественная проба (реакция Уилера — Толленса) [8].* К 1 объему раствора сахара добавляют равные объемы концентрированной соляной кислоты и флороглюцина. Смесь нагревают на кипящей водяной бане, при этом образуются продукты, окрашенные в фиолетово-красный цвет, которые можно проэкстрагировать *n*-амиловым спиртом. При высоких концентрациях пентозы образуется осадок, который можно отфильтровать, промыть водой и растворить в спирте; спиртовый раствор окрашен в красно-фиолетовый цвет. Эта реакция не является специфичной для пентоз, так как гексуроновые и гексоновые кислоты дают такую же окраску. Реакции также мешает большой избыток гексозы. 6-Дезокси-пентозы при сравнимых концентрациях не мешают.

#### *Реакция с флороглюцином, ледяной уксусной кислотой, D-глюкозой и соляной кислотой [9]*

Для микропроб и количественных определений пентоз в присутствии избытка других сахаров реакция с флороглюцином применяется в следующем модифицированном виде.

К 0,4 мл раствора, содержащего от 10 до 50  $\gamma$  пентозы или эквивалентное количество сложных эфиров пентозы, добавляют 5 мл свежеприготовленного реагента из 110 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл концентрированной соляной кислоты, 4,5 мл свежеприготовленного 5%-ного раствора флороглюцина в спирте и 1 мл 0,8%-ного раствора D-глюкозы. Одновременно обрабатывают стандартный раствор (холостой опыт) с водой вместо раствора сахара. Реакционную смесь нагревают 15 мин на кипящей водяной бане. Появляется пурпурное окрашивание с максимумом поглощения при 552 мкм. Спектрофотометрические измерения проводят непосредственно после охлаждения реакционной смеси водопроводной водой до комнатной температуры.

Пурпурную окраску дают только альдопентозы. D-Рибулоза (D-эритро-пентулоза) и D-ксилулоза (D-трео-пентулоза) дают зеленую окраску с максимумом поглощения при 470 мк. Гексуриновые кислоты реагируют, как и пентозы, но их коэффициенты экстинкции при 552 мк значительно ниже и кривые поглощения имеют другую форму.

Альдо- и кетогептозы дают окраски более красно-коричневых тонов, а гексозы — нехарактерную коричневую окраску. Величины коэффициентов экстинкции при 552 мк для четырех альдопентоз почти одинаковы, и D-рибозо-3-фосфат и соответствующие нуклеотиды реагируют, как и D-рибоза. Однако коэффициенты экстинкции D-рибозо-5-фосфата и соответствующих пуриновых нуклеотидов в два раза выше, чем для 3-фосфатов. Гексозы и гептозы также поглощают при 552 мк, однако это влияние можно исключить применением дихроматических измерений при 552 и 510 мк. Разность  $D_{552} - D_{510}$  для гексоз и гептоз не существенна и является линейной функцией концентрации пентозы в растворе. При количественном анализе исследуемые растворы нужно сравнивать со стандартными, так как пурпурная окраска постепенно ослабевает.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Borrow A., Jeffreys E. G., Analyst, **81**, 598 (1956).
2. Dische Z., J. Biol. Chem., **181**, 379 (1949).
3. Dische Z., Schwartz K., Microchim. Acta, **2**, 13 (1937).
4. Meijbaum W., Z. physiol. Chem., **258**, 117 (1939).
5. Albaum H. G., Umbreit W. W., J. Biol. Chem., **167**, 369 (1947).
6. Massart L., Hoste J., Biochim. et Biophys. Acta, **1**, 83 (1947).
7. Thomas P., Bull. soc. chim. biol., **7**, 102 (1925).
8. Wheeler H. J., Tollens B., Ann., **254**, 329 (1889).
9. Dische Z., Borenfreund E., Biochim. et Biophys. Acta, **24**, 189 (1957).

## Цветные реакции гексоз

### З. Дисхе

#### ОБЩИЕ ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ГЕКСОЗ

##### Реакция гексоз с L-цистеином и серной кислотой

Первичная реакция гексоз с L-цистеином и серной кислотой [1]. К 1 мл раствора, содержащему 10—100 γ гексозы, добавляют при охлаждении водой со льдом 5 мл 86%-ной (по объему) серной кислоты (1 часть воды на 6 частей серной кислоты). Через 2 мин пробу осторожно встряхивают, не вынимая из охлаждающей бани, затем помещают на 1 мин в баню с водопроводной водой, после чего нагревают 3 мин на сильно кипящей водяной бане. После охлаждения водопроводной водой добавляют 0,1 мл 3%-ного раствора моногидрата солянокислого L-цистеина и пробу энергично встряхивают. Появляется желтое окрашивание, интенсивность которого достигает максимума уже через несколько минут. Максимум поглощения соответствует 412—414 мк. Относительный коэффициент экстинкции, если за единицу принять коэффициент экстинкции D-глюкозы, равен 0,5 для D-галактозы, 0,4 для D-маннозы и 1,12 для

D-фруктозы. Коэффициент экстинкции D-глюкозы, D-фруктозо-6-фосфата и гликогена соответствует содержанию в них гексозы. Желтая окраска продукта реакции, по-видимому, весьма специфична для гексоз, особенно если она исчезает при добавлении 2 мл воды.

Однако при количественных определениях другие сахара могут мешать определению поглощения при 414 мкм. Влияние пентоз (оно незначительно) и 6-дезоксигексоз можно исключить, принимая во внимание различие в положении их максимумов поглощения.

Так как 6-дезоксигексозы имеют максимум при 400 мкм, оптическая плотность 6-дезоксигексоз при 380 мкм равна или почти равна оптической плотности при 414 мкм. Разность  $D_{414} - D_{380}$  пропорциональна концентрации гексоз в растворе. Такие дихроматические отсчеты при различных определениях изменяются меньше, чем отсчеты при самом максимуме поглощения. Влияние пентоз и гексуриновых кислот при таких дихроматических отчетах незначительно. Если в растворе присутствуют гептозы, качественное и количественное определение гексоз может стать невозможным.

*Вторичная реакция гексоз с L-цистеином и серной кислотой* [1]. Если окрашенную в желтый цвет реакционную смесь первичной реакции гексозы с цистеином оставить на ночь при комнатной температуре, желтая окраска меняется на окраску, характерную для каждой индивидуальной гексозы. D-Галактоза дает синюю окраску, D-глюкоза — зеленую, D-фруктоза — розовую. Желтая окраска D-маннозы переходит в коричневую. Для всех гексоз максимум поглощения находится при 605 мкм, хотя у них различные коэффициенты экстинкции. Так, для D-галактозы он в 10 раз выше, чем для D-маннозы, и в 2 раза выше, чем для D-глюкозы.

Неодинаковая окраска отдельных гексоз обусловлена различным поглощением при 605 мкм и в интервале 390—412 мкм, где имеется второй максимум. Оптическая плотность раствора при 605 мкм пропорциональна концентрации гексозы только при условии, что она выше 100 γ/мл. При использовании вторичной реакции с L-цистеином для количественного определения необходимо поэтому добавлять к пробе холостого опыта, к стандартному раствору и к испытуемой пробе по 100 γ D-маннозы, чтобы обеспечить соответствующий уровень концентрации сахара.

*Реакция D-маннозы с L-цистеином и серной кислотой* [1]. К 0,8 мл раствора с концентрацией сахара от 20 до 200 γ/мл добавляют 0,2 мл 1,5%-ного раствора моногидрата солянокислого L-цистеина и 5 мл 75%-ной (по объему) серной кислоты (190 мл воды и 450 мл концентрированной серной кислоты). Смесь нагревают 10 мин на кипящей водяной бане, охлаждают и оставляют на 48 час при комнатной температуре.

В этой реакции почти все сахара дают соединения, область поглощения которых близка к ультрафиолетовой области спектра. Кривая поглощения для D-маннозы отличается от кривых, полученных для других гексоз и пентоз, наличием максимума при 370 мкм: другие гексозы и пентозы имеют максимумы в области более коротких волн. Максимум поглощения 6-дезоксигексозы соответствует 400 мкм, но поглощение для этих сахаров непрерывно падает и совершенно исчезает за 48—96 час в зависимости от температуры, в то время как для D-маннозы величина поглощения остается почти постоянной.

*Количественное определение гексоз с L-цистеином.* Реакция гексоз с L-цистеином особенно важна при определении нескольких гексоз в смеси с 6-дезоксигексозами. Как будет показано ниже, первичной реакцией гексоз с L-цистеином можно определить и 6-дезоксигексозы, изме-

рив оптическую плотность при 4 различных длинах волн. Для получения надежных количественных данных при проведении этой реакции нужно добавлять серную кислоту ко всем пробам приблизительно с одинаковой скоростью с тем, чтобы смесь нагревалась при этом также приблизительно одинаково. Далее, применение дихроматических измерений почти удваивает ошибку в определениях.

Из-за большого различия между величинами относительных коэффициентов экстинкции D-глюкозы, D-галактозы и D-маннозы в их реакции с L-цистеином и серной кислотой эту реакцию можно применять для количественного определения трех указанных гексоз в их смесях. В реакции с D-маннозой величина разности  $D_{370} - D_{400}$  используется для измерения концентрации гексозы, но если в растворе присутствует 6-дезоксигексоза, измерение нужно производить через 96 час после нагревания.

### ***Реакции гексоз с хромотроповой кислотой (4,5-диокси-2,7-нафталиндисульфокислота) и серной кислотой [2]***

При нагревании оксиметилфурфурола с серной кислотой отщепляется формальдегид, который можно определить по его специфической реакции с хромотроповой кислотой.

1 мл раствора гексозы, содержащий 50 γ сахара, нагревают с 5 мл 2,2%-ного раствора хромотроповой кислоты (см. стр. 58) в 15 н. серной кислоте. К охлажденной реакционной смеси добавляют 9 мл концентрированной серной кислоты; появляется фиолетовое окрашивание с максимумом поглощения при 570 мμ, которого не дают пентозы или 6-дезоксипентозы. Реакция сахаров других классов с этим реагентом не изучалась, также нет данных относительно воспроизводимости интенсивности окраски. При концентрации сахаров 50 γ/мл оптическая плотность раствора равна 0,3 для D-глюкозы и 0,2 для D-галактозы и D-маннозы.

### ***Реакция с антроном (количественное определение) [3]***

Реакцию с антроном можно применять для количественного определения гексоз, так как, изменив условия реакции, удалось добиться того, что влияние пентоз, гексуриновых кислот и 2-дезоксипентоз становится заметным только в тех случаях, когда их концентрации превышают некоторый определенный уровень.

Два объема 2%-ного свежеприготовленного раствора антрона в 100 мл концентрированной серной кислоты охлаждают в водяной бане при температуре 10—15°. 1 объем раствора гексозы с концентрацией 100—200 γ/мл осторожно настилают поверх серной кислоты. Смесь охлаждают, встряхивают, доводят до комнатной температуры, нагревают 16 мин на кипящей водяной бане и снова охлаждают до комнатной температуры. Синюю окраску с максимумом поглощения при 625 мμ дают не только гексозы, но и 6-дезоксигексозы. Оптическая плотность при 625 мμ изменяется в соответствии с законом Бера. Пентозы в этих условиях дают желтую окраску, а коэффициент экстинкции для пентоз при 625 мμ равен всего нескольким процентам коэффициента экстинкции для гексоз. Гексуриновые кислоты при сравнимых концентрациях не оказывают влияния, если спектрофотометрические измерения проводят непосредственно после завершения реакции [4].

Гептозы и 2-дезоксипентозы дают красную окраску с максимумом поглощения между 520 и 560 *ммк* [5]. 6-Дезоксигексозы, как упоминалось выше, поглощают в той же области, что и гексозы, и, если они присутствуют в растворе, нужно вводить соответствующие поправки. Поэтому необходимо отдельно определить 6-дезоксигексозы.

Белок может мешать определению из-за присутствия в нем триптофана. При высоком содержании триптофана вместо голубой окраски появляется красная с максимумом поглощения при 530 *ммк* [6]. Другие органические соединения, например аскорбиновая, пиروвиноградная и молочная кислоты, также дают красную окраску с антроновым реагентом. Хотя реакция с антропом широко применяется для определения гексоз, она, по-видимому, не имеет особенных преимуществ перед другими реакциями углеводов, за исключением тех случаев, когда исследуемые растворы свободны от мешающих определению органических веществ и содержат небольшие количества других сахаров, не считая гексуриновых кислот.

### ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ АЛЬДОГЕКСОЗ

#### *Реакция с о-аминодифенилом и ледяной уксусной кислотой [7]*

К 1 *мл* раствора, содержащему 10—100  $\gamma$  альдогексозы, добавляют 5 *мл* 0,4%-ного раствора *о*-аминодифенила в ледяной уксусной кислоте. *о*-Аминодифенил должен иметь т. пл. 49°, продажный препарат следует обесцветить углем и дважды перекристаллизовать из водного спирта. Реагент можно хранить не более 2—3 дней при температуре 4°. Реакционную смесь нагревают 45 *мин* при 100°, появляется зеленая окраска с максимумом поглощения между 360 и 390 *ммк*. Альдогексозы дают зеленую окраску, если их концентрация превышает 10  $\gamma/\text{мл}$ ; оптическая плотность растворов изменяется в соответствии с законом Бера. *Д*-Фруктоза и сахароза в сравнимых концентрациях не дают этой реакции и не мешают определению. Олигосахариды, содержащие альдогексозы, реагируют так же, но для достижения максимальной интенсивности окраски необходимо длительное нагревание. Коэффициенты экстинкции *Д*-глюкозы, *Д*-маннозы и *Д*-галактозы почти идентичны, если достигнута максимальная интенсивность окраски. Альдопентозы, 6-дезоксигальдогексозы и гексуриновые кислоты дают желтую и желто-коричневую окраску, но заметное поглощение наблюдается при 380 *ммк*.

### ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ КЕТОГЕКСОЗ

#### *Качественные пробы*

*Реакция с мочевиной* [8]. В фарфоровую чашку помещают 0,5—1 *г* мочевины и добавляют 5—6 капель концентрированной соляной кислоты и 2—3 капли раствора *Д*-фруктозы с концентрацией не ниже 100  $\gamma/\text{мл}$ . Смесь осторожно встряхивают, пока мочевина не растворится, и затем нагревают на кипящей водяной бане. Через 15 *мин* *Д*-фруктоза дает бирюзово-синее кольцо; альдогексозы дают красную или пурпурно-красную окраску, а альдопентозы — желтую. Окрашенные в синий

цвет продукты реакции D-фруктозы экстрагируются спиртом, в присутствии щелочей синяя окраска обратимо переходит в красную.

**Реакция с амингуанидином** [9]. К 0,4 мл раствора сахара (200 г/мл) добавляют 0,4 мл 2,5%-ного раствора сернокислого амингуанидина и 1 мл концентрированной серной кислоты, содержащей 1% бихромата калия. Уже через 1 мин раствор окрашивается; D-фруктоза дает винно-красную окраску, альдогексозы — синюю и альдопентозы — желтую.

**Реакция фруктозы с  $\alpha$ -нафтолом** [10]. К 1 мл раствора D-фруктозы (100—200 г/мл) прибавляют 0,2 мл 2%-ного спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола<sup>1</sup> и 4,8 мл 75%-ной (по объему) серной кислоты. Через несколько минут появляется синева-фиолетовая окраска с интенсивной полосой поглощения около 500 мкм. Для альдогексоз и альдопентоз характерна красно-пурпурная окраска, и они не дают видимого поглощения при 500 мкм даже при концентрациях в 100 раз больших.

### Количественные определения

Цветные реакции, которые до сих пор применяются для количественного определения кетогексоз, не являются специфическими для этого класса сахаров, так как во всех этих реакциях альдогексозы дают окраску такого же рода, хотя и при значительно более высоких концентрациях.

**Реакция с L-цистеином и серной кислотой** [11]. К 0,4 мл раствора, содержащего 50—240 г кетогексозы, добавляют 0,1 мл 20%-ного раствора моногидрата солянокислого L-цистеина и 5 мл 75%-ной (по объему) серной кислоты. Смесь энергично встряхивают и оставляют на 3—4 час при комнатной температуре. Затем производят измерение на спектрофотометре Бекмана при максимуме поглощения (412 и 380 мкм). D-Фруктоза, L-сорбоза и D-тагатаза дают интенсивную желтую окраску, которая переходит в синюю, очень быстро для L-сорбозы и более медленно для двух других кетогексоз. После того как смесь простояла ночь, она дает второй максимум поглощения при 605 мкм. После 4-часовой выдержки все три кетогексозы, так же как фосфаты D-фруктозы, имеют очень близкие коэффициенты экстинкции при 412 мкм. Оптическая плотность  $D_{412}$  —  $D_{380}$  для всех трех соединений подчиняется закону Бера.

D-Глюкоза, D-галактоза и D-манноза реагируют в 100—200 раз слабее кетогексозы. Гептулозы и кетопентозы при концентрации раствора 100 г/мл дают слабую розовую окраску, которая становится едва заметной через 4 час.

Для D-глюко-гептулозы и седогептулозы (D-альтро-гептулоза)  $D_{412}$  —  $D_{380}$  равна нулю, а для D-фруктозы она составляет только  $1/60$  оптической плотности раствора, содержащего эквивалентные количества кетопентозы. L-Сорбозу можно отличить от D-фруктозы и D-тагатазы по отношению  $D_{605}/D_{412}$ , которое значительно больше для нее, чем для двух остальных. 0,1%-ный раствор D-глюкозы дает только очень слабую голубую окраску через 24 час, а D-манноза и D-галактоза при этой концентрации совсем не дают окраски.

**Реакция с резорцином и соляной кислотой** [12]. К 1 мл раствора, содержащему 10—50 г кетогексозы, добавляют 4 мл смеси из 7 частей

<sup>1</sup>  $\alpha$ -Нафтол предварительно растворяют в эквивалентном количестве раствора едкого натра, осаждают кислотой, промывают кислотой, а затем водой, не содержащей солей, и высушивают в вакууме.

30%-ной соляной кислоты (5 объемов концентрированной соляной кислоты на 1 объем воды) и 1 части реактива, приготовленного растворением 0,1 г резорцина и 0,25 г тиомочевины в 100 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь нагревают 10 мин на водяной бане при 80° с частым встряхиванием и затем охлаждают водопроводной водой. Появляется фиолетовая окраска. Кетогептоза дает почти идентичную окраску, а кетопентозы — желтую и зеленую окраску значительной интенсивности. Спектр поглощения кетогексоз имеет максимум при 515 мμ. Коэффициенты экстинкции при этой длине волны очень близки к коэффициентам экстинкции D-фруктозы, L-сорбозы и D-тагатозы, но эти три кетогексозы значительно отличаются по интенсивности поглощения в синей части спектра, что можно использовать для их дифференциации. Из кетопентоз только D-ксилулоза (D-трео-пентулоза) в отличие от D-рибулозы (D-эритро-пентулоза) дает максимум поглощения при 620 мμ. Гликолевый альдегид и аденозин-5-фосфат мешают определению; они дают окраску, подобную окраске кетогексоз. Альдогексозы реагируют так же, как и кетогексозы; отношение коэффициентов экстинкции D-фруктозы и D-галактозы при 515 мμ равно 70. Таким образом, эта реакция менее чувствительна и менее специфична для кето- и альдогексоз, чем реакция с L-цистеином и карбазолом.

*Реакция с 3-метилиндолом* [13—15]. К 1 мл раствора сахара (20—100 γ/мл) добавляют 1 мл 0,04%-ного раствора скатола<sup>1</sup> (3-метилиндола) и 8 мл 30%-ной соляной кислоты (5 частей концентрированной соляной кислоты на 1 часть воды). Пробу оставляют на 6 час при 38° и одновременно проводят холостой опыт с водой вместо раствора сахара. По окончании выдержки пробу охлаждают до комнатной температуры и экстрагируют 10 мл хлороформа. Появляется пурпурная окраска с максимумом поглощения при 510 мμ. Альдогексозы реагируют в 100—200 раз слабее D-фруктозы. Присутствие альдопентоз влияет на реакцию в той же степени. Реакции кетопентоз и кетогептоз не изучались.

*Реакция сахарозы с диазоурацилом* [16, 17]. К 40—50 мг сахарозы, растворенной в 5 мл 0,05 н. раствора едкого натра, добавляют 7—10 мг диазоурацила. Через несколько минут после растворения реагента появляется сине-зеленое окрашивание, которое устойчиво в течение недолгого времени при температуре ниже 10°. Реакция, по-видимому, пригодна для установления типа связи между D-фруктозой и D-глюкозой в сахарозе, так как олигосахариды, содержащие в своей молекуле остаток сахарозы, такие, как рафиноза, генцианоза и стахиоза, также дают положительную реакцию. Сами D-фруктоза, D-ксилулоза (D-трео-пентулоза) и кетогептозы, так же как и альдозы, дают нехарактерную желтую и коричневую окраску.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dische Z., Shettles L. B., Osnos M., Arch. Biochem., **22**, 169 (1949).
2. Klein B., Weismann M., Anal. Chem., **25**, 774 (1953).
3. Scott T. A., Melvin E. H., Anal. Chem., **25**, 1650 (1953).
4. Helbert J. R., Brown K. D., Anal. Chem., **28**, 1098 (1956).
5. Koehler L. H., Anal. Chem., **26**, 1334 (1954).
6. Shettler M. R., Anal. Chem., **24**, 1844 (1952).

<sup>1</sup> Раствор скатола можно хранить при 4° несколько дней.

7. Timell T. E., Glaudemans C. P. J., Currie A. L., Anal. Chem., **28**, 1916 (1956).
8. Fearon W. R., Drum J. A., Analyst, **74**, 56 (1950).
9. Tauber H., Anal. Chem., **25**, 826 (1953).
10. Dische Z., Mikrochemie, **7**, 33 (1929).
11. Dische Z., Devi A., Biochim. et Biophys. Acta, **39**, 140 (1960).
12. Roe J. H., Epstein J. H., Goldstein N. P., J. Biol. Chem., **78**, 839 (1959).
13. Dische Z., Popper H., Biochem. Z., **175**, 321 (1926).
14. Pogell B. M., J. Biol. Chem., **211**, 143 (1954).
15. De Carvalho C. A., Pogell B. M., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 206 (1951).
16. Raybin H. W., J. Am. Chem. Soc., **55**, 2603 (1933).
17. Raybin H. W., J. Am. Chem. Soc., **59**, 1402 (1937).

## Цветные реакции гептоз и октоз

### 3. Динс

#### ОБЩИЕ РЕАКЦИИ ГЕПТОЗ

##### *Реакция гептоз с орсином и соляной кислотой [1]*

К 2 мл раствора кетогептозы (20—100  $\gamma/\text{мл}$ ) или альдогептозы (100—500  $\gamma/\text{мл}$ ) в пробирке с притертой стеклянной пробкой прибавляют 0,4 мл концентрированной соляной кислоты (уд. вес 1,19). Смесь погружают на 1 час в кипящую водяную баню, затем добавляют 0,4 мл раствора, содержащего 13 мг гексагидрата хлорного железа на 100 мл 2 н. соляной кислоты, и 0,15 мл 6%-ного раствора орсина в спирте. Пробирку погружают в кипящую водяную баню точно на 3 мин. Раствор гептозы окрашивается в сине-фиолетовый цвет. Его разбавляют равным количеством дистиллированной воды, и окраска переходит в красно-фиолетовую. Если сине-фиолетовую реакционную смесь, полученную после 3-минутного нагревания с орсином, разбавить двойным объемом спирта или ледяной уксусной кислоты, синевато-фиолетовая окраска изменится на зеленовато-синюю. Фиолетовый раствор, полученный после добавления воды, имеет максимум поглощения при 560—565  $\text{м}\mu$ . После добавления ледяной уксусной кислоты максимум сдвигается к 610  $\text{м}\mu$ , а после добавления спирта — к 620  $\text{м}\mu$ . Гексозы, пентозы, октозы и 7-дезоксигептозы в этой реакции не дают характерной окраски. Кетогексозы, если их концентрации превышают 100  $\gamma/\text{мл}$ , дают красную окраску с максимумом при 530  $\text{м}\mu$ , положение которого не изменяется при добавлении спирта или ледяной уксусной кислоты. Оптическая плотность растворов изменяется в соответствии с законом Бера.

##### *Реакция с L-цистеином и серной кислотой*

Если приведенную выше методику первичной реакции гексоз и L-цистеина с серной кислотой (см. стр. 30) использовать для растворов гептозы, то после добавления L-цистеина немедленно появляется оранжевая окраска. Она медленно бледнеет и переходит в розовую, достигая



максимальной интенсивности через 6 час при комнатной температуре. Максимум поглощения конечного пурпурного продукта реакции соответствует 510 мкм. Реакция с L-цистеином сопровождается уменьшением поглощения, максимум смещается до 405 мкм, очевидно, вследствие образования 5-(1,2-диоксиэтил)фурфурола, который образуется из гентозы под действием кислоты.

Пентозы при высоких концентрациях также дают розовую окраску, однако максимум поглощения находится при 540 мкм. Разность оптической плотности при 510 и 540 мкм для пентоз отрицательна, в то время как для гентоз она положительна. Эта разность является линейной функцией концентрации гентозы. Разность  $D_{510} - D_{540}$  для раствора седогептулозана или седогептулозы с концентрацией 10 г/мл составляет примерно 0,1. Гексозы не оказывают влияния на эту реакцию; для них интенсивность поглощения в пределах 510—540 мкм очень незначительна.

### ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ КЕТОГЕНТОЗ

#### *Реакция с орсином (реакция Биалля) [1]*

К 1,5 мл раствора гентозы (10—25 г/мл) добавляют 3 мл концентрированной соляной кислоты, содержащей 0,05% гексагидрата хлорного железа, и 0,2 мл свежеприготовленного 6%-ного спиртового раствора орсина, дважды перекристаллизованного из бензола. Если реакционную смесь нагревать только 3 мин, альдогептозы, как и кетогептозы, дают зеленую окраску с максимумом поглощения при 585—595 мкм против пробы холостого опыта.

Если образец нагревать 20 мин и затем охладить до комнатной температуры, кетогептозы дают пурпурную окраску с максимумом поглощения при 560—570 мкм, а альдогексозы — зеленую окраску с максимумом поглощения, различным для каждой альдогептозы, лежащим в пределах 600—665 мкм.

#### *Реакция кетогептоз с флороглюцином [1]*

К 2 мл раствора кетогептозы (50—200 г/мл) добавляют 0,4 мл концентрированной соляной кислоты и смесь нагревают в пробирке с притертой пробкой в течение 1 час на кипящей водяной бане и затем охлаждают до комнатной температуры. К полученному раствору добавляют 5 мл реактива, содержащего 4,8 мл ледяной уксусной кислоты и 0,2 мл 5%-ного раствора флороглюцина в спирте. Смесь нагревают 60 сек при 100° и охлаждают до комнатной температуры. Кетогептозы в отличие от альдогептоз дают зеленую окраску с максимумом поглощения при 635 мкм. Интенсивность окраски раствора при стоянии при комнатной температуре вначале возрастает, а затем падает. Альдогептозы и другие сахара дают нехарактерное окрашивание (от желтого до коричневого).

### ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ОКТОЗ [2]

Альдооктозы, как и кетооктозы, если их обрабатывать по методике, приведенной для первичной реакции гексоз с L-цистеином и серной кислотой (см. стр. 30), дают красновато-коричневую окраску с максимумом поглощения при 465—470 мкм; интенсивность окраски возрастает, если

реакционную смесь оставить на ночь при комнатной температуре. Если после появления окраски к образцу добавить 2 мл воды и охладить его водопроводной водой, раствор немедленно обесцвечивается, а затем вновь окрашивается в пурпурный цвет с максимумом поглощения при 505 ммк.

Эта реакция не вполне специфична, так как 7-дезоксигептозы реагируют точно так же. До сих пор были исследованы только три октозы. Спектры поглощения этих октоз, D-галакто-D-галакто-октозы, D-галакто-D-глюко-октозы и октулозо-1,8-дифосфата, полученного конденсацией D-рибозо-5-фосфата и 1,3-диоксипропанонфосфата в присутствии мускульной альдолазы, не полностью идентичны, хотя максимумы поглощения всех трех октоз лежат между 465 и 470 ммк. В присутствии гептоз необходимо определить отношение  $D_{470}/D_{510}$ , которое меньше единицы для гептоз и значительно больше единицы для октоз. Сдвиг максимума поглощения после добавления воды также позволяет различать октозы и гептозы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dische Z., J. Biol. Chem., 204, 983 (1953).
2. Dische Z., Ann. N.Y. Acad. Sci., 75, 129 (1958).

## Цветные реакции гексуроновых кислот

### 3. Дише

#### ОБЩИЕ ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ

#### *Реакция с нафторезорцином*

*Качественная проба (реакция Толленса)* [1, 2]. 1 объем раствора гексуроновой кислоты (1 мг/мл) нагревают с эквивалентным объемом 2 н. соляной или 50%-ной серной кислоты и 0,1 г нафторезорцина 1—2 мин на кипящей водяной бане. Помутневший раствор охлаждают и экстрагируют несколькими миллилитрами хлороформа. Появляется очень характерная сине-фиолетовая окраска, и, если соблюдать должную осторожность, можно избежать отрицательного влияния большого избытка других сахаров. Если реакцию ведут с соляной кислотой, на появление окраски не влияет даже 200-кратный избыток альдогексозы или альдопентозы. В присутствии D-фруктозы, чтобы избежать помех, нужно применять серную кислоту. Простые глюкуроны, находящиеся в моче, реагируют как D-глюкуроновая кислота. Но концентрация этих веществ при нормальных условиях недостаточна для положительной пробы в этой реакции.

*Количественное определение* [3]. К 2 мл раствора (10—80 γ) D-глюкуроновой кислоты добавляют 2 мл 0,25%-ного водного раствора нафторезорцина, приготовленного нагреванием реагента с водой в течение 1 час при 37° (реактив устойчив в течение 1 недели при 0°), и 3 мл концентрированной соляной кислоты. Пробы нагревают 2 час на кипящей водяной бане, охлаждают 10 мин во льду и тщательно экстрагируют

5 мл *n*-амилового спирта. Надосадочную жидкость отделяют и определяют поглощение при 607 мк.

Простые глюкуроны реагируют в этих условиях как *D*-глюкуроновая кислота. Однако присутствие *D*-глюкозы, *D*-фруктозы и пентоз мешает определению, так как величина поглощения эквивалентна 20% основного количества в случае *D*-глюкозы. Ни один вариант нафторезорциновой реакции не дает удовлетворительных результатов с полиуронидами [4].

### **Реакции гексуриновых кислот с карбазолом и серной кислотой [5]**

Эти реакции основаны на образовании 5-карбоксифурфуrolа, который с концентрированной серной кислотой дает окрашенное соединение с максимумом поглощения, идентичным наблюдаемому в реакции с гексуриновыми кислотами [6].

### **Реакция с 87%-ной серной кислотой [5]**

К 1 мл раствора (5—100 γ) гексуриновой кислоты добавляют 6 мл концентрированной серной кислоты при охлаждении водопроводной водой. Реакционную смесь нагревают 20 мин на кипящей водяной бане, охлаждают водопроводной водой, добавляют 0,2 мл 0,1%-ного спиртового раствора карбазола (продажный препарат нужно дважды перекристаллизовать из бензола) и оставляют на 2 час при комнатной температуре. Появляющаяся пурпурная окраска устойчива приблизительно 1 час, а затем начинает медленно бледнеть. Максимум поглощения соответствует 535 мк.

Коэффициенты экстинкции *D*-галактуриновой, *D*-маннуриновой, *L*-идуриновой и *L*-гулуриновой кислот составляют соответственно 120, 17, 29 и 32% коэффициента экстинкции *D*-глюкуроновой кислоты [7]. Но в то же время простые гексуриды и сульфаты полисахаридов, например хондроитин- и дерматансульфат, реагируют как эквивалентные количества соответствующих гексуриновых кислот. Для гепарина по неизвестной причине коэффициент экстинкции на 50% выше, чем это соответствует эквивалентному количеству *D*-глюкуроновой кислоты. Поглощение следует закону Бера в пределах концентраций гексуриновой кислоты от 5 до 100 γ/мл, что можно использовать для количественного определения этих кислот. В этой реакции гексозы дают коричнево-красную, а пентозы — желтую окраску с совершенно различными спектрами поглощения. Однако при количественных определениях следует учитывать поглощение, обусловленное присутствием гексоз, так как оно соответствует 5—7% *D*-глюкуроновой кислоты. Величина поглощения, обусловленная присутствием пентоз, составляет только 1% поглощения *D*-глюкуроновой кислоты. Присутствие в растворе других сахаров можно легко обнаружить, добавив к реакционной смеси после достижения максимальной интенсивности окраски 2 мл воды. При этом коричнево-красная окраска гексуриновых кислот исчезает и появляется пурпурная окраска гексоз и пентоз, интенсивность которой быстро возрастает. Соединения, содержащие сульфгидрильные группы, увеличивают интенсивность окраски для всех сахаров, и их присутствие делает количественное определение ненадежным.

Присутствие больших количеств белка подавляет окраску, но это влияние можно устранить, если применить внутренние стандарты.

Для обнаружения и определения индивидуальных гексуроновых кислот можно использовать то обстоятельство, что в реакции с карбазолом коэффициенты экстинкции различных гексуроновых кислот неодинаковы. В этом случае оптическую плотность исследуемого соединения в реакции с карбазолом сравнивают с его оптической плотностью в другой реакции, например в реакции Биала с орсином, в которой соотношение коэффициентов экстинкции индивидуальных гексуроновых кислот существенно отличается от их соотношения в реакции с карбазолом [7].

*Реакция с карбазолом в 83%-ной серной кислоте, позволяющая различить отдельные гексуроновые кислоты и мукополисахариды* [8]. 5,4 мл разбавленной водой серной кислоты (6 : 1 по объему) добавляют к 0,4 мл гексуроновой кислоты (0,05—0,5 мг/мл) при охлаждении водой со льдом. Реакционную смесь погружают в водопроводную воду, затем точно на 90 сек в водяную баню с температурой 60°, немедленно охлаждают водопроводной водой и добавляют 0,2 мл 0,1%-ного раствора карбазола. Появляется слабая пурпурная окраска; через 1 час проводят измерение оптической плотности при 535 мкм. Одновременно определяют оптическую плотность соответствующего стандартного раствора и пробы холостого опыта.

Коэффициент экстинкции для D-галактурановой кислоты, измеряемый через 1 час, приблизительно в 20 раз больше соответствующего коэффициента для D-глюкуроновой кислоты. Удовлетворительные результаты можно получить и при концентрации D-галактурановой кислоты 50 γ/мл.

Ментил-α-D-глюкуронид в 0,1%-ном растворе не дает окраски. То же наблюдается при исследовании некоторых полиуронидов, таких, как пектовая и альгиновая кислоты и полисахариды из пневмококков, содержащие гексуроновые кислоты. Однако мукополисахариды животного происхождения дают в этой реакции более интенсивную окраску, чем эквивалентные количества гексуроновых кислот.

Увеличение коэффициента экстинкции различно для каждого отдельного мукополисахарида. Это можно использовать для определения и характеристики препаратов мукополисахаридов.

Поглощение изменяется в соответствии с законом Бера, и это можно использовать для количественных определений гексуроновых кислот и уронидов. Но концентрации веществ в каждом случае должны быть взяты в соответствующих пределах; так, концентрация D-галактурановой и гудурановой кислот должна составлять 15—500 γ/мл. Присутствие в растворе гексоз и пентоз влияет на реакцию, поскольку они дают пурпурную окраску, интенсивность которой возрастает во времени; в этом случае при проведении измерений необходимо вводить соответствующие поправки, поэтому одновременно с обработкой испытуемого образца нужно вести измерения и для стандартных растворов гексоз и пентоз, присутствующих в испытуемом растворе.

#### РЕАКЦИЯ D-ГЛЮКУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ С ТИОГЛИКОЛЕВОЙ И СЕРНОЙ КИСЛОТАМИ [9]

##### *Качественные пробы*

К одному из двух образцов (0,8 мл) раствора D-глюкуроновой кислоты с концентрацией 10 γ/мл добавляют 0,2 мл 0,1—0,2%-ного раствора D-маннозы, а к другому — 0,2 мл воды. Обе пробы погружают в баню

со льдом и водой и добавляют к ним по 4,5 мл водного раствора серной кислоты (6 : 1 по объему). Пробу помещают на 2 мин в водопроводную воду, а затем на 3 мин в бурно кипящую водяную баню и снова охлаждают водопроводной водой. К реакционной смеси добавляют 0,1 мл 2,5%-ного (по объему) раствора тиогликолевой кислоты и оставляют на 24 час при комнатной температуре. В пробе, содержащей D-маннозу, появляется розовая окраска, вторая проба, без маннозы, может быть окрашена в коричневый цвет со слабым красноватым оттенком.

Большинство сахаров реагирует с тиогликолевой и серной кислотами, как описано выше, образуя окрашенные соединения. Но только D-глюкуроновая кислота и глюкуроны способны отчетливо изменять окраску в этой реакции, если в растворе присутствует D-манноза. D-Галактуроновая кислота и полисахариды, содержащие D-маннуровую, L-идуруновую или L-гулуруновую кислоты, не дают характерной розовой окраски, если в растворе присутствует D-манноза. В то же время гиалуриновая кислота и хондроитинсульфат реагируют как эквивалентные количества D-глюкуроновой кислоты. Гепарин не вступает в эту реакцию. Если в растворе в большом количестве присутствуют пентозы, розовая окраска появляется даже в отсутствие D-маннозы. D-Глюкуроновую кислоту можно легко обнаружить по спектрофотометрическим измерениям. В этом случае пробу испытуемого вещества, приготовленную с добавлением D-маннозы, нагревают одновременно с пробой холостого опыта, содержащей D-маннозу и воду вместо раствора D-глюкуроновой кислоты, и затем измеряют оптическую плотность раствора при 510 и 480 мкм по отношению к пробе холостого опыта. Разность  $D_{510} - D_{480}$  положительна для D-глюкуроновой кислоты и отрицательна, хотя и незначительна по величине, для D-галактуроновой и других гексуроновых кислот, гексоз и пентоз.

### **Количественное определение**

Реакция D-глюкуроновой кислоты с D-маннозой и тиогликолевой кислотой была применена для количественного определения D-глюкуроновой кислоты в полисахаридах в присутствии D-галактуроновой кислоты [10]. В этом случае длительность нагревания при 100° уменьшают до 2 мин и раствор с появившейся окраской оставляют на 50 час при температуре 20—24°. Оптическую плотность раствора определяют при 530 и 600 мкм. Разность  $D_{530} - D_{600}$  равна нулю для D-галактуроновой кислоты и 0,250 для растворов, содержащих 50 γ глюкуроновой кислоты. Для получения надежных результатов нужно тщательно контролировать концентрации реагентов и температуру инкубации.

### **РЕАКЦИЯ ГАЛАКТУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ С L-ЦИСТЕИНОМ И СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ [11]**

К 1 мл раствора, содержащему 80 γ или более галактуроновой кислоты, добавляют 4 мл концентрированной серной кислоты при охлаждении водопроводной водой. Смесь встряхивают, снова охлаждают, добавляют 0,1 мл 2,5%-ного раствора моногидрата солянокислого L-цистеина и затем оставляют на 24 час при комнатной температуре. Появляется зеленовато-синяя окраска, интенсивность которой возрастает в течение последующих 24 час.

Голубая окраска, появляющаяся в присутствии D-галактуроновой кислоты и D-галактуронидов, по-видимому, специфична. D-Глюкуроновая кислота, D-глюкурониды и полисахариды, выделенные из пневмококков типа III, при концентрации до 1,5 мг/мл дают различные оттенки желтого, коричневого и розового цвета. То же наблюдается и для гексоз, пентоз и 6-дезоксигексоз. Единственным исключением является гепарин; он дает характерную голубую окраску D-галактуроновой кислоты. В присутствии других сахаров окраска D-галактуроновой кислоты может быть затемнена. В этом случае ее все же можно обнаружить спектрофотометрически, так как разность оптической плотности при 600 и 540 мкм положительна для D-галактуроновой кислоты и D-галактуронидов и отрицательна для других гексуриновых кислот, гексоз и пентоз. Гепарин и в этом случае ведет себя как D-галактуроновая кислота.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tollens, Ber., **41**, 1788 (1908).
2. Neuberg C., Kobel M., Biochem. Z., **243**, 435 (1931).
3. Hanson S. W. F., Mills G. T., Williams R. T., Biochem. J., **38**, 274 (1944).
4. Meyer K., Bloch H. S., Chaffee E., Federation Proc., **1** 125 (1942).
5. Dische Z., J. Biol. Chem., **167**, 189 (1947).
6. Stutz E., Deuel H., Helv. Chim. Acta, **39**, 2126 (1956).
7. Hoffman P., Linker A., Meyer K., Science, **124**, 1252 (1956).
8. Dische Z. J. Biol. Chem., **183**, 489 (1950).
9. Dische Z., J. Biol. Chem., **171**, 725 (1947).
10. Masamune H., Aizawa I., Tôhoku J. Exp. Med., **65**, 359 (1957).
11. Dische Z., Arch. Biochem., **16**, 409 (1948).

## Цветные реакции 6-дезокси-, 3-дезоксиде- и 3,6-дидезоксигексоз

*З. Дише*

### ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ 6-ДЕЗОКСИГЕКСОЗ

Специфические цветные реакции 6-дезоксигексоз основаны на образовании в качестве хромогена 5-метилфурфурола, который конденсируется с проявляющим реагентом и образует окрашенные продукты.

#### *Реакция с ацетоном и соляной кислотой (качественная проба) [1]*

Раствор 0,5 мг 6-дезоксигексозы в 1—2 мл ацетона нагревают в течение 10 мин с 10 мл концентрированной соляной кислоты на кипящей водяной бане. Появляется малиново-красная окраска с максимумом поглощения около 550 мкм. Пентозы в этих условиях дают нехарактерное коричневое окрашивание.

### **Реакция 6-дезоксигексоз с тиолами в серной кислоте**

*Реакция 6-дезоксигексоз с L-цистеином и серной кислотой* [2]. Эта реакция проводится точно так же, как первичная реакция L-цистеина для гексоз (см. стр. 30). Дезоксигексозы (5—500  $\gamma$ /мл) поглощают в фиолетовой и ближней ультрафиолетовой области спектра с острым максимумом при 400 мкм. Поглощение достигает максимума при комнатной температуре через  $\sim 2$  час после добавления L-цистеина. Присутствие пентоз и гексуроновых кислот не мешает. Растворы гексоз имеют значительное поглощение при 400 мкм, так как в первичной реакции L-цистеина с гексозами образуется желтое окрашивание с максимумом поглощения при 412—414 мкм. Влияние гексоз можно исключить, применяя дихроматические измерения при 396 и 426—428 мкм, при которых стандартные растворы гексозы имеют такую же прозрачность, как и при 396 мкм.

Определение гексозы можно вести в том же образце при 380 и 412—414 мкм. Разность оптической плотности при этой длине волн для 6-дезоксигексоз незначительна. Влияние гексоз можно также исключить, если, прежде чем добавить L-цистеин, нагревать испытуемый раствор с серной кислотой в течение 10 мин вместо 3 мин, как предусмотрено методикой. Более длительное нагревание вызывает почти полное исчезновение поглощения гексоз, в то время как для 6-дезоксигексоз оно уменьшается только на 20% по сравнению с максимальным, достигнутым в результате 3-минутного нагревания. Если гексозы присутствуют в большом избытке, нужно приготовить стандартный раствор одной из гексоз, нагревать его одновременно с испытуемым образцом и, проводя необходимые измерения, ввести соответствующую небольшую поправку на содержание гексозы.

*Реакция 6-дезоксигексоз с тиогликолевой и серной кислотами.* Для качественной микропробы [3] к 1 мл раствора 6-дезоксигексозы (10—100  $\gamma$ /мл) добавляют 4,5 мл разбавленной серной кислоты (6 : 1 по объему) при охлаждении водой со льдом. Образец нагревают 3 мин при 100°, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 0,1 мл свежеприготовленного 2,5%-ного (по объему) раствора тиогликолевой кислоты в воде и смесь встряхивают. Появляется характерная для 6-дезоксигексоз желто-зеленая окраска.

При проведении количественных определений [4], чтобы избежать влияния других сахаров, длительность нагревания увеличивают до 10 мин. Спектрофотометрические измерения проводят после того, как интенсивность окраски достигнет максимума, т. е. через 30 мин при комнатной температуре. Чтобы устранить влияние других сахаров, применяют дихроматические измерения при 400 и 430 мкм. В этих условиях пентозы и гексуроновые кислоты не мешают определению, а присутствие гексоз сказывается только в тех случаях, когда их концентрация более чем в 2 раза выше концентрации 6-дезоксигексоз. Разность оптической плотности  $D_{400} - D_{430}$  является линейной функцией концентрации 6-дезоксигексоз. 6-Дезокси-D-глюкоза, 6-дезоксид-гулоза, 6-дезоксид-3-О-метил-D-глюкоза и 6-дезоксид-3-О-метил-D-фукоза реагируют точно так же, как и D-фукоза, но их коэффициенты экстинкции составляют соответственно 165, 115, 150 и 94% коэффициента экстинкции D-фукозы.

### ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ 3-ДЕЗОКСИ- И 3,6-ДИДЕЗОКСИГЕКСОЗ [5]

При обработке этих сахаров иодной кислотой образуются соответственно 2-дезоксигексоз-4-О-формилпентоза и 2,5-дидезоксигексоз-4-О-формилпентоза. Эти дезокси-гексозы дают цветную реакцию Вебба с *n*-нитрофенилгидразином (см. стр. 47).

К 1 мл буферного раствора с pH ~7, содержащего вплоть до 200 γ сахара, добавляют 0,5 мл 0,2%-ного раствора метапериодата натрия. Если в растворе присутствуют большие количества других сахаров, концентрацию периодата соответственно увеличивают. Смесь выдерживают 4 час в темноте при комнатной температуре, удаляют избыток периодата, добавляя около 20 мг октагидрата гидроокиси бария до щелочной реакции раствора. Раствор центрифугируют, надосадочную жидкость нейтрализуют 1 н. серной кислотой и отделяют сульфат бария центрифугированием. К 1 мл надосадочной жидкости добавляют 3 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и 0,2 мл 5%-ного раствора *n*-нитрофенилгидразина в спирте. Смесь нагревают 20 мин на кипящей водяной бане. В дальнейшем методика точно такая, как описано ниже для 2-дезоксипентоз.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Rosenthaler K., Z. anal. Chem., 48, 167 (1909).
2. Dische Z., Shettles L. B., J. Biol. Chem., 175, 595 (1948).
3. Dische Z., J. Biol. Chem., 171, 725 (1947).
4. Gibbons M. N., Analyst, 80, 268 (1955).
5. Fromme I., Lüderitz O., Stierlin H., Westphal O., Biochem. Z., 330, 53 (1958).

### Цветные реакции 2-дезоксисахаров

#### З. Д и ш е

#### ОБЩИЕ РЕАКЦИИ; КАЧЕСТВЕННЫЕ ПРОБЫ

##### Реакция Килиани [1]

К нескольким миллилитрам раствора сахара (с концентрацией не менее 0,5 мг/мл) в ледяной уксусной кислоте, содержащей 0,05% хлорного железа, осторожно добавляют равный объем концентрированной серной кислоты, чтобы кислоты образовали два отдельных слоя. На поверхности раздела появляется темно-синее окрашивание, которое диффундирует в слой уксусной кислоты. Если пробу защитить от действия света и высокой температуры, окраска сохраняется в течение нескольких часов. Интенсивность ее пропорциональна концентрации 2-дезоксисахаров. Окраска не появляется, если альдегидные группы связаны в гликозидные звенья, как, например, в сердечных гликозидах.

##### Реакция с соляной кислотой [2]

К нескольким миллилитрам раствора сахара (0,5 мг/мл) добавляют равный объем концентрированной соляной кислоты и оставляют на 2—



3 мин при комнатной температуре, затем охлаждают. Появляется желтая окраска, которая при спектрофотометрировании дает интенсивную полосу поглощения между 465 и 485 мк. D-Арабиноза, D-глюкоза, D-галактоза и L-рамноза не дают этой реакции. Присутствие D-фруктозы мешает, так как она дает желтую окраску с очень широкой полосой поглощения, достигающей 560 мк.

**Реакция окисленных периодатом 2-дезоксисахаров  
с 2-тиобарбитуровой кислотой для количественных  
микроопределений [3]**

2-Дезоксисахара при окислении иодной кислотой дают диальдегид малоновой кислоты, который, конденсируясь с тиобарбитуровой кислотой, образует вещество, окрашенное в красный цвет. В эту реакцию вступают все 2-дезоксисахара и 3-дезоксисахара после их превращения под действием периодата в 2-дезоксид-4-О-формилпентозы, продуктами гидролиза которых являются 2-дезоксидальдозы.

3,5 мл раствора 2-дезоксидальдозы (0,2—12,5 γ) смешивают с 0,5 мл 0,025 н. раствора иодной кислоты в 0,125 н. серной кислоте. Смесь оставляют при комнатной температуре на 20 мин, если гликолевые группы сахаров имеют *цис*-конфигурацию, и на 40 мин, если исследуются сахара с *транс*-конфигурацией гликолевых групп. К смеси добавляют 1 мл 2%-ного раствора арсенита натрия в 0,5 н. соляной кислоте. Аликвотную пробу (1 мл) смешивают с 2 мл профильтрованного раствора 0,71 г кристаллической 2-тиобарбитуровой кислоты в 100 мл 0,007 н. раствора едкого натра (рН 2,0). Пробирку с пробой нагревают 20 мин на кипящей водяной бане и охлаждают водой до комнатной температуры. Появляется красная окраска с максимумом поглощения при 532 мк. Чувствительность реакции можно еще повысить, если экстрагировать окрашенное вещество малыми объемами органических растворителей. Окраска устойчива в течение 4 час при комнатной температуре.

Сиаловая кислота при обработке ее по этой методике дает продукт, окрашенный в розовый цвет с максимумом поглощения при 549 мк. N-Ацетил-D-глюкозамин после периодатного окисления также образует с 2-тиобарбитуровой кислотой неустойчивый продукт с розовой окраской. Как было установлено, гексозы, альдопентозы и аскорбиновая кислота при концентрациях вплоть до 50 γ/мл не оказывают влияния на эту реакцию. Если появление окраски вызвано присутствием 2-дезоксид-рибозы, то изменение оптической плотности подчиняется закону Бера вплоть до концентраций 2,5 γ/мл. 2-Дезоксиинуклеозиды реагируют в соответствии с содержанием в них сахара, но 2-дезоксид-рибозо-5-фосфат дает окраску, соответствующую только 2% эквивалентного количества сахара. Использование этой методики для определения дезоксирибонуклеиновой кислоты не дает никаких преимуществ.

**СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ 2-ДЕЗОКСИПЕНТОЗ**

2-Дезоксипентозы при нагревании их с кислотой в мягких условиях образуют фурфуриловый спирт, оксилевулиновый альдегид [4] и родственные им хромогены, которые конденсируются с ароматическими аминами, тиоловыми соединениями и индолом с образованием соединений с характерной окраской.

### Реакция с дифениламино

Эта реакция, которую первоначально описал Дише, была модифицирована Бертоном с целью увеличения ее чувствительности и специфичности. Однако по модифицированной методике Бертона требуется выдерживать реакционную смесь более 12 час при комнатной температуре, в то время как по первоначальной методике смесь нагревают при 100° в течение 10 мин. Обе методики приводятся ниже.

*Первоначальная методика* [5]. 1 объем раствора, содержащего в 1 мл 10—100 γ 2-дезоксипентозы или двойное эквивалентное количество дезоксирибонуклеиновой кислоты, смешивают с 2 объемами раствора, который готовят, растворяя 1 г дифениламина, дважды перекристаллизованного из 70%-ного спирта или петролейного эфира, в смеси 2,75 мл реактивной концентрированной серной кислоты и 100 мл ледяной уксусной кислоты наивысшей очистки. Реакционную смесь нагревают 10 мин при 100°. Раствор 2-дезоксипентозы дает синюю окраску, которая существенно не изменяется в течение нескольких часов.

*Модифицированная методика Бертона* [6]. К 1 объему раствора 2-деокси-*D*-рибозы (5—60 γ/мл) добавляют 2 объема раствора дифениламина и оставляют на 16—20 час при 25—35°. Раствор дифениламина готовят, растворяя 1,5 г дифениламина в смеси 1,5 мл концентрированной серной кислоты и 100 мл ледяной уксусной кислоты. Перед употреблением к нему добавляют водный раствор ацетальдегида (16 мг/мл) по 0,1 мл на каждые 20 мл раствора. Если раствор дифениламина при стоянии окрашивается в синий цвет, уксусную кислоту нужно перегнать.

По обеим методикам получается соединение, окрашенное в синий цвет с максимумом поглощения при 600 мμ. По методике Бертона 2 мг альдогексозы, *L*-рамнозы, аденозин-5-фосфата, *L*-цистеина и *L*-триптофана не дают окраски. *D*-Фруктоза и альдопентозы дают слабую окраску, интенсивность которой соответствует менее чем  $1/2000$  интенсивности окраски эквивалентного количества дезоксипентозы. Большим преимуществом методики Бертона по сравнению с первоначальной методикой в отношении специфичности является то, что сиаловая кислота, которая по первоначальной методике дает интенсивную пурпурную окраску, не реагирует в сравнимой степени с дифениламино, если в реакционной смеси присутствует ацетальдегид.

При применении модифицированной методики Бертона раствор 20 γ дезоксипентозы имеет при 600 мμ оптическую плотность 1,2, т. е. в 3,5 раза выше, чем при использовании первоначальной методики.

Коэффициент экстинкции 2-деокси-*D*-рибозо-5-фосфата по существу тот же самый, что и у самой 2-деокси-*D*-рибозы; в дезоксирибонуклеиновых кислотах реагируют только остатки сахара, связанные с пурином. Другие сахара, аминокислоты и белки в концентрациях 2 мг/мл могут на несколько процентов снизить интенсивность окраски, образуемой дезоксисахарами. При количественных определениях их влияние нужно корректировать с помощью внутренних стандартов. При использовании первоначальной методики 3-дезоксипентозы дают слабую окраску, соответствующую приблизительно  $1/30$  эквивалентного количества 2-дезоксисахаров [4].

### **Цветная реакция Вебба с *n*-нитрофенилгидразином [7]**

Раствор 2-дезоксирибозы в 5%-ной трихлоруксусной кислоте, содержащий 1—30  $\gamma$ /мл 2-деокси-*D*-рибозы или соответствующее количество дезоксирибонуклеотидов, нагревают 30 мин при 100°. К 2 мл горячего раствора приливают 2 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты и 0,2 мл свежеприготовленного 0,5%-ного раствора *n*-нитрофенилгидразина. Одновременно ставят холостой опыт с водой вместо сахара и обе смеси нагревают 20 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения растворы встряхивают в течение 5 мин с 10 мл *n*-бутилацетата. К водным слоям добавляют по 1 мл 2 н. раствора едкого натра и доводят их объемы до 5 мл. Появляется красная окраска с максимумом поглощения при 540 мкм, которая постепенно бледнеет: интенсивность окраски уменьшается приблизительно на 2% в минуту. Поэтому для количественных определений нужно одновременно готовить соответствующий стандартный раствор.

1 мг альдопентозы или гексозы в 5 мл реакционной смеси не дает никакой заметной окраски. Молярный коэффициент экстинкции 2-деокси-*D*-рибозы в этой реакции такой же, как и у дезоксирибонуклеиновой кислоты. Кажется маловероятным, чтобы при мягких условиях обработки кислотой по этой методике расщеплялось сколько-нибудь заметное количество пиримидиновых нуклеотидов. Очевидно, что окрашенный продукт не может быть гидразоном 2-деокси-*D*-рибозы, а является продуктом распада сахара, который образуется в большем количестве из дезоксирибонуклеиновой кислоты, чем из 2-деокси-*D*-рибозы. Чувствительность реакции с дезоксирибонуклеиновой кислотой примерно вдвое выше чувствительности реакции с дифениламином, модифицированной Бертоном. Но эта методика, по-видимому, более трудоемка и получаемая окраска менее устойчива.

### **Цветная реакция с *L*-цистеином и серной кислотой [8, 9]**

0,05 мл водного 5%-ного раствора моногидрата солянокислого *L*-цистеина и 5 мл 75%-ной (по объему) серной кислоты добавляют к 0,5 мл раствора, содержащего 25  $\gamma$ /мл или более дезоксирибонуклеиновой кислоты или эквивалентное количество 2-деокси-*D*-рибозы, и дают охладиться до комнатной температуры. Появляется розовая окраска с максимумом поглощения при 490 мкм, она становится наиболее интенсивной примерно через 15 мин.

Молярный коэффициент экстинкции окрашенного продукта, полученного из 2-деокси-*D*-рибозы, незначительно отличается от коэффициента экстинкции соответствующих пуриновых нуклеотидов. Тимидин и тимидин-5-фосфат также вступают в реакцию с *L*-цистеином и серной кислотой [10]. Коэффициент молярной экстинкции окрашенного соединения, полученного из тимидина, идентичен коэффициенту экстинкции пуриновых нуклеозидов, а для тимидин-5-фосфата его величина соответствует 75% величины для пуриновых нуклеозидов. Однако с тимидин-3,5-дифосфатом окраска получается очень слабой и достигает максимальной интенсивности при комнатной температуре только через 48 час. Цитидин и цитидиловая кислота не вступают в эту реакцию. Различие в реакционной способности тимидина и цитидина и соответствующих нуклеотидов при взаимодействии их с *L*-цистеином и серной кислотой отличает эту реакцию от всех других цветных реакций 2-дезоксипентоз.

D-Арабиналь также вступает в эту реакцию, он дает розовую окраску с максимумом поглощения при 490 мμ и двумя дополнительными максимумами при 450 и 415 мμ. 2-Дезоксигексозы и гликали ряда гексоз в этой реакции дают желто-красную окраску, спектр которой очень сильно отличается от спектра 2-дезоксид-рибозы. Альдопентозы и гексозы, тетрозы, алифатические альдегиды и гексуроновые кислоты не оказывают влияния на эту реакцию. Кетогексозы дают желтую окраску только при высоких концентрациях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kiliani H., Arch. Pharm., **251**, 567 (1913).
2. Stoll A., Kreis W., Helv. Chem. Acta, **16**, 1049 (1933).
3. Waravdekar V. S., Saslaw L. D., J. Biol. Chem., **234**, 1945 (1959).
4. Deriaz R. E., Stacey M., Teece E. G., Wiggins L. F., J. Chem. Soc., **1949**, 1222.
5. Dische Z., Mikrochemie, **2**, 4, (1930).
6. Burton K., Biochem. J., **62**, 315 (1956).
7. Webb J. M., Levy H. B., J. Biol. Chem., **213**, 107 (1955).
8. Dische Z., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **55**, 217 (1944).
9. Stumpf P., J. Biol. Chem., **169**, 367 (1947).
10. Manson L. A., Lampen J. O., J. Biol. Chem., **191**, 87 (1951).

## Цветные реакции гексозаминов

*З. Д и ш е*

### ВВЕДЕНИЕ

Существуют два различных типа цветных реакций гексозаминов. 1) Конденсация гексозамина с ацетилацетоном в щелочной среде дает 3 или 4 хромогена, которые затем конденсируются в кислом растворе с N,N-диметил-*n*-аминобензальдегидом, образуя окрашенные соединения. 2) Дезаминирование гексозамина азотистой кислотой до оксиметилдиокситетрагидрофурфурола (2,5-ангидросахара) с последующим взаимодействием полученного производного фурана с индолом или пирролом.

### ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ, ОСНОВАННЫЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ПИРРОЛОВЫХ ХРОМОГЕНОВ С РЕАКТИВОМ ЭРЛИХА

#### *Непрямая реакция гексозаминов с N,N-диметил-*n*-аминобензальдегидом (реакция Эльсона — Моргана) [1]*

Наиболее важным хромогеном в этой реакции, по-видимому, является 2-метилпиррол [1], который ответствен примерно за  $\frac{2}{3}$  интенсивности окраски, появляющейся в первоначальной реакции. Реакция неоднократно модифицировалась с целью увеличения ее чувствительности, специ-

фичности и воспроизводимости. Наиболее поздняя модификация, основанная на методике Бликса [2], состоит в следующем [3].

К 4 мл раствора гексозамина (5—15  $\gamma$ /мл), помещенного в пробирку с притертой пробкой, приливают 2 мл 4%-ного (по объему) раствора ацетилацетона в 1,25 н. растворе карбоната натрия и нагревают 1 час при 90°. После этого к смеси добавляют 16 мл спирта и 2 мл раствора 1,6 г дважды перекристаллизованного из 80%-ного спирта N,N-диметил-*n*-аминобензальдегида в смеси 30 мл спирта и 30 мл концентрированной соляной кислоты. Этот реагент устойчив в течение 1 месяца при температуре 0°. Реакционная смесь в пробирке окрашивается в красный цвет с максимумом поглощения при 530 мкм; окраска устойчива по крайней мере 1 час.

Коэффициенты экстинкции D-глюкозамина и D-галактозамина незначительно отличаются друг от друга; оптическая плотность раствора, содержащего 25  $\gamma$  D-глюкозамина, равна 0,604. В пределах упомянутых выше концентраций поглощение следует закону Бера. Растворы, содержащие 2 мг гексоз, альдопентоз и N-ацетилнейраминовой кислоты, не вызывают заметного окрашивания. D-Фруктоза и L-сорбоза в таких же количествах дают поглощение, соответствующее ~10  $\gamma$  D-глюкозамина. Смесь аминокислот в количестве 5 мг не оказывает существенного влияния. Однако одновременное присутствие в белковых гидролизатах гексоз и некоторых аминокислот, в частности L-лизина, сказывается сильно. В какой-то мере их влияние можно исключить, применяя дихроматические измерения при 450 и 530 мкм. В некоторых случаях, однако, для получения надежных результатов необходимо, согласно методике Боаса [4], отделить гексозамины адсорбцией на дауэксе 50 с последующим элюированием.

### Модификация Шлосса [5]

Хромоген, который дает окрашенный продукт с максимумом поглощения при 530 мкм, неустойчив, и чтобы улучшить воспроизводимость реакции, Шлосс предложил спектрофотометрировать другой окрашенный продукт, который образуется из D-глюкозамина во время реакции и имеет максимум поглощения при 512 мкм. Образование этого продукта полностью завершается только при длительном стоянии при комнатной температуре. Поэтому для определения гексозаминов была рекомендована следующая методика.

К 2 мл раствора гексозамина с концентрацией 4—40  $\gamma$ /мл добавляют 5,5 мл раствора 0,049 мл ацетилацетона, 290 мг карбоната натрия и 0,75  $\mu$ кв соляной кислоты. Ацетилацетон должен быть бесцветным (т. кип. 138°). Этот раствор устойчив при 4°. Реакционную смесь (рН 9,8) нагревают 20 мин при 100° и затем добавляют 2,5 мл раствора 0,8 г N,N-диметил-*n*-аминобензальдегида в смеси 30 мл спирта и 30 мл концентрированной соляной кислоты. После этого реакцию смесь разбавляют спиртом до 50 мл и выдерживают 24 час при 30°. Образуется продукт с вполне устойчивой окраской и максимумом поглощения при 512 мкм.

Для дифференциации D-глюкозамина и D-галактозамина Бродан [6] рекомендовал следующую методику. Так как один из четырех хромогенов, образующихся из D-глюкозамина при применении методики Шлосса, в реакции с D-галактозамином не образуется, то для этих двух гексозаминов наблюдается различное положение максимумов поглощения: D-га-

лактозамин дает максимум поглощения при 535, а не 512 мк. Гексозамин нагревают 20 мин при 100° в растворе ацетилацетона 0,25 М по карбонату натрия, 0,1 М по бикарбонату натрия и 0,1 М по соляной кислоте. После охлаждения полученные хромогены конденсируют с N,N-диметил-*n*-аминобензальдегидом в растворе 0,4 н. по соляной кислоте и 56%-ном (об.%) по спирту. По окончании конденсации к раствору добавляют необходимое количество спирта с тем, чтобы его концентрация достигла 65%, и оставляют стоять 25 час при 22°.

### **Модификация Рондла и Моргана [7]**

К 1 мл или менее раствора, содержащего 20—60 γ гексозамина (рН раствора 6—7), добавляют 1 мл свежеприготовленного раствора из 1 мл перегнанного ацетилацетона (т. кип. 138—140°) в 50 мл 0,5 н. раствора карбоната натрия и смесь разбавляют водой до 3 мл. Подготавливают соответствующие пробы холостого опыта, пробирки закрывают маленькими холодильниками и нагревают 20 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения до комнатной температуры к смеси добавляют 5 мл спирта (высушенного в течение 24 час над окисью кальция и перегнанного) и 1 мл раствора 0,8 г чистого N,N-диметил-*n*-аминобензальдегида в смеси 30 мл спирта и 30 мл концентрированной соляной кислоты (реактив N,N-диметил-*n*-аминобензальдегида нужно хранить на холоду и применять только в том случае, если он имеет слабожелтую окраску). Затем реакционную смесь разбавляют спиртом до 10 мл, снова нагревают 10 мин при 65—70°, охлаждают до комнатной температуры и проводят спектрофотометрические измерения при 530 мк. Коэффициент экстинкции для окрашенного продукта из D-галактозамина составляет около 90% величины его для продукта, полученного из D-глюкозамина; спектры поглощения идентичны.

### **ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ГЕКСОЗАМИНА, ОСНОВАННЫЕ НА ЕГО ДЕЗАМИНИРОВАНИИ В 2,5-АНГИДРОСАХАРА**

#### **Реакция с индолом и соляной кислотой [8]**

**Деаминарование гексозамина.** К 0,5 мл испытуемого образца добавляют 0,5 мл 5%-ного раствора нитрита натрия и 0,5 мл 33%-ного раствора уксусной кислоты. Пробирку со смесью встряхивают и оставляют стоять 10 мин; за это время деаминарование проходит полностью. Чтобы удалить избыток азотистой кислоты, добавляют 0,5 мл 12,5%-ного раствора сульфата аммония и несколько раз в течение 30 мин встряхивают.

**Реакция с индолом.** К 2 мл раствора, который содержит 5—100 γ/мл деаминированного гексозамина, добавляют 2 мл 5%-ной соляной кислоты и 0,2 мл 1%-ного раствора индола в спирте. Пробирки с реакционной смесью погружают на 5 мин в сильно кипящую водяную баню. Появляется интенсивная оранжевая окраска, и раствор слегка мутнеет; для удаления помутнения прибавляют 2 мл спирта и пробирки встряхивают. В результате этой реакции образуются два различно окрашенных соединения, оба с максимумом поглощения при 492 мк. Одно из них окрашено в розовый цвет, его экстрагируют хлороформом, другое окрашено в коричневый цвет, оно остается в водной фазе. Оптическая плотность

раствора, содержащего 25 γ хлоргидрата глюкозамина, ( $D_{492}$ ) равна 0,5, она подчиняется закону Бера. Все сахара дают окрашенные соединения с максимумом поглощения при 492 мμ. Однако реакции других сахаров не связаны с дезаминированием. Поэтому для количественного определения в присутствии других сахаров готовят контрольные пробы, которые обрабатывают точно так же, как и испытуемые образцы, только в контрольных пробах сульфат натрия добавляется к раствору прежде азотистой кислоты.

Присутствие белков в высоких концентрациях усиливает поглощение при 492 мμ, но максимум поглощения соответствует большему длинам волн. Влияние этих примесей можно почти полностью исключить; для этого после завершения реакции реакцию смесь встряхивают с равным объемом хлороформа. Чтобы удалить эмульгированный хлороформ из водной фазы, жидкость центрифугируют или оставляют на ночь для отстаивания [9] и спектрофотометрируют водную фазу. Оптическая плотность, обусловленная гексозамином, возрастает примерно на  $\frac{1}{3}$  по сравнению с первоначальной. Точность количественного определения увеличивается при применении дихроматических измерений при 492 и 520 мμ. Разность  $D_{492} - D_{520}$  только на 25% меньше, чем  $D_{492}$ , и является линейной функцией концентрации гексозамина. Величина коэффициента экстинкции для D-галактозамина на 5% меньше его величины для D-глюкозамина. Окраска раствора устойчива.

### **Реакция дезаминированного гексозамина с пирролом и соляной кислотой [10]**

**Дезаминирование.** К 1 мл раствора гексозамина (5—20 γ) добавляют 0,3 мл 10%-ного (по весу) раствора карбоната натрия, 0,3 мл воды, 0,15 мл свободной от альдегида ледяной уксусной кислоты и 0,15 мл свежеприготовленного 17,5%-ного раствора нитрита натрия. Через 10 мин приливают 0,3 мл 25%-ного раствора сульфата аммония и смесь оставляют на 20 мин при комнатной температуре.

**Реакция с пирролом и соляной кислотой.** В дезаминированную смесь вводят 4 мл концентрированной соляной кислоты, содержащей 0,25 мл четыреххлористого олова, 10 мл воды и 0,15 мл 1%-ного раствора пиррола. Смесь нагревают 5 мин на водяной бане при 60° и охлаждают водой со льдом. Появляется желтая окраска с максимумом поглощения при 433 мμ, окраска устойчива ~2 час. Оптическая плотность раствора, содержащего 5 γ глюкозамина, ( $D_{433}$ ) равна 0,15; при концентрациях гексозамина, приемлемых для спектрофотометрии, она подчиняется закону Бера.

Чувствительность реакции с пирролом почти в 2 раза выше чувствительности реакции с индолом; это связано с использованием в первом случае более концентрированной кислоты. Влияние высокой концентрации кислоты на другие сахара не изучалось. На реакцию влияет присутствие гексоз. Для количественных определений реакцию ведут после отделения гексозамина путем хроматографирования на колонке с амберлитом IRC-50 и последующего элюирования гексозамина соляной кислотой, которую перед определением нейтрализуют карбонатом натрия. Реакция с пирролом дает ожидаемую величину при определении гексозамина в полиуронидах, в то время как реакция с индолом в этом случае воспроизводимо дает только 50—55% теоретической величины.

### ПРЯМАЯ РЕАКЦИЯ N-АЦЕТИЛ-D-ГЛЮКОЗАМИНА С РЕАКТИВОМ ЭРЛИХА (РЕАКЦИЯ МОРГАНА — ЭЛЬСОНА [11])

N-Ацетил-D-глюкозамин при нагревании в щелочном растворе образует хромоген, вероятно 3-ацетамидо-5-(1,2-диокси)фуран [12], который в кислом растворе дает с реактивом Эрлиха окрашенное в фиолетовый цвет соединение с двумя максимумами поглощения при 544 и 585 мкм. Первоначальная методика [11] неоднократно модифицировалась. Наиболее поздняя модификация основывается на том, что присутствие бората увеличивает интенсивность и воспроизводимость окраски [13].

В пробирку помещают 0,5 мл раствора, содержащего 4—20 γ/мл N-ацетил-D-глюкозамина или 10—50 γ/мл N-ацетил-D-галактозамина, и добавляют 0,1 мл 0,8 M раствора тетрабората калия [14], нагревают 3 мин на кипящей водяной бане и охлаждают водопроводной водой. К раствору добавляют 3 мл 2%-ного (по весу) раствора N,N-диметил-п-аминобензальдегида в ледяной уксусной кислоте, содержащей 2,5% (по объему) 10 н. соляной кислоты; смесь выдерживают 20 мин при 36—38° и охлаждают водопроводной водой. Применяемый раствор N,N-диметил-п-аминобензальдегида готовят из сделанного в запас раствора 10 г реагента в 100 мл ледяной уксусной кислоты, содержащей 12,5% 10 н. соляной кислоты, разбавляя его 9 частями ледяной уксусной кислоты. Сразу после окончания реакции проводят измерения поглощения при 585 мкм против стандартных растворов и проб холостого опыта, которые приготавливаются одновременно с испытуемым образцом.

Молярный коэффициент экстинкции N-ацетил-D-галактозамина по модифицированной методике равен 7400 и составляет только 0,35 коэффициента экстинкции N-ацетил-D-глюкозамина. Замещение у C-4 [15, 16] приводит к почти полному исчезновению окраски, в то время как при замещении у C-3 интенсивность окраски значительно возрастает. У некоторых олигосахаридов, содержащих N-ацетилгексозамины, последние вступают в эту реакцию без предварительного гидролиза гликозидных связей [15]. Уридиндифосфат-N-ацетилгексозамин и N-ацетил-D-глюкозамин-1-фосфат без предварительного гидролиза в эту реакцию не вступают [16].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Cornforth J. W., Firth M. E., J. Chem. Soc., 1958, 1091; Elson L. A., Morgan W. T. J., Biochem. J., 27, 1824 (1933).
2. Blix G., Acta Chem. Scand., 2, 467 (1948).
3. Svennerholm L., Acta Soc. Med. Uppsaliensis, 61, 287 (1956).
4. Boas N. F., J. Biol. Chem., 204, 553 (1953).
5. Schloss B., Anal. Chem., 23, 1321 (1951).
6. Brogan T. D., Biochem. J., 71, 125 (1959).
7. Randle C. J. M., Morgan W. T. J., Biochem. J., 61, 586 (1954).
8. Dische Z., Borenfreund E., J. Biol. Chem., 184, 517 (1950).
9. Dische Z., Borenfreund E., Ann. J. Ophthalmol., 38, 165 (1954).
10. Exley D., Biochem. J., 67, 52 (1957).
11. Morgan W. T. J., Elson L. A., Biochem. J., 26, 988 (1943).
12. Kuhn R., Kruger C., Chem. Ber., 90, 264 (1957).
13. Aminoff D., Morgan W. T. J., Watkins W. M., Biochem. J., 51, 379 (1952).
14. Reissig J. L., Strominger J. L., Leloir L. E., J. Biol. Chem., 217, 959 (1955).
15. Kuhn R., Gauhe A., Baer H. H., Chem. Ber., 87, 1138 (1954).
16. Jeanloz R. W., Tremegge M., Federation Proc., 15, 282 (1956).



## Цветные реакции, основанные на восстанавливающих свойствах сахаров

### 3. Дисс

Применение цветных реакций для качественного и количественного определения сахаров (см. также [1]), основанных на реакциях восстановления, имеет преимущество по сравнению с объемными методами: чувствительность их выше и их удобнее использовать при серийных определениях. Различают три типа цветных реакций, причем все они характеризуются высокой степенью чувствительности: 1) реакция, основанная на восстановлении меди в слабощелочном растворе; 2) восстановление феррицианида в слабощелочном растворе; 3) восстановление трифенилтетразолия в сильнощелочной среде.

#### РЕАКЦИЯ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ САХАРОВ С АРСЕНОМОЛИБДАТОМ

Соли меди(II) восстанавливаются сахарами до окиси меди(I), которая способна восстанавливать арсеномолибдат с образованием молибденовой сини. Поглощение полученного окрашенного раствора является мерилем концентрации сахара.

Раствор соли меди готовят непосредственно перед проведением реакции, смешивая 25 частей реагента А, содержащего 25 г безводного карбоната натрия, 25 г виннокислой калиевонатриевой соли, 25 г бикарбоната натрия и 200 г безводного сульфата натрия в 1 л воды, и 1 часть реагента Б — 15%-ного раствора пентагидрата сульфата меди в воде, слегка подкисленной серной кислотой. 1 мл этого смешанного реагента нагревают с 1 мл раствора сахара, количество которого эквивалентно 50 γ глюкозы, в течение 20 мин на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры и добавляют 1 мл раствора реагента, приготовленного следующим образом: 25 г молибдата аммония, 21 мл концентрированной серной кислоты и 3 г гептагидрата кислого ортоарсената натрия растворяют в 1000 мл воды и выдерживают раствор в течение 24—48 час в темноте при 37°. При сливании растворов в реакционной смеси сразу же образуется молибденовая синь, и раствор окрашивается в характерный голубой цвет с максимумом поглощения при 660 мμ; поглощение соответствует закону Бера. Оптическая плотность раствора, содержащего 50 γ D-глюкозы, при 660 мμ равна 0,675. Воспроизводимость реакции лучше, если измерение вести при 500 мμ; при этом, однако, чувствительность реакции понижается до 75%.

#### ЦВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ САХАРОВ С ФЕРРИЦИАНИДОМ

Сахара восстанавливают феррицианид в растворе с pH несколько выше 10,5 до ферроцианида, который с ионами железа(III) дает берлинскую лазурь. 1—3 мл раствора сахара (или 1—9 γ сахара) смешивают с 1 мл реагента, содержащего 0,53% карбоната натрия, 0,065% цианистого калия и 1 мл 0,05%-ного раствора феррицианида калия [2]. Смесь нагревают 15 мин на кипящей водяной бане и после охлаждения добавляют 5 мл раствора, содержащего 1,5 г железа(III)-аммиачных квасцов и 1 г дианола в 1000 мл 0,05 н. серной кислоты. Появляется

устойчивая голубая окраска с максимумом поглощения при 700 мк. Оптическая плотность изменяется в соответствии с законом Бера и для раствора, содержащего 1 γ D-глюкозы, равна 0,118.

#### РЕАКЦИЯ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ САХАРОВ С 2,3,5-ТРИФЕНИЛТЕТРАЗОЛИЕМ

2,3,5-Трифенилтетразолий восстанавливается до трифенилформазана, который, растворяясь в органических растворителях, окрашивает раствор в вишнево-красный цвет.

К 2 мл раствора сахара (20—200 γ D-глюкозы) добавляют 1 мл бесцветного 0,3%-ного водного раствора бромистого 2,3,5-трифенилтетразолия и 1 мл 2 н. раствора едкого натра [3]. Смесь нагревают 3 мин на кипящей водяной бане, немедленно подкисляют 1 мл раствора 2,1 н. уксусной кислоты, охлаждают и разбавляют раствор этанолом или изопропанолом до объема 25 мл. При этом появляется красная окраска с максимумом поглощения при 485 мк; в пределах концентраций D-глюкозы от 10 до 100 γ/мл поглощение следует закону Бера. Чувствительность реакции можно увеличить, если экстрагировать окрашенный продукт небольшим объемом несмешивающегося с раствором органического растворителя.

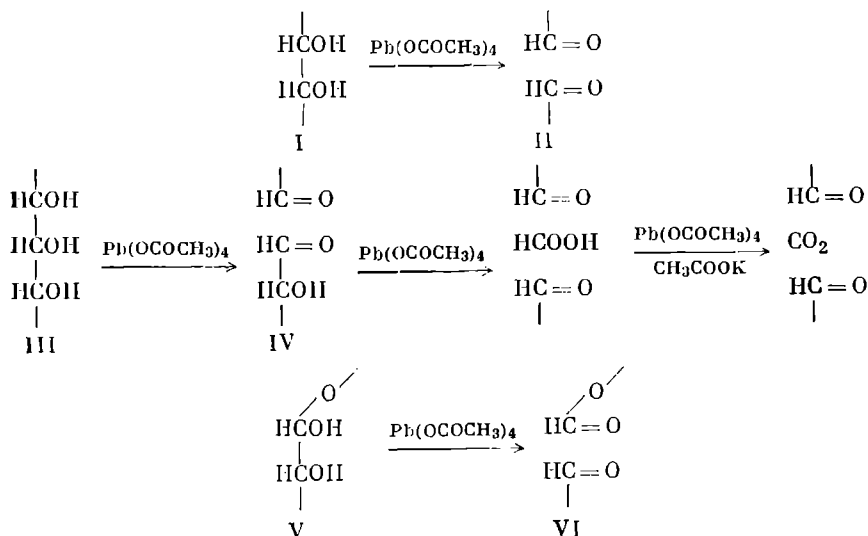
#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson N., J. Biol. Chem., **153**, 375 (1944).
2. Park J. T., Johnson M. J., J. Biol. Chem., **181**, 149 (1949).
3. Fairbridge R. A., Willis K. J., Booth R. G., Biochem. J., **49**, 423 (1951).

### Определение и расчет числа 1,2-гликольных групп

Окисление тетраацетатом свинца

А. С. Перлин



## ВВЕДЕНИЕ

При окислении 1,2-гликольных групп (I) тетраацетатом свинца [1] на 1 моль гликоля расходуется 1 моль окислителя, при этом углерод-углеродная связь расщепляется и образуются 2 моля альдегида (II). Расход тетраацетата свинца обычно измеряется иодометрически [1] (методика 1). Скорость окисления 1,2-гликоля заметно зависит от стереохимии диола [2, 3]. Например, *цис*-диол в пятичленном кольце может реагировать в 100 000 раз быстрее, чем *транс*-диол в шестичленном цикле. Таким образом, измерив скорость, с которой неизвестные углеводы поглощают тетраацетат свинца, можно получить данные не только просто о присутствии вицинальной диольной группировки, но и об особенностях структуры углевода.

В концевой 1,2-гликольной группировке первичная карбинольная группа окисляется до формальдегида<sup>1</sup> [4], и, таким образом, определение формальдегида (методика 2) позволяет идентифицировать подобную группировку.

Если соединение содержит больше двух соседних гидроксильных групп (например, III), то в результате окисления образуется муравьиная кислота, по-видимому, через  $\alpha$ -оксиальдегид (IV)<sup>2</sup>. Однако муравьиная кислота сама медленно окисляется тетраацетатом свинца до двуокиси углерода, что делает неясным стехиометрию «умеренного» и «медленного» окисления  $\alpha$ -гликолей [5—7]. Для таких соединений, как, например, многоатомные спирты и шестичленные циклиты, удобнее применять каталитическое окисление тетраацетатом свинца [7]. В этой реакции превращение муравьиной кислоты в двуокись углерода ускоряется при добавлении к реакционной смеси ацетата калия<sup>3</sup>, и количество полученной муравьиной кислоты рассчитывается по количеству выделившейся двуокиси углерода (методика 3). Вычитая полученную величину из общего количества поглощенного тетраацетата свинца, можно определить расход окислителя на расщепление гликольных группировок.

Если  $\alpha$ -оксиальдегид (IV) образует  $\alpha$ -оксиполуацеталь (V) с соответственно расположенной гидроксильной группой, при окислении обычно образуется формиат (VI), а не свободная муравьиная кислота. Это приводит к низкому выходу двуокиси углерода и соответственно пониженному общему расходу тетраацетата свинца, но истинная величина составляет 2 моля окислителя на 1 моль триола.

Если соединение не поглощает тетраацетата свинца, то обычно можно полагать, что оно не содержит 1,2-гликольных групп. Однако известно несколько примеров, когда вицинальные диолы не расщепляются под действием тетраацетата свинца. Это 1,6-ангидро- $\beta$ -D-глюко(и галакто)фураноза [9] и 2,3-*транс*-диольная система (1  $\rightarrow$  4) связанных моносахаридных единиц различных олигосахаридов [10]. Кроме того, некоторые гидроксильные группы этерифицируются муравьиной кислотой (как в VI), образовавшейся за счет окисления более реакционноспособной части молекулы [1]. Этим самым предупреждается разрыв первоначально

<sup>1</sup> Расщепление  $\alpha$ -диольной группировки, соседней с конечной метильной группой, как, например, в многоатомном спирте, имеющем дезоксизвено в положении 1, дает ацетальдегид, который можно отогнать из реакционной смеси и определить в виде 2,4-динитрофенилгидразона.

<sup>2</sup> При окислении  $\alpha$ -оксикетона образуется карбоновая кислота и альдегид.

<sup>3</sup> Окисление гликоля при этом также ускоряется [7, 8], но менее заметно.

присутствующей в соединении 1,2-гликольной группировки, что приводит к заниженному общему содержанию  $\alpha$ -гликольных групп, как было отмечено, в частности, при окислении свободных сахаров. Это явление может быть использовано для избирательного окисления [11, 12] и для определения положения замещающих групп в частичнозамещенных сахарах [10, 13, 14].

## МЕТОДИКИ

### 1. Измерение расхода тетраацетата свинца

Приготавливают 0,1—0,5%-ный раствор сахара в ледяной уксусной кислоте. Растворение образца можно ускорить, если растереть его в тонкий порошок или сначала растворить образец в минимальном количестве воды [15]. Содержание воды в конечной реакционной смеси не должно превышать 2—3%, хотя иногда более высокое содержание воды может быть благоприятным для реакции (см. методику 3).

К раствору сахара добавляют избыток 0,05—0,1 *M* раствора тетраацетата свинца в ледяной уксусной кислоте и одновременно проводят холостой опыт. Аликвотные пробы реакционной смеси добавляют к 4—5-кратному избытку «останавливающего» раствора иодистого калия, который приготавливают из расчета 20 г иодистого калия и 250 г тригидрата ацетата натрия на 1 л раствора [5]. Выделившийся свободный иод титруют стандартным раствором тиосульфата натрия.

$$\frac{\text{Эквивалент тиосульфата} \times \text{Мол. вес}}{2 \times \text{Вес образца}} = \frac{\text{Число молей тетраацетата свинца}}{1 \text{ моль вещества.}}$$

Для анализа соединения неизвестной структуры нужно применять более высокое молярное соотношение тетраацетата свинца — 5—10 моль/моль. Для измерения скорости окисления вицинального диола рекомендуется избыток 0,5—1,0 моля тетраацетата свинца [4, 16]; для высокоактивных диолов удобно применять реакционный сосуд с тремя камерами [4]. Обычно окисление ведут при 20—30°; при температуре ниже 16° можно применять смесь уксусной и пропионовой кислот [12]; смесь этих кислот в соотношении 75 : 25 приемлема для окисления при 0°.

### 2. Измерение количества формальдегида, получаемого при окислении тетраацетатом свинца (см. также стр. 58 и 62)

Оставшийся в реакционной смеси тетраацетат свинца восстанавливают и одновременно осаждают двухвалентный свинец, добавляя избыток безводной щавелевой кислоты, растворенной в уксусной кислоте<sup>1</sup>. Смесь разбавляют 3 объемами воды и фильтруют, чтобы удалить оксалат свинца. Присутствие формальдегида можно установить, а затем определить его а) в виде кристаллического димедонового производного [17] или б) колориметрически [13].

а) Димедон (5,5-диметилциклогександион-1,3), взятый в количестве 3—4 моля на 1 моль формальдегида, растворяют в минимальном объеме уксусной кислоты и добавляют к фильтрату после отделения оксалата

<sup>1</sup> Иод-крахмальную бумагу можно применять для пробы на присутствие двухвалентного, а также и четырехвалентного свинца; диодид свинца дает ярко-желтую окраску.

свинца, затем по каплям прибавляют 20%-ный раствор едкого натра до pH 5—6. Реакционную смесь оставляют на 18 час на холоду, после чего фильтруют, осадок промывают водой и сушат. Выход димедонового производного составляет ~90% от теоретического, т. пл. 190—191°.

б) Порцию фильтрата, в которой содержится 3—15 γ формальдегида, разбавляют водой до 1 мл и нагревают 30 мин на кипящей водяной бане с 10 мл реагента, содержащего хромотроповую кислоту [18]; колориметрическое измерение ведут при 570 мкм. Проводят также холостой опыт, повторяя процедуру с пробой фильтрата, полученного при обработке раствора тетраацетата свинца щавелевой кислотой, как описано для реакционной смеси; эта проба дает заметное окрашивание. На основании данных, полученных при окислении тетраацетатом свинца стандартных растворов эритрита, строят калибровочную кривую для формальдегида.

### **3. Определение муравьиной кислоты (двуокиси углерода<sup>1</sup>), образующейся при окислении углеводов тетраацетатом свинца**

Количество выделяющейся двуокиси углерода можно определить манометрическим методом [7] или путем поглощения щелочью [6, 20, 21]. Хотя манометрический метод требует более сложной аппаратуры, он позволяет проводить кинетические измерения на микропробах и более удобен при проведении каталитического окисления углеводов тетраацетатом свинца [7, 13, 14].

Обычно применяются манометры с постоянным объемом типа манометра Варбурга; прибор и работа с ним описаны Умбрайт и сотр. [22]. Прибор калибруют по окислению тетраацетатом свинца стандартных растворов муравьиной кислоты в заданных условиях<sup>2</sup>, после чего в тех же условиях ведут окисление образцов углеводов. Температура бани  $27 \pm \pm 0,05^\circ$ . 1 мл окисляющего раствора (20 мг тетраацетата свинца и 20 мг безводного ацетата калия в ледяной уксусной кислоте<sup>3</sup>) вводят в камеру прибора. Через боковой отвод вводят 0,2 мл ледяной уксусной кислоты, содержащей образец в количестве, достаточном для выделения 0,004—0,015 ммоль двуокиси углерода (муравьиной кислоты). Второй сосуд служит для контроля при холостом опыте. Прибор уравнивают в течение 10 мин<sup>4</sup>, содержимое камеры и «бокового отвода» смешивают и отмечают изменение давления. Поскольку количество образовавшейся двуокиси углерода прямо пропорционально изменению

<sup>1</sup> Двуокись углерода выделяется также при окислительном декарбоксилировании  $\alpha$ -окси- и  $\alpha$ -кетокислот [19] и при «переокислении».

<sup>2</sup> Описанные условия, как было найдено, удовлетворительны для различных групп углеводов и производных, но их можно несколько варьировать.

<sup>3</sup> При определении по этой методике олигосахаридов [10, 13, 14] реакцию ведут в 90%-ной уксусной кислоте; окисляющий раствор должен содержать 20 мг тетраацетата свинца и 10 мг ацетата калия на 1 мл раствора. Присутствие воды, по-видимому, сводит до минимума образование муравьиного эфира невосстанавливаемыми концевыми группами, что приводит к высокому выходу двуокиси углерода [7, 13].

<sup>4</sup> При калибровании манометра по муравьиной кислоте уравнивание продолжается 10 мин, чтобы свести до минимума диффузию паров муравьиной кислоты в камеру. Но для углеводных субстратов можно применять и более длительное время для уравнивания.

давления, выход муравьиной кислоты определяется по показаниям манометра.

Расход тетраацетата свинца определяют иодометрическим титрованием (см. методику 1) 1,0 мл пробы реакционной смеси и пробы холодного опыта. Эта величина (моль/моль) минус количество выделившейся двуокиси углерода (моль/моль) дает число молей тетраацетата свинца, израсходованных на окисление 1 моля углевода.

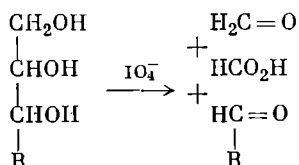
## ЛИТЕРАТУРА

1. Criegee R., Ber., **64**, 260 (1931).
2. Criegee R., Kraft L., Rank B., Ann., **507**, 159 (1933).
3. Criegee R., Büchner E., Walther W., Ber., **73**, 571 (1940).
4. Criegee R., Ann., **495**, 211 (1932).
5. Hockett R. C., Dienes M. T., Fletcher H. G., Jr., Ramsden H. E., J. Am. Chem. Soc., **66**, 467 (1944).
6. Grosheintz J. M., J. Am. Chem. Soc., **61**, 3379 (1939).
7. Perlin A. S., J. Am. Chem. Soc., **76**, 5505 (1954).
8. Criegee R., Büchner E., Ber., **73**, 563 (1940).
9. Dimler R. J., Davis H. A., Hilbert G. E., J. Am. Chem. Soc., **68**, 1377 (1946).
10. Perlin A. S., Lansdown A. R., Can. J. Chem., **34**, 451 (1956).
11. Perlin A. S., J. Am. Chem. Soc., **76**, 2595 (1954).
12. Perlin A. S., Brice C., Can. J. Chem., **34**, 541 (1956).
13. Perlin A. S., Anal. Chem., **27**, 396 (1955).
14. Charlson A. J., Perlin A. S., Can. J. Chem., **34**, 1200 (1956).
15. Baer E., Grosheintz J. M., Fischer H. O. L., J. Am. Chem. Soc., **61**, 2607 (1939).
16. Cordner J. P., Pausacker K. H., J. Chem. Soc., **1953**, 102.
17. Brice C., Perlin A. S., Can. J. Biochem. Physiol., **35**, 7 (1957).
18. Lambert M., Neish A. C., Can. J. Research, **B28**, 83 (1952).
19. Baer E., J. Am. Chem. Soc., **62**, 1597, 1600 (1940).
20. Abraham S., J. Am. Chem. Soc., **72**, 4050 (1950).
21. Perlin A. S., Anal. Chem., **26**, 1053 (1954).
22. Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F., Manometric Techniques and Tissue Metabolism, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn., 1940.

## Периодатное окисление

### Экспериментальные условия

*Р. Д. Гутри*



## ВВЕДЕНИЕ

Первоначально считалось, что иодная кислота и ее соли, обычно периодат натрия и реже периодат калия, расщепляют только  $\alpha$ -гликольные группировки. Реакция выражается уравнением, приведенным выше. Алкилдиолы-1,2 с прямой цепью окисляются с образованием двух алкилальдегидов; циклический диол-1,2 окисляется в  $\alpha,\omega$ -диальдегид с прямой цепью. В настоящее время известно, что периодат окисляет и другие типы соединений, например  $\alpha$ -оксиальдегиды,  $\alpha$ -оксикетоны и  $\alpha$ -аминоспирты [1], но в основном эта реакция в химии углеводов применяется для окисления  $\alpha$ -гликольных групп. Обычно эта реакция используется в аналитических целях для определения числа соседних гидроксильных групп, но ее можно также применять и как метод синтеза. Эта реакция, в частности, служит для установления структуры полисахаридов [1] и для подтверждения строения гликозидов [2]. Каждая  $\alpha$ -гликольная группа поглощает 1 моль периодата, и при прочих равных условиях скорость реакции зависит главным образом от стереохимии  $\alpha$ -гликольной группировки.

Если недостаточно тщательно контролировать условия реакции, то наряду с окислением других негликольных группировок, упомянутых выше, может иметь место еще и неспецифическое окисление.

Следует подчеркнуть, что если соединение не окисляется периодатом, то это еще не является доказательством отсутствия в этом соединении  $\alpha$ -гликольных групп, так как у некоторых соединений стерические факторы препятствуют их окислению [3]. Примеры применения различных условий реакции, которые рассмотрены ниже в общем виде, можно найти далее в разделах, посвященных анализу реакционных растворов (стр. 62 и 67) и выделению продуктов реакции (стр. 71).

## МЕТОДИКА

### Общие соображения [1, 3]

#### Окислитель

Иодная кислота и ее натриевая и калиевая соли являются доступными реагентами, и применение того или иного реагента зависит от pH испытуемого раствора. Метапериодат натрия растворим в нейтральных или слабокислых водных растворах (незабуференные водные растворы натриевой соли имеют pH  $\sim 4$ ), но нерастворим в щелочных растворах. Однако димезопериодат калия, приготовленный из метапериодата, растворим в щелочных водных растворах. Для растворов с pH  $< 3$  применяется иодная кислота.

#### Растворитель

Периодатное окисление углеводов осуществляется легко, так как в качестве растворителя применяется главным образом вода. Для соединений, нерастворимых в воде, используют водные смеси спиртов, диоксана или уксусную кислоту, но необходимо отметить, что скорость окисления в таких смешанных растворителях значительно меньше, чем в воде. Окисление можно вести и в гетерогенных условиях, например окисление целлюлозы, но во всех случаях, когда это возможно, следует применять гомогенную среду.

### Освещение

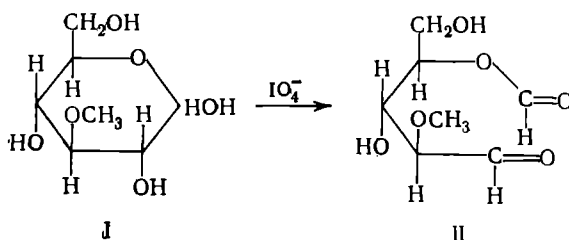
Так как растворы периодатов на свету разлагаются с заметной скоростью, окисление всегда нужно вести в темноте.

### Температура

Обычно реакции окисления ведут при комнатной температуре, так как с повышением температуры возрастает скорость побочных реакций неспецифического окисления. Иногда, чтобы предотвратить гидролиз ацетальных групп в кислом растворе или подавить специфическое окисление, реакцию ведут при температуре ниже комнатной.

### Величина pH

Величина pH имеет большое значение особенно из-за возможности гидролиза ацетальных или сложноэфирных групп в окисляемом соединении или в промежуточном продукте. Следует всегда иметь в виду возможность образования эфиров муравьиной кислоты при окислении. Эти эфиры гидролизуются в щелочных или сильноокислых растворах, но в слабокислой среде они устойчивы, поэтому образование этих эфиров замедляет или прекращает реакцию окисления. Вследствие этого нужное количество периодата не будет израсходовано полностью. Например, в результате мягкого окисления 3-О-метил-D-глюкозы (I) в слабокислой среде была получена 4-О-формил-2-О-метил-D-арабиноза (II) [4].



Окисление производных углеводов обычно быстрее всего проходит при pH 3—5, если не имеет места ступенчатое окисление. Исключение составляют  $\alpha$ -аминоспирты: они легче всего окисляются при pH 7,5. Всякий раз, когда это возможно, окисление углеводов нужно вести при pH, соответствующем наибольшей скорости окисления. Величину pH окисляемого раствора легко контролировать, применяя буферные растворы.

### Концентрация и избыток периодата

Установлено, что расщепление гликоля протекает более легко при большом избытке периодата и при высокой концентрации его. Обычно используют 0,01—0,1 M растворы, так как более высокие концентрации могут содействовать развитию побочных реакций неспецифического окисления.

В некоторых аналитических исследованиях, приведенных в литературе, указывается, что применялось только *расчетное* количество периодата. Однако мы уверены, что всегда и особенно при предварительном исследовании вещества следует применять избыток периодата (см. ниже).



### Продолжительность реакции

При постоянном pH и постоянной температуре скорость окисления зависит главным образом от стереохимии молекулы гликоля. Продолжительность реакции может быть различной: от нескольких секунд для простых гликолей, до нескольких дней для высших стерически затрудненных гликолей.

### Аналитическая методика

При изучении кинетики окисления реакции проводят в темных склянках или используют термостатические жидкости, окрашенные красителем в темный цвет, чтобы исключить возможность попадания света в склянки. Выбор окислителя, pH реакционной смеси и растворителя проводят в соответствии со сказанным выше. Реакцию ведут в термостате при температуре не выше 25°. При приготовлении реакционного раствора нужно смешивать разбавленные растворы, так как реакции неспецифического окисления более легко протекают в концентрированных растворах и, следовательно, разбавление позволит их избежать. Образец растворяют в воде или буферном растворе и добавляют равный объем раствора, в котором концентрация периодата в два раза выше, чем это необходимо по расчету. Для определения большинства кинетических характеристик достаточно трехкратного избытка периодата, однако в случае необходимости можно попытаться использовать и двадцатикратный избыток периодата.

Если же окисление проводят при эквимольном соотношении окисляемого вещества и периодата, то концентрация испытуемого вещества и периодата в реакционном растворе должна составлять приблизительно  $3,5 \cdot 10^{-3}$  и  $14 \cdot 10^{-3}$  моль/л соответственно. Одновременно производится окисление контрольной пробы, или пробы холостого опыта, которая содержит все компоненты реакционной смеси, за исключением испытуемого соединения. Холостой опыт особенно необходим в тех случаях, когда в качестве растворителя применяются водные спирты, так как они восстанавливают небольшие количества периодата.

### Препаративная методика

Реакцию ведут в темноте, как указывалось выше, и окислитель, и pH раствора, и растворитель могут быть различными. При препаративном окислении необходимо применять только очень небольшой избыток периодата<sup>1</sup>, чтобы упростить выделение целевого продукта и вести реакцию по возможности избирательно. Если применяется избыток периодата, его можно разрушить в конце реакции добавлением этиленгликоля. Следует подчеркнуть, что при небольшом избытке периодата реакция идет дольше, чем при аналитических определениях, где применяется большой избыток периодата. В большинстве случаев препаративное окисление ведут при комнатной температуре. Применения буферных растворов следует избегать, так как в противном случае в конце реакции возникает необходимость удаления различных ионов.

<sup>1</sup> До проведения препаративного окисления нужно, если это возможно, определить расход периодата.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Jackson E. L., Org. Reactions, 2, 341 (1944); Bobbitt J. M., Advances in Carbohydrate Chem., 11, 1 (1956).
2. Jackson E. L., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., 63, 1229 (1941).
3. Dyer J. R., Methods of Biochemical Analysis, 3, 111 (1956).
4. Barker G. R., Smith D. C. C., Chem. and Ind. (London), 1035 (1952).

## Периодатное окисление

## Определение периодата

Р. Д. Гутри

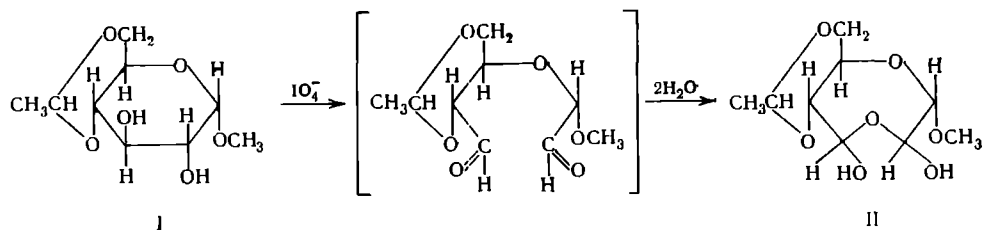
## В В Е Д Е Н И Е

Изучение кинетики периодатного окисления производных углеводов необходимо для выяснения числа окисляемых звеньев и их возможного пространственного положения, а также для установления момента окончания реакции (см. стр. 71). Существует несколько методов определения иона периодата в присутствии иона йода; некоторые из них будут подробно рассмотрены ниже, поскольку они применяются при различных обстоятельствах. Все эти методы предусматривают периодический и одновременный отбор аликвотных проб испытуемой реакционной смеси и холодного опыта. Содержание периодата в обоих пробах определяют титрованием (двух параллельных проб). По полученным данным можно построить кривую расхода периодата во времени. Пробы отбираются и анализируются до тех пор, пока по крайней мере два последовательных титрования дадут одинаковые результаты. Продолжительность реакции<sup>1</sup> и, следовательно, частоту отбора проб можно предварительно определить по данным поляриметрического контроля.

## М Е Т О Д И К А

Для иллюстрации общей методики приводится один пример, на котором будут детально разобраны аналитические приемы.

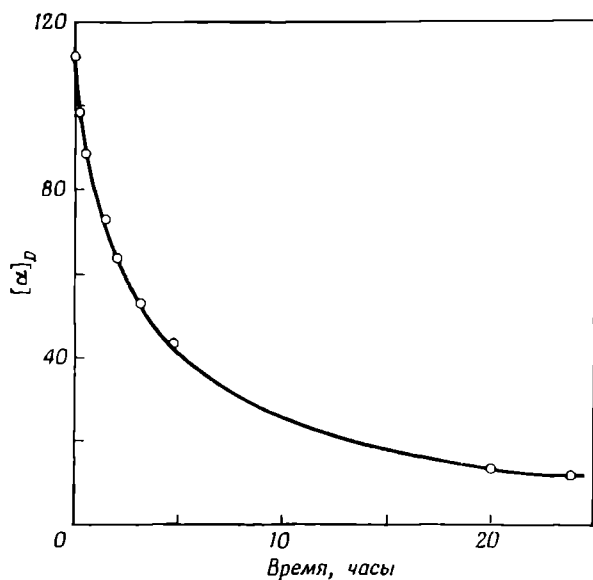
**Периодатное окисление 4,6-О-этилиден-α-метил-  
D-глюкопиранозиды при pH 4,0 и 25° [2, 3]**



Реакцию вначале контролируют поляриметрически. 4,6-О-Этилиден-α-метил-D-глюкопиранозид (I) (0,2 г) растворяют примерно в 18 мл

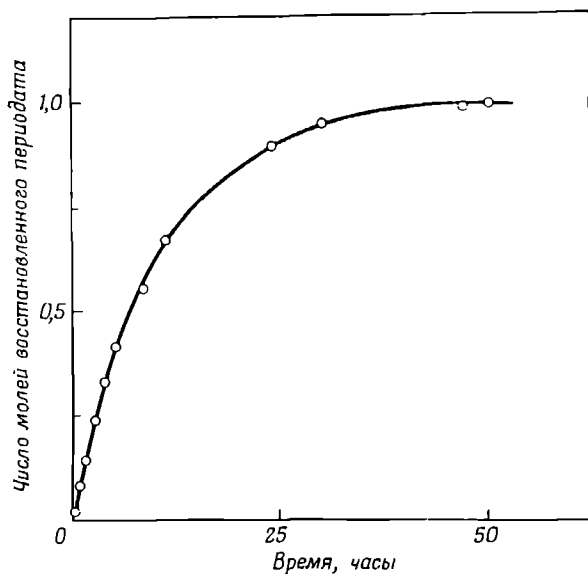
<sup>1</sup> Для контроля реакций, идущих с большой скоростью, где нельзя использовать обычные методы титрования, пользуются прибором Криге [1].

ацетатного буферного раствора (рН 4,0), содержащего 0,5—0,6 г мета-периодата натрия, и быстро доводят объем до 20 мл; время смешивания



Р и с. 1. Изменение оптического вращения реакционного раствора.

замечают. Раствор быстро переносят в трубку поляриметра и контролируют изменение угла вращения до тех пор, пока угол вращения не станет



Р и с. 2. Расход периодата.

постоянным. Между измерениями трубку поляриметра хранят в темноте. Кривая изменения величины  $[\alpha]_D$  во времени представлена на рис. 1.

Ход кривой показывает, что пробы нужно отбирать в течение 5 час с интервалом от получаса до часа, а затем значительно реже.

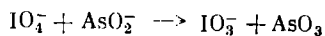
После установления необходимой частоты отбора проб проводят следующий опыт. 4,6-О-Этилиден- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (I) (0,07615 г) растворяют в 45 мл упомянутого выше буферного раствора, находящегося в мерной колбе емкостью 100 мл, и добавляют туда 50 мл  $28,88 \cdot 10^{-3} M$  раствора метапериодата натрия в буферном растворе. Объем раствора быстро доводят до 100 мл и отмечают время добавления. Концентрация глюкозида и периодата натрия в полученном растворе составит соответственно  $3,46 \cdot 10^{-3}$  и  $14,44 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Так же составляют раствор для холостого опыта, но не добавляют гликоль. Через промежутки времени, определенные по данным поляриметрии, отбирают аликвотные пробы реакционной смеси и раствора холостого опыта (первую пробу следует отобрать как можно быстрее) и титруют, как описано ниже, по методу Флери — Ланге. В этом частном случае можно также применить метод Мюллера — Фридбергера или метод Малапраде. Титрование дает возможность рассчитать концентрацию *невозстановленного* периодата и, зная его исходную концентрацию, определить расход периодата.

Если проба холостого опыта показывает, что происходит некоторое поглощение периодата (в приводимом примере этого нет), то в полученную величину расхода периодата на взаимодействие с гликолем нужно ввести соответствующую поправку. Кривая расхода периодата во времени показана на рис. 2.

### Подробная методика анализа<sup>1</sup>

#### Метод Флери — Ланге [4]

Это метод один из наиболее общих и распространенных, но его нельзя применять для сильноокислых и сильнощелочных реакционных смесей. Он заключается в восстановлении иона периодата только до иодата с применением в качестве восстановителя арсенит-иона и иодид-иона в качестве катализатора при pH раствора  $\sim 8$ :



Аликвотную пробу в 5 мл  $\sim 0,01 M$  раствора периодата с помощью пипетки переносят в колбу емкостью 100 мл и тотчас же добавляют 10 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, 20 мл  $\sim 0,01$  н. (0,005 M) раствора арсенита натрия и 2 мл 20%-ного раствора иодистого калия. Смесь выдерживают в темноте 15 мин и титруют избыток арсенита натрия 0,01 н. раствором иода, добавляя в качестве индикатора 1 мл 1%-ного раствора натриевой соли гликолята крахмала. Конечной точкой титрования считают момент появления постоянной бледной сине-фиолетовой окраски. Если раствор быстро обесцвечивается, титрование нужно повторить при 4°.

*Расчет расхода периодата.*

Допустим, что в  $A$  молях исходного раствора содержится  $m$  молей периодата и  $g$  г гликоля с молекулярным весом  $M$ .

<sup>1</sup> В приведенных примерах даны произвольные концентрации компонентов. Относительная концентрация зависит от условий отдельных опытов.

Допустим далее, что в момент отбора аликвотной пробы (5 мл) молярность раствора по периодату была  $x$ . По результатам титрования установлено, что:

$V$  мл 0,01 н. раствора иода  $\equiv$  20 мл раствора арсенита натрия,  $v$  мл 0,01 н. раствора иода  $\equiv$  избытку арсенита при титровании. Тогда  $(V - v)$  мл 0,01 н. раствора иода  $\equiv$  количеству арсенита, поглощенного 5 мл раствора периодата с нормальностью  $2x$ .

$$0,01 (V - v) = 5 \cdot 2x$$

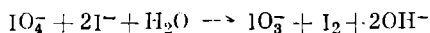
$$\text{Молярность периодата } x = \frac{0,01 \cdot (V - v)}{2 \cdot 5}$$

Если  $A$  мл раствора периодата теперь содержат  $\frac{A}{1000} \cdot \frac{0,01 \cdot (V - v)}{10}$  молей периодата,  $g$  г гликоля поглощают  $m = \frac{0,01A(V - v)}{10000}$  молей периодата или

$$\frac{M}{g} \cdot \left[ m - \frac{0,01A(V - v)}{10000} \right] \text{ молекулярных пропорций периодата.}$$

#### Метод Мюллера — Фридбергера [5]

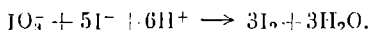
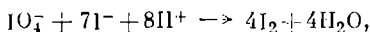
Этот метод, не требующий применения стандартных растворов иода, использовался многими исследователями, так как он более удобен, чем метод Флери и Ланге. Недостатком метода является, однако, то, что в растворе находится свободный иод и, следовательно, этот метод нельзя применять для соединений, которые до или после окисления могут реагировать с иодом; его также нельзя применять для сильноокислых или сильнощелочных растворов. Аликвотную пробу испытуемого раствора нейтрализуют раствором бикарбоната натрия и добавляют иодистый калий только до выделения иода из периодата.



Аликвотную пробу (5 мл) примерно 0,01  $M$  раствора периодата с помощью пипетки вводят в смесь 10 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия и 2 мл 20%-ного раствора иодистого калия. Полученную смесь оставляют на 15 мин в темноте и затем титруют 0,01 н. раствором арсенита натрия. В конце титрования, когда до достижения конечной точки остается прибавить приблизительно 1 мл (когда раствор станет бледно-желтым), добавляют в качестве индикатора 1 мл 1%-ного раствора натриевой соли гликоля крахмала. Изменение окраски раствора от бледно-розовой до бесцветной соответствует конечной точке. Расчет расхода периодата аналогичен приведенному выше, но необходимо помнить, что 1 н. раствор арсенита натрия эквивалентен 0,5  $M$  раствору периодата.

#### Метод Малапраде [6]

Этот метод предназначен для анализа сильнощелочных или сильно-кислых растворов. В реакционной среде также образуется свободный иод (см. выше), так как в кислом растворе оба иона — иодат и периодат — восстанавливаются до свободного иода:



К 5 мл аликвотной пробы испытуемого раствора добавляют 5 мл 30%-ного раствора иодистого калия и 5 мл 2 н. серной кислоты. Выделившийся иод немедленно титруют стандартным 0,1—0,2 н. раствором тиосульфата натрия, добавляя в качестве индикатора 1 мл 1%-ного раствора натриевой соли гликолята крахмала, как описано в предыдущих разделах. На каждый моль периодата, находящегося в исходном растворе, образуется 4 моля иода; из аликвотной пробы реакционной смеси, содержащей периодат и иодат, образуется от 3 до 4 молей иода.

#### Ионообменный метод [7]

Этим методом можно пользоваться в тех случаях, когда раствор окрашен и нельзя применять индикаторы или если реагенты, используемые в ранее описанных методах, могут реагировать с соединением, подлежащим окислению, или с продуктами реакции. В этих случаях ионы периодата и иодата абсорбируют на ионообменной смоле, а затем элюируют и определяют. Колонку (10×0,8 см) заполняют приблизительно 1,6 г воздушносухого амберлита IRA-400 (ацетатная форма), приготовленного в виде пасты. Если в реакции применяется неводный растворитель, для последней промывки колонки нужно взять именно этот растворитель. Реакционную смесь с содержанием периодата ~0,01 моль/л медленно пропускают через колонку со скоростью примерно 1 мл/мин. Реакционную колбу споласкивают растворителем, применявшимся при окислении, и промывной раствор<sup>1</sup> вместе с водой также пропускают через колонку. Затем ион периодата элюируют 5%-ным раствором едкого кали при скорости потока примерно 2 мл/мин. Общий объем элюата должен составлять ~150 мл. Элюат нейтрализуют 2 н. серной кислотой по фенолфталеину, добавляют 0,25 г бикарбоната натрия и анализируют по методу Флери — Ланге.

#### Спектрофотометрический метод [8, 9]

Ион периодата поглощает при 222,5 мкм [10]. Этот метод можно применять в тех случаях, если окисляемые компоненты или их продукты реакции взаимодействуют с одним из реагентов, применяемых в приведенных выше методиках, или при окислении очень малых количеств. Определение удобно вести с количествами углеводов, рассчитанными по формуле

$$\mu M \cdot P = 70 \div 100,$$

где  $\mu M$  — микромоли углевода и  $P$  — число молей восстановленного периодата. Подходящие количества составляют 6—9 мг для производного моносахарида, поглощающего 2 моля периодата; если поглощается 1 моль, то это количество удваивается. Производное углевода растворяют в 10 мл 0,015 М раствора метапериодата натрия и раствор оставляют в темноте. Отбирают аликвотные пробы и разбавляют их в 250 раз. Если для исследования доступно очень малое количество материала, то исходный объем можно уменьшить и провести окисление с образцами весом 2—3 мг. Оптическая плотность пробы измеряется при 223 мкм

<sup>1</sup> Продукт реакции можно получить упариванием соединенных растворов, пропущенных через колонку. В зависимости от применяемого окислителя в элюате будут присутствовать уксусная кислота или ее соли.

и сравнивается с оптической плотностью исходного раствора метацианида натрия, разбавленного в 250 раз, и плотностью эквимольного раствора иодата (оптическая плотность соответственно  $\sim 0,6$  и  $1,0$ ).

### Другие методы

Все эти методы применяются в ограниченных масштабах. Метод Неймюллера — Фассера [11] аналогичен методу Мюллера и Фридбергера, за исключением того, что вместо раствора бикарбоната натрия используют фосфатный буферный раствор с pH 6,98 и свободный иод титруют раствором тиосульфата. Метод Вилларда и Грейтхауза [12] также подобен приведенным выше методам, но он предусматривает использование буферного раствора бура — борная кислота, а свободный иод по этому методу титруют раствором арсенита натрия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Criegree R., Ann., **495**, 219 (1932).
2. Guthrie R. D., Honeyman J., J. Chem. Soc., **1959**, 2441.
3. Honeyman J., Shaw C. J. G., J. Chem. Soc., **1959**, 2454.
4. Fleury P. F., Lange J., J. pharm. chim., **17**, 107, 196 (1933).
5. Müller E., Friedberger O., Ber., **35**, 2652 (1902).
6. Malaprade L., Compt. rend., **186**, 392 (1928); Bull. soc. chim. France, **43**, 683 (1928).
7. Smith M. A., Willeford B. R., Anal. Chem., **26**, 751 (1954).
8. Dixon J. S., Lipkin D., Anal. Chem., **26**, 1092 (1954).
9. Aspinall G. O., Ferrier R. J., Chem. and Ind. (London), 1216 (1956).
10. Crouthamel C. E., Meek H. V., Martin D. S., Banks C. V., J. Am. Chem. Soc., **71**, 3031 (1949).
11. Neumüller G., Vasseur E., Arkiv Kemi, Mineral. Geol., **5**, 235 (1935).
12. Willard H. H., Greathouse L. H., J. Am. Chem. Soc., **60**, 2869 (1938).

## Окисление периодатом

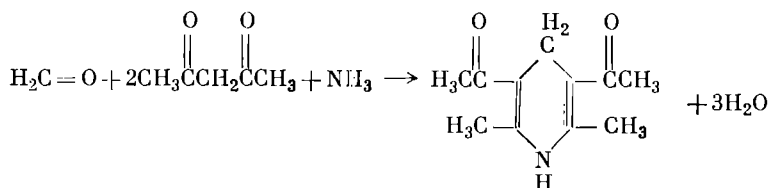
### Определение формальдегида

*Дж. К. Спек, мл.*

## ВВЕДЕНИЕ

Большинство наиболее удачных методов определения формальдегида в реакционной смеси после окисления периодатом основано на реакции формальдегида с димедоном (5,5-диметилциклогексантионом-1,3) [1, 2] (см. также стр. 54) или хромотроповой кислотой (4,5-диокси-2,7-нафталиндисульфокислотой) [3—6]. Во всех этих методах мешающие определения ионы иодата и периодата удаляют восстановлением арсенитом натрия [2, 6], хлористым оловом [4] или сульфитом натрия [5]. Хромотроповая кислота с формальдегидом даст пурпурный краситель неизвестной структуры, в то время как в результате реакции формальдегида с димедоном образуется твердое производное, что позволяет выделить формальдегид

из реакционной смеси после периодатного окисления для определения содержания в нем изотопов. Тем же менее в большинстве случаев для определения формальдегида применяют хромотроповую кислоту, а не димедон, так как она является чувствительным и специфичным реагентом, который быстро реагирует с формальдегидом. Другой очень чувствительный, специфичный и быстрый метод определения формальдегида основан на его реакции с ацетилацетоном (пентандионом-2,4) и аммиаком, в результате которой образуется окрашенное в желтый цвет соединение 3,5-диацетил-1,4-дигидро-2,6-лутидин:



Неш [8] использовал этот пример реакции Ганча [7] как основу для количественного определения формальдегида, которое проводится в очень мягких условиях.

Приведенные ниже методики представляют собой модифицированный метод Неша, используемый для реакционных смесей, получаемых после периодатного окисления, и модификацию метода Ламберта и Нейша [6] для определения глицерина, который основан на реакции с хромотроповой кислотой. Эти колориметрические методы почти одинаково чувствительны и дополняют друг друга в том смысле, что присутствие веществ, которые мешают определению по одному из этих методов, не всегда сказывается при определении другим методом.

Ниже приводятся также методика приготовления стандартных растворов формальдегида и предлагаемая методика окисления периодатом для сахаров и родственных им соединений, предшествующая определению оксиметильных групп в виде формальдегида.

## МЕТОДИКА

### *Периодатное окисление сахаров и родственных им соединений*

Навеску окисляемого вещества, взятого в таком количестве, чтобы оно могло восстановить не более 0,5 ммоль периодата и по объему не превышало 2 мл, смешивают с 2 мл 0,3 М раствора иодной кислоты и 2 мл 1 М раствора бикарбоната натрия. Чтобы приготовить раствор иодной кислоты, растворяют в воде взвешенное количество твердой кислоты  $\text{H}_5\text{IO}_6$  и полученный раствор разбавляют до нужного объема. Растворы иодной кислоты портятся при стоянии, поэтому их не следует готовить заранее.

Реакционную смесь оставляют стоять 1 час при 25°. В этих условиях большинство соединений полностью взаимодействует с периодатом в течение нескольких минут, если не допускать появления кислой реакции в реакционной смеси. В кислой среде на последней стадии окисление периодатом сахаров, которые способны давать в результате частичного окисления формиаты, такие, как 2-О-формил-Д-глицероза, может идти



медленно, так как гидролиз этих эфиров в кислой среде происходит значительно более медленно, чем в слабощелочной среде, которая создается за счет избытка бикарбоната натрия (см. стр. 62).

### ***Восстановление реакционных смесей после периодатного окисления арсенитом натрия***

Окисленную смесь подкисляют 15 мл 0,5 М раствора серной кислоты и добавляют 5 мл 1 М раствора арсенита натрия (13 г метарсенита натрия  $\text{NaAsO}_2$  в 100 мл раствора). Смесь осторожно перемешивают до тех пор, пока исчезнет свободный иод, выделившийся при добавлении арсенита. Полное восстановление иода в таких смесях проходит менее чем за 5 мин.

### ***Ацетилацетон-аммиачный метод***

Раствор, полученный в результате восстановления арсенитом натрия реакционной смеси, образовавшейся после периодатного окисления, разбавляют водой, так чтобы концентрация формальдегида в образце, взятом для колориметрического определения, не превышала 0,25 мкмоль/мл. Величина, соответствующая поглощению при 412 мкм, равна приблизительно 0,93 для исследуемого образца при измерении в 1 см кювете по разности с пробой холостого опыта. Измеренный объем этого раствора установленной концентрации помещают в пробирку и смешивают с равным объемом ацетилацетон-аммиачного реагента. Для приготовления этого реагента 2 мл ацетилацетона (лучше свежеперегнанного), 150 г ацетата аммония и 3 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в воде и разбавляют до 1 л. Этот реагент не должен заметно окрашиваться; он устойчив в течение нескольких недель.

Проба холостого опыта готовится так же и состоит из равных объемов ацетилацетон-аммиачного реагента и дистиллированной воды. Пробирки нагревают 10 мин на водяной бане при 60°, охлаждают и измеряют поглощение при 412 мкм. При экспозиции на воздухе и свету 3,5-диацетил-1,4-дигидро-2,6-лутидин постепенно бледнеет. Однако изменение поглощения в обычных лабораторных условиях в течение времени, необходимого для проведения этих измерений, не существенно.

Насколько известно, использованию метода препятствует наличие некоторых, мешающих определению соединений. Так, ацетальдегид образует 3,5-диацетил-1,4-дигидро-2,4,6-триметилпиридин, максимум поглощения которого соответствует не 412, а 388 мкм. Однако Неш сообщил [8], что эта реакция идет более медленно, чем реакции с формальдегидом, и, следовательно, влияние ацетальдегида незначительно, если только он не присутствует в больших количествах.

### ***Метод определения с хромотроповой кислотой***

Раствор, полученный при восстановлении арсенитом реакционной смеси после периодатного окисления, разбавляют так, чтобы концентрация формальдегида не превышала 0,62 мкмоль/мл: это соответствует величине поглощения ~0,97 для испытываемого образца, которое измеряется при 570 мкм в 1 см кюветах против пробы холостого опыта. Разбавленный раствор формальдегида (1 мл) помещают в пробирку и смешивают с 10 мл реагента, содержащего хромотроповую кислоту. Этот

реагент готовят согласно методике Мак-Фэдина [9]. Хромотроповую кислоту (1 г) растворяют в 100 мл воды; можно применять хромотроповую кислоту обычного качества, однако, если она не растворяется полностью, нерастворимый осадок (сульфоны) нужно удалить фильтрованием. Обычную хромотроповую кислоту можно легко очистить перекристаллизацией из 50%-ного спирта. Этот раствор доводят до 500 мл, добавляя примерно 12,5 М серную кислоту, которую готовят, смешивая 2 объема концентрированной серной кислоты с 1 объемом воды. Для полученного раствора величина поглощения не должна превышать 0,1, если она измеряется против воды в 1 см кюветах при 570 мкм. При хранении в темноте реагент устойчив в течение 2—3 недель.

Пробу холостого опыта готовят, смешивая 1 мл дистиллированной воды с 10 мл хромотропового реагента. Пробирки нагревают 30 мин на кипящей водяной бане, закрыв их, когда они станут горячими. После охлаждения измеряют величину поглощения для образца с формальдегидом против пробы холостого опыта при 570 мкм. Реакционная смесь формальдегид — хромотроповая кислота обесцвечивается медленно.

Определению формальдегида, согласно литературным данным [10], мешает присутствие ацетальдегида, этилметилкетона, диацетонового спирта (4-окси-4-метилпентанона-2), акролеина,  $\beta$ -оксипропионовой кислоты и высших алифатических спиртов. Также мешает определению присутствие пировиноградного альдегида и диацетила [11, 12]. Однако эти вещества обычно не встречаются в реакционных смесях после окисления углеводов периодатом.

### **Приготовление стандартных растворов формальдегида**

Растворы формальдегида известной концентрации для получения стандартной кривой для любого из описанных методов можно приготовить из образцов чистой D-глюкозы или D-эритрита по методике, приведенной при описании окисления периодатом и восстановления реакционной смеси после периодатного окисления арсенитом натрия. Стандартные растворы формальдегида можно также приготовить путем кислотного гидролиза чистого гексаметилентетрамина по методике Мак-Фэдина [9].

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Vorländer D., Z. anal. Chem., **77**, 241 (1929).
2. Reeves R. E., J. Am. Chem. Soc., **63**, 1476 (1941).
3. Eegriwe E., Z. anal. Chem., **110**, 22 (1937).
4. Corcoran A. C., Page I. H., J. Biol. Chem., **170**, 165 (1947).
5. Speck J. C., Jr., Forist A. A. Anal. Chem., **26**, 1942 (1954).
6. Lambert M., Neish A. C., Can. J. Research, **23B**, 83 (1950).
7. Hantzsch A., Ann., **215**, 8 (1882).
8. Nash T., Biochem. J., **55**, 416 (1953).
9. MacFadyen D. A., J. Biol. Chem., **158**, 107 (1945).
10. Bricker C. E., Johnson H. R., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **17**, 400 (1945).
11. Thornton B. J., Speck J. C., Jr., Anal. Chem., **22**, 899 (1950).
12. Speck J. C., Jr., Anal. Chem., **20**, 647 (1948).

## Периодатное окисление

### Выделение продуктов реакции

*Р. Д. Гутри*

### ВВЕДЕНИЕ

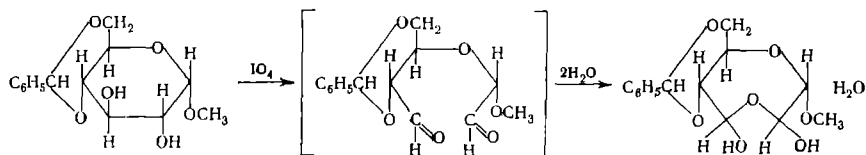
Выделение продуктов окисления существенно для подтверждения кинетических опытов и если реакция используется в препаративных целях. В последнем случае, чтобы иметь представление о длительности реакции, необходимо определить количество периодата, поглощаемого данным соединением (см. стр. 62). Если же реакция идет в гомогенной среде, ее можно контролировать поляриметрически. Метод выделения зависит от свойств выделяемого продукта; ниже приведены основные используемые методы. Следует избегать применения водных спиртов, чтобы предотвратить образование алкилполуацеталей диальдегида [1]. Окисление не следует вести в щелочных условиях, так как в этом случае происходит деградация продукта. Применение иодной кислоты часто облегчает выделение целевого продукта, поскольку в этом случае нет катионов, которые нужно удалять из раствора. Нужно отметить, что при выделении продуктов периодатного окисления не удается получить свободного диальдегида; обычно его выделяют в виде полуальдегида или внутреннего полуацетала.

### МЕТОДИКА

#### *Нерастворимые продукты реакции*

Продукт реакции легко выделить, если реакция гетерогенна, как, например, окисление целлюлозы, или в тех случаях, когда он кристаллизуется из реакционного раствора.

Окисление 4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил- $\beta$ -глюкопиранозид [2]:

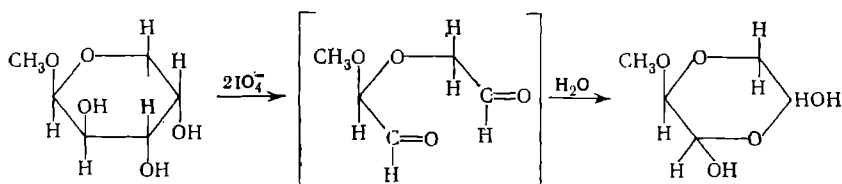


14 г (0,0496 моля) 2,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил- $\beta$ -глюкопиранозид (I) [14] растворяют в 3750 мл воды, нагретой до 80—90°; раствор охлаждают до комнатной температуры, добавляют к нему 10,7 г (0,050 моля) мета-периодата натрия, фильтруют и оставляют в темноте на 5 дней. Кристаллический продукт отфильтровывают, промывают водой и затем небольшим количеством петролейного эфира для удаления следов бензальдегида и высушивают в вакууме над пятиокисью фосфора. Выход гидрата-7,9-диокси-6- $\alpha$ -метокси-2-фенил-*транс*-*м*-диоксано-[5,4-*e*]-1,4-диоксепана (II) [3] 11 г, т. пл. 143—144°. То же вещество получают при окислении 4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил- $\beta$ -маннопиранозид или 4,6-О-бензилиден-3-амино-3-дезоксид- $\alpha$ -метил- $\beta$ -альтропиранозид [3].

### Удаление ионов иодата и периодата методом осаждения

Это, по-видимому, наиболее общий метод выделения продуктов окисления. Для осаждения ионов периодата и иодата применяются хлористый барий [4], гидрат окиси бария [5], ацетат [6] и нитрат свинца [7], но наиболее широко применяется гидрат окиси стронция [8].

Окисление  $\beta$ -метил-L-арабинопиранозида [9]:



Иодную кислоту (98 мл 0,269 *M* раствора) прибавляют к 2,057 г  $\beta$ -метил-L-арабинопиранозида (III) [10], помещенного в калиброванную колбу емкостью 100 мл. Полученный раствор быстро разбавляют водой до 100 мл и оставляют в темноте на 1,5 час при комнатной температуре. Оптическое вращение такого раствора соответствует  $[M]_D + 163^\circ$ . Раствор нейтрализуют по фенолфталеину горячим водным раствором гидрата окиси стронция (примерно 10%-ным). *Нейтрализацию нужно вести так, чтобы избежать малейшего избытка гидроокиси.* Осадок солей стронция отфильтровывают и промывают холодной водой. Фильтрат и промывные воды объединяют, добавляют 1 г карбоната стронция и упаривают в вакууме при температуре бани не выше  $40^\circ$  до объема 25 мл. После этого карбонат стронция отфильтровывают, а фильтрат упаривают в тех же условиях досуха. Полученный осадок 6 раз экстрагируют 25 мл порциями спирта. Спиртовой раствор упаривают при возможно более низкой температуре бани. К полученному сиропу добавляют 2 мл воды и затем снова упаривают в вакууме, как было указано выше; добавление воды предотвращает образование диальдегида этилполуацетата (ср. [11]). Продукт реакции (IV) получают в виде сиропа с почти количественным выходом. Этот метод можно применять для окисления любого из метилпентопиранозидов или гексопиранозидов (вес исходных соединений должен быть различным).

### Удаление ионов периодата и иодата с помощью ионообменных смол

Удаление ионов осуществляют по методике, приведенной в разделе, посвященном анализу реакционной смеси (см. стр. 62). Реакционный раствор пропускают через колонку, как описано, элюат и промывные воды соединяют и упаривают досуха в вакууме при температуре бани не выше  $50^\circ$ . Полученный остаток извлекают подходящим растворителем, обычно хлороформом, и, концентрируя экстракт, получают продукт окисления.

### Другие методы выделения

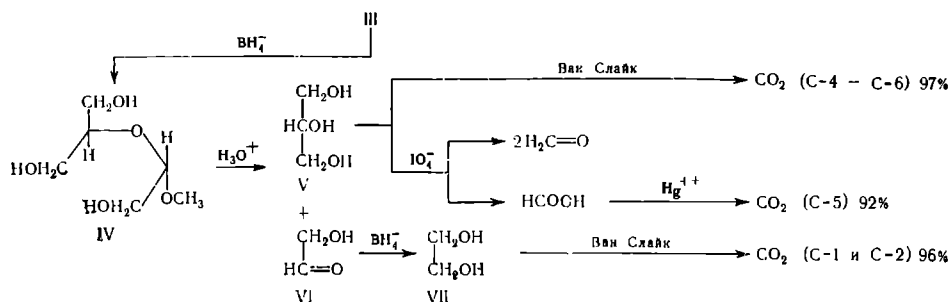
Два других метода выделения применяются реже, и их примеры будут даны только литературными ссылками. Продукты окисления некоторых полисахаридов можно выделить диализом; примером этой методики служит окисление ксилана пшеничной соломы [12].

ЛИТЕРАТУРА

- ## Определение положения радиоактивного углерода в альдозах

Дж. К. Н. Джонс, Р. Дж. Студли





## ВВЕДЕНИЕ

Существует несколько химических методов, позволяющих установить распределение радиоактивности в молекуле D-глюкозы, меченной  $C^{14}$  [1—6]. Выбор того или иного метода деградации зависит от типа применяемого счетчика<sup>1</sup>, удельной активности образца D-глюкозы<sup>2</sup>, а также от того, нужно ли определять активность каждого атома углерода отдельно<sup>3</sup>.

Ниже приведено описание метода, включающего приготовление двух кристаллических производных D-глюкозы, а именно D-глюконата калия и  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозида, с последующей их деградацией. Для определения требуется всего лишь 1 ммоль сахара, причем непосредственно получают значения удельной активности C-1, C-3, C-5 и C-6, а активность C-2 и C-4 вычисляют по разности.

## МЕТОДИКИ

### Общий метод

Углекислый газ, образующийся в описанных ниже примерах в результате окисления, увлекается током азота, очищенного от углекислого газа, и пропускается через раствор, содержащий хлористый барий и едкий натр<sup>4</sup>. Выпавший в осадок карбонат бария (около 30 мг) делят на три порции и после внесения поправочного коэффициента на самопоглощение определяют удельную активность каждого образца.

### Получение D-глюконата калия (I)

D-Глюконат калия получают по методу Мура и Линка [7]. Смесь 60 мг D-глюкозы и 170 мг очищенного возгонкой иода помещают в центри-

<sup>1</sup> При использовании счетчика Гейгера — Мюллера все продукты реакций должны быть переведены в одно и то же химическое соединение. Карбонат бария весьма удобен для анализа, поэтому необходимо каждый из атомов углерода D-глюкозы превратить в углекислый газ и затем в карбонат бария. Часто оказывается невыгодным сжигать «тяжелые» молекулы, такие, как димедонное производное формальдегида, поскольку это приводит к многократному разбавлению меченого звена.

<sup>2</sup> Удельная активность D-глюкозы показывает, сколько неактивной D-глюкозы можно добавить к меченому образцу и, следовательно, какие химические реакции можно использовать для выделения соответствующих звеньев молекулы.

<sup>3</sup> В некоторых случаях большая часть активности локализована на концевых атомах углерода, так что нет необходимости применять такие методы, которые позволяют определять активность каждого атома углерода в отдельности.

<sup>4</sup> 8 г дигидрата хлористого бария и 12,5 г едкого натра растворяют в 1 л воды и отфильтровывают осадок. Об аппаратуре, удобной для улавливания  $CO_2$ , см. [13].

фужную пробирку емкостью 15 мл и растворяют в 3,2 мл горячего метанола. К перемешиваемому при 40° раствору добавляют по каплям в течение 20 мин 3,5 мл 4%-ного (вес/об.) раствора едкого кали в метаноле, охлаждают до комнатной температуры, продукт отделяют центрифугированием, промывают метанолом, эфиром и сушат на воздухе. После перекристаллизации из водного метанола получают 62 мг (80%) D-глюконата калия, т. пл. 180° (с разл.),  $[\alpha]_D^{20} + 11^\circ$  (с 1,0 в воде).

### Дегградация D-глюконата калия (I)

Для дегградации применяют метод Бернштейна [8]. D-Глюконат калия (50 мг) растворяют в 7 мл 0,5 M буферного раствора фосфата натрия с pH 5,8 и окисляют при комнатной температуре, добавляя 3,3 мл 0,3 M раствора метаперiodата натрия.

#### Определение содержания C<sup>14</sup> в C-1

Выделившийся при окислении углекислый газ (из C-4) переводят в карбонат бария.

#### Определение содержания C<sup>14</sup> в C-6

Раствор после окисления (и отгонки углекислого газа) пропускают через колонки с амберлитом IR-120 (H<sup>+</sup>) и дуолитом A4 (OH<sup>-</sup>), элюат упаривают до небольшого объема (~15 мл)<sup>1</sup>. К полученному таким образом раствору формальдегида (из C-6) добавляют при 0° 10 мл 1 н. раствора едкого натра и 10 мл 0,1 н. раствора подкислителя [9] для окисления формальдегида в муравьиную кислоту. Через 30 мин раствор подкисляют 2 н. серной кислотой, добавляют 2 M раствор арсенита натрия до исчезновения окраски иода, нейтрализуют едким натром, концентрируют до небольшого объема (~15 мл) и подкисляют 1 н. серной кислотой. Этот раствор перегоняют почти досуха и окисляют находящуюся в дистиллате муравьиную кислоту до углекислого газа кипячением дистиллата с 10 мл раствора ацетата ртути<sup>2</sup>, как это описано Вике и Джекобсом [10].

#### Определение содержания<sup>3</sup> C<sup>14</sup> в C-2 — C-5

Муравьиную кислоту (из C-2—C-5) элюируют из колонки с дуолитом A4 50 мл 0,25 н. гидроокиси бария, промывают 100 мл воды. Часть элюата (30 мл), содержащего формиат бария, подкисляют ледяной уксусной кислотой до pH 4 и окисляют выделившуюся муравьиную кислоту до углекислого газа по описанной выше методике [10].

### Получение α-метил-D-глюкопиранозида (II)

Синтез α-метил-D-глюкопиранозида (II) проводят в соответствии с указаниями Нейша и сотр. [4]. К 3 мл 3%-ного раствора хлористого

<sup>1</sup> Потери формальдегида при упаривании в вакууме разбавленных водных растворов очень незначительны.

<sup>2</sup> 0,3 M раствор ацетата двухвалентной ртути в 0,5 M уксусной кислоте.

<sup>3</sup> Это определение можно не проводить, но путем суммирования удельных активностей всех фрагментов, образующихся при дегградации D-глюконата калия, можно провести независимую оценку и проверку общей активности, вычисленной на основании дегградации α-метил-D-глюкопиранозида.

водорода в метаноле добавляют 120 мг D-глюкозы, смесь кипятят 3 час, охлажденный раствор разбавляют 3 объемами воды и пропускают через небольшую колонку с амберлитом IR-400 (ОН<sup>-</sup>). Нейтральный элюат упаривают в вакууме до сиропа, который кристаллизуется при добавлении спирта. Его перекристаллизовывают из смеси этанола и метанола (1 : 1); выход 70 мг (55%), т. пл. 164—165°,  $[\alpha]_D^{20} + 158^\circ$  (с 1,0 в воде).

### Дегградация $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозиды (II)

Это соединение подвергают дегградации по методу, разработанному Аберкромби и Джонсом [5]. К раствору 70 мг  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозиды в 2 мл воды добавляют 2 мл 0,4 М раствора иодной кислоты, выдерживают 3 час при комнатной температуре, пропускают через небольшую колонку с дуолитом А4 (ОН<sup>-</sup>) и тщательно промывают колонку водой. Элюат (~110 мл), содержащий диальдегид (III), упаривают до небольшого объема (~20 мл) и добавляют к нему 25 мг боргидрида натрия. Через 5 час триол (IV) гидролизуют 2 мл 2 н. соляной кислоты в течение 20 мин при 60° и получают глицерин (V) и гликолевый альдегид (VI). Охлажденный раствор нейтрализуют едким натром, добавляют 20 мг боргидрида натрия [для восстановления гликолевого альдегида в этиленгликоль (VII)], через 5 час избыток боргидрида разрушают, добавляя твердую углекислоту, раствор деионизуют пропусканием через колонки с амберлитом IR-120 (Н<sup>+</sup>) и дуолитом А4 (ОН<sup>-</sup>). Элюат упаривают до сиропа и трижды упаривают с метанолом для удаления борной кислоты. Получают бесцветный подвижный сироп; выход 44 мг (80%).

Сироп фракционируют методом хроматографии на бумаге (ватман 3 MM)<sup>1</sup> и соответствующие зоны хроматограммы<sup>2</sup> элюируют водой. Элюаты упаривают, растворяют в метаноле, фильтруют, концентрируют и получают 28 мг (85%) глицерина (V) и 7 мг (31%) этиленгликоля (VII) в виде бесцветных сиропов.

### Определение содержания C<sup>14</sup> в C-3

Муравьиную кислоту (из C-3) элюируют из колонки с дуолитом А4 20 мл 0,25 н. раствора гидроокиси бария, промывают 30 мл воды; элюат подкисляют ледяной уксусной кислотой до pH 4 и окисляют муравьиную кислоту до углекислого газа обычным образом [10, 13].

### Определение содержания C<sup>14</sup> в C-1 и C-2

Этиленгликоль (из C-1 и C-2) нацело сжигают по методу Ван-Слайка и сотр. [12, 13]. К 5 мг сиропа этиленгликоля добавляют 300 мг твердого реагента<sup>3</sup> и 2 мл жидкого реагента<sup>4</sup>, затем смесь кипятят 2 мин на микрогорелке. Углекислый газ поглощают обычным способом.

<sup>1</sup> Бумагу предварительно промывают 1 н. соляной кислотой, водой и системой растворителей, в которой проводят хроматографическое разделение (n-бутанол — спирт — вода 3 : 1 : 1).

<sup>2</sup> Для определения местоположения спиртов по краям листа бумаги наносят смесь неактивных этиленгликоля и глицерина, после хроматографирования эти крайние полоски отрезают и проявляют щелочным раствором нитрата серебра [11, 14, 15].

<sup>3</sup> Твердый реагент готовят растиранием 1,0 г иодата калия со 100 мг бихромата калия.

<sup>4</sup> Жидкий реагент готовят, растворяя 1,5 г иодата калия в смеси 50 мл концентрированной серной кислоты и 50 мл сиропообразной фосфорной кислоты при нагревании до 160—190°.



Определение содержания  $C^{14}$  в C-4 — C-6

5 мг глицерина окисляют до углекислого газа в условиях, описанных для окисления этиленгликоля.

Определение содержания  $C^{14}$  в C-5

Растворяют 15 мг глицерина в 15 мл 0,2 М буферного раствора фосфата натрия с pH 8,0, добавляют 2,0 мл 0,3 М раствора метапериодата натрия, через 1 час избыток метапериодата разрушают добавлением боргидрида натрия и раствор подкисляют серной кислотой. Муравьиную кислоту (из C-5) окисляют до углекислого газа раствором ацетата ртути [10].

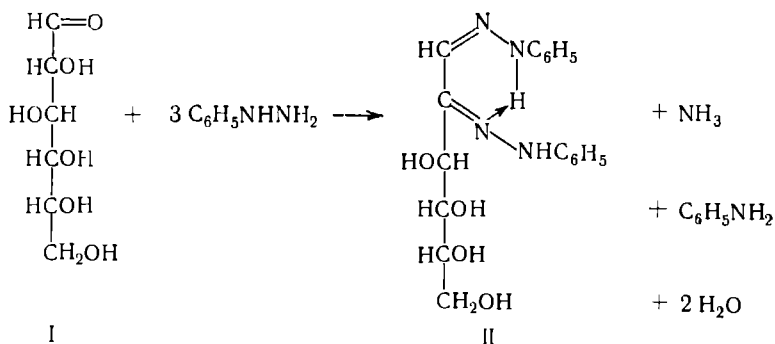
## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Abraham S., Chaikoff I. L., Hassid W. Z., J. Biol. Chem., **195**, 567 (1952).
2. Bishop C. T., Science, **117**, 715 (1953).
3. Bevington J. C., Bourne E. J., Turton C. N., Chem. and Ind. (London), 1390 (1953).
4. Boothroyd B., Brown S. A., Thorn J. A., Neish A. C., Can. J. Biochem. and Physiol., **33**, 62 (1955).
5. Abercrombie M. J., Jones J. K. N., Can. J. Chem., **38**, 1999 (1960).
6. Kohn P., Dmuchowski B. L., J. Biol. Chem., **235**, 1867 (1960).
7. Moore S., Link K. P., J. Biol. Chem., **133**, 293 (1940).
8. Bernstein I. A., J. Biol. Chem., **205**, 309 (1953).
9. Sakami W., J. Biol. Chem., **187**, 369 (1950).
10. Wieke H. D., Jacobs B., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **8**, 44 (1936).
11. Trevelyan W. E., Proctor D. P., Harrison J. S., Nature, **166**, 444 (1950).
12. Van Slyke D. D., Plazin J., Weisiger J. R., J. Biol. Chem., **191**, 299 (1951).
13. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 496.
14. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 21.
15. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 395.

# Производные для идентификации

## Фенилозазоны

*Н. К. Рихтмайер*



### ВВЕДЕНИЕ

Первый фенилозозон сахара (II) был получен Эмилем Фишером в 1884 г. [1] при нагревании водного раствора D-глюкозы (I) с солянокислым фенилгидразином в присутствии ацетата натрия. Уравнение реакции приведено выше [2], но до сих пор не существует единого мнения относительно механизма этой сложной реакции. Фенилозазоны плохо растворимы в воде, и их часто использовали для идентификации сахаров. Однако поскольку один и тот же фенилозозон, например II, образуется из трех разных сахаров: D-глюкозы, D-маннозы и D-фруктозы, то такая идентификация носит ограниченный характер. Фенилозазоны плавятся с разложением, их окрашенные растворы обычно медленно мутаротипруют, что вносит неопределенность в идентификацию; тем не менее предварительная идентификация может быть подтверждена изучением свойств фенилозотриазолов (см. стр. 81), которые легко получают из фенилозазонов, бесцветны, имеют четкие температуры плавления и не мутаротипируют в растворах.

Соединение (II), названное вначале фенилглюкозозоном и позднее фенилозозоном D-глюкозы, имеет систематическое название — фенилозозон D-арабино-гексозы, которым теперь преимущественно и пользуются [3]. Местер [4] показал, что озазоны существуют, вероятно, в хелатной форме (II), предложенной Физерами [5].

В 1947 г. Хаскинс, Хан и Хадсон составили, но не опубликовали сводку своих опубликованных и неопубликованных данных по синтезу и свойствам фенилозазонов сахаров. Они рекомендовали использовать 2-метоксизтанол (метилцеллозольв) в качестве растворителя для проведения реакции, перекристаллизации некоторых фенилозазонов и измерения их мутаротации. Растворы в метилцеллозольве не так сильно темнеют со временем, как растворы в смеси спирта и пиридина, которые использовали ранее. Измерение медленной мутаротации растворов удобнее всего проводить в стеклянных поляриметрических трубках с припаянными во избежание вытекания раствора к обоим концам стеклянными пластинками. Приводимые ниже детали проведения синтеза и константы взяты, как правило, из этой не публиковавшейся раньше сводки

## МЕТОДИКА

*Получение фенилозазонов в водном растворе*

Обычно реакцию проводят в воде. Сахар растворяют в таком количестве воды, чтобы его концентрация составила указанную в таблице (см. ниже) величину, и добавляют по 4 мол. экв. свежеперегнанного фенилгидразина и ледяной уксусной кислоты. Смесь нагревают на водяной бане в течение определенного времени. Фенилоазон обычно выкристаллизовывается из горячего раствора; раствор охлаждают, отфильтровывают фенилоазон и промывают его последовательно 10%-ной водной уксусной кислотой, водой, холодным спиртом и эфиром. Дополнительное количество продукта часто удается получить при повторном нагревании маточных растворов. Выход (по весу) обычно равен весу взятого сахара.

*Получение фенилозазонов в метилцеллозольве;  
фенилоазон D-эритро-пентозы [6]*

Смесь 25 г D-арабинозы, 32,5 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл метилцеллозольва нагревают до 80° на водяной бане; оставшийся нерастворенным сахар быстро переходит в раствор при добавлении 65 мл фенилгидразина. Смесь нагревают еще 1 час, после чего раствор выливают при перемешивании в 1600 мл воды, помещают на 2 час в холодильник, отфильтровывают обильный желтый осадок и промывают 10%-ной уксусной кислотой (2 × 50 мл) и водой (4 × 100 мл). Осадок отжимают от воды на фильтре как можно полнее и сразу растворяют в 100 мл кипящего спирта. При охлаждении фенилоазон выкристаллизовывается в почти чистом виде, образуя друзды мелких желтых иголок, их отфильтровывают и промывают спиртом (3 × 25 мл), охлажденным до 0°, выход 23 г (42%). Свойства этого фенилоазона приведены ниже.

*Получение и свойства фенилозазонов сахаров*

Для каждого из приведенных ниже фенилозазонов 21 сахара указаны: его систематическое название; название сахара, из которого он был получен; концентрация сахара (г/100 мл воды или метилцеллозольва); время нагревания на водяной бане (часы); количество весовых частей используемого для перекристаллизации растворителя<sup>1</sup>; температура плавления (разложения); исходное  $[\alpha]_D^{20}$ , определяемое сразу после растворения, и конечное  $[\alpha]_D^{20}$ , концентрация фенилоазона (г/100 мл смеси пиридин — спирт, взятых в соотношении 2 : 3), время (часы), необходимое для достижения постоянного значения удельного вращения, т. е. не меняющегося в течение последующих 24 час, и соответствующие значения величин удельного вращения фенилоазона в метилцеллозольве.

Фенилоазон D-эритро-пентозы; D-арабиноза; 25 (в метилцеллозольве); 1; 5 в. ч. 95%-ного спирта; 171—172°, —61°, —30°, 0,84, 48; —34°, —20°, 0,88. 24.

Фенилоазон D-трео-пентозы; D-ксилоза; 5, 2; 9 в. ч. 60%-ного спирта; 164—165°; —22,5°, —48°, 0,84, 48; —22°, —47°, 0,88, 48.

<sup>1</sup> При перекристаллизации из водных растворителей фенилозазона растворяют в теплом безводном растворителе и добавляют требуемое количество теплой воды.

Фенилолазон *D-арабино-гексозы*; *D-глюкоза*; 2, 2; 20 в. ч. 50%-ного пиридина; 208—209°; —72,5°, —40°, 0,88, 48; —59,5°, —45°, 0,46<sup>1</sup>, 24.

Фенилолазон *D-липсо-гексозы*; *D-галактоза*; 5, 2; 20 в. ч. 75%-ного метилцеллозолява; 185—187°; +80°, +18°, 0,84, 168; +47°, +15°, 0,81, 120.

Фенилолазон *D-рибо-гексозы*; *D-альтроза*; 2, 2; 5 в. ч. 50%-ного спирта; 167—169°; —38°, —48° (через 3 час), —36°, 0,82, 96; —27°, —23°, 0,84, 48.

Фенилолазон *L-ксило-гексозы*; *L-сорбоза*; 5, 2; 10 в. ч. смеси ацетон — эфир (1 : 1); 167—168°; —8°, —43°, 0,84, 48; —15°, —44°, 0,81, 48.

Фенилолазон *6-дезоксид-арабино-гексозы*; *L-рамноза*; 5, 2; 20 в. ч. 50%-ного спирта; 186—187°; +76,5°, +49°, 0,95, 24; +63°, +56°, 0,90, 48.

Фенилолазон *6-дезоксид-липсо-гексозы*; *L-фукоза*; 2,5, 2; 8 в. ч. абсолютного спирта; 178—179°; —62°, —23°, 0,44, 72; —20°, —8°, 0,43, 24.

Фенилолазон *D-альтро-гептозы*; *седогептулоза*; 5, 2; 75 в. ч. 95%-ного спирта; 194—195°; —64°, —47°, 0,40, 24; —54° (не мутаротирует), 0,41, 120<sup>2</sup>.

Фенилолазон *D-галакто-гептозы*; *D-глицеро-L-глюко-гептоза*; 9,5, 2; 10 в. ч. абсолютного метилцеллозолява; 218—219°; +81°, +13°, 0,40, 168; +69°, +30°, 0,40, 168.

Фенилолазон *D-глюко-гептозы*; *D-глицеро-D-гуло-гептоза*; 10, 2; 20 в. ч. 40%-ного метилцеллозолява; 199—200°; —4°, +38°, 0,41, 96; —8°, +32,5°, 0,43, 96.

Фенилолазон *L-гуло-гептозы* [8]; *L-гуло-гептулоза*; 13, 2; 50 в. ч. 95%-ного спирта; 197—200°; в пиридине: +111°, +41°, 0,40, 92 дня; в метилцеллозоляве: +27°, —2° (через 17 дней), +47°, 0,40, 22 месяца.

Фенилолазон *D-идо-гептозы* [9]; *D-идо-гептулоза*; 11, 2; 20 в. ч. 40%-ного метилцеллозолява; 178—179°; —5°, —52°, 0,38, 96; ±0,0°, —32°, 0,44, 72.

Фенилолазон *D-манно-гептозы*; *D-манно-гептулоза*; 3,5, 2; 20 в. ч. 50%-ного метилцеллозолява; 199—200°; +77°, —9°, 0,40, 168; +56°, +17°, 0,40, 96.

Фенилолазон *6-O-α-D-галактопиранозил-D-арабино-гексозы*; *мелибиоза*<sup>3</sup>; 20, 1; 80 в. ч. 95%-ного спирта; 186—187°; ±0,0°, +44°, 0,42, 48; +23°, +46°, 0,44, 24.

Фенилолазон *4-O-β-D-галактопиранозил-D-арабино-гексозы*; *лактоза*<sup>4</sup>; 10, 2; 100 в. ч. 4%-ного метилцеллозолява; 210—212°; +15°, —2°, 0,82, 96; —18°, —34°, 0,80, 24.

Фенилолазон *3-O-α-D-глюкопиранозил-D-арабино-гексозы* [10]; *тураноза*; 200, 1; 15 в. ч. 95%-ного спирта; 200—205°; +24,5°, +33°, 0,82, 24; +44°, +48,5°, 0,80, 24.

<sup>1</sup> Скорость растворения фенилолазона в метилцеллозоляве при 20° очень низка, поэтому навеску вещества растворяют в небольшом количестве растворителя при 50°, быстро охлаждают до 20° и доводят до нужного объема.

<sup>2</sup> В работе [7] приводятся следующие средние значения величин удельного вращения: —69° → —21° в пиридине со спиртом (3 недели); в метилцеллозоляве: —61° → —45° (6 дней).

<sup>3</sup> После 1-часового нагревания на водяной бане смесь выливают в 5 объемов насыщенного водного раствора хлористого натрия, нагревают еще 45 мин, охлаждают и продукт отфильтровывают.

<sup>4</sup> Мутаротация олазона лактозы сильно колеблется в зависимости от метода его получения и растворителя, примененного при перекристаллизации, поэтому эта характеристика недостаточно надежна для идентификации.

Фенилозазон 4-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-D-арабино-гексозы; мальтоза<sup>1</sup>; 10, 48 (при 60°); 7,5 в. ч. 95%-ного спирта; 204—206°; +99,5°, +85°, 0,80, 24; -77°, +64°, 0,40, 24.

Фенилозазон 6-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-D-арабино-гексозы [11]; изомальтоза; 5, 2,5; вода; 177—179°; в метилцеллозольве: +33°, +46°, 2, 24.

Фенилозазон 4-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-D-арабино-гексозы; целлобиоза; 40 (в метилцеллозольве), 2; 25 в. ч. 20%-ного метилцеллозольва; 207—208°; -6,5° (не мутаротирует), 0,82, 168; -34°, -30°, 0,81, 24.

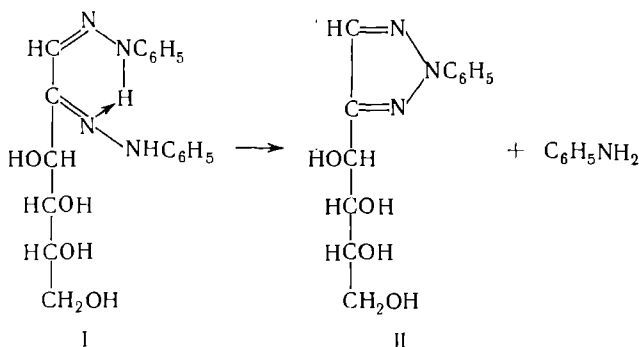
Фенилозазон 6-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-D-арабино-гексозы; генциобиоза<sup>2</sup>; 40 (в метилцеллозольве), 2; 30 в. ч. 20%-ного метилцеллозольва; 178—180°; -74,5°, -40,5°, 0,81, 48; -68°, -51°, 0,82, 24.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fischer E., Ber., **17**, 579 (1884).
2. Fischer E., Ber., **20**, 821 (1887).
3. Sowden J. C., J. Am. Chem. Soc., **69**, 1047 (1947).
4. Mester L., Proc. Intern. Congr. Biochemistry, 4th Congr., Vienna, 1958, **1**, 160 (Pub. 1959).
5. Fieser L. F., Fieser M., Organic Chemistry, D. C. Heath and Co., Boston, Mass., 1944, p. 351.
6. Haskins W. T., Hann R. M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **68**, 1766 (1946).
7. Rosenfeld D. A., Richtmyer N. K., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4907 (1951).
8. Stewart L. C., Richtmyer N. K., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2206 (1952).
9. Pratt J. W., Richtmyer N. K., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2210 (1952).
10. Hudson C. S., J. Org. Chem., **9**, 470 (1944).
11. Thompson A., Wolfrom M. L., J. Am. Chem. Soc., **76**, 5173 (1954).

## Фенилозотриазолы

*Н. К. Рихтмайер*



<sup>1</sup> В случае мальтозы лучшие результаты получаются при использовании только 3 мол. экв. фенилгидразина и ледяной уксусной кислоты, на каждые 100 мл воды добавляют 5 г хлористого натрия и нагревают смесь в течение 48 час при температуре не выше 60°.

<sup>2</sup> Раствор нагревают 1,5 час, выпаривают в горячую смесь 200 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и 50 мл воды, нагревают полчаса на водяной бане, выдерживают при 5° в течение ночи и отфильтровывают.

## ВВЕДЕНИЕ

Хан и Хадсон [1] открыли, что фенилозозон *D*-арабино-гексозы (I) под действием водного раствора сульфата меди(II) отщепляет 1 экв анилина и превращается в соединение (II), которое теперь обычно называют фенилозотриазолом *D*-арабино-гексозы; его систематическое название 2-фенил-4-(*D*-арабино-тетраоксибутил)-2Н-1,2,3-триазол. Эта реакция идет с другими мягкими окислителями [2] и с другими фенилозонами, за исключением тех из них, в которых оба остатка фенилгидразина дисамещенные [3]. Фенилозотриазолы сахаров оказываются особенно полезными, если необходимо подтвердить строение фенилозона сахара (см. стр. 78), поскольку они легко кристаллизуются, очень устойчивы, плавятся в узком интервале температур без разложения и не мутаротируют. В свою очередь фенилозотриазолы сахаров можно переводить в ацетаты или бензоаты и использовать эти производные для идентификации.

## МЕТОДИКА

Растворимость фенилозотриазолов сахаров в воде и органических растворителях изменяется в очень широких пределах; ниже приведены два способа выделения различающихся по растворимости озотриазолов. Помимо воды и бензола, для перекристаллизации фенилозотриазолов применялись также ацетон, хлороформ, смесь хлороформа с гексаном, эфир, этиловый и метиловый спирты.

**Фенилозотриазол *L*-ксило-гексозы [4]**

Суспензию 10,0 г фенилозона *L*-ксило-гексозы (из *L*-сорбозы) в растворе 7,7 г медного купороса (1,1 мол. экв.) в 1200 мл воды нагревают до кипения с обратным холодильником. Растворение фенилозона заканчивается через 10 мин, одновременно с этим раствор приобретает красную окраску и спустя некоторое время выпадает мелкий красный осадок (вероятно, закись меди). Через 30 мин осадок отфильтровывают, фильтрат концентрируют в вакууме до 500 мл, охлаждают, отфильтровывают 2,4 г мелких игл; из маточного раствора при дальнейшем концентрировании выделяют еще 1,3 г продукта. Общий выход 3,7 г (50%). Фенилозотриазол перекристаллизовывают из 20 частей воды и получают бесцветные тонкие призмы; т. пл. 158—159°,  $[\alpha]_D^{20}$  —47° (с 0,8 в пиридине). Это соединение практически нерастворимо в хлороформе, эфире, ацетоне, холодном спирте и холодной воде и растворимо в пиридине, ледяной уксусной кислоте и горячей воде.

**Фенилозотриазол 6-дезоксид-*L*-липсо-гексозы [5]**

К суспензии 10 г фенилозона 6-дезоксид-*L*-липсо-гексозы (из *L*-фукозы) в 900 мл кипящей воды добавляют раствор 8,0 г медного купороса (1,1 мол. экв.) в 100 мл кипящей воды и кипятят смесь 1 час с обратным холодильником. Раствор охлаждают, фильтруют и концентрируют в вакууме. Из-за относительно высокой растворимости этого фенилозотриазола в воде необходимо удалить из реакционной смеси избыток ионов меди(II). Их осаждают сероводородом, раствор фильтруют, фильтрат, не содержащий больше ионов меди, нейтрализуют 10 г карбоната бария,

фильтруют<sup>1</sup> и упаривают раствор в вакууме до сиропа. Сироп высушивают трехкратной отгонкой (3 × 25 мл) абсолютного спирта, растворяют в 25 мл хлороформа, разбавляют 25 мл гексана и оставляют при 5°. Выпавшее масло постепенно закристаллизовывается, выход окрашенных в темный цвет кристаллов 6,8 г. Их перекристаллизовывают сначала из 10 частей бензола, затем из 10 частей воды и получают бесцветные иглы; выход 4,8 г (66%), т. пл. 83–84°,  $[\alpha]_D^{20} + 20^\circ$  (с 0.9 в воде). Вещество растворимо в спирте, пиридине, ацетоне, хлороформе, эфире, ледяной уксусной кислоте и воде при комнатной температуре, слегка растворимо в ледяной воде и почти нерастворимо в холодном бензоле и гексане.

Известен случай [6], когда фенилозотриазол не удавалось получить в кристаллическом виде даже после удаления ионов меди и сульфата по приведенной выше методике<sup>2</sup>. Тогда к водному раствору добавили значительное количество активированного угля, после кипячения отфильтровали уголь, хорошо промыли водой и затем экстрагировали горячим ацетоном. При упаривании ацетонового экстракта получили желаемый фенилозотриазол в кристаллическом виде. Поскольку фенилозотриаозолы могут адсорбироваться на угле, при обесцвечивании растворов его следует добавлять в минимальных количествах.

### ПРОИЗВОДНЫЕ

Фенилозотриаозолы сахаров можно легко превратить в соответствующие ацетаты и бензоаты обычными методами ацетилирования и бензоилирования. Свойства ряда этих соединений приведены ниже.

#### Свойства фенилозотриаозолов сахаров

Для каждого из фенилозотриаозолов 20 сахаров приводятся в следующем порядке: его полусистематическое название и ссылка на оригинальную статью; название исходного сахара; температура плавления, °C,  $[\alpha]_D^{20}$  в воде и в пиридине (чаще всего при с 0,8); температура плавления, °C, и  $[\alpha]_D^{20}$  (чаще всего при с 0,8 в хлороформе) соответствующего ацетата и бензоата.

Фенилозотриазол *D*-эритро-пентозы [8]; *D*-арабиноза; 80–81 (призмы), 69–70 (иглы), +23°, +26°; 63–64, +68°; 114–115, +7°.

Фенилозотриазол *D*-трео-пентозы [4]; *D*-ксилоза; 88–90, –32°, –72° (раньше не приводилось; с 0,4); 57–58, –62°; 78–79, –24°.

Фенилозотриазол *D*-арабино-гексозы [1]; *D*-глюкоза; 195–196, –37° (при 60°; раньше не приводилось; с 0,4), –82°; 81–82, –26°; 112–113, +3°.

Фенилозотриазол *D*-лиixo-гексозы [4]; *D*-галактоза; 110–111, –13° (раньше не приводилось; с 0,4), –31°; 105–106, –28°; 93–94, +6,5°.

Фенилозотриазол *D*-рибо-гексозы [4]; *D*-альтроза; 134–135, +29° (раньше не приводилось; с 0,4), +28°; ацетат и бензоат не описаны.

Фенилозотриазол *L*-ксило-гексозы [4]; *L*-сорбоза; 158–159, –47° (в пиридине; вещество не очень хорошо растворимо в воде); 95–96, –105°; 124–125, –48°.

Фенилозотриазол 6-дезоксид-арабино-гексозы [5]; *L*-рамноза; 136–137, +49°, +101°; ацетат не описан; 101–102, +35°.

<sup>1</sup> В некоторых методиках рекомендуется удалять анилин из нейтрального раствора экстракцией эфиром. По-видимому, эта стадия не обязательна, поскольку анилин должен отогнаться при упаривании водного раствора в вакууме.

<sup>2</sup> Для этой цели использовали также ионообменные смолы [7].

Фенилозотриазол 6-дезоксиг-*л-липсо*-гексозы [5]; *л-фруктоза*; 83—84, +20°, в пиридине не определялось; 88—89, +44°; 97—98, —12°.

Фенилозотриазол *д-альтро*-гептозы [9]; седогептулоза; 181—182, —71,5° (в пиридине); ацетат не описан; 114—115, +15°.

Фенилозотриазол *д-галакто*-гептозы [9]; *д-глицеро-д-глюко*-гептоза; 214—215, +80° (в пиридине); 134—135, +53°; 134—135, +29°.

Фенилозотриазол *д-глюко*-гептозы [9]; *д-глицеро-д-гуло*-гептоза; 175—176, +47° (в пиридине); 111—112, +121°; 110—112, +104°.

Фенилозотриазол *л-гуло*-гептозы [10]; *л-гуло*-гептулоза; 122—123, —18°, —16°; ацетат и бензоат не описаны.

Фенилозотриазол *д-идо*-гептозы [6]; *д-идо*-гептулоза; 120—122, —45° (в пиридине); ацетат и бензоат не описаны.

Фенилозотриазол *д-манно*-гептозы [9]; *д-манно*-гептулоза; 184—185, —27,5° (в пиридине); 115—116, —5°; 76—77, +41°.

Фенилозотриазол 6-О- $\alpha$ -*д-галактопиранозил-д-арабино*-гексозы [5]; мелибиоза; 153—154, +61°, в пиридине не определялось; ацетат и бензоат не описаны.

Фенилозотриазол 4-О- $\beta$ -*д-галактопиранозил-д-арабино*-гексозы [4]; лактоза; 180—181, —44°, в пиридине не определялось; ацетат и бензоат не описаны.

Фенилозотриазол 3-О- $\alpha$ -*д-глюкопиранозил-д-арабино*-гексозы [11]; тураноза; 193—194, +74,5°, в пиридине не определялось; ацетат и бензоат не описаны.

Фенилозотриазол 6-О- $\alpha$ -*д-глюкопиранозил-д-арабино*-гексозы [12], изомальтоза; 177—178, +42,5° (при 25° с 3,4), в пиридине не определялось; ацетат и бензоат не описаны.

Фенилозотриазол 4-О- $\beta$ -*д-глюкопиранозил-д-арабино*-гексозы [4]; целлобиоза; 164—165, —51°, в пиридине не определялось; 130—131, —35,5°; бензоат не описан.

Фенилозотриазол 6-О- $\beta$ -*д-глюкопиранозил-д-арабино*-гексозы (в виде сольвата с этанолом) [13]; генциобиоза; 91—93, —34°, в пиридине не определялось; 144—146, —28°; 122—123, +1,5°.

## ЛИТЕРАТУРА

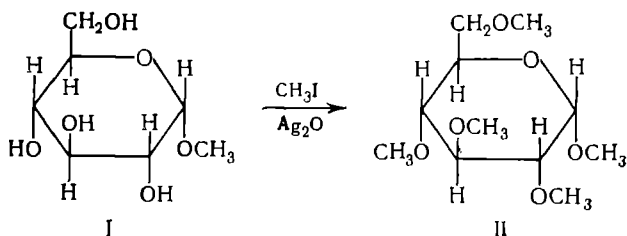
1. Hann R. M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **66**, 735 (1944).
2. El Khadem H., El-Shafci Z. M., J. Chem. Soc., **1958**, 3117.
3. El Khadem H., J. Chem. Soc., **1953**, 3452.
4. Haskins W. T., Hann R. M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **67**, 939 (1945).
5. Haskins W. T., Hann R. M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **69**, 1461 (1947).
6. Pratt J. W., Richtmyer N. K., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2210 (1952).
7. Hassid W. Z., Doudoroff M., Potter A. L., Barker H. A., J. Am. Chem. Soc., **70**, 306 (1948).
8. Haskins W. T., Hann R. M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **68**, 1766 (1946).
9. Haskins W. T., Hann R. M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **69**, 1050 (1947).
10. Stewart L. C., Richtmyer N. K., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2206 (1952).
11. Hudson C. S., J. Org. Chem., **9**, 470 (1944).
12. Thompson A., Wolfstrom M. L., J. Am. Chem. Soc., **76**, 5173 (1954).
13. Haskins W. T., Hann R. M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2288 (1948).



# Простые и сложные эфиры

## Метилловые эфиры моно- и дисахаридов

*Е. Л. Херст, Е. Персиваль*



### ВВЕДЕНИЕ

Метилловые эфиры сахаров благодаря своей устойчивости к действию кислот и щелочей играют исключительную роль при установлении строения углеводов. Первые полностью метилированные сахара были получены Пурди и Ирвином [1] при обработке метанольного раствора углевода иодистым метилом и окисью серебра. Однако этот метод пригоден для метилирования только невосстанавливающих производных сахаров, например гликозидов, поскольку окись серебра окисляет восстанавливающие сахара до эфиров карбоновых кислот. Использование в качестве растворителя метилового спирта является крупным недостатком этого метода, так как часть реагентов расходуется впустую на метилирование растворителя.

В поисках подходящего растворителя для метилирования сахаров Хэуорс [2] показал, что первоначальное метилирование можно даже с большим успехом проводить в водном растворе при использовании менее дорогих реагентов, таких, как диметилсульфат и 30%-ный раствор едкого натра. Кроме того, если вести реакцию при низких температурах и при отсутствии избытка щелочи на первых стадиях, то ее можно применять для метилирования и восстанавливающих сахаров и невосстанавливающих производных. В настоящее время для метилирования разнообразных производных сахаров предложены различные модификации методов Пурди и Хэуорса. В качестве примеров можно привести, во-первых, использование Куном [3] в качестве растворителя N,N-диметилформамида в совокупности с реагентами Пурди, что в некоторых случаях приводит к полностью метилированным производным сахаров с высоким выходом уже после одной обработки, и, во-вторых, использование Мензисом [4] для метилирования невосстанавливающих сахаров гидроокиси таллия и иодистого метила. Другие модификации рассматриваются ниже.

Метилирование сахаров может быть достигнуто также при действии на сахараты щелочных металлов иодистого метила в жидком аммиаке [5].

## МЕТОДИКА

*Метилирование по Пурди***Получение тетра-О-метил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (II)  
из  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (I) [6]**

В минимальном количестве метанола растворяют 5 г (1 моль) сухого  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (см. стр. 169) и прибавляют 36 г (10 молей) иодистого метила, раствор нагревают при 45° в трехгорлой колбе, снабженной механической мешалкой с затвором и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой. К смеси прибавляют десятью равными порциями через каждые полчаса высушенную, тонко измельченную свежеприготовленную окись серебра<sup>1</sup> (30,0 г, 5 молей) и по окончании дозировки нагревают еще несколько часов. Смесь охлаждают и фильтруют; серебряные соли тщательно экстрагируют хлороформом (или ацетоном) при кипячении с обратным холодильником и перемешивании. Экстракты высушивают над сульфатом натрия, объединяют с фильтратом и упаривают в вакууме. Полученный сиропообразный остаток метилируют трижды в тех же условиях. Только после второй обработки частично метилированный продукт растворим в иодистом метиле, и поэтому метанол не добавляется. Полученный сироп перегоняют в вакууме и собирают фракцию, кипящую при 145—150°/13 мм и перегоняющуюся в виде бесцветного подвижного масла. Более высоко кипящая фракция при повторном метилировании также дает тетра-О-метил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид. Общий выход продукта 97%,  $n_D^{20}$  1,4460,  $[\alpha]_D^{20} + 147^\circ$  (с 1,0 в воде).

*Метилирование по Хэуорсу***Гепта-О-метил-метиллактозид [7]**

В четырехгорлой литровой колбе, снабженной двумя капельными воронками, обратным холодильником, вводной газовой трубкой и механической мешалкой, в минимальном объеме теплой воды растворяют 30 г лактозы. Колбу помещают в баню со льдом и метилируют лактозу диметилсульфатом<sup>2</sup> (112 мл) и водным едким натром (111 г в 208 мл) в атмосфере азота, как описано ниже. Воздух из колбы вытесняют медленным током азота и к охлажденному раствору прибавляют сначала 14 мл диметилсульфата, а затем медленно, по каплям 30 мл раствора едкого натра. Во избежание высокой локальной концентрации щелочи смесь при этом энергично перемешивают. Температуру смеси поднимают до 40° и в течение 3 час прибавляют по каплям из отдельных воронок 14 мл диметилсульфата и 30 мл раствора едкого натра, после чего смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. В результате такой обработки лактоза почти полностью превращается в метиллакто-

<sup>1</sup> К горячему раствору 100 г нитрата серебра в 500 мл воды прибавляют горячий профильтрованный раствор 100 г октагидрата гидроокиси бария в 1 л воды, осадок окиси серебра отмывают от избытка гидроокиси бария кипящей водой. Отфильтрованный продукт высушивают на пористой тарелке и затем помещают в эксикатор.

<sup>2</sup> Диметилсульфат очень ядовит, поэтому реакцию следует проводить в вытяжном шкафу; аммиак является специфическим антидотом.

зид. Температуру смеси поднимают до  $60^{\circ}$  и прибавляют, как описано выше, третью порцию диметилсульфата (14 мл) и раствора едкого натра (26 мл), соответствующую одной восьмой их первоначального объема. Оставшееся количество реагентов осторожно прибавляют при  $70^{\circ}$  и смесь нагревают 30 мин при  $100^{\circ}$ , чтобы разложить непрореагировавший диметилсульфат. Охлажденный раствор нейтрализуют серной кислотой и тщательно экстрагируют хлороформом. Хлороформный экстракт высушивают над безводным сульфатом натрия и перегоняют в вакууме; получают 39 г светло-желтого сиропа. Его дважды метилируют при  $70^{\circ}$ , как описано выше, и полученный продукт (28,2 г) подвергают фракционной перегонке. Фракция (23 г), перегоняющаяся при  $195^{\circ}/0,05$  мм в виде бесцветного сиропа с  $n_D^{20}$  1,4688, при стоянии или затирании с петролейным эфиром (т. кип.  $30-60^{\circ}$ ) закристаллизовывается. Кристаллы отжимают на пористой пластинке и перекристаллизовывают из петролейного эфира (т. кип.  $30-60^{\circ}$ ); т. пл.  $77-82^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{20} +5^{\circ}$  (с 1,0 в воде).

Диметилсульфат и едкий натр можно также использовать для приготовления метилированных производных из ацетатов сахаров [8]. Щелочность реакционной смеси является достаточной для снятия ацетильных групп, которые полностью замещаются на метоксильные за одну обработку.

### **Метилирование диметилсульфатом и твердым едким натром в растворе ацетона**

#### **3-О-Метил-D-глюкоза [8]**

Смесь 78 г 1,2;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкозы (см. стр. 162), 75 мл ацетона и 32 г измельченного едкого натра перемешивают мешалкой в трехгорлой колбе, снабженной обратным холодильником и капельной воронкой, и затем нагревают до  $45^{\circ}$ . По каплям в течение 90 мин прибавляют 42,6 мл диметилсульфата, после чего смесь выдерживают 90 мин при  $50^{\circ}$  и затем 3 час при  $55-60^{\circ}$ . Смесь охлаждают, разбавляют водой и экстрагируют хлороформом ( $3 \times 150$  мл). Экстракт промывают водой, высушивают над сульфатом натрия и упаривают в вакууме. 1,2;5,6-Ди-О-изопропилиден-3-О-метил- $\alpha$ -D-глюкозу окончательно освобождают от продуктов конденсации ацетона, нагревая на паровой бане при остаточном давлении 1—3 мм. Полученный продукт (83 г) является достаточно чистым. Его сразу без дополнительной обработки гидролизуют разбавленной кислотой (см. стр. 162), образующаяся 3-О-метил-D-глюкоза выделяется в виде белых кристаллов; выход 50 г, т. пл.  $166-168^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{20} +104^{\circ}$  (с 1,0 в воде).

### **Метилирование диметилсульфатом и твердым едким натром в растворе тетрагидрофурана**

#### **Гекса-О-метил-(2-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил)метил-D-ксилозид [10]**

2-О-(4-О-Метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозил)-D-ксилозу [10] (0,497 г) метилируют один раз по методу Хэуорса. Растворяют 0,448 г частично метилированного продукта в 15 мл чистого тетрагидрофурана и к раствору прибавляют 2,6 г тонко измельченного едкого натра [10]. К смеси при

переменивании прибавляют по каплям в течение 3 час 3 мл диметилсульфата. Колбу наполовину погружают в баню с водой при 23—28° и выдерживают 16 час, после чего прибавляют достаточное для растворения твердого осадка количество воды, поднимают температуру бани до 60° и отгоняют тетрагидрофуран с током азота. Для полного разрушения непрореагировавшего диметилсульфата смесь выдерживают 1 час при 60°. Затем охлаждают и доводят pH до 8,9, прибавляя серную кислоту. Раствор тщательно экстрагируют хлороформом, экстракт высушивают и после упаривания в вакууме получают сироп, который очищают фильтрованием метанольного раствора. После упаривания метанола в вакууме и высушивания получают сиропобразный гекса-О-метил-(2-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил)метилксилозид. Выход 400 мг,  $[\alpha]_D^{25} +114^\circ$  (с 1,4 в хлороформе).

### **Метилирование иодистым метилом и натрием**

#### **Окта-О-метилсахароза [11]**

Раствор 5 г частично метилированной сахарозы (содержание ОСН<sub>3</sub>-групп 45,4%) в 50 мл сухого эфира осторожно встряхивают в течение нескольких часов с 1 г металлического натрия в виде проволоки. Смесь оставляют на ночь, раствор быстро декантируют с непрореагировавшего натрия в колбу с 10 мл иодистого метила и смесь упаривают до пастообразного состояния в вакууме. К остатку прибавляют 25 мл иодистого метила, полученный мутный раствор энергично встряхивают несколько часов и оставляют на 12 час при комнатной температуре. На протяжении всего метилирования реакционная смесь должна быть надежно защищена от влаги воздуха. Прибавляя равный объем сухого эфира, осаждают иодистый натрий, который отфильтровывают и промывают эфиром. Фильтрат и промывной эфир объединяют и упаривают при 30—40°, жидкий остаток растворяют в петролейном эфире (т. кип. 30—40°), фильтруют через уголь и после упаривания получают окта-О-метилсахарозу (содержание ОСН<sub>3</sub>-групп 54,48%) в виде почти бесцветной жидкости; выход 3,4 г,  $[\alpha]_D^{25} +68^\circ$  (с 5,6 в метаноле).

### **Метилирование иодистым метилом и окисью бария в N,N-диметилформамиде**

#### **2-Ацетамидо-3,4,6-три-О-метил- $\beta$ -этил-D-глюкопиранозид [12]**

К раствору 5 г 2-ацетамидо- $\beta$ -этил-D-глюкопиранозид [13] в 50 мл свеженерегнанного и высушенного над окисью бария N,N-диметилформамида, помещенному в трехгорлую колбу с механической мешалкой, термометром и обратным холодильником, прибавляют 15 мл иодистого метила и 18,4 г тонко измельченной окиси бария. Смесь энергично перемешивают, причем температура поднимается до 87°. Через 3,5 час температура падает до комнатной, после чего желтую пастообразную реакционную смесь экстрагируют хлороформом (3  $\times$  200 мл). Хлороформный экстракт обесцвечивается после промывания водой (3  $\times$  100 мл). Промывные воды экстрагируют хлороформом (3  $\times$  50 мл). Хлороформные

экстракты объединяют, упаривают в вакууме и получают неочищенный кристаллический 2-ацетиамидо-3,4,6-три-О-метил-β-этил-Д-глюкопиранозид; выход 4,8 г (82%). При перекристаллизации из уксусной кислоты получают бесцветные иглы; выход 3,3 г, т. пл. 190—191°,  $[\alpha]_D^{20} +6^\circ$  (с 2,0 в хлороформе) —17°, (с 2,0 в метаноле).

Использование N,N-диметилформамида, содержащего 0,5% влаги, приводит к повышению температуры реакционной смеси до 95°, но не сказывается на выходе чистого продукта.

### **Метилирование иодистым метилом и гидроокисью таллия**

#### **Тетра-О-метил-β-метил-Д-глюкопиранозид [14]**

Раствор 24,7 г полугидрата β-метил-Д-глюкопиранозид [15] в 15 мл воды прибавляют к горячему раствору гидроокиси таллия (600 мл 1,6 н. раствора, сконцентрированного примерно до 100 мл). Осадок отфильтровывают и высушивают в темноте в вакуум-эксикаторе над пятиокисью фосфора ~7 дней. Полученный сухой порошок (~180 г) кипятят 6 час с иодистым метилом. Избыток иодистого метила упаривают в вакууме, остаток тщательно экстрагируют хлороформом, экстракт упаривают и получают сиропообразный продукт; выход 24,3 г,  $n_D^{20}$  1,4462. При перегонке в вакууме сироп разделяют на три фракции: 1) тетра-О-метил-β-метил-Д-глюкопиранозид (14,32 г), т. кип. (т. бани) 125°/0,01 мм,  $n_D$  1,4450; 2) смесь метилированных метил-Д-глюкозидов (2,86 г), т. кип. (т. бани) 135°/0,01 мм,  $n_D$  1,4522; 3) три-О-метил-метил-Д-глюкозиды (5,19 г), т. кип. (т. бани) 140—143°/0,01 мм,  $n_D$  1,4572. Тетра-О-метил-β-метил-Д-глюкопиранозид кристаллизуется; т. пл. 40—41°,  $[\alpha]_D^{20} -17^\circ$  (с 4,0 в воде).

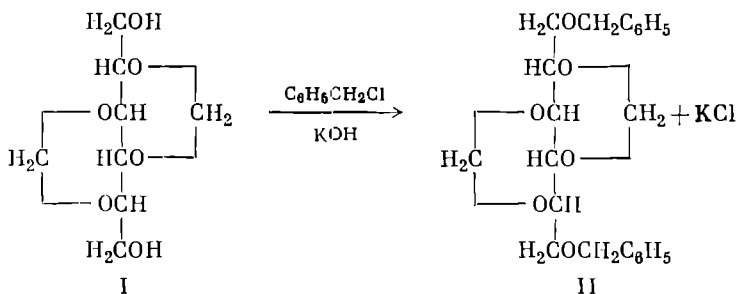
### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Purdie T., Irvine J. C., J. Chem. Soc., **83**, 1021 (1903).
2. Haworth W. N., J. Chem. Soc., **107**, 8 (1915).
3. Kuhn R., Trischmann H., Löw I., Angew. Chem., **67**, 32 (1955).
4. Menzies R. C., Fear C. M., J. Chem. Soc., **1926**, 937.
5. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 150.
6. Purdie T., Irvine J. C., J. Chem. Soc., **85**, 1049, 1071 (1904).
7. Haworth W. N., Leitch G. C., J. Chem. Soc., **113**, 188 (1918).
8. Haworth W. N., Hirst E. L., J. Chem. Soc., **119**, 193 (1921).
9. Glen W. L., Myers G. S., Grant G. A., J. Chem. Soc., **1951**, 2568.
10. Falconer E. L., Adams G. A., Can. J. Chem., **34**, 338 (1956).
11. Freudenberg K., Hixon R. M., Ber., **56**, 2419 (1923); Pacsu E., Trister S. M., J. Am. Chem. Soc., **61**, 2442 (1939).
12. Kuhn R., Baer H. H., Seeliger A., Ann., **611**, 236 (1958).
13. Kuhn R., Kirschenlohr W., Chem. Ber., **86**, 1331 (1953).
14. Barker C. C., Hirst E. L., Jones J. K. N., J. Chem. Soc., **1946**, 783.
15. Koenigs W., Knorr E., Ber., **34**, 957 (1901); Fischer E., Armstrong E. F., Ber., **34**, 2885 (1901); Raymond A. L., Schroeder E. F., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2785 (1948); Lemieux R. U., Shyluk W. P., Can. J. Chem., **31**, 528 (1953).

## Бензиловые эфиры

### 1,6-Ди-О-бензил-2,4;3,5-ди-О-метилен-L-идит

Х. Г. Флетчер, мл.



## ВВЕДЕНИЕ

Поскольку бензиловые эфиры легко расщепляются при каталитическом гидрировании [1] или ацетоллизе [2], бензиловые эфиры углеводов часто применяются для защиты гидроксильных групп в ходе синтеза. Имеется полный обзор [3] по получению и свойствам этого класса соединений. Наиболее общий метод получения бензиловых эфиров углеводов состоит в обработке соответствующего производного сахара суспензией гидроокиси щелочного металла в хлористом бензиле при повышенной температуре. Этот метод, один из случаев применения которого рассматривается ниже, обычно непригоден для углеводов с незащищенными восстанавливающими функциями или с чувствительными к действию щелочи заместителями; ацетильная группа в этих условиях быстро отщепляется, а образовавшийся гидроксил бензилируется. Новый более мягкий метод бензилирования, предусматривающий использование смеси бензилбромид, окиси бария и N,N-диметилформамида при комнатной температуре [4], может получить в будущем широкое распространение.

## МЕТОДИКА

Этот синтез был предложен Аллертоном и Флетчером [2]. К раствору 80 г 2,4;3,5-ди-О-метилен-L-идита (I) [5] в 64 мл свежеперегнанного хлористого бензила прибавляют 37 г порошкообразного едкого кали. Смесь нагревают 3 час при 130—140° при энергичном перемешивании. После охлаждения разбавляют 200 мл воды и экстрагируют хлороформом. Экстракт промывают водой, высушивают над безводным сульфатом натрия и упаривают в вакууме, причем в конце упаривание проводят при 100° (температура бани) и давления не более 0,7 мм<sup>1</sup>. Остаток самопроизвольно закристаллизовывается при охлаждении; выход 9,18 г (86%), т. пл. 117—120° (испр.). При перекристаллизации из горячего абсолютного спирта получают чистый 1,6-ди-О-бензил-2,4;3,5-ди-О-метилен-L-идит (II) в виде блестящих плоских игл; т. пл. 121—122° (испр.),  $[\alpha]_D^{20} +42,5^\circ$  (с 1,4 в хлороформе).

<sup>1</sup> При такого рода перегонках в целях экономии времени следует использовать прибор с коротким и широким ходом от перегоняющейся жидкости до конденсирующей поверхности.

Если бензиловые эфиры не кристаллизуются, для очистки продукта часто используют перегонку в высоком вакууме; при этом обычно удаляется дибензиловый эфир, который более летуч по сравнению с большинством бензиловых эфиров сахаров.

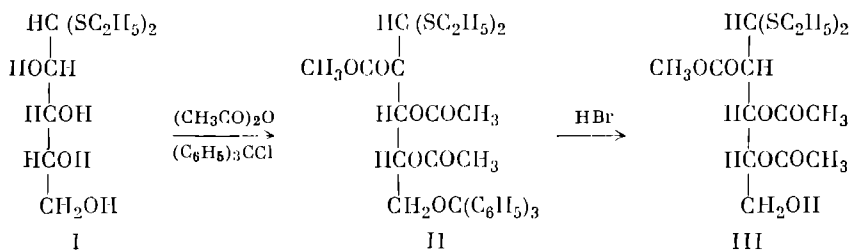
## ЛИТЕРАТУРА

1. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 386.
2. Allerton R., Fletcher H. G., Jr., J. Am. Chem. Soc., **76**, 1757 (1954).
3. McCloskey C. M., Advances in Carbohydrate Chem., **12**, 137 (1957).
4. Ballou C. E., Pizer L. I., J. Am. Chem. Soc., **82**, 3333 (1960).
5. Hann R. M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **67**, 602 (1945).

## Трифенилметилловые эфиры

### Получение и расщепление

Г. Р. Баркер



Трифенилметилловые (трителивые) эфиры образуются при взаимодействии трифенилхлорметана (тритилхлорида) с гидроксилсодержащим соединением. Тритиловые эфиры расщепляются как в кислой среде, так и при гидрогенолизе. Их важное значение в химии углеводов обуславливается двумя фактами: во-первых, тритилхлорид нормально реагирует только с первичной гидроксильной группой, во-вторых, гидроксильную группу легко можно регенерировать из трителивого эфира в очень мягких условиях. Хотя это справедливо для большинства случаев, тем не менее известны исключения. Так, установлено, что в реакции может участвовать, хотя и очень редко, вторичная гидроксильная группа, находящаяся в середине углеродной цепи сахара, как, например, в случае образования 1,2;5,6-ди-О-изопропилиден-3-О-трифенилметил- $\alpha$ -D-глюкофуранозы [1]. Другое более часто встречающееся исключение состоит в том, что с тритилхлоридом реагирует аномерный гидроксил как альдоз, так и кетоз. Однако скорость реакции с непервичными гидроксильными группами сравнительно невелика, так что при использовании 1 мол. экв. реагента с хорошим выходом можно получить монотритиловые эфиры только по первичной гидроксильной группе. Хотя, как упоминалось выше, тритиловые эфиры легко расщепляются с образованием исходного гидроксилсодержащего соединения, иногда происходят побочные реакции; так, например, при расщеплении 1,2,3-три-О-ацетил-5-О-трифенилметил-D-ри-

бозы образуется диангидрид-1,5',5,4'-ди-*н*-рибофураноза [2—4]. Несмотря на эти исключения, тритиловый остаток является идеальной защитой концевой гидроксильной группы цепи сахара в различных синтезах. Методы получения и расщепления тритиловых эфиров, благодаря которым эти эфиры прочно вошли в синтетическую химию углеводов, подробно рассмотрены в обзоре [5].

Наиболее общий метод получения тритиловых эфиров состоит во взаимодействии соединения с тритилхлоридом в пиридине. Часто удобно получать не сами тритиловые эфиры, а их полные ацетаты без предварительного выделения неацетилованного эфира. Этот прием обычно дает высокие выходы [3] и приводит к соединениям, которые легче подвергаются очистке. В качестве типичного примера выбрано получение диэтилдитиоацетата 2,3,4-три-*О*-ацетил-5-*О*-трифенилметил-*н*-арабинозы из диэтилдитиоацетата *н*-арабинозы; неацетилованный тритиловый эфир можно получить на первой стадии синтеза.

Известно много методов расщепления тритиловых эфиров; чаще всего применяются каталитическое гидрирование, кипячение с 80%-ной уксусной кислотой и обработка при комнатной температуре хлористым водородом в хлороформе или бромистым водородом в уксусной кислоте. Ниже приводится расщепление диэтилдитиоацетата 2,3,4-три-*О*-ацетил-5-*О*-трифенилметил-*н*-арабинозы действием бромистого водорода, которое, по-видимому, является наиболее удобным методом.

## МЕТОДИКА

### *Диэтилдитиоацеталь*

#### **2,3,4-три-*О*-ацетил-5-*О*-трифенилметил-*н*-арабинозы (II)**

Этот метод ранее нигде не публиковался. Он представляет собою метод Вольфрома и сотр. [6], видоизмененный применительно к энантио-морфной модификации, и аналогичен методу Циннера и сотр. [7]. Реакция протекает успешно только при скрупулезном соблюдении безводных условий на протяжении всего синтеза. Диэтилдитиоацеталь *н*-арабинозы (I) [8] (50 г) высушивают в вакууме над пятиокисью фосфора при 90° и растворяют в литровой колбе в 200 мл пиридина, предварительно высушенного над твердым едким кали и затем непосредственно перед использованием перегнанного над пятиокисью фосфора. К раствору прибавляют 54,4 г трифенилхлорметана, очищенного перекристаллизацией из лигроина, содержащего хлористый ацетил [7], колбу закрывают, встряхивают до растворения тритилхлорида и оставляют при комнатной температуре на 48 час. Кристаллы хлоргидрата пиридина на этой стадии можно и не удалять. К смеси прибавляют еще 300 мл свежеперегнанного пиридина, охлаждают колбу до 0° и прибавляют 300 мл свежеперегнанного уксусного ангидрида. Колбу закрывают, быстро встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 72 час. Затем прозрачный раствор выливают в 7 л воды со льдом и оставляют, пока температура смеси не достигнет комнатной. Водный слой декантируют с липкого твердого осадка и экстрагируют эфиром (3 × 700 мл). Экстракты объединяют и прибавляют к твердому остатку, который разминают до полного растворения. Эфирный раствор промывают насыщенным водным раствором бисульфата натрия (3 × 20 мл), насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (4 × 20 мл, при встряхивании с последней порцией раствора не должно быть вспенивания), водой (4 × 20 мл) и высу-



пивают над безводным сульфатом натрия. Эфир отгоняют в вакууме и полученный сиропообразный остаток смешивают с 200 мл метанола. При стоянии при комнатной температуре продукт выкристаллизовывается в виде игол, их отфильтровывают и промывают небольшим количеством холодного метанола; выход 57,5 г. Фильтрат и промытый метанол упаривают в вакууме, остаток перемешивают с 200 мл абсолютного этанола и оставляют при комнатной температуре на ночь. При этом выпадает вторая порция кристаллов; выход 14,5 г. Обе порции объединяют и перекристаллизовывают из 500 мл абсолютного этанола. Выход аналитически чистого продукта 56,9 г, т. пл.  $101-102^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{20} +27^{\circ}$  (с 4 в хлороформе). Из хлороформа продукт кристаллизуется в виде кубических кристаллов. Дополнительное количество неочищенного вещества (т. пл.  $90^{\circ}$  с предварительным размягчением) можно получить при упаривании объединенных фильтратов от второй порции кристаллов и от перекристаллизации главной массы продукта.

### *Диэтилдитиоацеталь 2,3,4-три-О-ацетил- $\beta$ -арабинозы (III)*

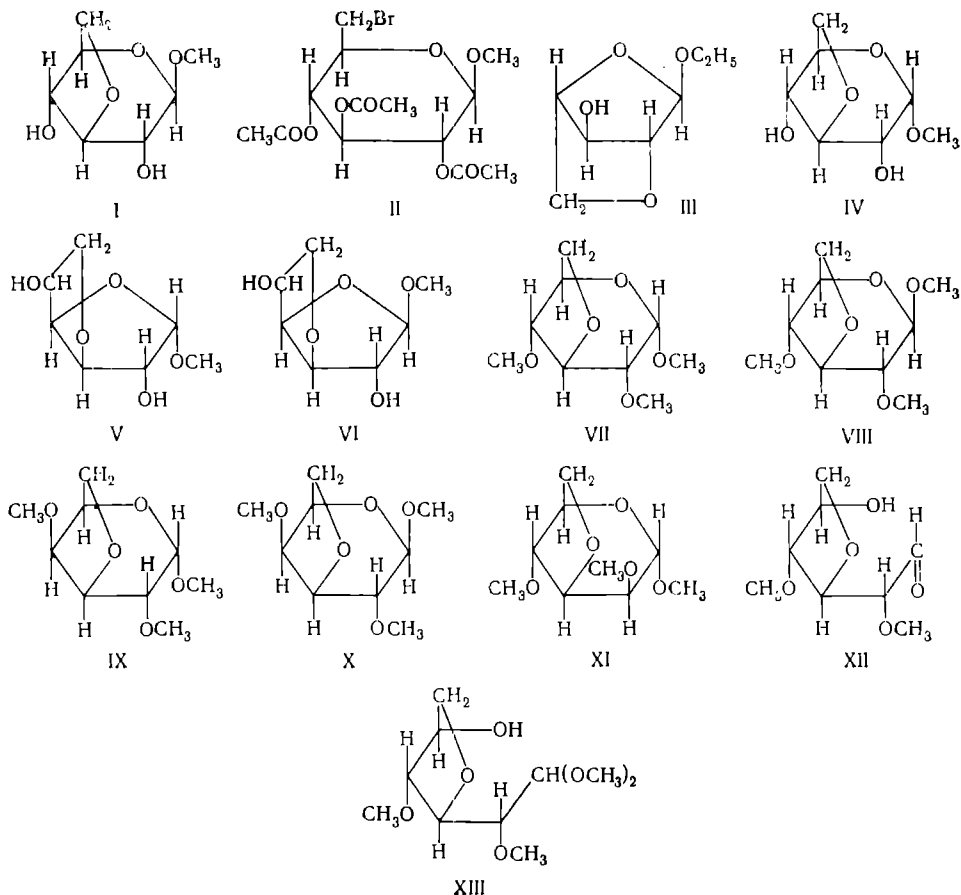
Диэтилдитиоацеталь 2,3,4-три-О-ацетил-5-О-трифенилметил- $\beta$ -арабинозы (62,4 г) растворяют в 125 мл ледяной уксусной кислоты при осторожном нагревании. К охлажденному до комнатной температуры раствору прибавляют 16 мл примерно 50%-ного (вес к объему) раствора бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте. Можно использовать продажный бромистый водород в уксусной кислоте, если раствор предварительно проанализирован на содержание бромистого водорода. Образующийся через 2—3 мин осадок быстро отфильтровывают на стеклянном пористом фильтре и промывают на фильтре 5 мл ледяной уксусной кислоты. Фильтрат и промытую уксусную кислоту объединяют и выливают в размельченный лед, смешанный с твердым бикарбонатом натрия, и оставляют, пока температура смеси не достигнет комнатной. Смесь экстрагируют хлороформом ( $3 \times 250$  мл). Экстракты объединяют и промывают один раз насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (водный слой должен давать щелочную реакцию по лакмусовой бумажке), три раза водой и затем высушивают безводным сульфатом натрия. Хлороформ отгоняют в вакууме, после чего к сиропообразному остатку прибавляют и отгоняют последовательно две порции по 100 мл абсолютного этанола. После упаривания этанола к остатку прибавляют 125 мл метанола, раствор отфильтровывают с отсасыванием, к фильтрату прибавляют воду до появления легкой опалесценции. Смесь оставляют на ночь при  $0^{\circ}$ , отфильтровывают трифенилкарбинол и прибавляют еще воду до появления опалесценции. После стояния при  $0^{\circ}$  выделяется небольшое количество кристаллов, состоящих главным образом из диэтилдитиоацетали 2,3,4-три-О-ацетил-5-О-трифенилметил- $\beta$ -арабинозы (III); их отфильтровывают. Из фильтрата отгоняют в вакууме метанол и выделяющееся из воды масло экстрагируют хлороформом ( $3 \times 100$  мл). Экстракты объединяют, промывают один раз водой и высушивают безводным сульфатом натрия. Растворитель полностью отгоняют в вакууме. При условии, что для отделения исходного вещества в выше описанных операциях было дано достаточно времени, полученное масло представляет аналитически чистый диэтилдитиоацеталь 2,3,4-три-О-ацетил- $\beta$ -арабинозы (III);  $n_D^{20} 1,5038$ ,  $[\alpha]_D^{18} +13^{\circ}$  (в хлороформе).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hockett R. C., Fletcher H. G., Jr., Ames J. B., J. Am. Chem. Soc., **63**, 2516 (1941).
2. Brederock H., Köthnig M., Berger E., Ber., **73**, 956 (1940).
3. Barker G. R., Lock M. V., J. Chem. Soc., **1950**, 23.
4. Jeanloz R. W., Barker G. R., Lock M. V., Nature, **167**, 42 (1951).
5. Helferich B., Advances in Carbohydrate Chem., **3**, 79 (1948).
6. Wolfrom M. L., Quinn J. L., Christman C. C., J. Am. Chem. Soc., **56**, 2789 (1934); **57**, 713 (1935).
7. Zinner H., Brandner H., Rembarz G., Chem. Ber., **89**, 800 (1956).
8. Wolfrom M. L., Weisblat D. I., Zophy W. H., Waisbrot S. W., J. Am. Chem. Soc., **63**, 201 (1941).
9. Renfrom W. B., Jr., Hauser C. R., Organic Syntheses, Coll., vol. 2, 608 (1943).

## 2,5- и 3,6-Ангидросахара и их производные

Б. А. Льюис, Ф. Смит, А. М. Стефен



## ВВЕДЕНИЕ

В 1912 г. Фишер и Зак [1] при обработке 2,3,4-три-О-ацетил-6-бром-6-дезоксид-β-метил-D-глюкопиранозидом (II) гидроокисью бария получили первое производное 3,6-ангидросахаров (I). Для замыкания 3,6-ангидрокольца можно использовать также 6-*n*-толуолсульфонаты [2, 3], 6-сульфаты [4] и 6-нитраты [5] производных D-глюкозы. Аналогичные реакции были использованы для получения 3,6-ангидро-D-галактозы и ее производных [6—8], а также для введения двух 3,6-ангидроциклов в метилмальтозид [9] и метилцеллобиозид [9]. Было показано, что ангидросахара такого типа встречаются в природе. Например, 3,6-ангидро-L-галактоза была выделена из агароподобного полисахарида из *Celidium amansii* [10, 11] и других видов *Gelidium* [12, 13], а также из экстрактов *Geranium hypnaeoides* [14], *Acanthopeltis japonica* [14], *Gracilaria confervoides* [15], *Gloiopeltis furcata* [16] и *Porphyra capensis* [17], в то время как 3,6-ангидро-D-галактоза была обнаружена в κ-карагепане из *Chondrus crispus* [18] и в экстрактах *C. ocellatus* [19].

Введение в молекулу метилгексозидов ангидроцикла повышает реакционную активность С-4 [2, 8]; более ярко это явление выражено в аналогичном производном 2,5-ангидро-L-арабинозы (III) [20]. Так, α- и β-формы 3,6-ангидрометил-D-глюкопиранозидов (IV и I соответственно) можно превратить в более устойчивые α- и β-формы 3,6-ангидрометил-D-глюкофуранозидов (V и VI соответственно). Следует отметить, что такое изменение размера цикла не сопровождается отщеплением гликозидной метоксильной группы [2]. Аналогично 2,4-ди-О-метилпроизводные 3,6-ангидро-α-метил-D-глюкопиранозидов (VII) [2] и 3,6-ангидро-α-метил-D-галактопиранозидов (IX) [8] превращаются в соответствующие β-аномеры (VIII и X соответственно) без потери метоксильной группы при С-4. Этот процесс, так же как и приведенное выше превращение пиранозидов в фуранозид, обусловлен протонированием атома кислорода в цикле и образованием карбапiona при С-4. Почти количественное превращение α- в β-форму в случае производных D-глюкозы и D-галактозы, вероятно, обусловлено не только более устойчивой конформацией β-D-аномера, но и пространственным влиянием метоксильной группы при С-2, способствующим образованию β-D-аномера. Эту точку зрения подтверждает то обстоятельство, что в случае 2,4-ди-О-метил-3,6-ангидрометил-D-маннозидов α-D-аномер (XI) более устойчив, чем β-D-форма, поскольку метоксильные группы при С-1 и С-2 в α-D-форме находятся в *транс*-положении [21—23]. Однако, как следует из конформационного анализа производных 3,6-ангидросахаров, включая некоторые 2-дезоксисахара, и из факта, что соответствующие фенилгликозиды [23] ряда D-галактозы и D-глюкозы не подвергаются описанному выше превращению [22], по-видимому, существуют другие конформационные и электронные факторы.

Повышенная активность, обусловленная 3,6-ангидроциклом, также проявляется в том, что метилгликозиды метилированных и неметилированных ангидросахаров легко гидролизуются разбавленной минеральной кислотой даже при комнатной температуре, причем с образованием соответствующих производных альдегидной формы (например, VII дает XII). При нагревании с разбавленными кислотами 3,6-ангидрогликозиды быстро гидролизуются, а образующиеся альдегидные формы ангидросахаров подвергаются дегидратации с образованием 5-оксиметилфурфуrola [20]. Аналогичный гликозид 2,5-ангидро-L-арабинозы гидроли-

зуется просто водой при комнатной температуре, а при нагревании с разбавленной кислотой превращается в фурфурол. Таким же образом при метанолизе агара [15] быстро расщепляются гликозидные связи, соединяющие 3,6-ангидро-*L*-галактозу с *D*-галактозой, и образуется соответствующий диметилацеталь.

Определяющая роль 3,6-ангидрокольца следует также из того, что альдегидные формы ангидросахаров и их метиловые эфиры дают положительную реакцию с реактивом Шиффа. Кроме того, 3,6-ангидросахара и их гликозиды при действии хлористого водорода в метаноле предпочтительно образуют диметилацеталь, а не гликозиды (например, и VII и XII дают XIII) [2, 8, 9].

## МЕТОДИКА

### 3,6-Ангидро-*D*-галактоза и ее производные [6, 8]

#### 3,6-Ангидро- $\alpha$ -метил-*D*-галактопиранозид

*6-O*-Тозил- $\alpha$ -метил-*D*-галактопиранозид. Сиропообразный безводный  $\alpha$ -метил-*D*-галактопиранозид [24] (получен при нагревании 100 г кристаллического моногидрата в вакууме при 100—110°) растворяют в 150 мл безводного, дважды перегнанного над пятиокисью фосфора пиридина, обрабатывают *n*-толуолсульфохлоридом (1,5 моля), полученный раствор выдерживают 12 час при ~18° и 2 дня при 30°. Вязкую реакционную смесь выливают в воду при перемешивании, нерастворимый сиропообразный осадок растирают с водой, чтобы удалить максимально возможное количество пиридина. Сиропообразный продукт растирают с ацетоном, чтобы освободиться от неидентифицированного ди-*O*-тозил- $\alpha$ -метил-*D*-галактопиранозида и вызвать кристаллизацию 6-*O*-тозил- $\alpha$ -метил-*D*-галактопиранозида. 6-*O*-Тозил- $\alpha$ -метил-*D*-галактопиранозид отфильтровывают, промывают ацетоном и высушивают в вакууме. Выход 40 г, т. пл. 188° (после перекристаллизации из смеси пиридина и петролейного эфира с т. кип. 30—60°),  $[\alpha]_D^{25} +118^\circ$  (с 1,4 в пиридине).

3,6-Ангидро- $\alpha$ -метил-*D*-галактопиранозид [8]. К раствору 5 г 6-*O*-тозил- $\alpha$ -метил-*D*-галактопиранозида в 200 мл спирта прибавляют 16 мл 1 н. раствора едкого натра и смесь нагревают в течение 1 час при 60°. Раствор нейтрализуют двуокисью углерода и упаривают в вакууме досуха. Твердый остаток экстрагируют ацетоном при нагревании, экстракт фильтруют и упаривают; 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил-*D*-галактопиранозид образуется с почти количественным выходом; т. пл. 140° (после перекристаллизации из этилацетата),  $[\alpha]_D^{25} +80^\circ$  (с 1 в воде).

#### 3,6-Ангидро- $\beta$ -метил-*D*-галактопиранозид [8]

Тетраацетат 6-*O*-тозил- $\alpha$ -*D*-галактопиранозы. 6-*O*-Тозил-*D*-галактозу [7] [14,5 г, т. пл. 128°,  $[\alpha]_D +4,6^\circ$  (с 2,0 в пиридине)] растворяют в 75 мл пиридина. Раствор охлаждают до -10° и при перемешивании постепенно прибавляют 20 мл уксусного ангидрида. Реакционную смесь выдерживают 12 час при 0° и выливают в воду. Сиропообразный продукт растирают несколько раз с водой для удаления пиридина и затем растворяют в 200 мл хлороформа. Хлороформный раствор полученного ацетата промывают 5 раз 3 н. серной кислотой, 2 раза насыщенным раствором бикарбоната натрия и один раз водой. Хлороформный раствор высуши-

вают над безводным сульфатом магния, фильтруют и упаривают до сиропа, который растворяют в минимальном объеме метанола. Через 12 час кристаллы отфильтровывают и перекристаллизовывают из метанола. Выход тетраацетата 6-О-тозил- $\alpha$ -D-галактопиранозы 16,0 г, т. пл. 107°,  $[\alpha]_D^{20} +42^\circ$  (с 1,3 в хлороформе). Оле и Тиль [7] приводят для  $\beta$ -формы т. пл. 126—127° и  $[\alpha]_D^{20} +9^\circ$  (с 1,1 в хлороформе) и для  $\alpha$ -формы тетраацетата 6-О-тозил-D-галактопиранозы т. пл. 117°,  $[\alpha]_D^{25} +89^\circ$  (с 1,8 в хлороформе).

2,3,4-Три-О-ацетил-6-О-тозил- $\alpha$ -D-галактопиранозилбромид [8]. Раствор 3 г 1,2,3,4-тетра-О-ацетил-6-О-тозил- $\alpha$ -D-галактопиранозы в 12 мл насыщенной при 0° бромистым водородом уксусной кислоты выдерживают 2,5 час при комнатной температуре. Светло-желтый раствор разбавляют 50 мл эфира, выливают при перемешивании в воду со льдом и немедленно отделяют водный слой. Кристаллический осадок, который почти сразу выпадает из эфирного слоя, отфильтровывают, промывают эфиром и высушивают в вакууме; выход 1,3 г. К эфирному маточному раствору прибавляют бензол и раствор промывают как можно быстрее три раза водой (0°), высушивают сульфатом магния, фильтруют и упаривают в вакууме досуха. Кристаллический остаток перекристаллизовывают из смеси бензол — эфир — петролейный эфир (т. кип. 30—60°) и получают дополнительно 1,7 г 2,3,4-три-О-ацетил-6-О-тозил- $\alpha$ -D-галактопиранозилбромида; т. пл. 149° (с разл.),  $[\alpha]_D^{20} +165^\circ$  (с 0,9 в хлороформе).

6-О-Тозил- $\beta$ -метил-D-галактопиранозид [8]. Раствор 12,9 г 2,3,4-три-О-ацетил-6-О-тозил- $\alpha$ -D-галактопиранозилбромида в 300 мл сухого метанола встряхивают в присутствии избытка сухого карбоната серебра (10 г) при комнатной температуре 12 час. Раствор фильтруют, упаривают в вакууме и получают 2,3,4-три-О-ацетил-6-О-тозил- $\beta$ -метил-D-галактопиранозид,  $[\alpha]_D^{25} +3^\circ$  (с 1 в хлороформе), который не кристаллизуется. Сиропообразный продукт растворяют в 200 мл сухого метанола и прибавляют 20 мг натрия (о дезацетилировании метилатом натрия см. стр. 119). Через 36 час раствор упаривают в вакууме и получают 6-О-тозил- $\beta$ -метил-D-галактопиранозид, выход 7 г, т. пл. 137° (после перекристаллизации из смеси этанола и петролейного эфира с т. кип. 30—60°),  $[\alpha]_D^{25} -3,5^\circ$  (с 0,8 в пиридине).

3,6-Ангидро- $\beta$ -метил-D-галактопиранозид [8]. 6-О-Тозил- $\beta$ -метил-D-галактопиранозид (4,1 г) растворяют в 50 мл спирта и обрабатывают 13 мл 1 н. раствора едкого натра. Раствор кипятят с обратным холодильником 2 час, охлаждают, нейтрализуют двуокисью углерода, упаривают в вакууме досуха при 40—50° (температура бани), остаток экстрагируют кипящим ацетоном. Ацетоновые экстракты объединяют, фильтруют и упаривают в вакууме; получают 3,6-ангидро- $\beta$ -метил-D-галактопиранозид с выходом, близким к количественному. Для очистки продукт перекристаллизовывают из этилацетата; т. пл. 119°,  $[\alpha]_D^{25} -115^\circ$  (с 1 в воде).

#### Диметилацеталь 3,6-ангидро-D-галактозы [8]

К раствору 5,2 г 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил-D-галактопиранозиды в 90 мл метанола прибавляют 10 мл метанола, содержащего 0,8 г хлористого водорода. Через 2 мин после прибавления хлористого водорода удельное вращение метанольного раствора изменяется от  $-90^\circ$  (до прибавления) до  $+55^\circ$ , через 40 мин до  $-157^\circ$  и затем остается постоянным в течение 17,5 час. Раствор нейтрализуют карбонатом серебра и фильтруют. При упаривании в вакууме получают диметилацеталь 3,6-ангидро-D-галактозы с  $[\alpha]_D^{25} +36,5^\circ$  (с 0,9 в воде). Это же вещество, не восстанавливающее

раствор Фелинга, можно получить по такой же методике из 3,6-ангидро- $\beta$ -метил-D-галактопиранозид.

Обычная обработка полученного диметилацетата 3,6-ангидро-D-галактозы *n*-нитробензоилхлоридом в пиридине приводит к 2,4,5-трис-(*n*-нитробензоату) с т. пл. 112° после перекристаллизации из смеси эфир — ацетон — петролейный эфир.

### 3,6-Ангидро-2,4-ди-О-метил- $\alpha$ -метил-D-галактопиранозид (IX) [8]

3,6-Ангидро- $\alpha$ -метил-D-галактопиранозид (4 г) кипятят 8 час с 25 мл иодистого метила в присутствии 8 г окиси серебра, причем к смеси прибавляют сухой ацетон в количестве, достаточном для растворения кристаллического гликозида. Реакционную смесь разбавляют 25 мл ацетона, фильтруют, нерастворимый остаток промывают 25 мл ацетона. Фильтрат и промывной ацетон объединяют, упаривают в вакууме, полученный сироп снова дважды метилируют иодистым метилом (25 мл) и окисью серебра (8 г), но ацетон уже не прибавляют. Иодистый метил отгоняют в вакууме, остаток экстрагируют ацетоном, экстракт упаривают и получают 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил- $\alpha$ -метил-D-галактопиранозид в виде бесцветной подвижной жидкости. Выход 4,3 г, т. кип. (т. бани) 90°/0,01 мм,  $n_D^{17}$  1,4640,  $[\alpha]_D^{17} +73^\circ$  (с 1,2 в воде),  $[\alpha]_D^{15} +99^\circ$  (с 0,6 в эфире).

### 3,6-Ангидро-2,4-ди-О-метил- $\alpha$ -D-галактоза [8]

Раствор 1,7 г 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил- $\alpha$ -метил-D-галактопиранозид в 50 мл 0,1 н. серной кислоты нагревают 1 час на кипящей водяной бане. Раствор,  $[\alpha]_D^{18} +22^\circ$ , нейтрализуют карбонатом бария, фильтруют, упаривают в вакууме до сиропа. Сироп перегоняют и получают 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил- $\alpha$ -D-галактозу в виде бесцветной жидкости; т. кип. (т. бани) 150°/0,03 мм,  $n_D^{17}$  1,4830,  $[\alpha]_D^{18} +24^\circ$  (с 1,4 в воде). Вещество дает розовую окраску с реагентом Шиффа, обесцвечивает разбавленный раствор перманганата калия и восстанавливает при нагревании раствор Фелинга.

Гидролиз 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил- $\alpha$ -метил-D-галактопиранозид может быть также осуществлен при комнатной температуре 0,1 н. серной кислотой за 40 час.

### 3,6-Ангидро-2,4-ди-О-метил-D-галактоно-1,5-лактон [8]

Раствор 0,5 г 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил- $\alpha$ -D-галактозы в 15 мл воды обрабатывают при комнатной температуре 1 мл брома в присутствии избытка основного карбоната свинца, встряхивая смесь время от времени. Через 12 час, когда окисление закончится (отбирают аликвотную пробу, выдувают из нее бром и кипятят с раствором Фелинга), раствор освобождают от брома продуванием воздуха, фильтруют, насыщают сероводородом и вновь фильтруют. Фильтрат, содержащий бромистый водород и сероводород, освобождают от последнего упариванием в вакууме до половины первоначального объема. Раствор нейтрализуют окисью серебра, чтобы удалить бромистый водород, фильтруют, обрабатывают сероводородом, фильтруют и упаривают в вакууме досуха; получают 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-D-галактоновую кислоту, которую пере-

кристаллизуют из этилацетата, т. пл.  $152^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{25} +66^{\circ}$  (с 0,9 в воде). Кислота возгоняется в вакууме, не претерпевая изменений.

Полученную кислоту нагревают 4 час при температуре плавления, затем перегоняют и получают в виде бесцветной жидкости 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-Д-галактоно-1,5-лактон; т. кип. (т. бани)  $140-156^{\circ}$  (0,01 мм),  $n_D^{20} 1,4720$ ,  $[\alpha]_D^{25} +4^{\circ}$  (с 1,2 в воде, остается постоянным 4 дня). Удельное вращение не изменяется, если раствор нагреть до кипения и охладить, но после нагревания с 1,5 экв 1 н. едкого натра в течение 3 мин  $[\alpha]_D^{25}$  составляет  $+59^{\circ}$ .

#### Метиловый эфир 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-Д-галактоновой кислоты [8]

Раствор 30 мг 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-Д-галактоновой кислоты в 2 мл метанола обрабатывают небольшим избытком диазометана в эфире до появления устойчивой желтой окраски [36]. При упаривании раствора в вакууме досуха получают с количественным выходом кристаллический метиловый эфир 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-Д-галактоновой кислоты; т. пл.  $51^{\circ}$  (после перекристаллизации из смеси эфира и петролейного эфира с т. кип.  $30-60^{\circ}$ ),  $[\alpha]_D^{25} +67^{\circ}$  (с 3,3 в воде).

При обычной обработке полученного метилового эфира метанольным раствором аммиака с почти количественным выходом образуется 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-Д-галактонамид; т. пл.  $151^{\circ}$  (после перекристаллизации из метанола).

#### Превращение 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-α-метил-Д-галактопиранозид (IX) в β-форму (X) [8]

Сиропообразный 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-α-метил-Д-галактопиранозид (50 мг) обрабатывают эфиром, содержащим 1 каплю 2,4 н. хлористого водорода. Почти мгновенно происходит кристаллизация. Продукт растворяют в эфире, раствор нейтрализуют окисью серебра и фильтруют. При упаривании фильтрата досуха и последующей перекристаллизации остатка из смеси эфир — петролейный эфир (т. кип.  $30-60^{\circ}$ ) получают 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-β-метил-Д-галактопиранозид; т. пл.  $83^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{25} -77^{\circ}$  (с 1 в воде). Аналогичное превращение отмечено в ряду Д-глюкозы [2].

#### Диметилацеталь 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-Д-галактозы [8]

Раствор 0,4 г 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-β-метил-Д-галактопиранозид в 1%-ном метанольном растворе хлористого водорода выдерживают 6 час при комнатной температуре;  $[\alpha]_D^{20} -46^{\circ}$  (2 мин)  $\rightarrow +30^{\circ}$  (6 час). Смесь нейтрализуют карбонатом серебра, фильтруют, упаривают и получают диметилацеталь 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-Д-галактозы. Выход 0,37 г, т. кип. (т. бани)  $110^{\circ}$  (0,02 мм),  $n_D^{20} 1,4540$ ,  $[\alpha]_D^{20} +23^{\circ}$  (с 0,8 в воде). В дистиллате присутствует небольшое количество 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-β-метил-Д-галактопиранозид.

Полученный продукт (0,2 г) выдерживают 3 дня с 0,18 г *n*-нитробензоилхлорида в 0,3 мл пиридина при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают с насыщенным водным раствором бикарбоната натрия для разрушения избытка *n*-нитробензоилхлорида и экстрагируют хлороформом (10 мл). Хлороформный раствор дважды промывают 0,1 н. серной кислотой, один раз водным раствором бикарбоната натрия

и дважды водой, высушивают над сульфатом магния, фильтруют и упаривают. Сиропобразный остаток перегоняют и получают 50 мг 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-β-метил-Д-галактопиранозид, т. кип. (т. бани) 90° (0,03 мм), т. пл. 83° (после перекристаллизации из воды), и 200 мг диметилацеталь 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-5-О-п-нитробензоил-Д-галактозы, т. кип. (т. бани) 215°/0,03 мм,  $n_D^{20}$  1,4513.

п-Нитробензоат (0,5 г) растворяют в 15 мл сухого метанола, содержащего 8 мг натрия (определяется титрованием стандартным раствором кислоты), раствор выдерживают 12 час при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривают, остаток растирают с водой и отфильтровывают осадок метил-п-нитробензоата. Фильтрат упаривают в вакууме и выделившийся диметилацеталь 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-Д-галактозы очищают экстракцией смесью 5 мл ацетона и 15 мл эфира. После упаривания растворителя остается 0,25 г вещества, при перегонке которого получают диметилацеталь 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-Д-галактозы в виде бесцветной жидкости; т. кип. (т. бани) 95°/0,02 мм,  $n_D^{20}$  1,4525,  $[\alpha]_D^{25} +35^\circ$  (с 0,7 в воде), т. пл. 36° (после перекристаллизации из смеси эфир — петролейный эфир, 30—60°). Повторная перегонка необходима только в том случае, если нужно получить кристаллический продукт.

Диметилацеталь под действием хлористого водорода в эфире или другого кислотного катализатора легко превращается в 3,6-ангидро-2,4-ди-О-метил-β-метил-Д-галактопиранозид; т. пл. 83°.

### 3,6-Ангидро-2-дезоксид-Д-галактоза и ее производные [22]

#### 3,6-Ангидро-2-дезоксид-Д-галактоза

3,6-Ангидро-2-дезоксид-α-метил-Д-галактопиранозид. К раствору 1,80 г 2-дезоксид-α-метил-Д-галактопиранозид [26] в 4 мл сухого пиридина (о приготовлении сухого пиридина см. выше) при 0° прибавляют в течение 1 час охлажденный раствор 1,80 г п-толуолсульфохлорида в 5 мл сухого пиридина. Реакционную смесь выдерживают 24 час при 0° и выливают в воду со льдом. Продукт реакции экстрагируют хлороформом, хлороформный экстракт промывают водой, высушивают и упаривают в вакууме. Выход 6-О-тозил-2-дезоксид-α-метил-Д-галактопиранозид 2,10 г,  $[\alpha]_D^{20} +79^\circ$  (с 5,0 в спирте). Его растворяют в 80 мл спирта и обрабатывают 1 час при 60° 6,4 мл 1 н. раствора едкого натра. Раствор нейтрализуют двуокисью углерода и упаривают досуха. Твердый остаток исчерпывающе экстрагируют ацетоном, экстракты объединяют и упаривают в вакууме, полученный остаток вновь экстрагируют этилацетатом. Раствор фильтруют и упаривают до сиропа, который перегоняется в виде бесцветной, постепенно кристаллизующейся жидкости; выход 0,6 г (40%), т. кип. (т. бани) 120° (0,01 мм). Перекристаллизация из эфира дает 3,6-ангидро-2-дезоксид-α-метил-Д-галактопиранозид в виде пластинок; т. пл. 80°,  $[\alpha]_D^{20} +98^\circ$  (с 0,8 в воде).

3,6-Ангидро-2-дезоксид-Д-галактоза [22]. Раствор 0,5 г 3,6-ангидро-2-дезоксид-α-метил-Д-галактопиранозид в 10 мл воды обрабатывают 1 мл 2 н. серной кислоты в течение 105 мин при комнатной температуре, после чего раствор нейтрализуют карбонатом бария, фильтруют и упаривают в вакууме досуха. Остаток экстрагируют водой и упаривают экстракт в вакууме. Очистка продукта экстракцией ацетоном дает бесцветный сироп; выход 0,39 г,  $n_D^{20}$  1,4977,  $[\alpha]_D^{20} +24^\circ$  (с 3,6 в воде). Вещество, кото-



рое является, по-видимому, 3,6-ангидро-2-дезоксид-альфа-D-галактозой, легко восстанавливает раствор Фелинга и дает положительную реакцию с реагентом Шиффа.

### 3,6-Ангидро-2-дезоксид-4-О-метил-альфа-метил-D-галактозид [22]

К раствору 1,0 г 3,6-ангидро-2-дезоксид-альфа-метил-D-галактопиранозид в 30 мл жидкого аммиака прибавляют при перемешивании 0,5 г натрия, перемешивают еще 1 час и затем в течение 1 час постепенно прибавляют 10 мл подистого метила. Аммиак удаляют током воздуха и остаток экстрагируют хлороформом. Хлороформный раствор фильтруют и упаривают в вакууме, остаток экстрагируют эфиром. Отгоняют большую часть эфира, прибавляют метанол, полученный раствор обезвреживают углем и фильтруют. Метанольный раствор упаривают до сиропа, который перегоняют и получают 3,6-ангидро-2-дезоксид-4-О-метил-альфа-метил-D-галактопиранозид. Выход 0,8 г (73%), т. кип. (т. бани) 70—74°/0,05 мм,  $n_D^{20}$  1,4650,  $[\alpha]_D^{20} +81,5^\circ$  (с 1,8 в воде).

### 3,6-Ангидро-D-глюкоза и ее производные

#### 3,6-Ангидро-бета-метил-D-глюкопиранозид (I)

2,3,4-Три-О-ацетил-6-бром-6-дезоксид-альфа-D-глюкопиранозилбромид [2,27]. Высушенный тонко размельченный пентаацетат бета-D-глюкопиранозы (15 г) (см. стр. 115) помещают в трубку Кариуса и покрывают твердым бромистым водородом (около 25 мл), пропуская газообразный бромистый водород в трубку, охлаждаемую жидким воздухом (вводная трубка для бромистого водорода должна находиться выше охлаждаемой части трубки Кариуса, в противном случае газ будет затвердевать прямо в вводной трубке). Пока содержимое трубки находится в твердом состоянии, трубку запаивают и выдерживают 9 дней при комнатной температуре, затем охлаждают жидким воздухом и после того, как ее содержимое затвердеет, вскрывают. Реакционную смесь оставляют открытой на воздухе, избыток бромистого водорода улетучивается, и остается кристаллический остаток. Остаток растворяют в 150 мл хлороформа, раствор последовательно промывают водой, раствором бикарбоната натрия, водой и высушивают над безводным сульфатом магния, фильтруют и упаривают в вакууме. Выход три-О-ацетил-6-бром-6-дезоксид-альфа-D-галактопиранозилбромида 6,5 г, т. пл. 170° (после перекристаллизации из смеси ацетон — петролейный эфир).

Три-О-ацетил-6-бром-6-дезоксид-бета-метил-D-глюкопиранозид (II) [2, 27]. Раствор 6,5 г дибромпроизводного в 100 мл сухого метанола встряхивают в течение ночи с 5 г карбоната серебра. Реакционную смесь обрабатывают углем и фильтруют, раствор упаривают в вакууме при 40° досуха и получают кристаллический три-О-ацетил-6-бром-6-дезоксид-бета-метил-D-глюкопиранозид. Выход 4,5 г, т. пл. 124° (после перекристаллизации из водного спирта).

6-Бром-6-дезоксид-бета-метил-D-глюкопиранозид. К раствору 4,9 г три-О-ацетил-6-бром-6-дезоксид-бета-метил-D-глюкопиранозид в 50 мл метанола прибавляют 20 мг натрия. Смесь оставляют на ночь, упаривают и получают 6-бром-6-дезоксид-бета-метил-D-глюкопиранозид; выход 3,3 г, т. пл. 154° (после перекристаллизации из этилацетата).

## 3,6-Ангидро-β-метил-Д-глюкопиранозид

1) Из 6-бром-6-дезоксид-β-метил-Д-глюкопиранозид [2]. Раствор 3,2 г 6-бром-6-дезоксид-β-метил-Д-глюкопиранозид в 1 н. растворе едкого натра нагревают 2 час при 85—90°. Раствор нейтрализуют двуокисью углерода, упаривают в вакууме досуха, остаток экстрагируют ацетоном, экстракт фильтруют и упаривают. Выделившийся 3,6-ангидро-β-метил-Д-глюкопиранозид перегоняется в виде бесцветного сиропа; т. кип. (т. бани) 160—170° (0,02 мм),  $n_D^{20}$  1,4900,  $[\alpha]_D^{20}$  —138° (с 1,1 в воде). Вещество самопроизвольно закристаллизовывается, т. пл. около 50° (в запаянном капилляре). Вещество гигроскопично и поэтому с трудом поддается перекристаллизации (ср. [2]).

2) Из три-О-ацетил-6-бром-6-дезоксид-β-метил-Д-глюкопиранозид (II) [1]. Раствор 10 г три-О-ацетил-6-бром-6-дезоксид-β-метил-Д-глюкопиранозид в 150 мл горячего 50%-ного водного спирта обрабатывают 50 г октагидрата гидроокиси бария и смесь нагревают 2 час на водяной бане при 85—90°. Желтый мутный раствор кипятят с углем, фильтруют и упаривают в вакууме. Остаток экстрагируют 4 или 5 раз смесью равных частей спирта и этилацетата при нагревании с обратным холодильником. Фильтрат упаривают, светло-желтый сиропобразный остаток перегоняют в вакууме и получают 3,6-ангидро-β-метил-Д-глюкопиранозид в виде бесцветного густого сиропа. Выход 3,5 г (76%), т. кип. (т. бани) 160—165° (0,2—0,3 мм),  $[\alpha]_D^{20}$  —137° (с 8 в воде). Вещество хорошо растворимо в воде, менее растворимо в спирте и трудно растворимо в этилацетате.

## 3,6-Ангидро-α-метил-Д-глюкопиранозид (IV)

Из 6-О-тозил-α-метил-Д-глюкопиранозид [2]. Полученный из соответствующего 6-О-трифенилметильного производного [28, 29] три-О-ацетил-6-О-тозил-α-метил-Д-глюкопиранозид (21,8 г) растворяют в 500 мл сухого метанола и прибавляют 30 мг натрия. Раствор выдерживают 12 час, за это время деацетилирование по методу Земплена проходит нацело [25] (см. также стр. 119). Упариванием в вакууме удаляют растворитель и получают 6-О-тозил-α-метил-Д-глюкопиранозид, выход 17 г, т. пл. 110—112°. Вещество кристаллизуется из горячей воды в виде гидрата с т. пл. 56—58°.

Раствор 8 г 6-О-тозил-α-метил-Д-глюкопиранозид в 50 мл спирта обрабатывают 12 час при комнатной температуре и 1 час при 80° 25 мл 1 н. раствора едкого натра. После нейтрализации двуокисью углерода раствор упаривают в вакууме досуха и остаток экстрагируют горячим ацетоном. Ацетоновый экстракт фильтруют, упаривают и получают с количественным выходом 3,6-ангидро-α-метил-Д-глюкопиранозид; т. пл. 108° (после перекристаллизации из этилацетата),  $[\alpha]_D^{20}$  +56° (с 1 в воде). Согласно литературным данным [30], температура плавления этого соединения 89—95°.

Из 6-нитрата три-О-ацетил-α-метил-Д-глюкопиранозид [5]. К 6,08 г 6-нитрата три-О-ацетил-α-метил-Д-глюкопиранозид прибавляют 38 мл спирта и затем 4 н. раствор едкого натра в таком количестве, чтобы общий объем смеси составил 60 мл. Через 30 мин при комнатной температуре осадок растворяется и раствор нагревают 70 мин при 75—80°. Реакция заканчивается, когда оптическое вращение смеси становится постоянным. Раствор подкисляют уксусной кислотой и упаривают в вакууме

досуха. Остаток экстрагируют кипящим ацетоном (5 × 25 мл). Ацетоновый раствор фильтруют и упаривают в вакууме, полученный сироп растворяют в 20 мл этилацетата, высушивают, фильтруют и упаривают до сиропа, который закристаллизовывается при внесении затравки 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозида. Выход 2,0 г (77%), т. пл. 105,5—107,5° (после двух перекристаллизаций из этилацетата),  $[\alpha]_D^{20} +56,5^\circ$  (в воде).

### 3,6-Ангидро-D-глюкоза

*1,2-O-Изопропилиден-5,6-ди-O-тозил- $\alpha$ -D-глюкофураноза* [31]. Раствор 4,5 г 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (см. стр. 162) в 30 мл сухого пиридина обрабатывают 4 дня при 40° раствором 9 г *n*-толуолсульфохлорида в 45 мл хлороформа. Реакционную смесь разбавляют хлороформом и промывают 2 раза водой, 3 раза 5%-ной водной серной кислотой, 1 раз водным бикарбонатом калия и снова водой. Раствор высушивают хлористым кальцием, встряхивают с углем, фильтруют и упаривают в вакууме. Вещество, которое закристаллизовывается при затирании со спиртом, трижды перекристаллизовывают из спирта; т. пл. 160°,  $[\alpha]_D^{20} -6^\circ$  (с 1,3 в хлороформе).

*3,6-Ангидро-1,2-O-изопропилиден-5-O-тозил- $\alpha$ -D-глюкоза* [3]. 1,2-O-Изопропилиден-5,6-ди-O-тозил- $\alpha$ -D-глюкозу (100 г) растворяют в 1 л 96%-ного спирта и кипятят 2 час с 210 мл 1 н. раствора едкого натра. При охлаждении окрашенного в коричневый цвет раствора выделяется некоторое количество 3,6-ангидро-1,2-O-изопропилиден-5-O-тозил- $\alpha$ -D-глюкозы. Для полного выделения вещества реакционную смесь разбавляют 3 л воды и через 24 час фильтруют. Полученный продукт перекристаллизовывают из пятикратного по весу количества горячего спирта; выход 54 г (75%), т. пл. 132°,  $[\alpha]_D^{20} +39^\circ$  (с 2,8 в хлороформе).

*3,6-Ангидро-1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофураноза* [3]. 3,6-Ангидро-1,2-O-изопропилиден-5-O-тозил- $\alpha$ -D-глюкофуранозид (50 г) растворяют в 500 мл кипящего 96%-ного спирта и обрабатывают 280 мл 1 н. раствора едкого натра. Реакционную смесь кипятят (около 12 час) до тех пор, пока при разбавлении капли смеси водой она перестанет мутнеть. Спирт отгоняют в вакууме, водный раствор нейтрализуют двуокисью углерода и упаривают в вакууме досуха. Сиропообразный остаток экстрагируют эфиром, к экстракту осторожно прибавляют петролейный эфир и получают кристаллическую 3,6-ангидро-1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозу. Продукт выкристаллизовывается в виде длинных игл, выход 60%, т. пл. 56—57°,  $[\alpha]_D^{20} +29^\circ$  (с 3,2 в воде). Вещество хорошо растворимо в спирте, эфире, этилацетате, хлороформе, бензоле и воде и нерастворимо в петролейном эфире (т. кип. 30—60°).

*3,6-Ангидро-D-глюкоза* [3]. Раствор 5 г 3,6-ангидро-1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы в 50 мл 0,1 н. серной кислоты выдерживают при 38° до постоянного оптического вращения (+2,53° → +3,23°, в трубке длиной 1 дм), затем нейтрализуют карбонатом бария, фильтруют и упаривают в вакууме до бесцветного сиропа. Сироп растворяют в смеси равных частей этилацетата и абсолютного спирта и к полученному раствору прибавляют петролейный эфир до его помутнения. 3,6-Ангидро-D-глюкоза кристаллизуется при потирании палочкой, выход чистого продукта почти количественный, т. пл. 119—122° [2],  $[\alpha]_D^{20} +55^\circ$  (с 2,9 в воде, мутаротации не происходит).

При обработке раствора 0,3 г 3,6-ангидро-D-глюкозы в 2 мл воды несколькими каплями фенилгидразина и уксусной кислоты при комнат-

ной температуре через несколько минут начинает выкристаллизовываться фенилгидразон. Фенилгидразон 3,6-ангидро- $\beta$ -D-глюкозы отфильтровывают и перекристаллизовывают из воды, т. пл. 155—156°.

Из 3,6-ангидро- $\beta$ -метил-D-глюкопиранозид (I) [1]. Раствор 3,6-ангидро- $\beta$ -метил-D-глюкопиранозид в семикратном по весу количестве 4,5%-ной водной серной кислоты нагревают 1 час при 100°. Светло-желтый раствор нейтрализуют карбонатом бария, обесцвечивают углем, фильтруют и упаривают в вакууме досуха. Сиропообразный остаток растворяют в смеси равных частей спирта и этилацетата, для удаления остатков карбоната бария раствор фильтруют и обрабатывают петролевым эфиром (т. кип. 30—60°) до появления помутнения. При стоянии 3,6-ангидро- $\beta$ -D-глюкоза выкристаллизовывается в виде длинных тонких игл, т. пл. 117°,  $[\alpha]_D^{20} +54^\circ$  (с 9 в воде). 3,6-Ангидро- $\beta$ -D-глюкоза растворима в воде и спирте, но менее растворима в этилацетате. В воде 3,6-ангидро- $\beta$ -D-глюкоза находится в виде альдегидной формы, поскольку водный раствор дает положительную реакцию с реагентом Шиффа уже через несколько минут.

При обработке 3,6-ангидро- $\beta$ -D-глюкозы (1 часть) хлоргидратом фенилгидразина (2 части) в водном растворе (20 частей) ацетата натрия (3 части) образуется фенилозазон; после перекристаллизации из 40%-ного водного спирта т. пл. 180° (нечеткая).

При восстановлении 3,6-ангидро- $\beta$ -D-глюкозы амальгамой натрия [32] (см. также [37]) получают 3,6-ангидро- $\beta$ -сорбит, который перекристаллизовывают из этилацетата; т. пл. 113°,  $[\alpha]_D^{20} -7,5^\circ$  (с 9 в воде).

Окисление 3,6-ангидро- $\beta$ -D-глюкозы бромом приводит к 3,6-ангидро- $\beta$ -глюконовой кислоте, т. пл. 123—125° (после перекристаллизации из *n*-пропанола). При дегидратации кислоты образуется 3,6-ангидро- $\beta$ -глюконолактон [33], т. пл. 115° (после перекристаллизации из этилацетата),  $[\alpha]_D^{20} +82^\circ \rightarrow +66^\circ$  (7 дней; с 9 в воде). При обработке 3,6-ангидро- $\beta$ -глюконолактона спиртовым аммиаком на холоду образуется 3,6-ангидро- $\beta$ -глюконамид; т. пл. 149° (после перекристаллизации из метанола),  $[\alpha]_D^{20} +78^\circ$  (с 9 в воде).

Из 6-сульфата 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы. Раствор 4 г бариевой соли 6-сульфата 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (см. стр. 156) в 150 мл воды нагревают 15 час при 100° с 32 г кристаллической гидроокиси бария. К смеси прибавляют 150 мл спирта, охлаждают и фильтруют, осадок промывают несколько раз горячим спиртом. Фильтрат нейтрализуют двуокисью углерода и упаривают в вакууме досуха. Остаток экстрагируют ацетоном, экстракт упаривают и получают сироп, который быстро закристаллизовывается; выход 1,94 г. При экстракции кристаллов эфиром остается нерастворимой 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофураноза с т. пл. 158°. После перекристаллизации из смеси ацетона и эфира температура плавления поднимается до 162°. Эфирный экстракт упаривают и получают кристаллическую 3,6-ангидро-1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозу; выход 0,91 г, т. пл. 55°,  $[\alpha]_D^{20} +29^\circ$  (с 1,3 в воде). Гидролиз до 3,6-ангидро- $\beta$ -D-глюкозы осуществляется, как описано выше.

#### Превращение 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид в соответствующий фуранозид [2]

Под действием 0,1 н. серной кислоты. Раствор 100 мг 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид в 10 мл 0,1 н. серной кислоты выдерживают при комнатной температуре (около 20°) 16 час. За это время оптическое

вращение раствора изменяется от  $+56$  до  $+145^\circ$ . Раствор нейтрализуют карбонатом бария, фильтруют и упаривают в вакууме. Остаток перекристаллизовывают из смеси спирт — эфир и получают 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкофуранозид (V). Выход 60 мг, т. пл.  $68^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +164^\circ$  (с 1,5 в воде).

Под действием хлористого водорода в смеси хлороформ—эфир. Смешивают 50 мг 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозида в 1 мл хлороформа с 1 мл 5 н. хлористого водорода в эфире, смесь сразу выливают в чашку и упаривают над натронной известью в вакуум-эксикаторе. Остаток перекристаллизовывают, как описано выше, и получают 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкофуранозид. Выход 35 мг, т. пл.  $70^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{18} +164^\circ$  (с 0,6 в воде).

Под действием хлористого водорода в метаноле. К раствору 50 мг 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозида в 1 мл метанола добавляют 1 каплю 4 н. раствора хлористого водорода в метаноле, смесь немедленно упаривают, как описано выше. Сухой кристаллический остаток растирают с эфиром и перекристаллизовывают, как описано ранее. Выход 3,6-ангидро- $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкофуранозида 25 мг, т. пл.  $69^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{18} +166^\circ$  (с 1 в воде).

#### Превращение 3,6-ангидро- $\beta$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозида в соответствующий фуранозид [2]

Такое превращение легко осуществляется под действием хлористого водорода в смеси хлороформ — эфир или в метаноле и приводит к 3,6-ангидро- $\beta$ -метил- $\beta$ -D-глюкофуранозиду (VI); т. пл.  $97^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{18} -50^\circ$  (с 1,1 в воде). Серная кислота, используемая для превращения  $\alpha$ -D-пиранозида в  $\alpha$ -D-фуранозид, в данном случае неэффективна.

### 2.5-Ангидро- $\alpha$ -этил-L-арабинофуранозид (III) [30]

#### 5-О-Тозил- $\alpha$ -этил-L-арабинофуранозид

К охлажденному до  $0^\circ$  в бане со льдом раствору 9 г  $\alpha$ -этил-L-арабинофуранозида (получен по методу Грина и Паксу [34]) в 150 мл безводного пиридина (дважды перегнанного над пятиокисью фосфора) прибавляют при перемешивании за 3—4 час небольшими порциями 10,1 г *n*-толуолсульфохлорида. Реакционную смесь выдерживают 3 дня при  $5^\circ$  в холодильнике и один день при  $26^\circ$  и затем выливают в воду со льдом. Тозильное производное экстрагируют хлороформом ( $3 \times 70$  мл). Хлороформные экстракты объединяют, промывают дважды водой, высушивают безводным сульфатом магния, фильтруют. Хлороформ упаривают в вакууме при  $40-50^\circ$  и получают 5-О-тозил- $\alpha$ -этил-L-арабинофуранозид в виде сиропа; выход 16 г. При перегонке в вакууме продукт разлагается, и поэтому его нельзя очистить таким методом.

#### 2,5-Ангидро- $\alpha$ -этил-L-арабинофуранозид [20]

Сиропообразный 5-О-тозил- $\alpha$ -этил-L-арабинофуранозид (16 г) растворяют в 75 мл сухого метанола и обрабатывают 150 мл 0,58 н. раствора метилата натрия в сухом метаноле. Раствор выдерживают 24 час при  $25^\circ$ , разрушают избыток метилата натрия действием двуокиси углерода и упаривают в вакууме при  $30-40^\circ$  (температура бани) досуха. Остаток экстрагируют 4 раза сухим ацетоном, объединенные экстракты упаривают и экстрагируют полученный сиропообразный остаток сухим эфиром.

При упаривании эфирного экстракта получают 6 г сиропа, который перегоняют в высоком вакууме. Первая фракция, которая перегоняется в виде бесцветной подвижной жидкости, представляет собой 2,5-ангидро- $\alpha$ -этил- $\text{L}$ -арабинофуранозид; т. кип.  $85\text{--}100^\circ$  (0,001 мм),  $n_D^{20}$  1,4541,  $[\alpha]_D^{20} -82^\circ$  (с 1 в 0,1 н. NaOH).

При растворении в дистиллированной воде 2,5-ангидро- $\alpha$ -этил- $\text{L}$ -арабинофуранозид гидролизуется с образованием 2,5-ангидро- $\text{L}$ -арабинозы. Гидролиз обнаруживается по изменению оптического вращения:  $[\alpha]_D^{20} -127^\circ \rightarrow +10^\circ$  (96 час, равновесие, с 1 в воде). По аналогичной методике можно получить 2,5-ангидро- $\alpha$ -метил- $\text{L}$ -арабинофуранозид [20].

### 3,6;3',6'-Диангидро- $\beta$ -метилмальтозид [9]

#### Пентаацетат 6,6'-ди- $\text{O}$ -мезил- $\beta$ -метилмальтозида [9, 35]

Раствор безводного  $\beta$ -метилмальтозида (получен при нагревании до постоянного веса 5,2 г кристаллического моногидрата в вакууме при  $125^\circ$ ) [9] в 50 мл сухого пиридина (перегнан над пятиокисью фосфора) обрабатывают при  $0^\circ$  раствором 2,1 мл метилсульфонилхлорида в 40 мл сухого пиридина. Смесь выдерживают 16 час при  $0^\circ$ , прибавляют 20 мл уксусного ангидрида и оставляют на ночь при температуре около  $20^\circ$ . Смесь выливают в ледяную воду при перемешивании и экстрагируют хлороформом ( $3 \times 50$  мл). Хлороформные экстракты объединяют, промывают последовательно разбавленной соляной кислотой, раствором бикарбоната натрия и водой, затем высушивают над сульфатом натрия и упаривают в вакууме. Остаток перекристаллизовывают из спирта и получают пентаацетат 6,6'-ди- $\text{O}$ -мезил- $\beta$ -метилмальтозида; т. пл.  $175\text{--}176^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +56,5^\circ$  (с 1,5 в хлороформе).

#### 3,6;3',6'-Диангидро- $\beta$ -метилмальтозид [9]

К раствору 2 г пентаацетата 6,6'-ди- $\text{O}$ -мезил- $\beta$ -метилмальтозида в 90 мл сухого метанола прибавляют 1 мл 0,2 н. раствора метилата натрия в сухом метаноле. Раствор выдерживают 12 час при комнатной температуре, упаривают в вакууме и получают сиропообразный 6,6'-ди- $\text{O}$ -мезил- $\beta$ -метил-мальтозид. Полученный сироп растворяют в 5 мл спирта, обрабатывают 12 мл 1 н. раствора едкого натра и нагревают 3,5 час при  $60^\circ$ . Смесь нейтрализуют двуокисью углерода, фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме досуха и остаток несколько раз экстрагируют кипящим этилацетатом. Экстракты объединяют, упаривают и получают аморфный остаток, который при перекристаллизации из 95%-ного спирта дает моногидрат 3,6;3',6'-диангидро- $\beta$ -метилмальтозида; выход 0,45 г, т. пл.  $95\text{--}101^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} -66^\circ$  (с 2,4 в воде). При ацетилировании полученного продукта уксусным ангидридом в пиридине образуется кристаллический триацетат 3,6;3',6'-диангидро- $\beta$ -метилмальтозида; т. пл.  $218\text{--}219^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +25^\circ$  (с 1,4 в хлороформе).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fischer E., Zach K., Ber., 45, 456 (1912).
2. Haworth W. N., Owen L. N., Smith F., J. Chem. Soc., 1941, 88.
3. Ohle H., Vargha L., von, Erlbach H., Ber., 61, 1211 (1928).
4. Percival E. G. V., J. Chem. Soc., 1945, 119.

5. Gladding E. K., Purves C. B., J. Am. Chem. Soc., **66**, 76 (1944).
6. Valentin F., Collection Czechoslov. Chem. Commun., **4**, 364 (1932).
7. Ohle H., Thiel H., Ber., **66**, 525 (1933).
8. Haworth W. N., Jackson J., Smith F., J. Chem. Soc., **1940**, 620.
9. Newth F. H., Nicholas S. D., Smith F., Wiggins L. F., J. Chem. Soc., **1949**, 2550.
10. Araki C., Nippon Kagaku Zasshi, **65**, 533 (1944); Chem. Abstracts, **42**, 1210 (1948).
11. Araki C., Hirase S., Bull. Chem. Soc. Japan, **26**, 463 (1953).
12. O'Neill A. N., Stewart D. K. R., Can. J. Chem., **34**, 1700 (1956).
13. Forbes I. A., Percival E. G. V., J. Chem. Soc., **1939**, 1844; Hands S., Peat S., Nature, **142**, 797 (1938); Jones W. G. M., Peat S., J. Chem. Soc., **1942**, 225.
14. Araki C., Nippon Kagaku Zasshi, **65**, 725 (1944); Chem. Abstracts, **41**, 3496 (1941).
15. Clingman A. L., Nunn J. R., Stephen A. M., J. Chem. Soc., **1957**, 197.
16. Hirase S., Araki C., Ito T., Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 985 (1956).
17. Pirie N. W., Biochem. J., **30**, 369 (1936).
18. Percival E., Chem. and Ind., 1487 (1954); O'Neill A. N., J. Am. Chem. Soc., **77**, 2837, 6324 (1955).
19. Araki C., Hirase S., Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 770 (1956).
20. Cifonelli M., Cifonelli J. A., Montgomery R., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **77**, 121 (1955).
21. Foster A. B., Jones W. G. M., Smith F., неопубликованные данные.
22. Foster A. B., Overend W. G., Stacey M., Vaughan G., J. Chem. Soc., **1954**, 3367.
23. Foster A. B., Overend W. G., Vaughan G., J. Chem. Soc., **1954**, 3625. (1954).
24. Fischer E., Beensch L., Ber., **27**, 2480 (1894).
25. Zemplén G., Pacsu E., Ber., **62**, 1613 (1929).
26. Tamm C., Reichstein T., Helv. Chim. Acta, **31**, 1630 (1948); Overend W. G., Shafizadeh F., Stacey M., J. Chem. Soc., **1950**, 671; Foster A. B., Overend W. G., Stacey M., *ibid.*, **1951**, 974.
27. Fischer E., Armstrong E. F., Ber., **35**, 833 (1902).
28. Helferich B., Brederick H., Schneidmüller, Ann., **458**, 111 (1927).
29. Helferich B., Himmen E., Ber., **61**, 1825 (1928).
30. Helferich B., Klein W., Schäfer W., Ber., **59**, 79 (1926).
31. Ohle H., Dickhäuser E., Ber., **58**, 2593 (1925).
32. Renfrow W. B., Jr., Hauser C. R., Org. Syntheses, Coll. vol. **2**, 609 (1943).
33. Fischer E., Zach K., Ber., **45**, 2068 (1912).
34. Green J. W., Pacsu E., J. Am. Chem. Soc., **60**, 2056 (1938).
35. Helferich B., Stryk F., von, **74**, 1794 (1941).
36. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds., Academic Press Inc., New York — London, vol. II, 1963, p. 59.
37. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds., Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 127.

## Ангидросахара типа $\alpha$ -окисей

### 2,3- и 5,6-Ангидросахара

Л. Ф. Виггинс

Ангидросахара типа  $\alpha$ -окисей сыграли важную роль в изучении вальденовского обращения в ряду сахаров, в синтезе редких сахаров и дезоксисахаров, в определении строения и синтезе 2-амино-2-дезоксид-глюкозы и 2-амино-2-дезоксид-галактозы.

Эти ангидросахара представляют интерес с точки зрения их использования для введения в молекулу сахара различных заместителей, например галогенов, алкильной и аминной групп.

Получение ангидросахаров типа  $\alpha$ -окисей лучше всего достигается гидролизом производных сахаров, содержащих галоген или сульфонильную группу в положении, удобном для атаки с тыла соседней гидроксильной группой. Так, 4,6-О-бензилиден-3-хлор-3-дезоксид- $\alpha$ -метил-Д-глюкопиранозид под действием метилата натрия дает 2,3-ангидро-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-Д-аллопиранозид [1], а щелочной гидролиз 1,2-О-изопропилиден-6-О-тозил- $\alpha$ -Д-глюкофуранозы приводит к 5,6-ангидро-1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -Д-глюкофуранозе [2]. В тех случаях, когда атом галогена или сульфонильная группа присоединены к асимметрическому атому углерода, образование цикла неизменно сопровождается вальденовским обращением [3]. Более того, образование цикла происходит достаточно легко только при условии, что гидроксильная группа на соседнем атоме углерода находится в *транс*-положении относительно сульфонильной группы или атома галогена.  $\alpha$ -Ангидросахара могут также образовываться при дезаминировании аминсахаров. Так, например, Бешфорд и Виггинс [4] получили 2,3-ангидро-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-Д-аллопиранозид при обработке 2-амино-2-дезоксид-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-Д-альтропиранозид азотистой кислотой в уксусной кислоте.

### МЕТОДИКА

#### 2,3-Ангидро-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-Д-маннопиранозид [5]

В 80 мл сухого пиридина (см. стр. 91, 115, 130) растворяют 50 г 4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-Д-глюкопиранозид [6] (см. стр. 251), смесь охлаждают в бане со льдом и при энергичном перемешивании прибавляют в течение 30 мин раствор 25 г *n*-толуолсульфохлорида в 80 мл сухого пиридина. Раствор выдерживают 24 час при комнатной температуре, а затем встряхивают со смесью 200 мл воды и 200 мл бензола. Органический слой отделяют, а водный слой экстрагируют 50 мл бензола. Экстракты объединяют, промывают 5%-ной соляной кислотой, раствором бикарбоната натрия и, наконец, водой. Во время этой обработки можно отделить непрореагировавшее бензилиденное производное. Бензольный экстракт высушивают сульфатом магния и упаривают досуха. Остаток растворяют в горячем спирте, при охлаждении из раствора выкристаллизовывается 2-О-тозил-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-Д-глюкопиранозид. Выход 20 г, т. пл. 153—154°,  $[\alpha]_D^{25} +64^\circ$  (с 4,9 в хлороформе).



Полученный тозилат (17 г) растворяют в 150 мл безводного метанола, содержащего 1,2 г чистого натрия, и кипятят смесь 4 час с обратным холодильником. При охлаждении смеси выкристаллизовывается 2,3-ангидро-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид в виде длинных игл; выход 9,5 г, т. пл. 145—147° (после перекристаллизации из абсолютного спирта),  $[\alpha]_D^{25} +107^\circ$  (с 1,6 в хлороформе).

### **2,3-Ангидро-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-D-аллопиранозид [7]**

4,6-О-Бензилиден- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид [6] растворяют в 350 мл пиридина и охлаждают раствор. К охлажденному раствору прибавляют в течение 15 мин 140 г *n*-толуолсульфохлорида, смесь хорошо перемешивают и выдерживают 48 час при 30°. Раствор выливают в смесь льда с водой и экстрагируют продукт реакции хлороформом. Хлороформный слой отделяют, промывают 5%-ной серной кислотой, разбавленным раствором бикарбоната натрия и, наконец, водой, высушивают над сульфатом магния, фильтруют и упаривают досуха. Остаток перекристаллизовывают из спирта и получают 2,3-ди-О-тозил-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид. Выход 96 г, т. пл. 148—149°,  $[\alpha]_D^{20} +13^\circ$  (с 1,5 в хлороформе). К раствору полученного дитозилата (94 г) в 1 л хлороформа прибавляют раствор 12,6 г натрия в 300 мл метанола. Смесь выдерживают при комнатной температуре 48 час, время от времени встряхивая, и затем разбавляют водой. Хлороформный слой отделяют, промывают один-два раза водой, высушивают сульфатом магния и упаривают. Остаток перекристаллизовывают из смеси хлороформ — эфир и получают 2,3-ангидро-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил-D-аллопиранозид; выход 38 г, т. пл. 199—200°,  $[\alpha]_D^{20} +140^\circ$  (с 2,2 в хлороформе).

### **2,3-Ангидро- $\beta$ -метил-D-рибопиранозид [8]**

К охлажденному до 0° раствору 2,8 г 2-О-тозил- $\beta$ -метил-D-арабинопиранозид [8] в 15 мл хлороформа прибавляют раствор 0,2 г натрия в 5 мл сухого метанола. Смесь выдерживают 12 час при комнатной температуре, разбавляют 50 мл хлороформа и встряхивают с 100 мл воды. Водный слой отделяют, нейтрализуют разбавленной серной кислотой и упаривают досуха. Остаток экстрагируют несколько раз горячим этилацетатом, экстракты объединяют и упаривают; остаток перегоняют при 110° (температура бани) и остаточном давлении 0,05 мм. При охлаждении дистиллат полностью закристаллизовывается. 2,3-Ангидро- $\beta$ -метил-D-рибопиранозид перекристаллизовывают из смеси эфир — петролейный эфир; т. пл. 46°,  $[\alpha]_D^{25} -36^\circ$  (с 0,6 в хлороформе).

### **1,2-О-Изопропилиден-5,6-ангидро- $\alpha$ -D-глюкофураноза [2]**

К охлажденному до 5—10° раствору 9 г 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (стр. 162) в 50 мл сухого пиридина (стр. 91, 115, 130) прибавляют в течение 15 мин раствор 7 г *n*-толуолсульфохлорида в холодном хлороформе и смесь оставляют на ночь при комнатной температуре. Растворители отгоняют в вакууме при температуре не выше 40° и растворяют остаток в эфире. Эфирный раствор промывают разбавленной серной кислотой, раствором бикарбоната натрия, водой, высушивают

над сульфатом магния и упаривают досуха. Остаток растворяют в теплом эфире и прибавляют бензол до появления опалесценции. При охлаждении смеси выкристаллизовывается 1,2-О-изопропилиден-6-О-тозил- $\alpha$ -D-глюкофураноза; т. пл.  $108^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} -9^\circ$  (с 2 в хлороформе).

Полученный тозилат (10 г) растворяют при нагревании в 25 мл хлороформа, охлаждают и прибавляют раствор 0,75 г натрия в 15 мл сухого метанола. Желеобразную смесь энергично встряхивают, охлаждая в бане со льдом. Реакция заканчивается через 10–15 мин. К смеси прибавляют воду для растворения выделившегося *n*-толуолсульфоната натрия. Хлороформный слой отделяют, а водный слой экстрагируют хлороформом. Экстракты объединяют, высушивают над сульфатом магния, упаривают и получают 1,2-О-изопропилиден-5,6-ангидро- $\alpha$ -D-глюкофуранозу, которую перекристаллизовывают из бензола. Выход 4 г, т. пл.  $133,5^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} -26,5^\circ$  (с 4,0 в воде).

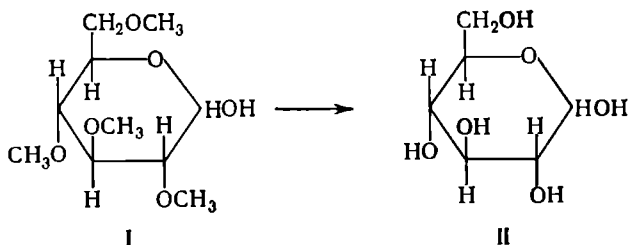
## ЛИТЕРАТУРА

1. Newth F. H., Overend W. G., Wiggins L. F., J. Chem. Soc., 1947, 10.
2. Ohle H., Vargha L., von, Ber., 62, 2435 (1929).
3. Peat S., Advances in Carbohydrate Chem., 2, 38 (1946).
4. Bashford V. G., Wiggins L. F., Nature, 165, 566 (1950).
5. Robertson G. J., Griffiths C. E., J. Chem. Soc., 1935, 1193.
6. Freudenberg K., Toepffer H., Andersen C. C., Ber., 61, 1758 (1928).
7. Richtmyer N. K., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., 63, 1727 (1941).
8. Kent P. W., Stacey M., Wiggins L. F., J. Chem. Soc., 1949, 1232.

## Расщепление метиловых эфиров

Действие бромистоводородной кислоты и трехбромистого бора

Л. Хаф, Р. С. Теобальд



## ВВЕДЕНИЕ

Деметилирование метилированных моносахаридов, полученных, например, при расщеплении метилированного полисахарида, с последующим хроматографированием на бумаге представляет удобный метод идентификации сахаров в малых количествах. Продолжительная обработка метилированной альдозы концентрированной водной бромисто-

водородной кислотой при 0° (метод, примененный Хессом и Нейманном [1] в 1935 г.) позволяет выделить незамещенный сахар с высоким выходом, например 80%-ным для альдогексоз. Однако при этом могут образовываться продукты полимерного характера или продукты конденсации [2]. Хлористый водород в этих условиях расщепляет только гликозидную связь, тогда как иодистый водород наряду с дезалкилированием вызывает восстановление и осмоление продуктов [1]. Иодистый водород с успехом применяют для метилированных полиспиртов и альдоновых кислот [3], хотя выходы в этом случае несколько ниже, чем при применении бромистого водорода. Производные гексулоз, например остаток D-фруктозы в метилированной сахарозе, разрушаются при действии этих реагентов [2—4]. Метилированный полисахарид полностью деполимеризуется и деметируется под действием бромистоводородной кислоты; так, метилированный крахмал и метилированная целлюлоза расщепляются с образованием кристаллической D-глюкозы [5]. Частичное деметилирование полиметилированного производного, вызываемое очень непродолжительным взаимодействием с бромистым водородом при более высокой температуре [6], часто применяется в целях идентификации, поскольку набор пятен, полученный при хроматографировании на бумаге, является характерным для данного типа замещения и может быть получен для сравнения с заведомым образцом. При действии бромистого водорода в уксусном ангидриде метилированные альдозы превращаются в ацетобромпроизводные [1].

Недавно Бурн и сотр. [7, 8] (см. также стр. 113) разработали общий эффективный метод деметилирования при низкой температуре, который состоит в действии треххлористого бора в хлористом метиле. В случае плохой растворимости или низкой реакционной активности предпочтительнее применять трехбромистый бор. В случае хорошей растворимости в реакционной смеси метилированный полисахарид гладко расщепляется на альдозы. К сожалению, этот метод также не применим для деметилирования производных фруктозы и сорбозы, которые превращаются в 5-оксиметилфурфурол. О расщеплении простых неуглеводных эфиров действием треххлористого бора впервые сообщили Виберг и Зюттерлин [9], о действии трехбромистого бора — Бентон и Диллон [10].

## МЕТОДИКА

### *Частичное деметилирование 2,3,4,6-тетра-О-метил-D-глюкопиранозы бромистоводородной кислотой [6]*

Смесь 10 мг 2,3,4,6-тетра-О-метил-D-глюкопиранозы и 1 мл водной бромистоводородной кислоты (48%-ная по весу) нагревают 5 мин в запаянной ампуле на кипящей водяной бане. Реакционную смесь немедленно разбавляют 10 мл воды, нейтрализуют небольшими порциями карбоната серебра и фильтруют через уголь. Для удаления следов серебра фильтрат насыщают сероводородом и снова фильтруют через слой угля. При упаривании раствора в вакууме получают сироп, который при хроматографировании на бумаге<sup>1</sup> обнаруживает три-О-метилглюкозу ( $R_f$  0,84, 0,77), ди-О-метилглюкозу ( $R_f$  0,50), моно-О-метилглюкозу ( $R_f$  0,22) и глюкозу ( $R_f$  0,10).

<sup>1</sup> Растворитель: *n*-бутанол — этанол — вода (40 : 11 : 19 по объему); реагент для обнаружения: хлоргидрат *n*-анизидина [12].

***D-Глюкоза из 2,3,6-три-O-метил-D-глюкозы [1]***

Раствор 1 г 2,3,6-три-O-метил-D-глюкозы в 5 мл воды насыщают при  $-18^{\circ}$  бромистым водородом и выдерживают 4 дня в запаянной ампуле при  $0^{\circ}$ . Первоначальная бледно-розовая окраска раствора темнеет до карминовой. Бромистоводородную кислоту и воду тщательно отгоняют в вакууме при низкой температуре, коричневый сиропообразный остаток растворяют в 30 мл воды, обесцвечивают углем и фильтруют. Для удаления следов бромистоводородной кислоты и брома, связанного с C-1 сахара, раствор встряхивают 1,5 час с 8 г свежеприготовленного карбоната серебра. Фильтрат освобождают от ионов серебра с помощью сероводорода, фильтруют, упаривают в вакууме досуха и получают неочищенную D-глюкозу в виде бесцветной стекловидной массы; выход 0,7 г (86%). Продукт содержит менее 2% метоксильных групп и не содержит брома.

При обработке 1 г хлоргидрата фенилгидразина, 1,5 г ацетата натрия, 0,5 мл ледяной уксусной кислоты и 10 мл воды полученная неочищенная D-глюкоза (0,2 г) дает D-арабино-гексозофенилозавон в виде желтых игл; выход 0,25 г (63%), т. пл.  $202^{\circ}$  (с разл.) (см. стр. 78).

***Полное деметилирование 2,3,4,6-тетра-O-метил-D-глюкопиранозы трехбромистым бором [8]***

Раствор 10 мг 2,3,4,6-тетра-O-метил-D-глюкопиранозы (I) в 2 мл сухого хлористого метилена <sup>1</sup> охлаждают ацетоном с сухим льдом и обрабатывают  $\sim 2$  г перегнанного трехбромистого бора <sup>2</sup>, охлажденного до  $-80^{\circ}$ . Смесь выдерживают при  $-80^{\circ}$  30 мин, снимают охлаждение и оставляют на ночь при комнатной температуре без доступа влаги. Растворитель и избыток реагента упаривают в вакууме, стекловидный остаток упаривают досуха в вакууме с абсолютным метанолом ( $3 \times 3$  мл). Хроматография на бумаге [11, 12] концентрированного водного раствора полученного продукта показывает, что прошло почти полное деметилирование до D-глюкозы (II). Аналогичная обработка 2,3,4,6-тетра-O-метил-D-глюкозы треххлористым бором приводит только к частичному деметилированию и при хроматографии на бумаге можно обнаружить следы моно-, ди- и три-O-метилглюкозы.

**Л И Т Е Р А Т У Р А**

1. Hess K., Neumann F., Ber., 68, 1371 (1935).
2. Araki T., Hasi Y., Nippon Kagaku Zasshi, 60, 692 (1939); Chem. Abstracts, 36, 4483 (1942).
3. Araki T., Hasi Y., Nippon Kagaku Zasshi, 61, 141 (1940); Chem. Abstracts, 36, 5147 (1942).
4. Araki T., Hasi Y., Nippon Kagaku Zasshi, 60, 783 (1939); Chem. Abstracts, 36, 5146 (1942).
5. Araki T., Hasi Y., Nippon Kagaku Zasshi, 60, 774 (1939); Chem. Abstracts, 36, 5146 (1942).

<sup>1</sup> Предварительно промывают 5%-ным раствором бикарбоната натрия, водой, высушивают над хлористым кальцием и перегоняют; т. кип.  $39,5-41^{\circ}$ .

<sup>2</sup> Т. кип.  $92^{\circ}$ ; немедленно запаивают во взвешенные ампулы.

6. Hough L., Jones J. K. N., Wadman W. H., J. Chem. Soc., 1950, 1702.
7. Allen S., Bonner T. G., Bourne E. J., Saville N. M., Chem. and Ind. (London), 630 (1958).
8. Bonner T. G., Bourne E. J., McNally S., J. Chem. Soc., 1960, 2929.
9. Wiberg E., Sütterlin W., Z. anorg. u. allgem. Chem., 202, 22 (1931).
10. Benton F. L., Dillon T. E., J. Am. Chem. Soc., 64, 1128 (1942).
11. Hough L., Methods of Biochem. Anal., 1, 205 (1954).
12. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. 1, p. 21.

## Расщепление связи углерод—кислород

### Действие треххлористого бора

*Т. Г. Боннер, Е. Дж. Бурн*

#### ВВЕДЕНИЕ

Треххлористый бор можно использовать для деметилирования, дезацетилирования и для расщепления ацетальных производных сахаров [1]. Поскольку этот реагент легко расщепляет углерод-кислородные связи, с его помощью можно быстро и легко идентифицировать моносахаридные единицы в метилированном полисахариде или в метилированных моносахаридах, полученных из последнего [2]. Для растворения незамещенного полисахарида в реагенте требуется только частичное его метилирование или частичное ацетилирование. Все известные моносахариды устойчивы к действию треххлористого бора, за исключением D-фруктозы и L-сорбозы, которые превращаются в 5-оксиметилфурфурол. Ангидроциклы в ангидросахарах легко расщепляются при действии реагента; однако оказалось, что 1,6-ангидропроизводные дают в качестве главного продукта исходный сахар, тогда как 2,3-ангидросахара полностью превращаются в новые вещества. Кроме того, было установлено, что *n*-толуолсульфонатные и сульфатные группы совершенно инертны к действию треххлористого бора. Поскольку в ряде случаев среди продуктов реакции были обнаружены олигосахариды, этот реагент может вызывать и некоторую конденсацию. Треххлористый бор при комнатной температуре представляет собой газ (т. кип. 12°), но он сохраняет высокую реакционную способность и при низких температурах, намного ниже точки кипения; его наиболее удобно применять при температуре смеси сухого льда с ацетоном [3], т. е. при -80°. В качестве растворителя целесообразно использовать хлористый метилен (т. кип. 40°), который не взаимодействует с реагентом и легко удаляется из реакционной смеси. Можно применять и некоторые другие растворители, но не *n*-пентан [3] и не тетрагидрофуран [4], которые в данных условиях реакционноспособны. В ряде случаев, когда вещество растворяется в треххлористом боре по мере повышения температуры от -80° до комнатной, реакцию можно проводить без растворителя. Вместо треххлористого бора часто удобно применять трехбромистый бор (т. кип. 92°), особенно для дисахаридов. Дисахариды, как правило, не взаимодействуют с треххлори-

стым бором даже при продолжительной обработке, однако они частично растворяются в треххлористом боре и при этом происходит расщепление гликозидной связи. Перед исследованием продукта реакции методом хроматографии на бумаге или ионофореом на бумаге избыток треххлористого бора и растворитель отгоняют в вакууме.

## МЕТОДИКА

### *Треххлористый бор*

Запаянную ампулу с продажным треххлористым бором, т. кип.  $12,5^{\circ}$  (760 мм), охлаждают смесью ацетон — сухой лед (около  $-80^{\circ}$ ) и переносят содержимое в перегонную колбу, также предварительно охлажденную [5]. Треххлористый бор перегоняется по мере повышения температуры до комнатной. Дистиллат, охлажденный до  $-80^{\circ}$ , быстро переносят во взвешенную, закрывающуюся ампулу с оттянутым горлом и запаивают перед взвешиванием.

### *Качественное исследование производных сахаров*

Исследуемое производное (1—10 мг) растворяют или суспендируют в 1—2 мл сухого хлористого метилена и охлаждают смесью ацетона и сухого льда. К смеси быстро прибавляют 1—2 г треххлористого бора из предварительно охлажденной ампулы. Смесью выдерживают 30 мин при  $-80^{\circ}$ , затем к колбе присоединяют хлоркальциевую трубку, снимают охлаждение и оставляют на ночь. Остаток треххлористого бора и растворитель отгоняют при комнатной температуре в вакууме водоструйного насоса. Остаток обрабатывают по одному из двух способов: 1) прибавляют метанол ( $3 \times 3$  мл), отгоняя растворитель в вакууме при комнатной температуре досуха после каждого прибавления, или 2) прибавляют суспензию карбоната серебра в воде, нейтральный раствор фильтруют от нерастворимых солей серебра и водный фильтрат лиофилизуют. Остаток, полученный по одному из методов, растворяют в небольшом количестве метанола или воды и исследуют с помощью хроматографии на бумаге [6] или электрофореза на бумаге [7].

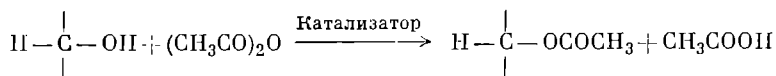
Методика проведения препаративных реакций с треххлористым бором аналогична рассмотренной выше [5].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Allen S., Bonner T. G., Bourne E. J., Saville N. M., Chem. and Ind. (London), 630 (1958).
2. Bonner T. G., Bourne E. J., McNally S., J. Chem. Soc., 1960, 2929.
3. Gerrard W., Lappert M. F., J. Chem. Soc., 1951, 2545.
4. Brown H. C., Tierney P. A., J. Am. Chem. Soc., 80, 1552 (1958).
5. Bonner T. G., Saville N. M., J. Chem. Soc., 1960, 2851.
6. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 21.
7. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 51.

## Ацетилирование

*М. Л. Вольфром, А. Томпсон*



### ВВЕДЕНИЕ

Гидроксильные группы углеводов легко реагируют с уксусным ангидридом в присутствии кислых или основных катализаторов. В качестве основных катализаторов обычно используются ацетат натрия или пиридин, а в качестве кислых — хлористый цинк, хлористый водород, серная и хлорная кислоты. Полиспирты ввиду их устойчивости можно ацетилировать любым из приведенных способов, тогда как при ацетилировании сахаров возникает ряд различных проблем, поскольку сахара существуют в растворе в виде равновесной смеси таутомерных форм, которые ацетируются независимо друг от друга. Образованию ацетилированного  $\beta$ -D-аномера благоприятствует высокая температура и присутствие ацетата натрия как катализатора. Ацетилирование  $\alpha$ - или  $\beta$ -D-глюкозы уксусным ангидридом в пиридине [1] при 0° происходит без превращений аномерного центра. Однако равновесие смещается в сторону  $\alpha$ -D-формы при ацетилировании при более высокой температуре в присутствии кислых катализаторов, таких, как хлористый цинк [2] или серная кислота. При ацетилировании кетоз, особенно D-фруктозы, удобнее использовать кислые катализаторы при низкой температуре, но даже в этих условиях часто образуются ациклические кетоацетаты. Ацетат ациклической альдегидной формы был выделен всего в одном случае при ацетилировании высшего сахара уксусным ангидридом в присутствии ацетата натрия [3].

Циклические ацетаты сахаров, полученные в обычных условиях ацетилирования, имеют, как правило, пиранозный цикл, хотя в некоторых случаях, как, например, в случае D-галактозы [4, 5], одновременно образуются и фуранозные циклы.

Трудная доступность  $\alpha$ -D-аномера сахара часто препятствует использованию прямого ацетилирования, приводящего к  $\alpha$ -D-серии. Поэтому ацетаты  $\alpha$ -D-аномеров можно получать аномеризацией  $\beta$ -D-аномеров под действием хлористого цинка в смеси уксусной кислоты и уксусного ангидрида. Иногда, как, например, в случае олигосахаридов целлодекстринового типа, удобнее сначала получить ацетилированный  $\alpha$ -D-аномер и затем превратить его через соответствующий ацетилированный  $\alpha$ -D-глицозилбромид в ацетилированный  $\beta$ -D-аномер.

Вследствие этого выбор методики ацетилирования зависит от строения желаемого продукта, от природы сахара и от доступности исходного вещества.

### МЕТОДИКА

#### *Ацетилирование $\alpha$ -D-глюкозы в присутствии ацетата натрия; пентаацетат $\beta$ -D-глюкозы [6, 7]*

Суспензию 50 г безводного ацетата натрия в 700 мл уксусного ангидрида в двухлитровой круглодонной колбе нагревают до кипения на голом пламени в эффективном вытяжном шкафу. К суспензии прибавляют 3 г безводной  $\alpha$ -D-глюкозы (из общего количества 100 г) и осторожно нагре-

вают колбу, так чтобы слой сахара находился почти на дне. Начало реакции определяется по энергичному кипению смеси после удаления пламени, после чего колбу помещают на подставку из корковых пробок, а пламя гасят. Остаток глюкозы прибавляют к смеси небольшими порциями с такой скоростью, чтобы не прекращалось кипение. Для предотвращения накопления твердого осадка на дне колбы смесь рекомендуется периодически осторожно встряхивать. Если реакция останавливается, колбу снова нагревают на пламени, не прибавляя новой порции сахара. После прибавления всего сахара и после того, как реакция прекратится, смесь нагревают до сильного кипения, охлаждают и выливают при перемешивании на 2 кг измельченного льда. Смесь выдерживают 3 час, периодически перемешивая, кристаллический осадок отфильтровывают с отсасыванием и промывают холодной водой; выход 160 г (73%). Продукт очищают перекристаллизацией из 1 л горячего 95%-ного спирта и обработкой активированным углем. Раствор следует фильтровать, как только он охладится до комнатной температуры. При длительной кристаллизации выделяется некоторое количество  $\alpha$ -D-аномера. Последующая такая же перекристаллизация дает чистый пентаацетат  $\beta$ -D-глюкопиранозы; т. пл. 132° (испр.),  $[\alpha]_D^{20} +4^\circ$  (в хлороформе).

О получении октаацетата  $\alpha$ -D-мальтозы в присутствии ацетата натрия см. [8].

#### **Ацетилирование $\alpha$ -D-глюкозы в присутствии пиридина; пентаацетат $\alpha$ -D-глюкопиранозы [1, 9]**

К охлажденной до 0° смеси 50 мл уксусного ангидрида и 65 г сухого пиридина (пиридин кипятят 4 час над окисью бария и перегоняют, хранят над драйеритом) прибавляют 10 г размельченной безводной  $\alpha$ -D-глюкозы и суспензию перемешивают при 0° до растворения осадка. Раствор выдерживают 18 час при комнатной температуре и выливают при перемешивании в 200 мл воды со льдом. Через несколько минут закристаллизовывается пентаацетат  $\alpha$ -D-глюкопиранозы, выход 19 г (88%). Для очистки продукт трижды перекристаллизовывают из 95%-ного спирта; т. пл. 112—113° (испр.),  $[\alpha]_D^{20} +102^\circ$  (в хлороформе).

#### **Ацетилирование $\beta$ -D-фруктозы в присутствии хлористого цинка; пентаацетат кето-D-фруктозы [10, 11]**

К охлажденному до 0° раствору 1 г свежеплавленного хлористого цинка в 100 мл уксусного ангидрида прибавляют 10 г тонко измельченной  $\beta$ -D-фруктозы, смесь энергично перемешивают до полного растворения сахара (4—5 час) и выдерживают 1 час при 20—25° и 2 час при 50°. Охлажденный раствор перемешивают 2 час с 200 мл воды со льдом и нейтрализуют избытком бикарбоната натрия. Раствор экстрагируют хлороформом, экстракт промывают водой, высушивают безводным сульфатом натрия и упаривают в вакууме. Сиропообразный остаток растворяют в 50 мл абсолютного эфира и оставляют на ночь в холодильнике при ~10°. В результате получают 10,3 г (48%) кристаллического вещества. Чистый пентаацетат кето-D-фруктозы получают при перекристаллизации из спирта, содержащего небольшое количество хлороформа; т. пл. 69—70°,  $[\alpha]_D^{20} +35^\circ$  (в хлороформе).

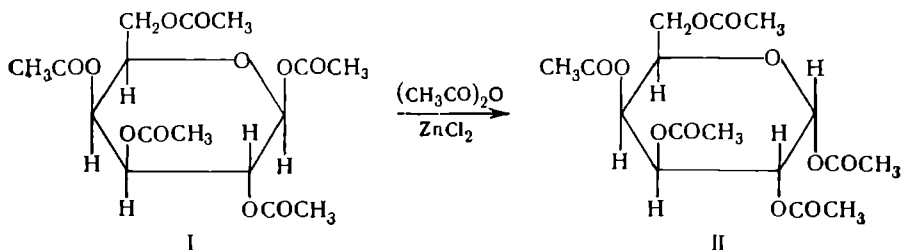
О получении ациклических кето-ацетатов при наращивании углеродной цепи под действием диазометана см. [12].



**Ацетилирование  $\alpha$ -D-глюкозы в присутствии хлорной кислоты; пентаацетат  $\alpha$ -D-глюкопиранозы [13]**

К раствору 0,5 мл 60%-ной хлорной кислоты в 70 мл уксусного ангидрида постепенно в течение 30 мин прибавляют при перемешивании 10 г безводной  $\alpha$ -D-глюкозы, поддерживая температуру в интервале 30—40°. Смесь перемешивают еще 30 мин и выливают в 300 мл воды со льдом. Через 2 час отфильтровывают с отсасыванием твердый ацетат, промывают водой и высушивают при 45°; выход 18 г (83%). Чистый пентаацетат  $\alpha$ -D-глюкопиранозы получают при перекристаллизации из спирта; т. пл. 112—113°,  $[\alpha]_D^{25} +102^\circ$  (в хлороформе).

**Превращение  $\beta$ -D-аномеров полных ацетатов сахаров в  $\alpha$ -D-аномеры; пентаацетат  $\alpha$ -D-галактопиранозы [14]**

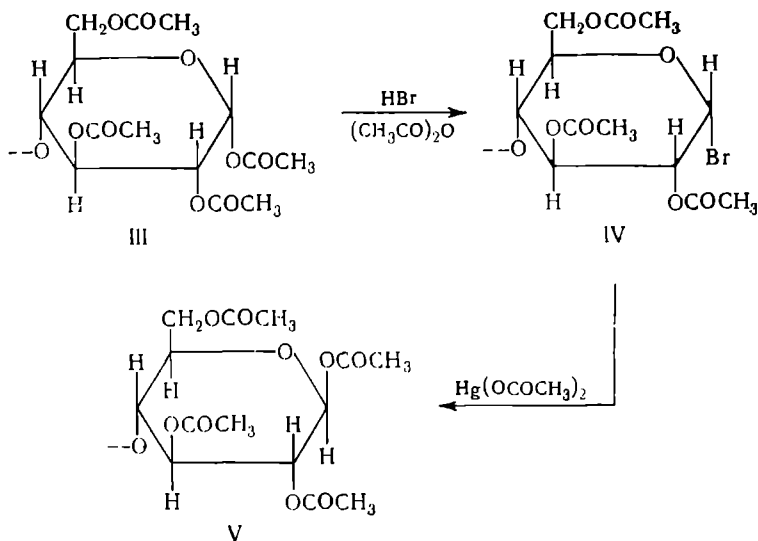


Раствор 50 г пентаацетата  $\beta$ -D-галактопиранозы (т. пл. 142°) в 150 мл уксусного ангидрида, содержащего 10 г хлористого цинка, нагревают 15 мин на кипящей водяной бане. Смесь выливают в 500 мл воды со льдом и экстрагируют хлороформом. Экстракт последовательно промывают водой, раствором бикарбоната натрия, водой, высушивают безводным сульфатом натрия и упаривают в вакууме. Полученный сироп через некоторое время закристаллизовывается. Продукт перекристаллизовывают из спирта и получают пентаацетат  $\alpha$ -D-галактопиранозы (II); выход 35 г (70%), т. пл. 95,5°,  $[\alpha]_D^{20} -107^\circ$  (в хлороформе).

**Превращение  $\alpha$ -D-аномеров полных ацетатов сахаров в  $\beta$ -D-аномеры: октаацетат  $\beta$ -целлобиозы [15]**

Октаацетат  $\alpha$ -целлобиозы превращают в ацетилированный гликозилбромид (IV), который, имея структуру  $\beta$ -глюкозы, стабилизируется в виде  $\alpha$ -D-аномера. Атом галогена замещается на ацетоксигруппу под действием ацетата ртути, причем в результате простой инверсии происходит образование  $\beta$ -D-ацетата. В 50 мл уксусного ангидрида, содержащего 40% бромистого водорода, растворяют 5,0 г октаацетата  $\alpha$ -целлобиозы; перемешивают при комнатной температуре 3—5 мин до полного растворения и быстро фильтруют через стеклянный фильтр в делительную воронку с 150 мл хлороформа. При работе с олигосахаридами реакцию следует проводить очень быстро, поскольку в данных условиях происходит расщепление гликозидной связи. Хлороформный раствор промывают 2 раза водой, высушивают безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают в вакууме досуха. Полученный сироп растворяют в 100 мл

безводной уксусной кислоты, содержащей 5 г ацетата ртути, и выдерживают при комнатной температуре 1 час. Раствор выливают в 300 мл хлороформа, промывают водой, высушивают безводным сульфатом натрия



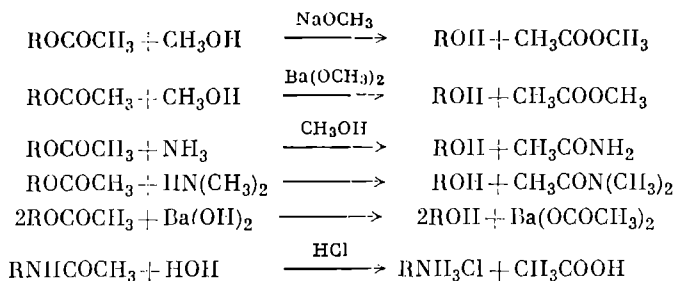
и упаривают в вакууме досуха. Сиропообразный остаток дважды перекристаллизуют из спирта и получают чистый октаацетат  $\beta$ -целлобиозы (V), выход 4,3 г (85%), т. пл.  $202-202,5^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} -14,5^\circ$  (в хлороформе).

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Behrend R., Roth P., Ann., **331**, 359 (1904).
2. Erwig E., Koenigs W., Ber., **22**, 1464 (1889).
3. Montgomery E., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **56**, 2463 (1934).
4. Hudson C. S., Johnson J. M., J. Am. Chem. Soc., **38**, 1223 (1916).
5. Schlubach H. II., Prochownick V., Ber., **63**, 2298 (1930).
6. Franchimont A. P. N., Ber., **12**, 1938 (1879).
7. Fischer E., Ber., **49**, 584 (1916).
8. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 334.
9. Hudson C. S., Dale J. K., J. Am. Chem. Soc., **37**, 1264 (1915).
10. Hudson C. S., Brauns D. H., J. Am. Chem. Soc., **37**, 2736 (1915).
11. Cramer F. B., Paesu E., J. Am. Chem. Soc., **59**, 1148 (1937).
12. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 118, 148.
13. Krüger D., Roman W., Ber., **69**, 1830 (1936); Nicholas S. D., Smith F., Nature, **161**, 349 (1948); Bárczai-Martos M., Körösy F., ibid., **165**, 369 (1950); Fritz J. S., Schenk G. H., Anal. Chem., **31**, 1808 (1959).
14. Hudson C. S., Johnson J. M., J. Am. Chem. Soc., **37**, 1276 (1915); Hudson C. S., Parker H. O., ibid., **37**, 1589 (1915).
15. Wolfrom M. L., Fields D. L., Tappi, **40**, 335 (1957).

## Деацетилирование

*А. Томпсон, М. Л. Вольфром, Е. Паксу*



## ВВЕДЕНИЕ

Ацетаты углеводов являются идеальными производными для выделения и очистки сахаров, поскольку их легко можно выделить в индивидуальном состоянии и затем превратить в исходный углевод. Гидролиз сложнэфирных групп катализируется как кислотами, так и основаниями, однако основания — более мощные катализаторы, чем кислоты. Для снятия ацетамидных групп используются сильные кислоты [1—4] и основания [5], но в последнем случае реакция часто затрудняется из-за пространственных эффектов. Ацетатные группы можно снять избирательно, не затрагивая ацетамидной функции [5—8]. Деацетилирование метанольным раствором, содержащим каталитические количества метилата натрия [9—12] или метилата бария [13], основано на реакции переэтерификации и протекает в условиях, мало затрагивающих свободные сахара. Метанольный раствор аммиака [14] снимает ацетильные группы с образованием ацетамида. Этот метод пригоден только для гликозидов и других производных сахаров с защищенной карбонильной группой. Вместо аммиака можно применять метанольные растворы диметиламина [15] и других аминов. Несмотря на то что сахара весьма неустойчивы в щелочных растворах, было показано, что охлажденный насыщенный раствор гидроокиси бария является эффективным О-деацетилирующим реагентом, особенно в случае кетоз [16], где, по-видимому, образуются комплексы, предохраняющие сахар. Выбор наиболее эффективного метода деацетилирования определяется, как правило, чувствительностью продуктов реакции к действию кислот и щелочей, растворимостью и т. д. Ниже приводятся несколько типичных методик деацетилирования, которые в зависимости от конкретных условий могут быть модифицированы. Удаление ионов из реакционной смеси легко осуществляется с помощью ионообменных смол [23].

## МЕТОДИКИ

### *Деацетилирование метилатом натрия в метаноле [9—12]*

Ацетильные группы превращаются в метилацетат каталитически под действием только части от стехиометрического количества основания, необходимого для превращения уксусной кислоты в соль. Метод позволяет избирательно снять О-ацетильные группы, не затрагивая N-ацетиль-

ные группы [2]. Как правило, реакция осуществляется следующим образом. К раствору или суспензии 1 г ацетата в 10 мл сухого метанола при перемешивании при комнатной температуре прибавляют 3 мл свежеприготовленного раствора метилата натрия (0,5 г натрия растворяют в 100 мл метанола). Реакция обычно протекает почти мгновенно с образованием осадка комплексного соединения натрия с сахаром. Если реакция закончилась (20 мин), капля реакционной смеси, добавленная к нескольким каплям воды, должна раствориться и дать щелочную реакцию на лакмус. Для удаления ионов натрия смесь перемешивают с небольшим избытком смолы амберлит IR-120 (H<sup>+</sup>) до нейтральной реакции раствора (индикаторная бумага). Смолу отфильтровывают и раствор упаривают в вакууме до сиропа. Полученный сироп растворяют в небольшом количестве воды, обесцвечивают углем и снова упаривают в вакууме, полученный сироп кристаллизуют из подходящего растворителя, обычно из метанола. Выход свободного сахара должен составлять 80—90% от теоретического.

Этот метод был впервые применен Паксу в 1927 г. к октаацетату целлобиозы, затем подтвержден Земплем и опубликован в их совместной статье [11]. Приведенные ниже примеры наглядно показывают легкость, с которой протекает дезацетилирование.

К раствору 0,54 г тетра-О-ацетил- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид [17] в 5 мл метанола прибавляют 0,1 мл 0,1 н. раствора метилата натрия в метаноле ( $1/_{800}$  теоретического количества) и нагревают смесь на водяной бане. Через 2 мин с количественным выходом выделяется  $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид. При комнатной температуре дезацетилирование протекает за 40 мин.

Раствор 8 г гекса-О-ацетил-D-маннита [18, 24] в 20 мл метанола нагревают на водяной бане с 2 мл 0,1 н. раствора метилата натрия ( $1/_{700}$  от теоретического количества). Через 3 мин начинает выкристаллизовываться D-маннит. Раствор упаривают в вакууме досуха и растворяют остаток в 5 мл воды. К теплomu раствору прибавляют 25 мл спирта и оставляют кристаллизоваться; выход D-маннита 2,7 г, т. пл. 165°, т. пл. смешанной пробы 165°.

Раствор 10 г октаацетата сахарозы [19] в 50 мл метанола нагревают 5 мин на водяной бане с 2 мл 0,1 н. раствора метилата натрия ( $1/_{800}$  теоретического количества). Раствор охлаждают и оставляют на ночь, при этом из раствора кристаллизуется чистая сахароза. Выход 4,5 г, т. пл. 182°,  $[\alpha]_D^{20} -64,5^\circ$  (в воде).

Суспензию 20 г пента-О-ацетилсалицина [20] в 80 мл метанола нагревают 5 мин на водяной бане с 4 мл 0,1 н. раствора метилата натрия ( $1/_{500}$  теоретического количества) и полученный раствор оставляют на ночь. Выход чистого кристаллического салицина 10 г, т. пл. 201°,  $[\alpha]_D^{20} -59^\circ$  (в воде). В этой реакции происходит также снятие ацетильной группы с о-(оксиметил)фенольного остатка агликона.

Применение метода каталитического дезацетилирования, который чаще проводят на суспензии, чем в растворе метанола, наглядно демонстрирует дезацетилированием О-ацетилцеллюлозы. Было показано [12, 25], что при кипячении 2 г О-ацетилцеллюлозы (38% ацетильных групп) в 50 мл метанола с различными количествами 0,1 н. раствора метилата натрия для полного дезацетилирования требуется 0,023 г натрия вместо теоретически необходимого 0,403 г. Реакция длится несколько часов.

Для дезацетилирования ацетатов восстанавливающих сахаров, которые обычно весьма чувствительны к действию щелочи при повышенной

температуре, реакцию проводят при комнатной температуре [12]. Например, 30 г октаацетата целлобиозы суспендируют в 120 мл метанола, к суспензии прибавляют 30 мл 0,1 н. раствора метилата натрия ( $1/120$  теоретического количества) и встряхивают смесь 3 час. Полученный неочищенный продукт (15,3 г) растворяют в 60 мл воды, раствор деионизуют и обесцвечивают активированным углем. Фильтрат упаривают в вакууме до густого сиропа, который затем растворяют в 100 мл горячего спирта. Кристаллизация целлобиозы проходит быстро; выход 13,6 г,  $[\alpha]_D^{25} + 34^\circ$  (в воде; равновесие).

Другие примеры деацетилирования с использованием каталитических количеств метилата натрия разбросаны по всей монографии; см., например, стр. 200.

### *Деацетилирование метилатом бария в метаноле*

Как уже упоминалось выше, метод деацетилирования по Исбеллу [13] аналогичен методу Земплена и Паксу; первый метод предусматривает использование метилата бария, второй — метилата натрия.

Метод Исбелла пригоден для снятия О-ацетильных групп, N-ацетильные группы при этом не затрагиваются [8]. В качестве примера ниже описано деацетилирование окта-О-ацетил-4-О-β-Д-глюкопиранозил-Д-маннозы [13].

Суспензию 6 г ацетата в 150 мл сухого метанола охлаждают смесью льда с солью, прибавляют 5 мл 0,5 н. раствора метилата бария (3,8 г окиси бария в 100 мл метанола) и оставляют смесь на 20 час в холодильнике, изредка встряхивая. Для удаления ионов бария раствор перемешивают с небольшим избытком амберлита IR-120 (H<sup>+</sup>), фильтруют и упаривают в вакууме до сиропа. Сиропообразный остаток кристаллизуется из спирта. Выход моногидрата 4-О-β-Д-глюкопиранозил-α-Д-маннозы 2,6 г (81%), т. пл. 137°.

### *Деацетилирование раствором аммиака в метаноле [14, 21]*

Снятие О-ацетильных групп с О-ацетильных производных углеводов с защищенной альдегидной группой, таких, как гликозиды, ацетали или дитиоацетали, легко происходит под действием раствора аммиака в метаноле. Метанольный аммиак предпочтительно снимает О-ацетильные группы: так, например, 2-ацетамидо-2-дезоксигри-О-ацетил-β-этил-Д-глюкопиранозид деацетилируется до 2-ацетамидо-2-дезоксигри-β-этил-Д-глюкопиранозида [17]. В качестве иллюстрации этого метода ниже приводится деацетилирование пента-О-ацетата диэтилдитиокетала β-фруктозы [21].

В охлажденный смесью льда с солью раствор 12 г пента-О-ацетата диэтилдитиокетала β-фруктозы [21] в 100 мл сухого метанола пропускают в течение 45 мин довольно быстрый ток сухого аммиака. Раствор выдерживают 20 час при 10° и затем упаривают до сиропа в вакууме при комнатной температуре. Полученный сироп растворяют в метаноле и снова упаривают до небольшого объема. Продукт реакции, который закристаллизовывается при добавлении двух объемов эфира, отфильтровывают и промывают эфиром; выход 5,4 г (73%), т. пл. 55–60°. После двух перекристаллизаций из смеси метанол — эфир получают чистый диэтилдитиокеталь β-фруктозы, т. пл. 65–67°,  $[\alpha]_D^{25} + 36^\circ$  (с 4 в воде).

### **Дезацетилирование водным раствором гидроокиси бария [16]; D-сорбоза**

Хотя этот метод включает действие раствора сильной щелочи, тем не менее он дает хорошие результаты при дезацетилировании кетоз. Можно предположить, что гидроокись бария не разрушает сахар за счет образования комплекса по кетонной группе, как это имеет место при образовании нерастворимого комплекса D-фруктозы с гидроокисью кальция [26].

Пентаацетат кето-D-сорбозы (5 г) [22] перемешивают с 200 мл 0,6 н. раствора гидроокиси бария в воде, предварительно охлажденного до 5°. Кристаллический осадок растворяется примерно за 30 мин, после чего смесь выдерживают еще 1 час при 5°. Полученный раствор насыщают двуокисью углерода, выпавший осадок карбоната бария отфильтровывают и промывают водой. Для удаления оставшихся ионов бария раствор перемешивают несколько минут с избытком амберлита IR-120 (H<sup>+</sup>). Фильтрат упаривают в вакууме до сиропа, который через некоторое время самопроизвольно кристаллизуется. Закристаллизовавшуюся массу перемешивают со спиртом и отфильтровывают; выход 1,85 г (80%), т. пл. 158—160°. Чистый продукт с т. пл. 165° и  $[\alpha]_D^{25} +43^\circ$  (с 4 в воде) получают после одной перекристаллизации из водного спирта.

### **Снятие N-ацетильных групп кислотным гидролизом [1—4]**

Тетра-O-ацетил-2-дезоксид-2-(N-метилацетиламино)- $\alpha$ -L-глюкозу (3 г) суспендируют в 20 мл 4 н. соляной кислоты и нагревают 45 мин на кипящей водяной бане. Раствор обесцвечивают углем, фильтруют и упаривают в вакууме при 50° до сиропа. Полученный сироп закристаллизовывается при добавлении нескольких капель спирта. Кристаллический продукт, хлоргидрат 2-дезоксид-2-(N-метиламино)- $\alpha$ -L-глюкозы, отфильтровывают и промывают небольшим количеством холодного спирта. Выход 1,5 г (88%), т. пл. 160—162°,  $[\alpha]_D^{25} -106^\circ$  (начальное, экстраполированное)  $\rightarrow -80^\circ$  (конечное; с 4 в воде).

### **Снятие N-ацетильных групп щелочным гидролизом [5]**

Щелочной гидролиз пригоден для снятия N-ацетильных групп в аминасахарах, в том случае когда карбонильная группа защищена. 9-(2-Ацетиламино-2-дезоксид- $\beta$ -D-аллопиранозил)-6-диметиламинопурин (1,00 г) [5] в 100 мл насыщенного водного раствора гидроокиси бария нагревают 20 час на водяной бане. Полученный раствор охлаждают, насыщают двуокисью углерода и фильтруют. Фильтрат упаривают в вакууме досуха. Полученный светло-желтый смолистый остаток (681 мг) растворяют в водном метаноле и наносят на колонку с амберлитом IRC-50 (H<sup>+</sup>). Колонку промывают водным метанолом (1 : 1 по объему) до минимальной адсорбции элюата в районе 274 ммк и затем элюируют 2 н. раствором гидроокиси аммония в водном метаноле (1 : 1 по объему). При упаривании в вакууме аммиачный элюат дает 360 мг (41%) белого стеклообразного остатка. Его растирают и получают белый аморфный порошок. Выделенный 9-(2-амино-2-дезоксид- $\beta$ -D-аллопиранозил)-6-диметиламинопурин кристаллизуется из метанола, т. пл. 260—261°,  $[\alpha]_D^{25} -17^\circ$  (с 1 в воде).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Moggridge R. C. G., Neuberger A., J. Chem. Soc., 1938, 745.
2. Levene P. A., J. Biol. Chem., 137, 29 (1941).
3. Foster A. B., Horton D., Stacey M., J. Chem. Soc., 1957, 81.
4. Wolfrom M. L., Thompson A., J. Am. Chem. Soc., 69, 1847 (1947).
5. McEvoy F. J., Baker B. R., Weiss M. J., J. Am. Chem. Soc., 82, 205, 209 (1960).
6. Wolfrom M. L., Konigsberg M., Soltzberg S., J. Am. Chem. Soc., 58, 490 (1936).
7. Kuhn R., Kirschenlohr W., Chem. Ber., 86, 1331 (1953).
8. Stoffyn P. J., Jeanloz R. W., J. Am. Chem. Soc., 80, 5690 (1958).
9. Zemplén G., Kunz A., Ber., 56, 1705 (1923).
10. Zemplén G., Ber., 59, 1254 (1926).
11. Zemplén G., Pacsu E., Ber., 62, 1613 (1929).
12. Zemplén G., Gerecs A., Hadácsy I., Ber., 69, 1827 (1936).
13. Isbell H. S., Bur. Standards J. Research, 5, 1179 (1930).
14. Fischer E., Bergmann M., Ber., 50, 1047 (1917).
15. Irvine J. C., Oldham J. W. II., Skinner A. F., J. Am. Chem. Soc., 51, 1279 (1929).
16. Hudson C. S., Brauns D. H., J. Am. Chem. Soc., 38, 1216 (1916).
17. Dale J. K., J. Am. Chem. Soc., 46, 1046 (1924).
18. Iwata M., Bull. Inst. Physical Chem. Research, Abstracts (Tokyo), 2, 27 (1929); Chem. Zentr., II, 177 (1929).
19. Herzfeld A., Ber., 13, 265 (1880); Hudson C. S., Johnson J. M., J. Am. Chem. Soc., 37, 2748 (1915).
20. Motessier A., Procès verbaux de l'Académie des sciences et lettres de Montpellier (séance du 12 Janv. 1863), 5 (1863); Jahresber. Chemie Liebigs, 676 (1866); Schiff H., Ann., 154, 14 (1870).
21. Wolfrom M. L., Thompson A., J. Am. Chem. Soc., 56, 880 (1934).
22. Wolfrom M. L., Olin S. M., Evans E. F., J. Am. Chem. Soc., 66, 204 (1944).
23. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 3.
24. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 77.
25. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III.
26. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 116.

Тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромид

Р. У. Лемье

## ВВЕДЕНИЕ

Пентаацетаты D-глюкопиранозы легко превращаются в тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромид [4—8] — соединение, которое широко известно под названием ацетобромглюкоза. Все методики включают

действие бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте, причем в реакцию легко вступают обе аномерные формы пентаацетата D-глюкопиранозы. По этой причине более поздние методики [5—7] предусматривают использование смеси пентаацетатов, которая образуется при ацетилировании D-глюкозы в кислых условиях. В этом разделе приводится несколько улучшенный метод, описанный Баркзан-Мартош и Кёрёши [7]. Можно полагать, что образующийся тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилбромид в ходе реакции обратимо превращается в термодинамически более устойчивый α-аномер. Кроме того, β-аномер легко гидролизуетсся в процессе выделения [8, 9]; вероятно, поэтому β-аномер никогда не был выделен в качестве продукта реакции, хотя он, несомненно, присутствует в реакционной смеси; это же приводит к заниженному выходу.

О получении других О-ацетилгликозилбромидов см. [10].

### МЕТОДИКА

В трехгорлую колбу емкостью 1 л, снабженную эффективной мешалкой и термометром, помещают 400 мл уксусного ангидрида, охлаждают в бане со льдом и прибавляют по каплям 2,4 мл 60—70%-ной хлорной кислоты. Раствор нагревают до комнатной температуры и при перемешивании прибавляют порциями в течение 30 мин 100 г безводной D-глюкозы с такой скоростью, чтобы температура реакционной смеси<sup>1</sup> находилась в интервале 30—40°. К охлажденному до 20° раствору прибавляют 30 г красного фосфора, а затем 180 г (58 мл) брома с такой скоростью, чтобы температура реакционной смеси не превышала 20°. К смеси при перемешивании и охлаждении приливают по каплям в течение 30 мин 36 мл воды, следя за тем, чтобы температура не поднималась выше 20°. Реакционную смесь выдерживают 2 час при комнатной температуре, разбавляют 300 мл хлороформа и фильтруют через слой тонкой стеклянной ваты. Реакционную колбу и фильтр смывают 50 мл хлороформа. Фильтрат выливают в 800 мл воды со льдом, находящейся в трехлитровой делительной воронке. Хлороформный слой промывают и переносят в двухлитровую воронку, содержащую 300 мл воды со льдом. Содержимое первой воронки экстрагируют 50 мл хлороформа и переносят экстракт во вторую воронку. Смесь энергично встряхивают, хлороформный слой отделяют и выливают при перемешивании в химический стакан емкостью 2 л, содержащий 500 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия. Смесь переносят в двухлитровую делительную воронку, ополоснув стакан небольшим количеством хлороформа, и энергично встряхивают. Хлороформный слой отделяют и перемешивают 10 мин с 10 г сухой кремневой кислоты. Смесь фильтруют, полученный светло-желтый раствор упаривают в вакууме при температуре не выше 60° на ротационном испарителе до образования твердой кристаллической массы. Продукт переносят в ступку, растирают в 500 мл смеси петролейный эфир — эфир (2 : 1 по объему), фильтруют и промывают 50 мл холодного сухого эфира. Неочищенный тетра-О-ацетил-α-D-глюкопиранозилбромид высушивают в вакууме над гидроокисью натрия; выход 194 г (80—85%), т. пл. 79—84°. Перекристаллизация из эфира или диизопропилового эфира даст чистое вещество с т. пл. 88—89°,  $[\alpha]_D^{20} +198^\circ$  (с 2 в хлороформе).

<sup>1</sup> По другому методу получения смеси пентаацетатов D-глюкозы в качестве аталлизатора используют серную кислоту [5].



## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Fischer E., Ber., **44**, 1903 (1911).
2. Brauns D. H., J. Am. Chem. Soc., **47**, 1280 (1925).
3. Karjala S., Link K. P., J. Am. Chem. Soc., **62**, 917 (1940).
4. Bates F. J. and Associates, Polarimetry, Saccharimetry and the Sugars; Natl. Bur. Standards Circular 440, 1942, p. 500.
5. Redemann C. E., Niemann C., Org. Syntheses, **22**, 1 (1942).
6. Scheurer P. G., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **76**, 3224 (1950).
7. Bárczai-Martos M., Kőrösy F., Nature, **165**, 369 (1950).
8. Lemieux R. U., Brice C., Can. J. Chem., **30**, 295 (1952).
9. Korytnyk W., Mills J. A., J. Chem. Soc., **1959**, 636.
10. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1965, vol. V, p. 182.

Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозилхлорид

Р. У. Лемье

## ВВЕДЕНИЕ

Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозилхлорид является неустойчивой аномерной формой ацетохлорглюкозы, и поэтому его следует получать в условиях, позволяющих контролировать кинетику реакции. Первый метод получения этого соединения включал реакцию тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромида с хлористым серебром [1, 2]. Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозилхлорид быстро образуется при взаимодействии пентаацетата  $\beta$ -D-глюкопиранозы с четыреххлористым титаном и затем с заметно меньшей скоростью изомеризуется в  $\alpha$ -D-аномер [3]. При проведении реакции в течение 5 мин при 40° с использованием бензола в качестве растворителя  $\beta$ -D-хлорид удается выделить с выходом 58% [4]. Реакция обоих аномеров пентаацетата D-глюкопиранозы с хлористым водородом в хлористом ацетиле приводит к  $\beta$ -D-хлориду [5]. В данном разделе приведена модифицированная методика общего способа получения неустойчивых 1,2-транс-поли-О-ацетилгликозилхлоридов, предложенного Корытником и Миллсом [5]. По этой методике получают более высокие выходы, чем по методике, описанной Лемье и Брисом [4]. Пентаацетат  $\alpha$ -D-глюкопиранозы реагирует с четыреххлористым титаном и хлористым алюминием слишком медленно, чтобы его можно было использовать как исходное вещество в синтезе.

Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозилхлорид в полярных растворителях очень быстро сольватируется [6] и реагирует со следами воды в хлороформе [5]. Реакция со спиртами в присутствии карбоната серебра или пиридина приводит к производным ортоацетатов, содержащих 2-О-ацетильную группу [4, 7]. В условиях, строго исключающих присутствие влаги, чистое сухое вещество устойчиво в течение нескольких недель.

## МЕТОДИКА

20 г пентаацетата  $\beta$ -D-глюкопиранозы (см. стр. 115) растворяют в 100 мл чистого сухого хлороформа<sup>1</sup>. К раствору прибавляют 3,6 г размель-

<sup>1</sup> Хлороформ следует готовить непосредственно перед использованием. Удобная методика приготовления чистого хлороформа состоит в пятикратном промывании водой продажного растворителя с последующим высушиванием над хлористым кальцием.

ченного безводного хлористого алюминия и встряхивают смесь 30 мин при комнатной температуре. К смеси прибавляют 200 мл бензола и затем 5 г сухой кремневой кислоты. Осадок отфильтровывают и промывают 25 мл бензола.

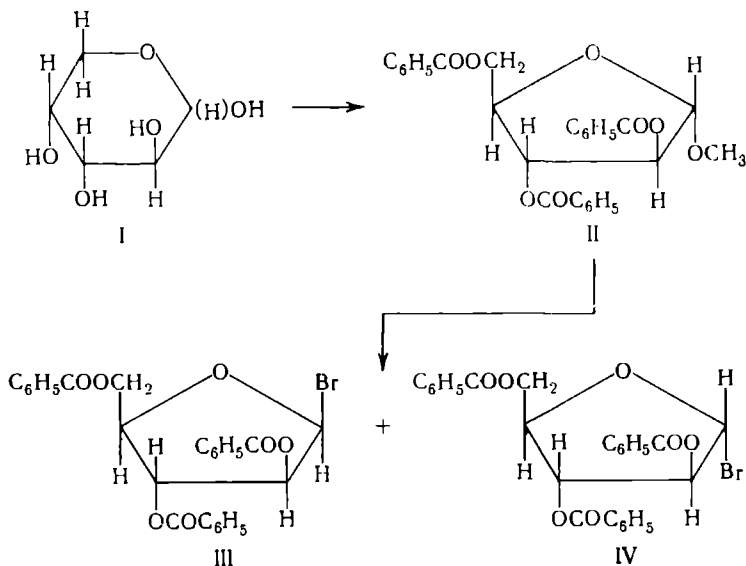
Фильтрат выливают в 50 мл воды, охлажденной до 0°, находящейся в делительной воронке емкостью 500 мл. Смесь встряхивают, органический слой фильтруют через бумагу, смоченную бензолом, и сразу упаривают в вакууме. Сиропообразный остаток растворяют в 50 мл абсолютного эфира, к раствору прибавляют 25 мл сухого петролейного эфира до появления опалесценции и вносят затравку<sup>1</sup>. Белый кристаллический тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилхлорид отфильтровывают, промывают петролейным эфиром и высушивают в вакууме над пятиокисью фосфора и плавленым едким натром. Выход неочищенного вещества 17 г (90%), т. пл. 82—84°. Перекристаллизация из того же количества эфира с петролейным эфиром дает 12 г продукта с т. пл. 93—95°,  $[\alpha]_D -6^\circ$  (с 3,6 в хлороформе). Температура плавления чистого тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилхлорида 99—100°,  $[\alpha]_D -13^\circ$  (с 1 в хлороформе).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schlubach H. H., Ber., **59**, 840 (1926).
2. Schlubach H. H., Stadler P., Wolf I., Ber., **61**, 287 (1928).
3. Lemieux R. U., Brice C., Can. J. Chem., **30**, 295 (1952).
4. Lemieux R. U., Brice C., Can. J. Chem., **33**, 109 (1955).
5. Korytnyk W., Mills J. A., J. Chem. Soc., **1959**, 636.
6. Mattok G. L., Phillips G. O., J. Chem. Soc., **1958**, 130.
7. Lemieux R. U., Ciperia J. D. T., Can. J. Chem., **34**, 906 (1956).

## Аномерные три-О-бензоил-D-арабинофуранозилбромиды

Х. Г. Флетчер, мл.



<sup>1</sup> Для получения кристаллической затравки сиропообразный продукт растирают в холодной воде.

## ВВЕДЕНИЕ

Химии ацилированных гликофуранозилгалогенозов уделялось сравнительно мало внимания, поскольку соединения этого класса менее доступны и менее устойчивы, чем хорошо изученные ацелированные гликопиранозилгалогенозы [1]. Всего несколько соединений было получено в чистой кристаллической форме, а пара кристаллических аномеров этого класса была получена только в 1958 г. [2]. Ниже приводится синтез этих двух аномеров три-О-бензоил-*D*-арабинофуранозилбромидов. *D*-Арабиноза, как и большинство свободных моносахаридов, существует в пиранозной форме. Однако при обработке абсолютным метанолом в слабокислой среде альдозы превращаются в метилгликофуранозиды много быстрее, чем в соответствующие метилгликопиранозиды. Если реакцию останавливают, убирая кислоту, то как только исчезнет восстанавливающая способность сахара, образуется смесь, более или менее обогащенная метилгликофуранозидами. Во многих случаях эта реакция представляет самый простой путь синтеза фуранозных производных, поскольку после ацилирования гидроксильных групп метоксильная группа в гликозиде легко замещается на атом галогена, как показано ниже, и полученную ацилированную гликофуранозилгалогенозу можно использовать в самых различных синтезах.

## МЕТОДИКА [2]

*Трибензоат  $\alpha$ -метил-*D*-арабинофуранозида (II)*

Смесь 10,0 г *D*-арабинозы (I), 200 мл абсолютного метанола и 63 мл 1,06 н. раствора хлористого водорода в метаноле<sup>1</sup> перемешивают при комнатной температуре до полного растворения. Раствор оставляют при комнатной температуре, через каждые 15 мин отбирают аликвотные пробы по 0,5 мл и обрабатывают их в стандартных условиях реактивом Фелинга. Визуальный контроль за серией таких проб легко позволяет определить исчезновение восстанавливающей способности раствора. В данном случае реакция длится обычно 3,75 час. Реакцию останавливают, прибавляя 37 мл сухого пиридина (см. стр. 115). Растворитель упаривают в вакууме (температура бани 70°), полученный сиропобразный остаток разбавляют 30 мл сухого пиридина. В результате повторного упаривания растворителя в вакууме (температура бани 70°) полностью удаляется метанол. К остатку прибавляют 75 мл сухого пиридина и охлаждают полученный раствор в бане со льдом. К раствору прибавляют по каплям 31 мл хлористого бензоила (4,01 экв) и выдерживают смесь 1 час при 0°. Для завершения реакции смесь нагревают 25 мин при 55°, после чего разрушают избыток хлористого бензоила, прибавляя 1,5 мл воды. К смеси приливают хлористый метилен. Полученный раствор последовательно промывают водой, холодной 3 н. серной кислотой и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Раствор высушивают над гранулированным безводным сульфатом натрия и упаривают в вакууме; сиропобразный остаток растворяют в 100 мл теплого абсолютного спирта. При охлаждении раствора выделяется 15,7 г (50%) кристаллического продукта, т. пл. 100—102° (испр.). К маточному раствору прибавляют пентан и получают еще 0,98 г (3,1%) почти столь же чистого продукта. После двух кристаллизаций из абсолютного спирта трибензоат  $\alpha$ -метил-*D*-арабино-

<sup>1</sup> Метанол в заметной степени реагирует с хлористым водородом с образованием хлористого метила [3, 4], поэтому лучше использовать свежеприготовленные растворы.

фуранозиды имеет т. пл.  $101-103^\circ$  (испр.),  $[\alpha]_D^{20} -19,5^\circ$  (с 2,67 в хлороформе). Райт и Кхорана [5], получившие это соединение по аналогичной методике, приводят т. пл.  $100-101,5^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} -19,1^\circ$  (с 2,05 в хлороформе).

**Три-О-бензоил- $\alpha$ -D-арабинофуранозилбромид (IV)  
и три-О-бензоил- $\beta$ -D-арабинофуранозилбромид (III)**

К раствору 10,0 г трибензоата  $\alpha$ -метил-D-арабинофуранозиды в 50 мл ледяной уксусной кислоты прибавляют 50 мл 32%-ного (по весу) раствора бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте. Смесь выдерживают 20 мин при комнатной температуре, разбавляют 300 мл хлористого метилена и выливают в 1 л воды со льдом. Органический слой быстро промывают холодным насыщенным раствором бикарбоната натрия в воде, высушивают над гранулированным безводным сульфатом натрия и упаривают в вакууме (температура бани  $40^\circ$ ). Полученный сироп растворяют в 50 мл абсолютного эфира, выдерживают 4 час при комнатной температуре и получают 4,2 г кристаллического продукта с т. пл.  $103-105^\circ$  (испр.). Его перекристаллизовывают при комнатной температуре из 75 мл смеси эфир — пентан (2 : 1 по объему) и получают чистый три-О-бензоил- $\alpha$ -D-арабинофуранозилбромид (IV) в виде призм; выход 4,0 г (36%), т. пл.  $103-104^\circ$  (испр.),  $[\alpha]_D^{20} +85^\circ$  (с 1,15 в сухом хлористом метиле).

К маточному раствору, из которого была получена первая порция  $\alpha$ -D-аномера, прибавляют 35 мл пентана и через 2 час получают еще 2,5 г несколько менее чистого  $\alpha$ -D-аномера, т. пл.  $102-103^\circ$  (испр.). При охлаждении фильтрата до  $-5^\circ$  из него кристаллизуется в виде тонких игл три-О-бензоил- $\beta$ -D-арабинофуранозилбромид (1,6 г), т. пл.  $94-98^\circ$  (испр.). Чистый три-О-бензоил- $\beta$ -D-арабинофуранозилбромид (III) получают с большими потерями после двух перекристаллизаций из эфира; выход 0,24 г (2%), т. пл.  $130-132^\circ$  (испр.),  $[\alpha]_D^{20} -138^\circ$  (с 0,88 в сухом хлористом метиле).

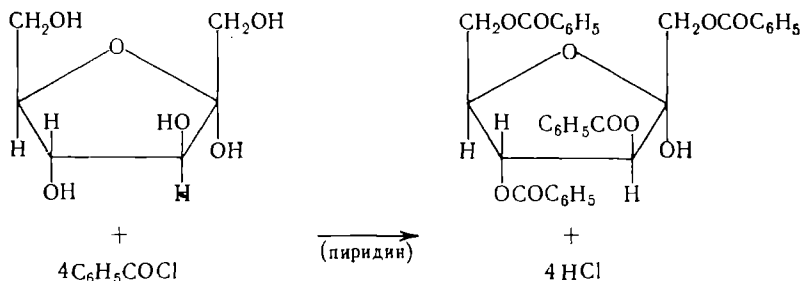
### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Haynes L. J., Newth F. H., *Advances in Carbohydrate Chem.*, **10**, 207 (1955).
2. Ness R. K., Fletcher H. G., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2007 (1958).
3. Carter S. R., Butler J. A. V., *J. Chem. Soc.*, **125**, 963 (1924).
4. Hinshelwood C. M., *J. Chem. Soc.*, **1935**, 599.
5. Wright R. S., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1994 (1958).

## 1,3,4,6-Тетрабензоат D-фруктофуранозы

Прямое бензоилирование D-фруктозы

Дж. В. Ван Клив



## ВВЕДЕНИЕ

1,3,4,6-Тетрабензоат D-фруктофуранозы является удобным промежуточным соединением для синтеза производных D-фруктофуранозы; его легко получают с высоким выходом при непосредственном бензоилировании D-фруктозы в пиридине [1].

Ниже приводится улучшенная методика Бригля и Шинле [2], в которую внесены два существенных изменения: а) температура реакционной смеси поддерживается в интервале 60—65° и б) хлористый водород полностью удаляется из неочищенного продукта до его перекристаллизации из спирта. Если не вносить в методику этих изменений, выход продукта снижается.

## МЕТОДИКА

В двухгорлую круглодонную колбу емкостью 1 л помещают 18 г (0,1 моля) D-фруктозы и прибавляют 300 мл безводного пиридина (см. стр. 91, 115, 130, 152). Одно горло колбы закрывают пробкой, через которую пропущен термометр, погруженный в жидкость, причем участок шкалы термометра, соответствующий температурам 60—70°, должен быть хорошо виден через стекло колбы. В другое горло колбы помещают осушительную хлоркальциевую трубку. Временно отсоединяя хлоркальциевую трубку, к смеси прибавляют 58 мл (0,5 моля) хлористого бензоила следующим образом: одну треть прибавляют в один прием и перемешивают содержимое, встряхивая колбу; оставшиеся две трети прибавляют порциями при энергичном встряхивании и с такой скоростью, чтобы температура реакционной смеси удерживалась в интервале 60—65° без применения внешнего охлаждения<sup>1</sup>. После окончания дозирования (на это требуется обычно 10—15 мин) смесь выдерживают 15 мин, а затем выливают тонкой струей при энергичном перемешивании в 1,5 л кашицы льда с водой, в которой растворено 42 г (0,5 моля) бикарбоната натрия. Образовавшееся нерастворимое масло после перемешивания в течение часа прекращает выделять пузырьки углекислого газа.

Надосадочную жидкость декантируют и растворяют оставшееся масло в 500 мл хлороформа. Хлороформный раствор встряхивают с 250 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия и затем с равным объемом воды, после чего упаривают в вакууме (температура бани 55°) в колбе, в которую добавлено 150 мл воды<sup>2</sup>. Полученный свободный от воды сироп растворяют в 25 мл 95%-ного спирта и выдерживают 1—2 дня при комнатной температуре, после чего кристаллизация обычно заканчивается.

Кристаллический осадок тщательно растирают в 100 мл 95%-ного спирта, фильтруют, промывают 100 мл спирта и высушивают на фильтре отсасыванием; выход 37—40 г. Чистый тетрабензоат получают при перекристаллизации продукта из 200 мл горячего 95%-ного спирта. Выход 25 г (59%), т. пл. 122—123°,  $[\alpha]_D^{25}$  —4° (30 мин) —13° (равновесие; с 2,4 в хлороформе).

<sup>1</sup> Чтобы проводить синтез по этой методике, требуется некоторая практика. Если температура реакционной смеси по какой-либо причине превысит 65°, колбу необходимо немедленно охладить холодной водой. Быстрое неконтролируемое прибавление хлористого бензоила вызывает энергичное разогревание и осмоление смеси и приводит к низкому выходу тетрабензоата.

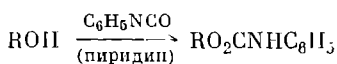
<sup>2</sup> Воду используют для удаления оставшегося пиридина (азеотропная перегонка), который препятствует кристаллизации продукта.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Brigl P., Schinle R., Ber., 67, 754 (1934).
2. Brigl P., Schinle R., Ber., 67, 427 (1934).

## Карбанилаты

В. М. Хирон



## ВВЕДЕНИЕ

Карбанилаты углеводов представляют большой интерес, поскольку они, как правило, легко образуются, имеют высокие температуры плавления, нерастворимы в воде, легко кристаллизуются и устойчивы в условиях кислотного гидролиза. Впервые карбанилаты производных углеводов были получены в 1885 г. Тессмером [1]. К настоящему времени описаны уже многие другие такого рода производные как моно-, так и полисахаридов [2—41]. Карбанилатная группа практически не гидролизуетсЯ при действии кислот и медленно и неполностью — щелочами [12]. Снятие карбанилатной группы легко происходит под действием метилата натрия в метаноле [13].

Алифатические изоцианаты мало пригодны для получения производных в ряду сахаров, поскольку они реагируют медленно и неполностью. Ароматические изоцианаты, как правило, реагируют быстро, хотя скорость реакции зависит от заместителя в бензольном кольце [15]. Значительная часть карбаматов, полученных из производных углеводов, является незамещенными карбанилатами.

## МЕТОДИКА

Изоцианаты легко гидролизуются до соответствующего амина (и двуокиси углерода), который в свою очередь быстро реагирует с исходным изоцианатом с образованием симметричной мочевины. Эта побочная реакция с водой весьма нежелательна, так как она приводит к потере реагента (1 г воды связывает 13 г фенилизотиоцианата) и к образованию трудно удалимых примесей. Вследствие этого необходимо с максимальным вниманием высушить все исходные вещества, растворители и посуду, чтобы исключить возможность появления влаги в реакционной смеси.

Для получения карбанилатов пригоден любой растворитель, если он не реагирует с изоцианатом; в качестве катализатора используется пиридин в небольшом количестве (или другие третичные амины). Однако наиболее подходящим растворителем оказался пиридин, который одновременно служит и катализатором. Безводный пиридин легко можно получить перегонкой на колонке в 20 тарелок. При обработке безводного пиридина 1-нафтилизотиоцианатом не должен выпадать осадок 1,3-бис-(1-нафтил)мочевины; эта простая проба используется для проверки надежности растворителя (см. [14], примечание 5).

**2,3,4-Три-О-ацетил-6-карбамил-α-метил-β-глюкопиранозид [16]**

50 г (0,156 моля) 2,3,4-три-О-ацетил-α-метил-β-глюкопиранозид [17—19] высушивают 2 час при 90° и растворяют в 40 мл сухого пиридина в сухой колбе с обратным холодильником и осушительной трубкой. К полученному раствору прибавляют 24 г (0,234 моля) фенилизоцианата. Смесь самопроизвольно разогревается, после чего ее нагревают 1 час при 100°, охлаждают, для удаления избытка изоцианата разбавляют 30 мл метанола и нагревают еще 10 мин. После охлаждения смесь выливают в холодную воду, перемешивают до образования полутвердой массы и декантируют. Полученный продукт дважды перекристаллизовывают из горячего метанола; выход 46 г (84%), т. пл. 147—148°,  $[\alpha]_D^{25} +145^\circ$  (с 1 в хлороформе).

**Тетракарбанилат α-метил-β-глюкопиранозид [4]**

5,0 г (26 ммоль) α-метил-β-глюкопиранозид, предварительно высушенного над пятиокисью фосфора в вакуум-эксикаторе (см. стр. 169), растворяют в 30 мл безводного пиридина в двухгорлой круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником и осушительной трубкой. После того как раствор охладится до комнатной температуры, к нему прибавляют 12,5 мл (117 ммоль) фенилизоцианата. Реакция начинается моментально и сопровождается значительным разогреванием. Раствор кипятят 3 час и охлаждают до комнатной температуры. Пиридин отгоняют в вакууме, аморфный остаток промывают несколько раз теплым эфиром; выход 11,5 г. Продукт растворяют при нагревании в смеси спирт-ацетон (2 : 1 по объему), большую часть ацетона удаляют отгонкой, к полученному горячему спиртовому раствору прибавляют воду до помутнения. При стоянии раствора при комнатной температуре выкристаллизовывается тетракарбанилат α-метил-β-глюкопиранозид, который отфильтровывают. Маточный раствор концентрируют и получают дополнительную порцию продукта примерно той же степени чистоты; общий выход 8 г, т. пл. 210—214° (с разл.). Чистый продукт удается получить после нескольких перекристаллизаций, т. пл. 227° (с разл.),  $[\alpha]_D^{25} +73^\circ$  (с 3 в ацетоне).

**ЛИТЕРАТУРА**

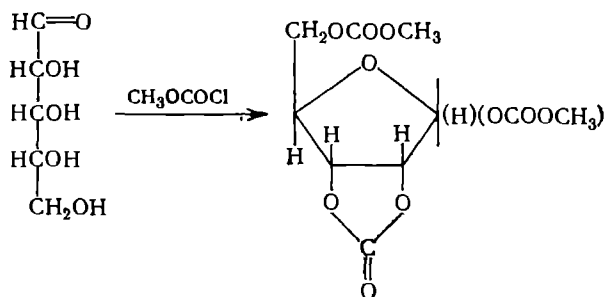
1. Tessmer H., Ber., **18**, 968 (1885).
2. Maquenne L., Goodwin W., Bull. soc. chim., [3] **3**, 430 (1904).
3. Jolles E., Bottrini M., Gazz. chim. ital., **65**, 1217 (1935).
4. Wolfrom M. L., Fletcher D. E., J. Am. Chem. Soc., **62**, 1151 (1940).
5. Wolff I. A., Rist C. E., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2779 (1948).
6. Wolff I. A., Rist C. E., J. Am. Chem. Soc., **70**, 3961 (1948).
7. Reeves R. E., J. Am. Chem. Soc., **70**, 259 (1948).
8. Wolff I. A., Watson P. R., Rist C. E., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3061 (1952).
9. Hodge J. E., пат. США 2637727 (1953); Chem. Abstracts, **48**, 2121 (1954).
10. Gerbaux I. R., Compt. rend. 27-me Congr. intern. chim. ind., Brussels, 1954, 3; Industrie chim. belge, **20**, Spec. No. 1, 392 (1955).
11. Gerbaux I. R., Bull. soc. chim. Belges, **65**, 270 (1956).

12. Hearon W. M., Hiatt G. D., Fordyce C. R., J. Am. Chem. Soc., **65**, 833 (1943).
13. Salmon M. R., Powell G., J. Am. Chem. Soc., **61**, 3507 (1939).
14. Hearon W. M., Hiatt G. D., Fordyce C. R., J. Am. Chem. Soc., **65**, 829 (1943).
15. Hearon W. M., Lobsitz J. L., J. Am. Chem. Soc., **70**, 296 (1948).
16. Hearon W. M., Hiatt G. D., Fordyce C. R., J. Am. Chem. Soc., **66**, 995 (1944).
17. Helferich B., Klein W., Schäfer W., Ber., **59**, 81 (1926).
18. Helferich B., Schneidmüller A., Ber., **60**, 2002 (1927).
19. Helferich B., Bredereck H., Schneidmüller A., Ann., **458**, 111 (1927).

## Карбонаты

### 2,3-Карбонаты аномерных 1,5-ди-О-метоксикарбонил-Д-рибофураноз

Г. Р. Баркер



## ВВЕДЕНИЕ

Для получения карбонатов (эфиров угольной кислоты) сахаров разработан ряд методов, которые подробно рассмотрены в обзоре [1]. Два основных метода, обычно используемых для получения карбонатов, основаны на взаимодействии сахара с фосгеном или с хлоругольным эфиром соответственно. В случае применения фосгена гидроксильные группы, не входящие в состав *цис*-гликольной системы, необходимо защитить, чтобы избежать образования полимерных продуктов [2]. Реакция сахаров с хлоругольными эфирами в пиридине приводит к образованию как алкоксикарбонильных производных, так и циклических карбонатов, но если конденсация проводится в присутствии водной щелочи, *цис*-гликольные группы реагируют обычно с образованием циклических карбонатов, тогда как изолированные гидроксильные группы замещаются на алкоксикарбонильные остатки. Этот метод исключает необходимость введения избирательных защитных группировок. В тех случаях, когда необходимо получить циклический карбонат без ациклических алкоксикарбонильных остатков в молекуле, реакцию проводят с бензилхлоругольным эфиром с последующим удалением бензилоксикарбонильной группы каталитическим гидрированием [3]. В других случаях наиболее удобным реагентом является метилхлоругольный эфир. Сахара с О-мет-



оксикарбонильными остатками при C-1 с помощью обычных методов легко можно превратить в гликозилгалогенозы. Применяя метилхлоругольный эфир, можно получить, в частности, ценные соединения в ряду пентоз, которые используются для синтеза пентозилгалогенозов в фуранозной форме. 2,3-Карбонат 1,5-ди-О-метоксикарбонил-D-рибозы — типичное производное, используемое для этой цели [4], его легко можно получить по приведенной ниже методике. Реакцию с бензилхлоругольным эфиром проводят по этой же методике.

### МЕТОДИКА

Реакцию следует проводить в хорошем вытяжном шкафу. К раствору 3 г D-рибозы в 25 мл воды прибавляют 10 мл метилхлоругольного эфира (используется продажный реагент без дополнительной очистки), смесь помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и охлаждают до 0°. При энергичном механическом перемешивании к смеси прибавляют из бюретки 2 н. раствор едкого натра с такой скоростью, чтобы удавалось поддерживать температуру между 0 и 1°, причем раствор должен быть нейтральным по лакмусовой бумаге. Очень важно, чтобы охлаждение было хорошим, поскольку оно в значительной мере определяет скорость реакции, которую следует закончить примерно за 1 час. Особенно внимательно необходимо следить за температурой на первой стадии прибавления щелочи. Поскольку во время реакции выпадает вязкий твердый осадок, лучше использовать термометр с длинным столбиком. Перед завершением реакции контроль за температурой осуществляется сравнительно просто, поэтому больше внимания надо уделить пробам на лакмусовую бумагу, которые надо делать часто. Реакция считается законченной, когда после прибавления 45 мл 2 н. едкого натра раствор становится и остается щелочным по лакмусу. Осадок (около 5 г) быстро отфильтровывают с отсасыванием и растворяют в 25 мл горячего этилацетата. Раствор фильтруют через складчатый фильтр и оставляют остывать. На следующий день продукт (смесь  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров) отфильтровывают и высушивают. В ряде случаев на дальнейших стадиях используют смесь изомеров, но при необходимости их можно разделить, как описано ниже. Полученный продукт (5 г) растворяют в 20 мл горячего этилацетата, раствор фильтруют и осторожно охлаждают. Через 1—2 час выпадают кристаллы в виде коротких широких призм. Раствор часто рассматривают через ручную линзу и моментально отфильтровывают, как только появятся игольчатые кристаллы. После окончания кристаллизации эти кристаллы также отфильтровывают. Обе фракции кристаллизуют из этилацетата и получают 2,3-карбонат 1,5-ди-О-метоксикарбонил- $\beta$ -D-рибозы в виде призм и 2,3-карбонат 1,5-ди-О-метоксикарбонил- $\alpha$ -D-рибозы в виде игл, собранных в дружки. Выход  $\beta$ -аномера 1,5 г, т. пл. 180°,  $[\alpha]_D^{25}$  —152° (в хлороформе), выход  $\alpha$ -аномера 1,5 г, т. пл. 162°,  $[\alpha]_D^{25}$  —76° (в хлороформе).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Hough L., Priddle J. E., Theobald R. S., *Advances in Carbohydrate Chem.*, 15, 91 (1960).
2. Tener G. M., Wright R. S., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 506 (1956).

3. Barker G. R., Gillam I. C., Lord P. A., Douglas T., Spoors J. W., J. Chem. Soc., 1960, 3885.
4. Barker G. R., Gillam I. C., Spoors J. W., Chem. and Ind. (London), 1312 (1956).

## Сульфонаты

### 6-О-Мезил- и 6-О-тозилглюкопиранозиды

**Ф. Д. Крамер**

### ВВЕДЕНИЕ

В реакциях ацилирования и алкилирования первичная гидроксильная группа (С-6) в гексозах более реакционноспособна по сравнению с гидроксильными группами при С-2, С-3 и С-4. Так, например, если гликозидный гидроксил защищен, то при использовании 1,1 моля сульфонилхлорида можно ввести тозилльную или мезильную группу исключительно к первичной гидроксильной группе при С-6. Однако 6-О-тозил-D-глюкозу не удается выделить непосредственно, поэтому ее идентифицируют в виде тетраацетата [1, 2]. 6-О-Тозил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид можно получить по следующей схеме: 6-О-трифенилметил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид  $\rightarrow$  2,3,4-три-О-ацетил-6-О-трифенилметил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид  $\rightarrow$  2,3,4-три-О-ацетил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид  $\rightarrow$  2,3,4-три-О-ацетил-6-О-тозил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид  $\rightarrow$  6-О-тозил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид [3].

Однако приведенный ниже метод предусматривает прямое сульфонилирование  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид, который приводит к 6-О-тозил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозиду с выходом 55%. Аналогично могут быть получены 6-О-тозил- $\beta$ -бензил-D-глюкопиранозид (выход 65%) и 6-О-мезил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид [4].

### МЕТОДИКА

#### 6-О-Тозил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид

К раствору 20 г  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (см. стр. 169) в 180 мл сухого пиридина (стр. 91, 115, 130, 152) прибавляют в течение 20 мин при 0° и перемешивании раствор 21 г *n*-толуолсульфохлорида в 50 мл сухого пиридина. Смесь выдерживают 2 дня при 20°, после чего упаривают в вакууме при 40° (температура бани). Полученный остаток растворяют в хлороформе, хлороформный раствор промывают раствором бисульфата калия, затем раствором бикарбоната калия и высушивают. Полученный после упаривания хлороформа сироп (30 г) растворяют при нагревании с обратным холодильником в 260 мл бензола. По мере охлаждения раствор затвердевает в желеобразную пасту, которую отфильтровывают с отсасыванием и помещают в эксикатор над парафиновыми стружками. Выделенный продукт растворяют в 37 частях воды, раствор обрабатывают 10 мин активированным углем, фильтруют при 55°, охлаждают

и оставляют кристаллизоваться при 4°. Выход 22 г (55%), т. пл. 56—58° (гидрат) и 124° (безводный),  $[\alpha]_D^{20} +98,5^\circ$  (с 1,3 в спирте). Вещество хорошо растворимо в спирте, диоксане, ацетоне и уксусной кислоте, слабо растворимо в воде, бензоле, хлороформе и этилацетате.

### **2,3,4-Три-О-ацетил-6-О-мезил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид**

К охлажденному до  $-20^\circ$  раствору 12,0 г  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (см. стр. 169) в 100 мл сухого пиридина (см. стр. 91, 115, 130, 152) медленно при перемешивании прибавляют 5,0 мл метансульфохлорида, поддерживая указанную температуру. Смесь выдерживают 24 час при 0° и 24 час при 20°, после чего упаривают в вакууме при 40°. Сиропообразный остаток дважды растворяют в *n*-пропанолем и упаривают при 50° в вакууме. Полученный сухой сироп растворяют в пиридине и ацетилируют 24 мл уксусного ангидрида при 20° в течение 24 час. Упариванием в вакууме удаляют растворитель, сиропообразный остаток растворяют в хлороформе. Хлороформный раствор промывают растворами бисульфата калия и бикарбоната натрия, высушивают, хлороформ отгоняют и полученный совершенно сухой сироп растворяют при нагревании в равном объеме абсолютного метанола. При охлаждении и потирании стеклянной палочкой выкристаллизовывается 2,3,4-три-О-ацетил-6-О-мезил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид; выход 16,5 г (67%), т. пл. 113°.

### **6-О-Тозил- $\beta$ -бензил-D-глюкопиранозид**

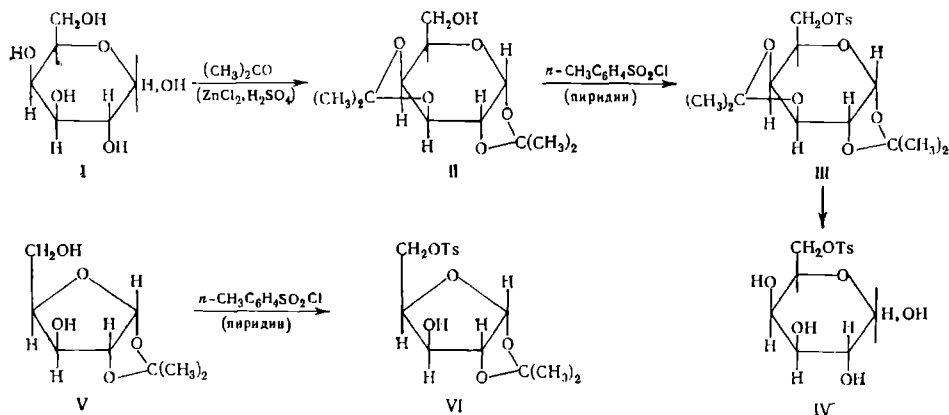
Раствор 31,5 г  $\beta$ -бензил-D-глюкопиранозид [5] в 400 мл сухого пиридина (см. стр. 91, 115, 130, 152) смешивают при  $-15^\circ$  с раствором 24,6 г *p*-толуолсульфохлорида в 80 мл пиридина. Реакционную смесь выдерживают 30 мин при  $-15^\circ$  и 12 час при 20°, пиридин отгоняют в вакууме при 40°. Остаток растворяют в хлороформе, хлороформный раствор промывают и высушивают, как описано выше. Поскольку раствор имеет склонность образовывать гель, все операции следует проводить при 50°. Полученный после упаривания хлороформа сухой порошок растворяют при нагревании в 1,9 л толуола и оставляют кристаллизоваться; выход 32 г (65%). Для перекристаллизации из воды на каждые 5 г вещества следует брать 1 л воды. Вещество выкристаллизовывается в виде гидрата, который теряет 2 молекулы кристаллизационной воды при 50° в вакууме; т. пл. 116—117° (с разл.),  $[\alpha]_D^{20} -38^\circ$  (в ацетоне).

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Hardegger F., Montavon R. M., *Helv. Chim. Acta*, **29**, 1199 (1946).
2. Helferich B., Gnüchtel A., *Ber.*, **71**, 712 (1938).
3. Helferich B., Himmen E., *Ber.*, **61**, 1834 (1928); Haworth W. N., Owen L. N., Smith F., *J. Chem. Soc.*, 1941, 97.
4. Cramer F., Otterbach H., Springmann H., *Chem. Ber.*, **92**, 384 (1959).
5. Slotta K. H., Heller H., *Ber.*, **63**, 1024 (1930).

Тозилаты<sup>1</sup>

Р. С. Тинсон



## ВВЕДЕНИЕ

Исчерпывающее сульфонилирование, при проведении которого используется небольшой избыток сульфонилирующего агента, применяется в том случае, когда все гидроксильные группы в производном сахара должны быть замещены; такая методика была впервые описана Оде́ном [1]. Те гидроксильные группы, которые не должны вступать в реакцию, предварительно блокируют подходящей защитной группировкой [2]. В качестве примера ниже описано получение [3] типичного сульфоната (IV). Промежуточные соединения II и III были впервые описаны Фриденбергом и Хиксоном [4]; многие исследователи пытались повысить скорость реакции и улучшить выходы. Приведенные в этом разделе методы получения соединений II и III были предложены Раймондом и Шредером [5].

Моносульфонилирование, которое протекает по наиболее реакционноспособной гидроксильной группе, осуществляется даже в том случае, когда остальные (менее реакционноспособные) гидроксильные группы остаются незащищенными (см. стр. 134). Если в соединении две из гидроксильных групп более реакционноспособны, чем все остальные, то аналогичным образом можно провести дисульфонилирование. Методика моносульфонилирования была впервые предложена Оле и Дикхейзером [6], в настоящее время она значительно улучшена. Приведенная ниже методика получения соединения VI была в основном разработана Левином и Раймондом [7].

## МЕТОДИКА

1,2;3,4-Ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопираноза (II)

В колбе Эрленмейера емкостью 500 мл, снабженной магнитной мешалкой, цилиндрический стержень которой покрыт тефлоном, быстро взвешивают 21,6 г безводного хлористого цинка, прибавляют 225 мл

<sup>1</sup> О получении мезилатов сахаров см. стр. 134.

ацетона, колбу закрывают и перемешивают суспензию магнитной мешалкой до растворения хлористого цинка. Незначительное количество гидроокиси цинка, которая обычно присутствует, остается в виде суспензии. К смеси быстро прибавляют из пипетки по каплям 0,72 мл концентрированной серной кислоты, следя за тем, чтобы кислота не попадала на стенку колбы; гидроокись цинка при этом переходит в раствор. К раствору быстро прибавляют 18 г (0,1 моля) тонко измельченной безводной D-галактозы (I). Колбу закрывают и смесь перемешивают магнитной мешалкой 4 час, затем прибавляют порциями суспензию 36 г безводного карбоната натрия в 63 мл воды (осторожно, но как можно быстрее). Смесь перемешивают сначала медленно, затем энергично, пока в надосадочной жидкости не останется ионов цинка. Полученную суспензию фильтруют с отсасыванием, осадок промывают несколько раз, взбалтывая с ацетоном и отфильтровывая. Фильтраты объединяют и упаривают ацетон в вакууме, при этом продукт реакции отделяется в виде маслянистого верхнего слоя. Смесь экстрагируют 3 раза эфиром, эфирные экстракты объединяют, высушивают над сульфатом натрия и фильтруют, осушитель промывают сухим эфиром. Фильтрат и промывной эфир объединяют и упаривают в вакууме (температура бани 30°). Диизопропилиденное производное освобождают от продуктов конденсации ацетона при 0,05 мм (т. бани 100°); выход неочищенного сиропообразного продукта 23,4 г (89,9%). Вещество очищают перегонкой в вакууме, т. кип. 131—135°/0,2 мм,  $[\alpha]_D^{20}$  —53° (с 4,4 в тетрахлорэтано) [8],  $[\alpha]_D^{20}$  —55° (с 3,6 в хлороформе) [9].

### 1,2;3,4-Ди-О-изопропилиден-6-О-тозил- $\alpha$ -D-галактопираноза (III)

26 г (0,1 моля) перегнанной 1,2;3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопиранозы (II) переносят с помощью пипетки в колбу Эрленмейера емкостью 250 мл, прибавляют 27,5 мл безводного ацетона и 17,5 мл безводного пиридина (см. стр. 91, 115, 130, 152), колбу закрывают и перемешивают на магнитной мешалке, железный стержень которой покрыт тефлоном, до растворения ацетата. Полученный раствор охлаждают холодной водой, колбу закрывают пробкой, через которую пропущен термометр, и при перемешивании прибавляют порциями в течение 1 час 22,8 г (0,12 моля) *n*-толуолсульфохлорида<sup>1</sup>, выдерживая температуру смеси 45°<sup>2</sup>. Смесь оставляют в закрытой колбе на ночь при комнатной температуре, затем охлаждают смесью льда с солью до 0° и прибавляют порциями 10 мл воды (1 + 1 + 1 + 2 + 5 мл) [11] при перемешивании и охлаждении с интервалами 5 мин, так чтобы температура не превышала 5°. Раствор выливают в 250 мл холодной воды, при этом отделяется сироп, который при перемешивании вскоре закристаллизовывается<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> *n*-Толуолсульфохлорид удобно очищать по методу Пеллетье [10].

<sup>2</sup> При сульфонилровании некоторых производных температура должна быть 0°.

<sup>3</sup> При получении некоторых сульфатов кристаллизация на этой стадии не происходит. В таком случае смесь экстрагируют три раза хлористым метиленом (или хлороформом), объединенные экстракты промывают последовательно: а) достаточно концентрированным холодным раствором бисульфата калия (или охлажденной в ледяной бане разбавленной серной кислотой) до удаления пиридина, б) дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод по конго красному, в) насыщенным раствором бикарбоната натрия до щелочной реакции промывных вод по красной лакмусовой бумаге и г) дистиллированной водой. Полученный раствор высушивают безводным сульфатом натрия и упаривают досуха.

Кристаллический осадок отфильтровывают, промывают водой до удаления пиридина (до отсутствия запаха) и высушивают в вакуум-эксикаторе до постоянного веса; выход 36 г (86,9%). Для перекристаллизации продукт растворяют в 36 мл горячего пропанола, раствор охлаждают до комнатной температуры, вносят кристаллическую затравку и перемешивают до начала кристаллизации. Затем к раствору постепенно прибавляют при перемешивании равный объем гексана, кристаллический осадок отфильтровывают, промывают гексаном и высушивают в вакуум-эксикаторе до постоянного веса. Выход 27,5 г (66%), т. пл. 87—89°; литературные данные: т. пл. 89—91° [12, 13], 91—92° [4], 102—103° [14], 104—105° [3],  $[\alpha]_D -63^\circ$  (в хлороформе),  $-54,5^\circ$  (в ацетоне) [13]. Полученный продукт вполне пригоден для превращения в соответствующее 6-иод-6-дезоксипроизводное; в случае необходимости его можно очистить перекристаллизацией до постоянной температуры плавления.

### **Аномеры 6-О-тозил- $\beta$ -галактозы (IV) [3]**

1,2;3,4-Ди-О-изопропилиден-6-О-тозил- $\alpha$ - $\beta$ -галактопиранозу (III) (20,7 г, 0,05 моля) взвешивают в круглодонной колбе емкостью 500 мл, прибавляют 130 мл ледяной уксусной кислоты и 130 мл 50%-ной уксусной кислоты. Полученный раствор 2 час нагревают с обратным холодильником на паровой бане, охлаждают до комнатной температуры и упаривают в вакууме (температура бани 25°) до начала кристаллизации 6-О-тозил- $\beta$ -галактозы (IV). Образовавшуюся суспензию фильтруют с отсасыванием, кристаллы хорошо отжимают от маточного раствора и высушивают до постоянного веса в вакуум-эксикаторе (эксикатор должен находиться в защитном чехле) в высоком вакууме над чашками с натронной известью и пятиокисью фосфора; выход 11,4 г (68%), т. пл. 130° (с разл.). Выделенное вещество (тонкие бесцветные иглы) представляет собой  $\beta$ -аномер;  $[\alpha]_D^{20} +14,5^\circ \rightarrow [\alpha]_D^{25} +32^\circ$  (с 1,7 в пиридине). При перекристаллизации из абсолютного спирта получают уже  $\alpha$ -аномер, который кристаллизуется в виде листочков; соединение содержит 1 молекулу кристаллизационного спирта, т. пл. 125° (с разл.),  $[\alpha]_D^{20} +32^\circ$  (в расчете на сахар, свободный от спирта, с 1,3 в пиридине). Перекристаллизация  $\alpha$ -аномера из воды приводит к  $\beta$ -аномеру.

### **1,2-О-Изопропилиден-5-О-тозил- $\alpha$ - $\beta$ -ксилофураноза (VI) [7]**

К 19 г (0,1 моля) 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ - $\beta$ -ксилофуранозы (V) в трехгорлой круглодонной колбе объемом 250 мл, снабженной капельной воронкой емкостью 75 мл, механической мешалкой и пентановым термометром (от  $-50$  до  $+50^\circ$ ), быстро прибавляют 95 мл безводного пиридина, предварительно высушенного над окисью бария. Смесь перемешивают без доступа влаги воздуха и охлаждают до 0° смесью льда с солью. К смеси при перемешивании без доступа влаги прибавляют по каплям из капельной воронки холодный раствор 20,9 г (0,11 моля) *n*-толуолсульфохлорида в 38 мл сухого, свободного от спирта хлороформа [15] (или хлористого метилена) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 0°. После прибавления реагента ( $\sim 20$  мин) смесь перемешивают при 0° 1 час, снимают охлаждение и оставляют при комнатной температуре на ночь, по-прежнему защищая смесь от влаги воздуха. К смеси при перемешивании прибавляют порциями 10 мл воды как описано выше и пере-

менивают еще 30 мин. Продукт выделяют как описано выше (см. примечание на стр. 137) и получают сироп, который сразу кристаллизуется при добавлении эфира; выход 20,9 г (60,7%). Продукт дважды перекристаллизовывают из этилацетата; т. пл. 133—134°,  $[\alpha]_D^{20} -13^\circ$  (с 2,0 в хлороформе).

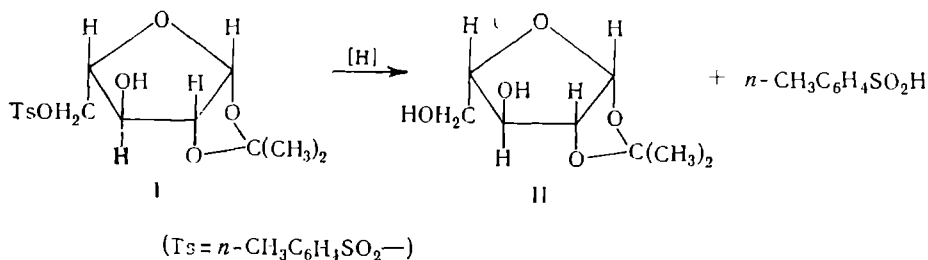
## ЛИТЕРАТУРА

1. Odén S., Arkiv Kemi. Mineral. Geol., **7**, No. 15, 1 (1918); Chem. Abstracts, **14**, 2170 (1920).
2. Freudenberg K., Ivers O., Ber., **55**, 929 (1922); Freudenberg K., Brauns F., Ber., **55**, 3233 (1922).
3. Ohle H., Thiel H., Ber., **66**, 525 (1933).
4. Freudenberg K., Hixon R. M., Ber., **56**, 2119 (1923).
5. Raymond A. L., Schroeder E. F., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2785 (1948).
6. Ohle H., Dickhäuser E., Ber., **58**, 2593 (1925).
7. Levene P. A., Raymond A. L., J. Biol. Chem., **102**, 317 (1933).
8. Levene P. A., Meyer G. M., J. Biol. Chem., **64**, 473 (1925).
9. Ohle H., Berend G., Ber., **58**, 2585 (1925).
10. Pelletier S. W., Chem. and Ind. (London), 1034 (1953).
11. Tipson R. S., J. Org. Chem., **2**, 235 (1944).
12. Schmid H., Karrer P., Helv. Chim. Acta, **32**, 1371 (1949).
13. Foster A. B., Overend W. G., Stacey M., Wiggins L. F., J. Chem. Soc., **1949**, 2542.
14. Freudenberg K., Raschig K., Ber., **60**, 1633 (1927).
15. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 524.

## Восстановительное десульфонирование

Регенерация исходного сахара из его сульфоната

*Р. С. Тинсон*



## ВВЕДЕНИЕ

При восстановлении сульфонатов различных производных сахаров может происходить отщепление сульфонильной группы с образованием исходного сахара и сульфоновой кислоты. Но если сульфонильные группы расположены таким образом, что возможно образование

ангидроцикла, то в некоторой степени эта реакция имеет место. Использование амальгамы натрия как десульфонилирующего восстановителя было впервые предложено Фриденбергом и Браунсом [1]; к настоящему времени в метод внесены некоторые незначительные изменения [2, 3]. Ниже приводится методика, предложенная Левином и Комптоном [4].

Из других восстановителей, которые нашли применение, следует назвать водород над никелем Ренел [5], восстановленный никель Ренеля в кипящем растворителе [5] и алюмогидрид лития [6, 7]. По различным причинам эти восстановители так или иначе менее удовлетворительны, чем амальгама натрия.

## МЕТОДИКА

### 1,2-О-Изопропилиден-β-L-арабинофураноза (II)

К 3,45 г (0,01 моля) 1,2-О-изопропилиден-5-О-тозил-β-L-арабинофуранозы (I) [4] в круглодонной колбе емкостью 500 мл прибавляют 184 мл 80%-ного метанола и 46 г 4%-ной амальгамы натрия<sup>1</sup>. Смесь перемешивают механической мешалкой 14 час при комнатной температуре, после чего нейтрализуют, пропуская углекислый газ, и декантируют с ртути. Ртуть промывают водой (3 × 10 мл), промывные воды объединяют с основным раствором и упаривают в вакууме досуха (температура бани 35°). К кристаллическому остатку прибавляют абсолютный спирт и снова упаривают досуха. Сухой твердый остаток размельчают и тщательно экстрагируют (дважды) кипящим абсолютным спиртом. Экстракты объединяют, фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме досуха. Полученный твердый остаток несколько раз экстрагируют теплым абсолютным эфиром до тех пор, пока при упаривании экстракта не будет оставаться остаток. Эфирные экстракты объединяют, фильтруют и оставляют упариваться в чашке. По мере упаривания происходит кристаллизация; выход продукта 1,84 г (96,7%), т. пл. 117—118°,  $[\alpha]_D^{20} -29^\circ$  (с 2,0 в воде).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Freudenberg K., Brauns F., Ber., 55, 3233 (1922).
2. Levene P. A., Compton J., J. Am. Chem. Soc., 57, 2306 (1935); J. Biol. Chem., 116, 169 (1936).
3. Meyer A. S., Reichstein T., Helv. Chim. Acta, 29, 152 (1946).
4. Levene P. A., Compton J., J. Biol. Chem., 116, 189 (1936).
5. Kenner G. W., Murray M. A., J. Chem. Soc., 1949, 178.
6. Schmid H., Karrer P., Helv. Chim. Acta, 32, 1371 (1949).
7. Bolliger H. R., Ulrich P., Helv. Chim. Acta, 35, 93 (1952).
8. Isbell H. S., Frush H. L., Holt N. B., J. Research, Natl. Bur. Standards, 64A, 135 (1960).

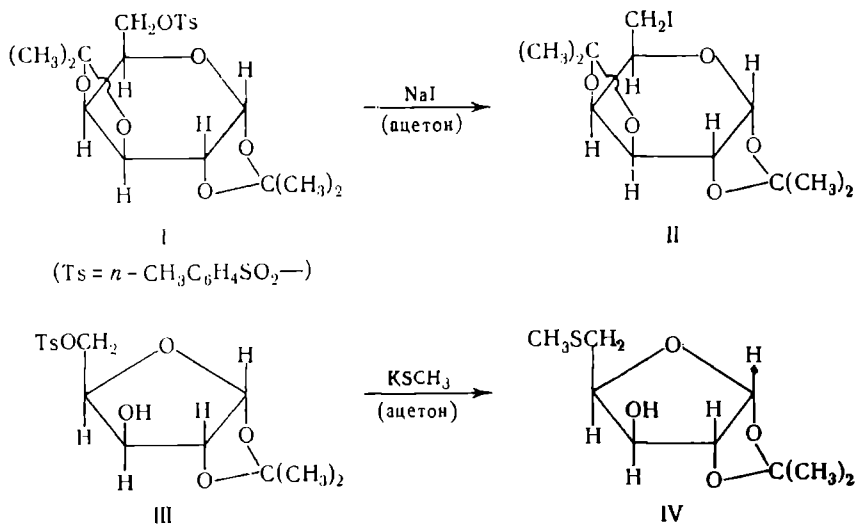
<sup>1</sup> Метод приготовления амальгамы натрия см. Renfrow W. B., Jr., Hauser C. R., Org. Syntheses, Coll. 2, 607 (1943). В виде гранул ее получают, выдавливая расплав амальгамы через обогреваемый алундовый стакан (с несколькими небольшими отверстиями в дне) в минеральное масло [8]. Хранят амальгаму под сухим минеральным маслом.



## Замещение первичных сульфоноксигрупп

Получение  $\omega$ -С-производных сахаров из  $\omega$ -О-сульфонатов

*Р. С. Тинсон*



### ВВЕДЕНИЕ

Сульфонаты первичных спиртов обычно гораздо более реакционно-способные соединения, чем сульфонаты вторичных спиртов. Поэтому производные сахаров, имеющих первичную сульфоноксигруппу (см. стр. 134), являются ценными промежуточными соединениями в синтезе самых разнообразных производных сахаров. Например, первичную гидроксильную группу исходного сахара можно заместить через сульфонат непосредственно на H, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, SCH<sub>3</sub>, SC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> или SCN, а через дезоксиодпроизводное — на H, ONO<sub>2</sub> или NH<sub>2</sub> (в последнем случае гидроксильная группа может быть вновь регенерирована).

Соединение II было впервые приготовлено Фриденбергом и Рашигом [1]; приведенная ниже методика содержит изменения, введенные Раймондом и Шредером [2]. Метод получения соединения IV, также приведенный ниже, предложен Раймондом [3].

### МЕТОДИКА

#### **6-Иод-6-дезоксид-1,2;3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактоза (II)**

К 2,49 г (0,06 моля) 1,2;3,4-ди-О-изопропилиден-6-О-тозил-D-галактозы (стр. 136) (I), помещенной в трубку из стекла пирекс емкостью 250 мл (один конец трубки запаян, а второй оттянут и приготовлен для запаивания), прибавляют 18 г (0,12 моля) безводного иодистого натрия и 125 мл безводного ацетона. Трубку охлаждают в смеси сухой лед — хлороформ, запаивают, заворачивают в два слоя металлической сетки и помещают

в глицериновую баню<sup>1</sup>, нагретую до 110°. Через 36 час трубку вынимают, охлаждают в бане с холодной водой, разворачивают, охлаждают смесью сухой лед — хлороформ и вскрывают. Полученную суспензию фильтруют с отсасыванием, кристаллический *n*-толуолсульфонат натрия промывают, взбалтывая три раза с безводным ацетоном и отфильтровывая с отсасыванием. Фильтрат и промывной ацетон объединяют и упаривают в вакууме досуха. Полученный сироп перемешивают с 100 мл воды и прибавляют при перемешивании несколько кристалликов тиосульфата натрия до исчезновения окраски иода. Через несколько часов сироп затвердевает, осадок размельчают и тщательно промывают водой, отфильтровывают с отсасыванием, отжимают досуха и высушивают в вакуум-эксикаторе до постоянного веса; выход 22 г (почти 100%). Вещество перекристаллизовывают из 25 мл абсолютного метанола; выход 19,0 г (85,6%), т. пл. 69—71°; литературные данные: т. пл. 72° [1],  $[\alpha]_D^{25}$  —50° (в тетрагидроэтане).

#### **1,2-О-Изопропилиден-5-*S*-метил-5-тио- $\alpha$ -D-ксилофураноза (IV)**

К 17,2 г (0,05 моля) 1,2-О-изопропилиден-5-О-тозил- $\alpha$ -D-ксилофуранозы (см. стр. 138) (III), помещенной в трубку из стекла пирекс емкостью 125 мл (один конец трубки запаян, второй оттянут и приготовлен к запаиванию), прибавляют 8,7 г (0,1 моля) безводного метилмеркаптида калия<sup>2</sup> и 86 мл безводного ацетона. Трубку охлаждают, запаивают, заворачивают в сетку, как описано выше, и нагревают 4 час на кипящей водяной бане. Трубку охлаждают и вскрывают, из реакционной смеси, не фильтруя ее, выпаривают в вакууме ацетон, прибавляя время от времени воду, чтобы *n*-толуолсульфонат калия находился в растворе. Полученный раствор экстрагируют хлороформом (3  $\times$  200 мл), экстракты объединяют и последовательно промывают охлажденной льдом разбавленной серной кислотой (до кислой реакции водного слоя по конго красному) и охлажденной льдом водой (до нейтральной реакции по синей лакмусовой бумаге). Хлороформный слой высушивают безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают в вакууме, полученный сироп растворяют в кипящем гексане и оставляют кристаллизоваться. Продукт сразу выкристаллизовывается при охлаждении, его отфильтровывают с отсасыванием и промывают гексаном. Из маточного раствора получают еще две дополнительные порции кристаллов. Весь полученный продукт объединяют и высушивают в вакуум-эксикаторе до постоянного веса; выход 8,26 г (75%). Вещество перекристаллизовывают один раз из гексана, содержащего 8% этилацетата, и два раза из гексана, содержащего 5% этилацетата; т. пл. 91,5—92°,  $[\alpha]_D^{25}$  —54° (с 2,0 в абсолютном спирте).

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Freudenberg K., Raschig K., Ber., **60**, 1633 (1927).
2. Raymond A. L., Schroeder E. F., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2785 (1948).
3. Raymond A. L., J. Biol. Chem., **107**, 85 (1934).

<sup>1</sup> При получении целого ряда дезоксиподпронзводных можно использовать кипящую водяную баню и даже значительно сократить время нагревания при 100°.

<sup>2</sup> Для получения метилмеркаптида калия растворяют 0,1 моля твердого едкого кали (85%) в 10 объемах абсолютного спирта, прибавляют 0,1 моля метилмеркаптана и упаривают раствор досуха, прибавляя несколько раз абсолютный спирт.

## Альдозо-1-фосфаты

### Химические и ферментативные методы получения

*Е. В. П у т м а н*

#### В В Е Д Е Н И Е

Альдопиранозо-1-фосфаты<sup>1</sup> легко образуются из полностью ацетилированных альдопиранозилбромидов при замещении галогена под действием солей серебра. В первоначальной методике, предложенной Кори и сотр. [1], обработка тризамещенным фосфатом серебра приводила к образованию триглицозилфосфорного эфира, который при частичном гидролизе давал моноэфир с той же конфигурацией аномерного центра, что и в исходном бромпроизводном. Аналогичные результаты, но с более экономичным использованием ацетогалогенозы дает метод Постернака [2], в котором применяется дифенилфосфат серебра. Фенильные группы продукта конденсации снимают каталитическим гидрированием, затем для удаления ацетильных групп обрабатывают щелочью и получают монофосфорный эфир.

Однако если вместо дифенилфосфата используется дибензилфосфат серебра по методу Вольфрома и сотр. [3], то конденсация протекает с вальденовским обращением при C-1 и приводит к продукту, в котором ацетилированный гидроксил при C-2 имеет ту же конфигурацию, что и бром при C-1. Такое же обращение конфигурации происходит в том случае, когда замена атома брома осуществляется «монофосфатом серебра» по методу Райтла [4]. Но, как было показано Мак-Дональдом и Флетчером [5], в условиях реакции фосфорилирующим агентом является скорее двузамещенный фосфат серебра, а не монофосфат.

В ряде случаев альдозо-1-фосфаты можно получать, используя ферментативные методы, которые менее трудоемки, чем химические. Так, в методе, описанном Мак-Креди и Хассидом [6],  $\alpha$ -D-глюкопиранозо-1-фосфат получают фосфорилизом крахмала в присутствии ортофосфата и сырого картофельного сока, который содержит фермент — фосфорилазу крахмала.

#### МЕТОДИКА

#### *Тризамещенный фосфат серебра [7]*

Все следующие операции выполняются при отсутствии яркого освещения. К нагретому до кипения раствору 103 г (0,73 моля) двузамещенного фосфата натрия в 600 мл воды осторожно прибавляют при перемешивании раствор 50 г (0,29 моля) нитрата серебра в 250 мл воды. Реакционную смесь кипятят 5 мин, охлаждают до комнатной температуры и декантируют раствор с желтого осадка тризамещенного фосфата серебра. Осадок промывают водой не менее 5 раз ( $5 \times 4$  л), декантируя промывные воды, затем осадок отфильтровывают с отсасыванием. Влажный три-

<sup>1</sup> Фосфат одновалентного радикала (R) обычно представляет соединение  $R_3PO_4$  (ср. фосфат натрия  $Na_3PO_4$ ). Однако на протяжении многих лет биохимики использовали термин «фосфат» для обозначения соединения типа  $ROPO(OH)_2$ , подразумевая, что выделенное вещество является нейтральной солью (при этом катион иногда не указывается). Термин «фосфат» будет использован в тексте в этом же смысле.

замещенный фосфат серебра высушивают в вакуумном сушильном шкафу при 60° в течение ночи, размельчают до мелкого порошка и хранят в эксикаторе в темноте; выход 40 г (0,096 моля, 98%) [8].

**Получение  $\alpha$ -D-глюкопиранозо-1-фосфата  
с использованием тризамещенного фосфата серебра [1]**

Смесь 21 г (0,05 моля) порошкообразного тризамещенного фосфата серебра, 61,7 г (0,15 моля) тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромид (см. стр. 123) и 180 мл бензола кипятят 1 час при энергичном механическом перемешивании в трехгорлой защищенной от света колбе емкостью 500 мл, снабженной затвором и холодильником с хлоркальциевой трубкой для защиты от влаги воздуха. Серебряные соли отфильтровывают, отсасывая смесь через слой кизельгура, бензольный фильтрат упаривают в вакууме при 40° до густого сиропа. Полученный сироп переносят с помощью небольшого количества бензола в стакан емкостью 600 мл и, чтобы осадить смолообразный продукт конденсации, перемешивают с петролейным эфиром (т. кип. 30—60°). Осадок растирают с новой порцией петролейного эфира и высушивают, помещая стакан в вакуум-эксикатор. Влажный продукт разбухает и дымит в вакууме. Вещество высушивают 3—4 час и затем легко растирают палочкой в аморфный порошок; выход неочищенного трис-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-D-глюкозил)фосфата 50 г. Этот продукт (50 г) растворяют в 1 л 0,2 н. раствора хлористого водорода в метаноле (16,5 мл концентрированной соляной кислоты разбавляют до 1,0 л абсолютным метанолом) в колбе Эрленмейера емкостью 4 л и оставляют при комнатной температуре. Чтобы контролировать протекание реакции, из раствора каждый час отбирают аликвотные пробы по 0,2 мл и анализируют их на неорганический фосфат. Ортофосфат удобно определять по колориметрическому методу Аллена [9].

Для определения неорганического фосфата аликвотную часть реакционной смеси (0,2 мл) переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, содержащую 18—19 мл воды. К смеси прибавляют 2 мл 60%-ной хлорной кислоты, вращая колбу, чтобы избежать высокой локальной концентрации кислоты. Затем прибавляют 2 мл амидольного реагента (профильтрованного раствора 2 г дихлоргидрата 2,4-диаминофенола и 40 г бисульфита натрия в 200 мл воды) и 1 мл раствора молибдата аммония (8,3 г в 100 мл воды); объем смеси доводят до метки и смесь перемешивают. Через 10—30 мин измеряют абсорбцию при 660 м $\mu$  и сравнивают ее с абсорбцией стандартного раствора, приготовленного таким же методом. Стандартный раствор ортофосфата: 1,0967 г аналитически чистого монозамещенного фосфата калия растворяют в 250 мл воды. Этот раствор, содержащий 1 мг фосфата в 1 мл, разбавляют при необходимости до содержания фосфата 5—75  $\mu$ г.

Для определения общего количества фосфата в реакционной смеси аликвотную пробу (0,05 мл) переносят в пробирку из стекла пирекс (внешний диаметр трубки 18 мм), прибавляют 2,2 мл 60%-ной хлорной кислоты и несколько кусочков неглазурованного фарфора. Смесь нагревают на пламени микрогорелки до обесцвечивания. Если раствор не становится прозрачным к тому времени, когда хлорная кислота начинает дымить, пробирку охлаждают, прибавляют 2 капли 30%-ной перекиси водорода и нагревают снова. Когда раствор обесцветится, содержимое пробирки охлаждают, прибавляют 5 мл воды и осторожно кипятят 2 мин. Полученный раствор количественно пере-

носят в мерную колбу емкостью 25 мл, добавляют 2,0 мл амидольного реагента и 1 мл раствора молибдата аммония, после чего объем смеси доводят до метки и измеряют абсорбцию раствора, как описано для неорганического фосфата.

После того как гидролиз достигнет той степени, когда 20—25 % общего количества фосфора выделится в виде неорганического фосфата ( $8 \pm 4$  час), реакционную смесь разбавляют 1 л метанола и доводят pH до 8,5 (по тимоловому синему), добавляя насыщенный раствор гидроокиси бария. Смесь выдерживают при 2° в течение ночи, снова прибавляют раствор гидроокиси бария до pH 8,5 и отделяют осадок бариевой соли центрифугированием. Бариевую соль  $\beta$ -глюкозилфосфата отделяют от полученного осадка продолжительной экстракцией водой. Сначала осадок экстрагируют 100 мл воды, а затем порциями по 50 мл. В каждом случае осадок суспендируют в течение 10 мин при механическом перемешивании и центрифугируют. Бариевую соль переосаждают из объединенных экстрактов (250—300 мл), прибавляя 2 объема 95%-ного спирта. Экстрагирование и переосаждение повторяют до тех пор (обычно 3 раза), пока осадок не будет полностью растворяться в первых 200 мл воды, взятых для экстракции. После последнего переосаждения продукт промывают спиртом и окончательно высушивают в вакууме при 50°. Выход тригидрата бариевой соли  $\alpha$ -D-глюкопиранозо-1-фосфата 7,5 г,  $[\alpha]_D^{25} +66^\circ$  (с 1,3 в воде).

По этой же методике были получены  $\alpha$ -D-маннопиранозо-1-фосфат [10],  $\alpha$ -D-галактопиранозо-1-фосфат [11],  $\alpha$ -мальтозо-1-фосфат [12],  $\alpha$ -D-ксилопиранозо-1-фосфат [12],  $\alpha$ -L-глюкопиранозо-1-фосфат [13] и  $\beta$ -L-арабин опиранозо-1-фосфат [14].

### *Дифенилфосфат серебра [15]*

5 мл дифенилхлорфосфата нагревают с 20 мл 2,5 н. едкого натра до образования гомогенного раствора. Избыток щелочи нейтрализуют по фенолфталеину концентрированной азотной кислотой, затем прибавляют 50 мл воды и 85 мл 10%-ного раствора нитрата серебра и нагревают смесь до кипения. От горячего раствора отфильтровывают осадок хлористого серебра и фильтрат охлаждают в бане со льдом. Осадок в виде тонких игл отфильтровывают и перекристаллизуют из горячей воды; выход 4,6 г. Перед дальнейшим использованием продукт высушивают при 100°.

### *Получение $\alpha$ -D-глюкопиранозо-1-фосфата с использованием дифенилфосфата серебра [2, 16]*

Раствор 0,6 г (1,46 ммоль) тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромида (см. стр. 123) в 2 мл сухого бензола кипятят с 0,52 г (1,46 ммоль) сухого, тонкоизмельченного дифенилфосфата серебра в течение 30 мин без доступа влаги воздуха. К смеси прибавляют еще 0,25 г дифенилфосфата серебра и кипятят 30 мин. Нерастворимые соли серебра отделяют центрифугированием и промывают сухим бензолом. Бензольный надосадочный раствор упаривают в вакууме, полученный тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-дифенилфосфат высушивают в высоком вакууме. Высушенный продукт растворяют в 8 мл абсолютного спирта, фильтруют и гидрируют при комнатной температуре и атмосферном давлении над 100 мг окиси платины. Теоретическое количество водорода (8 молей на 1 моль веще-

ства) при активном катализаторе поглощается за 2 час. Катализатор отфильтровывают, к спиртовому раствору прибавляют 1,0 мл 10 н. едкого натра и осторожно кипятят раствор в течение 3 мин. Для растворения выпадающего дезацетилированного продукта к смеси прибавляют 10 мл воды; полученный молочно-белый раствор кипятят еще 2 мин. Раствор охлаждают, избыток щелочи нейтрализуют ледяной уксусной кислотой и отгоняют спирт и циклогексан в вакууме. К полученному водному раствору прибавляют раствор 0,5 г ацетата бария в 1 мл воды, выпавший осадок фосфата бария удаляют центрифугированием и промывают. Для осаждения  $\alpha$ -D-глюкопиранозилфосфата бария к водному раствору прибавляют два объема 95%-ного спирта. Частичная очистка продукта достигается повторным растворением его в воде с последующим осаждением спиртом. Полученный в результате продукт промывают 95%-ным спиртом и высушивают в вакууме; выход тригидрата  $\alpha$ -D-глюкопиранозо-1-фосфата (бариевая соль) 0,25 г.

По этой методике получены также  $\alpha$ -D-галактопиранозо-1-фосфат [2],  $\alpha$ -D-маннопиранозо-1-фосфат [17] и  $\alpha$ -лактозо-1-фосфат [18].

### **Дибензилфосфат серебра [19]**

Смесь 36 г тризамещенного фосфата серебра и 36 г хлористого бензила в 300 мл безводного эфира кипятят 2 час в колбе, защищенной от света, при энергичном перемешивании, не допуская попадания влаги. Нерастворимые соли серебра удаляют фильтрованием через кизельгур, полученный раствор упаривают в вакууме почти досуха и получают полукристаллический остаток. Кристаллы трибензилфосфата сушат в вакууме и отжимают от прилипшего масла на пористой тарелке. Выделенный продукт (20 г) кипятят 10 час со 100 мл 10%-ного раствора едкого кали в метаноле. Раствор упаривают в вакууме, остаток растворяют в воде. При подкислении водного раствора азотной кислотой осаждается дибензилфосфат, который перекристаллизуют из хлороформа, добавляя петролейный эфир (т. кип. 30—60°). Затем дибензилфосфат (т. пл. 79—80°) растворяют в 95%-ном спирте, к раствору прибавляют 400 мл 2%-ного раствора нитрата серебра в спирте, полученный дибензилфосфат серебра перекристаллизуют из горячей воды. Перед дальнейшим использованием продукт высушивают при 100°; т. пл. 222°.

### **Получение $\beta$ -D-глюкопиранозо-1-фосфата с использованием дибензилфосфата серебра [3]**

К раствору 10 г (24 ммоль) тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромиды (см. стр. 123) в 60 мл сухого бензола в колбе, защищенной от света черной бумагой или алюминиевой фольгой, снабженной мешалкой с затвором и хлоркальциевой трубкой, прибавляют 5 г измельченного драйерита и 14 г (36 ммоль) сухого измельченного дибензилфосфата серебра. Смесь медленно в течение 30 мин при энергичном перемешивании нагревают до 50° и затем 90 мин при кипении. Нерастворимые соли удаляют фильтрованием с отсасыванием, бензольный раствор упаривают в вакууме досуха. Полученный сироп растворяют в 20 мл абсолютного эфира и кристаллизуют, добавляя петролейный эфир (т. кип. 30—60°). Выход неочищенного тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозидибензилфосфата 10,8 г, т. пл. 74—76°. 1 г полученного неочищенного продукта рас-

творяют в 15 мл абсолютного спирта и гидрируют при комнатной температуре и атмосферном давлении над 0,2 г окиси палладия. Теоретическое количество водорода, 2 моля на 1 моль вещества, поглощается за 30 мин. Катализатор немедленно отфильтровывают и к фильтрату прибавляют 1,0 мл 10 н. раствора едкого натра.

Для растворения выпавшего продукта дезацетилирования к смеси прибавляют воду и нейтрализуют полученный раствор уксусной кислотой по фенолфталеину. Спирт отгоняют в вакууме и к полученному водному раствору прибавляют 0,5 г ацетата бария в 1 мл воды. Осадок фосфата бария отделяют центрифугированием, к надосадочной жидкости для осаждения  $\beta$ -D-глюкопиранозилфосфата бария прибавляют два объема 95%-ного спирта. Осадок экстрагируют водой и переосаждают 95%-ным спиртом до тех пор, пока полученное вещество не будет полностью растворимо в воде. Полученное таким образом вещество промывают 95%-ным спиртом и высушивают в вакууме; выход 0,65 г гидрата  $\beta$ -D-глюкопиранозилфосфата бария,  $[\alpha]_D^{+20} + 20^\circ$  (с 2 в воде).

По этой методике получены также  $\beta$ -D-галактопиранозо-1-фосфат [4],  $\alpha$ -D-маннопиранозо-1-фосфат [17] и D-рибопиранозо-1-фосфат [20].

Райт и Кхорана [20—23] предложили подобную методику, в которой используется триэтиламмонийдибензилфосфат (эквивалентная смесь триэтиламина и дибензилфосфата). При применении этого реагента и соответствующей ацетобромгалогенозы были получены  $\beta$ -D-рибофуранозо-1-фосфат [20],  $\alpha$ -D-рибофуранозо-1-фосфат [21], D- и L-арабинофуранозо-1-фосфаты [22],  $\alpha$ -D- и  $\alpha$ -L-арабинопиранозо-1-фосфаты [22].

### **Получение $\beta$ -D-глюкопиранозо-1-фосфата по методу Райтла [4]**

21 г (0,05 моля) тризамещенного фосфата серебра смешивают с 6,3 мл (0,1 моля) 90%-ной фосфорной кислоты. Серую сиропообразную смесь перемешивают с 15 мл абсолютного эфира до образования однородной суспензии. Суспензию переносят, используя для этой цели дополнительно 15 мл абсолютного эфира, в реакционную колбу, помещенную в баню с водой, температура которой не превышает  $5^\circ$ . При энергичном механическом перемешивании к смеси прибавляют за 10 мин холодный раствор 61,7 г (0,15 моля) тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромиды в 150 мл сухого хлороформа. Через 15 мин серебряные соли быстро отфильтровывают с отсасыванием и фильтрат встряхивают с 300 мл воды, охлажденной до  $0^\circ$ . Смесь нейтрализуют холодным 1 н. раствором едкого натра по фенолфталеину и хлороформный слой отбрасывают. К раствору прибавляют 60 г ацетата бария в 150 мл воды и осадок отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость упаривают досуха в вакууме, остаток (тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозилфосфат бария) растворяют в 95%-ном спирте и дезацетилируют этилатом натрия (см. стр. 119). Неочищенную бариевую соль отделяют центрифугированием, осадок для дополнительной очистки растворяют в воде и переосаждают спиртом, как описано в методике, предусматривающей использование тризамещенного фосфата серебра. Выход гидрата  $\beta$ -D-глюкопиранозилфосфата бария 6 г.

По этой методике были также получены  $\beta$ -D-галактопиранозо-1-фосфат [4],  $\beta$ -лактозо-1-фосфат [18],  $\beta$ -D-ксилопиранозо-1-фосфат [14],  $\alpha$ -L-арабинозо-1-фосфат [14] и с некоторыми изменениями в методиках — 2-дезоксид- $\alpha$ -D-эритро-пентофуранозо-1-фосфат [5].

### Получение $\alpha$ -D-глюкопиранозо-1-фосфата фосфоролизом крахмала [6]

20 г растворимого крахмала перемешивают в 500 мл кипящей воды до растворения, полученный гомогенный раствор оставляют охлаждаться до 20—25°. Нарезают ломтиками две очищенные средней величины картофелины (около 300 г) и гомогенизируют с 300 мл воды 2 мин на электрическом гомогенизаторе при высокой скорости. Пульпу удаляют, продавливая гомогенат через бязь, сложенную в несколько слоев, и оставляют профильтрованную жидкость на 5—10 мин для осаждения мелких частичек. Приготавливают фосфатный буфер с pH 6,7, растворяя 35 г (0,2 моля) двузамещенного фосфата калия и 27 г (0,2 моля) монозамещенного фосфата калия в 500 мл воды. Картофельный экстракт (500 мл) декантируют с осадка и тщательно перемешивают с раствором крахмала и фосфатным буфером. К смеси прибавляют 0,25 г фенилмеркурнитрата и выдерживают 24 час при 20—25°. Смесь быстро нагревают до 95°, охлаждают и отделяют скоагулировавший белок фильтрованием с отсасыванием через слой кизельгура. К фильтрату прибавляют 86 г (0,4 моля) тетрагидрата ацетата магния и, прибавляя 8 н. раствор аммиака, доводят pH раствора до 8,5. Осадок магнийаммонийфосфата отделяют фильтрованием, фильтрат пропускают через колонку с дауэксом 50 (H<sup>+</sup>, 20—50 меш). Колонку диаметром 5 см с набивкой объемом 600 мл промывают со скоростью 50 мл/мин. Смола в колонке промывают один раз 600 мл воды. Кислый элюат, полученный с колонки с дауэксом, сразу же пропускают через колонку с пермутитом А (ОН<sup>-</sup>), чтобы адсорбировать  $\alpha$ -D-глюкозо-1-фосфат. Для этой цели используют колонку диаметром 2,5 см с набивкой объемом 50 мл, скорость вымывания составляет 500 мл/час. Для удаления следов крахмала колонку промывают 2 л воды с той же скоростью. Для выделения  $\alpha$ -D-глюкозо-1-фосфата колонку элюируют 200 мл 5%-ного едкого кали. К элюату при перемешивании осторожно прибавляют три объема метанола, при этом калиевая соль глюкозофосфата самопроизвольно закристаллизовывается. Кристаллизация заканчивается при 0°, продукт перекристаллизовывают из 100 мл воды с добавлением 300 мл метанола. Кристаллы отфильтровывают и высушивают в вакууме над хлористым кальцием; выход 14,3 г дигидрата двузамещенного  $\alpha$ -D-глюкопиранозилфосфата калия,  $[\alpha]_D^{20} +78^\circ$  (с 2 в воде).

При использовании бактериальных ферментов  $\alpha$ -D-глюкозо-1-фосфат можно получить также фосфоролизом сахарозы [23], а  $\beta$ -D-глюкозо-1-фосфат — фосфоролизом мальтозы [24]. При получении  $\alpha$ -D-рибофуранозо-1-фосфата [25] фосфоролиз инозина проводят ферментами, выделенными из печени; также получают 2-дезоксид- $\alpha$ -D-эритро-пентофуранозо-1-фосфат [26] из 9-(2-дезоксид- $\beta$ -D-эритро-пентофуранозил)гуанина.

### ПРОИЗВОДНЫЕ

Альдозо-1-фосфаты являются невосстанавливающими сахарами, устойчивыми к действию щелочи. В кислой среде фуранозилфосфаты гидролизуются необычайно легко, тогда как для полного гидролиза их пиранозных аналогов последние необходимо нагревать при 100° в 1 н. растворе кислоты в течение 7 мин. Аморфные гидраты бариевых солей, которые при гидролизе дают восстанавливающий сахар и фосфат в соот-



ношении 1 : 1, постоянно содержат примеси аномера и родственных соединений. Эти примеси устраняют, переводя сахар в кристаллическую соль.

1-Фосфаты  $\alpha$ -D-глюкопиранозы,  $\alpha$ -D-галактозы и  $\alpha$ -D-ксилопиранозы очищают через их двузамещенные калиевые соли. Для этого смешивают 10%-ный раствор бариевой соли с половинным объемом 10%-ного раствора сульфата калия. Осадок сульфата бария отделяют центрифугированием. К полученному раствору прибавляют до образования устойчивой мути спирт, после чего охлаждают до 0°. В процессе кристаллизации к раствору прибавляют спирт до тех пор, пока его количество не составит 1,7 первоначального объема. Кристаллизация завершается при 0° за несколько часов. Продукт перекристаллизовывают из 15%-ного водного раствора, добавляя при 0° 1,7 объема 95%-ного спирта. Кристаллы отфильтровывают и высушивают в вакууме над хлористым кальцием.

Большая часть фосфатов сахаров может быть очищена через их кристаллические бис-циклогексиламмониевые соли. Для этой цели встряхивают 10%-ный раствор бариевой соли с влажным дауэксом 50 (H<sup>+</sup>) (1 г влажной смолы на 1 мл раствора). Смолу отфильтровывают и промывают водой. Фильтрат нейтрализуют 1 M раствором циклогексилamina в 95%-ном спирте по фенолфталеину и упаривают в вакууме досуха. бис-Циклогексиламмониевые соли пентопиранозо-1-фосфатов кристаллизуются по мере упаривания их водных растворов. Выделенный продукт перекристаллизовывают из кипящего 80%-ного спирта. Сироп, полученный при упаривании водного раствора бис-циклогексиламмониевой

#### Удельное вращение некоторых кристаллических альдозо-1-фосфатов в воде

1-Фосфат	Соль	$[\alpha]_D$ , градус (в воде при 20--25°)	Литература
$\beta$ -D-Арабинопиранозы	бис-Циклогексиламмониевая	-39 (с 2,1)	22
$\alpha$ -L-Арабинопиранозы	»	+31 (с 2,5)	14
$\beta$ -L-Арабинопиранозы	»	+91 (с 2,5)	14
$\alpha$ -D-Галактопиранозы	Дикалиевая, дигидрат	+98 (с 2,4)	11
$\alpha$ -D-Галактопиранозы	бис-Циклогексиламмониевая	+78,5 (с 2,5)	14
$\beta$ -D-Галактопиранозы	бис-Циклогексиламмониевая, моногидрат	+21 (с 2,5)	14
$\alpha$ -D-Глюкопиранозы	Дикалиевая, дигидрат	+78 (с 4)	8
$\alpha$ -D-Глюкопиранозы	бис-Циклогексиламмониевая	+64 (с 2,5)	14
$\beta$ -D-Глюкопиранозы	бис-Циклогексиламмониевая · C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH · H <sub>2</sub> O	+7 (с 2,5)	14
$\alpha$ -L-Глюкопиранозы	Дикалиевая, дигидрат	-78 (с 1,0)	13
$\alpha$ -D-Рибофуранозы	бис-Циклогексиламмониевая, моногидрат	+53 (с 0,5)	27
2-Дезокси- $\alpha$ -D-эритро-пентофуранозы	бис-Циклогексиламмониевая	+39 (с 2,6)	28
$\alpha$ -D-Ксилопиранозы	Дикалиевая, дигидрат	+76 (с 2)	12
$\alpha$ -D-Ксилопиранозы	бис Циклогексиламмониевая	+58 (с 2,5)	14
$\beta$ -D-Ксилопиранозы	»	+1 (с 2,5)	14

соли гексопиранозилфосфата, растворяют в минимальном количестве кипящего 95%-ного спирта. Кристаллизация начинается при охлаждении раствора, неочищенный продукт перекристаллизовывают из горячего 95%-ного спирта.

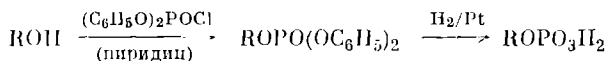
Для удаления примеси аномера рекомендуется минимум три перекристаллизации. В таблице приведены значения оптического вращения различных альдозо-1-фосфатов.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cori C. F., Colowick S. P., Cori G. T., J. Biol. Chem., **121**, 465 (1937).
2. Posternak T., J. Am. Chem. Soc., **72**, 4824 (1950).
3. Wolfrom M. L., Smith C. S., Fletcher D. E., Brown A. E., J. Am. Chem. Soc., **64**, 23 (1942); Zervas L., Naturwiss., **27**, 317 (1939).
4. Reithel F. J., J. Am. Chem. Soc., **67**, 1056 (1945).
5. MacDonald D. L., Fletcher H. G., Jr., J. Am. Chem. Soc., **82**, 1832 (1960).
6. McCready R. M., Hassid W. Z., Biochem. Preparations, **4**, 63 (1955);  
Hanes C. S., Proc. Royal Soc. (London), **B129**, 174 (1940).
7. Lipmann F., Tuttle L. C., J. Biol. Chem., **153**, 571 (1944).
8. Krah M. E., Cori C. F., Biochem. Preparations, **1**, 33 (1949).
9. Allen R. J. L., Biochem. J., **34**, 858 (1940).
10. Colowick S. P., J. Biol. Chem., **124**, 557 (1938).
11. Kosterlitz H. W., Biochem. J., **33**, 1087 (1939).
12. Meagher W. R., Hassid W. Z., J. Am. Chem. Soc., **68**, 2135 (1946).
13. Potter A. L., Sowden J. C., Hassid W. Z., Doudoroff M., J. Am. Chem. Soc., **70**, 1751 (1948).
14. Putman E. W., Hassid W. Z., J. Am. Chem. Soc., **79**, 5057 (1957).
15. Posternak T., J. Biol. Chem., **180**, 1269 (1949).
16. Posternak T., in «Methods in Enzymology», Colowick S. P. and Kaplan N. O., Eds., Academic Press Inc., New York, N. Y., 1957, vol. 3, p. 132.
17. Posternak T., Rosselet J. P., Helv. Chim. Acta, **36**, 1614 (1953).
18. Reithel F. J., Young R. G., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4210 (1952).
19. Lossen W., Köhler A., Ann., **262**, 212 (1891).
20. Wright R. S., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **78**, 841 (1956).
21. Tenner G. M., Wright R. S., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **79**, 441 (1957).
22. Wright R. S., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 1994 (1958).
23. Doudoroff M., Kaplan N. O., Hassid W. Z., J. Biol. Chem., **148**, 67 (1943).
24. Fittig C., Doudoroff M., J. Biol. Chem., **199**, 153 (1952).
25. Kalckar H. M., J. Biol. Chem., **167**, 477 (1947).
26. Freidkin M., J. Biol. Chem., **184**, 449 (1950).
27. Tener G. M., Wright R. S., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **78**, 506 (1956).
28. Tarr H. L. A., Can. J. Biochem. and Physiol., **36**, 517 (1958).

## Фосфорилирование действием дифенилхлорфосфата

К. Е. Баззю, Д. Л. Мак-Дональд



### ВВЕДЕНИЕ

Методы получения фосфорилированных производных сахаров делятся на две категории. Первая категория предполагает неконтролируемое фосфорилирование сахара с образованием полифосфорилированного продукта, который затем подвергают частичному гидролизу до желаемого фосфата. Этот метод, единственным преимуществом которого является простота, нашел ограниченное применение, однако в ряде случаев он используется, например при получении D-глюкозо-6-фосфата [1, 2].

Методы второй категории включают монофосфорилирование сахара. Для этой цели в молекулу сахара вводят заместители таким образом, чтобы оставить незамещенной только одну гидроксильную группу, которая и подвергается фосфорилированию. Защитные группы подбирают так, чтобы их легко можно было удалить на подходящей стадии синтеза. Желательно также, чтобы само фосфорилирование протекало с высоким выходом и не затрагивало других заместителей.

Для этой цели используются несколько производных фосфорной кислоты. Фосфорилирование пирофосфатами, например тетра-*n*-нитрофенилпирофосфатом [3—5] или цианэтилфосфатом в присутствии карбодимида [6], к настоящему времени недостаточно разработано. Наиболее широкое применение нашли эфиры хлорфосфорной кислоты, из которых чаще всего используются дибензилловый и дифениловый эфиры.

Дибензилхлорфосфат является отличным реагентом, его обычно применяют в пиридине. Реагент несет защитные группы, которые можно удалить каталитическим гидрированием или воздействием различных анионов. К недостаткам реагента относится его неустойчивость; в связи с этим дибензилхлорфосфат готовят непосредственно перед употреблением [7]. Дифенилхлорфосфат сравнительно устойчив и имеется в продаже. Этот реагент также используют в пиридине; он часто с высоким выходом приводит к дифенилфосфатам сахаров, и так как последние представляют собой неполярные соединения, то их можно выделить экстракцией органическим растворителем. Фенильные группы дифенилфосфата обычно снимают каталитическим гидрированием над платиной.

При наличии двух или более свободных гидроксильных групп, открытых для фосфорилирования, реакция может протекать предпочтительно по первичной спиртовой группе, если фосфорилирующий реагент взят в недостаточном количестве. Именно на этом основан успешный синтез 2-амино-2-дезоксид-глюкозо-6-фосфата [8]; аналогично синтез D-глюкозо-6-фосфата построен на избирательной активности дибензилхлорфосфата [9]. Вторичные гидроксильные группы реагируют с избытком реагента. Если две гидроксильные группы соответствующим образом примыкают к соседнему углеродному атому, по которому проведено фосфорилирование, то полученный первоначально монофосфорилированный продукт может подвергаться атаке по атому фосфора оставшейся свободной гидроксильной группой; при этом происходит элиминирование фенола и образуется циклический триэфир [10]. Этот продукт может дальше самопроизвольно расщепляться с образованием смеси дифосфорных эфиров, которые уже растворимы в воде [11].

В дополнение к синтезам, описанным ниже, аналогичные методики были применены для получения D-глицеральдегид-3-фосфата [12], 2-фосфата D-глицериновой кислоты [13], 2,3-дифосфата D-глицериновой кислоты [14], D-эритрозо-4-фосфата [15], 4-фосфата D- и L-эритрита [16], D-глюкозо-6-фосфата [17], 2-фосфата *мио*-инозита [18] и многих других соединений.

### МЕТОДИКА

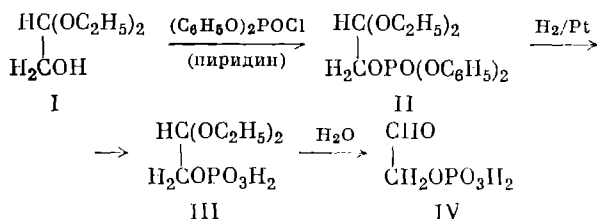
Конкретные методики, описывающие использование дифенилхлорфосфата, см. в следующей статье и работах [19, 20].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Soegmiller J. E., Horecker B. L., J. Biol. Chem., **192**, 175 (1951).
2. Viscontini M., Olivier C., Helv. Chim. Acta, **36**, 466 (1953).
3. Moffatt J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **79**, 1194 (1957).
4. Moffatt J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3741 (1957).
5. Chambers R. W., Moffatt J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3747 (1957).
6. Gilham P. T., Tener G. M., Chem. and Ind. (London), 542 (1959).
7. Atherton F. R., Biochem. Preparations, **5**, 1 (1957).
8. Maley F., Lardy H. A., J. Am. Chem. Soc., **78**, 1393 (1956).
9. Atherton F. R., Howard H. T., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1948**, 1106.
10. Kilgour G. L., Ballou C. E., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3956 (1958).
11. Pizer F. L., Ballou C. E., J. Am. Chem. Soc., **81**, 915 (1959).
12. Ballou C. E., Fischer H. O. L., J. Am. Chem. Soc., **77**, 3329 (1955).
13. Ballou C. E., Fischer H. O. L., J. Am. Chem. Soc., **76**, 3188 (1954).
14. Baer E., J. Biol. Chem., **185**, 763 (1950).
15. Ballou C. E., Fischer H. O. L., MacDonald D. L., J. Am. Chem. Soc., **77**, 5967 (1955).
16. MacDonald D. L., Fischer H. O. L., Ballou C. E., J. Am. Chem. Soc., **78**, 3720 (1956).
17. Lardy H. A., Fischer H. O. L., J. Biol. Chem., **164**, 513 (1946).
18. Iselin B. M., J. Am. Chem. Soc., **71**, 3822 (1949).
19. Ballou C. E., MacDonald D. L., in «Methods in Carbohydrate Chemistry», Academic Press Inc., New York — London, v. II, 1963, p. 277.
20. Ballou C. E., MacDonald D. L., in «Methods in Carbohydrate Chemistry», Acad. Press Inc., New York — London, v. II, 1963, p. 282.

### Фосфат гликолевого альдегида

К. Е. Баллу, Д. Л. Мак-Дональд



## ВВЕДЕНИЕ

2-Фосфат гликолевого альдегида можно получить при периодатном расщеплении 1-фосфата глицерина [1] или фосфатов сахаров, несущих концевую фосфатную группу [2]. Он был также получен фосфорилированием диэтилацетата гликолевого альдегида [3] (см. ниже).

## МЕТОДИКА

**Фосфат диэтилацетата гликолевого альдегида,  
циклогексиламмониевая соль (III) [3]**

К раствору 7,7 г диэтилацетата гликолевого альдегида (I) [3] в 50 мл сухого пиридина<sup>1</sup>, охлажденному в бане со льдом до 5°, прибавляют по каплям в течение 15 мин при перемешивании 19,0 г дифенилхлорфосфата<sup>2</sup> (1,2 моля на 1 моль ацетата). Реакционную смесь выдерживают 1 час при 5° и затем 2 час при комнатной температуре<sup>3</sup>. Избыток фосфорилирующего агента разрушают, прибавляя несколько капель воды, и, чтобы удалить основное количество пиридина, смесь упаривают в вакууме<sup>4</sup>. Остаток растворяют в 100 мл бензола<sup>5</sup> и промывают последовательно водой, холодной 1 н. соляной кислотой, холодным 1 М раствором бикарбоната натрия и водой<sup>6</sup>. Бензольный раствор высушивают сульфатом натрия и упаривают до сиропа; выход около 20 г. Теоретический выход дифенилфосфата диэтилацетата гликолевого альдегида (II) составляет 19,3 г.

Полученный продукт без дальнейшей очистки<sup>7</sup> для снятия фенольных остатков гидрируют в 500 мл абсолютного спирта над 2 г окиси платины при атмосферном давлении. Реакция завершается через 1,5 час, при этом поглощается 11,2 л водорода<sup>8</sup>. Катализатор удаляют декантированием или центрифугированием, к раствору немедленно прибавляют до pH 9 свежеперегнанный циклогексиламин и упаривают в вакууме. Полученный сироп растворяют в 20 мл воды и прибавляют около 400 мл ацетона. Смесь осторожно нагревают до кипения, раствор отфильтровывают с отсасыванием от небольшого количества нерастворимого осадка. Фильтрат охлаждают до 5°, оставляют на ночь и получают кристаллическую циклогексиламмониевую соль фосфата диэтилацетата гликолевого

<sup>1</sup> Реактивный пиридин кипятят 2 час с гидридом кальция (5 г на 1 л) и затем перегоняют.

<sup>2</sup> В некоторых случаях желательно применять избыток реагента (до 100%).

<sup>3</sup> Обычно реакция длится 18 час, но в случае пространственно затрудненных спиртов реакцию ведут при 40—60° в течение нескольких дней.

<sup>4</sup> Если упаривание проводится достаточно долго и при слишком высокой температуре, то происходит разложение хлоргидрата пиридина и образующаяся кислота вызывает разложение продукта.

<sup>5</sup> Для растворения не следует брать хлороформ, поскольку при дальнейших манипуляциях придется менять делительные воронки.

<sup>6</sup> Первой водной промывкой удаляют избыток дифенилфосфата в виде пиридиневой соли. Если для первой промывки использовать кислоту, то дифенилфосфат попадет в органическую фазу и может вызвать гидролиз лабильного продукта реакции.

<sup>7</sup> В ряде случаев необходимо обработать спиртовый раствор продукта активированным углем, промытым кислотой, чтобы убрать вещества, отравляющие катализатор.

<sup>8</sup> Чтобы гидрирование протекало быстро, необходимо энергичное перемешивание. Для этой цели хорошо подходит продолговатый прибор для гидрирования («утка»), прикрепленный к качалке. Если гидрирование протекает медленно или вообще не идет, необходимо удалить катализатор и прибавить новый. **ВНИМАНИЕ!** При проведении указанной работы ввиду опасности взрыва следует соблюдать все необходимые меры предосторожности.

альдегида (если кристаллизации не происходит, к смеси прибавляют дополнительное количество циклогексиламина, чтобы образовалась заведомо бис-циклогексиламмониевая соль). Вещество отфильтровывают, промывают на фильтре ацетоном и высушивают на воздухе; выход  $\sim 20$  г. Полученную соль перекристаллизовывают, как описано выше и получают 19 г моногидрата бис-циклогексиламмониевой соли, мол. вес 430.

При нагревании в вакууме вещество теряет кристаллизационную воду при  $57^\circ$  и становится резиноподобным. После высушивания в вакууме при комнатной температуре вещество темнеет при  $195^\circ$  и затем плавится с разложением при  $200^\circ$ .

Несобычайная легкость, с которой монозамещенные эфиры углеводов образуют кристаллические соли с циклогексиламином, заслуживает того, чтобы об этом напомнить еще раз. Обычно этот прием применяют к соединениям, не содержащим свободной карбонильной группы, поскольку образование основания Шиффа может вызвать затруднения. Тем не менее циклогексиламмониевая соль 1,6-дифосфата-D-фруктозы [4] была одной из первых солей такого типа, а впоследствии было получено еще несколько таких соединений. Многие фосфорные эфиры, полученные из различных производных сахаров, выделяют в виде кристаллических циклогексиламмониевых солей кристаллизацией из воды с добавлением ацетона или из спирта с добавлением эфира. Некоторые из этих солей кристаллизуются из абсолютного спирта, например соли D,L-глицеро-1-фосфата и 2-фосфата глицерина. Очень низкая растворимость циклогексиламмонийфосфата в горячем или холодном абсолютном спирте способствует удалению неорганического фосфата, если продукт реакции растворим в спирте. Устойчивость (константы диссоциации) циклогексиламмониевых солей фосфорных эфиров различна, и некоторые соли кристаллизуются менее чем с двумя молекулами амина на молекулу монозамещенного фосфорного эфира. Фосфорные эфиры сахаров, содержащие несколько фосфатных групп, вследствие повышенного значения рК одной из фосфатных групп склонны кристаллизоваться с тремя молекулами амина на две фосфатные группы. Это обстоятельство может привести к трудностям при получении аналитически чистого вещества. Однако достоинства метода в данном случае существеннее его недостатков. Избыток циклогексиламина легко удаляется из раствора при упаривании в вакууме.

### *Раствор фосфата гликолевого альдегида*

Раствор 100 мг циклогексиламмониевой соли фосфата диэтилацеталь гликолевого альдегида (III) [3] в 10 мл воды перемешивают с 2 мл смолы дауэкс 50 ( $H^+$ , 200—400 меш) в течение 1 мин, чтобы удалить амин; смолу отфильтровывают и фильтрат выдерживают при  $40^\circ$ . Из раствора отбирают аликвотные пробы и анализируют их на свободный альдегид по модифицированному методу Вильштеттера-Шуделя [5]. Анализ показывает, что ацеталь гидролизуются на 80% за 5 час и практически нацело за 18 час; к этому времени раствор показывает 104% вычисленной восстанавливающей активности<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> При получении биологически активных фосфатов анализ обычно даст 90—100% теоретического выхода. Но в тех случаях, когда гидролиз длится несколько дней (например, гидролиз 3-фосфата диметилацеталь оксипировинной кислоты), может образовываться некоторое количество неорганического фосфата за счет распада целевого продукта. Скорости гидролиза некоторых ацеталей приведены в таблице. Другая методика гидролиза ацеталей используется при синтезе D,L-глицеральдегид-3-фосфата [8].

## Гидролиз ацеталей

Соединение <sup>а</sup>	Продолжительность гидролиза, часы
Диметилацеталь фосфата диоксиацетона . . . . .	4
Диэтилацеталь 3-фосфата D, L-глицеральдегида . . .	18
Диметилацеталь D-эритрозо-4-фосфата . . . . .	18
Диметилацеталь 3-фосфата D-глицеральдегида . . . . .	48
Диэтилацеталь 3-фосфата оксигировиноградной кислоты . . .	72
Диметилацеталь 3-фосфата оксигировиноградной кислоты . .	96
Диметилацеталь 2-дезоксид-эритро-пентозо-5-фосфата . . . .	0,75
2-Дезоксиметил-D-эритро-пентофуранозидо-5-фосфат . . .	96

<sup>а</sup> Взяты примерно 0,04 М растворы свободных фосфатов в воде при 40°; для производных 2-дезоксид-эритро-пентозы взяты 0,01 М растворы при 20—25°.

При хроматографировании полученного раствора на ватмане № 1, промытом кислотой, в системе растворителей *n*-бутанол — пикриновая кислота [6] обнаруживается только один фосфатсодержащий компонент с  $R_f$  0,40, идентичный фосфату гликолевого альдегида, полученному при периодатном расщеплении 1-фосфата D,L-глицерина.

При гидролизе 1 н. серной кислотой при 100° до неорганического фосфата продукт расщепляется наполовину за 16 мин. При действии 1 н. раствора едкого натра в течение 20 мин при комнатной температуре образуется только 5% неорганического фосфата; основной продукт реакции представляет смесь дифосфатов тетроз, которые образовались вследствие альдольной конденсации [7].

Кристаллическая бруциновая соль (т. пл. 100—120°) образуется с теоретическим выходом. Температура плавления вещества <sup>1</sup> повышается на 20—30° после продолжительного высушивания в вакууме при 60°.

## ЛИТЕРАТУРА

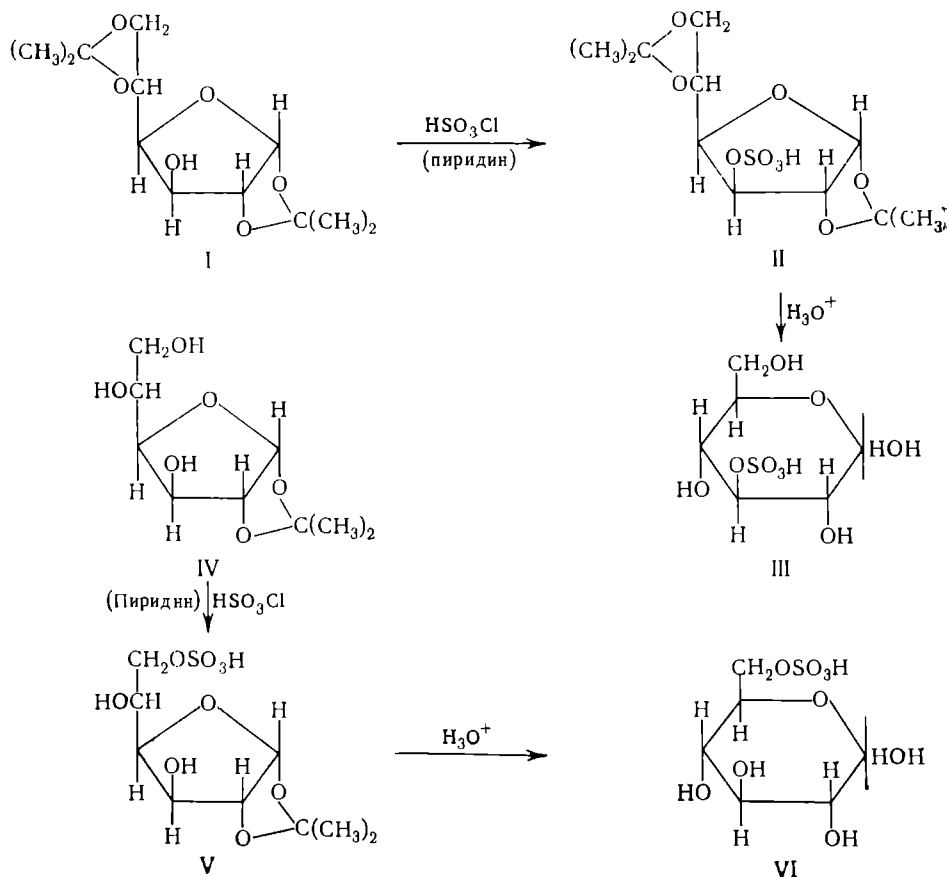
1. Fleury P., Courtois J., Desjober t A., Bull. soc. chim. France, 694 (1948).
2. Loring H. S., Levy L. W., Moss L. K., Ploeser J. M., J. Am. Chem. Soc., 78, 3724 (1956).
3. Ballou C. E., Arch. Biochem. Biophys., 78, 328 (1958).
4. McGilvery R. W., J. Biol. Chem., 200, 835 (1953).
5. Auerbach F., Bodländer F., Z. angew. Chem., 36, 602 (1923).
6. Hanes C. S., Isherwood F. A., Nature, 164, 1107 (1949).
7. Backer E., Klybas V., Schramm M., J. Biol. Chem., 234, 2510 (1959); Fluharty A. L., Ballou C. E., J. Biol. Chem., 234, 2517 (1959).
8. Ballou C. E., McDonald C. E., Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 289.

<sup>1</sup> Кристаллические бруциновые соли фосфата диоксиацетона и 3-фосфата D-глицеральдегида с хорошими результатами элементарного анализа можно приготовить по аналогичной методике. Однако они имеют только 60—80% ожидаемой биологической активности и разлагаются в течение нескольких дней. Таким образом, «аналитически чистая» бруциновая соль такого рода соединений не может рассматриваться как чистый материал.

## Сульфаты

### 3-Сульфат и 6-сульфат D-глюкозы

*Р. Л. Уистлер, В. В. Спенсер, Дж. Н. Бемиллер*



## ВВЕДЕНИЕ

Сульфаты моносахаридов обычно получают при взаимодействии производных сахаров, растворенных в пиридине, с хлорсульфоновой кислотой [1, 2], тионилхлоридом [3], пиридинсульфотриоксидом [4—7, 9, 10] или концентрированной серной кислотой [9]. Прямое сульфирование сахара используется сравнительно редко (ср., однако, [6, 7, 11]), поскольку возникают трудности, связанные с высокой реакционной способностью сульфлирующих агентов, с выделением кристаллических продуктов, с возможностью образования смеси моно- и полисульфатов. В тех случаях, когда применяется прямое сульфирование, кислый сульфат образуется преимущественно по первичной спиртовой группе. В приведенных ниже методиках предусматривается использование хлорсульфоновой кислоты и пиридинсульфотриоксида; первая методика предложена Персивал [2], вторая — Гюзели и Руоффом [7].



## МЕТОДИКА

*D*-Глюкозо-3-сульфат [2]

К раствору 8 г 1,2;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (I) (см. стр. 162) в 80 мл сухого пиридина (см. стр. 91, 115, 130, 152) при  $-18^\circ$  прибавляют по каплям в течение 2 час раствор 4 мл хлорсульфоновой кислоты в 25 мл свободного от спирта хлороформа так, чтобы температура не превышала  $-15^\circ$ . Смесь оставляют на ночь при комнатной температуре, затем снова охлаждают до  $-18^\circ$  и прибавляют раствор 5 мл воды в 20 мл пиридина. К смеси прибавляют 100 мл воды и подщелачивают по фенолфталеину насыщенным раствором гидроокиси бария. Избыток щелочи нейтрализуют углекислым газом. Смесь упаривают в вакууме при  $35^\circ$  до 100 мл в присутствии карбоната бария. Затем прибавляют небольшой избыток насыщенного раствора сульфата серебра, осадок отфильтровывают и, чтобы удалить ионы серебра, в полученный раствор пропускают ток сероводорода в присутствии карбоната бария. Смесь фильтруют и выдувают сероводород воздухом. Фильтрат снова подщелачивают по фенолфталеину раствором гидроокиси бария и нейтрализуют двуокисью углерода, как описано выше. Смесь фильтруют, фильтрат упаривают при  $35^\circ$  в вакууме досуха в присутствии карбоната бария. Остаток несколько раз экстрагируют кипящим петролевым эфиром (т. кип.  $40-60^\circ$ , всего 500 мл), чтобы удалить непрореагировавшей 1,2;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозу. Полученный остаток экстрагируют кипящим ацетоном, экстракт фильтруют, упаривают до 20 мл и прибавляют 200 мл эфира. Раствор фильтруют, упаривают, стекловидный остаток растворяют в воде и упаривают при комнатной температуре. Полученную кристаллическую бариевую соль 1,2;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозо-3-сульфата (II) отфильтровывают, промывают спиртом и высушивают над пятиокисью фосфора в вакууме; выход 6,0 г,  $[\alpha]_D^{25} -10,5^\circ$  (с 2,4 в воде).

Для спятия изопропилиденовых групп вещество растворяют в 200 мл 0,2 н. серной кислоты и выдерживают 48 час при  $38^\circ$ . Смесь нейтрализуют избытком карбоната бария, нейтральный раствор фильтруют и упаривают при  $35^\circ$  в вакууме до получения стекловидного остатка, который дважды экстрагируют кипящим спиртом в присутствии карбоната бария. Остаток растворяют в воде и осаждают спиртом. Полученная бариевая соль D-глюкозо-3-сульфата (III) имеет вид белого порошка, выход 5,8 г,  $[\alpha]_D^{20} +29^\circ$  (с 2,2 в воде).

Для получения калиевой соли [5] бариевую соль растворяют в минимальном количестве воды и пропускают через колонку с дауэксом 50 ( $H^+$ ). Кислый элюат и промывные воды нейтрализуют 0,05 M раствором едкого кали до pH 7,4 и упаривают до небольшого объема в вакууме при  $35^\circ$ .

Калиевую соль осаждают, прибавляя 5 объемов спирта, осадок отфильтровывают, промывают абсолютным спиртом, эфиром и высушивают в вакууме над хлористым кальцием.

*D*-Глюкозо-6-сульфат

## Сульфирование хлорсульфоновой кислотой [2]

Раствор 11 г 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (IV) в 60 мл сухого пиридина (см. стр. 91, 115, 130, 152) обрабатывают 3,7 мл хлорсуль-

фоновой кислоты в 35 мл сухого хлороформа, как при получении бариевой соли 1,2;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозо-3-сульфата (см. выше). Этой методике следуют вплоть до стадии удаления сероводорода, после чего раствор упаривают досуха в присутствии карбоната бария, а полученный остаток несколько раз экстрагируют кипящим ацетоном (всего ~500 мл). Экстракты объединяют и упаривают до 50 мл. Прибавляя 50 мл эфира, осаждают бариевую соль 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозо-6-сульфата (V) и высушивают ее в вакууме над пятиокисью фосфора; выход 8 г,  $[\alpha]_D^{25} -4^\circ$  (с 2,7 в воде).

Остаток после экстракции ацетоном экстрагируют водой, водный раствор фильтруют и упаривают; получают бариевую соль 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозо-3-сульфата (V), выход 5 г,  $[\alpha]_D^{25} -4^\circ$  (с 3,0 в воде).

Бариевую соль D-глюкозо-6-сульфата (VI) получают из изопропилиденового производного по методике, описанной выше для D-глюкозо-3-сульфата;  $[\alpha]_D^{25} +30^\circ$  (с 0,9 в воде).

#### Сульфирование пиридин — сульфотриоксидом [7]

К раствору 5,22 г (0,015 моля) 1,2,3,4-тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозы (стр. 176) в 20 мл безводного пиридина (см. стр. 91), помещенного в закрывающуюся стеклянной пробкой колбу емкостью 50 мл, прибавляют 2,39 г (0,015 моля) пиридин — сульфотриоксида [7]. Смесь встряхивают до полного растворения и оставляют на ночь при комнатной температуре. Прибавляют 50 мл воды и полученный раствор нейтрализуют до pH 7,5 водным раствором гидроокиси бария. Образовавшуюся суспензию упаривают в вакууме досуха, остаток суспендируют в 60 мл воды. (Если суспензия имеет кислую реакцию, ее нейтрализуют до pH 7,0 раствором гидроокиси бария. Нейтрализацию и упаривание повторяют до тех пор, пока суспензия остатка не будет иметь pH 7,0.) Нерастворимые неорганические соли отделяют центрифугированием, раствор в случае необходимости обрабатывают углем и упаривают в вакууме до получения густого сиропа, который растворяют в 30—40 мл метанола. К метанольному раствору прибавляют эфир до помутнения и выдерживают в холодильнике до окончания кристаллизации. Кристаллы отфильтровывают, промывают смесью метанол — эфир (1 : 1 по объему) и эфиром. Перекристаллизация осуществляется упариванием раствора в 98%-ном спирте; выход 2,3 г (30%) дигидрата бариевой соли 1,2,3,4-тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозо-6-сульфата, т. пл. 105—106° (с разл.)  $[\alpha]_D^{25} +12^\circ$  (с 3,0 в воде).

Раствор 1,00 г дигидрата бариевой соли 1,2,3,4-тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозо-6-сульфата в 10 мл безводного метанола [8] охлаждают до 0°, насыщают безводным аммиаком и оставляют на ночь при комнатной температуре. Аммиак и метанол отгоняют в вакууме, к остатку прибавляют несколько миллилитров абсолютного спирта и упаривают досуха, чтобы убрать следы влаги. Для удаления ацетамида остаток трижды промывают абсолютным спиртом, затем растворяют в 20 мл воды. Полученный раствор доводят до pH 7,5 раствором гидроокиси бария, обрабатывают углем, как описано выше, фильтруют и упаривают в вакууме. К остатку прибавляют абсолютный спирт, осадок бариевой соли D-глюкозо-6-сульфата отфильтровывают, промывают абсолютным спиртом, эфиром и высушивают в вакууме над пятиокисью фосфора; выход 0,35 г (53%).

## Прямое сульфирование пиридин — сульфотриоксидом [7]

21,6 г (0,12 моля) безводной  $\alpha$ -D-глюкозы растворяют в 300 мл безводного диметилформамида при нагревании до  $\sim 50^\circ$  в трехгорлой круглодонной колбе емкостью 1 л, снабженной воздушным холодильником, осушительной трубкой, стеклянной мешалкой и капельной воронкой. К охлажденному до комнатной температуры раствору прибавляют в течение 1,5 час при перемешивании раствор 19,0 г (0,12 моля) пиридин — сульфотриоксида в 125 мл безводного диметилформамида. Смесь перемешивают еще 1 час, после чего упаривают диметилформамид в вакууме при температуре не выше  $35^\circ$ ; полученный сироп растворяют в 125 мл воды, раствор нейтрализуют до pH 7,5 водным раствором гидроокиси бария. Суспензию упаривают в вакууме до образования пасты и эту пасту суспендируют в 100 мл воды. (Если суспензия имеет кислую реакцию, прибавляют дополнительное количество раствора гидроокиси бария до pH 7,0—7,5; воду упаривают в вакууме и всю процедуру повторяют до тех пор, пока pH суспензии не останется постоянным и равным 7,0—7,5.) Суспензию нагревают до  $40^\circ$ , центрифугируют, обрабатывают углем и фильтруют. Регулярно проверяют pH суспензии и в случае необходимости прибавляют раствор гидроокиси бария. Раствор упаривают в вакууме до сиропа, из которого осаждают бариевую соль D-глюкозо-6-сульфата. Осаждение проводят следующим образом. К остатку прибавляют метанол порциями по несколько миллилитров и перемешивают каждый раз до растворения. Когда растворение уже не происходит, прибавляют в один прием 500 мл метанола. Колбу закрывают и энергично встряхивают 30 сек вручную, а затем в течение ночи на механической качалке. Полученный осадок отфильтровывают и промывают с отсасыванием один раз метанолом и два раза эфиром, затем выдерживают над пятиокисью фосфора в вакууме; выход 16,6 г (40%). При добавлении к маточному раствору промывного эфира получают дополнительно 5,8 г (14%) вещества.

*Бруциновая соль  $\alpha$ -D-глюкозо-6-сульфата.* Неочищенную бариевую соль D-глюкозо-6-сульфата (25 г) растворяют в 175 мл воды, раствор пропускают через колонку ( $1,5 \times 40$  см) с амберлитом IR-120 ( $H^+$ ) со скоростью 3 мл/мин. Колонку промывают водой до нейтральной реакции промывных вод. К объединенному водному раствору прибавляют раствор бруцина в спирте до pH 6,0. Спирт отгоняют в вакууме, водный раствор промывают хлороформом ( $2 \times 75$  мл) и эфиром ( $2 \times 50$  мл), после чего концентрируют в вакууме до 150—200 мл и нагревают до  $40^\circ$ . К теплomu раствору прибавляют ацетон до образования устойчивой мути. Смесь медленно охлаждают до комнатной температуры, а затем выдерживают в холодильнике; при этом выпадает очень мелкий кристаллический осадок. Осадок отфильтровывают, промывают 90%-ным ацетоном, ацетоном и высушивают на воздухе. Трехкратную перекристаллизацию полученной соли выполняют тем же образом, (x г бруциновой соли растворяют в 3x мл воды, нагревают до  $40^\circ$  и прибавляют 12x мл ацетона), обрабатывают углем и получают почти чистую бруциновую соль  $\alpha$ -D-глюкозо-6-сульфата. Выход 15,2 г (30,5%),  $[\alpha]_D^{20} -2$  (5 мин)  $\rightarrow -6,5^\circ$  (равновесие; с 4,8 в воде).

*Калиевая соль  $\beta$ -D-глюкозо-6-сульфата.* К раствору 15,0 г бруциновой соли  $\alpha$ -D-глюкозо-6-сульфата в 500 мл воды прибавляют 1 н. раствор едкого кали до pH 9,5. Смесь охлаждают несколько минут в бане со льдом и отфильтровывают выпавший бруцин. Фильтрат промывают дважды

хлороформом (сначала 100 мл и затем 80 мл), дважды эфиром (сначала 100 мл и затем 80 мл), концентрируют в вакууме до ~35 мл и прибавляют к остатку абсолютный спирт до появления мути (в случае образования желеобразного осадка смесь центрифугируют) и оставляют кристаллизоваться. Калиевую соль  $\beta$ -D-глюкозо-6-сульфата отфильтровывают, промывают 50–60%-ным спиртом, абсолютным спиртом и высушивают на воздухе. Продукт перекристаллизовывают тем же способом; выход 4,2 г (65%), т. пл. 170–173° (с разл.),  $[\alpha]_D^{20} +16,5$  (5 мин)  $\rightarrow +37^\circ$  (равновесие; с 3,0 в воде).

### Определение серы

Образец (0,5 г) кипятят 12–16 час в 250 мл 10%-ной соляной кислоты, раствор количественно переносят в стакан емкостью 400 мл и прибавляют 25 мл 10%-ного раствора хлористого бария. Осадок сульфата бария отфильтровывают на взвешенном тигле Гуча. Тигель с осадком выдерживают 1 час при 300°, после чего прокаливают 1 час при 600°.

$$\text{Содержание серы, \%} = \frac{0,13737 \cdot \text{Вес сульфата бария, г}}{\text{Вес образца, г}}$$

### ЛИТЕРАТУРА

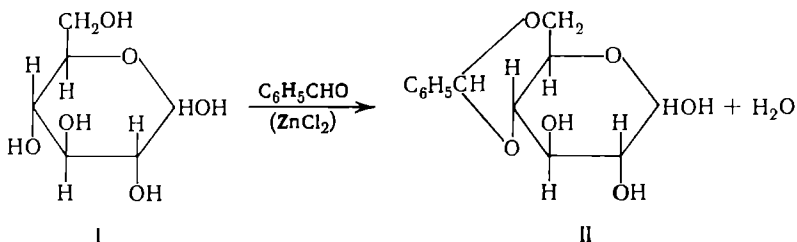
1. Neuberg C., Liebermann L., Biochem. Z., **121**, 326 (1924).
2. Percival E. G. V., J. Chem. Soc., **1945**, 119.
3. Levene P. A., Meyer G. M., J. Biol. Chem., **53**, 437 (1922).
4. Duff R. B., J. Chem. Soc., **1949**, 1597.
5. Turvey J. R., Clancy M. J., Nature, **183**, 537 (1959).
6. Lloyd A. G., Nature, **183**, 109 (1959); Biochem. J., **75**, 478 (1960).
7. Guiseley K. B., Ruoff P. M., J. Org. Chem., **26**, 1248 (1961).
8. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 282.
9. Guiseley K. B., Ruoff P. M., J. Org. Chem., **27**, 1479 (1962).
10. Peat S., Turvey J. R., Clancy M. J., Williams T. P., J. Chem. Soc., **1960**, 4761.
11. Saito T., Noguchi J., Nippon Kagaku Zasshi, **82**, 471 (1961); Saito T., Noguchi J., Komatsu K., ibid., **82**, 472 (1961).

# Бензилиденовые и изопропилиденовые производные

## Бензилиденовые производные

### 4,6-О-Бензилиден-D-глюкопираноза

Х. Г. Флетчер, м.л.



## ВВЕДЕНИЕ

4,6-О-Бензилиден-D-глюкопираноза (II), являющаяся циклическим ацеталем, была впервые описана Зервасом в 1931 г. [1]. Это соединение представляет собой удобный промежуточный продукт в различных синтетах. Излагаемая здесь усовершенствованная модифицированная методика Зерваса предложена Вудом, Дилом и Флетчером [2]; она состоит в конденсации безводной D-глюкозы с бензальдегидом в присутствии безводного хлористого цинка. Пример аналогичного введения бензилиденовой группировки приведен в работе [3].

## МЕТОДИКА

Безводную D-глюкозу тщательно измельчают и высушивают при 60° и остаточном давлении менее 50 мм в течение 2 час. Хлористый цинк плавят и измельчают. Бензальдегид также желательно очистить непосредственно перед введением в реакцию. Для этого предварительно удаляют примесь бензойной кислоты, промывая бензальдегид насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, после чего его высушивают безводным гранулированным сульфатом натрия и перегоняют в вакууме или в токе азота. 10 г D-глюкозы и 40 г хлористого цинка встряхивают с 200 мл бензальдегида при температуре ~28° в течение 4 час. Реакционную смесь охлаждают в бане со льдом, разбавляют 250 мл воды и выдерживают 30 мин при 0°. Выпавшую кристаллическую массу отфильтровывают, промывают на фильтре холодной водой (2 × 25 мл) и пентаном (2 × 25 мл) и высушивают на воздухе. Выход неочищенной 4,6-О-бензилиден-D-глюкопиранозы 7,5 г, т. пл. 140—150° (испр.),  $[\alpha]_D^{20} +19^\circ$  (с 3,4 в метаноле; равновесие; мутаротирует влево). Вторую порцию вещества можно выделить из водного слоя и объединенных промывных вод следующим образом. Водный раствор экстрагируют эфиром (2 × 100 мл) для удаления 1,2;4,6-ди-О-бензилиден-α-D-глюкопиранозы и фильтруют через 30 г активированного угля. Адсорбент промывают 100 мл воды, экстрагируют 100 мл горячего диоксана и в заключение промывают 50 мл теплого диоксана. Диоксановые экстракты объединяют и упаривают в вакууме. Кристаллический остаток перекристаллизовывают.

вают из 10 мл диоксана. Таким путем получают дополнительно 1,8 г 4,6-О-бензилиден-D-глюкопиранозы с т. пл. 155—161° (испр.),  $[\alpha]_D^{20} -2,5^\circ$  (с 4,0 в метаноле; равновесие; мутаротирует влево).

Всю полученную 4,6-О-бензилиден-D-глюкопиранозу (II) перекристаллизовывают из смеси диоксана и хлороформа и затем из воды. Для этого к 8,2 г почти чистого препарата прибавляют 90 мл кипящей воды, содержащей 9 капель концентрированного водного аммиака. Смесь встряхивают не более 1 мин и быстро фильтруют через очень тонкий слой активированного угля. Фильтрат немедленно охлаждают в бане со льдом<sup>1</sup>. По окончании кристаллизации (0°) чистую 4,6-О-бензилиден-D-глюкопиранозу отфильтровывают. Выход 6,3 г (42%), т. пл. 186—187° (испр.),  $[\alpha]_D^{20} -5^\circ$  (с 2,6 в метаноле; равновесие; мутаротирует влево).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zervas L., Ber., 64, 2289 (1931).
2. Wood H. B., Jr., Diehl H. W., Fletcher H. G., Jr., J. Am. Chem. Soc., 79, 1986 (1957).
3. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc, New York — London, 1962, vol. I, p. 90.

## Изопропилиденовые производные

О. Т. Шмидт

### ВВЕДЕНИЕ

Изопропилиденовые производные сахаров [1] находят большое применение. Эти соединения образуются из циклических форм сахаров при конденсации ацетона с вицинальными *цис*-гидроксильными группами, связанными с пиранозным или фуранозным циклом, или с экзоциклическим гидроксильным и гидроксильным цикла (как, например, в 2,3;4,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозиде). В ациклических соединениях благодаря свободному вращению углерод-углеродной цепи *эритро*-конфигурация соседних гидроксильных групп не обязательна для успешной реакции с ацетоном. Примером такого рода может служить дибензилдитеоацеталь 2,3;4,5-ди-О-изопропилиден-L-фукозы (6-дезоксид-галактозы) [2], в котором асимметрические центры C-2 — C-3 и C-4 — C-5 имеют *трео*-конфигурацию. В определенных случаях в процессе конденсации с ацетоном пиранозные формы сахаров претерпевают превращение в фуранозные формы, как это имеет место, например, в реакции D-глюкозы, D-маннозы и D-ксилозы.

Изопропилиденовые производные часто представляют собой легко кристаллизующиеся вещества, которые могут быть перегнаны в высоком вакууме без разложения. Как правило, они устойчивы к щелочам, но гидролизуются водными растворами кислот. В большинстве случаев нагревание этих соединений на кипящей водяной бане с разбавленными минеральными кислотами в течение нескольких часов приводит к полному удалению изопропилиденовых групп. Иногда различие в скоростях

<sup>1</sup> Быстрота манипуляций является обязательным условием на этой стадии, так как продолжительное нагревание раствора приводит к резкому снижению выхода.

гидролиза двух изопропилиденовых групп, находящихся в одной молекуле, бывают столь значительным, что удается осуществить избирательный гидролиз и удалить одну из изопропилиденовых групп, не затрагивая другую, как, например, при синтезе 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы из 1,2;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы.

Для введения изопропилиденовых группировок в сахара и их производные обычно используют три метода.

1. Катализ минеральными кислотами: синтеза 1,2;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы, 2,3;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-маннофуранозы и 2,3-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозиды.

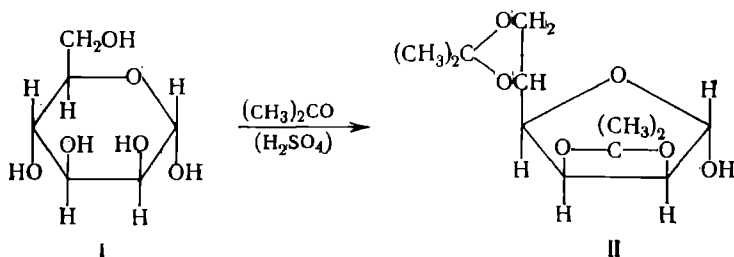
2. Катализ хлористым цинком: синтез 1,2;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы.

3. Катализ безводным сульфатом меди(II): синтеза 1,2;3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопиранозы и 2,3;4,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозиды. Дополнительные примеры можно найти в других разделах этой книги.

Частичный гидролиз диизопропилиденных производных сахаров иллюстрируется на примере двух методов синтеза 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы.

## МЕТОДИКИ

### 2,3;5,6-Ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-маннофураноза (II) [3, 4]



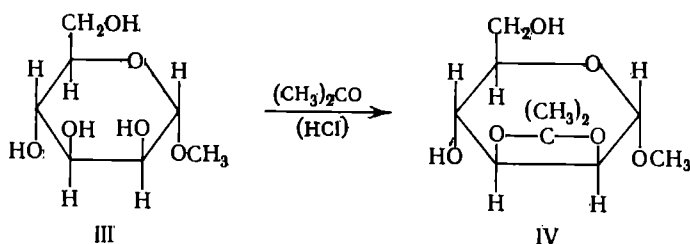
20 г  $\alpha$ -D-маннозы (I) встряхивают с 30-кратным количеством безводного ацетона<sup>1</sup>, содержащего 14 мл концентрированной серной кислоты. Через 3—4 час весь сахар переходит в раствор. Светло-желтый раствор нейтрализуют безводным карбонатом натрия и фильтруют. Фильтрат кипятят в течение 1 час с углем и несколькими граммами карбоната натрия, после чего смесь фильтруют и фильтрат упаривают в вакууме. 2,3;5,6-Ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-маннофуранозу (II) растворяют в минимальном количестве эфира и осаждают петролевым эфиром; выход 20 г. Из маточного раствора можно дополнительно получить еще 6—7 г вещества. Общий выход 92%. Вещество легко растворимо в спирте, ацетоне и хлороформе, растворимо в эфире (в 8 частях), бензоле и воде. Его можно перекристаллизовать из петролевого эфира, т. пл. 122—123°,  $[\alpha]_D^{25} +38 \rightarrow +17^\circ$  (с 1,0 в ацетоне) [5],  $[\alpha]_D^{25} +31,5 \rightarrow +10^\circ$  (с 0,55 в 1,1,2,2-тетрахлортане) [5],  $[\alpha]_D^{25} +16^\circ$  (с 2,6 в этаноле),  $[\alpha]_D^{25} +12 \rightarrow -6$  (1 час)  $\rightarrow +1^\circ$  (45 час; с 0,45 в воде) [5].

<sup>1</sup> Обычно требуется абсолютный ацетон, свободный от спиртов и воды, поскольку следы спиртов часто приводят к образованию гликозидов, а следы воды снижают выход. Можно пользоваться и продажным ацетоном, однако лучше всего применять абсолютный растворитель, приготовленный следующим образом. Продажный ацетон кипятят с небольшим количеством перманганата калия до устойчивой лиловой окраски, после чего перегоняют и высушивают в течение 2 дней безводным поташом или сульфатом кальция. Сушитель удаляют и проводят заключительную перегонку.

В 2,3;5,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-маннофуранозе гидроксил в положении C-1 свободен. Тем не менее это соединение не восстанавливает фелингову жидкость, но может окисляться перманганатом калия в 2,3;5,6-ди-О-изопропилиден-D-манноновую кислоту [6]. Эту кислоту можно осадить в виде кристаллической натриевой соли из раствора в 2 н. едком натре 50%-ным раствором едкого натра [4а].

Другой удачный метод получения описан Фриденбергом и сотр. [7].

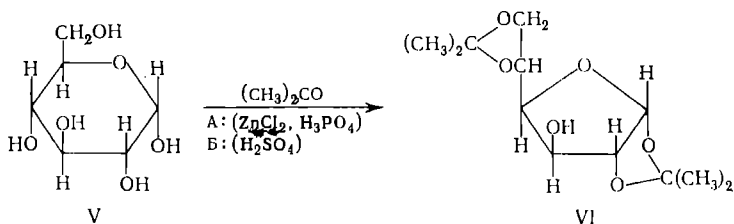
**2,3-О-Изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид (IV)  
и 2,3;4,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид [8]**



15 г  $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид (III) [9] (см. также [24]) встряхивают с 500 мл безводного ацетона, содержащего 1% сухого хлористого водорода. Встряхивание продолжают до тех пор, пока весь твердый материал не перейдет в раствор (около 10 дней). Ацетоновый раствор нейтрализуют карбонатом серебра, фильтруют и упаривают в вакууме в присутствии небольшого количества карбоната бария. Сиропообразный остаток экстрагируют кипящим петролейным эфиром (т. кип. 40–60°) для удаления 2,3;4,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид и продуктов конденсации ацетона. Остаток после экстракции в виде вязкого сиропа 2,3-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид (IV) кристаллизуется. Его перекристаллизовывают из смеси спирт — петролейный эфир; выход 6 г, т. пл. 105°, т. кип. 145°/0,02 мм,  $[\alpha]_D^{20} +28^\circ$  (с 4,3 в метаноле),  $[\alpha]_D^{20} +24^\circ$  (с 4,0 в воде). Он легко растворим в обычных органических растворителях, за исключением петролейного эфира.

2,3-О-Изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид можно окислить щелочным перманганатом калия в 2,3-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозидуроновую кислоту, из которой частичным гидролизом с удалением изопропилиденовой группы можно получить  $\alpha$ -метил-D-маннопиранозидуроновую кислоту. Гидролиз последней приводит к D-манну-роно-6,3-лактону [8] (см. также стр. 225).

**1,2;5,6-Ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофураноза (VI)  
[1а, 1б, 1г, 10]**





## Методика А [10]

К интенсивно перемешиваемой суспензии 150 г безводной  $\alpha$ -D-глюкозы (V) в 1 л безводного ацетона прибавляют 120 г измельченного безводного хлористого цинка и затем 7,5 г 85%-ной фосфорной кислоты. Смесь перемешивают 30 час при комнатной температуре, после чего непрореагировавшую D-глюкозу (61,8 г) отделяют и промывают небольшим количеством ацетона. Объединенные фильтрат и промывной ацетон охлаждают и прибавляют раствор 85 г едкого натра в 85 мл воды до слабощелочной реакции раствора. Нерастворимый неорганический осадок отделяют фильтрованием и промывают ацетоном. Почти бесцветные фильтрат и промывной ацетон объединяют и концентрируют в вакууме, остаток разбавляют 150 мл воды и раствор экстрагируют хлороформом ( $3 \times 150$  мл). Объединенные хлороформные экстракты промывают небольшим количеством воды и упаривают в вакууме. Белый кристаллический остаток представляет собой неочищенную 1,2;5,6-ди-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозу (VI); выход 115,4 г (91%, считая на вступившую в реакцию D-глюкозу), т. пл. 95—101°. Одна перекристаллизация из смеси хлороформа и гексана (1 : 2 по объему) поднимает температуру плавления до 105—109°; из лигроина (т. кип. 90°) получают препарат с т. пл. 110—111° (испр.) [1г], т. кип. 148°/0,1 мм [11],  $[\alpha]_D^{20}$  —18,5° (с 5 в воде) [1а],  $[\alpha]_D^{20}$  —19° (с 5 в ацетоне) [12],  $[\alpha]_D^{20}$  —13,5° (в хлороформе) [13].

Ди-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофураноза легко растворима в воде и большинстве органических растворителей и менее растворима в петролейном эфире. Описано множество других удобных методик ее получения, некоторые из них приведены в работах [7, 14—16].

Методика Б. 1,2; 5,6-Ди-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофураноза и 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофураноза [17]

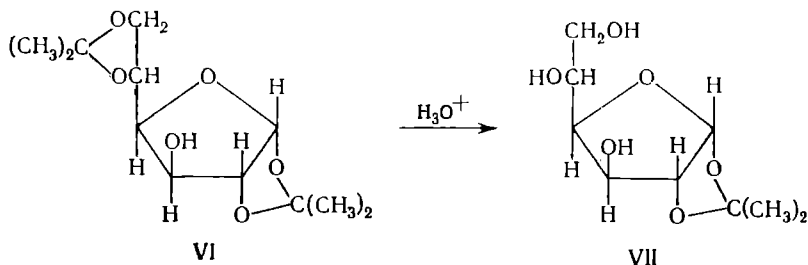
200 г безводной  $\alpha$ -D-глюкозы, измельченной в гомогенизаторе Уоринга, интенсивно перемешивают с 4 л ацетона при охлаждении в бане со льдом. К смеси порциями по 20 мл через 10—15 мин прибавляют 160 мл 96%-ной серной кислоты, поддерживая при этом температуру 5—10°. После этого реакционную смесь перемешивают еще 5 час, постепенно поднимая температуру до 20—25°. Раствор вновь охлаждают в бане со льдом и прибавляют при перемешивании 50%-ный раствор едкого натра (245 г едкого натра в 300 мл воды), доводя pH раствора приблизительно до нейтрального. Во избежание разогревания нейтрализацию следует проводить медленно. Для поддержания нейтральности раствора прибавляют небольшое количество бикарбоната натрия и смесь оставляют на ночь. Неорганические соли отфильтровывают и после упаривания в вакууме ацетонового раствора получают густой сироп, затвердевающий при стоянии. Смесь растворяют в хлороформе<sup>1</sup> при нагревании на водяной бане, раствор экстрагируют водой и водный экстракт промывают хлороформом. Хлороформные растворы, содержащие ди-O-изопропилиденное производное, объединяют и упаривают в вакууме. Перекристаллизацией оставшегося после упаривания сиропа из циклогексана получают 1,2;5,6-ди-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозу, выход 121 г, т. пл. 110°.

<sup>1</sup> Хлороформ можно заменить более дешевым дихлорэтаном.

Водные растворы содержат моно-О-изопропилиденовое производное. Их объединяют и полученный после упаривания в вакууме сироп перекристаллизовывают из этилацетата. Выход 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы 37 г, т. пл. 160°.

### 1,2-О-Изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофураноза (VII)

#### Методика А



Для получения 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы можно использовать методику, применяемую для получения 1,2-О-изопропилиден- $\beta$ -L-глюкофуранозы [15].

4,5:1,2;5,6-Ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (VI) с т. пл. 110° растворяют в 23,4 мл метанола, прибавляют 23,4 мл 0,8%-ной серной кислоты и оставляют на 22 час (по истечении этого времени смесь еще не восстанавливает фелингову жидкость). Раствор нейтрализуют карбонатом бария, нагревают до кипения и фильтруют. Фильтрат упаривают в вакууме, остаток кристаллизуют из смеси метанол — эфир. 1,2-О-Изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофураноза выпадает в виде бесцветных игл, выход 3,6 г (95%), т. пл. 160—161°,  $[\alpha]_D^{19} -11,4 \pm 2^\circ$  (с 1,1 в воде). Вещество растворимо в воде, спирте и ацетоне, не растворимо в эфире [1в].

#### Методика Б

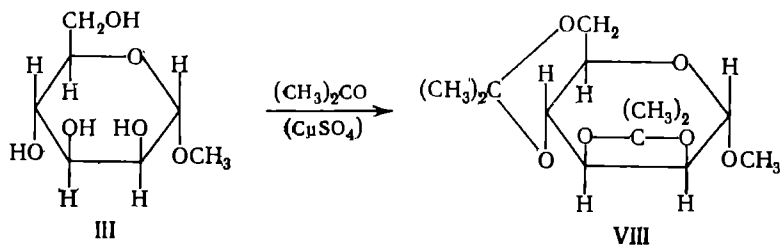
Удобный способ получения моно-О-изопропилиден-D-глюкозы без выделения ди-О-изопропилиденового производного предложен Мельтретером и сотр. [16].

Операции, описанные выше в разделе «Методика Б. 1,2;5,6-Ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофураноза», выполняют до стадии упаривания ацетонового раствора. Вместо упаривания до сиропа раствор разбавляют 2,5 л воды и смесь концентрируют в вакууме при 60—70° до объема 1600 мл, удаляя таким образом ацетон и продукты его конденсации. Остаточную смесь, имеющую щелочную реакцию, подкисляют концентрированной соляной кислотой до pH 2, после чего при непрерывном перемешивании нагревают 4 час при 40°. Добавлением раствора едкого натра доводят pH гидролизата до 8 и отфильтровывают 1,7 г нерастворимого вещества. Фильтрат концентрируют в вакууме до начала кристаллизации 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (VII). Продукт отфильтровывают, промывают холодным спиртом и сушат на воздухе. Выход 81,2 г, т. пл. 161°,  $[\alpha]_D^{25} -12^\circ$  (с 8,3 в воде), т. пл. 161—162,5°,  $[\alpha]_D^{19} -12^\circ$  (в воде) [1г].

Концентрированием маточного раствора получают вторую порцию препарата. Выход 33,6 г (общий выход 55%), т. пл. 161°,  $[\alpha]_D^{25} -12^\circ$

(с 8,1 в воде). Упаривание последнего маточного раствора досуха дает 83 г продукта с т. пл. 148—152°, очистить который трудно. Эту порцию прибавляют к гидролизату при повторении синтеза.

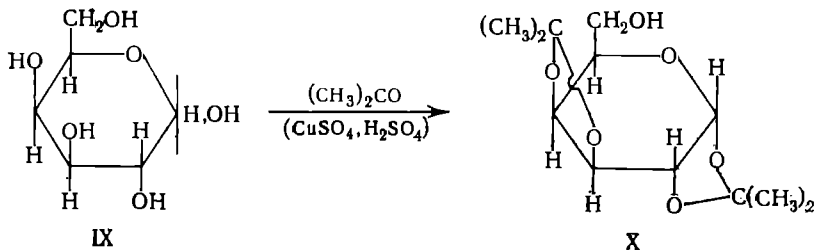
**2,3;4,6-Ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-  
D-маннопиранозид (VIII) [18]**



10 г  $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид (III) [9, 24] встряхивают при комнатной температуре в течение 10 дней с 400 мл безводного ацетона в присутствии безводного сульфата меди<sup>1</sup>. Затем смесь фильтруют и фильтрат упаривают в вакууме до сиропа. Для удаления непрореагировавшего  $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид оставшийся сироп экстрагируют холодным ацетоном. Экстракт вновь упаривают до сиропа, из которого перегонкой в вакууме получают 1,6 г 2,3;4,6-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид (VIII), т. кип. 125—130° (т. бани) при остаточном давлении 0,03 мм,  $n_D^{20}$  1,4605, и 0,8 г 2,3-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид, т. кип. 165—170° (т. бани) при остаточном давлении 0,03 мм. Моно-О-изопропилиденное производное кристаллизуют, как описано выше. Ди-О-изопропилиденное производное медленно кристаллизуется при хранении в эксикаторе, после чего его перекристаллизуют из водного спирта; температура плавления полученного вещества 76—77°,  $[\alpha]_D^{25} +3^\circ$  (с 2,4 в метаноле).

Выход обоих соединений повышается, если конденсацию проводят при 50°. 2,3;4,6-Ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид получают также при действии на  $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид безводного ацетона, содержащего 1% (по весу) сухого хлористого водорода [18].

**1,2;3,4-Ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопираноза (X)  
[19, 20] (см. также стр. 134)**



<sup>1</sup> Наилучший способ приготовления безводного сульфата меди(II) заключается в следующем. Пентагидрат высушивают при 140° в течение нескольких дней, после чего практически сухую соль прокалывают на голем пламени при постоянном перемешивании до получения белого материала. Максимальная эффективность катализатора достигается при использовании безводной соли непосредственно после высушивания.

В 4—6-литровую широкогорлую бутылку, снабженную пришлифованной стеклянной пробкой, помещают 90 г (0,5 моля) тонко измельченной безводной D-галактозы (IX), 200 г (1,25 моля) безводного сульфата меди(II), 2 л (27,4 моля) ацетона и 10 мл концентрированной серной кислоты (уд. вес 1,84). Смесь встряхивают 24 час на механической качалке, после чего сульфат меди отфильтровывают и промывают безводным ацетоном. Объединенные промывной ацетон и фильтрат нейтрализуют по конго красному, прибавляя при встряхивании 94 г (1,27 моля) измельченной гидроокиси кальция. Непрореагировавшую гидроокись кальция и сульфат кальция отфильтровывают и промывают сухим ацетоном и из фильтрата отгоняют растворитель при атмосферном давлении. Большую часть ацетона, оставшегося в полученном подвижном сиропе, отгоняют в вакууме водоструйного насоса (остаточное давление 15 мм) при 50°, а последние следы ацетона отгоняют при 100° и остаточном давлении 6 мм. Остаточное светло-желтое масло представляет собой неочищенную 1,2;3,4-ди-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопиранозу (X). Выход 100—120 г (76—92%),  $[\alpha]_D^{20}$  —55° (с 3,5 в хлороформе),  $[\alpha]_{579}^{18}$  —46° (в воде) [21]. Вещество перегоняется при 130—140° (0,001—0,01 мм) [20] и 131—139°/0,2—0,5 мм [13]; легко растворимо в воде и большинстве органических растворителей и несколько хуже в эфире и петролейном эфире. Другие удобные методики получения описаны в работах [22, 23].

## ЛИТЕРАТУРА

1. a) Fischer E., Ber., 28, 1145 (1895); б) Ber., 28, 1167 (1895); в) Ber., 28, 2496 (1895); г) Fischer E., Rund C., Ber., 49, 88 (1916).
2. Schmidt O. T., Wernicke E., Ann., 556, 179 (1944).
3. Freudenberg K., Hixon R. M., Ber., 56, 2119 (1923).
4. a) Freudenberg K., Wolf A., Ber., 58, 300 (1925); б) Ber., 60, 232 (1927).
5. Irvine J. C., Skinner A. F., J. Chem. Soc., 1926, 1089.
6. Ohle H., Berend G., Ber., 58, 2590 (1925).
7. Van Grunenbergh H., Bredt C., Freudenberg W., J. Am. Chem. Soc., 60, 1507 (1938).
8. Ault R. G., Haworth W. N., Hirst E. L., J. Chem. Soc., 1935, 517.
9. Fischer E., Beensch L., Ber., 29, 2927 (1896).
10. Glen W. L., Myers G. S., Grant G. A., J. Chem. Soc., 1951, 2568.
11. Levene P. A., Meyer G. M., J. Biol. Chem., 79, 357 (1928).
12. Ohle H., Spencker K., Ber., 61, 2387 (1928).
13. Ohle H., von Vargha L., Ber., 62, 2425 (1929).
14. Schmidt O. T., Simon A., J. prakt. Chem., 152, 190 (1939).
15. Blindenbacher G., Reichstein T., Helv. Chim. Acta, 31, 1669 (1948).
16. Mehlretter C. L., Alexander B. H., Mellies R. L., Rist C. E., J. Am. Chem. Soc., 73, 2424 (1951).
17. Thompson A., частное сообщение.
18. Ault R. G., Haworth W. N., Hirst E. L., J. Chem. Soc., 1935, 1012.
19. Ohle H., Berend G., Ber., 58, 2585 (1925).
20. Link K. P., Sell H. M., Biochem. Preparations, 3, 75 (1953).
21. Svanberg O., Bergman S. W., Arkiv. Kemi, Mineral. Geol., 9, No. 3, 16 pp. (1924).
22. Raymond A. L., Schroeder E. F., J. Am. Chem. Soc., 70, 2785 (1948).
23. Ballou C. E., Fischer H. O. L., J. Am. Chem. Soc., 76, 3188 (1948); Ballou C. E., Biochem. Preparations, 5, 67 (1957).
24. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 328.

## $\alpha$ -Метил-D-глюкопиранозид

Реакция D-глюкозы с метанолом в присутствии катионитов

*Г. Н. Болленбек*

### ВВЕДЕНИЕ

Метод, избранный для синтеза  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозида, основан на подробном исследовании Дина и Пайла [1] и сообщении Смита и сотр. [2] (ср. также с работой Эрне [3]). В этом методе в качестве катализатора конденсации D-глюкозы с метанолом используют катиониты.

### МЕТОДИКА

#### Выбор катализатора и его приготовление

В указанной реакции в качестве катализатора можно использовать следующие ионообменные смолы: шитые сульфированные полистиролы, сульфированные фенольные смолы и сульфированные угли. Типичными представителями ионитов первой группы являются амберлит IR-120, дауэкс 50, называемый также нальцитом HCR, и пермутит Q, известный также под названием ионак C-240<sup>1</sup>. Примером сульфированных фенольных смол служит эффективный катализатор дуолит C-3. Типичный представитель сульфированных углей — зеокarb II. Все эти смолы удовлетворительно катализируют реакцию, однако сульфированные полистиролы предпочтительны [1—3], по-видимому, вследствие их большей механической устойчивости в условиях реакции, а также, вероятно, потому, что количество продукта, выделяемого при их применении, больше, нежели в случае применения других смол при той же продолжительности реакции и том же количестве смолы [2].

Перед употреблением смолу переводят в кислую ( $H^+$ ) форму, эту операцию проводят в соответствии с заводской инструкцией. После этого катионит промывают 2—3 раза метанолом и оставляют стоять под метанолом, лучше всего в течение ночи. Затем растворитель отфильтровывают и смолу высушивают на воздухе. В более тщательном высушивании нет необходимости, поскольку реакция успешно протекает при содержании воды, включая воду, образующуюся при конденсации, не превышающем 5% от общего объема реакционной смеси [1].

---

<sup>1</sup> Отечественным эквивалентом этих смол является катионит КУ-2.— *Прим. перев.*

### $\alpha$ -Метил-D-глюкопиранозид

Смесь 80 г безводной  $\alpha$ -D-глюкозы, 200 мл продажного метанола<sup>1</sup> и 20 г дауэкса 50 (H<sup>+</sup>)<sup>1</sup> при перемешивании кипятят в 500 мл трехгорлой круглодонной колбе, снабженной механической мешалкой и обратным холодильником. В этих условиях глюкоза растворяется за 90—105 мин. Через 24 час<sup>2</sup> смолу отфильтровывают и промывают тремя порциями по 20 мл метанола<sup>3</sup>. Фильтрат и промывной метанол объединяют и концентрируют на паровой бане в вакууме водоструйного насоса до объема ~125 мл. Полученному концентрату дают медленно в течение ночи охладиться до комнатной температуры. Продукт самопроизвольно кристаллизуется. Выход неочищенной смеси гликозидов 40,5 г. Эту смесь смачивают 25 мл холодного (10°) метанола и жидкость отфильтровывают. Полученный таким образом неочищенный  $\alpha$ -D-глюкопиранозид (32,0 г) суспендируют в этаноле и 10%-ную (вес/об.) суспензию кипятят с обратным холодильником до растворения. При охлаждении до комнатной температуры выкристаллизовывается чистый  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид; выход 25 г (29%), т. пл. 167—169°,  $[\alpha]_D^{25} +157^\circ$  (с 2 в воде). При концентрировании объединенных маточных растворов получают вторую и третью порции (всего 30—40 г) смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -D-аномеров. Общий выход глюкопиранозидов составляет 83—85%. При совместной перекристаллизации второй и третьей порций из спирта получают дополнительно 18 г чистого  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид, общий выход которого составляет ~50%.

Последний маточный раствор можно превратить в равновесную смесь гликозидов. С этой целью его необходимо упарить досуха, растворить остаток в метаноле и вновь обработать катионитом. Кроме того, этот маточный раствор можно использовать как удобный источник  $\beta$ -метил-D-глюкопиранозид.

### ПРОИЗВОДНОЕ

Смесь 2 г  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид, 200 мг безводного ацетата натрия и 4,8 мл уксусного ангидрида кипятят 5 час с обратным холодильником в круглодонной колбе емкостью 50 мл на паровой бане. Затем прибавляют 25 мл воды и перемешивают при комнатной температуре 3 час. Твердый тетраацетат отфильтровывают, промывают небольшим количеством воды и высушивают на воздухе в течение ночи. Выход тетраацетата  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид 2,5—2,6 г (67—69,5%), т. пл. 101—103°,  $[\alpha]_D^{25} +130^\circ$  (с 2 в хлороформе).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Dean G. R., Pyle R. E., пат. США 2606186 (1952); Chem. Abstracts, **47**, 147 (1953).
2. Cadotte J. E., Smith F., Priestersbach D., J. Am. Chem. Soc., **74**, 1501 (1952).
3. Erne K., Acta Chem. Scand., **9**, 893 (1955).

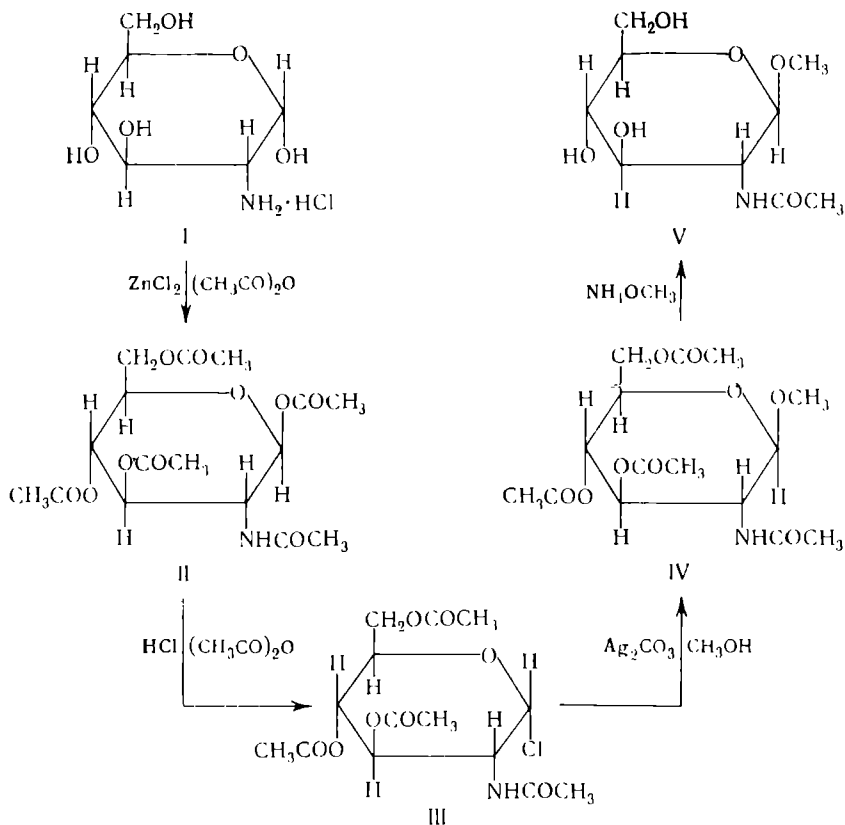
<sup>1</sup> Дин и Пайл [1] нашли, что оптимальное молярное соотношение метанола и D-глюкозы лежит в пределах 8,5—45. При соотношении ниже 8,5 и до 1 глюкозид имеет тенденцию кристаллизоваться в реакционной смеси. Удовлетворительное весовое соотношение D-глюкоза — смола лежит в пределах 8—2.

<sup>2</sup> На этой стадии продукт содержит менее 5% восстанавливающих веществ. Метил-D-глюкопиранозиды присутствуют в виде смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров в соотношении приблизительно 65 : 35.

<sup>3</sup> Эту смолу можно использовать по крайней мере еще для одиннадцати таких синтезов [1].

## Синтез метилгликопиранозидов по методу Кенигса—Кнорра

Дж. Кончи, Г. А. Левви



### ВВЕДЕНИЕ

В определенных случаях прямой синтез метилгликопиранозидов и других алкилгликопиранозидов по реакции Фишера (см. стр. 169) оказывается неприменимым. Эта реакция может не приводить к желаемому аномеру, а ее применение для гликозидирования дисахаридов ограничено вследствие возможности алкоголиза. В таких случаях прибегают к реакции Кенигса—Кнорра [1] с использованием поли-О-ацетилгликозилгалогенидов. С этой целью чаще всего применяют поли-О-ацетилгликозилбромиды (см. стр. 174), но иногда используют и поли-О-бензоилгликозилбромиды [2] (см. также стр. 126). Предлагаемая здесь методика синтеза 2-ацетида-2-деокси-β-метил-D-глюкопиранозид служит примером использования поли-О-ацетилгликозилхлорида (бромид в данном случае неустойчив).

## МЕТОДИКА

**Тетра-О-ацетил-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопираноза (II) [3]**

20 г тщательно измельченного хлоргидрата 2-амино-2-дезоксид-α-D-глюкозы (хлоргидрат D-глюкозамина) (см. стр. 141) при сильном встряхивании в течение 30 мин прибавляют к раствору 16,6 г безводного гранулированного хлористого цинка в 106 мл уксусного ангидрида. Во время прибавления сахара и в последующие 15 мин до его полного растворения температуру смеси необходимо поддерживать в пределах 45—50°. Раствор при перемешивании и охлаждении выливают в воду и в течение 30 мин при 45—50° прибавляют раствор 64 г едкого натра в 200 мл воды. К концу прибавления щелочи начинается осаждение, которое полностью заканчивается при охлаждении смеси до 0° (1 час). Кристаллический продукт отфильтровывают, промывают водой при 0° для удаления кислот и используют на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход 10 г (28%), т. пл. 188—189°,  $[\alpha]_D^{25} +1,5^\circ$  (с 4 в хлороформе).

При использовании хлористого цинка в качестве катализатора почти всегда образуются α-D(β-L)-поли-О-ацетаты (см. стр. 91). D-Глюкозамин в этом отношении представляет исключение. Для ацетилирования применялись также и другие катализаторы, в том числе ацетат натрия, который дает поли-О-ацетаты β-D(α-L)-конфигурации (см. стр. 179) (исключение составляют D- и L-арабинозы), пиридин (см. стр. 91), в присутствии которого могут образовываться оба аномера, и хлорная кислота (см. стр. 91), которая действует аналогично хлористому цинку, но ее требуется гораздо меньше.

**Три-О-ацетил-2-ацетамидо-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозилхлорид (III) [5]**

10 г сухого кристаллического вещества II встряхивают с 30 мл уксусного ангидрида, насыщенного при 0° сухим хлористым водородом. После полного растворения смесь оставляют при комнатной температуре на 16 час. Полученный раствор выливают в 125 мл хлороформа, охлаждают и последовательно промывают дважды равными объемами холодного насыщенного раствора бикарбоната натрия и дважды холодной водой. Хлороформный раствор высушивают 5—10 г безводного сульфата магния и обесцвечивают 2—3 г угля при комнатной температуре, после чего упаривают в вакууме при температуре бани 35—40°. Полученный сироп кристаллизуется. Его растирают с сухим эфиром и твердое вещество III отфильтровывают. Выход 6,5 г (69%), т. пл. 126—127°. Продукт достаточно чист для большинства дальнейших операций. Дополнительная очистка может быть достигнута перекристаллизацией, для чего вещество растворяют в теплом этилацетате, прибавляют легкий петролейный эфир до помутнения и оставляют при 0° на ночь; т. пл. 133—134° (с разл.),  $[\alpha]_D^{25} -118^\circ$  (с 1 в хлороформе).

Для получения поли-О-ацетилгликозилгалогенидов можно использовать любой аномер поли-О-ацетилированного сахара или их сиропобразную смесь. При этом образуется более стабильный аномер галогенида, который в большинстве случаев имеет α-D-конфигурацию.



**Три-О-ацетил-2-ацетамидо-2-дезоксид-  
β-метил-D-глюкопиранозид (IV) [5]**

Смесь 125 мл безводного метанола<sup>1</sup>, 5 г свежеприготовленного карбоната серебра и 5 г безводного сульфата кальция встряхивают в течение 30 мин, прибавляют 5 г III и встряхивают в темноте еще 16 час. Фильтрат упаривают досуха в вакууме при температуре бани 35—40°, остаток растворяют в 100 мл хлороформа, дважды встряхивают с равными объемами холодного 2%-ного водного аммиака (для удаления следов серебряных солей), дважды промывают водой, высушивают хлористым кальцием и упаривают досуха. Остаток кристаллизуют из спирта. Выход 2,1 г (42%), т. пл. 163°,  $[\alpha]_D^{25} -22^\circ$  (с 1 в метаноле).

Как карбонат серебра, так и окись серебра [6] при использовании в качестве катализатора реакции Кенигса — Кнорра вызывают вальденовское обращение, приводящее к образованию β-D-аномера из стабильных α-D-поли-О-ацилгликозилгалогенидов. При применении в качестве катализаторов солей ртути могут образовываться оба аномера [7—9].

**2-Ацетамидо-2-дезоксид-β-метил-D-глюкопиранозид (V) [9]**

К охлажденному до 0° раствору 2 г IV в 50 мл сухого метанола прибавляют 50 мл насыщенного при 0° раствора аммиака в сухом метаноле. Раствор предохраняют от влаги и выдерживают при 20° 5 час, после чего упаривают в вакууме при температуре бани 35—40°. Остаток растворяют в минимальном объеме горячего абсолютного спирта, выделившийся продукт (V) перекристаллизовывают из спирта; т. пл. 204°,  $[\alpha]_D^{25} -47^\circ$  (с 1,5 в воде).

Вместо аммиака в качестве дезацетилирующего агента используют обычно метилаты натрия или бария, получаемые растворением металла в сухом метаноле.

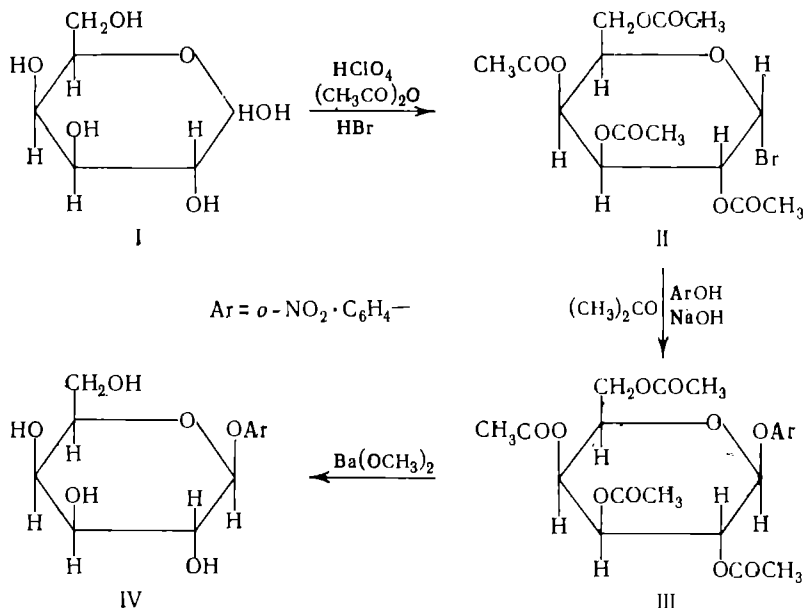
**Л И Т Е Р А Т У Р А**

1. Koenigs W., Knorr E., Ber., **34**, 957 (1901).
2. Fletcher H. G., Jr., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **72**, 4173 (1950).
3. Findlay J., Levvy G. A., Marsh C. A., Biochem. J., **69**, 467 (1958).
4. Feier H., Westphal O., Ber., **89**, 589 (1956).
5. Leaback D. H., Walker P. G., J. Chem. Soc., **1957**, 4754.
6. Conchie J., Levvy G. A., Marsh C. A., Advances in Carbohydrate Chem., **12**, 157 (1957).
7. Lindberg B., Arkiv Kemi, Mineral. Geol., **18B**, No. 9, 1 (1945).
8. Helferich B., Doppstadt A., Gottschlich A., Naturwissenschaften, **40**, 441 (1953).
9. Kuhn R., Kirschenlohr W., Chem. Ber., **86**, 1331 (1953).

<sup>1</sup> Продажный метанол кипятят с магнием, а затем перегоняют.

## Синтез арилгликозидов по методу Кенигса—Кнорра

Дж. Кончи, Г. А. Левви



## ВВЕДЕНИЕ

Одним из общих методов получения арилгликозидов является реакция Кенигса — Кнорра [1]. Из числа необходимых для этого поли-О-ацетилгликозилгалогенидов чаще всего используют поли-О-ацетилгликозилбромиды, которые можно получить или двустадийным синтезом, как было, например, показано в предыдущем разделе (см. стр. 171), или в одну стадию по методике Баркзай-Мартоша и Кёрёши [2]. В качестве примера приводится получение  $\beta$ -(*o*-нитрофенил)-D-галактопиранозиды [3].

## МЕТОДИКА

*Тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-галактопиранозилбромид (II)*

Тетраацетат  $\alpha$ -D-галактопиранозилбромид получают одностадийным синтезом (стр. 123, 171). D-Галактозу (I) исчерпывающе ацетируют в присутствии хлорной кислоты как катализатора и без выделения образующегося пентаацетата производят бромирование. Конечный продукт, получаемый осаждением петролейным эфиром из эфира, достаточно чист для использования на следующей стадии. Выход 75%, т. пл. 83—84°,  $[\alpha]_D^{20} + 215^\circ$  (с 1 в хлороформе).

**Тетра-О-ацетил- $\beta$ -(*о*-нитрофенил)-  
D-галактопиранозид (III)**

В растворе 16,8 г едкого натра в 420 мл воды растворяют 42 г *о*-нитрофенола. К полученному раствору прибавляют раствор 88 г тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-галактопиранозилбромидов в 620 мл ацетона. Смесь выдерживают при комнатной температуре 5 час, после чего концентрируют в вакууме при 25—30°. По мере упаривания начинает выделяться продукт реакции. Раствор охлаждают до 0° и через 15 мин выпавший осадок отфильтровывают, а фильтрат вновь концентрируют до начала выделения осадка. Такие операции продолжают до тех пор, пока не прекратится выпадение продукта реакции (обычно раствор упаривают приблизительно до половины первоначального объема). Полученные порции препарата объединяют и перекристаллизовывают из 95%-ного спирта, выход 56 г, т. пл. 172—172,5°,  $[\alpha]_D^{25} +70^\circ$  (с 1,9 в хлороформе).

Реакция всегда протекает с вальденовским обращением. Таким образом, из стабильных поли-О-ацетил- $\alpha$ -D-гликозилбромидов образуются  $\beta$ -D-гликозиды. К тому же результату приводит использование окиси [4] или карбоната серебра [1]; при применении солей ртути могут образовываться и  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеры [5, 6].

**$\beta$ -(*о*-Нитрофенил)-D-галактопиранозид (IV)**

К суспензии 1 г тетраацетата IV в 50 мл абсолютного метанола прибавляют 1 мл 0,4 н. раствора метилата бария. Суспензию выдерживают при 0°, периодически встряхивая. Приблизительно через 4 час раствор становится прозрачным, а через 24 час отделяют выпавшие кристаллы гликозида. Маточный раствор упаривают в вакууме до прекращения выделения кристаллического осадка. Выход гликозида количественный. Продукт перекристаллизовывают из абсолютного спирта, т. пл. 193—194°,  $[\alpha]_D^{25} -52^\circ$  (с 1 в воде).

Для деацетилирования могут быть также использованы метилаты натрия и аммония (см. стр. 119, 123, 171). Для общего применения можно рекомендовать методику Либекса [7].

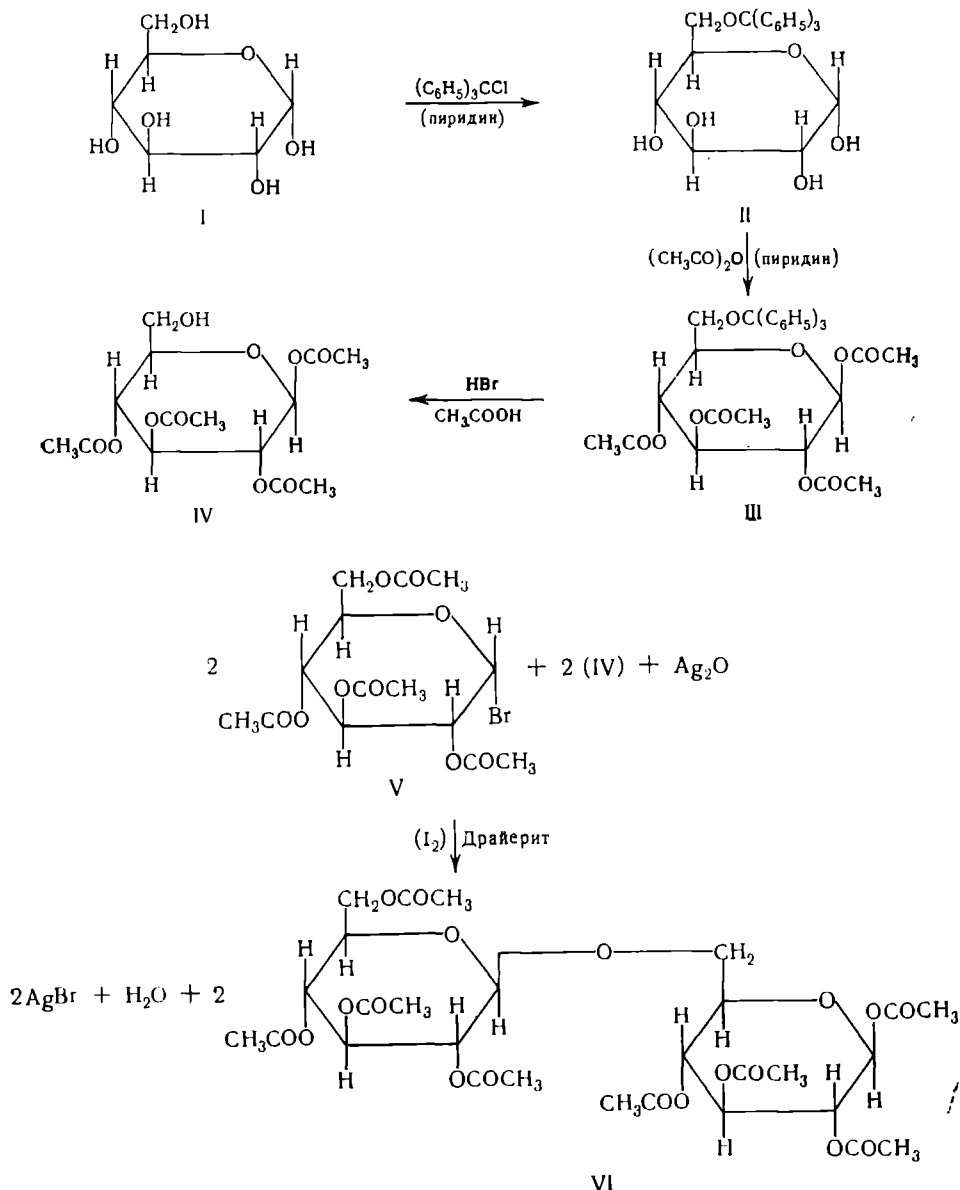
Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Koenigs W., Knorr E., Ber., 34, 957 (1901).
2. Bárczai-Martos M., Körösy F., Nature, 165, 369 (1950).
3. Seidman M., Link K. P., J. Am. Chem. Soc., 72, 4325 (1950).
4. Conchie J., Levvy G. A., Marsh C. A., Advances in Carbohydrate Chem., 12, 157 (1957).
5. Helferich B., Jung K.-H., Ann., 589, 77 (1954).
6. Heyns K., Kelch C., Chem. Ber., 86, 601 (1953).
7. Leaback D. H., J. Chem. Soc., 1960, 3166.

# Синтез дисахаридов по реакции Кенигса—Кнорра

Е. А. Таллей

## Октаацетат $\beta$ -генциобиозы



## ВВЕДЕНИЕ

Реакция Кенигса — Кнорра [1] представляет один из наиболее употребительных методов синтеза олигосахаридов [2]. Эта реакция обычно приводит к образованию  $\beta$ -D-связи, однако в некоторых случаях образуется и  $\alpha$ -D-связь [2—4]. В качестве примера здесь приводится синтез

октаацетата  $\beta$ -генциобиозы (см. стр. 91, 115, 130). Этот синтез впервые был выполнен Гельферихом и сотр. [5], а позднее был модифицирован Рейнольдсом и Эвансом [6].

## МЕТОДИКА

### *Тетра-О-ацетил-6-О-трифенилметил- $\beta$ -D-глюкопираноза (III) [6, 7]*

120 г (0,67 моля) безводной  $\alpha$ -D-глюкозы (I) и 193 г (0,7 моля) трифенилхлорметана [6, 8] растворяют при нагревании на паровой бане в 500 мл безводного пиридина (см. стр. 91, 115, 152). Реагенты и аппаратура должны быть тщательно высушены. К раствору без охлаждения прибавляют в один прием 300 мл уксусного ангидрида (более высокая температура способствует образованию  $\beta$ -D-аномера). Раствору дают охладиться и оставляют при комнатной температуре приблизительно на 12 час, затем выливают тонкой струей в 10 л энергично перемешиваемой смеси воды со льдом, содержащей 500 мл уксусной кислоты, и продолжают энергично перемешивать еще 2 час, после чего осадок отфильтровывают и немедленно смешивают со второй 10-литровой порцией воды со льдом. Если пиридин не отмыт достаточно полно, продукт при повышении температуры становится клейким. Белый зернистый осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат на воздухе. Для удаления большей части тетра-О-ацетил-6-О-трифенилметил- $\alpha$ -D-глюкопиранозы полученный продукт смешивают с 500 мл эфира и фильтруют. Осадок перекристаллизовывают из горячего 95%-ного спирта. После охлаждения тетра-О-ацетил-6-О-трифенилметил- $\beta$ -D-глюкопираноза (III) выкристаллизуется в виде мелких игл, обычно достаточно чистых для использования на следующей стадии; выход около 170 г (43%). Перекристаллизация дает чистое соединение, т. пл. 166—166,5° (испр.) [6],  $[\alpha]_D^{25} +45^\circ$  (с 9 в пиридине) [7].

### *1,2,3,4-Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопираноза (IV) [9, 10]*

46 г (0,078 моля) тетра-О-ацетил-6-О-трифенилметил- $\beta$ -D-глюкопиранозы (III) растворяют при нагревании на водяной бане в 200 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор охлаждают приблизительно до 10° (раствор становится перенасыщенным). Прибавляют 18 г насыщенного раствора сухого бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте, смесь встряхивают ~45 сек, выпавший трифенилбромметан немедленно отфильтровывают с отсасыванием. Маточный раствор выливают в ~1 л смеси воды со льдом или непосредственно фильтруют в эту смесь. Тетраацетат экстрагируют 250 мл хлороформа, экстракт четырежды промывают водой с температурой 0° для удаления уксусной кислоты и высушивают безводным сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывают и раствор упаривают в вакууме при комнатной температуре. Остаток заливают 100 мл безводного эфира, растирая спиром стеклянной палочкой. Обычно кристаллизация начинается немедленно, выход 15—20 г (55—70%), т. пл. 128—129° (испр.),  $[\alpha]_D^{25} +12^\circ$  (с 6 в хлороформе) [9].

### Октаацетат $\beta$ -генциобиозы (VI) [6]

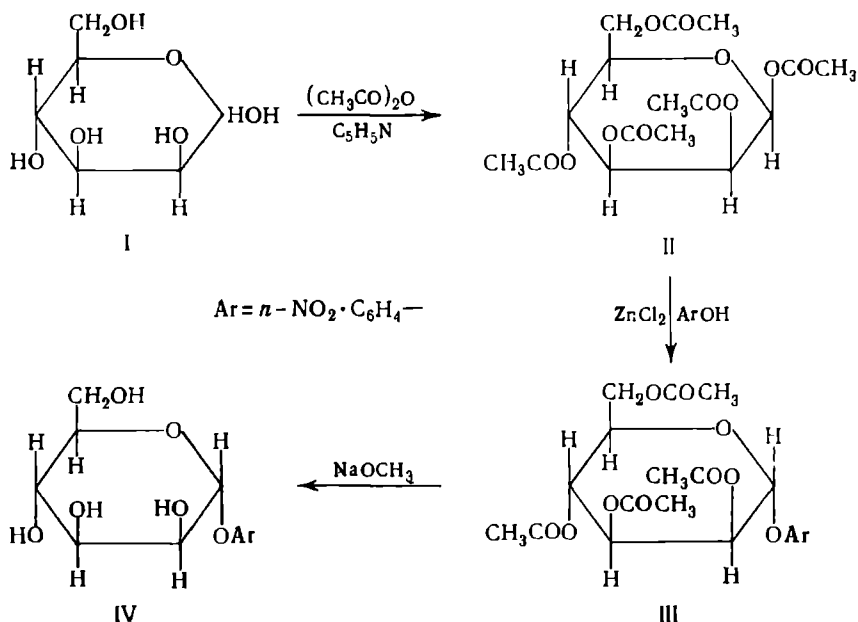
В круглодонную трехгорлую колбу емкостью 500 мл, снабженную механической мешалкой с затвором, осушительной трубкой и капельной воронкой, помещают 35 г (0,1 моля) 1,2,3,4-тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозы, 25 г (0,11 моля) окиси серебра [10], 100 г драйерита, предварительно прокаленного при 240° в течение 2 час, и 100 мл сухого хлороформа, не содержащего спирта. Для защиты от света колбу обертывают черной бумагой. Содержимое колбы перемешивают ~1 час, чтобы обеспечить полноту удаления влаги. Прибавляют катализатор — 5 г иода, после чего с помощью капельной воронки к реакционной смеси приливают в течение 1 час при перемешивании раствор 41,3 г (0,1 моля) тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромид (см. стр. 123) в 150 мл сухого свободного от спирта хлороформа. Перемешивание продолжают еще 24 час. Смесь фильтруют и осадок промывают хлороформом. Фильтрат и промывной хлороформ объединяют и упаривают в вакууме. Белый кристаллический осадок растворяют в 2 л горячего абсолютного спирта. После охлаждения октаацетат  $\beta$ -генциобиозы выделяется в виде чистых белых кристаллических игл, выход 50,5 г (74%), т. пл. 195—196° (испр.). После повторной кристаллизации из абсолютного спирта т. пл. 196° (испр.) [10],  $[\alpha]_D^{20}$  —5° (с 5 в хлороформе) [11].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Koenigs W., Knorr E., Sitzber. bayer. Akad. Wiss., **30**, 103 (1900); Ber., **34**, 957 (1901).
2. Evans W. L., Reynolds D. D., Talley E. A., Advances in Carbohydrate Chem., **6**, 27 (1951).
3. Gorin P. A. J., Perlman A. S., Can. J. Chem., **37**, 1930 (1959).
4. Zemplén G., Ber., **62**, 990 (1929); Zemplén G., Nagy Z. S., Ber., **63**, 368 (1930).
5. Helferich B., Advances in Carbohydrate Chem., **3**, 79 (1948).
6. Reynolds D. D., Evans W. L., J. Am. Chem. Soc., **60**, 2559 (1938).
7. Helferich B., Moog L., Junger A., Ber., **58**, 877 (1925).
8. Gomberg M., Ber., **33**, 3144 (1900).
9. Reynolds D. D., Ph. D. Dissertation, The Ohio State University, Columbus, Ohio, 1939, p. 19.
10. Helferich B., Klein W., Ann., **450**, 219 (1926).
11. Hudson C. S., Johnson J. M., J. Am. Chem. Soc., **39**, 1272 (1917).

# Синтез арилгликозидов по методу Гельфериха

Дж. Кончи, Г. А. Левви



## ВВЕДЕНИЕ

Реакция Гельфериха [1] широко применяется как общий метод получения арилгликопиранозидов, в частности  $\alpha$ -D-гликозидов. Так же как и в методе Кенигса — Кнорра, сахар сначала ацетируют, но далее поли-O-ацетат сахара непосредственно конденсируют с фенолом. В качестве примера описывается получение  $\alpha$ -(*p*-нитрофенил)-D-маннопиранозид [2, 3].

## МЕТОДИКА

### Пента-O-ацетил- $\beta$ -D-маннопираноза (II) [4]

12 г D-маннозы (I) прибавляют небольшими порциями в течение получаса к смеси 100 мл уксусного ангидрида и 130 мл пиридина, охлаждаемой смесью льда с солью. Реакционную смесь перемешивают, не снимая охлаждения, механической мешалкой еще 4 час и оставляют при 0° на 2 суток, изредка встряхивая. Раствор при интенсивном перемешивании медленно выливают в смесь 1,5 л воды с измельченным льдом. При этом выделяется сироп, который при дальнейшем перемешивании кристаллизуется. Кристаллы отфильтровывают и тщательно промывают водой; выход 21 г (79%), т. пл. 117°. После тщательного высушивания продукт достаточно чист для использования на следующей стадии. Продажная D-манноза обычно представляет собой смесь  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров и в описанной выше реакции даст пентаацетат  $\beta$ -D-маннопиранозы.

Для ацетилирования сахаров можно использовать и другие катализаторы (см. стр. 91, 171). На следующей стадии синтеза можно использовать любой аномер поли-O-ацетата сахара, поскольку конфигурация образующегося гликозида определяется природой катализатора.

**Тетра-О-ацетил- $\alpha$ -(*n*-нитрофенил)-D-маннопиранозид (III)**

12,5 г *n*-нитрофенола, 12,5 г пентаацетата  $\beta$ -D-маннопиранозы и 0,5 г хлористого цинка сплавляют при механическом перемешивании на масляной бане при 160° в течение 30 мин. После охлаждения до 60° расплав растворяют в 200 мл бензола и полученный раствор промывают дважды равными объемами воды и затем 1 н. раствором едкого натра (2—3 л), пока водный слой не станет почти бесцветным. В заключение раствор дважды промывают равными объемами воды, высушивают хлористым кальцием и упаривают в вакууме при температуре бани 35—40°. Полученный сироп растворяют в абсолютном спирте, обесцвечивают углем, фильтруют и снова упаривают в вакууме. При этом тетраацетат гликозида кристаллизуется. Концентрируя маточный раствор, получают вторую порцию кристаллов. Вещество перекристаллизовывают из спирта, выход 11,3 г (75%), т. пл. 156—157°,  $[\alpha]_D^{20} +105^\circ$  (с 1 в хлороформе).

Использование в этой конденсации хлористого цинка, как правило, приводит к предпочтительному образованию  $\alpha$ -D-( $\beta$ -L-)аномеров, хотя известно большое число исключений. В качестве другого катализатора для получения  $\alpha$ -D-аномера недавно был применен цианид ртути [5]. Для получения  $\beta$ -D-гликозидов рекомендован ряд катализаторов, в том числе безводный хлористый алюминий [6], *n*-толуолсульфокислота [7] и серная кислота [8] (последние два используются в гораздо меньших количествах).

 **$\alpha$ -(*n*-Нитрофенил)-D-маннопиранозид (IV)**

К суспензии 5 г тетраацетата  $\alpha$ -(*n*-нитрофенил)-D-маннопиранозида в 60 мл безводного метанола прибавляют 0,5 мл 0,2 н. раствора метилата натрия. Раствор кипятят с обратным холодильником в течение 5 мин, упаривают в вакууме приблизительно до  $\frac{2}{3}$  первоначального объема и охлаждают до 0°. При этом выпадает маннозид, его отфильтровывают (выход 2,7 г, или 85%) и перекристаллизовывают из воды; т. пл. 183—184°,  $[\alpha]_D^{20} +145^\circ$  (с 0,2 в воде).

Для деацетилирования можно также использовать метилаты бария или аммония (см. стр. 171, 174).

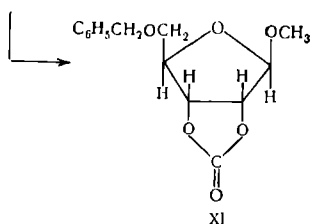
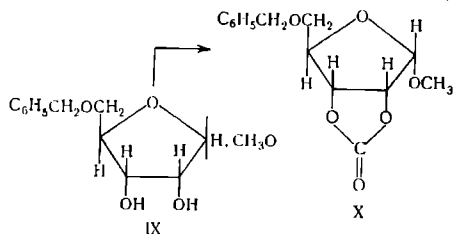
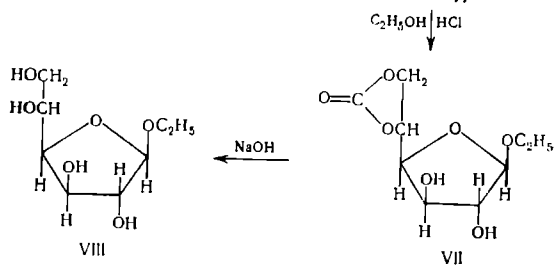
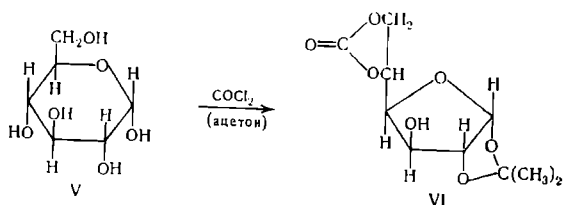
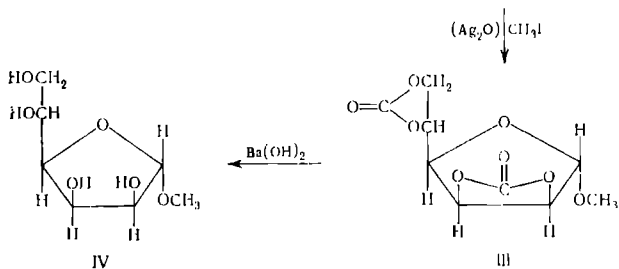
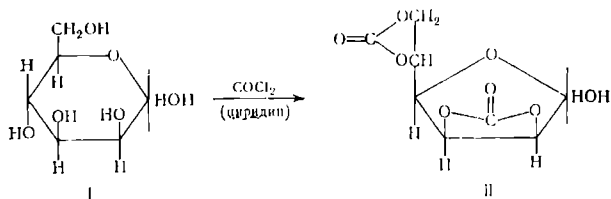
**Л И Т Е Р А Т У Р А**

1. Helferich B., Schmitz-Hillebrecht E., Ber., 66, 378 (1933).
2. Jermyn M. A., Australian J. Chem., 8, 403 (1955).
3. Westphal O., Feier H., Chem. Ber., 89, 582 (1956).
4. Dale J. K., J. Am. Chem. Soc., 51, 2788 (1929).
5. Feier H., Westphal O., Chem. Ber., 89, 589 (1956).
6. Hurd C. D., Bonner W. A., J. Org. Chem., 11, 50 (1946).
7. Helferich B., Ber., 77, 194 (1944).
8. Helferich B., Demant S., Coerdeler J., Bosse R., Z. physiol. Chem., 283, 179 (1948).



# Гликофуранозиды из циклических карбонатов

Е. Л. Херст, Э. Персивал



## ВВЕДЕНИЕ

Карбонаты сахаров обычно представляют собой кристаллические соединения, которые довольно легко выделить. Будучи сложными эфирами, они легко гидролизуются щелочами. В отличие от изопропилиденных производных карбонаты относительно устойчивы к кислотам; это свойство карбонатов использовали Хэуорс и сотрудники для получения чистых фуранозидных производных сахаров.

## МЕТОДИКА

 ***$\alpha$ -Метил-D-маннофуранозид (IV)*****2,3;5,6-Дикарбонат D-маннофуранозы (II)**

В охлаждаемый льдом интенсивно перемешиваемый раствор 18 г D-маннозы (I) в 60 мл сухого пиридина пропускают довольно быстрый ток газообразного фосгена [1]. Через час добавляют воду, охлажденную до 0°, выпавший осадок аморфного карбоната отфильтровывают и отбрасывают. Фильтрат обрабатывают избытком карбоната бария для нейтрализации хлористого водорода, освобождающегося в результате разложения хлоргидрата пиридина, и упаривают до малого объема в вакууме при 30—35°. После того как весь пиридин будет таким образом удален, оставшуюся смесь фильтруют и фильтрат исчерпывающе экстрагируют этилацетатом. Удаление этилацетата из экстракта приводит к 2,3;5,6-дикарбонату D-маннофуранозы, который кристаллизуется из воды в виде блестящих хлопьев или игл. Выход ~1,5 г, т. пл. 122—123° (газообразование),  $[\alpha]_{578}^{21} +26^\circ$  (с 1,0 в ацетоне).

**2,3;5,6-Дикарбонат  $\alpha$ -метил-D-маннофуранозида (III)**

4 г 2,3;5,6-дикарбоната D-маннофуранозы (II) растворяют в иодистом метиле, содержащем немного ацетона. К полученному раствору, нагреваемому при температуре ниже температуры кипения, небольшими порциями прибавляют окись серебра [2]. Продолжительный контакт с избытком окиси серебра вреден. Раствор фильтруют, осадок экстрагируют кипящим ацетоном, фильтрат и экстракт упаривают в вакууме и остаток повторно метилируют, как описано выше. Удаление растворителей после второго метилирования дает кристаллический 2,3;5,6-дикарбонат  $\alpha$ -метил-D-маннофуранозида, выход 1,5 г, т. пл. 172—173° (с разл.),  $[\alpha]_{578}^{22} +87^\circ$  (с 2,45 в ацетоне).

 **$\alpha$ -Метил-D-маннофуранозид (IV)**

Раствор 5 г 2,3;5,6-дикарбоната  $\alpha$ -метил-D-маннофуранозида (III) в минимальном количестве ацетона осторожно нагревают с избытком 0,33 н. раствора гидроокиси бария [2]. Выпавший карбонат бария отфильтровывают, а избыточную гидроокись бария удаляют в виде карбоната, прибавляя к раствору твердую двуокись углерода. Полученный раствор упаривают в вакууме при 45°, остаток экстрагируют этилацетатом. Упаривая этилацетатный раствор, получают кристаллический  $\alpha$ -метил-D-маннофуранозид, выход 3,8 г [5]. Из содержащего эфир метанола  $\alpha$ -метил-D-маннофуранозид кристаллизуется в виде бесцветных игл, т. пл. 118—119°,  $[\alpha]_D^{20} +113^\circ$  (с 1,1 в воде),  $[\alpha]_D^{25} +117^\circ$  (с 0,8 в метаноле).

### ***β-Этил-D-глюкофуранозид (VIII)***

#### **5,6-Карбонат 1,2-O-изопропилиден-α-D-глюкофуранозы (VI)**

Суспензию 8 г α-D-глюкозы (V) в 70 мл сухого ацетона (см. стр. 162) при интенсивном перемешивании обрабатывают газообразным фосгеном [3]. После полного растворения глюкозы (3 час) смесь оставляют при комнатной температуре на 12 час, нейтрализуют, встряхивая с карбонатом свинца, и фильтруют. Осадок промывают ацетоном. Фильтрат и промывную жидкость объединяют и упаривают почти досуха при 36° в вакууме. Из остатка кристаллизуется 5,6-карбонат 1,2-O-изопропилиден-α-D-глюкофуранозы, выход ~3 г. Перекристаллизацией из спирта получают бесцветные иглы, которые размягчаются при 215°, т. пл. 223—224° (с разл.),  $[\alpha]_{D_{25}}^{21} = -36^\circ$  (с 1,0 в ацетоне). Из первого ацетонового маточного раствора получают 3 г 1,2-O-изопропилиден-α-D-глюкофуранозы и 1 г 1,2;5,6-ди-O-изопропилиден-α-D-глюкофуранозы.

#### **5,6-Карбонат β-этил-D-глюкофуранозида (VII)**

5,6-Карбонат 1,2-O-изопропилиден-α-D-глюкофуранозы растворяют в 150 мл кипящего абсолютного спирта, раствор быстро охлаждают и быстро прибавляют 21 мл 5 н. спиртового раствора хлористого водорода с таким расчетом, чтобы концентрация хлористого водорода составляла 2,25%, а производного сахара — 1,6%. Раствор нагревают при 45—50° в течение 6—8 час. Реакционную смесь нейтрализуют карбонатом серебра в тот момент, когда удельное вращение раствора будет лишь немного отрицательным. Смесь фильтруют и фильтрат упаривают в вакууме при 35°. Сиропообразный остаток кристаллизуется из спирта после прибавления эфира. При перекристаллизации из смеси эфира и петролейного эфира получают длинные шелковистые иглы с т. пл. 164—165°,  $[\alpha]_{D_{25}}^{19} = -51^\circ$ ,  $[\alpha]_{D_{25}}^{19} = -55^\circ$  (с 1,1 в воде).

### ***β-Этил-D-глюкофуранозид (VIII)***

Раствор 5 г (1 моль) 5,6-карбоната β-этил-D-глюкофуранозида (VII) в эквимольном количестве 0,25 н. раствора едкого натра (171 мл, 2 моля) выдерживают в холодильнике несколько часов [3]. Раствор упаривают в вакууме досуха при 35°, остаток несколько раз экстрагируют этилацетатом. Упаривая экстракт в вакууме, получают вязкий сироп, который при стоянии в течение нескольких дней в вакуум-эксикаторе над пятиокисью фосфора образует гигроскопичные кристаллы. При перекристаллизации из сухого этилацетата, содержащего следы спирта, с последующим прибавлением эфира до слабого помутнения и выдерживанием при —10° в течение нескольких дней получают крупные друзы кристаллов VIII. Их отделяют, промывают сухим этилацетатом и высушивают на пористой пластинке; хранят β-этил-D-глюкофуранозид в вакуум-эксикаторе над пятиокисью фосфора. Выход 85—90%, т. пл. 59—60°,  $[\alpha]_D^{25} = -86^\circ$  (с 1,0 в воде).

#### ***2,3-Карбонаты аномерных 5-O-бензилметил-D-рибофуранозидов (X и XI)***

К интенсивно перемешиваемому раствору 2,23 г 5-O-бензилметил-D-рибофуранозида (IX) [4] в 40 мл безводного пиридина прибавляют по каплям при комнатной температуре раствор 2 г фосгена в 20 мл толуола.

Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 1 час, тщательно предохраняя его от попадания влаги. Затем вводят 200 мл воды, охлажденной до 0°, смесь экстрагируют эфиром (2 × 100 мл), объединенные эфирные экстракты промывают водой и высушивают сульфатом натрия. После отгонки эфира в вакууме остается 2,41 г оранжево-коричневой жидкости, при перегонке которой при остаточном давлении 0,01 мм и температуре бани 190° получают смесь X и XI в виде светло-желтой жидкости, затвердевающей при стоянии. Эту смесь растворяют в бензоле (0,23 г в 15 мл) и разделяют хроматографированием на колонке с силикагелем на α- и β-D-гликозиды [6]. Элюирование 170 мл бензола с последующим упариванием элюата дает кристаллический 2,3-карбонат 5-O-бензил-β-метил-D-рибофуранозид, выход 1,03 г. В результате последующего элюирования колонки 70 мл 6%-ного раствора эфира в бензоле получают 1,1 г α-D-аномера. Оба аномера можно перекристаллизовать из водного метанола и затем из смеси эфира и петролейного эфира. 2,3-Карбонат 5-O-бензил-α-метил-D-рибофуранозид (X) образует перистые иглы, т. пл. 62—63°,  $[\alpha]_D^{25} +102^\circ$  (с 2,5 в спирте). β-D-Производное (XI) кристаллизуется в виде плотных игл, т. пл. 59—59,5°,  $[\alpha]_D -54,5^\circ$  (с 1,0 в спирте).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Haworth W. N., Porter C. R., J. Chem. Soc., 1930, 151.
2. Haworth W. N., Porter C. R., J. Chem. Soc., 1930, 649.
3. Haworth W. N., Porter C. R., J. Chem. Soc., 1929, 2796.
4. Tener G. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 79, 437 (1957).
5. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 328.
6. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds., Academic Press Inc., New York-London, 1962, vol. I, p. 36.

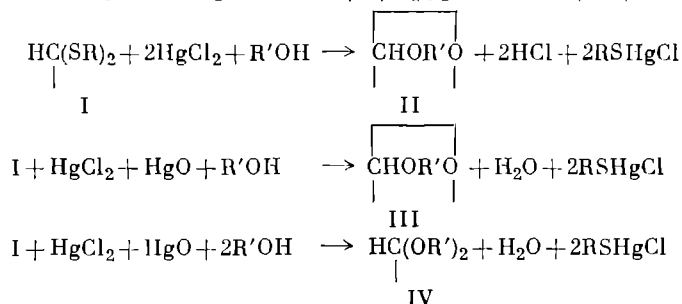
## Получение гликозидов из дитиоацеталей

O-Алкил- и S-алкилфуранозиды и пиранозиды, диалкилацетали

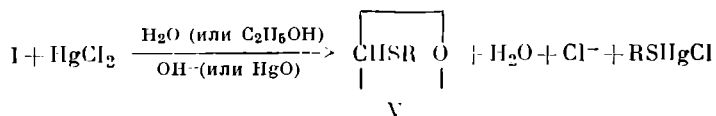
*Е. Паксу*

## ВВЕДЕНИЕ

При варьировании условий алкоголиза алкилтиоацеталей ациклических форм альдоз (I) или кетоз, протекающего в присутствии хлорида ртути, можно получать пиранозиды (II), фуранозиды (III) и ацетали (IV):



Из дитиоацеталей D-глюкозы можно также получить  $\alpha$ -алкил-1-тио-D-глюкофуранозиды (V):



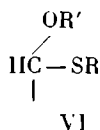
В 1925 г. Паксу [1] описал образование метил-D-глюкопиранозидов: им были получены с выходом 71,5 и 19% соответствующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеры (II). Это был первый пример получения алкилгликопиранозидов из дитиоацеталей сахаров. В этой реакции общего типа на протяжении всего процесса поддерживается кислая реакция спиртовых растворов и проводят ее при повышенных температурах.

Паксу и Грин [2] нашли, что если реакцию вести при низкой температуре, а хлористый водород в момент выделения нейтрализовать желтой окисью ртути, то удастся получить с высоким выходом алкилгликофуранозиды. При введении в реакцию достаточного количества окиси ртути на протяжении всего процесса поддерживается нейтральная реакция среды и нужная концентрация хлорной ртути. Для удаления из реакционной смеси хлорной ртути лучше всего использовать пиридин. В противоположность методу Фишера [3, 4] (см. также стр. 169), требующему применения кислого катализатора, предложенный Паксу и Грин общий метод позволяет получать гликозиды в нейтральных условиях.

Применив этот метод к метанолизу диэтилдитиоацетата 6-дезокси-L-маннозы (L-рамнозы), Грин и Паксу [5] в 1938 г. обнаружили в реакционной смеси небольшое количество диметилацетата L-рамнозы. В ряду кетоз та же реакция, проводимая при низкой температуре ( $-70^\circ$ ), приводит к почти количественному образованию кристаллического диметилацетата D-фруктозы из диэтилдитиоацетата D-фруктозы [6].  $\alpha$ -Алкил-1-тио-D-глюкофуранозиды были впервые получены Шнейдером и сотр. [7—9], однако они сделали ошибочные предположения о структуре этих соединений [10, 11]. Алкилтиогликозиды можно также получить и другими путями (см. стр. 196).

Под действием горячей разбавленной (0,01 н.) соляной кислоты  $\alpha$ -этил-1-тио-D-глюкофуранозид превращается в  $\beta$ -D-аномер и  $\alpha$ -этил-1-тио-D-глюкопиранозид [12]. Аналогичное поведение свойственно O-алкилгликозидам [13, 14].

Относительно механизма превращений, претерпеваемых дитиоацетатами, было сделано предположение [5, 15], что, за исключением случая D-глюкозы, вероятным промежуточным продуктом реакции дитиоацеталей сахаров в спиртовой среде, содержащей хлорид ртути и окись ртути, является смешанный ацеталь (VI).



Вольфром и сотрудники синтезировали такие смешанные ацетали D-галактозы и D-глюкозы [16, 17] и исследовали их реакционную способность в синтезе фуранозидов [18].

В следующих примерах одинаково подходящими исходными веществами служат дибензил-, диэтил- и другие диалкилдитиоацетаты.

## МЕТОДИКА

 ***$\alpha$ -Метил- и  $\beta$ -метил-D-глюкопиранозиды [1]***

8,2 г дибензилдитиоацетата D-глюкозы [19], синтезированного по улучшенной методике [20], растворяют в 100 мл кипящего метанола и прибавляют раствор 16,3 г (3 моля) хлорида ртути в 30 мл горячего метанола. После кипячения в течение 15 мин с обратным холодильником от раствора отфильтровывают 13,95 г  $C_6H_5CH_2SHgCl$  (теоретический выход 14,3 г). Избыток ртути удаляют из фильтрата в виде сульфида, пропуская через раствор сероводород. Бесцветный фильтрат встряхивают с карбонатом серебра, чтобы удалить хлористый водород. Раствор фильтруют через уголь и упаривают в вакууме до сиропа, который после прибавления спирта превращается в кристаллическую массу почти чистого  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (см. также стр. 169). Выход  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид 2,8 г (71,5%). Продукт перекристаллизовывают из 18 частей горячего спирта, т. пл.  $166^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +158^\circ$  (в воде). Из первого маточного раствора при стоянии при низкой температуре выкристаллизовывается  $\beta$ -метил-D-глюкопиранозид, выход 0,74 г (19%). Его перекристаллизовывают из 8 частей горячего спирта, т. пл.  $108-110^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} -32^\circ$  (с 8 в воде).

Практически такой же результат получается при использовании в качестве исходного вещества 5,5 г диэтилдитиоацетата D-глюкозы (см. стр. 203).

***Алкилпиранозиды L-арабинозы, 6-дезокс-L-маннозы (L-рамнозы) и D-галактозы [21]***

Для получения соответствующих метилгликопиранозидов используют дибензилдитиоацетаты. К достаточно концентрированному раствору 1 моля дитиоацетата в горячем метаноле в один прием прибавляют метанольный раствор 3 молей хлорида ртути, имеющий такую же температуру. Раствор осторожно кипятят 5—10 мин, осадок  $C_6H_5CH_2SHgCl$  отфильтровывают, фильтрат вновь кипятят и фильтруют, повторяя эти операции до тех пор, пока раствор не будет оставаться прозрачным при последующем кипячении (обычно  $\sim 1$  час). Затем раствор обрабатывают сероводородом, чтобы удалить избыток ионов ртути в виде сульфида ртути. Смесь фильтруют и раствор встряхивают с карбонатом серебра для удаления хлористого водорода. Фильтрат обычно содержит небольшое количество ионов серебра, его можно удалить в виде сульфида серебра, обрабатывая раствор сероводородом с последующим упариванием смеси на водяной бане в присутствии активированного угля до объема 20—30 мл. Полученный темный раствор, содержащий коллоидный сульфид серебра, фильтруют и фильтрат, обычно прозрачный и бесцветный, упаривают в вакууме до густого сиропа.

Сиропообразный  $\beta$ -метил-L-арабинопиранозид кристаллизуется из горячего спирта в виде шелковистых пластинок или мелких игл, выход 4,7 г (90%) из 13 г дибензилдитиоацетата, т. пл.  $169-170^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +246^\circ$  (с 1,2 в воде).

Сиропообразный  $\alpha$ -метил-D-галактопиранозид кристаллизуется из горячего спирта в виде игл, содержащих 1 моль кристаллизационной воды, выход 8,5 г (80%) из 20,5 г дибензилдитиоацетата, т. пл.  $111^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +178^\circ$  (с 1,5 в воде).

Для характеристики сиропообразного 6-дезоксид- $\alpha$ -метил-1-маннопиранозида ( $\alpha$ -1-рамнопиранозида) образец (3 г) превращают в ацетат, обрабатывая 1 час при 100° 9 мл пиридина и 18 мл уксусного ангидрида. Смесь выливают в воду со льдом, раствор выдерживают в течение ночи при 0° и затем отделяют бесцветные длинные иглы 2,3,4-три-О-ацетил-6-дезоксид- $\alpha$ -метил-1-маннопиранозида. Выход 2,6 г, т. пл. 86—87°,  $[\alpha]_D^{20} -54^\circ$  (в 1,1,2,2-тетрахлорэтаноле).

Аналогичным образом из дибензилдитиоацетата (20,5 г) [21] в этанольном растворе приготавливают  $\alpha$ -этил-D-галактопиранозид. Он кристаллизуется в виде бесцветных игл; выход 9,5 г (91%), т. пл. 139—140°,  $[\alpha]_D^{20} +187^\circ$  (с 1,6 в воде). Значения этих констант согласуются с литературными данными.

Для получения  $\alpha$ -аллил-D-галактопиранозида 10,3 г дибензилдитиоацетата [21] в 80 мл горячего аллилового спирта прибавляют к раствору 13,6 г тщательно измельченного хлорида ртути в 100 мл холодного аллилового спирта. После нагревания в течение 1 час при 70—80° реакционную смесь отфильтровывают от осадка  $C_6H_5CH_2SHgCl$  и аллиловый спирт отгоняют в вакууме. Для удаления непрореагировавшего исходного соединения остаток экстрагируют водой при 0°, от раствора отфильтровывают нерастворимый дитиоацетат и фильтрат концентрируют в вакууме. После повторения такой обработки получают сиропообразный продукт, который при встряхивании со спиртом превращается в кристаллическую массу бесцветных игл, выход 2,8 г (50%). Перекристаллизацией из горячего спирта можно получить чистое вещество с т. пл. 138—142°,  $[\alpha]_D^{20} +172^\circ$  (с 0,8 в воде).

### $\alpha$ - и $\beta$ -Этил-D-галактофуранозиды [10]

Смесь 11,4 г (1 моль) диэтилдитиоацетата D-галактозы [10, 21a], 21,8 г (2 моля) хлорида ртути и 17 г (избыток) желтой окиси ртути встряхивают 2 час при 20° в 200 мл спирта. Смесь фильтруют и к фильтрату прибавляют 5 мл пиридина. При этом почти немедленно осаждается молекулярное соединение пиридина и хлорида ртути. Смесь выдерживают при 0° в течение ночи, фильтруют и фильтрат упаривают в вакууме при 35° до сиропа. Полученный сироп растворяют в небольшом количестве холодной воды и отфильтровывают от выпавшего в осадок пиридинового комплекса. Раствор подщелачивают по фенолфталеину несколькими каплями разбавленной щелочи и упаривают в вакууме при 50°. Остаток растворяют в спирте, раствор фильтруют и упаривают в вакууме досуха. Эту операцию проводят дважды. Полученный сироп в течение нескольких часов медленно кристаллизуется. Его растворяют в 100 мл кипящего этилацетата, охлаждают до комнатной температуры, прозрачный раствор декантируют с небольшого количества нерастворившегося сиропа и выдерживают в течение ночи при 0°. Выделившиеся кристаллы отфильтровывают и перекристаллизовывают из 125 мл этилацетата. Выход чистого  $\beta$ -этил-D-галактофуранозида 5,8 г (70%), т. пл. 85—86°,  $[\alpha]_D^{20} -102^\circ$  (с 0,5 в воде).

Из дибензилдитиоацетата D-галактозы после трехчасового встряхивания при 20° получают 5 г (60%)  $\beta$ -этил-D-галактофуранозида.

Реакция 11,4 г диэтилдитиоацетата D-галактозы, 21,8 г хлорида ртути и 17 г окиси ртути, если ее проводить в спирте общим объемом 180 мл, при быстром перемешивании и температуре 70° в течение 1—2 час, дает только 3 г (35%) чистого  $\beta$ -этил-D-галактофуранозида.

Из маточного раствора, оставшегося после кристаллизации  $\beta$ -этил-D-галактофуранозид, был выделен кристаллический  $\alpha$ -этил-D-галактофуранозид [22]. С этой целью к раствору 28 г диэтилдитиоацетата в 250 мл спирта, интенсивно перемешиваемому при 70° с 35 г окиси ртути и 10 г порошкообразного драйсрита, за 30—40 мин прибавляют раствор 35 г хлорида ртути в 150 мл спирта. Далее смесь в течение 1 час охлаждают до 30°, фильтруют, к фильтрату прибавляют 10 мл пиридина и оставляют при 0° на ночь. Отфильтровывают соединение хлорида ртути с пиридином и фильтрат обрабатывают, как описано выше. Выход  $\beta$ -этил-D-галактофуранозид 10 г. Маточный раствор концентрируют приблизительно до 200 мл и выдерживают длительное время в холодильнике. Обычно через несколько дней кристаллизуется дополнительно некоторое количество  $\beta$ -этил-D-галактофуранозид, одновременно происходит кристаллизация  $\alpha$ -этил-D-галактофуранозид. Их разделяют механическим путем:  $\alpha$ -аномер образует круглые полупрозрачные друзы, а  $\beta$ -аномер кристаллизуется в виде хрупких игл. Неочищенный продукт,  $[\alpha]_D^{20} +84^\circ$ , растворяют примерно в 100 вес. частях горячего этилацетата и после охлаждения раствора до комнатной температуры получают в виде красивых коротких игл чистый  $\alpha$ -этил-D-галактофуранозид; выход  $\sim 0,4$  г, т. пл. 139—140°,  $[\alpha]_D^{20} +92^\circ$  (с 1,25 в воде).

**$\beta$ -Метил-,  $n$ -пропил- и бензил-D-галактофуранозиды;  
 $\alpha$ -метил- и этил-L-арабинофуранозиды [23]**

Описанная выше общая методика может быть применена и к другим спиртам и сахарам. Смесь 5,7 г (1 моль) диэтилдитиоацетата D-галактозы [10, 21a], 10,9 г (2 моля) хлорида ртути, 5 г желтой окиси ртути и 3 г драйсрита встряхивают с 60 мл метанола при комнатной температуре в течение 4 час, после чего реакционную смесь обрабатывают обычным образом. Сиропообразный продукт экстрагируют эфиром на механической качалке (общий объем растворителя составляет 4 л). Полученный экстракт упаривают на водяной бане при 40—50°. Оставшийся сироп растворяют в небольшом количестве метанола, раствор фильтруют и концентрируют в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием до густого сиропа. Сироп,  $[\alpha]_D^{20} -83^\circ$  (в воде), выдерживают в холодильнике до тех пор, пока он не закристаллизуется (1 месяц). Полученную кристаллическую массу растворяют в 100 мл теплого этилацетата и раствор оставляют при 0°. При этом медленно выделяются кристаллы в виде твердых друз. При повторной перекристаллизации из этилацетата получают чистые, но гигроскопичные кристаллы  $\beta$ -метил-D-галактофуранозид; выход 0,87 г (20%), т. пл. 63—65°,  $[\alpha]_D^{20} -180^\circ$  (с 1,65 в воде).

Аналогичная реакция в  $n$ -пропанолe приводит к сиропу, экстракция которого эфиром с последующим упариванием экстракта на водяной бане при 40—50° дает самопроизвольно кристаллизующийся остаток, выход 2,8 г. Чистый  $\beta$ - $n$ -пропил-D-галактофуранозид можно получить в виде игольчатых кристаллов из этилацетата, выход 1 г (23%), т. пл. 89—90°,  $[\alpha]_D^{20} -100^\circ$  (с 1,65 в воде).

Такую же смесь встряхивают 10 час при комнатной температуре с бензиловым спиртом, фильтруют, фильтрат разбавляют 480 мл петролейного эфира (т. кип. 30—60°) и 120 мл бензола и экстрагируют 4 порциями воды по 60 мл. Объединенные водные экстракты фильтруют, промывают небольшим количеством эфира для удаления бензинового спирта и в заключение обрабатывают 1 мл пиридина. Небольшое количество



комплекса пиридина и хлорида ртути отфильтровывают, фильтрат нейтрализуют по фенолфталеину несколькими каплями разбавленной щелочи и упаривают в вакууме при 40° до сиропа. Сироп высушивают посредством добавления этанола с последующей отгонкой. Эту операцию повторяют несколько раз и в результате получают густой сироп, который при хранении в эксикаторе при комнатной температуре медленно (5—6 недель) кристаллизуется. Кристаллическую массу обрабатывают 25 мл этилацетата и кристаллы отделяют; выход 1,25 г,  $[\alpha]_D -70^\circ$  (в воде). После трех перекристаллизаций из этилацетата получают чистый  $\beta$ -бензил-D-галактофуранозид; выход 0,65 г (12%), т. пл. 80—81°,  $[\alpha]_D^{20} -96^\circ$  (с 1,65 в воде).

По той же методике получают чистый  $\alpha$ -метил-L-арабинофуранозид; продолжительность встряхивания 2 час. Сироп, полученный из эфирного экстракта,  $[\alpha]_D -96^\circ$  (в воде), кристаллизуется за 2 дня при внесении в качестве затравки следов D-изомера. Из 25 мл сухого этилацетата получают чистое, но чрезвычайно гигроскопичное вещество; выход 0,45 г (14%),  $[\alpha]_D^{20} -125^\circ$  (с 1,3 в воде).

Сиропообразный  $\alpha$ -этил-L-арабинофуранозид,  $[\alpha]_D -79^\circ$  (в воде), полученный по тождественной методике, при хранении в течение 4 месяцев над пятиокисью фосфора превращается в кристаллическую массу. После перекристаллизации из 10 мл сухого этилацетата при 0° выход  $\alpha$ -этил-L-арабинофуранозида 0,9 г (24%), т. пл. 48—49°,  $[\alpha]_D^{20} -116^\circ$  (с 2,05 в воде). Эти кристаллы также весьма гигроскопичны.

#### **6-Дезокси- $\alpha$ -этил-L-маннофуранозид ( $\alpha$ -L-рамнофуранозид) и диметилацеталь 6-дезокси- L-маннозы (L-рамнозы) [5]**

Смесь 10,8 г (1 моль) диэтилдитиоацетата 6-дезокси-L-маннозы (L-рамнозы) [23a], 22 г (2 моля) хлорида ртути, 12 г окиси ртути и 6 г драйерита встряхивают 4 час при 25° с 80 мл спирта. Реакционную смесь обрабатывают так же, как было описано выше. Полученный сиропообразный остаток,  $[\alpha]_D -53^\circ$  (в воде), растворяют в 20 мл сухого этилацетата и разбавляют при 0° сухим эфиром до слабого помутнения. Выпадают кристаллы, выход 0,2 г,  $[\alpha]_D -71^\circ$  (в воде). После трех перекристаллизаций из сухого эфира (5 мл) с последующим разбавлением петролейным эфиром (т. кип. 30—60°) получают чистый 6-дезокси- $\alpha$ -этил-L-маннофуранозид ( $\alpha$ -L-рамнозид) в виде длинных толстых игл; выход 50 мг, т. пл. 54—56°,  $[\alpha]_D^{20} -95,5^\circ$  (с 1,1 в воде).

В результате такой же реакции в метаноле получают сироп,  $[\alpha]_D -35^\circ$  (в воде), который при упаривании этилацетатного раствора частично кристаллизуется. Вещество растворяют в 15 мл этилацетата и раствор оставляют в холодильнике; выход 0,3 г. Повторная кристаллизация дает 0,2 г (5%) чистого диметилацетата 6-дезокси-L-маннозы (L-рамнозы), т. пл. 123—124°,  $[\alpha]_D^{20} +10^\circ$  (с 0,4 в воде). Эти кристаллы, имеющие форму длинных красивых игл, не гигроскопичны.

#### **$\alpha$ - и $\beta$ -Метил-D-маннофуранозиды и другие $\alpha$ -алкил-D-маннофуранозиды [26, 27]**

Диэтилдитиоацеталь-D-маннозы — исходное соединение в этих синтезах — удобно и с высоким выходом получают из легко доступного  $\alpha$ -метил-D-маннопиранозида [24] при действии на него соляной кислоты

и этилмеркаптана [25]. Аналогичным образом можно получить дибензилдитиоацеталь D-маннозы [26].

Для получения аномерных метил-D-маннофуранозидов (см. также стр. 181) теплый раствор 109 г (2 моля) хлорида ртути в 500 мл метанола медленно прибавляют к суспензии 87 г желтой окиси ртути в растворе 57,6 г (1 моль) диэтилдитиоацетата D-маннозы и 500 мл метанола. Во время прибавления реагента, продолжающегося 3 час, смесь перемешивают или встряхивают. После удаления из фильтрата хлорида ртути с помощью пиридина [2] (см. выше в разделе « $\alpha$ - и  $\beta$ -Этил-D-галактофуранозиды») раствор фильтруют и упаривают в вакууме до сиропа, который часто кристаллизуется самопроизвольно. Затем сироп или кристаллический остаток растворяют в 2—3 объемных частях *n*-пропанола и в раствор вносят кристаллическую затравку. После завершения кристаллизации кристаллы отфильтровывают и промывают холодным *n*-пропанолом, пока оптическое вращение промывной жидкости не станет положительным. Фильтрат и промывную жидкость упаривают в вакууме, а остаток кристаллизуют из *n*-пропанола при 0° и получают вторую порцию тех же кристаллов. Их также промывают *n*-пропанолом (порциями по 10 мл) до положительного оптического вращения промывной жидкости. Общий выход неочищенного продукта 25 г (64%). Фильтрат, имеющий сильно отрицательное вращение, и промывную жидкость сохраняют для получения  $\beta$ -D-аномера. Для перекристаллизации продукт растворяют в десятикратном (по весу) количестве *n*-пропанола при 75°, горячий раствор фильтруют через воронку для горячего фильтрования и фильтрат выдерживают в холодильнике в течение ночи. После повторной перекристаллизации получают чистый  $\alpha$ -метил-D-маннофуранозид, т. пл. 118°,  $[\alpha]_D^{20} +108^\circ$  (в воде), что согласуется с данными, приведенными в литературе. Кристаллический тетраацетат получают ацелированием уксусным ангидридом с ацетатом натрия с последующим упариванием хлороформного раствора продукта в токе воздуха (см. стр. 115). Тетраацетат перекристаллизовывают из водного спирта, т. пл. 61—62°,  $[\alpha]_D^{20} +108^\circ$  (с 1,2 в хлороформе),  $+105^\circ$  (с 1,6 в *транс*-1,2-дихлорэтилене),  $+120^\circ$  (с 1,2 в *цис*-1,2-дихлорэтилене).

Упариванием в вакууме объединенных промывных жидкостей и фильтрата, оставшихся после выделения  $\alpha$ -метил-D-маннофуранозидов, получают сироп с сильным отрицательным вращением. К этому сиропу прибавляют насыщенный водный раствор 8 г хлористого кальция. Через несколько минут начинается кристаллизация молекулярного соединения  $\beta$ -метил-D-маннофуранозид·CaCl<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, инициируемая перемешиванием. Для предотвращения затвердевания смеси во время кристаллизации к ней прибавляют равный объем *n*-пропанола. Кристаллическую массу охлаждают несколько часов во льду и фильтруют с отсасыванием. Кристаллы промывают холодным спиртом, в котором они нерастворимы, и высушивают в вакууме над хлористым кальцием; выход 8 г (13%). Неочищенное соединение с хлористым кальцием растворяют в минимальном количестве метанола (20 мл). Следует избегать избытка метанола, поскольку растворение происходит медленно. К раствору при комнатной температуре порциями по несколько миллилитров прибавляют изобутанол до общего объема 60 мл. С этого момента начинается кристаллизация, во время которой к раствору прибавляют еще 20 мл изобутанола, доводя таким образом общий объем до 80 мл. Смесь выдерживают в течение ночи в холодильнике, кристаллы отфильтровывают и промывают изобутанолом; выход практически количественный,  $[\alpha]_D^{20} -58,5^\circ$  (с 1,7 в воде).

Для получения кристаллического  $\beta$ -метил-D-маннофуранозид из его кристаллического соединения с хлористым кальцием раствор 3,6 г комплекса в 50 мл воды встряхивают 30 мин с эквивалентным количеством оксалата серебра. Реакционную смесь фильтруют, подщелачивают несколькими каплями аммиака и упаривают в вакууме до сиропа, который несколько раз обрабатывают спиртом, каждый раз выпаривая растворитель в вакууме, чтобы добиться удаления воды. Небольшую порцию сиропа экстрагируют 25 мл горячего этилацетата и полученный раствор медленно упаривают в эксикаторе. Таким путем получают затравку кристаллического продукта. Далее основную массу сиропа экстрагируют несколькими порциями теплого этилацетата, прозрачную надосадочную жидкость декантируют в чистую колбу, вносят затравку и оставляют при 0°. Кристаллизация, продолжающаяся несколько дней, дает мелкие иглы; выход 1 г. После повторной кристаллизации из этилацетата получают чистый  $\beta$ -метил-D-маннофуранозид, т. пл. 46—47°,  $[\alpha]_D^{20} -113^\circ$  (с 2,95 в воде).

Для получения других  $\alpha$ -алкил-D-маннофуранозидов к раствору 22,8 г диэтилдитиоацетата маннозы в соответствующем спирте (200 мл этанола или 400 мл *n*-пропанола или изопропанола) прибавляют 34 г желтой окиси ртути. К полученной смеси при интенсивном перемешивании прибавляют раствор 43,6 г хлорида ртути в 200 мл этанола (или в 325 мл *n*-пропанола, или в 280 мл изопропанола). Смесь встряхивают или перемешивают в течение определенного времени (3 час в случае изопропанола, 6 час в случае этанола и в течение ночи в случае *n*-пропанола), после чего смесь фильтруют. Фильтрат и промывную жидкость обрабатывают так же, как описано выше для  $\alpha$ -метил-D-маннофуранозид. Полученный сироп кристаллизуется самопроизвольно. Продукты перекристаллизовывают из этилацетата. Их константы следующие.  $\alpha$ -Этил-D-маннофуранозид: т. пл. 90°,  $[\alpha]_D^{20} +105^\circ$  (в воде);  $\alpha$ -*n*-пропил-D-маннофуранозид: т. пл. 89°,  $[\alpha]_D^{20} +96^\circ$  (в воде);  $\alpha$ -изопропил-D-маннофуранозид: т. пл. 82—84°,  $[\alpha]_D^{20} +97^\circ$  (в воде).

Для смеси 23 г дибензилдитиоацетата 2-О-метил-D-маннозы [26], 23 г желтой окиси ртути и 30 г хлорида ртути в 200 мл метанола продолжительность перемешивания при 60° составляет 6 час; при этом получают 10 г бесцветной невосстанавливающей жидкости,  $[\alpha]_D +67^\circ$  [26]. 5 г этой жидкости растворяют в 15 мл горячего этилацетата. После охлаждения раствора до 0° выкристаллизовывается 2-О-метил- $\alpha$ -метил-D-маннофуранозид, выход 2,4 г. Перекристаллизацией из 2 частей спирта и 1 части эфира получают чистое вещество в виде длинных призматических игл; выход 2,2 г, т. пл. 82°,  $[\alpha]_D^{25} +129,5^\circ$  (с 2,6 в воде). Из маточного раствора при концентрировании и последующем охлаждении выкристаллизовывается диметилацеталь 2-О-метил-D-маннозы в виде мелких пластинок, выход 25 мг. Перекристаллизацией более крупного образца из *n*-пропанола получают чистое вещество; т. пл. 111—112°,  $[\alpha]_D^{25} -11^\circ$  (с 2,65 в воде).

#### Диметилацеталь D-фруктозы и $\alpha$ -метил-D-фруктофуранозид [6, 15]

В трехгорлую колбу, снабженную механической мешалкой с ртутным затвором, капельной воронкой и обратным холодильником, помещают 11,4 г (1 моль) диэтилдитиоацетата D-фруктозы [28], полученного по несколько модифицированной методике [15], 100 мл метанола и 17 г желтой окиси ртути. Прибор помещают в сосуд Дьюара, содержащий

смесь ацетона с твердой углекислотой, а сосуд в свою очередь погружают в баню со смесью льда и соли. При энергичном перемешивании к реакционной смеси из капельной воронки в течение 15 мин прибавляют раствор 21,8 г (2 молей) хлорида ртути в 60 мл метанола. После 17 час перемешивания при температуре охлаждающей смеси реакция заканчивается, о чем судят по прекращению выделения осадка  $C_2H_5SHgCl$  при нагревании профильтрованной пробы реакционной смеси. После этого смесь фильтруют и прибавляют 5 мл пиридина для удаления хлорида ртути. После двухчасового стояния при  $0^\circ$  от смеси отфильтровывают осадок комплекса пиридина с хлоридом ртути и фильтрат упаривают в вакууме до сиропа. Для удаления последних следов пиридиновой соли сироп растворяют в воде при  $0^\circ$  и фильтруют раствор через уголь. После этого фильтрат подщелачивают по фенолфталеину несколькими каплями разбавленной щелочи и упаривают в вакууме до сиропа. Сироп растворяют в метаноле, раствор в случае необходимости фильтруют через уголь и фильтрат упаривают в вакууме до бесцветного невосстанавливающего сиропа, который постепенно кристаллизуется. Образующиеся кристаллы по своей форме напоминают алмазы. Вещество кристаллизуется из *n*-пропанола в виде прекрасно сформированных призм. После заключительной перекристаллизации из спирта получают чистый диметилацеталь *D*-фруктозы; выход 7 г (77%), т. пл.  $107-108^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} -46^\circ$  (с 3,0 в воде),  $[\alpha]_D^{20} -63^\circ$  (в метаноле).

Для ацетилирования 1 г ацетала обрабатывают при  $100^\circ$  уксусным ангидридом, содержащим 5% ацетата натрия (см. стр. 115). Концентрированием раствора в вакууме получают сироп, который при добавлении воды сразу же кристаллизуется. После перекристаллизации из спирта получают чистый диметилацеталь пента-О-ацетил-*D*-фруктозы в виде хорошо сформированных призм, т. пл.  $109^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} \pm 0^\circ$  (в хлороформе).

При действии на диэтилдитиоацеталь *D*-фруктозы метанольного раствора хлорида ртути при  $0^\circ$  или при более высоких температурах выход ацетала снижается. Маточный раствор, полученный в этих опытах, дает сиропообразный остаток, из которого экстракцией горячим этилацетатом и концентрированием получают невосстанавливающий сироп с  $[\alpha]_D +6^\circ$ . Этот остаток последовательно экстрагируют ацетоном и этилацетатом. При стоянии этилацетатного раствора при комнатной температуре выкристаллизовываются хорошо сформированные острые призмы. После перекристаллизации из метанола, содержащего небольшое количество *n*-амилового спирта, получают чистый кристаллический  $\alpha$ -метил-*D*-фруктофуранозид, т. пл.  $69^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +93^\circ$  (в воде), что согласуется с данными Пюрвеса и Хадсона [29], которые позже (см. [30], примечание 3) дают ту же величину удельного вращения, но т. пл.  $80,5-81^\circ$ .

Остаток, нерастворимый в этилацетате, снова экстрагируют горячим этилацетатом. Нерастворимая в этилацетате часть имеет в воде удельное вращение  $-35^\circ$ . При добавлении к раствору инвертазы эта величина быстро падает до  $-64^\circ$ , причем раствор становится сильно восстанавливающим. Вероятно, это сиропообразное вещество представляет собой  $\beta$ -метил-*D*-фруктофуранозид («гамма-метилфруктозид» Пюверса и Хадсона [29]).

#### ***$\alpha$ -Акил-1-тио-*D*-глюкофуранозиды [7]***

К 300 мл водного раствора 8,2 г (1 моль) хлорида ртути при комнатной температуре небольшими порциями прибавляют 350 мл водного раствора 8,55 г (1 моль) диэтилдитиоацетала *D*-глюкозы (см. стр. 203).

Немедленно происходит образование осадка  $C_2H_5SHgCl$ . Раствор, становящийся кислым вследствие освобождения хлористого водорода, периодически нейтрализуют 1 н. щелочью. Через 2 час смесь фильтруют, фильтрат слегка подщелачивают несколькими каплями аммиака и упаривают досуха на водяной бане. Остаток экстрагируют этилацетатом.  $\alpha$ -Этил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозид выкристаллизовывается из профильтрованного раствора в виде мелких бесцветных шелковистых игл; чистое вещество получают двукратной перекристаллизацией из этилацетата, выход 4,4 г (65%), т. пл.  $153^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +121^\circ$  (с 3,4 в воде).

Аналогичным образом из 7,7 г диметилдитиоацетата  $\beta$ -глюкозы [8] и 8,2 г хлорида ртути, каждое вещество растворено в 1 л воды, получают чистый  $\alpha$ -метил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозид [8]; выход 44%, т. пл.  $137^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +124,5^\circ$  (с 3,8 в воде).

Ту же методику применяют для получения  $\alpha$ -*n*-пропил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозида [8], используя раствор 9,4 г ди-*n*-пропилдитиоацетата  $\beta$ -глюкозы [8] в смеси 1,5 л воды и 300 мл спирта и раствор 8,2 г хлорида ртути в 1 л воды. Выход  $\alpha$ -*n*-пропил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозида 30%, т. пл.  $118-122^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +116,5^\circ$  (с 3,6 в воде).

Из раствора 18,9 г дибензилдитиоацетата  $\beta$ -глюкозы [19, 20] в смеси 1,5 л воды и 800 мл спирта и раствора 12,3 г хлорида ртути в 1,5 л воды по этой же методике с низким выходом (10%) получают  $\alpha$ -бензил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозид, т. пл.  $112-114^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} +176^\circ$  (с 3,1 в воде).

Низкий выход 1-тиоглюкофуранозидов, в частности бензилтиоглюкофуранозида, обычно получаемый по этим методикам, по-видимому, связан с использованием низких температур и разбавленных растворов. При прибавлении раствора 4,1 г дибензилдитиоацетата  $\beta$ -глюкозы в 50 мл горячего спирта к 2,72 г хлорида ртути в 10 мл спирта с последующим выдерживанием смеси при  $70^\circ$  в течение 5—10 мин и без нейтрализации освобождающегося хлористого водорода выход  $\alpha$ -бензил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозида повышается до 81% [1]. Но при низкой температуре ( $20^\circ$ ) даже в присутствии окиси ртути (9 г) в спиртовом растворе (общий объем 200 мл) из 16,4 г (1 моля) дибензилдитиоацетата  $\beta$ -глюкозы и 5,5 г (0,5 моля) хлорида ртути получают только 34% теоретического выхода 1-тио- $\beta$ -глюкофуранозида [10]. Для получения высокого выхода  $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозида благоприятное воздействие оказывает удаление освобождающегося хлористого водорода. Так, при применении методики с использованием окиси ртути и пиридина и водного раствора диэтилдитиоацетата выход равен 55 [10] или 63% [12], в то время как при применении спиртового раствора без окиси ртути выход составляет всего 40% [10].

О получении 2-ацетамидо-2-дезокс- $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозида см. стр. 132.

### **Аномеризация $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозида в $\beta$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозид [12]**

13 г  $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозида растворяют в 495 мл кипящей воды, к раствору прибавляют 5 мл 1 н. соляной кислоты и смесь выдерживают 25 мин при  $100^\circ$ . Раствор нейтрализуют 1 н. щелочью и упаривают в вакууме досуха. Перекристаллизацией остатка из воды получают ~3 г неизмененного исходного соединения в кристаллическом состоянии. Фильтрат упаривают в вакууме до подвижного сиропа и затем экстрагируют небольшими порциями горячего этилацетата (общий объем

~100 мл). Объединенные экстракты охлаждают до 0°, прозрачный этилацетатный раствор отделяют от выделившегося подвижного сиропа и упаривают в вакууме до подвижной жидкости,  $[\alpha]_D -41^\circ$  (в воде). Этот продукт экстрагируют при комнатной температуре приблизительно 80 мл этилацетата, экстракт обрабатывают активированным углем и выдерживают несколько дней при 0°. Выпадающий за это время сироп вновь отделяют, а раствор упаривают в вакууме до  $[\alpha]_D -70^\circ$ . Процедуру повторяют, но на этот раз экстракцию этилацетатом проводят при 0°. Остаток, полученный из этого раствора, имеет  $[\alpha]_D -92^\circ$ . В результате последующей очистки экстракцией жидкости холодной смесью этилацетата с абсолютным эфиром получают остаток с  $[\alpha]_D -101^\circ$  (в воде). Заключительная экстракция примерно 300 мл абсолютного эфира дает небольшое количество бесцветной невосстанавливающей подвижной жидкости; выход 0,4 г,  $[\alpha]_D^{20} -104^\circ$  (с 4,5 в воде). Тетраацетат также является сиропом,  $[\alpha]_D^{20} -53^\circ$  (с 2,4 в хлороформе).

### *Превращение $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозид в $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкопиранозид [12]*

3 г  $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкофуранозид растворяют в 200 мл горячей 0,01 н. соляной кислоты и раствор нагревают при 100° 3 час. После охлаждения раствор нейтрализуют карбонатом серебра, фильтруют и фильтрат обрабатывают сероводородом для удаления растворенных серебряных солей. Раствор,  $[\alpha]_D +110^\circ$ , упаривают в вакууме до сиропа, который растворяют в 30 мл воды, фильтруют и упаривают до подвижного сиропа. Эту операцию проводят несколько раз. В заключение раствор остатка выдерживают при 40° с дрожжами в течение 2 дней для полного удаления  $\beta$ -глюкозы. Дрожжи отфильтровывают с углем и раствор упаривают до бесцветного невосстанавливающего сиропа,  $[\alpha]_D +151^\circ$ . Остаток растворяют в этилацетате и выдерживают раствор в холодильнике в течение нескольких дней. Выпадающий при этом в виде мелких стекловидных друз  $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкопиранозид, возможно, загрязнен  $\beta$ - $\beta$ -изомером; выход 1 г,  $[\alpha]_D +170^\circ$  (в воде). Поскольку очистить вещество перекристаллизацией не удастся, его превращают в ацетат по стандартной методике с использованием уксусного ангидрида и ацетата натрия (см. стр. 115). Перекристаллизациями из метанола, а затем из метанола, содержащего небольшое количество воды, получают тетраацетат в виде мелких бесцветных призматических игл; выход 1 г, т. пл. 95°,  $[\alpha]_D^{20} +194^\circ$  (с 1,6 в хлороформе). Деацетилизированием по методу Земплена и Паксу [31] получают чистый  $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкопиранозид, который кристаллизуется из этилацетата при низкой температуре в виде мелких сферических друз, построенных из игольчатых кристаллов. Вещество имеет необычно высокое удельное вращение:  $[\alpha]_D^{20} +261,5^\circ$  (с 2,0 в воде). Бригль и сотр. [11] дают т. пл. 117° и  $[\alpha]_D +269^\circ$  (с 1,6 в воде) для чистого  $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкопиранозид, перекристаллизованного медленным испарением спиртового раствора. Для чистого тетраацетата т. пл. 97,5°,  $[\alpha]_D +190^\circ$  (в 1,1,2,2-тетрахлорэтаноле),  $[\alpha]_D +207^\circ$  (в спирте). При охлаждении спиртового или ацетонового раствора свободного  $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -глюкопиранозид образуются гели.

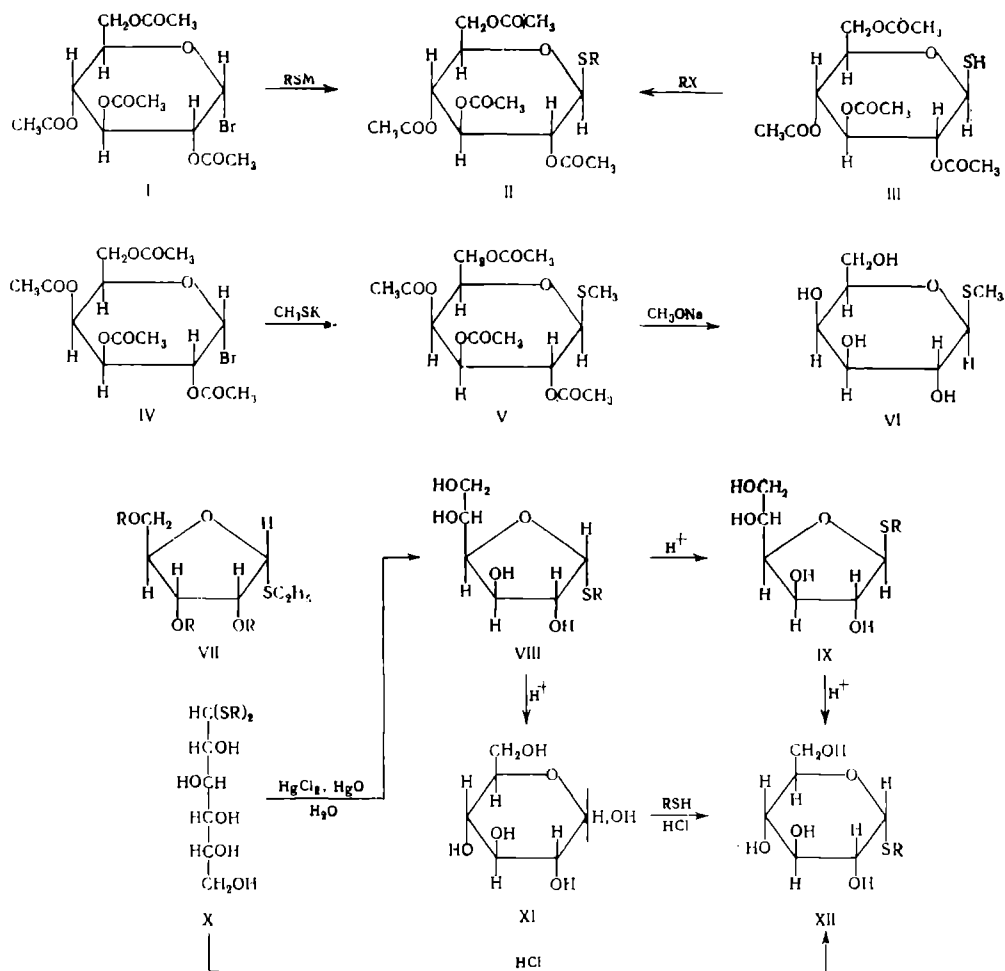
### ЛИТЕРАТУРА

1. Рассу Е., Бер., 58, 509 (1925).
2. Рассу Е., Грин Дж. У., J. Am. Chem. Soc., 58, 1823 (1936).

3. Fischer E., Ber., 28, 1145 (1895).
4. Fischer E., Ber., 47, 1980 (1914).
5. Green J. W., Pacsu E., J. Am. Chem. Soc., 60, 2288 (1938).
6. Pacsu E., J. Am. Chem. Soc., 60, 2277 (1938).
7. Schneider W., Sepp J., Ber., 49, 2054 (1916).
8. Schneider W., Sepp J., Stiehler O., Ber., 51, 220 (1918).
9. Schneider W., Gille R., Eisfeld K., Ber., 61, 1244 (1928).
10. Green J. W., Pacsu E., J. Am. Chem. Soc., 59, 1205 (1937).
11. Brigl P., Gronemeier K., Schulz A., Ber., 72, 1052 (1939).
12. Pacsu E., Wilson E. J., Jr., J. Am. Chem. Soc., 61, 1450 (1939).
13. Levene P. A., Raymond A. L., Dillon R. T., J. Biol. Chem., 95, 699 (1932).
14. Levene P. A., Raymond A. L., Dillon R. T., J. Biol. Chem., 96, 449 (1932).
15. Pacsu E., J. Am. Chem. Soc., 61, 1671 (1939).
16. Wolfrom M. L., Weisblat D. I., J. Am. Chem. Soc., 62, 878 (1940).
17. Wolfrom M. L., Weisblat D. I., Hanze A. R., J. Am. Chem. Soc., 62, 3246 (1940).
18. Wolfrom M. L., Weisblat D. I., Hanze A. R., J. Am. Chem. Soc., 66, 2065 (1944).
19. Lawrence W. T., Ber., 29, 547 (1896).
20. Pacsu E., Ber., 57, 849 (1924).
21. Pacsu E., Ticharich N., Ber., 62, 3008 (1929).
- 21a. Wolfrom M. L., J. Am. Chem. Soc., 52, 2464 (1930).
22. Green J. W., Pacsu E., J. Am. Chem. Soc., 59, 2569 (1937).
23. Green J. W., Pacsu E., J. Am. Chem. Soc., 60, 2056 (1938).
- 23a. Fischer E., Ber., 27, 678 (1894).
24. Hudson C. S., Organic Syntheses, 7, 64 (1927).
25. Scattergood A., Pacsu E., J. Am. Chem. Soc., 62, 903 (1940).
26. Pacsu E., Trister S. M., J. Am. Chem. Soc., 63, 925 (1941).
27. Pacsu E., Scattergood A., J. Am. Chem. Soc., 61, 534 (1939).
28. Wolfrom M. L., Thompson A., J. Am. Chem. Soc., 56, 880 (1934).
29. Purves C. B., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., 56, 708 (1934).
30. Purves C. B., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., 59, 49 (1937).
31. Zemplén G., Pacsu E., Ber., 62, 1613 (1929).

## 1-Тиогликозиды

Д. Хортон



## ВВЕДЕНИЕ

Первый синтез 1-тиогликозида был выполнен Фишером и Дельбрюком [1], получившими тетраацетат  $\beta$ -фенил-1-тио-D-глюкопиранозида (II,  $\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5$ ) при реакции тетра-O-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромидом (см. стр. 123) с тиофенолятом натрия. В дальнейшем эта реакция была использована как общий метод синтеза ацетилированных  $\beta$ -алкил- и  $\beta$ -арил-1-тио-D-гликозидов (или  $\alpha$ -1-тио-L-гликозидов) из ацетилированных гликозилгалогенидов и солей щелочных металлов соответствующих тиолов [2—7]. В качестве типичного примера здесь описан синтез 2,3,4,6-тетра-O-ацетил- $\beta$ -метил-1-тио-D-галактопиранозида (V) [4] из 2,3,4,6-тетра-O-ацетил- $\alpha$ -D-галактопиранозилбромидом (IV). Удаление ацетильных групп, приводящее к  $\beta$ -алкил- или  $\beta$ -арил-1-тио-D-гликозидам, легко можно выполнить с помощью известных методов (см. стр. 119). Дру-



гой удобный путь синтеза ацетилированных  $\beta$ -1-тио-D-глюкопиранозидов состоит в S-алкилировании 2,3,4,6-тетра-O-ацетил-1-тио- $\beta$ -D-глюкопиранозы (III) галогеналкилом [8, 9]. Этот метод целесообразно использовать в тех случаях, когда соответствующее тиопроизводное, необходимое для первого синтеза, труднодоступно. При обработке ацетатов сахаров этилмеркаптаном и хлористым цинком также можно получить ацетилированные  $\beta$ -1-тио-D-глюкозиды [10, 11], однако при такой методике возможно включение тиоэтильной группы и в другие участки молекулы.  $\beta$ -1-Тио-D-глюкозиды были выделены с низким выходом из смеси продуктов, образовавшихся при катализируемой кислотой реакции альдоз с этилмеркаптаном [12].

Достаточно общий синтез  $\alpha$ -1-тио-D-гликозидов не известен.  $\alpha$ -Алкил-1-тио-D-глюкофуранозиды (VIII) (см. стр. 184) были синтезированы Шнейдером и Зеппом при обработке диалкилдитиоацеталей D-глюкозы (X) 1 молем хлорида ртути в присутствии основания [2, 13]. Как было показано Грином и Паксу [14], а также Вольфромом и сотр. [15], эти соединения имеют фуранозную циклическую структуру. В качестве аналогичного примера в ряду D-рибозы здесь описан синтез  $\alpha$ -этил-1-тио-D-рибофуранозид (VII, R=H) [7] (ср. [16]). Эта реакция представляет собой первый этап двустадийной конверсии диалкилдитиоацетала в альдозу (например, XI). Оказалось, что относительные скорости двух последовательных реакций: диалкилдитиоацеталь альдозы  $\rightarrow$  алкил-1-тиогликозид и алкил-1-тиогликозид  $\rightarrow$  альдоза зависят от конфигурации сахара [7]. В случае производных D-глюкозы и D-рибозы вторая реакция протекает значительно медленнее первой, в результате чего получаются высокие выходы 1-тиогликозидов. В сходном случае производных D-галактозы [17] и D-ликозы скорости обеих реакций близки, и выход 1-тиогликозидов ниже. В ряду D-маннозы и D-ксилозы вторая реакция протекает быстрее первой, и единственными продуктами, которые удается выделить, оказываются исходный неизмененный диалкилдитиоацеталь и соответствующий моносахарид.

$\alpha$ -Этил-1-тио-D-глюкопиранозид (XII, R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) был получен [16] (см. стр. 184) в результате обработки соответствующего  $\alpha$ -1-тио-D-фуранозид (VIII, R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) очень разбавленной кислотой при 100°. При меньшей продолжительности реакции образуется  $\beta$ -1-тио-D-фуранозид (IX) (см. стр. 184). Общие выходы низки, поскольку реакция осложняется одновременно протекающим полным гидролизом исходного соединения до D-глюкозы (XI).  $\alpha$ -Этил-1-тио-D-глюкопиранозид был также получен с низким выходом при обработке диэтилдитиоацетала D-глюкозы или смеси D-глюкозы с этилмеркаптаном 22%-ной соляной кислотой [18, 19]. Был также описан синтез  $\alpha$ -1-тио-D-гликозидов из гликозилгалогенидов и меркаптанов [20]. Использувавшиеся в этой работе гликозилгалогениды имели свободную гидроксильную группу при C-2 в *транс*-положении по отношению к атому галогена при C-1. Эти соединения дают продукты с  $\alpha$ -D-конфигурацией путем двойного вальденовского обращения, включающего промежуточное образование эпоксида.

## МЕТОДИКА

**2,3,4,6-Тетра-О-ацетил- $\beta$ -метил-1-тио- $\beta$ -галактопиранозид (V) [4]**

Суспензию 35 г тщательно измельченного 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\alpha$ - $\beta$ -галактопиранозилбромид (IV) [21] (см. стр. 174) в 50 мл сухого метанола обрабатывают раствором, полученным постепенным прибавлением к 50 мл безводного метанола 3,3 г калия и последующим прибавлением 8 мл метилмеркаптана. Смесь встряхивают, периодически охлаждая для предотвращения перегрева, до тех пор, пока растворение гликозилгалогенида и осаждение бромистого калия не будет полным. Фиолетово-коричневый раствор фильтруют и упаривают в вакууме до сиропа. Последний ацетируют десятиминутным кипячением с 150 мл уксусного ангидрида и 15 г безводного ацетата натрия (см. стр. 115). После охлаждения смесь выливают в 500 г льда, выпадающее при перемешивании частично закристаллизовавшееся масло отделяют, тщательно промывают водой и перекристаллизовывают из спирта. Получают бесцветные иглы, выход 19 г (59%), т. пл. 108°,  $[\alpha]_D^{25} +3^\circ$  (в хлороформе).

 **$\beta$ -Метил-1-тио- $\beta$ -галактопиранозид (VI) [4]**

Суспензию 9 г 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\beta$ -метил-1-тио- $\beta$ -галактопиранозид (V) в 36 мл безводного метанола обрабатывают 9 мл 0,1 н. метанольного раствора метилата натрия. При встряхивании ацетат растворяется, а большая часть продукта кристаллизуется при охлаждении до 0°. Концентрированием маточного раствора получают дополнительное количество VI. Неочищенный препарат дважды перекристаллизовывают из 20 объемов спирта; выход 3,5 г (70%), т. пл. 174—175°,  $[\alpha]_D^{25} +11^\circ$  (в воде).

 **$\alpha$ -Этил-1-тио- $\beta$ -рибофуранозид (VII, R=H) [7] (ср. [16])**

К перемешиваемому раствору 0,80 г едкого натра в 20 мл воды медленно прибавляют раствор 2,72 г (0,01 моля) хлорида ртути в 40 мл воды. Выпавший осадок желтой окиси ртути дважды промывают декантацией и суспендируют в 40 мл воды. К этой суспензии при интенсивном перемешивании прибавляют 2,56 г (0,01 моля) тщательно измельченного диэтилдитиоацетата  $\beta$ -рибозы [22], после чего в течение 30 мин прикапывают охлажденный раствор 1,36 г (0,005 моля) хлорида ртути в 25 мл воды. Перемешивание продолжают в течение 1 час при 20°, раствор фильтруют и осадок дважды промывают 5 мл воды. Фильтрат обрабатывают 1,0 мл пиридина и выдерживают 12 час при 0°. Осадок ртутнопиридинового комплекса отфильтровывают и фильтрат упаривают при 35° до сиропа. Полученный сироп растворяют в 20 мл горячего метилпропилкетона, раствор встряхивают с активированным углем и безводным сульфатом натрия, фильтруют, концентрируют до 10 мл и оставляют для кристаллизации. Продукт отфильтровывают и промывают эфиром, предохраняя от влаги. Таким путем получают безводный  $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -рибофуранозид в виде листочков; выход 1,32 г (68%), т. пл. 71—72°,  $[\alpha]_D^{25} +175^\circ$  (с 4,4 в воде). При кристаллизации неочищенного сиропа из 95%-ного спирта получают иглы полугидрата; выход 1,30 г (64%), т. пл. 75°.

## ПРОИЗВОДНОЕ

$\alpha$ -Этил-1-тио- $\beta$ -рибофуранозид можно охарактеризовать как кристаллический триацетат (VII, R = CH<sub>3</sub>CO).

**2,3,5-Три-О-ацетил- $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -рибофуранозид**  
(VII, R = CH<sub>3</sub>CO) [7]

Раствор 1,94 г  $\alpha$ -этил-1-тио- $\beta$ -рибофуранозид в 12 мл пиридина обрабатывают при 0° 7 мл уксусного ангидрида. Раствор оставляют на 16 час при комнатной температуре, выливают в 100 мл воды, кристаллический продукт отфильтровывают и перекристаллизовывают из водного спирта; выход 2,27 г (71%), т. пл. 62°,  $[\alpha]_D^{20} +206^\circ$  (с 2,0 в хлороформе).

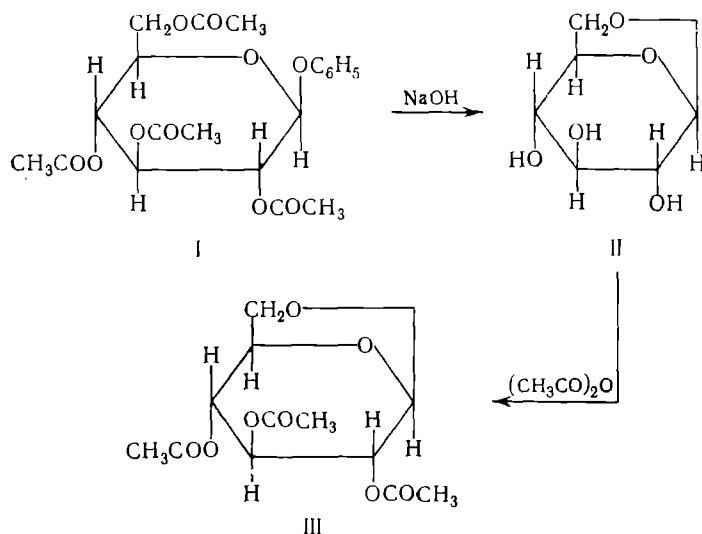
## ЛИТЕРАТУРА

1. Fischer E., Delbrück K., Ber., **42**, 1476 (1909).
2. Schneider W., Sepp J., Stiehler O., Ber., **51**, 220 (1918).
3. Purves C. B., J. Am. Chem. Soc., **51**, 3619, 3631 (1929).
4. Helferich B., Grünewald H., Laugenhoff F., Chem. Ber., **86** 873 (1953).
5. Helferich B., Türk D., Chem. Ber., **89**, 2215 (1956).
6. Staněk J., Malkovský K., Novák M., Petříček D., Chem. listy, **51**, 1556 (1957); Collection Czechoslov. Chem. Commun., **23**, 336 (1958).
7. Zinner H., Koine A., Nimz H., Chem. Ber., **93**, 2705 (1960).
8. Schneider W., Gille R., Eisfeld K., Ber., **61**, 1244 (1928).
9. Černý M., Pacák J., Chem., listy, **52**, 2090 (1958); Collection Czechoslov. Chem. Commun., **24**, 2566 (1959).
10. Wolfrom M. L., Thompson A., J. Am. Chem. Soc., **56**, 880, 1804 (1934).
11. Lemieux R. U., Can. J. Chem., **29**, 1079 (1951).
12. Fried J., Walz D. E., J. Am. Chem. Soc., **71**, 140 (1949).
13. Schneider W., Sepp J., Ber., **49**, 2054 (1916).
14. Green J. W., Pacsu E., J. Am. Chem. Soc., **59**, 1205 (1937).
15. Wolfrom M. L., Waishrot S. W., Weisblat D. I., Thompson A., J. Am. Chem. Soc., **66**, 2063 (1944).
16. Pacsu E., Wilson E. J., Jr., J. Am. Chem. Soc., **61**, 1450 (1939).
17. Wolfrom M. L., Yosizawa Z., Juliano B. O., J. Org. Chem., **24**, 1529 (1959).
18. Brigl P., Gronemeier G., Schultz A., Ber., **72**, 1052 (1939).
19. Pacsu E., Wilson E. J., Jr., J. Am. Chem. Soc., **61**, 1930 (1939).
20. Reist E. J., Hart P. A., Goodman L., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., **81**, 5176 (1959).
21. Bárczai-Martos M., Körösy F., Nature (London), **165**, 369 (1950).
22. Zinner H., Chem. Ber., **86**, 495 (1953).

## Триацетат 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы (триацетат левоглюкозана)

Получение реакцией тетраацетата β-фенил-D-глюкопиранозиды со щелочью

Дж. Х. Колеман



### ВВЕДЕНИЕ

Получение 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы (левоглюкозана) (II) пиролизом различных углеводов описано в работе [1]. При малых нагрузках по этой методике получают высокие выходы, но они быстро падают с увеличением количеств перерабатываемых веществ. Левоглюкозан был также получен при нагревании со щелочью бромистого триметил-(тетра-О-ацетил-α-D-глюкопиранозил)аммония [2]. Излагаемый здесь способ получения является модификацией описанных ранее методов [3, 4].

Тетра-О-ацетил-β-фенил-D-глюкопиранозид нагревают с раствором едкого натра. Образующийся левоглюкозан ацетируют уксусным ангидридом и выделяют в виде легко кристаллизующегося триацетата. Левоглюкозан легко можно регенерировать из ацетата перэстерификацией [5].

### МЕТОДИКА

#### Тетра-О-ацетил-β-фенил-D-глюкопиранозид (I)

Тетра-О-ацетил-β-фенил-D-глюкопиранозид можно легко получить из пента-О-ацетил-β-D-глюкопиранозы по методу Монтоммери и сотр. [6]. Как было показано, следующая модифицированная методика удобна для проведения синтеза в крупных масштабах. К раствору 7,5 г моногидрата *p*-толуолсульфокислоты в 500 г теплого фенола прибавляют 585 г пента-О-ацетил-β-D-глюкопиранозы (см. стр. 115). Колбу снабжают капиллярной трубкой и приспособлением для перегонки. Смесь сильно нагревают на паровой бане в вакууме (остаточное давление 20 мм). После начала отгонки нагревание в этих условиях продолжают 30 мин, затем давление пони-

жают до 10—12 мм и смесь нагревают еще 15 мин. После этого отгонку прекращают и к смеси прибавляют раствор 2,5 г едкого натра в 150 мл теплого фенола. Далее смесь вновь нагревают при 10—12 мм до почти полного прекращения отгонки. После этого давление понижают до 1 мм и отгоняют весь фенол. Вязкий остаток перемешивают с 1 л горячей воды и оставляют охлаждаться. Воду декантируют, остаток растворяют в 500 мл горячего 95%-ного спирта, раствор оставляют при комнатной температуре на 15—20 час для кристаллизации. Кристаллы тетра-О-ацетил-β-фенил-D-глюкопиранозида (I) отфильтровывают, промывают 70%-ным спиртом и сушат на воздухе. Выход 412—482 г (65—76%), г. пл. 120—122°. Продукт достаточно чист для получения левоглюкозана.

### *Триацетат 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы (левоглюкозана) (III)*

В круглодонную колбу емкостью 5 л помещают раствор 429 г едкого натра в 3,33 л воды и к нему прибавляют 554 г (4,3 моля) тетра-О-ацетил-β-фенил-D-глюкопиранозида. К колбе присоединяют короткий обратный холодильник и смесь нагревают до кипения с помощью электрической нагревательной рубашки и осторожно кипятят ~20 час. К концу первого часа большая часть гликозида должна перейти в раствор. При использовании чистого тетра-О-ацетил-β-фенил-D-глюкопиранозида смесь после кипячения имеет лишь слабо-желтый цвет. Если исходное соединение загрязнено заметными количествами пента-О-ацетил-β-D-глюкопиранозы, раствор темнеет.

По окончании кипячения раствор охлаждают до комнатной температуры и нейтрализуют 454 г концентрированной серной кислоты, предварительно разбавленной равным весом количества льда. Если были применены недостаточно чистые реагенты и раствор получился очень темным, на этой стадии его можно обработать углем и профильтровать.

Далее раствор упаривают в вакууме на паровой бане досуха <sup>1</sup>. Остаток тщательно экстрагируют 2,5 л кипящего 95%-ного спирта и экстракт фильтруют на воронке Бюхнера с отсасыванием. Нерастворенные соли промывают двумя порциями по 500 мл горячего спирта. Спиртовый раствор упаривают в колбе емкостью 5 л в вакууме досуха <sup>2</sup>. Остаток ацетилируют, осторожно прибавляя 1,5 л уксусного ангидрида <sup>3</sup>.

Смесь нагревают 1 час на паровой бане. Затем постепенно прибавляют воду в количестве, достаточном для разложения избытка уксусного ангидрида (125 мл), и уксусную кислоту отгоняют в вакууме. Остаток экстрагируют 2 л хлороформа и хлороформный раствор дважды промывают водой порциями по 500 мл для удаления суспендированных солей. Хлороформ отгоняют на паровой бане (в конце отгонки в вакууме), сиропообразный остаток смешивают с 150 мл 95%-ного спирта и оставляют для кристаллизации. Через 8—10 час кристаллы отделяют, а фильтрат

<sup>1</sup> При использовании только паровой бани после начала выделения солей смесь кипит со значительными толчками (смесь «бросает»). Это затруднение можно обойти, используя обогреваемый паром оловянный или медный змеевик, введенный внутрь колбы.

<sup>2</sup> Выделение кристаллического левоглюкозана нецелесообразно, поскольку примеси препятствуют кристаллизации. Поэтому выделяют триацетат, который легко кристаллизуется.

<sup>3</sup> При ацетилировании следует соблюдать осторожность. Сначала прибавляют небольшое количество уксусного ангидрида (смесь можно нагреть, если это необходимо для начала реакции) и постепенно прибавляют остальное количество реагента.

концентрируют до сиропа, прибавляют 100 мл эфира и помещают в холодильник для кристаллизации. Объединенные порции кристаллического продукта обрабатывают 400 мл эфира при 0° и отфильтровывают; выход 275—300 г (73—80%), т. пл. 108—109°.

## ЛИТЕРАТУРА

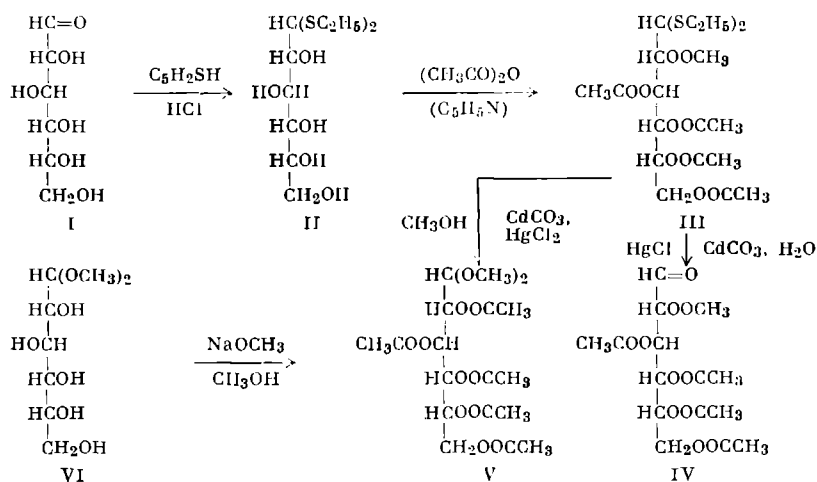
1. Hahn R. M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **63**, 1484 (1941).
2. Karrer P., Smirnoff A. P., Helv. Chim. Acta, **4**, 817 (1921).
3. Montgomery E., Richtmyer N. K., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **65**, 3 (1943).
4. Coleman G. H., McCloskey C. M., Kirby R., Ind. Eng. Chem., **36**, 1040 (1944).
5. Zemplén G., Pacsu E., Ber., **62**, 1613 (1929).
6. Montgomery E., Richtmyer N. K., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **64**, 692 (1942).

# Ациклические производные

## Ациклические производные моносахаридов (из дитиоацеталей)

М. Л. Вольфром, А. Томпсон

### ВВЕДЕНИЕ



Дитиоацетали относятся к числу наиболее давно известных производных моносахаридов. Они легко получаются с высокими выходами и служат удобными исходными веществами при синтезе других ациклических, а также фуранозных производных моносахаридов. Здесь описано получение типичного дитиоацетала и его использование в синтезе диметилацетала, а также ацетата альдегидной формы сахара.

### МЕТОДИКИ

#### Диэтилдитиоацеталь D-глюкозы (II) [1]

В закрытой стеклянной пробкой бутылки при комнатной температуре 100 г безводной D-глюкозы (I) растворяют в 85 мл соляной кислоты (уд. вес 1,19). К этому раствору прибавляют 100 мл технического этилмеркаптана. Смесь тщательно встряхивают, время от времени открывая

пробку для устранения избыточного давления<sup>1</sup>. Температура реакционной смеси должна быть примерно комнатной; с этой целью к смеси прибавляют небольшие количества льда и холодной воды и погружают сосуд в баню со льдом. Встряхивание продолжают до тех пор, пока не произойдет обильное выделение кристаллов, которое должно наступить очень скоро. После этого смесь выдерживают в смеси льда с солью в течение получаса и фильтруют с отсасыванием. Осадок промывают ледяной водой и немедленно перекристаллизовывают; растворяют в горячей воде, содержащей немного бикарбоната натрия, и полученный раствор охлаждают. Кристаллы отфильтровывают, промывают небольшим количеством ледяной воды, абсолютным спиртом и эфиром. Продукт высушивают на воздухе; выход примерно 100 г, т. пл. 127°.

### ***Пента-О-ацетат диэтилдитиоацетата D-глюкозы (III) [2, 3]***

100 г диэтилдитиоацетата D-глюкозы (II) растворяют в 360 мл сухого пиридина (см. стр. 115). Раствор охлаждают во льду и постепенно прибавляют 720 мл уксусного ангидрида, поддерживая температуру смеси 0° и периодически встряхивая до тех пор, пока образовавшийся вначале осадок не растворится вновь. Затем раствор нагревают до комнатной температуры, оставляют на ночь и выливают в 5 л воды. Водный раствор декантируют с образовавшегося слоя сиропа; последний промывают несколько раз водой с растиранием и декантацией, заливают водой, вносят затравку и оставляют в холодильнике для кристаллизации. Кристаллы отфильтровывают и промывают водой; выход 160 г. Перекристаллизацию производят из водного метанола при 4°. Первоначально образующийся сироп впоследствии хорошо кристаллизуется; т. пл. 45—47°.  $[\alpha]_D^{25} +11^\circ$  (с 4 в хлороформе).

### ***Пента-О-ацетил-аль-D-глюкоза (IV) [3, 4]***

В трехлитровой трехгорлой колбе, снабженной эффективной (важно!) механической мешалкой, 137 г (0,5 моля) хлорида ртути растворяют в 500 мл ацетона. Прибавляют 200 г тщательно измельченного, промытого водой и высушенного карбоната кадмия и 20 мл воды. Смесь тщательно перемешивают 15 мин, после чего к ней медленно прибавляют раствор 50 г (0,1 моля) пента-О-ацетата диэтилдитиоацетата D-глюкозы (III) в 500 мл ацетона. Смесь интенсивно перемешивают в течение 20 час при комнатной температуре, после чего фильтруют в колбу, содержащую 150 г карбоната кадмия, а осадок на фильтре промывают 500 мл ацетона. Фильтрат и промывную жидкость упаривают в вакууме при температуре бани 35—40° в присутствии карбоната кадмия. Остаток экстраги-

<sup>1</sup> При проведении реакции таким путем возникает сильный неприятный запах. Его можно в значительной мере устранить, если проводить реакцию в трехгорлой колбе, снабженной мощной мешалкой, термометром и отводной трубкой, которая присоединена к двойной ловушке, охлаждаемой смесью сухого льда с ацетоном. Ловушки такого же типа используются для предохранения масляных насосов. Весьма эффективна также предложенная Хиллом и Вольфромом [6] ловушка, содержащая хлорную медь на угле. Ее присоединяют к аспиратору и создают небольшое разрежение. Такую же ловушку используют на отсасывающей линии при фильтровании. Все операции следует также проводить в хорошем вытяжном шкафу.



руют несколькими порциями теплого хлороформа; хлороформный раствор промывают последовательно водным раствором иодистого калия и водой до отсутствия в промывной воде иона галогена, после чего высушивают сульфатом натрия, фильтруют с углем и упаривают в вакууме при температуре бани 35—40°. Остаток растворяют в 100 мл горячего ацетона и раствор охлаждают до комнатной температуры. Прибавляют эфир (50 мл) и затем петролейный эфир (т. кип. 30—60°) до появления опалесценции и вносят затравку. Продукт кристаллизуется при комнатной температуре; выход 21 г, т. пл. 116—117°. Маточный раствор упаривают до сиропа и таким же образом получают вторую и третью порции кристаллов; общий выход 33,2 г (84%), т. пл. 116—117°. Чистое вещество получают перекристаллизацией из смеси ацетона, эфира и петролейного эфира; т. пл. 119,5—120,5°,  $[\alpha]_D^{25} +3^\circ$  (с 4,9 в тетрахлорацетиле).

### Пента-О-ацетат диметилацетата D-глюкозы (V) [5]

20 г пентаацетата диэтилдитоацетата D-глюкозы (III) растворяют в 200 мл абсолютного метанола, содержащего 24 г тщательно измельченного карбоната кадмия. К смеси прибавляют раствор 65 г хлорида ртути в 160 мл абсолютного метанола и кипятят с обратным холодильником 7 час при интенсивном механическом перемешивании. Смесь фильтруют, осадок промывают небольшим количеством метанола, фильтрат встряхивают со смесью 300 мл хлороформа и 300 мл воды. Хлороформный слой промывают несколько раз водой до полного удаления хлоридов, высушивают безводным сульфатом натрия и упаривают в вакууме до сиропа. Последний растворяют в эфире и прибавляют гентан до появления опалесценции. В раствор вносят затравку и помещают в холодильник для кристаллизации; выход 3 г, т. пл. 71—72°,  $[\alpha]_D^{20} +12^\circ$  (с 2,2 в хлороформе).

### Диметилацеталь D-глюкозы (VI) [5]

8,5 г пентаацетата диметилацетата D-глюкозы (V) растворяют в 10 мл абсолютного метанола, добавляют 0,5 мл 0,4 н. раствора метилата натрия и оставляют на 5 час приблизительно при 4°. Затем прибавляют эфир до появления опалесценции и раствор выдерживают при той же температуре до завершения кристаллизации. Кристаллы отфильтровывают и промывают смесью равных объемов эфира и метанола; выход 3,5 г, т. пл. 94—95°,  $[\alpha]_D^{20} +14^\circ$  (с 5 в воде) [7].

## ЛИТЕРАТУРА

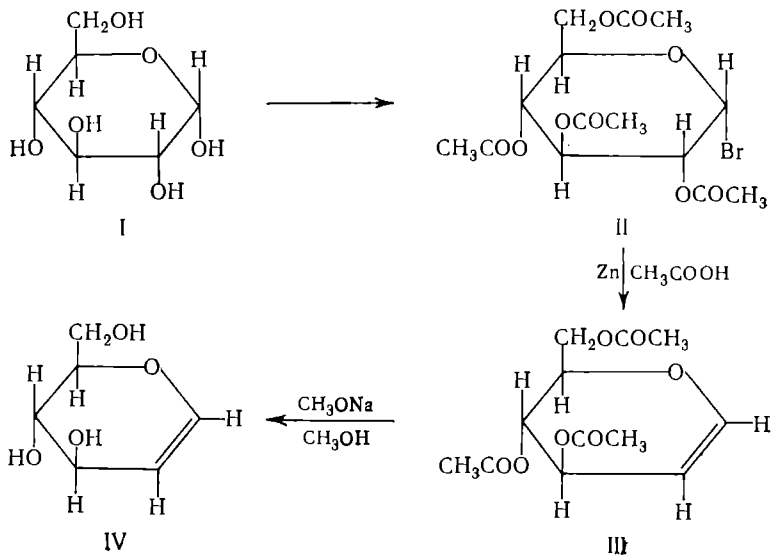
1. Fischer E., Ber., 27, 673 (1894).
2. Schneider W., Sepp J., Ber., 51, 220 (1918).
3. Wolfrom M. L., J. Am. Chem. Soc., 51, 2188 (1929).
4. Wolfrom M. L., Konigsberg M., Weisblatt D. I., J. Am. Chem. Soc., 61, 574 (1939).
5. Wolfrom M. L., Waishrot S. W., J. Am. Chem. Soc., 60, 854 (1938).
6. Hill H. M., Wolfrom M. L., J. Am. Chem. Soc., 69, 1539 (1947).
7. Richtermyer N. K., Adams M., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., 61, 1833 (1939).

# Непределённые сахара

## *D*-Глюкаль и гликали

*D*-Глюкаль и 6-дезоксид-*L*-глюкаль

*В. Рот, В. Пигман*



## ВВЕДЕНИЕ

Гликали были открыты Фишером и Захом в 1913 г. [1] и позже интенсивно исследовались Бергманом и Шотте. Обзор по химии гликалей составлен Гельферихом [2].

Гликали получают из ацетилгликозилгалогенидов восстановительным отщеплением галогена и соседней ацетильной группы с последующим омылением. Гликали представляют значительный интерес, связанный прежде всего с их высокой реакционной способностью и легкостью превращений и изомеризации. Эти соединения — важные промежуточные продукты при взаимных превращениях сахаров, эписмерных по C-2, и при синтезе 2-дезоксисахаров.

Наиболее изученный представитель гликалей — *D*-глюкаль (IV) — является производным *D*-глюкозы (I) (и *D*-маннозы). Ниже приведена наиболее широко применяемая методика синтеза триацетата этого соединения. Наилучшим способом получения ацетилированных гликалей других сахаров, вероятно, может служить методика, описанная для ди-*O*-ацетил-6-дезоксид-*L*-глюкала.

## МЕТОДИКА

### *D*-Глюкаль

Три-*O*-ацетил-*D*-глюкаль (III) непосредственно из *D*-глюкозы [3]

К смеси 200 мл уксусного ангидрида и 1,2 мл 70%-ной хлорной кислоты постепенно в течение 1 час при температуре 30—40° прибавляют последовательно 55 г моногидрата  $\alpha$ -*D*-глюкозы (I) и 15 г красного фос-

фора. После этого реакционный сосуд охлаждают льдом или смесью льда и соли и при непрерывном перемешивании приливают по каплям 90 г (29 мл) брома с такой скоростью, чтобы температура реакционной смеси не поднималась выше 20°. Тщательно следя за тем, чтобы температура смеси не поднялась выше 20°, к ней в течение 30 мин прибавляют 15 мл воды. Затем реакционный сосуд закрывают пробкой и выдерживают при комнатной температуре 3 час. Смесью фильтруют, фильтровальную бумагу промывают небольшим количеством ледяной уксусной кислоты. Фильтрат содержит тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глоконопиранозилбромид (II) (см. также стр. 123).

Тем временем готовят раствор 200 г ацетата натрия (тригидрата) в смеси 290 мл воды и 200 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор охлаждают в смеси льда с солью, прибавляют 110 г цинковой пыли и 11 г медного купороса, растворенного в 40 мл воды. После исчезновения голубой окраски к смеси постепенно в течение 1 час прибавляют при энергичном перемешивании раствор ацетобромглюкозы, получение которого описано выше. Температура смеси при этом должна быть ниже 0°, лучше между -10 и -20°. Затем смесь перемешивают при 0° еще 3 час, фильтруют и промывают осадок на фильтре 50%-ной уксусной кислотой. Фильтраты объединяют, разбавляют 500 мл охлажденной до 0° воды и экстрагируют хлороформом (5  $\times$  100 мл). Объединенные хлороформные экстракты промывают охлажденной до 0° водой, раствором бикарбоната натрия и снова водой, охлажденной до 0°. Раствор высушивают хлористым кальцием, осушитель отделяют деkantацией, промывают хлороформом и объединенные хлороформные растворы упаривают в вакууме. Полученный сироп растворяют в 50 мл абсолютного бензола и снова упаривают в вакууме досуха. Остаток сироп растворяют при нагревании в 75 мл абсолютного эфира, к раствору прибавляют петролейный эфир до появления опалесценции. Кристаллизация три-О-ацетил-D-глюкала (III), которую можно вызвать внесением затравки или потиранием, завершается за несколько часов; выход 40—45 г. Прибавляя к маточному раствору большее количество петролейного эфира, можно выделить вторую порцию кристаллов; общий выход 50—58 г (60—70%). Перекристаллизацией из эфира или из метанола и воды можно получить чистое вещество, т. пл. 54—55°.

Синтез три-О-ацетил-D-глюкала следует проводить без перерывов. Только растворы ацетобромглюкозы и три-О-ацетил-D-глюкала после отделения цинка, меди и соли можно хранить при -15° в течение 12 час. Такое хранение этих растворов на выход не влияет.

#### D-Глюкаль (IV) [4]

64 г три-О-ацетил-D-глюкала (III) растворяют в 1 л сухого метанола, к раствору прибавляют 160 мг натрия и оставляют на 2 суток при комнатной температуре (см. стр. 113). Раствор обрабатывают углекислотой и упаривают в вакууме. Сухой остаток экстрагируют горячим этилацетатом. Концентрирование объединенных экстрактов дает кристаллический D-глюкаль; выход 25 г, т. пл. 57—59°,  $[\alpha]_D^{25}$  -8° (с 1,9 в воде).

### 6-Дезокси-Л-глюкаль

#### Ди-О-ацетил-6-дезоксид-Л-глюкаль [5]

5 г моногидрата 6-дезоксид- $\alpha$ -Л-маннозы растворяют в 25 мл абсолютного пиридина и при охлаждении прибавляют 25 мл уксусного ангидрида. Раствор выдерживают при 20° 2 суток, после чего упаривают в вакууме. Сиропообразный остаток растворяют в смеси льда с хлороформом, водный слой отделяют и экстрагируют еще несколько раз хлороформом. Объединенные хлороформные растворы промывают несколько раз попеременно разбавленной серной кислотой и насыщенным водным раствором бикарбоната калия, высушивают хлористым кальцием, декантируют и упаривают в вакууме. Таким путем получают 9,3 г (94%) неочищенной тетра-О-ацетил-6-дезоксид-Л-маннозы в виде светло-желтого сиропа.

9 г полученного продукта растворяют в смеси 2,5 мл ледяной уксусной кислоты и 2,5 мл уксусного ангидрида при 0°. К полученному раствору прибавляют 18 мл охлажденного до 0° 30%-ного раствора бромистого водорода в уксусной кислоте. Раствор выдерживают 2 час при 16°, за это время он становится красным. После этого реакционную смесь прибавляют к раствору, полученному следующим образом.

В трехгорлой колбе, снабженной капельной воронкой, механической мешалкой и термометром, растворяют 25 г тригидрата ацетата натрия в 60 мл 50%-ной уксусной кислоты. Раствор охлаждают до -10° и при интенсивном перемешивании прибавляют 18 г цинковой пыли и раствор 1,8 г медного купороса в 5,5 мл воды. После исчезновения голубой окраски и начала выделения водорода к смеси по каплям в течение 20 мин прибавляют неочищенный раствор ацетилованного 6-дезоксид-Л-маннозилбромид, поддерживая температуру реакционной смеси в пределах от -10 до -5°. После чего перемешивание продолжают еще 3 час при -10°.

Выделение ацетилованного 6-дезоксид-Л-глюкала производят максимально быстро. Поддерживая раствор в охлажденном состоянии прибавлением льда, отфильтровывают с отсасыванием цинк и медь. Осадок промывают небольшим количеством охлажденной до -10° 50%-ной уксусной кислоты, к фильтрату прибавляют 50 г измельченного льда. Смесь экстрагируют тремя порциями хлороформа, объединенные экстракты промывают ледяной водой и затем холодным насыщенным водным раствором бикарбоната калия до полного удаления уксусной кислоты. Раствор высушивают хлористым кальцием, декантируют и упаривают в вакууме досуха при температуре бани 40°. Остаток (5,12 г) перегоняют в высоком вакууме (при остаточном давлении 0,06 мм). Ди-О-ацетил-6-дезоксид-Л-глюкаль получают в виде бесцветного масла, выход 4,65 г (80%), т. кип. 68—69°.

#### 6-Дезокси-Л-глюкаль [5]

В профильтрованном и охлажденном до 15° растворе 4 г октагидрата гидроокиси бария в 40 мл метанола растворяют при встряхивании 4 г ди-О-ацетил-6-дезоксид-Л-глюкала. Раствор вскоре становится желтым. Сосуд закрывают пробкой и выдерживают 12 час при 15°. Не отделяя ацетат бария, раствор нейтрализуют углекислотой. Небольшое количество осадка отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме. Остаток растворяют при нагревании в 5 мл абсолютного спирта и 20 мл смеси

ацетона с эфиром (1:1) и осаждают бариевые соли. Осадок отфильтровывают и тщательно промывают смесью ацетона с эфиром (1:1). Фильтрат упаривают в вакууме досуха, остаток перегоняют в высоком вакууме (остаточное давление 0,06 мм). Бесцветный 6-дезоксиглюкаль, перегоняющийся при 77—78°, вскоре желтеет. Перекристаллизацией из бензола его получают в виде бесцветных игл, выход 2,18 г (89%), т. пл. 70—73°.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fischer E., Zach K., Sitzber. kgl. preuss. Akad. Wiss., **16**, 311 (1913).
2. Helferich B., Advances in Carbohydrate Chem., **7**, 209 (1952).
3. Helferich B., Mulcahy E. N., Ziegler H., Ber., **87**, 233 (1954).
4. Shafizadeh F., Stacey M., J. Chem. Soc., **1952**, 3608.
5. Iselin B., Reichstein T., Helv. Chim. Acta, **27**, 1146 (1944).

# Способы обращения конфигурации

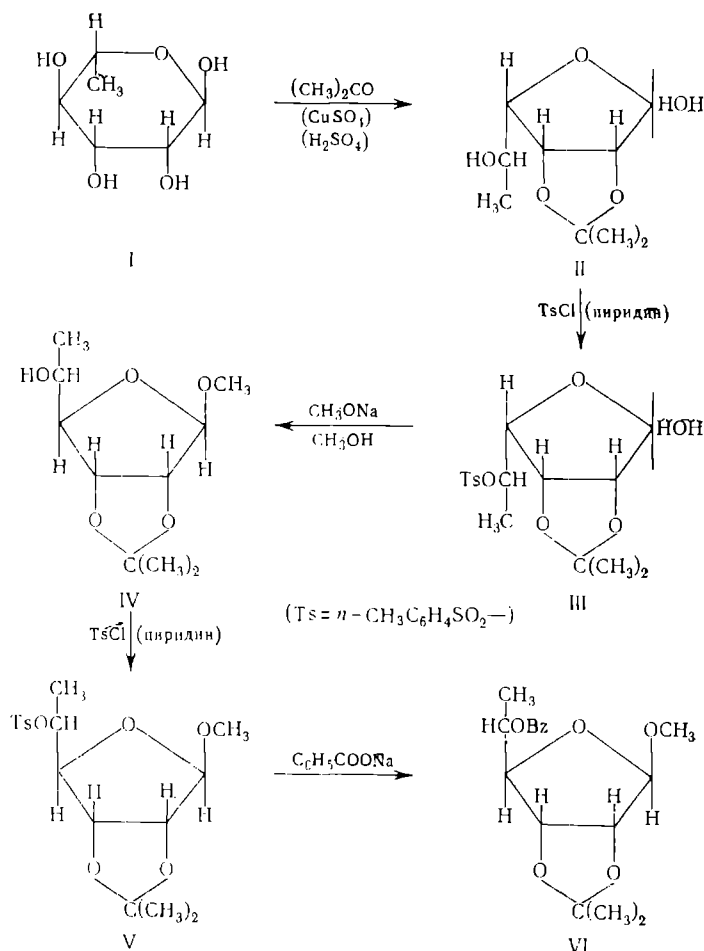
## Обращение конфигурации

$S_N2$ -замещение вторичных сульфонов

*Б. Р. Байкер*

### ВВЕДЕНИЕ

Препятствием для синтеза редких сахаров по реакции нуклеофильного замещения вторичных сульфонов, протекающей с вальденовским обращением, является низкая реакционная способность этих сульфонов [1]. Многообещающим реагентом в этом плане оказался бензоат натрия (в диметилформамиде). При действии бензоата натрия на 6-дезокси-



2,3-О-изопропилиден-5-О-тозил-β-метил-D-аллофуранозид (V) получают 5-О-бензоил-6-дезоксид-2,3-О-изопропилиден-α-метил-L-талофуранозид [2], а из 2,3-О-изопропилиден-4,6-ди-О-тозил-α-метил-D-галактопиранозид — 2,3,4,6-тетра-О-бензоил-α-метил-D-глюкопиранозид [3]. Осуществить замену тозилата на бензоат в 3-О-тозил-1,2;5,6-ди-О-изопропилиден-α-D-глюкофуранозе не удалось [4]. Ниже приведен пример замены 5-О-тозильной группы в производном 6-дезоксид-D-аллозы на бензоат с образованием производного 6-дезоксид-L-талозы.

## МЕТОДИКИ

### **6-Дезокси-2,3-О-изопропилиден- L-маннофураноза (II) [5]**

Смесь 33 г моногидрата α-L-рамнозы (I), 60 г безводного сульфата меди и 1,2 мл 96%-ной серной кислоты перемешивают с 600 мл ацетона 23 час в закрытой колбе, фильтруют, к фильтрату добавляют 4,5 мл 28%-ного раствора аммиака и отделяют выпавший сульфат аммония фильтрованием через слой целита толщиной 0,6 см. Фильтрат упаривают в вакууме, образовавшийся сироп растворяют в 300 мл хлороформа и оставляют на 2 час. Затем снова фильтруют через слой целита<sup>1</sup>, чтобы удалить последние следы неорганических солей, фильтрат упаривают в вакууме и остаток перегоняют при 129° и остаточном давлении 0,7 мм; выход 25 г (68%).

### **6-Дезокси-2,3-О-изопропилиден-5-О-тозил- L-маннофураноза (III) [6]**

К охлажденному до 0° раствору 5,35 г (0,026 моля) 6-дезоксид-2,3-О-изопропилиден-L-маннофуранозы (II) в пиридине добавляют по каплям при перемешивании раствор 5,14 г (0,027 моля) *n*-толуолсульфохлорида в 10 мл хлороформа, выдерживают еще 1 час при охлаждении и оставляют на ночь при комнатной температуре. Раствор выливают в 25 мл воды со льдом, перемешивают 30 мин, добавляют еще 20 мл хлороформа и отделяют органический слой. Его последовательно промывают охлажденной до 0° водой (дважды), дважды холодной 10%-ной серной кислотой, дважды холодным насыщенным раствором бикарбоната натрия и дважды водой, охлажденной до 0°. Затем хлороформный слой высушивают хлористым магнием, упаривают в вакууме и получают 5,28 г (56%) неочищенного продукта (III), который при стоянии закристаллизовывается; этот продукт без дополнительной очистки используют на следующей стадии.

### **6-Дезокси-2,3-О-изопропилиден-β-метил- D-аллофуранозид (IV) [6]**

Раствор 4,0 г полученной на предыдущей стадии неочищенной 6-дезоксид-2,3-О-изопропилиден-5-О-тозил-L-маннофуранозы (III) в 50 мл абсолютного метанола, содержащего 1,17 г метилата натрия, выдерживают ночь при комнатной температуре. Избыток метилата нейтрализуют твердой углекислотой и раствор упаривают досуха в вакууме. Остаток

<sup>1</sup> Эта операция существенна, иначе при перегонке происходят большие потери из-за разложения.

обрабатывают хлороформом, хлороформный экстракт упаривают в вакууме и остаток перегоняют. Получают 1,38 г (60%) IV в виде бесцветной жидкости, т. кип. 74—76°/0,7 мм,  $[\alpha]_D^{24,5}$  —74° (с 2,3 в метаноле).

**6-Дезокси-2,3-О-изопропилиден-5-  
О-тозил-β-метил-D-аллофуранозид (V) [6]**

Раствор 5,0 г (0,023 моля) 6-дезокси-2,3-О-изопропилиден-β-метил-D-аллофуранозида (IV) в 25 мл пиридина охлаждают смесью льда с солью до 0° и к этому раствору добавляют при энергичном перемешивании охлажденный до 0° раствор 7,5 г (0,04 моля) *n*-толуолсульфохлорида в 10 мл хлороформа. Смесью выдерживают 1 час при 0°, затем оставляют на ночь при комнатной температуре, предохраняя от попадания влаги воздуха. Раствор выливают в 50 г льда и нейтрализуют 100 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия. Перемешивают смесь 15 мин, выделившееся масло экстрагируют 50 мл хлороформа, хлороформный раствор промывают 25 мл воды, сушат безводным сульфатом магния, фильтруют и упаривают в вакууме. Образовавшееся масло закристаллизуется при стоянии, выход 7,34 г (86%). При перекристаллизации из метанола получают 6,0 г V в виде белых кристаллов, т. пл. 93—94°,  $[\alpha]_D^{28}$  —41° (с 0,34 в метаноле).

**6-Дезокси-5-О-бензоил-2,3-О-изопропилиден-  
α-метил-L-галактофуранозид (VI) [2]**

Смесью 2,00 г 6-дезокси-2,3-О-изопропилиден-5-О-тозил-β-метил-D-аллофуранозида (V), 4,0 г бензоата натрия и 50 мл N,N-диметилформамида кипятят 6 час с обратным холодильником<sup>1</sup>. По окончании кипячения реакционную смесь охлаждают, разбавляют 50 мл воды и экстрагируют двумя порциями эфира по 50 мл. Объединенные экстракты промывают насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, водой, сушат безводным сульфатом магния, упаривают в вакууме, остаток высушивают при 100° и остаточном давлении 1 мм и получают желтое масло, кристаллизующееся при стоянии. Выход 1,37 г (79%). Из метанола кристаллизуется в виде белых кристаллов; т. пл. 93,5—95°,  $[\alpha]_D^{27}$  —38° (с 2,8 в метаноле).

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. a) Tipson R. S., *Advances in Carbohydrate Chem.*, **8**, 107 (1953); б) Sugihara J. M., *ibid.*, **8**, 26 (1953).
2. Reist E. J., Goodman L., Baker B. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5775 (1958).
3. Reist E. J., Spencer R. R., Baker B. R., *J. Org. Chem.*, **24**, 1618 (1959).
4. Reist E. J., Spencer R. R., Goodman L., Baker B. R., неопубликованные данные.
5. Baker B. R., Hewson K., *J. Org. Chem.*, **22**, 966 (1957).
6. Levene P. A., Compton J., *J. Biol. Chem.*, **116**, 169 (1936).

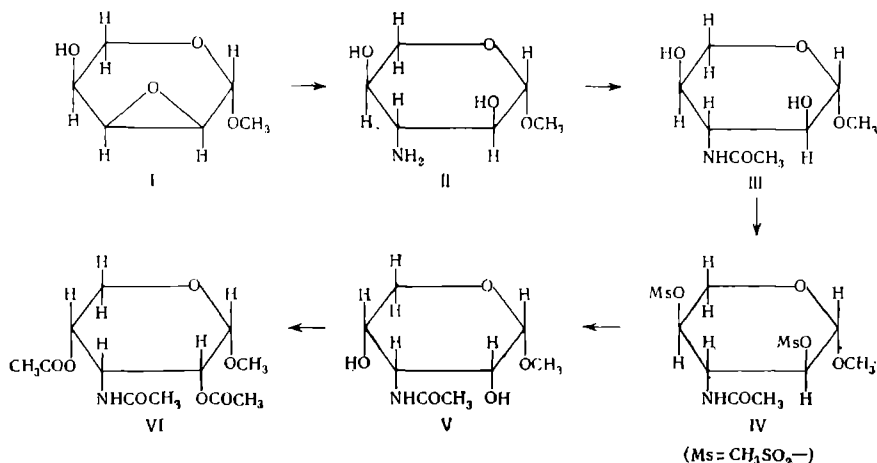
<sup>1</sup> Для завершения реакции 2,3-ди-О-бензоил-4,6-ди-О-тозил-α-метил-D-галактопиранозида с бензоатом натрия в N,N-диметилформамиде требуется 24-часовое кипячение с обратным холодильником [3].



## Обращение конфигурации, протекающее с участием соседних групп

Реакции с соучастием соседней азотсодержащей группы

Б. Р. Бэйкер



### ВВЕДЕНИЕ

Большое значение в ряду производных циклогексана приобрели реакция обращения конфигурации, при которой ацетамидная группа атакует соседнюю *транс*-тозилоксигруппу с образованием *цис*-ацетамидоциклогексанола-2 [1]; реакция протекает через оксазолиновое производное. Первоначально в области углеводов эту реакцию применили для превращения 3-амино-3-дезоксид-β-метил-L-ксилопиранозид (II) в производное 3-амино-3-дезоксид-α-метил-D-рибопиранозид [2]; при этом обращению подвергаются гидроксильные группы как при C-4, так и при C-2. В этой же статье [2] описано превращение производного 3-амино-3-дезоксид-α-метил-D-аллопиранозид в производное 3-амино-3-дезоксид-α-метил-D-аллопиранозид с обращением при C-2. Указанная реакция имеет наибольшую применимость в ряду аминсахаров. Так, описаны превращения 3-амино-3-дезоксид-α-метил-D-арабинофуранозид (и β-аномера [3]) в соответствующие 3-амино-3-дезоксид-α-метил-D-рибофуранозиды с обращением при C-2 [3], 2-амино-2-дезоксид-D-глюкозы в 2-амино-2-дезоксид-D-аллозу [4] и 2-амино-2-дезоксид-D-галактозы в 2-амино-2-дезоксид-D-гулозу [5]; в двух последних случаях обращению подвергалась гидроксильная группа при C-3.

### МЕТОДИКИ

#### 3-Амино-3-дезоксид-β-метил-L-ксилопиранозид (II) [2]

Раствор 12,1 г 2,3-ангидро-β-метил-L-рибопиранозид (I) [2] в 90 мл концентрированного раствора аммиака нагревают 24 час в стальном автоклаве при 100°. Охлажденный раствор обрабатывают активированным углем и фильтруют через слой целита. Фильтрат упаривают в ваку-

уме досуха, образовавшийся полукристаллический остаток перекристаллизовывают из 120 мл спирта и получают 8,1 г (65%) вещества II, т. пл. 191—192° (с разл.). Этот продукт можно использовать на следующей стадии. Повторная перекристаллизация из спирта приводит к 3-амино-3-дезоксид-β-метил-л-ксилопиранозиду в виде белых кристаллов с т. пл. 191—192° (с разл.),  $[\alpha]_D^{25} +61^\circ$  (с 1,0 в воде).

### **3-Ацетамидо-3-дезоксид-β-метил-л-ксилопиранозид (III) [2]**

К раствору 1,00 г 3-амино-3-дезоксид-β-метил-л-ксилопиранозид (II) в 5 мл воды добавляют 0,87 мл уксусного ангидрида, смесь встряхивают 5 мин, упаривают досуха в вакууме и получают 1,22 г (97%) продукта с т. пл. 184—187°, пригодного для непосредственного использования на дальнейших стадиях. Из этилацетата III кристаллизуется в виде белых кристаллов, т. пл. 194—195°,  $[\alpha]_D^{25} +64^\circ$  (с 2,0 в воде).

### **3-Ацетамидо-3-дезоксид-2,4-ди-О-мезил-β-метил-л-ксилопиранозид (IV) [2]**

К раствору 29,5 г 3-ацетамидо-3-дезоксид-β-метил-л-ксилопиранозид (III) в 500 мл очищенного пиридина добавляют небольшими порциями при перемешивании и охлаждении льдом 29,5 мл метансульфохлорида (хлористого мезила) с такой скоростью, чтобы температура не поднималась выше 25—30°. По окончании экзотермичной реакции смесь оставляют в закрытой колбе на 20 час при комнатной температуре. К смеси добавляют воду для растворения выпавшего хлоргидрата пиридина, раствор упаривают в вакууме при температуре бани 50° до ~150 мл, разбавляют 300 мл воды, охлаждают до 15°, отфильтровывают выпавший темно-желтый осадок, промывают его водой и получают 31,7 г IV с т. пл. 149—150°. Фильтрат концентрируют в вакууме и получают еще 11,2 г IV; общий выход 83%, т. пл. 149—150°. Этот продукт можно использовать на следующей стадии синтеза. Аналитически чистый образец получают перекристаллизацией из спирта, т. пл. 149°,  $[\alpha]_D^{25} +19^\circ$  (с 2,0 в пиридине).

### **3-Ацетамидо-3-дезоксид-2,4-ди-О-ацетил-α-метил-д-рибопиранозид (VI) [2]**

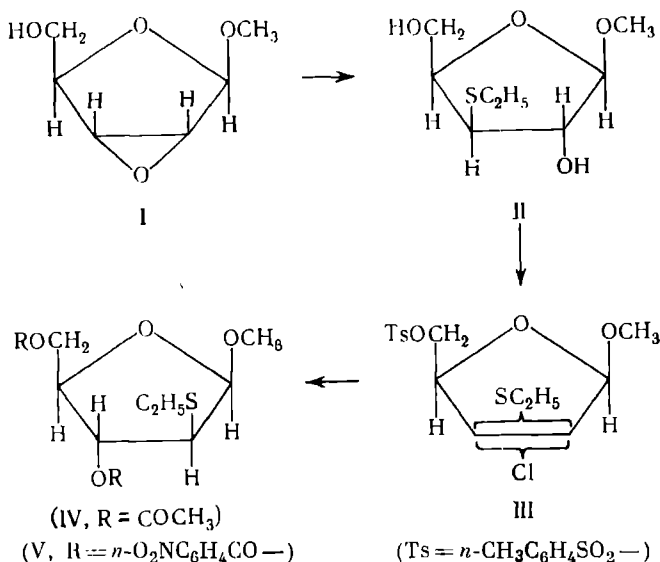
Смесь 18 г 3-ацетамидо-3-дезоксид-2,4-ди-О-мезил-β-метил-л-ксилопиранозид (IV), 20,5 г безводного ацетата натрия и 215 мл метилцеллозольва, содержащего 5% воды, кипятят 24 час с обратным холодильником. Охлажденную смесь фильтруют, отделяя выпавший мезилат натрия, упаривают досуха в вакууме и остаток, неочищенный V, нагревают 1 час с 54 мл очищенного пиридина и 54 мл уксусного ангидрида при 100°. Смесь разбавляют 270 мл воды, экстрагируют хлороформом (3 × 90 мл), экстракт сушат сульфатом магния, упаривают досуха в вакууме, остаток растворяют в 50 мл толуола и снова упаривают в вакууме досуха. Эту операцию повторяют, используя каждый раз свежий толуол, до полной отгонки пиридина. При охлаждении продукт закристаллизовывается, выход 10,0 г (70%), т. пл. 116—117°. При перекристаллизации из 4 объемов абсолютного спирта получают белые кристаллы, т. пл. 116—117°,  $[\alpha]_D^{25} +94^\circ$  (с 1,6 в хлороформе).

## ЛИТЕРАТУРА

1. McCasland G. E., Clark R. K., Jr., Carter H. E., J. Am. Chem. Soc., **71**, 637 (1949).
2. Baker B. R., Schaub R. E., J. Org. Chem., **19**, 646 (1954).
3. Baker B. R., Schaub R. E., Williams J. H., J. Am. Chem. Soc., **77**, 7 (1955).
4. Jeanloz R. W., J. Am. Chem. Soc., **79**, 2591 (1957).
5. Tarasiejska Z., Jeanloz R. W., J. Am. Chem. Soc., **79**, 4215 (1957).

### Обращение конфигурации, протекающее с участием соседних групп

Замещение гидроксильной группы с переносом серусодержащей функции



## ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известная способность алкил- или арилтиогрупп к соучастию в реакциях замещения, особенно ярко выраженная при реакциях замещения находящихся по соседству галогенов, объясняется первоначальным образованием эписульфониевых ионов [1, 2]. Последующая атака этих ионов нуклеофильными агентами зачастую приводит к миграции соучаствующей алкил- или арилтиогруппы [3, 4]. Образующиеся на промежуточной стадии реакций 2,3-эписульфониевые ионы в ряду фуранозидов сравнимы с 2,3-ангидропроизводными фуранозидов, которые атакуются нуклеофильными реагентами преимущественно по С-3 [5]. Описана миграция этилтиогруппы от С-3 к С-2 в метилфуранозиде [6]. Единственный другой пример подобной реакции в ряду сахаров известен лишь для нуклеозидов [7].

## МЕТОДИКИ

**3-Этилтио-3-дезоксид-β-метил-  
D-ксилофуранозид (II) [6]**

Раствор 25,0 г (0,171 моля) 2,3-ангидро-β-метил-D-рибофуранозид (I) [5] в 15 мл метанола добавляют к раствору тиоэтилата натрия, приготовленному из 27,5 г (0,51 моля) метилата натрия и 41,3 мл (0,56 моля) этилмеркаптана в 110 мл метанола. Смесь кипятят 19 час с обратным холодильником в атмосфере азота, охлаждают и упаривают в вакууме до вязкого сиропа. Его растворяют в 350 мл воды и раствор перемешивают 3 час со 100 г амберлита IRC-50 (H<sup>+</sup>) в пленочном испарителе при температуре бани около 35° и давлении 30—40 мм. Нейтральный раствор фильтруют, смолу промывают горячей водой (3 × 60 мл), объединенные фильтрат и промывные воды упаривают в вакууме досуха, коричневатый остаток растворяют в 500 мл смеси бензол — метанол (3 : 1) при нагревании, обесцвечивают норитом А и фильтруют. При упаривании фильтрата в вакууме и последующего высушивания при 35° и остаточном давлении 0,5 мм получают масло янтарного цвета, в инфракрасном спектре которого отсутствует полоса поглощения эпоксидного цикла (11,6 мк). Выход 35,8 г (100%),  $[\alpha]_D^{25}$  —26° (с 4,0 в хлороформе).

**3(2)-Хлор-2(3)-этилтио-2,3-дидезокси-5-О-тозил-  
β-метил-D-арабино(ксило)фуранозид (III) [6]**

К охлаждаемому водой до 20—25° перемешиваемому раствору 2,63 г (12,6 ммоль) II в 62 мл реактивного пиридина добавляют 9,65 г (50 ммоль) *n*-толуолсульфохлорида, предохраняя от влаги воздуха. Смесь выдерживают 68 час при комнатной температуре, добавляют 0,62 мл воды и продолжают перемешивание еще 2 час. Затем концентрируют в вакууме при температуре бани 35° до 25 мл, выливают в 100 мл воды и экстрагируют хлороформом (1 × 60 мл и 2 × 45 мл). Экстракт промывают водой (2 × 25 мл), сушат сульфатом магния, фильтруют, упаривают (температура бани 35°) в вакууме и получают масло. Его растворяют в 15 мл бензола и снова упаривают, сушат при 30°/0,5 мм, и получают светло-коричневое масло, выход 4,36 г (91%). Вещество III дает положительную реакцию на галоген при действии горячего раствора нитрата серебра в спирте,  $[\alpha]_D^{25}$  —14° (с 2,0 в хлороформе). В ИК-спектре III имеются полосы поглощения сульфонатной группы (8,42 и 8,50 мк) и отсутствует полоса гидроксильной группы при 3,0 мк.

**3,5-Ди-О-ацетил-2-этилтио-2-дезоксид-  
β-метил-D-арабинофуранозид (IV) [6]**

Раствор 2,43 г III (6,38 ммоль) и 1,95 г (24,0 ммоль) безводного ацетата натрия в 20 мл 95%-ного 2-метоксиэтанола кипятят с обратным холодильником 1,5 час, при этом смесь темнеет. Ее охлаждают, разбавляют 60 мл хлороформа и выпавшие при реакции соли отмывают водой (3 × 25 мл). Хлороформный раствор сушат сульфатом магния, фильтруют, упаривают и полученное масло растворяют в смеси 3,0 мл (32 ммоль) уксусного ангидрида и 15 мл пиридина. Раствор выдерживают 16 час при комнатной температуре, предохраняя от влаги воздуха, добавляют

0,6 мл воды при охлаждении и перемешивании. Через 1 час смесь разбавляют 60 мл хлороформа, промывают 1 М раствором бикарбоната натрия ( $4 \times 20$  мл), сушат сульфатом магния, фильтруют, упаривают и получают 1,29 г коричневого масла. Его перегоняют при  $90-100^\circ$  (температура бани) и остаточном давлении 0,10 мм, собирая три фракции: 1) 0,22 г,  $n_D^{20}$  1,4826; 2) 0,47 г,  $n_D^{20}$  1,4786,  $[\alpha]_D^{25} -55^\circ$  (с 1,0 в хлороформе); 3) 0,59 г,  $n_D^{20}$  1,4768; общий выход дистиллата 71%. Вторая фракция, для которой получены хорошие результаты элементарного анализа, не содержит гидроксильных и тозилксигрупп (отсутствие полос поглощения при 3,0 и 8,5 мк в ИК-спектре). По данным газо-жидкостной хроматографии, фракция 2 содержит 83% смеси продукта IV и диацетата II в соотношении 4,2 : 1,0; кроме того, в небольших количествах присутствуют еще три компонента.

**2-Этилтио-2-дезоксид-3,5-ди-О-п-нитробензоил-  
β-метил-п-арабиофуранозид (V) [6]**

Раствор 0,36 г (1,2 ммоль) суммарного дистиллата, содержащего в основном IV (детали см. выше), в 15 мл реактивного метанола, к которому предварительно добавили 0,2 мл 1 М метилата натрия, кипятят с обратным холодильником 30 мин и упаривают в вакууме досуха. Остаток растворяют в 5 мл бензола и снова упаривают досуха. Остаток растворяют в 5 мл пиридина, охлаждают раствор до  $0^\circ$  и при перемешивании добавляют 0,45 г (2,4 ммоль) *p*-нитробензоилхлорида, защищая от влаги воздуха. Смесь выдерживают 1 час при  $0^\circ$  и 48 час при комнатной температуре, добавляя при перемешивании 0,10 мл воды и упаривают в вакууме. Остаток разбавляют 6 мл хлороформа, промывают 1 М водным раствором бикарбоната натрия ( $6 \times 2$  мл) и 5 мл воды, сушат сульфатом магния, фильтруют и упаривают. Остаток высушивают при  $40^\circ$  и остаточном давлении 0,5 мм и получают 0,56 г неочищенного V, т. пл.  $135-141^\circ$ . Порцию этого имеющего коричневую окраску продукта (0,52 г) растворяют в горячем этилацетате, обесцвечивают коричневый раствор активированным углем норит А и к фильтрату добавляют гексан до появления мути; выход V 0,214 г, т. пл.  $147-148^\circ$ . При упаривании маточного раствора в вакууме и после двух перекристаллизаций из смеси бензол — гептан получают еще 0,101 г продукта. Общий выход составляет 55%, т. пл.  $142-147^\circ$ . Аналитический образец после перекристаллизации из смеси бензол — гептан имеет т. пл.  $149-150^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{24} -64^\circ$  (с 1,0 в хлороформе); ИК-спектр (в таблетке с KBr): 5,79 мк ( $C=O$  сложного эфира ароматической кислоты), 6,54, 7,40 мк (ароматическая нитрогруппа),

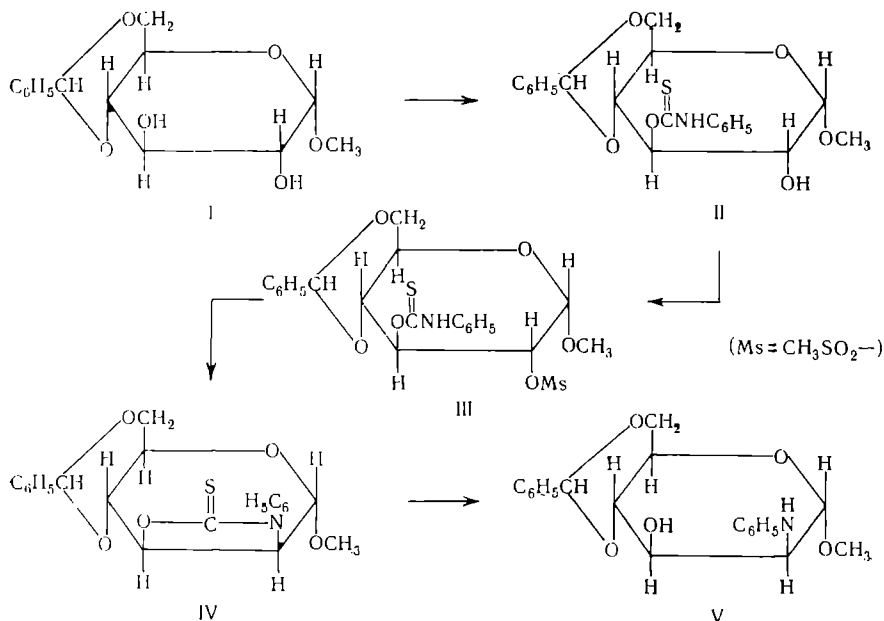
**Л И Т Е Р А Т У Р А**

1. Goering H. L., Howe K. L., J. Am. Chem. Soc., **79**, 6542 (1947).
2. Streitweiser A., Jr., Chem. Revs., **56**, 571 (1956).
3. Gundermann K.-D., Angew. Chem., **69**, 726 (1957); Ber., **88**, 1432 (1955).
4. Parham W. E., Heberling J., Wynberg H., J. Am. Chem. Soc., **77**, 1169 (1955).
5. Anderson C. D., Goodman L., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., **80**, 5247 (1958).
6. Anderson C. D., Goodman L., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., **81**, 898 (1959).
7. Anderson C. D., Goodman L., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., **81**, 3967 (1959).

## Обращение конфигурации, протекающее с участием соседней группы

Замена гидроксила на замещенную аминогруппу с соучастием соседней группы

*Б. Р. Бэйкер*



### ВВЕДЕНИЕ

Внутримолекулярными реакциями замещения, протекающими при участии соседней группы, очень широко пользуются в тех случаях, когда нужно произвести определенные стереохимические изменения в молекуле. Уинштейн и Бошан [1] в своем обзоре рассмотрели использование в такого рода реакциях «сложных» заместителей, находящихся по соседству с группой, конфигурацию которой надо обратить. Описано [2] применение фенилтиокарбамоильной группы для этой цели в ряду производных циклогексана. В данной статье описано получение аниносахара в результате внутримолекулярной реакции замещения соучаствующей соседней фенилтиокарбамоильной группой. Проблема общности этого типа инверсии применительно к другим замещенным тиокарбамоильным группам и другим сахарам остается нерешенной и требует дополнительных исследований.

### МЕТОДИКИ

#### *4,6-О-Бензилиден-3-О-фенилтиокарбамоил- α-метил-D-глюкопиранозид (II) [3]*

К раствору 10,0 г (35,4 ммоль) сухого 4,6-О-бензилиден-α-метил-D-глюкопиранозид (I) [4] (см. также стр. 251) и 50 мл сухого N,N-диметилформамида добавляют раствор 1,91 г (35,4 ммоль) метилата натрия

в 10 мл абсолютного метанола. Большую часть метанола и некоторое количество N,N-диметилформамида отгоняют на пленочном испарителе в вакууме водоструйного насоса при температуре бани 80—90°; в линию подключают осушительную трубку для предохранения натриевого производного I от влаги. Оставшийся растворитель отгоняют в вакууме масляного насоса и получают натриевое производное I в виде студнеобразной массы. Сухой остаток суспендируют в 100 мл N,N-диметилформамида и обрабатывают 4,98 мл (42,0 ммоль) фенилизотиоцианата, защищая от влаги воздуха. Смесь нагревают при 80° до полного растворения при периодическом помешивании (75 мин), подкисляют 4,98 мл (87,0 ммоль) уксусной кислоты, разбавляют смесь 500 мл воды и экстрагируют 100 мл хлороформа. Хлороформный экстракт промывают водой, сушат сульфатом магния, упаривают досуха в вакууме; особенно важно отогнать весь оставшийся N,N-диметилформамид. Остаток растворяют в 25 мл горячего хлороформа, добавляют 50 мл гексана, охлажденный раствор фильтруют, осадок на фильтре промывают смесью хлороформ — гексан (1 : 2) и получают 3,16 г (21%) кристаллического продукта с т. пл. 206—209°, который можно непосредственно использовать на последующих стадиях. Полученный продукт представляет собой, однако, смесь II и изомерного 2-О-фенилтиокарбамоилпроизводного, которые можно разделить следующим образом. Бензольный раствор смеси изомеров обрабатывают 3%-ным водным раствором едкого натра при 0°; II остается в бензоле, тогда как изомерный продукт переходит в щелочной раствор. Аналитический образец II имеет т. пл. 210°,  $[\alpha]_D^{25} - 77^\circ$  (с 0,6 в хлороформе).

**4,6-О-Бензилиден-2-дезоксид-2-(N-тиокарбокситио)-  
анилино- $\alpha$ -метил-D-маннопиранозидо-  
 $\gamma$ -лактон (IV) [3]**

К охлажденному до 0° раствору 6,20 г (15,0 ммоль) II в 32 мл пиридина добавляют 7,70 г (68 ммоль) метансульфохлорида и оставляют в закрытой колбе на 24 час при комнатной температуре. Смесь выливают в 150 мл воды со льдом, экстрагируют хлороформом (4  $\times$  25 мл), экстракт промывают 30 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия, сушат сульфатом магния, упаривают досуха в вакууме и получают 8,4 г (114%) стекловидного мезитилата (III), который не удалось кристаллизовать.

К раствору 8,4 г неочищенного III в 60 мл метанола добавляют 20 мл (24 ммоль) 1,2 M раствора мстилата натрия в метаноле и оставляют в закрытой колбе на ночь. Потиранием стеклянной палочкой о стенки колбы вызывают начало кристаллизации и для ее завершения оставляют смесь на 4 час при 0°. Продукт отфильтровывают, промывают холодным метанолом и получают белые кристаллы; выход 5,98 г (84%, считая на II), т. пл. 208—209°. Аналитический образец имеет т. пл. 208°,  $[\alpha]_D^{25} - 111^\circ$  (с 2,0 в хлороформе).

**2-Анилино-2-дезоксид-4,6-О-бензилиден-  
 $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид (V) [3]**

К горячему раствору 10,0 г (31,1 ммоль) октагидрата гидроокиси бария в 120 мл воды добавляют раствор 5,00 г (12,0 ммоль) IV в 120 мл 2-метоксиэтанола, кипятят с обратным холодильником 18 час, охлаждают, разбавляют примерно 400 мл воды, нейтрализуют твердой углекислотой,

что сопровождается выделением сероводорода (проба с бумажкой, смоченной ацетатом свинца, и характерный запах). Осадок отфильтровывают, промывают на фильтре водой и полученную этим путем смесь карбоната бария и продукта экстрагируют кипящим спиртом ( $3 \times 150$  мл), экстракты объединяют, упаривают досуха в вакууме и получают 3,60 г (81%) продукта с т. пл. 148—149°. Перекристаллизацией из горячего спирта с добавлением воды до появления мути получают V в виде белых кристаллов, т. пл. 148—150°,  $[\alpha]_D^{25} -18^\circ$  (с 2,0 в хлороформе); ИК-спектр (в таблетке с KBr): 2,91, 2,95 и 3,03 мк (ОН и NH), 6,25 и 6,67 мк (фенильная группа), 9,12, 9,34 и 9,95 мк (C — O — C и C — OH), 13,3 и 14,3 мк (монозамещенное бензольное кольцо).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Winstein S., Boschan R., J. Am. Chem. Soc., **72**, 4669 (1950).
2. Goodman L., Benitez A., Anderson C. D., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6582 (1958).
3. Baker B. R., Hewson K., Goodman L., Benitez A., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6577 (1958).
4. Baker B. R., Schaub R. E., J. Org. Chem., **19**, 646 (1954).

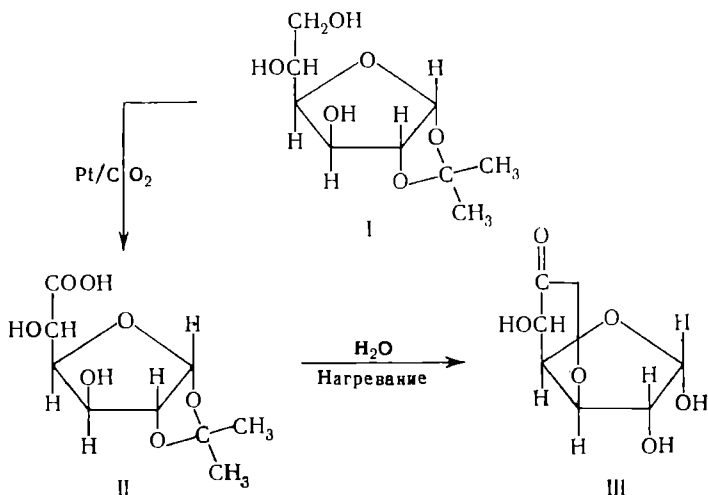


# Продукты окисления и восстановления

## D-Глюкуроновая кислота

Получение  $\alpha$ -D-глюкофурануроно-6,3-лактона каталитическим окислением воздухом 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы

*К. Л. Мельтретер*



### ВВЕДЕНИЕ

D-Глюкуроновая кислота имеет важное биохимическое значение. В литературе описаны многочисленные методы синтеза D-глюкуроновой кислоты и ее лактона [1], однако приведенная здесь методика является наиболее удобной [2]. Она основана на каталитическом окислении воздухом 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (I) в 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкуроновую кислоту (II), которая выделяется в виде кристаллической кальцевой соли. Одновременное удаление кальция и снятие изопропилиденовой группировки приводит к водному раствору D-глюкуроновой кислоты, при концентрировании которого образуется 6,3-лактон (III).

### МЕТОДИКА

#### *Приготовление катализатора*

Катализатор — платина на активированном угле — готовят по измененному методу, описанному Треннером [3]. Активированный уголь марки Дарко G-60 обрабатывают в течение ночи соляной кислотой (1 : 1), фильтруют и отмывают водой от кислоты. После высушивания в течение нескольких часов при  $100^\circ$  87 г очищенного угля добавляют к раствору 35 г платинохлористоводородной кислоты ( $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) в 600 мл воды, помещенному в стакан объемом 1500 мл. При механическом перемешивании смесь нейтрализуют, осторожно добавляя бикарбонат натрия, затем нагревают до  $80^\circ$  на водяной бане и постепенно в течение 45 мин прибавляют 55 мл 38%-ного формальдегида. Чтобы нейтрализовать образовавшуюся муравьиную кислоту и поддерживать смесь

слегка щелочной, одновременно с формальдегидом прибавляют порциями бикарбонат натрия. После добавления всего формальдегида смесь выдерживают 2 час при 80° при постоянном перемешивании, затем охлаждают до комнатной температуры, фильтруют и промывают катализатор последовательно горячим раствором хлористого калия с понижающейся концентрацией и, наконец, горячей водой. Промывку горячей водой проводят до исчезновения хлор-ионов. Воздушно-сухой катализатор содержит 13% платины по весу.

**Окисление 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (I)  
в 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкуроновую кислоту (II)**

60 г (0,27 моля) 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (см. стр. 162) растворяют в 900 мл воды в трехгорлой круглодонной колбе емкостью 3 л и прибавляют 5,7 г (0,068 моля) бикарбоната натрия. После растворения вводят 6,8 г катализатора (платина на активированном угле) и энергично перемешивают смесь со скоростью около 3000 об/мин. В реакционную смесь через вводную трубку продувают со скоростью 112 л/час сжатый воздух, очищенный пропусканием через концентрированную серную кислоту. Температура реакции поддерживается на уровне 50° при помощи водяной бани. Когда pH раствора снизится до 7,0, прибавляют еще 5,7 г бикарбоната натрия. Эту операцию повторяют, пока не будет израсходовано 22,7 г (0,27 моля) бикарбоната натрия, а конечное значение pH раствора не достигнет 7. Для завершения окисления обычно требуется 7—11 час. Применение большего соотношения катализатора и 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы способствует быстрому завершению реакции. От полученной смеси отфильтровывают катализатор и промывают его горячим разбавленным раствором хлористого натрия. Фильтрат и промывные воды объединяют и концентрируют в вакууме до 175 мл. Полученный раствор нагревают до 70° и прибавляют 2 г хлористого кальция для осаждения щавелевой кислоты в виде оксалата кальция. После фильтрования раствор обрабатывают насыщенным раствором 13 г хлористого кальция. При охлаждении до 15—20° (30 мин) выкристаллизовывается кальциевая соль 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкуроновой кислоты, которую отделяют фильтрованием. Продукт промывают один раз водой, охлажденной до 0°, и высушивают на воздухе; получают 41,8 г (47%) гидрата кальциевой соли, содержащего 5,5 молекул воды.

**D-Глюкофурануроно-6,3-лактон (III)**

К раствору 10,1 г дигидрата щавелевой кислоты (теоретическое количество) в 275 мл воды при 90—100° прибавляют при перемешивании 48,6 г гидрата кальциевой соли 1,2-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранурановой кислоты. Полученную смесь, которая содержит образовавшуюся 1,2-О-изопропилиден-D-глюкофурануроновую кислоту, нагревают при перемешивании 1,75 час, причем в последние полчаса прибавляют активированный уголь. Чтобы объем смеси оставался постоянным, периодически прибавляют воду. Отфильтрованную смесь концентрируют на паровой бане до начала кристаллизации, а затем быстро охлаждают до 20°. Через 2 час кристаллический продукт отфильтровывают, промывают холодным спиртом и высушивают при 50°; выход первой порции D-глюкофурануроно-6,3-лактона составляет 12,2 г, т. пл. 176—178°,  $[\alpha]_D^{20} +20^\circ$ .

(с 5,2 в воде). При упаривании объединенных маточного раствора и промывного спирта до начала кристаллизации и охлаждении получают вторую порцию кристаллов с т. пл. 175—176°. Общий выход составляет 21,3 г (81%).

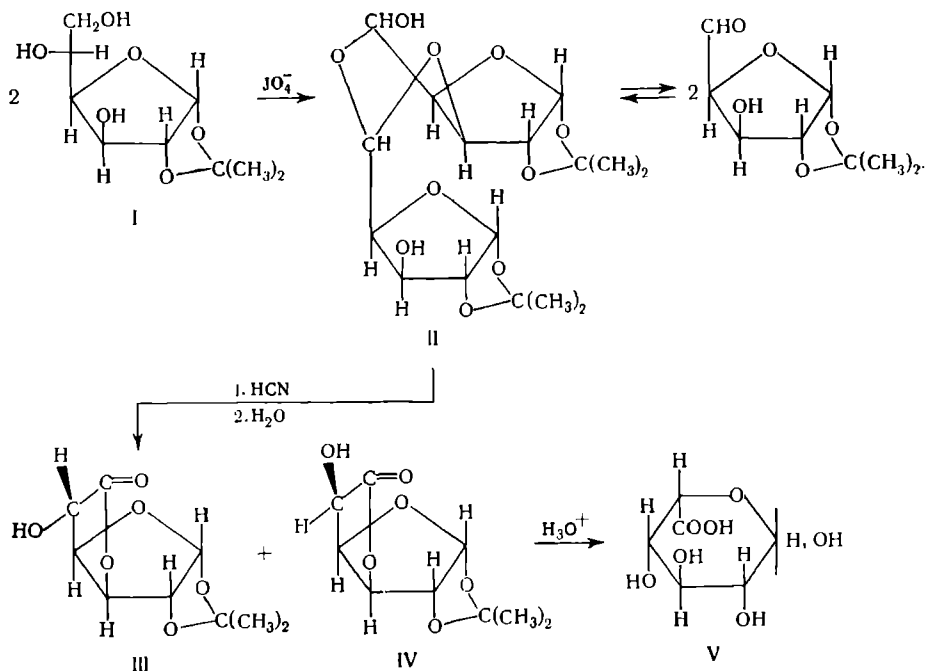
## ЛИТЕРАТУРА

1. Mehlretter C. L., *Advances in Carbohydrate Chem.*, 8, 231 (1953).
2. Mehlretter C. L., Alexander B. H., Mellies R. L., Rist C. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 2424 (1951).
3. Trenner N. R., пат. США 2428438 (1947); *Chem. Abstracts*, 42, 924 (1948).

## L-Идуоновая кислота

Получение из 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкозы

*М. Л. Вольфром, Г. Х. Томас*



## ВВЕДЕНИЕ

При синтезе D-глюкозы-6- $\text{C}^{14}$  Соуден [1] получил кристаллический 1,2-O-изопропилиден-D-глюкофурануроно-6,3-лактон (III). Синтез был повторен Шафизаде и Вольфромом [2], причем с помощью хроматографии на глине эти авторы смогли разделить эпимерные по C-5 O-изопропилиденгексурнолактоны (III и IV) [3]. При периодатном окислении [1,4] 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофуранозы (I) (см. стр. 162) образуется альдегид (II), который закристаллизовался и, как было показано Шаффером и Исбеллом [5], оказался циклическим димером II. Из II циангидриновым синтезом получены два лактона (III и IV). После разделения

на глине мягкий гидролиз хорошо кристаллизующегося лактона IV дает L-идуоновую кислоту (V), которая кристаллизуется в виде свободной кислоты. L-Идуоновая кислота кристаллизуется трудно и с низким выходом. Вскоре после получения в кристаллическом состоянии L-идуоновая кислота была идентифицирована как составная часть некоторых мукополисахаридов [6—9].

## МЕТОДИКА

### *1,2-O-Изопропилиден-α-D-ксило-пентодиальдо-1,4-фураноза (II)*

22 г 1,2-O-изопропилиден-α-D-глюкофуранозы (I) (см. стр. 162) и 5 г бикарбоната натрия растворяют в 150 мл воды. К раствору прибавляют при перемешивании порциями 23,6 г метапериодата натрия до появления избытка окислителя. Избыток реагента обнаруживается водным раствором иодистого калия с крахмалом. Раствор фильтруют, фильтрат экстрагируют хлороформом (5 × 300 мл). Объединенные экстракты высушивают над безводным сульфатом натрия и упаривают до сиропа, который выдерживают несколько дней в вакуум-эксикаторе. Полученная сиропобразная 1,2-O-изопропилиден-α-D-ксило-пентодиальдо-1,4-фураноза (12 г) дает кристаллический семикарбазон, который разлагается при 199—200°.

### *1,2-O-Изопропилиден-β-L-идофурануроно-6,3-лактон (IV)*

К раствору 4 г 1,2-O-изопропилиден-α-D-ксило-пентодиальдо-1,4-фуранозы (II) и 1,2 г бикарбоната натрия в 40 мл воды прибавляют несколько кусков сухого льда, помещают его в баню со льдом и приливают столь же охлажденный раствор 0,8 г цианистого натрия в 30 мл воды. После испарения сухого льда реакционную колбу закрывают пробкой, оборачивают алюминиевой фольгой и помещают на 48 час в холодильник. Затем раствор выдерживают 72 час при комнатной температуре, нагревают на водяной бане 5 час при 60° и одновременно пропускают в него струю воздуха, после чего упаривают в вакууме досуха или лиофилизируют. Остаток недолго кипятят с 50 мл метанола. Полученному раствору дают остыть, затем прибавляют 150 мл эфира и отфильтровывают осадок натриевых солей и бикарбоната натрия. Осадок промывают эфиром и высушивают, выход 6 г. Высушенный осадок растворяют в 20 мл воды и 10%-ной соляной кислотой доводят pH раствора до 2. Полученный раствор экстрагируют этилацетатом (10 × 50 мл), объединенные экстракты высушивают над безводным сульфатом натрия и упаривают в вакууме до полукристаллического остатка, который лактонизируют кипячением в 40 мл толуола в течение 3 час. Полученный раствор декантируют, охлаждают и постепенно разбавляют 50 мл петroleйного эфира с т. кип. 30—60°. Выделившуюся неочищенную смесь лактонов III и IV (1,47 г) растворяют в 6 мл этилацетата, к которому добавлено 1,5 мл петroleйного эфира, и раствор хроматографируют на колонке (250 × 20 мм) со смесью флорекс ХХХ — целит (4 : 1). Колонку элюируют 75 мл смеси этилацетат — петroleйный эфир (4 : 1 по объему), собирая пятнадцать фракций по 5 мл. Фракции, содержащие чистый лактон, и фракции, содержащие смесь лактонов, определяют хроматографией на бумаге в системе третичный амиловый спирт — вода — n-пропиловый спирт — этиловый спирт (8 : 4 : 2,6 : 1); хроматограммы проявляются при опрыскивании под-

щелочным раствором хлоргидрата гидроксилamina с последующей обработкой водным раствором хлорного железа [10]. Из двух лактонов 1,2-О-изопропилиден-β-1-идофурануроно-6,3-лактон (IV) является более подвижным, его получают в кристаллической форме при упаривании растворителя из соответствующих фракций и перекристаллизовывают из смеси ацетон — петролейный эфир; выход 0,568 г, т. пл. 137—138°,  $[\alpha]_D^{25} -100^\circ$  (с 2 в ацетоне). Менее подвижные фракции можно использовать для получения 1,2-О-изопропилиден-α-D-глюкофурануроно-6,3-лактона (III) [2].

### 1-Идурановая кислота (V)

Раствор 1,5 г 1,2-О-изопропилиден-β-1-идофурануроно-6,3-лактона IV в 35 мл воды кипятят 3 час на паровой бане с 7,5 мл амберлита IR-120 (H<sup>+</sup>). Раствор охлаждают, фильтруют и упаривают. Остаток растворяют в воде, раствор нагревают с небольшим количеством активированного угля, фильтруют с отсасыванием через целит и упаривают. Остаток растворяют в минимальном количестве метилового спирта и прибавляют этилацетат до появления опалесценции; кристаллизация начинается при комнатной температуре. После начала кристаллизации раствор помещают в холодильник. Чистое вещество можно получить при перекристаллизации из смеси метиловый спирт — этилацетат; выход 300 мг, т. пл. 131—132°,  $[\alpha]_D^{25} +37^\circ$  (3,5 мин) → +33° (28 мин, 4 час) (с 3 в воде).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sowden J. C., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4377 (1952).
2. Shafizadeh F., Wolfrom M. L., J. Am. Chem. Soc., **77**, 2568 (1955).
3. Lew B. W., Wolfrom M. L., Goepf R. M., Jr., J. Am. Chem. Soc., **68**, 1449 (1946).
4. Iwadare K., Bull. Chem. Soc. Japan, **16**, 40 (1941).
5. Schaffer R., Isbell H. S., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3864 (1957).
6. Hoffmann P., Linker A., Meyer K., Science, **124**, 1252 (1956).
7. Meyer K., Biochim. et Biophys. Acta, **21**, 506 (1956).
8. Cifonelli J. A., Ludowieg J., Dorfman A., Federation Proc., **16**, 165 (1957); J. Biol. Chem., **233**, 544 (1958).
9. Jeanloz R. W., Stoffyn P. J., Federation Proc., **17**, 249 (1958).
10. Abdel-Akher M. A., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **73**, 5859 (1951).

### D-Маннурановая кислота

Получение D-маннофурануроно-6,3-лактона из альгиновой кислоты

Р. Л. Уистлер, Дж. Н. Бемиллер

## ВВЕДЕНИЕ

D-Маннурановую кислоту получают в разных формах при гидролизе альгинов из различных морских водорослей. Кислотный гидролиз альгина из *Macrocystis pyrifera* проводят горячей 88%-ной муравьиной кислотой [1], горячей разбавленной серной кислотой [2, 3], крепкой

серной кислотой при комнатной температуре [4] или хлористым водородом в метаноле [5]. D-Маннурановая кислота была выделена в виде 6,3-лактона [1] и в виде легко кристаллизующейся бариевой соли [2, 4], а в одном случае удалось получить в небольшом количестве свободную кислоту в кристаллическом виде [6].

Выходы никогда не бывают близки к стехиометрическим. Наилучшие результаты были получены при гидролизе альгиновой кислоты горячей муравьиной кислотой и выделении продукта в виде D-маннофурануроно-6,3-лактона. Этот метод, предложенный Споером [11], приводится ниже. Многие альгиновые кислоты содержат D-гулурановую кислоту, которая в значительной мере разрушается во время гидролиза, и не мешает выделению D-маннурановой кислоты [3, 7]. D-Маннурановая кислота была синтезирована окислением  $\alpha$ -метил-D-маннопиранозидом [8].

### МЕТОДИКА

150 г продажной альгиновой кислоты или одной из ее солей (альгината) смачивают небольшим количеством спирта и диспергируют в 3000 мл 88%-ной муравьиной кислоты в круглодонной колбе емкостью 5 л. Смесь оставляют на 6 час, встряхивая время от времени, после чего кипятят 12 час, охлаждают и фильтруют. Фильтрат концентрируют при 40—45° в вакууме до густого сиропа<sup>1</sup>. Полученный сироп нагревают с 1 л 95%-ного спирта, спирт затем упаривают в вакууме. Сиропообразный остаток растворяют при непродолжительном кипячении в 3 л 95%-ного спирта и обрабатывают углем, фильтрат упаривают и получают частично закристаллизовавшийся сироп. Прибавляют 30 мл 99,5%-ного спирта и оставляют смесь на 12 час при комнатной температуре и затем на ночь в холодильнике. Кристаллический осадок отфильтровывают и промывают смесью спирт — ацетон (30 : 70 по объему). Осадок растворяют в 200 мл воды, раствор обрабатывают углем, фильтруют, упаривают досуха и кристаллическую массу растирают со смесью спирт — ацетон (30 : 70 по объему). Выход 23 г, т. пл. 186—187°.

Полученное вещество растворяют примерно в 2 л кипящего 90%-ного спирта. При охлаждении осаждается 17 г (11%) D-маннофурануроно-6,3-лактона с т. пл. 191—192° (после высушивания в вакууме т. пл. 197—199°),  $[\alpha]_D^{25} +71 \rightarrow +92^\circ$  (20 мин; с 1 в воде) [3, 7]. Это соединение диморфно; для него известны также другие температуры плавления в интервале от 139 до 145° [1, 2, 4, 6, 9].

Прибавляя петролейный эфир (т. кип. 35—37°), можно осадить дополнительную порцию вещества.

### ПРОИЗВОДНЫЕ

Для идентификации обычно достаточно выделения кристаллического D-маннофурануроно-6,3-лактона. Для идентификации в виде производного в случае необходимости можно получить 2,4-динитрофенилгидразон [10]. В минимальном количестве воды (~ 3 мл) растворяют 0,5 г D-маннуранолактона, к раствору прибавляют 0,5 г 2,4-динитрофенилгидразина в этилацетате (около 150 мл) и 1 каплю концентрированной соляной кислоты. Если из раствора отделяется вода, следует прибавить несколько миллилитров спирта. Раствор встряхивают 20—24 час при

<sup>1</sup> Отгоняющую кислоту можно использовать вновь.

комнатной температуре. Отфильтровывают небольшое количество ( $\sim 0,3$  г) кристаллической смеси непрореагировавшего лактона и его 2,4-динитрофенилгидразона, фильтрат упаривают досуха в вакууме, полученный остаток растирают с эфиром, фильтруют и промывают эфиром. Неочищенный продукт перекристаллизовывают из минимального количества горячего 95%-ного спирта, выход 2,4-динитрофенилгидразона D-маннууроно-6,3-лактона 0,3 г, т. пл.  $203-210^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{25} +76^\circ$  (с 0,1 в спирте).

Смесь D-маннууронолактона и его гидразона для удаления лактона можно промыть водой. Гидразон перекристаллизовывают из спирта, как описано выше, это дает дополнительно 80 мг продукта.

О микроидентификации D-глюкуроно-6,3-лактона и D-галактуроновой кислоты в виде их гидразонов уже сообщалось в работе [11]; этот прием несомненно пригоден и для D-маннууронолактона.

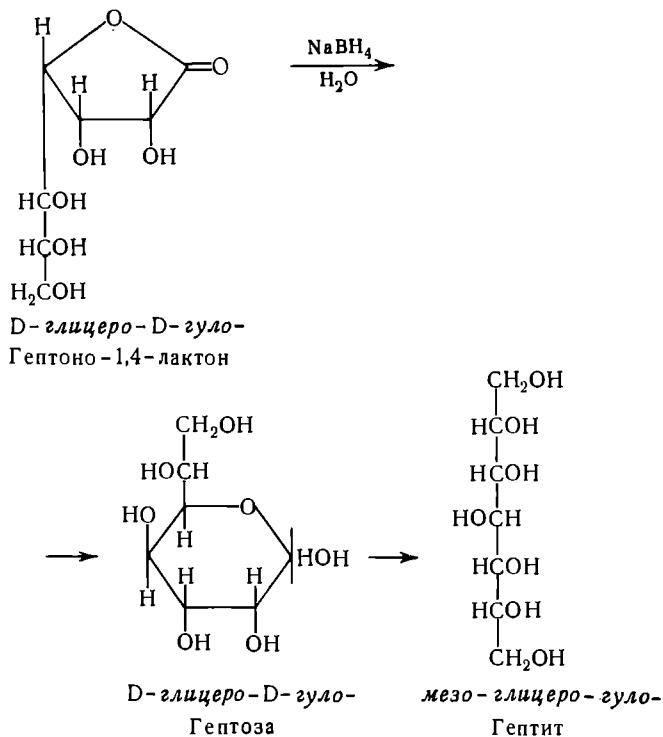
## ЛИТЕРАТУРА

1. Spoe hr H. A., Arch. Biochem., **14**, 153 (1947).
2. Schoeffel E., Link K. P., J. Biol. Chem., **95**, 213 (1932).
3. Whistler R. L., Kirby K. W., Z. physiol. Chem., **314**, 46 (1959); Kirby K. W., Ph. D. Dissertation, Purdue University, Lafayette, Indiana, 1958.
4. Nelson W. L., Cretcher L. H., J. Am. Chem. Soc., **51**, 1914 (1929); **52**, 2130 (1930); **54**, 3409 (1932).
5. Hirst E. L., Jones J. K. N., Jones W. O., J. Chem. Soc., **1939**, 1880.
6. Schoeffel E., Link K. P., J. Biol. Chem., **100**, 397 (1933).
7. Fischer F. G., Dörfel H., Z. physiol. Chem., **302**, 186 (1955).
8. Stacey M., Wilson P. I., J. Chem. Soc., **1944**, 587.
9. Isbell H. S., Frush H. L., J. Research Natl. Bur. Standards, **37**, 43 (1946).
10. Whistler R. L., BeMiller J. N., неопубликованные данные.
11. White L. M., Secor G. E., Anal. Chem., **31**, 1273 (1959).

## Восстановление боргидридом натрия

D-глицеро-D-гуло-Гептоза, мезо-глицеро-гуло-гептит, дульцит

М. Л. Вольфром, А. Томпсон



### ВВЕДЕНИЕ

Боргидриды металлов, содержащие алюминий, бериллий и натрий, описаны Шлезингером и сотр. [1, 2]. Боргидрид натрия был впервые применен для восстановления альдегидов и кетонов Хайкином и Брауном [3]. Активность боргидрида натрия в водных растворах делает его пригодным для восстановления альдоновых кислот и альдоз [4]. Хотя установлено, что боргидрид натрия вообще не восстанавливает сложные эфиры [3], известно восстановление альдонолактонов и эфиров уроновых кислот [5]. Выходы улучшаются, если предотвратить образование альдоната натрия путем поддержания низкого значения pH при помощи забуферивания борной кислотой, катионитом или двуокисью углерода [6]. Боратные комплексы полигидроксильных соединений легко разрушаются при удалении иона натрия катионитом с последующим удалением борной кислоты в виде ее летучего метилового эфира отгонкой с избытком метанола в вакууме. Боргидрид натрия более удобен в обращении и дает лучшие выходы при восстановлении альдонолактонов в альдозы, чем амальгама натрия [7]. Боргидрид натрия не столь эффективен при восстановлении лактонов или альдоз в полиолы, как водород под давлением [8—10], однако, если установки для гидрирования под высоким давлением отсутствуют, целесообразно применять именно его.



## МЕТОДИКА

**Восстановление альдонолактона в альдозу:  
D-глицеро-D-гуло-гептоза [4]**

К охлажденному до 0° раствору 15 г D-глицеро-D-гуло-гептоно-1,4-лактона [11, 12] в 100 мл воды прибавляют по каплям раствор 2 г боргидрида натрия в 50 мл воды с такой скоростью, чтобы температура смеси удерживалась в интервале 0—3°. Смесь осторожно и непрерывно перемешивают механической мешалкой. Одновременно с введением боргидрида натрия прибавляют 1 н. раствор серной кислоты с такой скоростью, чтобы рН реакционной смеси была в пределах 3—4 (по индикаторной бумаге). На протяжении всей реакции (45—60 мин) происходит выделение водорода. Спустя 10 мин после добавления последней порции восстанавливающего агента прибавляют 5 мл 1 н. серной кислоты, чтобы разрушить непрореагировавший гидрид. Раствор разбавляют до 450 мл и перемешивают 15 мин с 35 мл амберлита IR-120 (H<sup>+</sup>), фильтруют и затем перемешивают с небольшим избытком дуолита А-4 до рН 7. После фильтрования водный раствор упаривают до ~50 мл и разбавляют 100 мл спирта. Раствор снова упаривают до 50 мл и оставляют при 10° на ночь. Кристаллическую массу отфильтровывают, промывают спиртом и эфиром, выход 5,94 г. Дальнейшее упаривание и прибавление спирта дает еще две порции продукта. Общий выход составляет 10 г (66,5%). Чистое вещество получают при перекристаллизации из метанола, т. пл. 191—192°,  $[\alpha]_D^{25} -20^\circ$  (конечное значение после мутаротации; с 3,5 в воде).

**Восстановление лактона в присутствии катионита [6];  
мезо-глицеро-гуло-гептит**

1 ммоль лактона, 2 мл амберлита IR-120 (H<sup>+</sup>) и 10 мл 0,05 M водного раствора борной кислоты помещают в небольшую колбу и охлаждают в бане со льдом. К раствору лактона при эффективном перемешивании прибавляют по каплям в течение 2—3 мин 10 мл свежеприготовленного 0,3 M раствора боргидрида натрия. Перемешивание продолжают 30 мин и снова прибавляют 10 мл раствора боргидрида. Через 30 мин рН смеси доводят приблизительно до 9 с помощью раствора едкого натра и оставляют смесь на ночь при низкой температуре (5°). Затем смесь пропускают через колонку с 10 мл амберлита IR-120 (H<sup>+</sup>), элюат и промывные воды упаривают в вакууме досуха. Борную кислоту удаляют повторяющимся восстановлением остатка в метаноле и упариванием раствора в вакууме. Полученный сироп растворяют в небольшом количестве метанола или этанола, фильтруют, вносят затравку соответствующего полиола и оставляют кристаллизоваться. Ниже указаны выходы полиолов, полученных при восстановлении следующих веществ: D-ксилоно-1,4-лактон, 97,2%; D-арабино-1,4-лактон, 95,8%; D-гулоно-1,4-лактон, 95,2%; D-галактоно-1,4-лактон, 97,2%; D-глицеро-D-гуло-гептоно-1,4-лактон, 98,6%; лактобиозо-1,4-лактон, 97% [6].

**Восстановление альдозы в полиол; дульцит [13]**

К раствору 10 г  $\alpha$ -D-галактозы в 30 мл воды прибавляют по каплям при перемешивании раствор 2 г боргидрида натрия в 50 мл воды. Время прибавления составляет 10 мин, а температура не должна превышать

50°. Смесь выдерживают 10 мин, после чего осторожно прибавляют амберлит IR-120 (H<sup>+</sup>) до прекращения выделения газа. Раствор разбавляют до 200 мл, прибавляют 50 мл амберлита IR-120 (H<sup>+</sup>) и перемешивают 15 мин. После фильтрования раствор упаривают в вакууме, полученный подвижный сироп несколько раз растворяют в метаноле и упаривают в вакууме, что приводит к удалению борной кислоты в виде летучего метилбората. Сироп растворяют в небольшом количестве воды и разбавляют спиртом, выход дульцита 9 г (90%), т. пл. 182—185°. Перекристаллизация из воды и спирта дает чистое вещество с т. пл. 188°.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schlesinger H. I., Brown H. C., J. Am. Chem. Soc., **62**, 3429 (1940).
2. Finholt A. E., Ph. D. Dissertation, The University of Chicago, Chicago, Ill. (1946).
3. Chaikin S. W., Brown W. G., J. Am. Chem. Soc., **71**, 122 (1949).
4. Wolfrom M. L., Wood H. B., J. Am. Chem. Soc., **73**, 2933 (1951).
5. Wolfrom M. L., Anno K., J. Am. Chem. Soc., **74**, 5883 (1952).
6. Frush H. L., Isbell H. S., J. Am. Chem. Soc., **78**, 2844 (1956).
7. Fischer E., Ber., **22**, 2204 (1889).
8. Glattfeld J. W. E., Schimpff G. W., J. Am. Chem. Soc., **57**, 2204 (1935).
9. Wolfrom M. L., O'Neill A. N., Galkowski T. T., J. Am. Chem. Soc., **74**, 1062 (1952).
10. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 77.
11. Kiliani H., Ber., **19**, 767 (1886); Phillippe L.—H., Ann. chim. phys., [8] **26**, 311 (1912).
12. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, vol. I, 1962, p. 160.
13. Thompson A., неопубликованные данные.

## Восстановление гидридами металлов

Восстановление сложных эфиров сахаров и лактонов

*Б. А. Льюис, Ф. Смит, А. М. Стефен*

## ВВЕДЕНИЕ

Как известно, сложноэфирные группировки восстанавливаются гидридами металлов до спиртов; на практике для этой цели обычно используются комплексные гидриды, так как они обладают хорошей растворимостью и устойчивостью [1]. Комплексные гидриды металлов значительно отличаются друг от друга по восстанавливающей способности. Например, алюмогидрид лития [2, 3] восстанавливает самые разнообразные сложные эфиры в сухих растворителях эфирного типа; боргидриды магния [4, 5], кальция [6] и лития [4, 5, 7, 8] восстанавливают те же группировки, но менее энергично. Боргидрид натрия, как правило, реагирует неудовлетворительно [6, 9], но становится активным при добавлении одной трети моля хлористого алюминия [10] или некоторых других

галогенидов многовалентных металлов. Лактоны в общем случае обрабатывают так же, как и сложные эфиры.

Восстановление сложноэфирных и лактонных группировок является в настоящее время общей реакцией в химии углеводов, причем выбор восстанавливающего агента определяется, как правило, растворимостью восстанавливаемого соединения. Высоко реакционноспособный алюмогидрид лития [11, 12] применяется в тех случаях, когда используется сухой органический растворитель, а боргидриды калия и натрия [13] — когда наиболее подходящим растворителем служит вода. Боргидриды щелочных металлов успешно реагирует со сложными эфирами углеводов и лактонами, но наиболее подходящим для этой цели является боргидрид натрия, поскольку он растворим и в воде и в эффективном органическом растворителе *бис*-2-метоксиэтиловом эфире (диглиме) [5]. Растворимость продукта реакции может также влиять на успешное протекание восстановления, особенно если приходится иметь дело с высокомолекулярными соединениями. Кроме того, большое значение имеет легкость выделения продуктов реакции из комплексов с ионами металлов [14, 15] или с боратионом [16, 17]. Чтобы вызвать диссоциацию таких комплексов, часто необходима специальная обработка; в частности, это относится к полигидроксильным соединениям. Ввиду высокой реакционной способности гидридов металлов по отношению к карбонильным группам вообще при восстановлении сложных эфиров необходимо защищать альдегидные и кетонные функциональные группы углевода (см., однако, [18]) обычно образованием гликозида (ацетали и кетали не реагируют). Реакции восстановления гидридами металлов обычно осуществляются при умеренных температурах (0—60°), длятся они от получаса до 3 час. Если условия реакции тщательно подобраны, выходы целевых продуктов обычно высокие.

Ниже приведены примеры наиболее часто встречающихся типов реакций восстановления сложных эфиров и лактонов углеводов:

- 1) альдонолактон в альдозу в воде (см. стр. 225);
- 2) альдонолактон в полиол в воде (см. стр. 225) или в особых случаях в органическом растворителе;
- 3) альдоза в полиол (см. стр. 225), это вторая стадия полного восстановления по реакции, указанной в п. 2;
- 4) метиловый эфир уроновой кислоты в сахар обычно в воде;
- 5) метиловый эфир метилированной уроновой кислоты в метилированный сахар в органическом растворителе;
- 6) бутиловый эфир (бутил для увеличения растворимости) сахарной (двухосновной) кислоты в полиол в органическом растворителе;
- 7) метиловый эфир альдобииуроновой кислоты в нейтральный дисахарид в воде или органическом растворителе;
- 8) метиловый эфир полностью метилированной альдобииуроновой кислоты в соответствующее производное дисахарида в воде или органическом растворителе;
- 9) метиловый эфир ацилированной альдобииуроновой кислоты в нейтральный дисахарид в органическом растворителе.

## МЕТОДИКА

**Восстановление альдонолактона в альдозу  
(см. стр. 225)**

D-Ликсоно-1,4-лактон восстанавливают в D-ликсозу [19] по аналогичной методике, но вместо серной кислоты используют уксусную. Интересным примером предпочтительного восстановления лактонной группировки в присутствии восстанавливающей группы представляет получение диальдегидоглюкодиальдогексозы при восстановлении D-глюкуронолактона в водном растворе действием боргидрида натрия при pH 5 и температуре ниже 0° с выходом 12% [18].

**Восстановление альдонолактонов в полиолы  
боргидридом натрия**

Общий метод восстановления альдонолактонов в полиолы боргидридом натрия в присутствии катионита приведен на стр. 225 и показан на примере восстановления D-глицеро-D-гуло-гептоно-1,4-лактона в мезо-глицеро-гуло-гептит. Другие общие методики [20] приводятся ниже.

**Восстановление в присутствии борной кислоты.** Раствор 1 ммоль лактона в 5 мл водного 0,4 M раствора борной кислоты охлаждают в бане со льдом и прибавляют по каплям в течение 30 мин при перемешивании 10 мл 0,3 M раствора боргидрида натрия. Раствор выдерживают еще 30 мин при 0°, подщелачивают до pH ~ 9, добавляя раствор едкого натра, и оставляют на ночь при 5°. Продукт восстановления выделяют так же, как в случае мезо-глицеро-гуло-гептита (см. стр. 225).

**Восстановление в присутствии двуокиси углерода.** 1 ммоль лактона растворяют в 5 мл воды со льдом и раствор охлаждают в бане со льдом. Через раствор пропускают ток двуокиси углерода и прибавляют по каплям в течение 30 мин раствор 1 ммоль боргидрида натрия в 10 мл воды. Затем прекращают подачу двуокиси углерода и прибавляют по каплям за 30 мин 10 мл водного раствора, содержащего дополнительно 3 ммоль боргидрида натрия. Реакционную смесь подщелачивают до pH ~ 9 и отбавывают как в случае мезо-глицеро-гуло-гептита (см. стр. 225).

**Восстановление в безводном метаноле.** К охлажденному до 0° раствору 2 ммоль боргидрида натрия и 0,1 ммоль метилата натрия в 10 мл метанола в колбе с магнитной мешалкой и осушительной трубкой прибавляют 1 ммоль тонко измельченного лактона. Смесь перемешивают до растворения лактона и затем оставляют при комнатной температуре. Через 18 час метанол упаривают в токе воздуха. Остаток деионизуют катионитом и удаляют борат с метанолом, как описано в случае мезо-глицеро-гуло-гептита (см. стр. 225).

**Восстановление лактонов алюмогидридом лития  
в органических растворителях**

Алюмогидрид лития также применяют для восстановления соответствующим образом замещенных лактонов сахаров в смеси тетрагидрофурана и эфира. Этим путем тетра-О-ацетил-D-гулоно-1,4-лактон был превращен в 1-сорбит с выходом 47% [21]. Этот метод, однако, менее удобен, чем описанные выше методы, в которых используются водные растворы боргидрида натрия. Аналогичным образом 2,3,6-три-О-метил-

D-манноно-1,4-лактон был превращен в 2,3,6-три-O-метил-D-маннит [12]. В качестве примера восстановления лактонов уроновых кислот можно привести восстановление алюмогидридом лития в эфире 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофурануроно-6,3-лактона в D-глюкозу, на промежуточной стадии которого образуется 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкоза [22] (ее можно выделить). Это восстановление имеет определенные преимущества перед соответствующим восстановлением 1,2-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-глюкофурануроно-6,3-лактона в водном растворе под действием боргидрида натрия [23].

### *Восстановление альдоз в полиолы (см. также стр. 225)*

#### **Общая методика восстановления сахаров [16]**

К раствору 1 г сахара в 20 мл воды прибавляют раствор 0,1—0,15 г боргидрида натрия в 10 мл воды. Реакционную смесь, ставшую слабощелочной, выдерживают при температуре 20—25°, пока капля смеси, подкисленная уксусной кислотой, не перестанет восстанавливать раствор Фелинга. Протекание реакции также контролируется поляриметрически: после завершения реакции оптическое вращение должно быть постоянным. Продолжительность реакции сильно сокращается, если увеличить количество боргидрида. Так, обычно восстановление D-галактозы длится 80 мин, но если вес введенного боргидрида составляет половину веса сахара, то реакция завершается уже через 15 мин.

В конце реакции для разрушения избытка боргидрида натрия прибавляют уксусную кислоту. Продукт реакции можно выделить несколькими способами.

1) Водный раствор последовательно пропускают через катионит и анионит и при упаривании получают полиол (или смесь двух полиолов в случае кетозы). Так, например, при восстановлении галактозы указанным способом можно сразу получить кристаллический дульцит.

2) Водный раствор упаривают в вакууме досуха и кипятят 1 час с 6%-ным хлористым водородом в метаноле. После удаления хлористого натрия фильтрованием при охлаждении фильтрата выделяется полиол. По этому методу с выходом 90% был получен D-маннит.

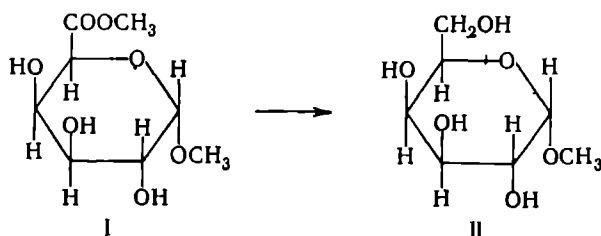
3) Водный раствор полиола упаривают в вакууме досуха, остаток встряхивают с 15 мл уксусного ангидрида, содержащего 1 мл концентрированной серной кислоты, до растворения большей части остатка. Смесь нагревают 10 мин при 50—60°, охлаждают и выливают в воду со льдом. Ацетат полиола, который обычно легко кристаллизуется, отфильтровывают, промывают водой, высушивают и перекристаллизовывают обычным образом. Деацетилирование любым из стандартных методов (см. стр. 119) приводит к полиолу.

Со времени опубликования приведенной работы эффективность и полнота восстановления сахаров (как альдоз, так и кетоз) боргидридом были неоднократно подтверждены [24, 25]. Тем не менее Хаф и сотр. [26] показали, что в некоторых случаях восстановление боргидридом натрия замедляется из-за наличия пространственных затруднений или из-за препятствий, создаваемых образованием боратных комплексов. Так, ниже приведено время, необходимое для восстановления различных сахаров двойным по весу количеством боргидрида натрия при комнатной температуре: D-глюкоза 2 час, 3-O-метил-D-глюкоза 24 час, целлобиоза 3 час, софороза 5 час, ламинарибиоза 24 час, 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-L-

арабиноза 24 час. Брэгг и Хаф [28] исследовали количественные закономерности восстановления боргидридом калия при pH 10,3, оптимальном для данной реакции [27]. Как правило, 3-О-замещенные производные альдоз и 4-О-замещенные производные гексозол реагируют необычно медленно.

### Восстановление метиловых эфиров метилгликозидов уруновых кислот

Восстановление метилового эфира  $\alpha$ -метил-D-галактопирануринозида (I) в  $\alpha$ -метил-D-галактопиранозид (II) [19]



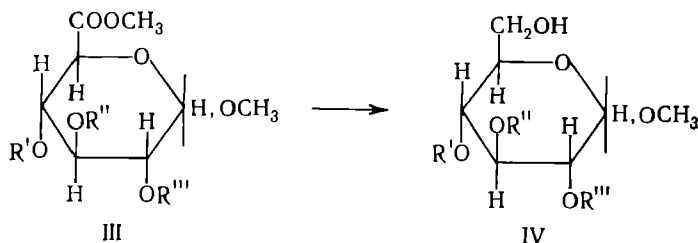
Раствор 0,50 г моногидрата I [28a] в 5 мл воды прибавляют по каплям в течение 5 мин при перемешивании к раствору 0,20 г боргидрида натрия в 3 мл воды при комнатной температуре. Смесь перемешивают еще 10 мин, подкисляют разбавленной уксусной кислотой, разбавляют двумя объемами воды и пропускают последовательно через колонки с амберлитом IR-120 (H<sup>+</sup>) и IR-4B (OH<sup>-</sup>). Элюат упаривают в вакууме до сиропа (0,4 г). Для удаления непрореагировавшего метилового эфира сироп растворяют в 10 мл воды, прибавляют 20 мл 0,2 н. раствора гидроксида бария и выдерживают 4 час. Щелочной раствор деионизуют, как описано выше, элюат упаривают до сиропа и получают моногидрат  $\alpha$ -метил-D-галактопиранозид (II); выход 61%, после перекристаллизации из смеси абсолютного спирта с эфиром т. пл. 104—106°,  $[\alpha]_D^{25} +170^\circ$  (с 0,5 в воде). При повторной перекристаллизации из той же смеси растворителей получают чистое вещество с т. пл. 108—109°,  $[\alpha]_D^{25} +177^\circ$  (с 3 в воде).

Аналогичным образом восстанавливают метиловый эфир  $\beta$ -метил-D-галактопирануринозида до  $\beta$ -метил-D-галактопиранозид, выход 64%, т. пл. 175—176°,  $[\alpha]_D^{25} -1^\circ$  (с 3 в воде). Метиловый эфир  $\alpha$ -метил-D-глюкопирануринозида восстанавливают до  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид; выход 37%, т. пл. 164—165°,  $[\alpha]_D^{25} +151^\circ$  (с 1 в воде).

Одним из первых примеров восстановления метилового эфира метилгликозида уруновой кислоты в безводном растворителе было превращение метилового эфира 2-дезоксигалакто-3,4-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-галактопирануринозида с выходом 23% в 2-дезоксигалакто-3,4-О-изопропилиден- $\alpha$ -метил-D-галактопиранозид действием алюмогидрида лития в эфире [29]; наличие изопропилиденной группы обуславливало растворение этого соединения в эфире.

## Восстановление метиловых эфиров метилированных метилгликозидов уроновых кислот

Восстановление метилового эфира 4-О-метил- $\alpha$ -метил-D-глюкопирануронозида и выделение 4-О-метил-D-глюкозы [30]



Раствор 200 мг метилового эфира 4-О-метил- $\alpha$ -метил-D-глюкопирануронозида (III,  $R' = CH_3$ ,  $R'' = R''' = H$ ,  $\alpha$ -аномер) [30] в 10 мл сухого тетрагидрофурана осторожно прибавляют при перемешивании к раствору 300 мг алюмогидрида лития в 20 мл сухого тетрагидрофурана. Через 15 мин прибавляют воду, реакционную смесь фильтруют и промывают остаток. Фильтрат и промывные воды упаривают в вакууме и получают 160 мг сиропа, который растворяют в 1 мл спирта и прибавляют 8 мл эфира. Небольшое количество осадка удаляют фильтрованием, фильтрат упаривают досуха в вакууме и получают 4-О-метил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (IV,  $R' = CH_3$ ,  $R'' = R''' = H$ ,  $\alpha$ -аномер) в виде бесцветной нейтральной и невосстанавливающей жидкости с  $n_D^{25}$  1,4790 и  $[\alpha]_D^{25} +133^\circ$  (с 3,5 в воде).

При нагревании раствора 93 мг 4-О-метил- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид в 5 мл 1 н. серной кислоты в течение 15 час на кипящей водяной бане  $[\alpha]_D$  вначале изменяется, а затем становится постоянным и равным  $+59^\circ$ . Полученный раствор нейтрализуют, пропуская через дуолит А-4 ( $OH^-$ ), упаривают в вакууме досуха и получают 70 мг 4-О-метил-D-глюкозы с  $[\alpha]_D^{25} +80^\circ$  (с 1,3 в метаноле). 4-О-Метил-D-глюкозу удобно характеризовать как фенилоазон; т. пл.  $158-159^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{25} -31 \rightarrow -2^\circ$  (равновесие; с 0,5 в спирте).

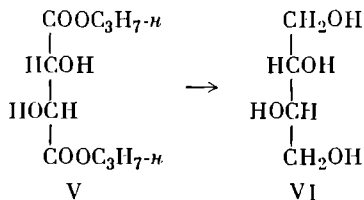
Литго и Триппетт [11] сообщили, что восстановление метилового эфира 2,3,4-три-О-метил-метил-D-глюкопирануронозида (III,  $R' = R'' = R''' = CH_3$ ,  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномер) действием алюмогидрида лития в эфире дает 2,3,4-три-О-метил-метил-D-глюкозид (IV,  $R' = R'' = R''' = CH_3$ ,  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномер). Это же восстановление было выполнено одновременно и независимо (на чистом  $\alpha$ -изомере) Абдель-Акером и Смитом [12] и позднее многократно повторено другими авторами. В данном случае продукт реакции удобно выделять подкислением реакционной смеси разбавленной серной кислотой с последующей непрерывной экстракцией частично метилированного гликозида эфиром или хлороформом.

### Восстановление эфиров сахарных (двухосновных) кислот в органических растворителях

Приведенная ниже методика иллюстрирует использование алюмогидрида лития при восстановлении эфиров сахарных кислот, растворимых в органических растворителях. В этом случае для увеличения растворимости применен ди-*n*-бутиловый эфир. Для выделения конечного

продукта из устойчивых промежуточных комплексов, включающих гидроксильные группы восстанавливаемого соединения, применяется ацетилирование.

**Восстановление ди-*n*-бутилового эфира L-треаровой кислоты (V)  
в L-треит (VI) [14]**



Раствор 5 г ди-*n*-бутилового эфира (+)-винной кислоты (эфир L-треаровой кислоты) (V) [14] в 25 мл сухого тетрагидрофурана осторожно прибавляют при перемешивании к раствору 3 г алюмогидрида лития в смеси 75 мл тетрагидрофурана и 25 мл эфира. На этой и на любой последующей стадии восстановления выпадение осадка не происходит. Смесь кипятят с обратным холодильником 4 час, охлаждают и осторожно выливают при перемешивании в 150 мл воды, прибавляют 10 мл ледяной уксусной кислоты и упаривают в вакууме досуха. К сухому остатку прибавляют 100 мл уксусного ангидрида, смесь нагревают на кипящей водяной бане 1 час и затем кипятят 2 час с обратным холодильником на масляной бане, чтобы осуществить одновременно ацетилирование и расщепление комплекса с металлом. После удаления большей части уксусного ангидрида отгонкой в вакууме остаток охлаждают и встряхивают с 100 мл воды и некоторым количеством соляной кислоты, достаточным для растворения неорганических солей. Ацетат L-треита экстрагируют хлороформом, хлороформный экстракт промывают водой для удаления минеральной кислоты и высушивают сульфатом магния. Упаривание растворителя дает тетра-О-ацетил-L-треит, его перегоняют и получают в виде подвижной бесцветной жидкости с выходом 5,1 г, т. кип. (т. бани) 145° (0,05 мм),  $n_D^{20}$  1,4380,  $[\alpha]_D^{25}$  —32° (с 4,0 в спирте).

Обработка тетраацетата смесью 75 мл 1 н. едкого натра и 50 мл спирта в течение 1 час при 50° с последующим деионизацией амберлитом IR-120 (H<sup>+</sup>) и упариванием растворителя дает L-треит (VI), который самопроизвольно кристаллизуется. Выход 2,18 г, после перекристаллизации из метанола т. пл. 88°,  $[\alpha]_D^{25}$  —4° (с 7,0 в воде).

**Восстановление метиловых эфиров метилгликозидов  
альдобииуроновых кислот**

Это восстановление, приводящее к образованию нейтральных дисахаридов, очень часто используется для идентификации альдобииуроновых кислот (и их полностью метилированных производных), полученных из гемицеллюлоз и растительных камедей. Разработаны разнообразные методы восстановления и выделения продукта реакции. Рассматриваемые примеры помогут исследователю в выборе наиболее подходящей для его целей схемы.

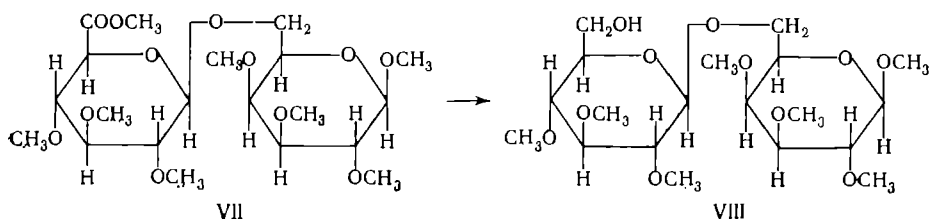
Так как метиловые эфиры метилгликозидов альдобииуроновых кислот растворимы в воде, то их можно восстановить водным боргидридом калия [31]. Реакцию прекращают, добавляя уксусную кислоту, а нейтральный



продукт выделяют деионизацией и упариванием раствора. При наличии подходящего сухого растворителя (обычно тетрагидрофурана) можно использовать алюмогидрид лития; этот тип реакции особенно пригоден, когда имеется остаток 4-О-метилглюкуроновой кислоты [32]. Избыток восстанавливающего агента можно разрушить добавлением этилацетата, после чего полученную смесь разбавляют водой и деионизуют.

Восстановление сложных эфиров гликозидов водным боргидридом калия было распространено на триоуроновые кислоты [31]; этот же тип реакции был осуществлен при использовании алюмогидрида лития в тетрагидрофуране [33]. Здесь на стадии образования сложного метилового эфира метилгликозида имеется некоторая опасность метанолиза.

### *Восстановление полностью метилированных альдобиуроновых кислот*



Восстановление метиловых эфиров полностью метилированных альдобиуроновых кислот в нейтральные частично метилированные дисахариды алюмогидридом лития в эфире или тетрагидрофуране широко использовалось после первого сообщения [12] о том, что метиловый эфир 6-О-(2,3,4-три-О-метил-β-Д-глюкуронозил)-2,3,4-три-О-метил-β-метил-Д-галактозида (VII) можно превратить этим путем в 6-О-(2,3,4-три-О-метил-β-Д-глюкозил)-2,3,4-три-О-метил-β-метил-Д-галактозид (VIII). Детальное описание метода было опубликовано позднее [34]. Продукт был выделен непрерывной экстракцией эфиром смеси, полученной при выливании реакционного раствора в воду. Соответствующий α-метил-Д-гликозид, приготовленный аналогичным образом, был выделен обработкой реакционной смеси минеральной кислотой и экстракцией хлороформом. Джонс и Вайс [35] при выделении подобных продуктов разрушали избыток гидрида, добавляя этилацетат и удаляли ионы смолами амберлит IR-120 (H<sup>+</sup>) и IR-400 (OH<sup>-</sup>). При другом методе выделения щелочной фильтрат, полученный после добавления этилацетата и воды, концентрируют до небольшого объема и экстрагируют хлороформом.

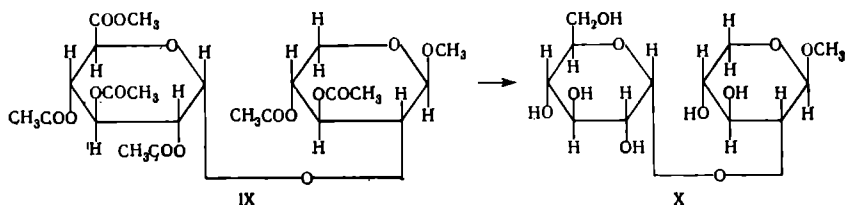
Для восстановления метиловых эфиров полностью метилированных альдобиуроновых кислот также применяется боргидрид натрия в спирте [36, 37]. Эффективность восстанавливающей системы, по-видимому, снижается из-за медленного взаимодействия боргидрида со спиртами [5].

### *Восстановление ацетатов метиловых эфиров метилгликозидов альдобиуроновых кислот*

Восстановление альдобиуроновых кислот в виде ацетатов метиловых эфиров метилгликозидов приводит к нейтральным дисахаридам; этот процесс представляет другой вариант метода восстановления, описанного в предыдущем разделе. В этом случае ацетатные группы, введенные для

обеспечения подходящей растворимости в сухих органических растворителях, подвергаются восстановлению до вторичных спиртовых групп параллельно с восстановлением карбометоксильной группы до первичной спиртовой.

Восстановление метилового эфира 2-O-(2,3,4-три-O-ацетил)- $\alpha$ -D-глюкопирануринозил-3,4-ди-O-ацетил- $\beta$ -метил-D-ксилопиранозид (IX) [15]



50 мг ацетата IX растворяют в 5 мл сухого тетрагидрофурана и постепенно прибавляют к суспензии 100 мг алюмогидрида лития в 5 мл тетрагидрофурана. Смесь кипятят с обратным холодильником 3 час, охлаждают и фильтруют, фильтрат подкисляют уксусной кислотой, упаривают в вакууме и получают в виде бесцветного сиропа 2-O-( $\alpha$ -D-глюкопиранозил)- $\beta$ -метил-D-ксилопиранозид (X), выход 20 мг.

## ЛИТЕРАТУРА

- Gaylord N. G., Reduction with Complex Metal Hydrides, Interscience Publishers Inc., New York, N.Y., 1956.
- Brown W. G., Org. Reactions, **6**, 469 (1951).
- Nystrom R. F., Brown W. G., J. Am. Chem. Soc., **69**, 1197 (1947).
- Kollonitsch R. F., Fuchs O., Gábor V., Nature, **173**, 125 (1954).
- Brown H. C., Mead E. J., Subba Rao B. C., J. Am. Chem. Soc., **77**, 6209 (1955).
- Kollonitsch J., Fuchs O., Gábor V., Nature, **175**, 346 (1955).
- Nystrom R. F., Chaikin S. W., Brown W. G., J. Am. Chem. Soc., **71**, 3245 (1949).
- Paul R., Joseph N., Bull. soc. chim. France, 550 (1952).
- Chaikin S. W., Brown W. G., J. Am. Chem. Soc., **71**, 122 (1949).
- Brown H. C., Subba Rao B. C., J. Am. Chem. Soc., **77**, 3164 (1955); **78**, 2582 (1956).
- Lythgoe B., Trippett S., J. Chem. Soc., **1950**, 1983.
- Abdel-Akher M., Smith F., Nature, **166**, 1037 (1950).
- Wolf from M. L., Wood H. B., J. Am. Chem. Soc., **73**, 2933 (1951).
- Klosterman H., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 5336 (1952).
- Montgomery R., Smith F., Srivastava H. C., J. Am. Chem. Soc., **78**, 6169 (1956).
- Abdel-Akher M., Hamilton J. K., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4691 (1951).
- Zill L. P., Khyrn J. X., Cheniae G. M., J. Am. Chem. Soc., **75**, 1339, (1953).
- MacDonald D. L., Fischer H. O. L., J. Am. Chem. Soc., **78**, 5025 (1956).
- Wolf from M. L., Anno K., J. Am. Chem. Soc., **74**, 5583 (1952).
- Frush H. L., Isbell H. S., J. Am. Chem. Soc., **78**, 2844 (1956).
- Ness R. K., Fletcher H. G., Jr., Hudson C. S., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4759 (1951).

22. Roseman S., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4467 (1952).
23. Sowden J. C., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4377 (1952).
24. Whelan W. J., Morgan K., Chem. and Ind. (London), 1449 (1955).
25. Peat S., Whelan W. J., Roberts J. G., J. Chem. Soc., **1956**, 2258.
26. Hough L., Woods B. M., Perry M. B., Chem. and Ind. (London), 1100 (1957).
27. Lindberg B., Theander O., Svensk Papperstidn., **57**, 83 (1954).
28. Bragg P. D., Hough L., J. Chem. Soc., **1957**, 4347.
- 28a. Ehrlich F., Guttmann R., Ber., **66**, 220 (1933); Morell S., Link K. P. J. Biol. Chem., **100**, 385 (1933); Jones J. K. N., Stacey M., J. Chem. Soc., **1947**, 1340.
29. Overend W. G., Shafizadeh F., Stacey M., J. Chem. Soc., **1951**, 1487.
30. Smith F., J. Chem. Soc., **1951**, 2646.
31. Aspinall G. O., Hirst E. L., Matheson N. K., J. Chem. Soc., **1956**, 989.
32. Whistler R. L., Conrad H. E., Hough L., J. Am. Chem. Soc., **76**, 1668 (1954).
33. Srivastava H. C., Adams G. A., J. Am. Chem. Soc., **81**, 2409 (1959).
34. Abdel-Akher M., Smith F., Priestersbach D., J. Chem. Soc., **1952**, 3637.
35. Jones J. K. N., Wise L. E., J. Chem. Soc., **1952**, 3389.
36. Adams G. A., Can. J. Chem., **30**, 698 (1952).
37. Adams G. A., Can. J. Chem., **32**, 186 (1954).

# Получение олигосахаридов

## Олигосахариды D-глюкозамина

Частичный гидролиз хитозана

*Дж. Дистлер, С. Роземан*

### ВВЕДЕНИЕ

Полностью ацетилированные олигосахариды, содержащие 2-амино-2-дезоксид-D-глюкозу (D-глюкозамин), например окта-O-ацетилхитобиозу, можно получить ацетилированием хитина [1]. В результате кислотного гидролиза хитина, последующего полного ацетилирования и фракционной кристаллизации полученных продуктов были выделены окта-O-ацетилхитобиоза и ундека-O-ацетилхитотриоза [2]. При омылении окта-O-ацетилхитобиозы раствором аммиака в метиловом спирте образуется пять веществ, среди них N,N-диацетилхитобиоза, которая была выделена при хроматографировании полученных веществ [3]. Серия олигосахаридов, содержащих N-ацетил-D-глюкозамин, была получена посредством N-ацетилирования продуктов частичного гидролиза хитозана с последующим хроматографированием, образовавшихся N-ацетилпроизводных на колонке со смесью угля и целита [4].

Олигосахариды D-глюкозамина, не содержащие ацетильных групп, можно получить при частичном гидролизе хитозана; их можно разделить с помощью ионообменной хроматографии [5]. Олигосахариды (хлоргидраты) еще не получены в кристаллическом виде, поэтому очень важно начинать с приготовления хитозана с низким содержанием ацетильных групп. Хитозан хорошего качества получают сплавлением очищенного хитина с едким кали в атмосфере азота [5, 6].

### МЕТОДИКА

Раствор 100 г очищенного хлоргидрата хитозана в 1 л воды добавляют к 18 л концентрированной соляной кислоты. Раствор помещают в две 20-литровые полиэтиленовые бутылки и герметично закрытые бутылки выдерживают 48 час при 50—55°. Полученный раствор частично гидролизованного хитозана упаривают в вакууме досуха, выделившееся стекловидное вещество янтарного цвета растворяют в 1200 мл воды и хроматографируют на колонке с ионообменной смолой.

С этой целью раствор пропускают через колонку, содержащую 6500 мл дауэкса 50 (H<sup>+</sup>, 200—400 меш), приготовленной по обычной методике [7]. Образец, адсорбированный на смоле, промывают 6 л воды, а затем колонку промывают 32 л 0,1 н. соляной кислоты, после чего проводят градиентное элюирование, помещая 16 л 0,3 н. соляной кислоты в резервуар-смеситель и 100 л 2,22 н. соляной кислоты в основной резервуар. Каждый час отбирают фракции объемом по 600—700 мл, их хранят при 5° не более 12 час.

Анализы фракций обычно можно выполнить, применяя модифицированную методику с антроном [5]. Аликвотные пробы фракций объемом 0,2 мл помещают в пирексовые пробирки и отгоняют соляную кислоту в вакууме над хлористым кальцием и натронной известью. К остатку добавляют последовательно 0,2 мл воды, 0,1 мл 1%-ного раствора нитрита натрия и 0,1 мл 20%-ной уксусной кислоты. Смесь периодически встряхивают в течение 10 мин, после чего добавляют 0,1 мл 6%-ного раствора сульфата аммония и дополнительно встряхивают еще 5 мин. Затем образцы помещают в баню со льдом и добавляют 1,2 мл раствора антрона (200 мг перекристаллизованного антрона в 100 мл концентрированной серной кислоты). Реакционные смеси в пробирках перемешивают, вращая пробирки, охлаждают до комнатной температуры в течение 10 мин, после чего измеряют оптическую плотность растворов при 580 мкм. Стандартные растворы хлоргидрата D-глюкозамина, содержащие от 15 до 150 γ, обрабатывают точно таким же образом, как и определяемые образцы.

Элюирование первым градиентом дает четыре главные фракции. Фракция 1, выходящая с 13—20 л элюата, содержит вещества, для которых молярное отношение азота к восстанавливающему сахару соответствует рассчитанному для глюкозамина. Как видно из таблицы, фракция 2 выходит с 34—45 л элюата, фракция 3 — с 50—60 л. Молярное отношение азота к восстанавливающему сахару для этих фракций соответствует ди- и трисахаридам. Для фракции 4, выходящей с 75—86 л элюата, это соотношение больше 4,0, и, следовательно, эта фракция может быть смесью высших олигосахаридов. С другой стороны, величины восстанавливающих эквивалентов олигосахаридов, таких, как тетрасахарид, могут отличаться от данных, полученных для глюкозамина, и теоретическое соотношение в этом случае не удастся получить.

Анализы веществ, выделенных из фракций

Фракции	$[\alpha]_D^{25}$ (с 1,0 в воде), град	N/гексозамин *, моль/моль	N/феррицианидный эквивалент **, моль/моль
2	+43,5	2,00	2,13
3	+21,5	2,92	3,00
4	+16	4,30	3,96

\* Определение гексозамина было проведено на негидролизированных образцах по модифицированной методике Ольсона—Моргана. Указанная методика приложена в работе [8], при определении гексозамина опущена стадия хроматографирования на ионообменной смоле.

\*\* Восстанавливающая способность по феррицианидному методу [9] для D-глюкозамина принята в качестве стандарта. До определения восстанавливающего сахара образцы не были гидролизваны.

К каждой из указанных фракций добавляют избыток карбоната свинца, доводя pH раствора до 4—5. Смесь фильтруют, фильтрат обрабатывают сероводородом, снова фильтруют и удаляют избыток сероводорода, пропуская через раствор ток азота. К полученному раствору добавляют 6 мл концентрированной соляной кислоты и упаривают в вакууме до получения вязкого желтого сиропа.

Для дальнейшей очистки сахаров используют их растворимость в абсолютном этиловом и метиловом спиртах. Сироп, полученный из фракции 2, дважды экстрагируют (2 × 625 мл) абсолютным спиртом при

энергичном встряхивании в течение 4 час с последующим центрифугированием. Обе надосадочные жидкости смешивают и добавляют 3 объема ацетона. При этом образуется студнеобразный осадок; его промывают центрифугированием вначале со смесью ацетона и этилового спирта (3 : 1), а затем с ацетоном. Осадок высушивают в вакуум-эксикаторе и получают белый гигроскопичный порошок, выход 10,8 г. Под действием влаги вещество становится желтым, но его можно очистить переосаждением из спирта. Хлоргидрат хитобиозы, полученный по этому способу, при хроматографировании на бумаге дает одно пятно при проявлении смесью *n*-бутанол — пиридин — вода, взятых в объемном соотношении 6 : 4 : 3,  $R_{\text{глюкозамин} \cdot \text{HCl}}$  0,64.

Сироп, полученный из фракции 3, очищают подобным же способом. Дважды экстрагируют абсолютным спиртом ( $2 \times 200$  мл), надосадочную жидкость обрабатывают тремя объемами ацетона, осадок промывают и сушат, как описано для хитобиозы. Выход 8,2 г, вещество имеет вид бледно-желтого порошка. Хроматографирование на бумаге в той же системе растворителей дает одно пятно,  $R_{\text{глюкозамин} \cdot \text{HCl}}$  0,29.

Вещество, содержащееся во фракции 4, плохо растворяется в этиловом спирте, но оно растворимо в метиловом спирте, поэтому в данном случае в описанной выше методике этиловый спирт заменяют метиловым. После обработки по указанной методике получают 1,1 г белого гигроскопичного порошка. Хроматографирование на бумаге дает одно пятно на старте. Величины оптического вращения и анализы веществ, содержащихся во фракции, представлены в таблице (см. стр. 241).

## ПРОИЗВОДНЫЕ

Хитобиозу можно идентифицировать в виде кристаллического *N,N*-диацетильного производного. К смеси 500 мг хлоргидрата хитобиозы, 15 мл дауэкса 1 (бикарбонатная форма, 20—50 меш), 1,5 мл метилового спирта и 15 мл воды, помещенной в баню со льдом, при перемешивании добавляют 0,25 мл уксусного ангидрида [10]. Перемешивают еще 90 мин, затем фильтруют и фильтрат пропускают через колонку с 20 мл дауэкса 50 ( $\text{H}^+$ , 200—400 меш). Элюат и промывные воды объединяют, упаривают в вакууме досуха и добавляют 2 мл этилового спирта, чтобы вызвать кристаллизацию. Выделившиеся кристаллы промывают небольшим количеством абсолютного этилового спирта; выход сухих кристаллов составляет 0,42 г. Вещество можно перекристаллизовать с выходом 62%. Его растворяют в 1 мл воды, добавляют 5 мл этилового спирта, нагревают до кипения и добавляют 20 мл кипящего диметилцеллозольва. Вещество легко кристаллизуется; т. пл. 251,5—252,5°,  $[\alpha]_D^{25} +17^\circ$  (при равновесии, с 1,0 в воде). При *N*-ацетилировании хитотриозы и хитотетраозы по этой методике кристаллические производные получены не были. Выделенные аморфные продукты после промывки метиловым спиртом и высушивания имеют следующие характеристики:  $[\alpha]_D^{25} +0,5^\circ$  (с 1 в воде) для трисахарида и  $[\alpha]_D^{25} -5^\circ$  (с 1 в воде) для тетрасахарида.

При исчерпывающем ацетилировании образуются кристаллические производные и хитобиозы и хитотриозы. Смесь 500 мг хлоргидрата хитобиозы, 3,5 мл пиридина и 2,3 мл уксусного ангидрида встряхивают в течение 2 дней при 4°. Полученный коричневатый раствор выливают в 12,5 мл воды со льдом и оставляют на 12 час при 4°; в результате получают 350 мг слегка окрашенного в бурый цвет кристаллического вещества, которое можно перекристаллизовать из метилового спирта. Выход при

перекристаллизации 50%, т. пл. 296,5°,  $[\alpha]_D^{25} +55,5^\circ$  (с 1 в уксусной кислоте). Из 500 мг хлоргидрата хитотриозы после исчерпывающего ацетилирования по приведенной выше методике выделяют 300 мг вещества, температура плавления которого после перекристаллизации из метилового спирта 305—306°,  $[\alpha]_D^{25} +32^\circ$  (с 0,5 в уксусной кислоте).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bergmann M., Silberkweit E., Naturwiss., **19**, 20 (1931); Ber., **64**, 2436 (1931).
2. Zechmeister L., Tóth G., Ber., **64**, 2028 (1931).
3. Zilliken F., Braun G. A., Rose C. S., György P., J. Am. Chem. Soc., **77**, 1296 (1955).
4. Barker S. A., Foster A. B., Stacey M., Webber J. M., Chem. and Ind. (London), 208 (1957); J. Chem. Soc., 1958, 2218.
5. Horowitz S. T., Roseman S., Blumenthal H. J., J. Am. Chem. Soc., **79**, 5046 (1957).
6. Jeanloz R., Forchielli E., Helv. Chim. Acta, **33**, 1690 (1950).
7. Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., **192**, 663 (1951).
8. Roseman S., Daffner I., Anal. Chem., **28**, 1743 (1956).
9. Park J. T., Johnson M. J., J. Biol. Chem., **181**, 149 (1949).
10. Roseman S., Ludowieg J., J. Am. Chem. Soc., **76**, 301 (1954).

## $\alpha$ -Ламинарибиоза

### Гидролиз ламинарана

*В. Барри, Дж. Маккормик*

### ВВЕДЕНИЕ

Ламинарибиоза, 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-D-глюкоза, была впервые выделена в виде аморфного порошка и в одном случае в виде кристаллического дигидрата при частичном гидролизе ламинарана 1 н. щавелевой кислотой [1]. Позднее то же вещество было получено при гидролизе в аналогичных условиях с последующим разделением полученных сахаров на целлюлозной [2] или угольно-целитовой колонке [3]. Недавно для гидролиза была применена разбавленная серная кислота [4, 5]. Описываемый ниже метод в основном разработан Блеком и сотр. [4].

Другие два метода синтеза ламинарибиозы см. [3, 6].

### МЕТОДИКА

Выделенный из *Laminaria cloustoni* нерастворимый ламинаран (10,2 г, влажность 14,3%), нагревают 5 час в 1200 мл 0,25 н. серной кислоты с обратным холодильником на кипящей водяной бане. Полученный раствор быстро охлаждают до комнатной температуры, добавляя лед, и нейтрализуют, переменявая 2 час с 300 мл амберлита IR-4В (ОН<sup>-</sup>). Смола отфильтровывают, тщательно промывают водой, фильтрат и промывные воды объединяют и упаривают в вакууме при 40—50° приблизительно до 40 мл. Затем раствор переносят на колонку (25,5 × 3 см)

со смесью угля и целита [7] (см. также стр. 13), приготовленную следующим образом.

Однородную смесь равных по весу частей активированного угля и целита 535 промывают водой (1500 мл на 50 г) и в виде суспензии небольшими порциями переносят в стеклянную колонку, нижний конец которой плотно заткнут ватой. В промежутках между добавлением отдельных порций угольно-целитовой смеси дают отстояться, но отсасывание не применяют.

Через колонку пропускают гидролизат и затем при слабом отсасывании последовательно 1350 мл воды и 300 мл 7,5%-ного (по объему) водного спирта, собирая фракции по 150 мл. Пробу каждой фракции хроматографируют на бумаге ватман № 1, используя в качестве растворителя смесь *n*-бутанол — пиридин — вода — бензол (5 : 3 : 3 : 1 по объему, верхний слой) и анилинфталат [8, 9] в качестве проявителя. В случае необходимости каждый образец исследуют по методу тонкослойной хроматографии.

Элюированная водой фракция 1 содержит, как это установлено, главным образом D-глюкозу со следами ламинарибиозы ( $R_g$  0,77) и вещество с  $R_g$  0,48. Фракция 2 состоит в основном из ламинарибиозы и некоторого количества D-глюкозы и содержит следы вещества с  $R_g$  0,48. Фракции 3—9, элюированные водой, и фракции 10—11, элюированные 7,5%-ным водным спиртом, состоят из ламинарибиозы и вещества с  $R_g$  0,48. Фракции 3—11 объединяют, упаривают в вакууме при 40—50° до небольшого объема и проводят повторное хроматографирование полученного раствора на свежей угольно-целитовой колонке (9 × 3 см). Как и при первом хроматографировании, колонку промывают водой, а затем 7,5%-ным водным спиртом и отбирают фракции по 50 мл каждая. Во всех фракциях, кроме двух, обнаружена чистая ламинарибиоза.

Фракцию 2 из первой колонки также концентрируют и хроматографируют на свежей колонке (15 × 1,5 см). После элюирования смеси D-глюкозы, ламинарибиозы и вещества с  $R_g$  0,48 получают чистую ламинарибиозу. Загрязненную фракцию можно снова подвергнуть хроматографированию и дополнительно выделить чистый дисахарид.

Все фракции, содержащие только ламинарибиозу, соединяют и упаривают в вакууме до образования стекловидного остатка. Последний растворяют в 80%-ном (по объему) водном метиловом спирте и фильтруют; фильтрат упаривают досуха, как описано выше. Полученный осадок затвердевает после добавления этилового спирта и последующего упаривания; его сушат при остаточном давлении 18 мм над пятиокисью фосфора, выход 1,2 г. Безводная  $\alpha$ -ламинарибиоза медленно кристаллизуется из концентрированного раствора в метиловом спирте при выдерживании в холодильнике; т. пл. 200—202°. Повторная кристаллизация повышает т. пл. до 202—205°;  $[\alpha]_D^{25} + 24^\circ$  (20 мин)  $\rightarrow +18^\circ$  (в равновесии. с 2 в воде).

### ПРОИЗВОДНОЕ

Ламинарибиоза дает красивый кристаллический октаацетат [3]. Дисахарид (762 мг) нагревают 1,5 час на кипящей водяной бане с 373 мг порошкообразного ацетата натрия и 4,32 мл уксусного ангидрида. Полученный раствор охлаждают, добавляют 22 мл воды и образовавшееся масло отделяют от надосадочной жидкости. Масло очень медленно затвердевает после растирания с холодной водой и выдержки в холодильнике. Смесью фильтруют, осадок промывают водой и сушат при остаточном



давления 18 мм над пятиокисью фосфора; выход 918 мг. Для перекристаллизации вещество растворяют в небольшом объеме метилового спирта и добавляют избыток эфира, из охлажденного раствора осаждаются бесцветные иглы окта-О-ацетил- $\beta$ -ламинарибиозы; т. пл. 157—159°,  $[\alpha]_D^{25}$ —27° (с 1,9 в хлороформе). Повторная перекристаллизация из этилового спирта не изменяет эти константы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Barry V. C., Sci. Proc. Roy. Dublin Soc., **22**, 423 (1941).
2. Connell J. J., Hirst E. L., Percival E. G. V., J. Chem. Soc., **1950**, 3494.
3. Bächli P., Percival E. G. V., J. Chem. Soc., **1952**, 1243.
4. Black W. A. P., Dewar E. T., Woodward F. N., J. Sci. Food Agr., **12**, 754 (1955).
5. Peat S., Whelan W. J., Lawley H. G., J. Chem. Soc., **1958**, 724.
6. Freudenberg K., Oertzen K., von, Ann., **574**, 37 (1951).
7. Whistler R. L., Durso D. F., J. Am. Chem. Soc., **72**, 677 (1950).
8. Partridge S. M., Nature, **164**, 443 (1949).
9. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 21.

## Мальтотриоза

### Обработка амилозы амилазой слюны

Дж. Г. Пауэр

### ВВЕДЕНИЕ

Опубликованы методы получения мальтотриозы, О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1  $\rightarrow$  4)-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1  $\rightarrow$  4)-D-глюкозы, основанные на ферментативном гидролизе крахмала [1], обработке мальтогептаозы  $\beta$ -амилазой [2], кислотном гидролизе крахмала [3], амилопектина [4] или амилозы [6]. Так как амилоза представляет собой легко доступный линейный  $\alpha$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-полимер глюкозы, который при гидролизе под действием амилазы слюны превращается в мальтозу и мальтотриозу, то она является идеальным исходным материалом для получения мальтотриозы. Реакционная смесь, полученная по этому методу, не содержит сложных олигосахаридов с  $\alpha$ -D-(1  $\rightarrow$  4)- или  $\alpha$ -D-(1  $\rightarrow$  6)-связями, как это имеет место при применении некоторых других методов. Мальтоза, образующаяся из амилозы под действием амилазы слюны, удаляется ферментацией пекарскими дрожжами. Из полученного раствора мальтотриозу выделяют адсорбированием на активном угле с последующим элюированием водным спиртом. Спиртовой раствор упаривают в вакууме до сиропа. Сироп высушивают в эксикаторе и получают аморфный продукт. При хроматографировании раствора препарата на бумаге было получено одно пятно восстанавливающего сахара, соответствующее положению трисахарида в ряду мальтоолигосахаридов.

## МЕТОДИКА

60 г обезжиренного крахмала растворяют в 4 л кипящей воды и перемешивают 24 час с 500 мл *n*-бутанола [7]. Кристаллический комплекс амилозы с бутанолом отделяют от раствора в центрифуге Шарплеса, растворяют в 1 л воды и кипятят до удаления кристаллизационного растворителя. Охлажденный раствор доводят до объема 1 л и смешивают с 10 мл профильтрованной слюны человека. Амилолитическая активность смеси будут мальтоза и мальтотриоза. После этого фермент дезактивируют нагреванием и субстрат исследуют хроматографированием на бумаге на присутствие в смеси мальтозы и мальтотриозы. Затем добавляют водную суспензию 80 г пекарских дрожжей и в течение 6 час ведут ферментацию. Смесь снова нагревают до кипения, дрожжи удаляют центрифугированием и прозрачный фильтрат концентрируют приблизительно до 100 мл.

Качественное хроматографирование концентрированного раствора показывает, что он содержит одно восстановленное соединение. Этот раствор перемешивают 2 час с 50 г активированного угля дарко G-60 и 25 г целита. Суспензию фильтруют с отсасыванием и осадок дважды промывают водой порциями по 100 мл. Затем мальтотриозу извлекают 15%-ным спиртом до тех пор, пока конечный объем не составит 1 л. Элюат упаривают в вакууме до образования сиропа и высушивают в вакуум-эксикаторе. Продукт суспендируют в ацетоне, собирают на фильтре, тщательно промывают *n*-бутанолом и оставляют в эксикаторе. Выход ~ 3 г из 60 г крахмала,  $[\alpha]_D^{25}$   $-158^\circ$  (с 2 в воде). При хроматографировании на бумаге в нескольких системах растворителей продукт дает одно пятно.

## ПРОИЗВОДНЫЕ

Мальтотриозу можно охарактеризовать как  $\beta$ -ундекаацетат [8] или как 1-фенилфлавазол [9, 10]. Ацетилирование смесью уксусного ангидрида с ацетатом натрия [11] более приемлемо для получения  $\beta$ -ундекаацетатного производного с т. пл.  $135^\circ$ . 1-Фенилфлавазол получают следующим образом. 0,1 г трисахарида растворяют в 5 мл воды и смешивают с 0,05 г *o*-фенилендиамина, 0,2 г хлоргидрата фенилгидразина и 0,1 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь кипятят с обратным холодильником в течение 5 час. Желтый кристаллический осадок 1-фенилфлавазола мальтотриозы, который образуется при охлаждении, собирают на фильтре и кристаллизуют из 3 мл горячего *n*-пропанола, т. пл.  $248^\circ$  (с разл.). Для идентификации флавазола используют также рентгеноструктурный анализ.

## ЛИТЕРАТУРА

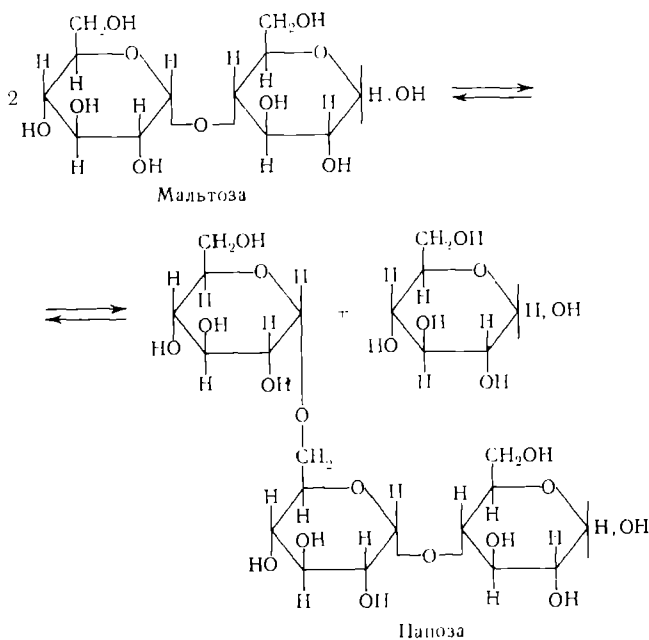
1. Sugihara J. M., Wolf from M. L., J. Am. Chem. Soc., **71**, 3357 (1949).
2. French D., Levine M. L., Pazur J. H., Norberg E., J. Am. Chem. Soc., **72**, 1746 (1950).
3. Whistler R. L., Hickson J. L., Anal. Chem., **27**, 1514 (1955).
4. Wolf from M. L., Tyree J. T., Galkowski T. T., O'Neill A. N., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4927 (1951).
5. Whelan W. J., Bailey J. M., Roberts P. J. P., J. Chem. Soc., **1953**, 1293.

6. Pazur J. H., J. Biol. Chem., **205**, 75 (1953).
7. Schoch T. J., Cereal Chem., **18**, 121 (1941); Wilson E. J., Jr., Schoch T. J., Hudson C. S., *ibid.*, **65**, 1380 (1943).
8. Wolfrom M. L., Georges L. W., Thompson A., Miller I. L., J. Am. Chem. Soc., **71**, 2873 (1949).
9. Pazur J. H., Am. Chem. Soc., **77**, 1015 (1955).
10. Neumüller G., Arkiv Kemi, Mineral. Geol., **A21**, No. 19 (1946).
11. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. 11.

## α-Паноза

Ферментативное трансгликозилирование мальтозы

*С. Пан*



## ВВЕДЕНИЕ

Как видно из приведенного уравнения, панозу, О-α-D-глюкопиранозил-(1 → 6)-О-α-D-глюкопиранозил-(1 → 4)-D-глюкопиранозу [1—3], можно получить при трансгликозилировании мальтозы [4—9] под действием некоторых ферментов, выделяемых, например, из культуральной жидкости *Aspergillus niger*. Панозу можно легко выделить из реакционной смеси после удаления ферментируемых сахаров и очистить осаждением основным ацетатом свинца и обработкой ионообменной смолой. Этот трисахарид легко кристаллизуется в виде α-D-аномера, кристаллы которого диморфны. Панозу можно также выделить с малым выходом из кислотных гидролизатов амилопектина [10], гликогена бычьей печени [11] и гликогена дрожжей [12].

## МЕТОДИКА

*Фермент*

Культура *Aspergillus niger* NRRL 337 готовится в среде, содержащей следующие ингредиенты (в расчете на 1 л): кукурузная мука 20 г, сульфат аммония 2 г, однозамещенный фосфат калия 1 г, сульфат магния 0,5 г, сульфат железа 0,01 г и карбонат кальция 5 г. Стерилизованную среду (по 100 мл в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл) прививают спорами плесени, которая выращивалась в течение 1 недели на косом агаре в среде Чапека [13]. Колбы с привитой культурой встряхивают на аппарате для встряхивания, дающем 100 циклов в 1 мин при размахе 5 см, в течение 64 час при температуре 30°, пока в колбах в избыточном количестве не появятся мицеллы.

Продажные препараты амилазы, по-видимому, обладают некоторой трансгликозилирующей активностью [6]. Их можно применять вместо описанной выше культуры грибка: 5—10 мг препарата фермента вместо 1 мл культуры грибка.

*Ферментативный синтез*

Культуру грибка отфильтровывают и 50 мл фильтрата смешивают с 100 мл раствора, содержащего 15 г мальтозы и 15 мл буферного раствора Мак-Ильвейна с pH 4,5 [14]. Продажную мальтозу предварительно перекристаллизовывают из водного метанола по методике, описанной ниже для панозы. Добавляют несколько капель толуола и смесь выдерживают 72 час при 50°. Высокая температура инкубации, например 50°, способствует уменьшению бактериальных загрязнений и более быстрому превращению. Процесс трансгликозирования контролируют с помощью хроматографии на бумаге в системе *n*-бутанол — пиридин — вода, взятых в соотношении 6 : 4 : 3 (по объему) [15]. Восстанавливающие сахара обнаруживают проявляющим реагентом, содержащим 0,5 г 3,5-динитросалицилата натрия и 4,5 г едкого натра в 100 мл воды, с последующим нагреванием сухой полоски бумаги в течение 10 мин при 100°. Интенсивность пятна мальтозы падает приблизительно до одной трети ее первоначальной величины через 72 час, в то время как интенсивность пятен D-глюкозы и пятна панозы (подвижность последнего приблизительно вдвое меньше подвижности пятна мальтозы) почти достигает интенсивности пятна мальтозы. Ферментативную реакцию прерывают, нагревая реакционную смесь 10 мин на кипящей водяной бане. Очень важно остановить реакцию на желаемой стадии, так как длительная инкубация приводит к гидролизу панозы и, следовательно, к низкому ее выходу.

Реакционную смесь разбавляют 400 мл воды и 50 мл буферного раствора Мак-Ильвейна с pH 4,5 и добавляют 30 г свежих пекарских дрожжей [16]. Смесь инкубируют 4—6 час при 30°, периодически перемешивая. Прекращение выделения газа при перемешивании может служить признаком завершения ферментации D-глюкозы и мальтозы. Удалить D-глюкозу и мальтозу можно также ферментацией чистой культурой пекарских дрожжей [1] или хроматографированием на угле по Уистлеру и Дерсо [11, 17].

Чтобы удалить дрожжи, смесь центрифугируют. К прозрачной надосадочной жидкости добавляют порциями по 1 мл 10%-ный раствор основного ацетата свинца до тех пор, пока при добавлении реагента

перестанет выпадать осадок. Осадок отфильтровывают и фильтрат для удаления солей, загрязняющих образец, пропускают через амберлит IR-100 ( $H^+$ ) и IR-4B ( $OH^-$ ). Количества смол должны быть равны удвоенному количеству солей, введенных с буферными растворами; в качестве колонки обычно можно использовать цилиндрическую делительную воронку. Отсутствие свинца в растворе после очистки ионообменной смолой проверяют пробой с серной кислотой; нейтральность раствора после пропускания через анионообменную смолу свидетельствует о полном удалении солей.

Раствор и промывные воды соединяют и упаривают в вакууме до сиропа (приблизительно до 6—8 мл) и добавляют при постоянном перемешивании метанол в количестве, в 4 раза большем, чем объем сиропа. Осадок, который при этом образуется, можно растворить, прибавляя по каплям воду; следы помутнения исчезают при центрифугировании или фильтровании через пористый стеклянный фильтр. Паноза кристаллизуется легко, если водно-метанольный раствор выдерживают при комнатной температуре в закрытом сосуде. Введение затравки способствует кристаллизации, и в этом случае для полной кристаллизации требуется 3—5 дней. Кристаллы собирают на фильтре из пористого стекла, промывают 80%-ным метанолом и сушат; выход ~3—3,5 г.

Для перекристаллизации на растворение и последующее осаждение каждого грамма панозы берут соответственно 1,2 мл воды и 5 мл метанола. Раствор осветляют центрифугированием и оставляют при комнатной температуре для кристаллизации. Кристаллизацию повторяют; конечный выход 49%, ~70% для каждой перекристаллизации.

Температура плавления дважды перекристаллизованной  $\alpha$ -панозы  $220^\circ$  (с разл.),  $[\alpha]_D^{25} +160^\circ \rightarrow +151^\circ$  (140 мин, с 3,8 в воде). Кристаллы  $\alpha$ -панозы диморфны, обе модификации можно охарактеризовать по данным рентгеноструктурного анализа [11]; по температурам плавления их различить невозможно, так как они плавятся с разложением.

### ПРОИЗВОДНОЕ

Кристаллическое производное панозы можно легко получить в виде додекаацетата соответствующего спирта панита [3]. Раствор 1 г панозы в 10 мл воды, в которой суспендировано 0,4 г никелевого катализатора Ренея, 12 час перемешивают при  $80^\circ$ , пропуская через него водород под давлением 130 атм при температуре  $80^\circ$ . Раствор фильтруют и упаривают в вакууме до образования сиропа. Затем остаток сушат: добавляют абсолютный спирт и затем отгоняют его в вакууме. Полученное аморфное вещество обрабатывают примерно 15 мин 0,4 г безводного ацетата натрия и 5 мл уксусного ангидрида при температуре немного ниже температуры кипения до образования прозрачного раствора. Уксусный ангидрид полностью гидролизуют, добавляя 60 мл льда и воды, и кристаллизуют ацетат. Перекристаллизацию производят из абсолютного спирта; выход ~1,2 г, т. пл.  $148,5-150^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{25} +120^\circ$  (с 4,0 в хлороформе).

### ЛИТЕРАТУРА

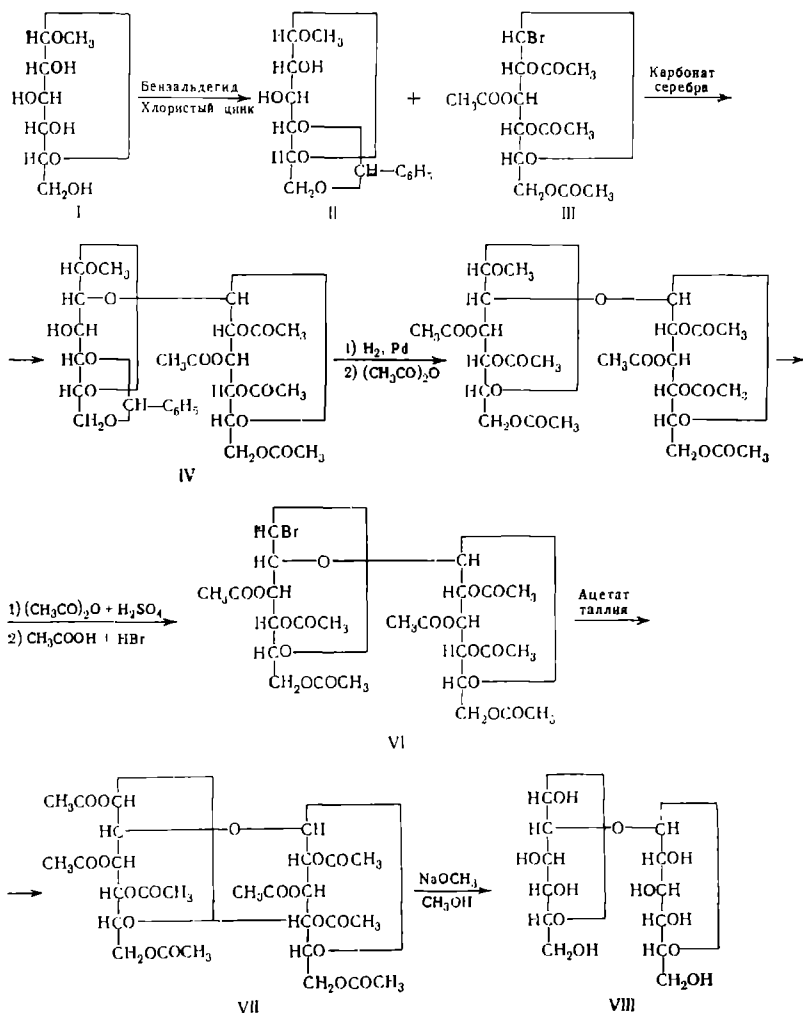
1. Pan S. C., Nicholson L. W., Kolachov P., J. Am. Chem. Soc., 73, 254 (1951).
2. French D., Science, 113, 352 (1951).

3. Wolf from M. L., Thompson A., Galkowski T. T., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4093 (1951).
4. Pan S. C., Andreasen A. A., Kolachov P., Science, **112**, 115 (1950).
5. Pan S. C., Nicholson L. W., Kolachov P., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 406 (1953).
6. Pan S. C., Nicholson L. W., Kolachov P., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 421 (1953).
7. Pazur J. H., French D., J. Biol. Chem., **196**, 265 (1952).
8. Edelman J., Advances in Enzymol., **17**, 189 (1956).
9. Okazaki H., Arch. Biochem. Biophys., **63**, 322 (1956).
10. Thompson A., Wolf from M. L., J. Am. Chem. Soc., **73**, 5489 (1951).
11. Wolf from M. L., Thompson A., J. Am. Chem. Soc., **79**, 4212 (1957).
12. Peat S., Whelan W. J., Edwards T. E., J. Chem. Soc., 1955, 355.
13. Thom C., Raper K. B., A Manual of Aspergilli, Williams and Wilkins, Baltimore, Md., 1945, p. 32.
14. Hodgman C. D., Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio, 33rd Ed., 1951, p. 1489.
15. Jeanes A., Wise C. S., Dimler R. J., Anal. Chem., **25**, 415 (1953).
16. Pan S. C., Nicholson L. W., Kolachov P., Anal. Chem., **25**, 231 (1953).
17. Whistler R. L., Durso D. F., J. Am. Chem. Soc., **72**, 677 (1950).

## Софороза

Синтез Кенигса — Кнорра

О. Т. Шмит



## ВВЕДЕНИЕ

Рабатэ и Дасси [1] установили, что плоды *Sophora japonica* L. вместе с другими гликозидами содержат гликозид кемиферола, 5,7,4'-триокси-флавонола. Этот гликозид был гидролизован разбавленной кислотой в кемпферол и дисахарид, состоящий из остатков D-глюкозы. Дисахарид, который с фенилгидразином образует только фенилозазон D-глюкозы, а не фенилозазон дисахарида, был принят Рабатэ [2] за 2-O-β-D-глюкопиранозид-D-глюкозу (VIII). Четырьмя годами ранее софороза была синте-

зированной Фриденбергом и сотр. [3]<sup>1</sup>. Сравнение синтетического и природного продуктов [4] показало, что предположение Рабатэ правильно. Выделение софорозы из *Sophora japonica* L. см. [6].

## МЕТОДИКА

### **4,6-О-Бензилиден- $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид (II) [5]**

28 г сухого  $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид [4], 21 г тонко измельченного безводного хлористого цинка и 70 мл бензальдегида встряхивают в течение 3 час. Реакционную смесь промывают последовательно холодной водой и петролейным эфиром и перекристаллизовывают из горячей воды. Выход 23 г, т. пл. 161—162°,  $[\alpha]_D^{+85} + 85^\circ$  (с 0,4 в воде) [8].

### **2-О-(2,3,4,6-Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид (IV) [7]**

27 г 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромид (III), 20 г II и 20 г сухого карбоната серебра встряхивают в 160 мл чистого хлороформа в течение ночи. После того как проба на ионы брома будет отрицательна, смесь фильтруют и раствор упаривают в вакууме. Остаток экстрагируют горячей водой для удаления 4,6-О-бензилиден- $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкозида и тетраацетата  $\beta$ -глюкозы. Вязкий остаток кристаллизуется в метаноле в виде тонких игл. Выход 4,7 г, т. пл. 232°,  $[\alpha]_D^{+47} + 47^\circ$  (в хлороформе).

### **2-О-(2,3,4,6-Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-3,4,6-три-О-ацетил- $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид (V) [3]**

2 г угля суспендируют в воде, пропускают через суспензию ток водорода и обрабатывают раствором 0,5 г хлористого палладия. После того как поглощение водорода прекратится, катализатор отфильтровывают с отсасыванием и высушивают над едким кали при нормальном давлении. Бензилиденное производное IV (12 г) суспендируют в 180 мл метанола и к суспензии добавляют катализатор в атмосфере двуокиси углерода. Примерно через 24 час продукт растворяется, причем за это время поглощается около 2 молей водорода. Смесь фильтруют и фильтрат упаривают в вакууме. Остаток обрабатывают 5 частями пиридина и 3 частями уксусного ангидрида 2 дня при 20° и затем 2 час при 60°. Раствор упаривают в вакууме, остаток высушивают и растворяют в 5 частях метанола, обрабатывают углем и кристаллизуют, осторожно прибавляя воду. Полученные кристаллы имеют иглообразную форму; выход 10,5 г, т. пл. 132°,  $[\alpha]_D^{+50} + 50^\circ$  (в хлороформе).

### **2-О-(2,3,4,6-Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-3,4,6-три-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромид (VI) [3]**

Раствор 8,5 г гептаацетата (V) в 16 мл хлороформа обрабатывают 16 мл уксусного ангидрида и 16 мл смеси уксусного ангидрида и серной

<sup>1</sup> В то время как этот том находился в печати, опубликована методика более простого приготовления софорозы [5].



кислоты (1 : 1 по объему), приготовленной при  $-15^{\circ}$ . Через полчаса реакционную смесь выливают в воду со льдом и осадок растворяют в хлороформе. Раствор сушат, испаряют хлороформ, остаток (7 г) растирают с 16 мл раствора бромистого водорода в уксусной кислоте и выдерживают 3 час при  $0^{\circ}$ . Бромид, кристаллизующийся из прозрачного раствора, помещают в воду со льдом и тщательно промывают, выход 6,0 г. Бромид гептаацетата дисахарида VI перекристаллизовывают из 50 частей этилацетата и получают иглы с т. пл.  $194^{\circ}$  (с разл.),  $[\alpha]_D^{20} +96^{\circ}$  (в хлороформе).

### Октаацетат $\beta$ -софорозы (VII) [3]

5 г неочищенного бромида VI растворяют в 50 мл уксусной кислоты и обрабатывают 2 г ацетата таллия в течение 2 час при  $100^{\circ}$ . Бромистый таллий отфильтровывают и из фильтрата осаждают ацетат, добавляя 500 мл воды. Ацетат кристаллизуют из спирта; выход 3,8 г, т. пл.  $192^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{20} -4^{\circ}$  (в хлороформе) [4].

### Софороза (VIII) [3]

К холодному раствору 10 г октаацетата VII в 25 мл хлороформа добавляют при встряхивании холодный раствор 0,5 г натрия в 25 мл метанола. Смесь, которая становится густой, ставят на 15 мин в лед, обрабатывают 25 мл воды со льдом и хлороформный слой отделяют. Водный раствор нейтрализуют уксусной кислотой и упаривают в вакууме. Остаток растворяют в 1—2 мл горячей воды, добавляют 13 мл 90%-ного спирта, нагревают, фильтруют и помещают раствор в холодильник. При этом из раствора кристаллизуется моногидрат 2-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил- $\alpha$ -D-глюкозы. Кристаллизацию повторяют и получают бесцветные иглы с т. пл.  $180^{\circ}$ . После высушивания в вакууме при  $80^{\circ}$  они теряют 1 моль воды; безводное соединение имеет т. пл.  $198^{\circ}$  (с разл.) [4],  $[\alpha]_D^{20} +34,5^{\circ}$  (начальная)  $\rightarrow +20^{\circ}$  (конечная, 20 час; с 4 в воде).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rabaté J., Dussy J., Bull. soc. chim. biol., **20**, 459, 467 (1938).
2. Rabaté J., Bull. soc. chim. France, [5] **7**, 565 (1940).
3. Freudenberg K., Soff K., Ber., **69**, 1245 (1936).
4. Freudenberg K., Knauber H., Cramer F., Chem. Ber., **84**, 144 (1951).
5. Coxon B., Fletcher H. G., Jr., J. Org. Chem., **26**, 2892 (1961).
6. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 345.
7. Freudenberg K., Toeppfer H., Andersen C. C., Ber., **61**, 1750 (1928).
8. Ekenstein W. A., van, Blankema J. J., Rec. trav. chim., **25**, 153 (1906).

## **$\beta,\beta$ -Трегалоза**

### **( $\beta$ -D-глюкопиранозил- $\beta$ -D-глюкопиранозид)**

#### ***Синтез Кенигса — Кнорра***

**И. З. Аллен**

#### **ВВЕДЕНИЕ**

$\beta,\beta$ -Трегалоза ( $\beta$ -D-глюкопиранозил- $\beta$ -D-глюкопиранозид) была синтезирована в виде октаацетата с выходом 8—31% конденсацией 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромидом с 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкозой [1—4]. Октаацетат был также получен перегонкой 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкозы с бисульфатом калия при 140° [2]. Кроме того,  $\beta,\beta$ -трегалоза была найдена в относительно малых количествах среди продуктов кислотной реверсии D-глюкозы [5] и в смеси дисахаридов, полученных действием эмульсина миндаля на D-глюкозу [6]. Метод синтеза  $\beta,\beta$ -трегалозы, описанный ниже, разработан Гельферихом и Вейсом [3]. Общий выход свободного сахара, считая на тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромид, согласно данным этих авторов, составляет 25%.

#### **МЕТОДИКА**

#### ***2,3,4,6-Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкоза [1, 7]***

Раствор 82,2 г 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромидом [8] в 125 мл безводного ацетона, высушенного хлористым кальцием, помещают в колбу емкостью 250 мл, охлаждают до 0° в бане со льдом и добавляют 2,3 мл воды. К охлажденному раствору при энергичном перемешивании с помощью механической мешалки добавляют небольшими порциями в течение 15 мин 46,5 г карбоната серебра. Энергичное перемешивание продолжают еще 30 мин, до тех пор пока не прекратится выделение двуокиси углерода. Затем смесь подогревают до 50—60° и фильтруют через пористый стеклянный фильтр. Соли серебра промывают 65 мл сухого ацетона, переносят с фильтра в колбу, нагревают с 65 мл ацетона и снова фильтруют и промывают на фильтре. Растворы соединяют вместе в колбе емкостью 500 мл и упаривают в вакууме при комнатной температуре. Если при упаривании применяют капилляр, то его нужно соединить с осушительной трубкой. Когда из раствора выпадут обильные кристаллы, испарение прекращают и смесь подогревают до полного растворения кристаллов. Ацетоновый раствор переносят в стакан емкостью 600 мл и добавляют равный объем абсолютного эфира, а затем — равный объем петролейного эфира. Раствор охлаждают в охлаждающей смеси, осторожно перемешивая, и выдерживают в бане со льдом еще 10 мин, после того как образуются кристаллы, чтобы обеспечить полную кристаллизацию. Кристаллы отфильтровывают и высушивают на воздухе; выход 52—56 г (75—80%), т. пл. 132—134°.

#### ***Октаацетат $\beta,\beta$ -трегалозы [3]***

В 250-миллилитровой колбе, снабженной осушительной трубкой и мешалкой, растворяют 17,4 г (0,05 моля) высушенной над пятиокисью фосфора 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкозы в 60 мл абсолютного нитро-

метана и затем добавляют 20,5 г (0,05 моля) тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромид и 12,5 г (0,05 моля) цианистой ртути. Реакционную смесь перемешивают 8 час с помощью механической мешалки, снабженной ртутным или масляным затвором, с тем чтобы исключить возможность попадания влаги; при этом следует иметь в виду, что в ходе реакции образуются цианистый водород и бромистая ртуть. Смесь концентрируют до желтоватого сиропа в вакууме при температуре водяной бани. Полученный сироп растворяют в 120 мл горячего бензола и оставляют на 12 час при 0°. Соли ртути отфильтровывают на пористом стеклянном фильтре и промывают несколько раз небольшими порциями бензола. Бензольные растворы соединяют и упаривают в вакууме до густого сиропа, который растирают с 270 мл теплого эфира. Эфирный раствор оставляют стоять несколько часов при комнатной температуре и затем выдерживают при 0° до полной кристаллизации октаацетата  $\beta$ , $\beta$ -трегалозы. Продукт фильтруют с отсасыванием; выход 10,7 г (31,5%).

Неочищенный продукт перекристаллизовывают, растворяя 1,5 г ацетата в 30 мл хлороформа. Раствор фильтруют и добавляют 30 мл эфира, после чего медленно по каплям до появления устойчивого помутнения добавляют петролейный эфир. После одной перекристаллизации температура плавления продукта 181,5—182,5°,  $[\alpha]_D - 17^\circ$  (в хлороформе).

### Дезацетилирование октаацетата $\beta$ , $\beta$ -трегалозы [3]

Октаацетат  $\beta$ , $\beta$ -трегалозы (6,0 г) растворяют в 100 мл абсолютного метанола, добавляют 3 мл 0,1 н. раствора метилата натрия и смесь кипятят 10 мин с обратным холодильником. Раствор упаривают в вакууме до густого сиропа, который после прибавления 40 мл теплой воды дает слабомутный раствор. Его фильтруют, к фильтрату по каплям добавляют ацетон до устойчивого помутнения и инициируют кристаллизацию потиранием стенок сосуда палочкой. Когда кристаллизация закончена, трегалозу отфильтровывают с отсасыванием и кристаллы промывают на фильтре холодной (0°) смесью ацетона с водой (4 : 1). В полученной таким способом  $\beta$ , $\beta$ -трегалозе содержатся различные количества кристаллизационной воды, которую можно частично удалить высушиванием в вакууме при комнатной температуре над пятиокисью фосфора или полностью удалить высушиванием вначале при 68°, а затем при 110° в течение 6—8 час. Выход 2,45 г (80%), кристаллы  $\beta$ , $\beta$ -трегалозы имеют форму призм, т. пл. 135—140°,  $[\alpha]_D - 40^\circ$  (в воде).

### Производные

$\beta$ , $\beta$ -Трегалозу можно идентифицировать в виде ее октаацетата (см. [8]). Температура плавления октаацетата  $\beta$ , $\beta$ -трегалозы 180,5—181,5°,  $[\alpha]_D^{25} - 18^\circ$  (с 3 в хлороформе) [1].

### ЛИТЕРАТУРА

1. McCloskey C. M., Pyle R. E., Coleman G. H., J. Am. Chem. Soc., 66, 349 (1944).
2. Brederick H., Hoschle G., Ruck C., Chem. Ber., 86, 1277 (1953).
3. Helferich B., Weis K., Chem. Ber., 89, 314 (1956).

4. Michael F., Hagel K. O., Chem. Ber., 85, 1087 (1952).
5. Thompson A., Anno K., Wolfrom M. L., Inatome M., J. Am. Chem. Soc., 76, 1309 (1954).
6. Peat S., Whelan W. J., Hinson K. A., Nature, 170, 1056 (1952).
7. McCloskey C. M., Coleman G. H., Org. Syntheses, Coll., vol. 3, 434 (1955).
8. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II.

# ПОЛИСАХАРИДЫ





# Общие методы выделения полисахаридов

---

## Растворение полисахаридов

*А. О. П и т т е т*

### ВВЕДЕНИЕ

Многие полисахариды образуют вязкие или коллоидные растворы в полярных растворителях благодаря водородным связям [1]. Если не принять предосторожностей, прибавление порошкообразного углевода к жидкости приводит к образованию комков. Разработаны разнообразные методы получения однородных растворов, особенно для практически важных полисахаридов; эти методы включают как физическую, так и химическую обработку полимера. В общем случае гомогенные растворы образуются легче, если полисахарид быстро прибавляют к хорошо перемешиваемому растворителю при комнатной температуре.

### МЕТОДИКА

#### *Размер частиц*

Величина частиц полисахарида сильно влияет на легкость его растворения. Крупнозернистый материал с незначительной общей площадью поверхности частиц после прибавления к воде медленно гидратируется и быстро оседает; в то же время мелкие частицы часто гидратируются настолько быстро, что весь материал, захватываемый поверхностной пленкой, будет немедленно слипаться в комки. Например, крупные (+80 Тайлер-меш) частицы гуарана [2] можно растворить в воде при перемешивании вручную, в то время как для получения однородного 1%-ного (вес к объему) коллоидного раствора тонко измельченного (—200 Тайлер-меш) препарата требуется энергичное механическое перемешивание.

#### *Использование инертного твердого вещества*

Полисахариды, обладающие большим сродством к воде, можно успешно растворять, предварительно смешав с твердым инертным веществом. Неионные соединения, такие, как порошкообразная сахароза, удобнее неорганических солей, которые часто влияют на свойства полисахаридов в растворах, вызывая понижение вязкости и даже препятствуя растворению [3, 4]. Эффективное перемешивание двух веществ приводит к физическому разделению частиц полисахарида, что позволяет им гидратироваться независимо и не слипаться в комки. Перемешивая с водой вручную смеси 5 частей сахарозы и 1 части натриевой

соли карбоксиметилцеллюлозы, можно получать однородные растворы с концентрацией полисахарида до 1%. Недостатком этого метода является наличие в полученном растворе постороннего растворенного материала, хотя в случае необходимости его можно удалить диализом (см. стр. 299).

### ***Использование инертной смешивающейся с водой жидкости***

Неспособность полисахаридов набухать в органических растворителях, смешивающихся с водой, например в метаноле, этиленгликоле, глицерине, можно использовать для их растворения. При прибавлении воды к суспензии вещества в спирте твердая фаза диспергируется, а органический растворитель разбавляется до концентрации, при которой весь полисахарид перейдет в раствор. Органический растворитель также можно удалить диализом или, в случае более летучих спиртов, упариванием. Однопроцентный (вес/об.) раствор камеди карая можно приготовить следующим образом: к суспензии 1 части порошкообразной камеди в 5 частях спирта быстро прибавляют воду до желаемой концентрации при перемешивании вручную. Раствор достигает максимальной вязкости через 5 мин.

### ***Концентрация ионов водорода***

На скорость растворения полисахаридов влияет рН растворителя. Так, тонко измельченный гуаран можно диспергировать в воде при рН 12 и выше. Скорость гидратации камеди можно увеличить, нейтрализовав раствор.

### ***Комплексообразование с анионами***

Полисахариды, содержащие винцинальные *цис*-гидроксильные группы, такие, как галактоманнаны, реагируют с тетраборатом натрия в слабощелочной среде с образованием поперечно сшитых структур [5]. Если в реакцию вступает гидратированный полимер, происходит гелеобразование, но если полисахарид обработать перед растворением, то вещество становится нерастворимым. Минимальная концентрация тетрабората натрия, препятствующая растворению гуарана, зависит от рН [6]. Например, для 1%-ного (вес/об.) коллоидного раствора камеди при рН 10—10,5 необходимо всего 0,25—0,5% тетрабората натрия (считая на вес полисахарида), при рН 7,5—8,0 нужно 1,5—2,0% этой соли. Нейтрализация суспензии приводит к разложению комплекса и растворению камеди.

### ***Комплексообразование с катионами***

Многие кислые полисахариды образуют нерастворимые соли с поливалентными катионами, и эта реакция используется для получения водорастворимого пектина [7]. При суспендировании пектина в растворителе, не вызывающем его набухания, например в водном спирте, содержащем растворенную соль металла, на поверхности частиц образуется нерастворимая пленка соли пектиновой кислоты. После перемешивания в течение нескольких минут частицы пектина отфильтровывают с отсасыванием, промывают спиртом и сушат. Этот материал диспергируется в воде без образования комков.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Whistler R. L., in «Industrial Gums», R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Eds, Academic Press Inc., New York, N.Y., 1959, p. 1.
2. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1965, vol. V, p. 143.
3. Golstein A. M., Alter E. N., in «Industrial Gums», R. L. Whistler and BeMiller J. N., Eds, Academic Press Inc., New York, N.Y., 1959, p. 343.
4. Hollabaugh C. B., Burt L. H., Walsh A. P., Ind. Eng. Chem., **37**, 943 (1945).
5. Deuel H., Neukom H., Weber F., Nature, **161**, 96 (1948).
6. См. ссылку [3], p. 321.
7. Olsen A. G., пат. США 2261858 (1941); Chem. Abstracts, **36**, 1106 (1942).

## Удаление белков

Метод Севага

А. М. Штауб

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из самых мягких приемов удаления белков из раствора полисахарида является метод, введенный Севагом [1]. Белки денатурируются при встряхивании с хлороформом и образуют гель, остающийся после центрифугирования на границе раздела вода — хлороформ. Чтобы облегчить денатурацию, часто вместо воды лучше использовать буфер с pH 4—5 и всегда необходимо прибавлять небольшие количества *n*-бутанола или *n*-пентанола.

Поскольку с помощью этого метода удаляют только небольшие количества белка, часто необходимо многократно повторять его, что может вызвать значительные потери полисахаридов. Поэтому предпочтительно применять его только после других методов очистки. Его нельзя использовать для липополисахаридов (содержащих даже небольшие количества липидов), так как они более или менее растворимы в хлороформе.

Другие примеры см. на стр. 349, 356, 367. О ферментативной депротеинизации см. стр. 349, 364, 367.

## МЕТОДИКА

К водному раствору, подкисленному или нейтральному<sup>1</sup>, прибавляют хлороформ (0,2 объема от объема воды), а затем — *n*-бутанол или *n*-пентанол (0,2 объема от объема хлороформа). Смесь встряхивают 30 мин, центрифугируют и отделяют водную фазу. Хлороформный раствор промывают водой или соответствующим буфером и с объединенным водным раствором повторяют вышеописанную операцию до полного удаления всего белка.

<sup>1</sup> Для определения оптимального pH, не разрушающего полисахарид, следует провести предварительные испытания на малых количествах вещества.

После этого полисахарид осаждают из водного раствора спиртом или ацетоном. Затем его следует растворить в воде, раствор диализовать (см. стр. 299) и лиофилизовать (см. стр. 302). Полисахарид можно также выделить после диализа осаждением и высушить промывкой несколькими растворителями (см. стр. 301).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sevag M. G., Biochem. Z., 273, 419 (1934).

### Удаление белков с помощью трифтортрихлорэтана

Депротеинизирующее действие трифтортрихлорэтана  
и выделение углеводов из водной фазы

*А. С. Марковиц, Ч. Ф. Ланге, мл.*

#### ВВЕДЕНИЕ

Сообщение Гесслера и сотр. [1] об использовании трифтортрихлорэтана («генестрон 113», препарат «Дженерал Кемиклс», Нью-Йорк) в качестве депротеинизирующего агента при очистке вируса гриппа позволило предположить, что этот реагент может иметь более широкое применение. Марковиц и Гендерсон [2] с помощью этого галогенированного производного получили пневмококковый полисахарид из интактных клеток. То, что органический растворитель не смешивается с водой, в которой растворимы полисахариды, позволяет легко проводить разделение в большом масштабе. Недавно Марковиц и Ланге [3], используя этот реагент, выделили обогащенный углеводами и не содержащий белка препарат из стрептококков.

Использование трифтортрихлорэтана для удаления белка описано также Де Карвало [4], Мак-Кенна и сотр. [5] и Тейлором и сотр. [6]. Все эти исследователи сообщили о выделении специфических веществ из раковых опухолей, причем Де Карвало считает, что окончательный продукт является рибонуклеиновой кислотой, а другие исследователи относят его к белковым веществам.

Большинство способов получения полисахаридов пневмококков включает метод Севага [7] (см. также стр. 261) или его модификацию. Раствор, содержащий полисахарид и белок, встряхивают со смесью хлороформа и амилового спирта. Как и при использовании трифтортрихлорэтана, белок отделяется в виде нерастворимого геля, а полисахарид остается растворенным в водной фазе.

О ферментативной депротеинизации см. стр. 349, 364, 367.

#### МЕТОДИКА

Хотя использование трифтортрихлорэтана позволяет легко выделять полисахариды типа полисахаридов пневмококков, в ряде случаев для получения обогащенного углеводами материала может понадобиться предварительная обработка исходного вещества. Ниже проводятся две методики, имеющие общее применение.

### Выделение полисахарида пневмококков

Клетки *D. pneumoniae* («гладкая» форма) выращивают на агаре с экстрактом сердца быка (выращивать культуры в жидкой среде нецелесообразно), через 18 час их собирают, промывают 5 раз забуференным соевым раствором с pH 7,2 и готовят суспензию клеток в этом растворе с концентрацией  $10^8$  клеток в 1 мл.

1 часть клеточной суспензии и 1 часть трифтортрихлорэтана<sup>1</sup> перемешивают 10 мин в высокоскоростном гомогенизаторе. Трифтортрихлорэтан кипит при  $\sim 56^\circ$ , поэтому контейнер гомогенизатора должен быть погружен в лед во избежание закипания реагента в процессе перемешивания. После гомогенизации смесь центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин, при этом образуется три слоя: а) верхний водный, б) средний гелеобразный и в) нижний слой — слой реагента. Верхний водный слой отделяют отсасыванием и дважды обрабатывают, как описано выше. При третьей экстракции образуется весьма незначительный гелеобразный слой.

Такой трижды обработанный «депротеинизированный» водный раствор дает положительную реакцию Молиша, отрицательную реакцию с нингидрином и содержит пневмококковый полисахарид, как это следует из его физических, химических и иммунохимических свойств [2].

### Выделение богатого углеводами вещества из стрептококков

Цитоплазматическую массу, не содержащую клеточных стенок, полученную разрушением стрептококков (группа А, тип 12) в микромельнице Гиффорда — Вуда (тип MV-6-3), обрабатывают трифтортрихлорэтаном, как описано для полисахарида пневмококков. Водную фазу экстрагируют в тех же условиях еще два раза. Гелеобразный слой, образующийся при третьей обработке, обычно незначителен; это указывает, что депротеинизация под действием реагента достигнута. Обогащенную углеводами водную фазу анализируют 24 час (см. стр. 299) против дистиллированной воды и лиофилизируют (см. стр. 302). Полученное вещество обрабатывают далее формамидом по модифицированному методу Фуллера [8].

1 г (сухой вес) депротеинизированного вещества стрептококков нагревают 15 мин при  $160^\circ$  с 100 мл формамида в колбе Эрленмейера емкостью 500 мл. После охлаждения прибавляют 100 мл подкисленного спирта (5 мл 2 н. соляной кислоты и 95 мл абсолютного спирта), выдерживают 1 час при комнатной температуре, осадок отделяют центрифугированием и отбрасывают. К раствору прибавляют 500 мл ацетона, выпавший осадок отделяют центрифугированием и промывают 3 раза ацетоном. Полученное вещество растворимо в воде, содержит значительное количество углеводов и не содержит белка.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gessler A. E., Bender C. E., Parkinson M. C., Trans. N.Y. Acad. Sci., 18, 701 (1956).
2. Markowitz A. S., Henderson J. R., Nature, 181, 771 (1958).

<sup>1</sup> Хотя в первоначальном методе выделения полисахаридов пневмококков использовались 3 части реагента на 1 часть исходного материала, позднее было найдено, что применение равных объемов даст удовлетворительные результаты.

3. Markowitz A. S., Lange C. F., Jr., J. Immunol., в печати.
4. De Carvalho S., J. Lab. Clin. Med., 56, 333 (1960).
5. McKenna J. M., Sanderson R. P., Blake more W. S., Science, 135, 370 (1962).
6. Taylor A. R., Gillen A., Brandon F. B., Virology, 7, 348 (1959).
7. Sevag M. S., Biochem. Z., 273, 419 (1934).
8. Fuller A. T., Brit. J. Exp. Pathol., 19, 130 (1938).

## Фракционирование на колонках с целлюлозой

*С. Гарделл*

### ВВЕДЕНИЕ

Смеси полисахаридов обычно разделяют на компоненты фракционным осаждением органическими растворителями из водных растворов (см. стр. 285). Во многих случаях можно добиться хорошего разделения, хотя обычно необходимо переосаждение фракций. Если же компоненты незначительно различаются по растворимости или если доступно лишь небольшое количество материала, фракционное осаждение редко дает желаемые результаты. Даже при значительном различии в растворимости выход чистых фракций часто мал.

Принципы фракционного осаждения можно, однако, легко использовать при фракционировании на колонках; в этом случае слой сорбента в колонке служит для удерживания разделяемой смеси.

Колонки наполняют инертным пористым материалом, таким, как порошкообразная целлюлоза, насыщают раствором, полностью осаждающим все полисахариды смеси, и затем наносят на колонку раствор смеси веществ в подходящем растворителе. При движении вдоль колонки полисахариды осаждаются на пористом материале. Различные полисахариды вымываются затем из этого осадка за счет ступенчатого или плавного изменения состава элюирующего растворителя. Таким образом, фракционное осаждение заменяется фракционным элюированием.

Преимущества колоночного процесса перед обычным фракционным растворением состоят в следующем: поверхность соприкосновения между осажденным материалом и растворителем в этом случае больше и меньше возможностей образования «оболочки» из нерастворимого соединения, внутри которой содержится более растворимое вещество.

Этот подход Дерс и Гойзен [1] использовали для разделения нуклеиновых кислот, а Цан и Шталь [2] и Зиттль и Делла Моника [3] — для разделения белков. В статьях указанных авторов можно найти также ценные сведения о приемах фракционирования, отличающихся от изложенного ниже.

Разделение полисахаридов описано Гарделлом [4], Беренсоном [5] и Гранатом [6]. Эти авторы основывали свои методы на неодинаковой растворимости различных полисахаридов в разных смесях воды и органических растворителей. Позже Антонопулос и сотр. [7] описали колоночный процесс разделения кислых полисахаридов, основанный на различной растворимости в солевых растворах их комплексов с четвертичными аммониевыми соединениями, содержащими алифатические радикалы с длинной цепью. Возможности использования этих соединений для

фракционирования полисахаридов изложены в обзоре Скотта [8] (см. также стр. 288).

Ниже дается общее описание фракционирования полисахаридов на колонках с целлюлозой. Это модификация метода, предложенного Гарделлом [4]. Поскольку почти любой вариант осаждения можно проводить, используя деление на колонке, состав растворителей и методы анализа следует выбирать в соответствии с используемой системой и растворимостью в этой системе полисахарида. Такие детали в приводимом описании опущены. Приготовление колонки, нанесение смеси веществ и обработка фракций практически одинаковы для большинства систем. В конце главы приведено несколько конкретных примеров разделения.

## МЕТОДИКА

### *Приготовление колонки*

Диаметр колонки выбирают в соответствии с количеством разделяемого материала. Длина колонки должна составлять примерно 20 см.

Необходимое для приготовления желаемой колонки количество целлюлозного порошка смешивают с водой до образования жидкой суспензии; 10 г сухой целлюлозы достаточно для колонки диаметром 1 см и длиной ~20 см. Суспензию выливают в склянку для отсасывания, заполняя не больше 0,20—0,25 ее объема. Склянку эвакуируют в течение 1 час с помощью водоструйного насоса и время от времени осторожно вращают. При этой процедуре удаляется большая часть воздуха, захваченного целлюлозой, что сильно облегчает набивание колонки.

После откачивания воздуха суспензию выливают в колонку. Если при этом образуются воздушные пузырьки, суспензия слишком густа, заполнение колонки следует повторить с более разбавленной суспензией. Порошку целлюлозы дают осесть до постоянной высоты, следя, чтобы уровень жидкости не опустился ниже верхнего края сорбента (в случае необходимости прибавляют воду).

Различные партии целлюлозы несколько отличаются по своим свойствам, поэтому используются разные способы заполнения колонки. Иногда достаточно одной седиментации, в других случаях необходимо пропустить через колонку 1—2 объема воды при давлении воздуха 20—40 мм рт. ст. Скорость протекания через колонку должна составлять 5—10 мл/час на 1 см<sup>2</sup> поперечного сечения при слое воды над уровнем сорбента высотой 10 см. После промывания водой до полного исчезновения сахаров в элюате (для контроля используются колориметрические реакции типа реакции с антроном) колонку насыщают первым растворителем. Этот растворитель должен осаждать все содержащиеся в смеси полисахариды или все, кроме одного <sup>1</sup>.

### *Подготовка образца*

Полисахариды растворяют в подходящем растворителе, обычно в воде (исключения см. ниже). Полученные 1—5%-ные растворы наносят на колонку в таком количестве, чтобы 1 см<sup>2</sup> ее поперечного сечения соответствовало 1—2 мл раствора. Раствор проникает в слой целлюлозы

<sup>1</sup> Очень удобно использовать готовые колонки «Хромакс пейперролл». Эти колонки выпускаются шведской фирмой «ЛКБ-Продактер», Стокгольм, Швеция.

под действием силы тяжести. После этого несколькими миллилитрами чистого растворителя смывают стенки колонки над поверхностью целлюлозы.

### *Элюирование веществ*

Прежде чем подать на колонку элюирующий растворитель, ее промывают двумя объемами растворителя, использованного для первоначального насыщения. При этом полисахариды не должны вымываться, хотя можно подобрать растворитель, который будет элюировать один из компонентов смеси. Подходящие растворители для вымывания следует выбирать в соответствии с растворимостями компонентов смесей. Если нужно разделить совершенно неизвестную смесь, проводят предварительное испытание на стенках колонки над слоем целлюлозы.

Объем раствора, необходимый для каждой стадии ступенчатого элюирования, должен составлять по меньшей мере два удерживаемых объема. Можно применять непрерывное градиентное элюирование, но при этом возникает ряд трудностей. В процессе фракционного элюирования количество растворителя, необходимого для вымывания данного компонента смеси, зависит от растворимости этого компонента в элюирующем растворителе и от содержания компонента в смеси. Таким образом, для незначительно растворимого в примененном растворителе вещества требуется тем больший объем элюента, чем больше вещества находится в смеси. Поэтому градиент, дающий хорошие результаты при разделении определенной смеси данных компонентов, может оказаться мало пригодным, если изменится соотношение между отдельными компонентами этой смеси.

### *Обработка получаемых фракций*

В большинстве случаев удобнее всего собирать вытекающий из колонки раствор с помощью автоматического коллектора. Эти фракции анализируют затем подходящим колориметрическим методом. Дальнейшей обработке подвергаются только фракции, содержащие элюированные вещества.

Для выделения полисахаридов применяют разнообразные методы осаждения этих веществ из разбавленных растворов. Если для вымывания применялись спиртовые растворы солей, фракции, содержащие один и тот же компонент, объединяют, концентрируют в вакууме и диализуют, после чего полисахариды осаждают из концентрированных растворов спиртом.

### *Примеры*

#### **Фракционирование полисахаридов из межпозвоночных дисков**

400 г сухого целлюлозного порошка суспендируют в 3 л воды и эвакуируют порциями в склянке для отсасывания емкостью 5 л. Суспензию по частям вносят в хроматографическую колонку размером  $6,5 \times 70$  см и дают целлюлозе осесть. Затем колонку промывают 5 л воды и 3 л 80%-ного спирта, содержащего 0,3% ацетата бария. 0,4 г смеси полисахаридов, выделенной из центральной части межпозвоночных дисков, растворяют в 80 мл 0,3%-ного раствора ацетата бария и наносят на колонку. После того как раствор впитается в слой сорбента под действием силы тяжести, стенки колонки споласкивают 20 мл 0,3%-ного раствора ацетата бария. Колонку промывают вначале 2 л 80%-ного спирта, содер-

жащего 0,3% ацетата бария. Полисахариды элюируют следующими растворами: 50, 35, 25 и 20%-ным спиртом, содержащим 0,3% ацетата бария, и наконец, 0,3%-ным водным раствором ацетата бария. Используют по 2 л каждого раствора. Каждый элюат упаривают в вакууме приблизительно до 100 мл, слегка подкисляют раствором уксусной кислоты и диализуют на холоду против дистиллированной воды. Затем полисахариды осаждают спиртом.

Ткань содержит кератансульфат и хондроитинсульфат. Кератансульфат чистоты 98—99% получают с выходом 60%. Дополнительные 20% полисахарида имеют чистоту порядка 95%. Хондроитинсульфат с чистотой 98—99% получают с выходом 80%. Добавочное количество (15%) полисахарида имеет чистоту 90—95%.

#### Фракционирование полисахаридов роговицы глаза быка

11,2 мг полисахаридной фракции роговицы глаза быка растворяют в 0,15 мл 0,3%-ного раствора ацетата бария и наносят на колонку размером  $0,5 \times 7$  см с целлюлозой, приготовленную, как описано выше, и насыщенную 80%-ным спиртом, содержащим 0,3% ацетата бария. Колонку промывают растворами, содержащими 0,3% ацетата бария и убывающие концентрации спирта. Фракции исследуют на содержание аминоксахаров методом ионообменной хроматографии [9]. Результаты хроматографирования и концентрации спирта в составе элюирующего раствора приведены в таблице.

#### Фракционирование полисахаридов роговицы глаза быка на колонке с целлюлозой при ступенчатом вымывании 0,3%-ными растворами ацетата бария и водном спирте

Концентрация спирта в элюенте, %	D-Глюкозамин, % от общего содержания гексозаминов	D-Галактозамин, % от общего содержания гексозаминов	Концентрация спирта в элюенте, %	D-Глюкозамин, % от общего содержания гексозаминов	D-Галактозамин, % от общего содержания гексозаминов
80	—	—	25	Следы	100
60	—	—	20	8,6	91,4
50	100	Следы	15	9,3	90,7
45	96,4	3,6	10	—	—
40	87,1	12,9	5	—	—
35	71,9	20,1	0	—	—
30	6,8	93,2			

#### Фракционирование смеси гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и гепарина

40 г порошкообразной целлюлозы смешивают с 500 мл воды и суспензию эвакуируют, как описано выше. Затем суспензию вливают в хроматографическую колонку диаметром 2 см и общей длиной 50 см. Осевшую целлюлозу промывают 1 л воды и 500 мл 1%-ного водного раствора хлористого цетилпиридиния (см. стр. 288). Смесь полисахаридов, содержащую 20 мг гиалуроновой кислоты, 35 мг хондроитинсульфата и 35 мг гепарина, растворяют в 5 мл воды и наносят на колонку, после чего стенки колонки споласкивают 2 мл воды. Колонку промывают 200 мл 1%-ного раствора хлористого цетилпиридиния, а затем последовательно

200 мл 0,15, 0,50 и 1,00 М водных растворов хлористого магния, содержащих 0,05% хлористого цетилпиридиния. Полисахариды выделяют концентрированием полученных фракций и осаждением спиртом. Анализ фракций показывает, что происходит полное разделение смеси полисахаридов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Desreux V., Ghaussen E. M., Bull. Soc. Chim. Belges, **60**, 410 (1954).
2. Zahn R. K., Stahl I., Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's, **293**, 1 (1953).
3. Zittle C. A., Della Monica S. E., Arch. Biochem. Biophys., **58**, 31 (1955).
4. Gardell S., Acta Chem. Scand., **11**, 668 (1957).
5. Berenson G. S., Biochim. Biophys. Acta, **28**, 176 (1958).
6. Granath K. A., Makromol. Chem., **28**, 1 (1958).
7. Antonopoulos C. A., Borelius E., Gardell S., Hamström B., Scott J. E., Biochim. Biophys. Acta, **54**, 213 (1961).
8. Scott J. E., Methods in Biochemical Analysis, **8**, 145 (1960).
9. Gardell S., Acta Chem. Scand., **7**, 207 (1953).

## Фракционирование на колонках с диэтиламиноэтилцеллюлозой

Разделение нейтральных и кислых полисахаридов  
ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе

*Г. Нейком, В. Кюндиг*

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из самых важных и трудных стадий в исследовании полисахаридов является их очистка и фракционирование с целью получения более или менее однородных индивидуальных веществ. До настоящего времени разделение проводилось главным образом фракционным осаждением производных полисахаридов в органических растворителях или избирательным осаждением из водных растворов различными электролитами [1, 2]. Из-за отсутствия подходящих адсорбентов хроматография полисахаридов не достигла больших успехов. Введение в практику Собрером и сотр. [3, 4] ионообменников на основе целлюлозы для колоночной хроматографии белков и нуклеиновых кислот привело к появлению новых адсорбентов, весьма удобных для разделения высокомолекулярных растворимых в воде веществ.

Недавно было показано, что аниониты на основе целлюлозы (ДЭАЭ-и ЭКТЕОЛА-целлюлозы) могут успешно применяться для фракционирования как кислых, так и нейтральных полисахаридов [5] и мукополисахаридов [6, 7]. Кислые полисахариды легко адсорбируются на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой при pH ~6 и вымываются в зависимости от содержания кислотных групп а) при увеличении концентрации буферного раствора с тем же pH (только для слабокислых полисахаридов), б) щелочными растворами возрастающей концентрации и в) кислыми растворами возрастающей концентрации. Нейтральные полисахариды не задерживаются или очень слабо адсорбируются на колонке при pH 5—6; но они



адсорбируются на колонке в основной форме. Элжирование проводят щелочными растворами возрастающей концентрации. Нейтральные полисахариды можно фракционировать также, пользуясь свойством ряда полисахаридов образовывать отрицательно заряженные боратные комплексы [5]. В этом случае колонку предварительно переводят в боратную форму; полисахариды, образующие боратные комплексы, задерживаются на колонке и их можно элжировать раствором бората с возрастающей концентрацией. Полисахариды, не образующие боратных комплексов, проходят через колонку.

Во многих случаях хроматография ведет к удалению различных загрязняющих полисахариды веществ; так, гуминовые кислоты прочно адсорбируются и остаются на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

Адсорбция полисахаридов на ДЭАЭ-целлюлозе весьма зависит от строения разделяемых соединений, поэтому нельзя дать общей методики, применимой для всех полисахаридов. Необходим предварительный подбор условий наилучшего разделения для каждого полисахаридного препарата, подлежащего фракционированию. Необходимо отметить, что в общем случае адсорбции на ДЭАЭ-целлюлозе способствует увеличение числа кислотных групп в молекуле полисахарида. В гомологичной серии линейных полисахаридов вещества с низким молекулярным весом удерживаются менее прочно, чем высокомолекулярные [8, 20]. Далее, следует ожидать, что форма молекулы полисахарида также влияет на адсорбцию; например, при фракционировании растворимого крахмала и декстринов линейные компоненты удерживаются прочнее разветвленных [5]. При применении ДЭАЭ-целлюлозы в боратной форме могут проявляться дополнительные влияния на процесс разделения.

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе использована для фракционирования пектиновых веществ [5, 8—11] и полисахаридов почвы [12], для отделения кислых полисахаридов от глюкоманнанов [13] и для фракционирования пентогликанов и гликопротеинов пшеничной муки [14, 15]. Различные гликопротеины сыворотки также были подвергнуты фракционированию на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой [16—19], а мукополисахариды (гепарин, хондроитинсерная и гиалуроновая кислоты) были разделены хроматографированием на ЭКТЕОЛА-целлюлозе [6, 7, 20].

Другие примеры см. на стр. 362.

## МЕТОДИКА

### *Приготовление колонок с ДЭАЭ-целлюлозой*

Можно использовать любую имеющуюся в продаже реактивную ДЭАЭ-целлюлозу с ионообменной емкостью 0,70—0,75 экв/г. Для фракционирования 200 мг полисахаридов требуется ~20 г сухой ДЭАЭ-целлюлозы. Для больших количеств полисахаридов нужно брать колонки соответственно больших размеров. При приготовлении колонки особое внимание следует обратить на предотвращение загрязнения элюатов частицами целлюлозы, которое искажает результаты определения полисахаридов. Поэтому желательно предварительно удалить из ДЭАЭ-целлюлозы фракцию наиболее мелких частиц. Для этого сухую ДЭАЭ-целлюлозу суспендируют последовательно в 0,5 н. соляной кислоте и 0,5 н. растворе едкого натра; седиментацию суспензии проводят в вакуум-эксикаторе, чтобы освободиться от захваченных пузырьков воздуха. Мутную

надосадочную жидкость сливают и ДЭАЭ-целлюлозу отмывают водой на воронке Бюхнера перед каждым следующим суспендированием. Целлюлозу обрабатывают трижды соляной кислотой и трижды щелочью, а затем суспендируют в 0,1 н. растворе едкого натра и взвесь вливают в хроматографическую колонку, снабженную тампоном из стеклянной ваты и содержащую слой песка толщиной 2 см. После оседания ДЭАЭ-целлюлозы колонку промывают водой под небольшим давлением до нейтральной реакции элюата. В процессе хроматографирования давление не применяется.

После этого колонка с ДЭАЭ-целлюлозой в основной форме готова к употреблению. Чтобы перевести целлюлозу в фосфатную форму, колонку промывают 8—10 удерживаемыми объемами 0,5 *M* буферного раствора фосфата натрия с нужным рН. Избыток фосфата удаляют промыванием дистиллированной водой. Колонку в боратной форме готовят, промывая 8—10 объемами 0,5 *M* раствора бората натрия, а избыток бората отмывают дистиллированной водой.

### Работа с колонкой

Полисахариды наносят на колонку в виде концентрированных растворов. Вначале обычно колонку промывают водой, чтобы определить, удерживаются ли полисахариды. Далее можно использовать и ступенчатое, и непрерывное градиентное элюирование (см. стр. 272). Желательно провести сначала непрерывное градиентное элюирование, чтобы оценить примерно число фракций и концентрации электролита, необходимые для ступенчатого элюирования каждой из этих фракций. Ступенчатое вымывание обычно дает лучшее разделение и более компактные фракции, чем непрерывное градиентное элюирование. Скорость протекания через колонку не должна превышать 1,5 мл/мин. Фракции объемом 10—20 мл собирают обычно с помощью автоматического коллектора.

Если для вымывания применяют раствор едкого натра, его концентрация не должна быть  $>0,5$  н.; в противном случае небольшое количество ДЭАЭ-целлюлозы может переходить в раствор и препятствовать определению полисахаридов во фракциях.

Определение концентрации полисахаридов в элюате можно выполнить любым достаточно чувствительным колориметрическим методом, используемым для анализа сахаров; например, содержание гексоз и пентоз определяют реакцией с антроном, а урановых кислот — реакцией с карбазолом (см. стр. 38).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Whistler R. L., Smart C. L., Polysaccharide Chemistry, Academic Press Inc., New, York, N.Y., 1953, p. 27.
2. Deuel H., Neukom H., Verhandlungsber. Kolloid-Ges., **18**, 91 (1958).
3. Peterson E. A., Sober H. A., J. Am. Chem. Soc., **78**, 751 (1956).
4. Sober H. A., Gutter F. J., Wyckoff M. M., Peterson E. A., J. Am. Chem. Soc., **78**, 756 (1956).
5. Neukom H., Deuel H., Heri W. J., Kündig W., Helv. Chim. Acta, **43**, 64 (1960).
6. Ringertz N. R., Reichard P., Acta Chem. Scand., **13**, 1467 (1959).
7. Ringertz N. R., Reichard P., Acta Chem. Scand., **14**, 303 (1960).

8. Heri W., Neukom H., Deuel H., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1939 (1961).
9. Heri W., Neukom H., Deuel H., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1945 (1961).
10. Aspinall G. O., Fanshawe R. S., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 4215.
11. Anderson D. M. W., King N. J., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 5333.
12. Müller M., Mehta N. C., Deuel H., *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.*, **90**, 139 (1960).
13. Meier H., *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1381 (1961).
14. Kündig W., Neukom H., Deuel H., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 823 (1961).
15. Kündig W., Neukom H., Deuel H., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 969 (1961).
16. Lowy P. H., Keighley G., Borsook H., *Nature*, **185**, 102 (1960).
17. Lowy P. H., Keighley G., *Nature*, **192**, 75 (1961).
18. Biserte G., Havez R., Laturaze J., Hayem - Levy A., *Compt. rend. soc. biol.*, **154**, 2067 (1960).
19. Goa J., *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1975 (1961).
20. Laurent T. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 224 (1961).

## Фракционирование кислых мукополисахаридов на колонках с целитом и фосфатом кальция

*Дж. М. Боунесс*

### ВВЕДЕНИЕ

Адсорбция на колонке со смесью фосфата кальция и целита и градиентное элюирование фосфатным буфером с рН 6,5 и концентрацией до 0,2 моль/л позволяет отделить хондроитинсульфат от гиалуроновой кислоты или разделить образцы гиалуроновой кислоты на фракции с различным молекулярным весом [1]. Этот метод можно использовать также для выделения растворимого комплекса хондроитинсульфата с белком из экстрактов хрящевых тканей [2] (см. стр. 343).

### МЕТОДИКА

Для приготовления колонки смешивают 3,2 г целита с 50 мл 0,2 М раствора хлористого кальция, используя магнитную мешалку.

Чтобы осадить фосфат кальция, не прекращая перемешивание, приливают 64 мл 0,2 М раствора диаммонического фосфата калия. Полученную суспензию перемешивают еще 5 мин и выливают в стеклянную колонку емкостью 25 мл и диаметром 1 см, внизу которой имеется пористый стеклянный фильтр. Жидкости позволяют стекать из колонки в течение 1 час, а затем создают избыточное давление, ~40 см вод. ст. После того как уровень жидкости в колонке достигнет 0,5 см над слоем сорбента, колонку осторожно, чтобы не повредить поверхность сорбента, наполняют дистиллированной водой и под тем же давлением снова доводят столбик жидкости до высоты ~0,5 см. Если в верхнем слое осевших частиц заметны трещины, часть сорбента размешивают с прибавленной дистиллированной водой и опять подают давление на колонку. Колонки, диаметр которых больше 2,0 см и объем больше 150 мл, можно приготовить тем же способом, используя двойные и тройные количества исходных веществ. Высота слоя осевших частиц в меньших колонках должна составлять ~7,5 см, а в больших — 10 см.

Концентрация растворенных солей в растворе хроматографируемых веществ должна быть низкой. Для большинства биологических жидкостей и экстрактов необходим предварительный диализ. Некоторые протеины, например сыворотки, влияют на хроматографическое поведение кислых мукополисахаридов, поэтому их следует удалить перед хроматографированием [1]. Раствор, содержащий кислые мукополисахариды, нужно наносить на колонку, не применяя избыточного давления.

Для градиентного элюирования можно использовать две аспираторные склянки емкостью по 500 мл. Нижнее отверстие первой склянки соединяют с верхним отверстием второй склянки, а ее нижнее отверстие — с колонкой; для соединения применяют полупрозрачные трубки из поливинилхлорида. При заполнении на эти трубки надевают зажимы. Раствор, находящийся в склянке, которая соединена непосредственно с колонкой, перемешивают магнитной мешалкой. Склянку помещают над колонкой, так чтобы высота жидкости над слоем сорбента составляла примерно 75 см. Молярность растворов, помещаемых в склянки, варьируют в зависимости от хроматографируемого материала. Для гиалуроновой кислоты процесс начинают в колонке (диаметром 1 см), заполненной дистиллированной водой, и в склянку, соединенную с колонкой, помещают 100 мл дистиллированной воды. В другую склянку помещают 200 мл 0,025 М фосфатного буфера с pH 6,5. В случае смеси мукополисахаридов хроматографирование начинают с 0,025 М фосфатным буфером в последней склянке, но его заменяют на 0,1 или 0,2 М буфер, после того как отбирают 100 мл вытекающего из колонки раствора. При хроматографировании хондроитинсульфата можно в склянку, соединенную с колонкой, помещать 0,005 М фосфатный буфер. В случае больших колонок нужны большие объемы растворов в каждой склянке. Для предварительного хроматографического исследования может оказаться полезным ступенчатое элюирование. Для маленьких колонок, например, можно последовательно прибавлять по 20 мл 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 и 1,0 М фосфатного буфера (pH 6,5).

Скорость вытекания из колонок сравнительно невелика, и для завершения разделения может понадобиться около двух дней. В большинстве случаев необходим автоматический коллектор для отбора фракций объемом 2,5 или 5 мл. При хроматографировании лабильных соединений предпочтительна работа в холодной комнате.

Фракции, полученные при хроматографировании, вначале исследуют с помощью простых цветных реакций типа карбазольной реакции на уроновые кислоты [3, 4] (стр. 38) или реакции Эльсона — Моргана на гексозамины [5]. После получения предварительной выходной кривой по данным этих цветных реакций можно провести дополнительное исследование фракций, в которых установлено присутствие мукополисахаридов. Для выделения мукополисахаридов в твердом виде из растворов в фосфатном буфере применяют диализ с последующим осаждением спиртом, если необходимо, в присутствии буферных растворов ацетата кальция [6].

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bowness J. M., Arch. Biochem., **91**, 86 (1960).
2. Bowness J. M., Biochim. Biophys. Acta, **50**, 410 (1961).
3. Dische Z., J. Biol. Chem., **167**, 189 (1947).
4. Bowness J. M., Biochem. J., **67**, 295 (1957).

5. Boas N. F., J. Biol. Chem., **204**, 553 (1953).  
6. Meyer K., Davidson E., Linker A., Hoffman P., Biochim. Biophys. Acta, **21**, 506 (1956).

## Гель-фильтрация

### Фракционирование декстрана

К. А. Гранат

#### ВВЕДЕНИЕ

Природные декстраны, продуцируемые из сахарозы штаммами *Leuconostoc* [1], *Betacoccus* или родственными бактериями, имеют чрезвычайно широкое молекулярно-весовое распределение [2]. Декстран находит наиболее важное применение как заменитель плазмы крови. После первоначальной частичной деполимеризации необходимо тщательное фракционирование для получения более узкого молекулярного распределения, которое, как показывают клинические испытания, является предпочтительным [3]. Таким образом, для производства препарата, пригодного для использования в клинике, нужны эффективная методика фракционирования и удобный метод анализа молекулярно-весового распределения.

В промышленном масштабе обычно используется повторное частичное осаждение из водного раствора этанолом [4] или метанолом. Многоступенчатое фракционирование последовательным осаждением из разбавленных растворов чаще всего применяется и для лабораторного получения фракций декстрана [5]. В нашей лаборатории для серийных анализов молекулярно-весового распределения клинических образцов ранее применялось фракционное осаждение спиртом из 0,6%-ных растворов декстрана. Однако серьезными недостатками метода были образование весьма гетерогенных первых фракций и продолжительное время формирования осадков. В настоящее время разработан полуавтоматический метод определения молекулярно-весового распределения декстрана, представляющий собой процесс колоночной экстракции с целитом в качестве адсорбента для осажденного декстрана [6]. Образующиеся фракции довольно гомогенны, как следует из отношения между средневесовым и среднечисловым молекулярным весом ( $M_w/M_n$ ) [6].

Декстраны, особенно в области небольших молекулярных весов, иногда склонны кристаллизоваться [7]. Образцы частично кристаллического декстрана неудовлетворительно фракционируются с помощью осаждения или экстракции из-за изменившейся растворимости. Однако можно ожидать, что метод гель-фильтрации применим и в этих случаях.

Ниже изложены экспериментальные условия гель-фильтрации и некоторые результаты, полученные при фракционировании декстрана (см. также стр. 280).

#### МЕТОДИКА

С момента введения Поратом и Флодином [8] сефадекса<sup>1</sup> гель-фильтрация за короткое время превратилась в важный метод разделения. Несмотря на его новизну, уже опубликованы многочисленные примеры

<sup>1</sup> Сефадекс производят фирмы «АБ Фармация», Уппсала, Швеция и «Фармация Файн Кемикалс», Бокс 1010, Рочестер, Миннесота.

применения этого метода для обессоливания коллоидных растворов и разделения смесей белков, пептидов и аминокислот. Разделение олигосахаридов [9] и фракционирование низкомолекулярных декстранов [10] было выполнено уже на первых типах сефадекса (G-25—G-75); обзор этих работ см. в [11].

Гелеобразующее вещество, сефадекс, представляет собой гранулы поперечно сшитого декстрана. Действием эпихлоргидрина, ведущим к образованию 1,3-глицериновых мостиков, цепи декстрана связаны в трехмерную сеть с высоким содержанием гидроксильных групп. Хотя сефадекс не растворяется в воде, но будучи гидрофильным, он набухает с образованием гелеобразной структуры. Степень набухания зависит от степени сшитости, т. е. от пористости трехмерной сети, и характеризуется величиной набухаемости (*water regain*,  $W_r$ ), равной числу граммов воды, поглощаемой 1 г сухого вещества. Метод гель-фильтрации основан на способности набухшего геля сефадекса захватывать небольшие растворенные молекулы и не задерживать молекулы, размеры которых превышают некоторую определенную величину.

Объем растворителя  $V_e$ , необходимый для появления данного вида молекул в элюате, зависит от объема «внешней» воды ( $V_0$ ) и объема «внутреннего» растворителя ( $V_i$ ), задерживаемого набухшими гранулами, следующим образом:

$$V_e = V_0 + K_d V_i,$$

где  $K_d$  — коэффициент распределения вещества между водой, заключенной в гранулах геля, и «внешней» водой.  $K_d$  — параметр, зависящий от размеров молекул растворенного вещества и пористости структуры геля, который показывает часть объема  $V_i$ , доступную для растворенного вещества.  $K_d$  равен нулю для молекул, которые совершенно не проникают в структуру геля, и приближается к единице для растворенных веществ, распределяющихся равномерно между стационарной и подвижной фазами.

В гомологическом ряду размеры молекул возрастают с увеличением молекулярного веса. Для видов молекул, более или менее свободно проникающих в структуру геля, коэффициент распределения имеет величину  $1 > K_d > 0$ , поэтому можно полагать, что внутри определенного интервала молекулярных весов будет происходить фракционирование по молекулярному весу. Следствием процесса поперечной сшивки является широкий набор размеров ячеек трехмерной сети, что объясняет плавное изменение значений  $K_d$  в довольно большом интервале молекулярных весов.

Коэффициент распределения для данного вида молекул является функцией набухаемости декстранового геля. Поэтому выбор геля для фракционирования определяется интервалом молекулярных весов разделяемых веществ.

Для фракционирования декстрана были использованы колонки объемом  $V_t$  от 800 до 3000 мл, причем объем образца составлял от 5 до 7,5% общего объема колонки. Как правило, разделяющая способность не зависит от концентрации образца, если только вязкость раствора не слишком велика. Чтобы избежать осмотических нарушений и уменьшения скорости вытекания,  $\eta_{\text{отн}}$  образца не должна, как правило, превышать 10 сп. Для декстранов с обычными молекулярными весами это соответствует 3—10%-ным растворам.

Соотношение высоты и диаметра колонки можно варьировать в широких пределах [11]. В нашей лаборатории используются стеклянные труб-

ки размером  $5 \times 100\text{--}180\text{ см}$  с нейлоновой сеткой на 400 меш в основании столба сорбента (см. рис. 1).

Для приготовления колонки сухие гранулы сефадекса (200—400 меш) перемешивают в большом сосуде с дистиллированной водой или разбавленным соевым раствором. Важно достичь полного набухания частиц перед заполнением колонки. Как правило, для этого достаточно одного дня, но сефадекс G-200 требует трех дней. За это время суспензию несколько раз декантируют для удаления самых мелких частиц. Затем суспензию переносят (G-25 — G-75 при перемешивании) через воронку в вертикально установленную колонку, наполненную водой, и гранулы геля медленно осаждаются на дно. После образования слоя высотой в несколько сантиметров колонку открывают для создания медленного тока воды. Горизонтальная поверхность осевших частиц медленно повышается; после оседания всего геля поверх слоя сорбента помещают хорошо пригнанную прокладку из пластика, предохраняющую его от повреждения. Затем плотно привинчивают крышку колонки и пропускают элюент в течение  $\sim 12\text{ час}$  для полного оседания. Поверхность столба сорбента должна постоянно быть покрыта растворителем. В случае G-200 желательно помещать на дно колонки тонкий слой крупнозернистого сефадекса G-25, чтобы предотвратить забивание нейлоновой сетки.

Образец наносят следующим образом: крышку открывают и дают растворителю опуститься почти до уровня сорбента. Образец прибавляют по каплям и после его проникновения в слой сорбента приливают небольшое количество элюента для промывания поверхности. Затем наливают большое количество элюента и начинают вымывание, используя незначительное гидростатическое давление.

Равномерное вытекание (результат тщательной набивки), низкая скорость тока ( $10\text{--}50\text{ мл/час}$ ) и небольшой размер частиц геля ( $< 200\text{ меш}$ ) с нужной степенью сшивки — вот необходимые условия успешного фракционирования методом гель-фильтрации.

После вымывания всех растворенных веществ колонка готова для новых экспериментов. Приготовленную колонку с гелем можно использовать для большого числа разделений, особенно если к элюенту прибавить небольшое количество предохраняющих веществ.

Об определении «внешнего» объема  $V_0$  и параметров, необходимых для вычисления величины  $K_d$ , см. [11].

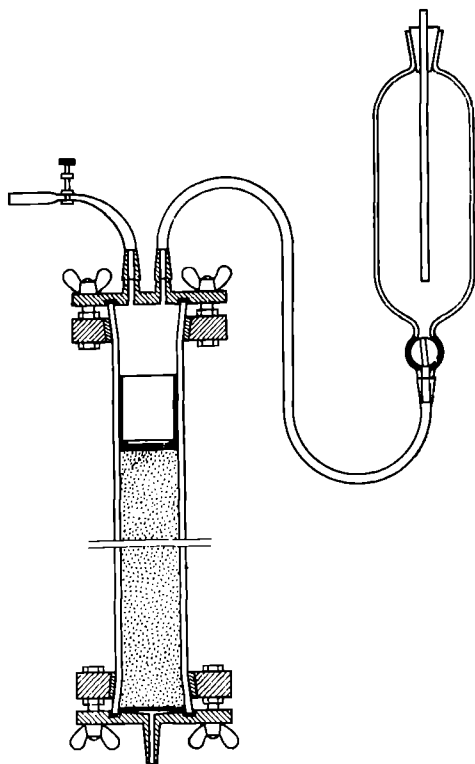


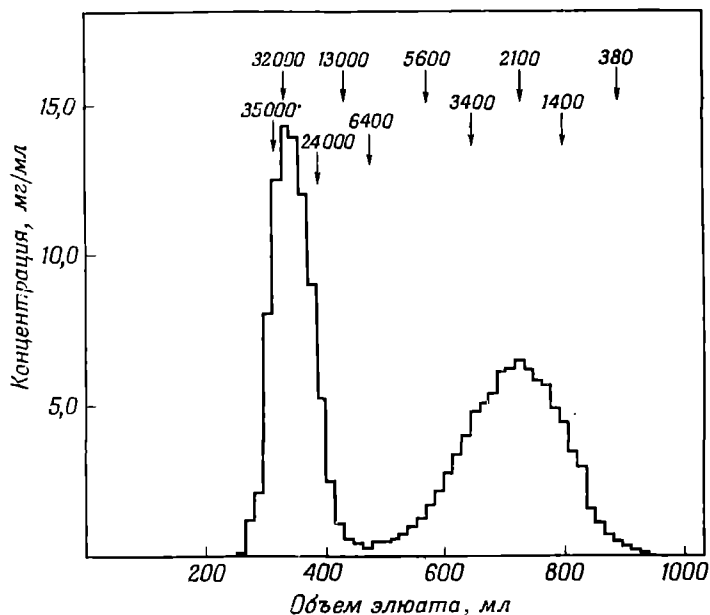
Рис. 1. Устройство колонки для гель-фильтрации.

После вытекания из колонки удерживаемого объема элюата начинают собирать фракции по времени или объему. Концентрацию растворенного вещества в полученных фракциях можно определять непрерывно, измеряя показатель преломления [12], с помощью химического анализа или определяя сухой вес [13]. Декстран в элюате определяют обычно антроновым методом [14] или по сухому весу.

Среднечисловые молекулярные веса  $M_n$  определяют, анализируя концевые восстанавливающие группы фосфатным методом Шомоди [15, 16]. Средневесовые молекулярные веса измеряют методом светорассеяния [17, 21]. Как правило, перед определением молекулярного веса для всех фракций измеряют характеристическую вязкость.

### Результаты и применение

Флодин и Аспберг [9] описали успешное разделение целлодекстринов на сефадексе G-25. Большое число образцов декстрана с различными молекулярными весами ( $M_n$  2200—26 000) было расфракционировано



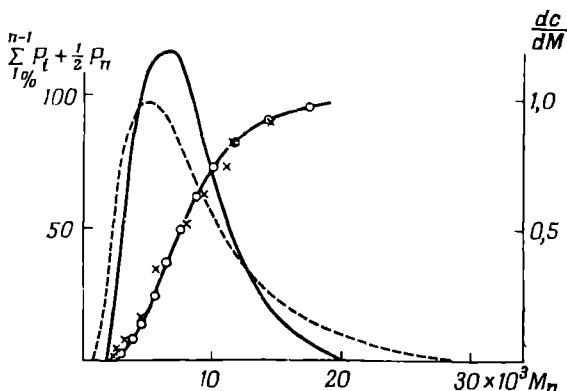
Р и с. 2. Кривая элюирования смеси двух фракций декстрана ( $M_n = 26\,000$  и  $1800$ ) из колонки, содержащей сефадекс G-75. Цифры со стрелками указывают измеренные для ряда фракций величины  $M_n$  [9].

Гранатом и Флодином [10]. Определены предельные размеры молекул, которые можно фракционировать на сефадексах G-25 — G-75 ( $W_r = 2,3-8,7$ ). Эффективность метода гель-фильтрации иллюстрируется разделением смеси двух фракций декстрана (рис. 2).

Недавнее появление более пористых гелей, сефадексов G-100 и G-200 ( $W_r = 10$  и  $20$ ) сделало возможным фракционирование в более широком интервале молекулярных весов. Ниже приводятся результаты ряда экспериментов по разделению с применением этих гелей.



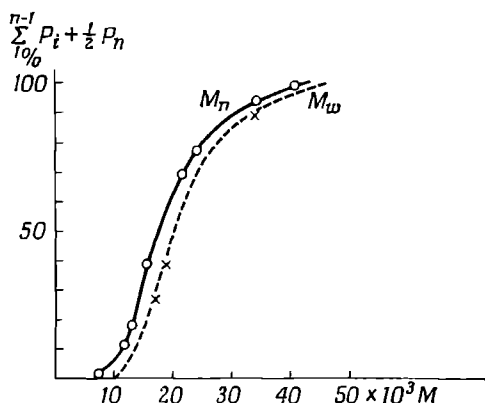
Рис. 3 показывает результаты фракционирования низкомолекулярного декстрана 10 ( $\bar{M}_w = 9400$ ,  $\bar{M}_n = 6200$ ) на сефадексе G-100. Интегральная кривая распределения вычислена по значениям  $M_n$  элюированных фракций. Средневесовой молекулярный вес определен только для



Р и с. 3. Фракционирование декстрана 10 ( $\bar{M}_w = 9400$ ,  $\bar{M}_n = 6200$ ) на сефадексе G-100 с  $W_r = 10,6$ ,  $V_t = 1600$  мл,  $V_0 = 525$  мл; образец: 3 г декстрана в 100 мл.

— интегральное и дифференциальное распределения, вычисленные по экспериментальным значениям, полученным для индивидуальных фракций; - - - распределение Лансинга — Крэмера для исходного декстрана.

двух высших фракций, но отношения  $M_w/M_n$ , равные 1,06 и 1,08 соответственно, указывают на очень хорошее разделение, лучшее, чем описанное Флодином и Гранатом [18] (см. ниже) фракционирование сходного образца декстрана на сефадексе G-75 ( $W_r = 8$ ). Крестиками на рис. 3



Р и с. 4. Распределения  $M_w$  и  $M_n$  для декстрана 20 ( $\bar{M}_w = 22\,700$ ,  $\bar{M}_n = 17\,000$ ), рассчитанные по результатам фракционирования на декстрановом геле с  $W_r = 15,8$ ,  $V_t = 1700$  мл,  $V_0 = 560$  мл. Образец: 4,5 г декстрана в 150 мл.

показан этот последний эксперимент. На основании средних молекулярных весов  $\bar{M}_w$  и  $\bar{M}_n$  для декстрана 10 вычислено логарифмическое распределение (распределение Лансинга — Крэмера).

Рис. 4 иллюстрирует эффективность фракционирования декстрана 20 ( $\bar{M}_w = 22\,700$ ,  $\bar{M}_n = 17\,000$ ) на декстрановом геле с  $W_r = 15,8$ . Экспериментальные условия сходны с условиями предыдущего экспери-

мента. Для фракций были определены значения  $[\eta]$  и  $M_n$ . Интегральное молекулярно-весовое распределение рассчитано по уравнению  $[\eta] =$

$2,43 \cdot 10^{-3} M_w^{0,42}$ , которое применимо для узких фракций частично гидролизованного шведского декстрана [17]. Три величины  $M_w$ , определенные экспериментально и указанные крестиками на рис. 4, хорошо

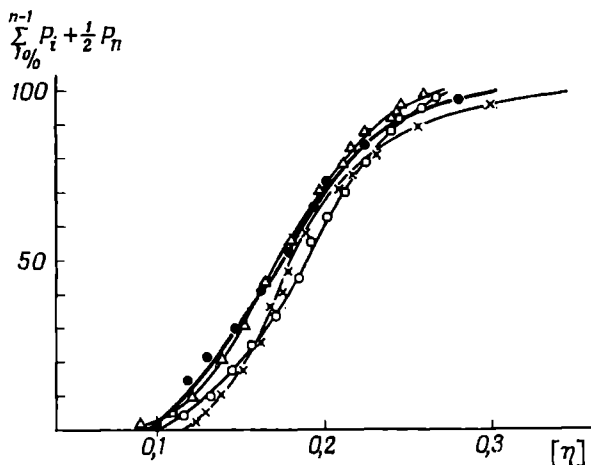


Рис. 5. Интегральные кривые молекулярно-весового распределения клинического образца декстрана реомакродекса.

Кривые рассчитаны по значениям  $[\eta]$ , измеренным для фракций, полученных фракционной экстракцией (●) и гель-фильтрацией на сефадексе: G-100,  $W_r = 11,2$ ,  $V_t = 1700$  мл (○);  $W_r = 15,9$ ,  $V_t = 1700$  мл (Δ); G-200,  $W_r = 20,5$ ,  $V_t = 3000$  мл (×).

совпадают с рассчитанным распределением. Что касается приведенных выше результатов фракционирования, зависимость  $V_e/V_t$  от  $\ln M_n$  линейна во всем интервале молекулярных весов.

Декстран 10 на G-100  $V_e/V_t = 2,84 - 0,56 \ln M_n$

Декстран 20 на G-200  $V_e/V_t = 3,20 - 0,58 \ln M_n$

На рис. 5 приведены интегральные кривые распределения по молекулярным весам для образца клинического декстрана реомакродекса ( $\bar{M}_w = 38\,600$ ,  $\bar{M}_n = 22\,400$ ,  $[\eta] = 0,187$ ), вычисленные по  $[\eta]$  фракций, полученных при фракционной экстракции и при гель-фильтрации на декстрановых гелях с  $W_r = 11,2$ ; 15,8 и 20,5 (G-200). Объем слоя геля сефадекса G-200 был равен 3000 мл, а других сефадексов — только 1700 мл. Во всех случаях использовался раствор 6 г декстрана в 150 мл.

Истинное молекулярно-весовое распределение реомакродекса находится приблизительно в пределах от 10 000 до 100 000. Очевидно, ни один из примененных в этих опытах гелей не обеспечивает фракционирование во всем интервале распределения молекулярных весов реомакродекса. Как и следовало ожидать, в области низких молекулярных весов сильно сшитые гели дают лучшие результаты, чем сефадекс G-200, который обеспечивает хорошее фракционирование в области высоких молекулярных весов. Здесь, по-видимому, гель-фильтрация на G-200 превосходит метод экстракции.

Для получения оптимального разделения в случае широкого молекулярно-весового распределения может понадобиться повторное фракциони-

рование части фракций на другом геле или пропускание образца через колонку со смесью гелей, а также через две (или более) соединенные колонки, характеризующиеся различными значениями набухаемости. В этом направлении проводятся успешные эксперименты.

Руководством к выбору подходящего геля для фракционирования декстрана может служить следующая схематическая таблица:

Интервал молекулярных весов	Тип сепидекса
<1000	G-25
1000—5000	G-50
1000—10 000	G-75
1000—20 000 (50 000)	G-100
10 000—50 000 (70 000)	«G-150»
30 000—100 000 (200 000)	G-200

При повседневном фракционировании образцов декстрана с примерно одинаковым распределением при аналогичных экспериментальных условиях элюиционные кривые могут быть интерпретированы как кривые молекулярно-весаового распределения.

Использование метода гель-фильтрации для фракционирования полисахаридов находится в начальной стадии. Благодаря простоте и скорости выполнения этот метод может стать ценным дополнением к обычным приемам фракционирования. Теоретически гель-фильтрация может применяться для разделения всех растворимых в воде полимеров. Кроме фракционирования декстрана, описано также разделение олигосахаридов ряда мальтозы [19], изомальтозы и целлодекстрина; в нашей лаборатории для фракционирования инулина был успешно применен недавно сепадекс G-75 [20].

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. V, p. 118.
2. Arond L. H., Frank H. P., J. Phys. Chem., **58**, 953 (1954).
3. Gelin L.-E., Ingelman B., Acta Chir. Scand., **122**, 294 (1961).
4. Ingelman B., Halling M., Arkiv Kemi, **1**, 61 (1949).
5. Senti F. R., Hellman N. N., Ludwig N. H., Babcock G. E., Tobin R., Glass C. A., Lamberts B. L., J. Polymer Sci., **17**, 527 (1955).
6. Granath K. A., Makromol. Chem., **28**, 1 (1958).
7. Taylor N. W., Zobel H. F., Hellman N. N., Senti F. R., J. Phys. Chem., **63**, 599 (1959).
8. Porath J., Flodin P., Nature, **183**, 1657 (1959).
9. Flodin P., Asperberg K., Biological Structure and Function, Academic Press Inc., London, England, vol. 1, 1961, p. 345.
10. Granath K., Flodin P., Makromol. Chem., **48**, 160 (1961).
11. Flodin P., Dextran Gels and Their Applications in Gel Filtration, Ph.D. Dissertation, Uppsala University, Uppsala, Sweden, 1962.
12. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. 1, p. 520.
13. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1964, vol. IV, p. 147.
14. Scott T., Melvin E., Anal. Chem., **25**, 1656 (1953).

15. Isbell H., Snyder C., Holt N., Dryden M., J. Research Natl. Bur. Standards, 50, 81 (1953).
16. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 380.
17. Granath K., J. Colloid Sci., 13, 308 (1958).
18. Flodin P., Granath K., IUPAC Symposium über Makromoleküle (Weisbaden, West Germany, 1959), Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Bergstr., Germany, 1959.
19. Nordin P., Arch. Biochem. Biophys., 99, 101 (1962).
20. Granath K., неопубликованные данные.
21. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1964, vol. IV, p. 191.

## Разделения с помощью молекулярных сит

Н. К. Ли, Р. Монтгомери

### ВВЕДЕНИЕ

Скорость диффузии растворенного материала в инертную незаряженную трехмерную структуру зависит как от размера пор этой структуры, так и от размеров молекул диффундирующего вещества. Это явление служит основой для проявления эффекта молекулярных сит [1], который изменяется в тех случаях, когда материал сита содержит ионные группы, как в ионообменных смолах, или при взаимодействии диффундирующего вещества с ситом за счет адсорбции или комплексообразования. С практической точки зрения желательно, чтобы сито имело либо форму мембраны, что используется при проведении диализа (стр. 299) и не будет здесь рассматриваться, либо форму колонки из дискретных частиц. Наиболее удобным материалом для этого последнего применения является сефадекс — поперечно сшитый декстран разной степени пористости. Методика разделения аналогична методике хроматографирования на колонках и называется гель-фильтрацией [2] (см. стр. 273).

Сефадекс набухает в воде и других сильно полярных растворителях с образованием нерастворимого геля. Объем связанного растворителя, приходящийся на 1 г сухого материала, является характеристикой степени сшивки декстрана, которая связана с проницаемостью для молекул растворенного вещества. Колонка с водным гелем, приготовленная из  $a$  г сухого сефадекса, содержит  $V_0$  «внешней» воды и  $V_i$  «внутренней» воды в частицах геля, равное  $aW_r$ , где  $W_r$  — количество воды, связываемое 1 г сухого материала (набухаемость).

Рассмотрим раствор, содержащий моносахарид и полисахарид высокого молекулярного веса, который нанесен на колонку и вымывается со скоростью, обеспечивающей установление равновесия вдоль колонки. Примем также, что вся вода в геле  $V_i$  доступна для диффузии небольших молекул без осложнений такими факторами, как адсорбция, так что моносахарид, свободно распределяясь между связанной и «внешней» водой, выйдет из колонки после протекания  $V_0 + V_i$  элюата. Полисахарид совершенно не диффундирует в гель и появляется на выходе из колонки после протекания соответствующего объема элюата ( $V_0$ ). Любое препятствие для диффузии в гель снижает время удерживания при элюировании.

и исследуемое вещество появляется в какой-то момент, промежуточный между появлением моносахарида и совершенно не задерживающегося полисахарида. Объем  $V_e$  для элюирования этого вещества можно поэтому выразить как

$$V_e = V_0 + K_d V_i,$$

где  $K_d$  — константа, называемая коэффициентом распределения.

Практически найдено, что не вся вода, заключенная в частицах геля, доступна для диффузии низкомолекулярных растворенных веществ; например, для D-глюкозы на сефадексе G-25 константа  $K_d$  равна  $\sim 0,7$ — $0,8$  вместо теоретической единицы. С другой стороны, адсорбция веществ на колонках увеличивает элюирующий объем. На заряженные молекулы влияет ионная сила и pH элюирующего растворителя.

## МЕТОДИКА

### Приготовление геля

200 г порошкообразного (100—200 меш) сефадекса G-25 суспендируют в 2 л воды или разбавленного солевого раствора, оставляют для набухания на 20—30 мин и несколько раз промывают декантацией, выдерживая по 15—30 мин для каждой седиментации.

### Приготовление колонки

Обычную хроматографическую колонку размером  $75 \times 4$  см укрепляют вертикально и наполняют водой. В колонку осторожно опускают скошенную перфорированную фарфоровую пластинку диаметром 3 см, так чтобы она приняла горизонтальное положение. Затем в колонку один за другим помещают два кружка фильтровальной бумаги, диаметр которых на 1 мм больше диаметра фарфоровой пластинки, и дают им опуститься на фарфоровую пластинку. В отверстиях пластинки или между кружками фильтровальной бумаги не должно быть захваченных пузырьков воздуха. В колонку вливают небольшое количество суспензии геля для образования слоя высотой 1—2 см. Затем пропускают растворитель со скоростью 10—20 мл/мин и вливают в колонку 40—60 мл перемешиваемой суспензии геля. Прежде чем осядет главная масса набухших частиц, вливают следующую порцию суспензии и этот процесс повторяют, пока не будет прибавлен весь сефадекс. Поверхность адсорбента делают ровной и горизонтальной и осторожно накрывают двумя тщательно подогнанными кружками фильтровальной бумаги и перфорированной фарфоровой пластинкой диаметром 4 см. Колонку в течение нескольких часов промывают водой или другим элюирующим раствором для ее стабилизации; окончательная высота столба геля 65 см.

Для приготовления колонок с сефадексом можно использовать также непрерывный метод [3]. Большую воронку с помощью длинной (100 см) стеклянной или резиновой трубки, внутренний диаметр которой 2 см, соединяют с верхушкой колонки и суспензию геля прибавляют из воронки, где она непрерывно перемешивается. При скорости протекания жидкости 5—20 мл/мин в колонке образуется отчетливая, постепенно повышающаяся горизонтальная граница осажденного геля.

Если необходимо провести гель-фильтрацию в другом растворе, колонку промывают 2—2,5 л желаемого растворителя, пока элюат по составу не перестанет отличаться от элюента. Эта простая операция позволяет

многократно использовать колонку с одним и тем же гелем в широком интервале условий, отличающихся составом растворителя, ионной силой и рН.

После приготовления новой колонки необходимо испытать однородность набивки. На колонку наносят узкую зону раствора высокомолекулярного вещества, такого, как гликоген или бычий сывороточный альбумин [4], и элюируют в условиях эксперимента. Если колонка набита правильно, образуется узкий и симметричный пик. При использовании гемоглобина [3] однородность колонки можно контролировать визуально.

Если на вышеописанную колонку нанести 5 мл 0,5%-ного раствора гемоглобина в 0,1 М пиридинацетатном буфере с рН 5,5 и элюировать, как описано ниже, то вещество появляется после протекания 360 мл растворителя в трех-четырех фракциях по 20 мл. Раствор вещества, составляющий 10% объема столба адсорбента, не должен в процессе элюирования разбавляться более чем вдвое [3].

### *Нанесение вещества*

Жидкость над слоем адсорбента удаляют возможно полнее, а остатку дают впитаться в гель, пока мениск не коснется поверхности адсорбента. Затем осторожно наносят раствор вещества, не повреждая верхней части адсорбента, и дают ему проникнуть в гель. Стенки колонки промывают несколькими миллилитрами воды (или элюирующего раствора) и снова дают жидкости впитаться в гель. Промывание повторяют, колонку наполняют элюентом и начинают элюирование. Его проводят со скоростью 50—100 мл/час, собирая фракции по 20 мл с помощью автоматического коллектора. После вымывания последнего растворенного вещества колонка готова к следующему фракционированию. Описанная колонка использовалась больше года и все это время сохраняла разделяющую способность. Когда колонка не используется, гель консервируют, прибавляя антисептик, например нитрат фенилртути или толуол. Гель можно стерилизовать кипячением или автоклавированием при 100°.

### *Факторы, влияющие на разделение*

#### **Размер колонки и частиц геля**

Соотношение высоты и диаметра колонки может изменяться от 4:1 до 40:1. Высокое соотношение предпочтительнее для сложных разделений, но для простого обессоливания достаточно 4:1 [3]. Просеянный в сухом состоянии сефадекс дает лучшие результаты, чем непросеянный материал. Наибольшая эффективность колонки достигается при использовании частиц небольшой величины, но мелкие частицы увеличивают падение давления и, следовательно, уменьшают скорость вытекания. Компромиссным является размер 100—200 меш, подходящий для большинства целей<sup>1</sup>.

Размеры пор сефадексов G-25, G-50 и G-75 примерно таковы, что гели не взаимодействуют с веществами, молекулярный вес которых превышает 3500—4500, 8000—10 000 и 40 000—50 000 соответственно. Новейшие типы сефадексов, G-100 и G-200, расширяют этот предел до 200 000. Набухание сефадекса и скорость диффузии растворенных молекул зависят в некоторой степени и от природы растворителя [5].

<sup>1</sup> В настоящее время в продаже имеется просеянный материал, а также сефадекс с частицами шарообразной формы.

### Объем наносимого раствора

Поскольку  $V_e = V_0 + K_d V_i$ , два растворенных вещества с коэффициентами распределения  $K'_d$  и  $K''_d$  на выходе из колонки будут разделены объемом  $V_i(K'_d - K''_d)$ . В случае отделения моносахаридов ( $K_d$  около 0,8) от крупных коллоидных частиц полисахарида ( $K_d = 0$ ) верхний предел объема наносимого образца приблизительно равен 0,8  $V_i$ . На практике найдено, что даже такие простые разделения не бывают полными, если наносимый объем превышает половину теоретической предельной величины или 25% общего объема геля. Для хроматографических разделений применяют гораздо меньшие объемы наносимых растворов, обычно менее 5% объема геля.

### Скорость вытекания

Разделяющая способность при гель-фильтрации возрастает с уменьшением скорости вытекания. Однако до некоторых пределов эта скорость не имеет большого значения. На описанной выше колонке с сефадексом G-25 увеличение скорости вытекания до 120 мл/час не влияет существенно на разделение. Поскольку скорость движения растворителя через колонку с сефадексом падает с уменьшением величины частиц и степени поперечной сшивки, скорость вытекания из колонок, содержащих сефадекс G-50, G-75, а также G-25 мельче 200 меш, обычно не ограничивают.

### Ионные и адсорбционные эффекты

Эффекты отталкивания ионов и ионного обмена проявляются в поведении заряженных растворенных веществ на колонках с сефадексом, например при «проскоке» низкомолекулярных кислых веществ или при адсорбции основных веществ [6]. Эти эффекты наблюдаются только в отсутствие электролитов и исчезают или значительно понижаются, если гель-фильтрацию проводят в разбавленных растворах солей, например в 0,1  $M$  растворе ацетата пиридина, или в 1,0  $M$  уксусной кислоте. В этих случаях перед нанесением вещества колонку промывают проявляющим раствором до равновесия; применение летучих солей или кислот позволяет проводить количественное обессоливание.

Замечено, что присутствие ароматических или гетероциклических групп усиливает адсорбционные эффекты, которые не снимаются изменением pH или ионной силы [6]. Приведенная таблица иллюстрирует поведение ароматических глюкозидов и D-глюкозы на колонке с сефадексом G-25 [13].

Поведение арилглюкозидов на сефадексе G-25  
(элюирующий раствор — 0,02  $M$  раствор сульфата натрия)

Вещество	$K = \frac{V_e - V_0}{V_i}$	Вещество	$K = \frac{V_e - V_0}{V_i}$
D-Глюкоза . . . . .	0,7	$\alpha$ -( <i>n</i> -Питрофенил)-D-глюко-	
$\alpha$ -Метил-D-глюкопиранозид	0,6	зид . . . . .	1,2
Мальтоза . . . . .	0,6	$\beta$ -(2,5-Дихлорфенил)-4-тио-	
$\beta$ -( <i>o</i> -Оксиметилфенил)-D-		D-глюкозид . . . . .	1,8
глюкозид . . . . .	0,8	Диэтилдитиоацеталь L-ара-	
$\beta$ -D-Глюкозид гидрохинона	1,0	бинозы . . . . .	0,8

### Концентрация вещества и вязкость

Если вязкость наносимого раствора веществ низка, концентрация, по-видимому, оказывает незначительное влияние на разделение, кроме тех случаев, когда структура геля может измениться за счет осмотических эффектов. Предельная вязкость равна примерно 10 *сп* [3].

### Применение

Сефадекс применяют для удаления солей из растворов углеводов и для фракционирования по молекулярному весу. Таким способом были освобождены от солей фракции мукополисахаридов после хроматографирования на ЭКТЕОЛА-целлюлозе [7, 8] и продукты периодатного окисления [9]. Описано разделение глюкозы и декстрана в биологических объектах перед определением декстрана [10, 11]. На сефадексе G-25 (200—400 меш) были разделены целлодекстрины до целлогексаозы [12]; тем же способом был проконтролирован  $\alpha$ -амилолиз гликогена [13]. Описано частичное разделение крахмальных декстринов на сефадексе G-75 [14], а также фракционирование декстрана по молекулярному весу [15] (стр. 273). Гель-фильтрация нашла широкое применение при исследовании белков [4] и ферментов [16] и использовалась для выделения гликопептидов из овальбумина [17].

Описано применение ионообменных смол как молекулярных сит для разделения низших олигосахаридов [18, 19]. Возможно использование ионного обмена одновременно с действием молекулярных сит в случае карбоксиметил-, диэтиламиноэтил- и сульфоксиэтил-сефадексов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Flodin P., Porath J., in «Chromatography», E. Heftman, Ed., Reinhold Publishing Corp., New York, N.Y., 1961, p. 328.
2. Porath J., Flodin P., Nature, 183, 1657 (1959).
3. Flodin P., J. Chromatog., 5, 103 (1961).
4. Bennich H., Biochim. Biophys. Acta, 51, 265 (1961).
5. Prath J., Lindner E. B., Nature, 191, 69 (1961).
6. Gelotte B., J. Chromatog., 3, 330 (1960).
7. Ringertz N. R., Reichard P., Acta Chem. Scand., 14, 303 (1960).
8. Ringertz N. R., Acta Chem. Scand., 14, 312 (1960).
9. Chatterjee A. K., Durant G. D., Hendrickson H., Lee Y. C., Montgomery R., Biochem. Biophys. Research Commun., 4, 425 (1961).
10. Oestling G., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 64, 222 (1960).
11. Bill A., Marsden N., Ulfendahl H. R., Scand. J. Clin. and Lab. Invest., 12, 392 (1960).
12. Flodin P., Asperberg K., in «Biological Structure and Function», T. W. Goodwin and O. Lindberg, Eds., Academic Press Inc., New York, N. Y., 1961, p. 345.
13. Montgomery R., Abstracts Papers, Am. Chem. Soc., 139, 10D (1961).
14. Nordin P., Arch. Biochem. Biophys., 99, 101 (1962).
15. Granath K., Flodin P., Makromol. Chem., 48, 160 (1961).
16. Kisliuk R. L., Biochim. Biophys. Acta, 40, 531 (1960).
17. Lee Y. C., Montgomery R., Archiv. Biochem. Biophys., 97, 9 (1962).
18. Jones J. K. N., Wall R. A., Pittet A. O., Can. J. Chem., 38, 2285 (1960).
19. Jones J. K. N., Wall R. A., Can. J. Chem., 38, 2290 (1960).



## Фракционное осаждение спиртом

### Очистка гемицеллюлоз

*Р. Л. Уистлер, Дж. Л. Санелла*

#### ВВЕДЕНИЕ

Гемицеллюлозы часто выделяют из растительного материала или делигнифицированного растительного материала экстракцией водными растворами щелочей. При подкислении полученного экстракта 50%-ной уксусной кислотой до pH 4,5 гемицеллюлоза А выпадает в осадок, а в растворе остается гемицеллюлоза Б — гетерогенная смесь полисахаридов, которую можно осадить, прибавив 3 объема спирта. Удобным методом выделения чистых полисахаридов из разбавленного водного раствора гемицеллюлозы Б служит фракционное осаждение при постепенном прибавлении спирта.

Фракционирование обычно проводят при pH ~ 7,0, при котором полисахариды наиболее устойчивы. При выдерживании гемицеллюлоз в кислой среде может происходить значительный гидролиз гликозидных связей [1], а в растворах оснований наблюдается щелочное расщепление [2]. При pH 7,0 карбоксильные группы уроновых кислот, входящих в состав гемицеллюлоз, находятся в форме ионизованных солей. Иногда хорошее разделение полисахаридов достигается только в кислой среде (pH 2—4), если эти карбоксильные группы не ионизованы. Поскольку при низких значениях pH может происходить гидролиз, разделение лучше проводить с небольшими количествами веществ, быстро и при пониженной температуре.

Рекомендуется ставить предварительные опыты по фракционированию при различных концентрациях водородных ионов для получения сведений о сложности смесей и о значении pH, обеспечивающем наилучшее разделение. График зависимости веса осаждаемого вещества от концентрации спирта (в %) представляет собой характеристическую кривую осаждения для данной смеси. Вертикальные перепады на кривой обусловлены различиями в растворимости компонентов смеси и указывают число разных полисахаридов в растворе.

Другие примеры см. на стр. 336.

#### МЕТОДИКА

##### *Фракционирование небольших количеств*

К 40 мл 2%-ного водного раствора неочищенной гемицеллюлозы Б кукурузной кочерыжки (pH 7), находящегося в центрифужном стакане емкостью 250 мл при температуре водяной бани 25°, прибавляют по каплям при перемешивании спирт до исчезающего помутнения. Через 5 мин взвесь центрифугируют. Осадок промывают несколько раз спиртом, сушат в вакууме и взвешивают. Если удельное вращение чистых компонентов не сильно отличается от удельного вращения смеси, то измерение оптической активности растворов всех осадков позволяет определить их вес с небольшой ошибкой [3]. Надосадочную жидкость после центрифугирования помещают в другой центрифужный стакан и прибавляют по каплям спирт, как описано выше, до появления мути. Нерастворимую фракцию снова отделяют центрифугированием и повторяют процедуру

осаждения, пока концентрация спирта не достигнет 75—80%. Кривая осаждения гемицеллюлозы Б кукурузной кочерыжки имеет три перегиба, указывающих на присутствие трех различных полисахаридов [3].

### **Фракционирование в крупном масштабе**

80 г гемицеллюлозы Б кукурузной кочерыжки растворяют в воде, нейтрализуют разбавленным раствором едкого кали и доводят объем до 4 л. Для предотвращения роста микроорганизмов прибавляют несколько капель 0,05%-ного раствора фенолмеркурацетата. Раствор охлаждают до 5° и оставляют стоять в течение ночи. Образовавшийся хлопьевидный осадок отделяют центрифугированием, лучше в центрифуге непрерывного действия. Затем к энергично перемешиваемому раствору при 25° прибавляют по каплям спирт до появления мути. Суспензию выдерживают 6—10 час при 5° и центрифугируют. Повторное прибавление спирта при 25° до появления осадка, выдерживание при 5° и центрифугирование продолжают до тех пор, пока концентрация спирта в растворе не достигнет ~80%.

Осажденные фракции последовательно промывают в гомогенизаторе Уоринга 75, 95 и 99,9%-ным спиртом, затем смачивают абсолютным эфиром, фильтруют на воронке Бюхнера и сушат в вакуум-эксихаторе над пятиокисью фосфора. Нужно принимать предосторожности против конденсации на веществах атмосферной влаги. Так, не следует просасывать воздух через остаток полисахарида на воронке или держать вещество на воздухе дольше, чем необходимо (см. стр. 304).

### **Выделение однородного полисахарида**

Для каждой фракции определяют количественный моносахаридный состав и содержание уоновых кислот. Однородность веществ определяют методом электрофореза с подвижной границей в боратном буфере (см. стр. 411). Соседние фракции одинакового состава, гомогенные по данным электрофореза, объединяют, считая чистой индивидуальной гемицеллюлозой.

Для получения полностью однородного вещества часто необходимо повторное фракционирование.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Lauterbach G. E., Ph. D. Thesis, Purdue University, Lafayette, Indiana, 1958.
2. Whistler R. L., BeMiller J. N., Advances in Carbohydrate Chem., **13**, 289 (1958).
3. Whistler R. L., Lauterbach G. E., Arch. Biochem. Biophys., **77**, 62 (1958).

## **Фракционирование с использованием медных комплексов**

*Дж. К. Н. Джонс. Р. Дж. Студли*

### **ВВЕДЕНИЕ**

Соли двухвалентной меди широко используются для фракционирования смесей полисахаридов. Обычно применяется раствор Фелинга, а также растворы куприэтилендиамина [1], хлористой [2], сернохлористой [3]

и уксуснокислой [4] меди. В большинстве случаев прибавляют избыток осадителя и нерастворимый «медный комплекс полисахарида» разлагают спиртовым раствором кислоты или хелатообразующим агентом.

Описано два общих метода, пригодных для очистки полисахаридов. Первый из них, предусматривающий использование раствора Фелинга, часто приводит к успеху при фракционировании полимеров, содержащих D-маннозу и D-ксилозу. Второй метод, предусматривающий использование ацетата двухвалентной меди и спирт, был впервые применен Эрскином и Джонсом [5] для разделения смесей кислых и нейтральных полисахаридов. Последний вариант особенно удобен, так как легко дает чистые нейтральные фракции.

## МЕТОДИКА

### *Фракционирование с помощью раствора Фелинга (см. также стр. 378 и 382)*

1,0 г полисахарида растворяют в 100 мл воды или раствора едкого натра; в случае необходимости раствор фильтруют. К раствору полимера прибавляют реактив Фелинга<sup>1</sup> до полного осаждения «медного комплекса». Следует избегать введения большого избытка раствора Фелинга, так как осажденный «медный комплекс» иногда растворяется в избытке реагента. Через 4 час осадок (фракция А) отфильтровывают, промывают водой и разлагают, растирая при 0° в течение 1 мин со спиртом, содержащим 5% (по объему) концентрированной соляной кислоты. Остаток промывают спиртом до отрицательной реакции на хлор-ион. Хлорид меди(II) растворяется в ацетоне с образованием интенсивно желтого раствора. Поэтому промывание ацетоном будет указывать на наличие или отсутствие хлорида меди(II). Фильтрат после отделения фракции А нейтрализуют уксусной кислотой и диализуют (стр. 299) 24 час против водопроводной воды. Диализат концентрируют в вакууме до небольшого объема и выливают в спирт, охлажденный до 0°; выпавший в осадок полисахарид (фракция Б) отфильтровывают.

Выделенные этим методом фракции обычно загрязнены друг другом, поэтому для получения чистых компонентов часто бывает необходимо провести несколько осаджений [6].

### *Фракционирование с помощью ацетата меди(II) и спирта*

1,0 г полисахарида растворяют в 100 мл воды или раствора едкого натра; в случае необходимости раствор фильтруют. К фильтрату прибавляют 7%-ный раствор ацетата меди до полного осаждения «медного комплекса». В некоторых случаях осадка не образуется. Тогда к раствору прибавляют спирт до появления осадка, который (фракция А) отделяют центрифугированием. К центрифугату приливают следующий объем раствора ацетата меди, равный предыдущему, и затем спирт до начала осаждения. Нерастворимый материал (фракция Б) отделяют центрифугированием. К маточному раствору прибавляют избыток спирта для осаждения остав-

<sup>1</sup> Этот реактив получают смешиванием равных объемов растворов А и Б. Раствор А готовят, растворяя 34,6 г сульфата меди(II) в воде, содержащей несколько капель серной кислоты, и разбавляя до 500 мл. Для приготовления раствора Б 60 г едкого натра и 173 г тетрагидрата виннокислого калия — натрия растворяют в воде и разбавляют до 500 мл.

шегося полисахарида (фракция В), который также отделяют. Фракции перемешивают в течение 1 мин при 0° в гомогенизаторе Уоринга со спиртом, содержащим 5% (по объему) концентрированной соляной кислоты. Полисахариды промывают спиртом до удаления хлор-иона.

Если эта методика приводит к разделению, то отдельные фракции переосаждают до получения чистых компонентов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bishop C. T., Adams G. A., Hughes E. O., Can. J. Chem., 32, 999 (1954).
2. Amin E. S., J. Chem. Soc., 1955, 282.
3. Hirst E. L., Dunstan S., J. Chem. Soc., 1953, 2332.
4. Easterby D. G., Jones J. K. N., Nature, 165, 614 (1950).
5. Erskine A. J., Jones J. K. N., Can. J., Chem., 34, 821 (1956).
6. Chanda S. K., Hirst E. L., Jones J. K. N., Percival E. G. V., J. Chem. Soc., 1950, 1289.

## Фракционное осаждение четвертичными аммонийными солями

Дж. Е. Скотт

### ВВЕДЕНИЕ

Катионные детергенты, такие, как цетилтриметиламмоний (ЦТА) и цетилпиридиний (ЦП), образуют с полианионами соли, очень мало растворимые в воде [1, 2]. Нейтральные полисахариды не вступают в эту реакцию; исключением являются условия, в которых могут образоваться боратные комплексы (см. [12]), и высокие значения рН, когда часть гидроксильных групп ионизована. Поэтому кислые полисахариды легко отделяются от нейтральных осаждением реагентами типа бромистого цетилтриметиламмония [1] из кислого, нейтрального или слабощелочного раствора. Осадки растворяются в некоторых органических растворителях и растворах солей [11]. Белки осаждаются при значениях рН, более щелочных по отношению к их изоэлектрической точке.

### МЕТОДИКА

#### Осаждение и отделение осадка

Не рекомендуется в качестве осадителей использовать продажные препараты антисептиков на основе бромистого цетилтриметиламмония или хлористого цетилпиридиния. Лучше применять возможно более чистые вещества; так, обычно используют реактивы, содержащие не менее 95% главного компонента. В отдельных случаях полезно перекристаллизовать реактив из ацетона или воды.

К раствору полисахарида, в который для ускорения агрегации осадка введено небольшое количество (0,02 моль/л или менее) сульфата натрия, прибавляют избыток хлористого цетилпиридиния (ХЦП) или бромистого цетилтриметиламмония (БЦТА) в виде 1—10%-ного водного раствора.

Оптимальная концентрация раствора полисахарида лежит в пределах 0,1—1% (вес/об.); как правило, необходимо прибавить не более 3 мг четвертичной аммонийной соли ( $QN^+$ ) на 1 мг полисахарида.

Для агрегации осадка требуется несколько минут, ее лучше проводить при слабом нагревании (например, до 37°). Осадки низкомолекулярных полисахаридов с малой плотностью заряда приходится иногда оставлять на ночь.

Концентрация посторонних электролитов, кроме прибавленного сульфата натрия, должна быть минимальной, чтобы избежать растворения осадка (см. ниже). Часто можно обойтись без сульфата натрия как коагулянта осадка, если полисахарид титруют до образования хлопьев [1]. Если образовался значительный хлопьевидный осадок, то конец титрования трудно определить из-за мутности раствора; нужно отцентрифугировать осадок и прибавить новое количество четвертичной аммонийной соли ( $QN^+$ ). Увеличение мутности будет указывать, что осаждаемый полисахарид еще присутствует в растворе.

Для отделения осадка обычно достаточно центрифугирования при 3000 об/мин в течение нескольких минут. В случае разбавленных растворов или очень устойчивых суспензий тонкие частицы можно собрать на фильтре из Гифло-суперцеля. Удобно помещать слой Гифло-суперцеля толщиной 2—10 мм на стеклянную фильтровальную бумагу, находящуюся в свою очередь на пористом стеклянном фильтре № 1. При фильтровании можно применять отсасывание, хотя энергичное отсасывание может вызвать проскок осадка через фильтр, особенно в случае более концентрированных суспензий. Корн [4] нашел, что небольшие количества осадков можно отделять адсорбцией на целите. Целит в течение нескольких минут осторожно перемешивают с суспензией осадка и затем центрифугируют. Для регенерирования осажденного полисахарида целит экстрагируют подходящим растворителем.

### *Выделение полисахарида из комплекса*

Методы разложения комплексов и регенерирования полисахаридов распадаются на 3 группы в зависимости от того, растворяется ли полисахаридный комплекс в растворах солей, в органических растворителях или не растворяется вовсе.

#### **Комплекс, растворимый в растворах солей**

Применяется перемешивание при 37° с концентрированными (4M) растворами хлористого натрия или хлористого калия. Для полного растворения высокомолекулярных веществ необходимо 24—48 час. Если комплекс не растворяется в этих условиях, маловероятно, чтобы осадок удалось растворить в каком-либо солевом растворе. Если же осадок растворим, появляются две возможности.

а) Полисахарид осаждают непосредственно в виде соли катиона, используемого в растворяющем электролите, прибавлением 3—5 объемов спирта. Четвертичная аммонийная соль ( $QN^+$ ) остается в маточнике. Рекомендуются провести повторное растворение в растворе электролита и последующее осаждение спиртом, чтобы удалить последние следы  $QN^+$ . Если электролит недостаточно растворим в спирте, часть его может соосаждаться вместе с полисахаридом. Соосаждение это можно уменьшить, применяя наименьшую возможную концентрацию электролита для растворе-

ния комплекса, что достигается, например, разбавлением раствора электролита, содержащего комплекс, водой до начала выпадения комплекса.

б) Четвертичный аммонийный ион ( $QN^+$ ) можно удалить из раствора: 1) осаждением иодидом или тиоцианатом, причем лишь очень небольшие количества  $QN^+$  остаются в растворе; 2) адсорбцией на фуллеровой земле (адсорбент прибавляют небольшими порциями при энергичном встряхивании до исчезновения устойчивой пены) и 3) экстракцией органическими растворителями, такими, как *n*-бутиловый и амиловый спирты, хлороформ. После одной экстракции амиловым спиртом в водной фазе остаются лишь небольшие количества  $QN^+$ . Эмульсии, которые могут образоваться при экстракции, легко разрушить центрифугированием при небольших скоростях. Полисахарид можно выделить, например, диализом (см. стр. 299) и лиофилизацией (см. стр. 302).

#### Комплекс, растворимый в органических растворителях

Наиболее пригодными растворителями являются пропанол или слегка подогретый (до  $37^\circ$ ) этанол. Прежде чем пытаться растворить полисахаридный комплекс в органических растворителях, его нужно отмыть от неорганических солей. Полисахарид осаждают, прибавляя к раствору неорганическую соль. Лучше использовать спиртовой или очень концентрированный водный раствор соли, чтобы сохранить максимальной концентрацию органического растворителя. Наиболее удобными неорганическими электролитами являются ацетат натрия, иодистый натрий, тиоцианат натрия и хлористый кальций. Получаемый полисахарид представляет собой соль неорганического катиона. В виде свободной кислоты полисахарид можно осадить прибавлением сильной минеральной кислоты, например соляной.

#### Комплекс, нерастворимый в водных растворах солей и органических растворителях

Такие комплексы образуют гуминовые кислоты [5] и карагенан [6]. В этом случае  $QN^+$  обменивают на неорганический катион в органическом растворителе. Тонко измельченный осадок комплекса встряхивают в течение нескольких часов с насыщенным раствором неорганического электролита в спирте, лучше при небольшом нагревании. Нерастворимый полисахарид отделяют центрифугированием; маточный раствор отбрасывают и заменяют свежим спиртовым раствором электролита. Ионный обмен проводят еще несколько часов, после чего он практически заканчивается. Осадок промывают несколько раз спиртом для удаления неорганической соли. В результате получают соль полисахарида с катионом неорганического электролита.

Эта методика применима почти ко всем  $QN^+$  — полисахаридным комплексам.

#### Фракционирование кислых полисахаридов

Для фракционирования полисахаридов в виде четвертичных аммонийных ( $QN^+$ ) солей используют два различных подхода: а) фракционное осаждение при возрастающих концентрациях амина и б) фракционное осаждение в присутствии различных концентраций неорганических электролитов.

### Возрастающая концентрация амина

Фракционное осаждение, основанное на изменениях концентрации амина, до сих пор выполняется эмпирически. Раствор  $QN^+$  при достаточно эффективном перемешивании медленно прибавляют к раствору полисахарида. Если образуется осадок, который можно отфильтровать или отцентрифугировать, его удаляют, а к маточному раствору прибавляют новые количества  $QN^+$ . Осадки отделяют по мере их образования. Полисахариды, осаждающиеся в первую очередь, имеют наибольшую плотность заряда и более высокий молекулярный вес. Последующие осадки содержат полисахариды с меньшими плотностями заряда и (или) меньшим молекулярным весом.

Методика воспроизводима, если остаются постоянными концентрации реагирующих веществ; порядок образования различных фракций не зависит от концентрации, но, если концентрации значительно различаются, отдельные фракции могут не совпадать по составу.

### Изменяющиеся концентрации неорганического электролита

Растворимость  $QN^+$ -комплексов в солевых растворах резко меняется от очень низкого до очень высокого значения при критической концентрации электролита (ККЭ). Значение ККЭ зависит от химической природы полисахарида, главным образом от типа и расположения кислотных группировок. Комплексы полисахаридов, содержащих сульфогруппы, например карагенан, требуют для растворения гораздо больших концентраций солей, чем комплексы полисахаридов, имеющих только карбоксильные группы, такие, как альгиновая кислота (см. таблицу).

### Критические концентрации электролитов для цетилпиридиниевых комплексов

	KCl	MgCl <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	NaCl
Пектин . . . . .	0,14	0,04	0,03		0,13
Гиалуронат . . . . .	0,22	0,19	0,15	0,22	0,21
Альгинат . . . . .	0,33	0,30	0,60		0,38
Полиакрилат . . . . .					0,46
Полиглутамат . . . . .					0,475
ДНК . . . . .	0,36	0,35	0,75	0,35	0,45
Хондроитинсульфат . . . . .	0,9	1,00		≥0,7	
Гепарин, 28 ед/мг . . . . .	0,95				
Гепарин, 75 ед/мг . . . . .	1,10				
Гепарин, 100 ед/мг . . . . .	1,20				1,55
Декстрансульфат I (низкий мол. вес) . . . . .	1,00	4,1			1,75
Декстрансульфат II (высокий мол. вес) . . . . .	2,00	>4			2,9
Карагенан . . . . .	>2,5	>4		≥0,7	

Другими факторами, влияющими на ККЭ, являются молекулярный вес полисахарида [11], химическая природа детергента [11] и природа элек-

тролита [11]. ККЭ в весьма широких пределах не зависит от концентрации полисахарида или четвертичного аммонийного основания.

Значение ККЭ несколько возрастает с ростом температуры. В случае цетилпиридиниевого комплекса гепарина в интервале температур от 20 до 60° оно увеличивается при увеличении концентрации раствора хлористого натрия от 1,5 до 1,6 моль/л. Чтобы избежать небольших изменений за счет этого эффекта и гарантировать, что  $QN^+$  остается в растворе в процессе фракционирования, лучше проводить процесс при контролируемой и слегка повышенной температуре (например, при 30°).

Состав фракций воспроизводим и зависит от концентрации электролита при заданных  $QN^+$  и электролите [11]. Для справок приводится таблица, в которой даны критические концентрации электролитов для различных полисахаридов.

Имеются три практические методики:

1. Осадок, содержащий смесь полисахаридов, экстрагируют растворами электролитов возрастающей концентрации. Этот способ может дать удовлетворительные результаты при обработке объемистого осадка, но лучше воспользоваться им, когда осадок распределен на поверхности инертного носителя [7] (см. стр. 264). Корн элюировал осадок с целита [4].

2. К раствору, содержащему смесь двух или более полисахаридов, прибавляют электролит до необходимой концентрации, и те компоненты смеси, которые при этой концентрации электролита дают нерастворимые комплексы, осаждают 10%-ным (вес/об.) водным раствором бромистого цетилтриметиламмония (БЦТА) или хлористого цетилпиридиния (ХЦП). Необходимое общее количество прибавляемого ХЦП можно рассчитать, исходя из того, что на 1 мг смеси полисахаридов необходимо 3 мг ХЦП, и, кроме того, на 1 мл раствора, в котором осаждается полисахарид, необходимо 0,5 мг ХЦП. В концентрированных растворах электролитов осадки обычно всплывают. Их отделяют фильтрованием через Гифло-суперцель или центрифугированием в присутствии целита или Гифло-суперцеля [4]. Гиалуроновая кислота отделяется этим способом от хондроитинсерной кислоты в 0,2 М сульфате натрия или в 0,05 М серной кислоте. Гепарин почти полностью отделяется от хондроитинсерной кислоты в 0,9—1,0 М растворе хлористого калия.

3. К раствору смеси полисахаридов прибавляют электролит до концентрации, достаточной для предотвращения осаждения  $QN^+$ -комплексов всех компонентов. Затем прибавляют ХЦП или БЦТА из расчета 3 мг на 1 мг полисахарида плюс 0,5 мг на 1 мл общего объема раствора, в котором проводится осаждение.

Раствор постепенно разбавляют 0,05%-ным ХЦП, который прибавляют медленно и при перемешивании. Осадки отбирают по мере их появления одним из описанных выше способов. Осадки, появляющиеся в первую очередь, содержат полисахариды с более высоким молекулярным весом и большей плотностью заряда (см. таблицу).

### Осаждение нейтральных полисахаридов

Нейтральные полисахариды можно осадить в виде боратных комплексов или в виде «алкоголятов», образующихся за счет ионизации гидроксильных групп при высоких рН [8—10].

Осаждение боратных комплексов зависит от рН и конфигурации гликольных групп. *цис*-Гликоли, присутствующие, например, в маннах дрожжей или слоновьего ореха, образуют комплексы, осаждающиеся при



$\text{pH} < 8,5$ . Другие группировки, дающие комплексы с боратом, например в гликогене, ламинаране (и поливиниловом спирте), осаждаются при еще более щелочном  $\text{pH}$  (9,10).

Осаждение проводят в присутствии 0,33%-ного боратного буфера [8]; применение бората цетилтриметиламмония [9, 10] устраняет возможные искажения, вносимые боратым буфером.

Осадки растворимы в разбавленной уксусной кислоте, в растворах солей и в водных растворах глицерина и D-галактозы.

Баркер и сотрудники отделили гликоген от дрожжевого маннана: при  $\text{pH}$  8,5 маннан выпадает в осадок. Гликоген был отделен от инулина при  $\text{pH}$  10,0; инулин остается в растворе [8].

Боувенг и Линдберг [10] с помощью бората цетилтриметиламмония разделили два сходных арабиногалактана древесины лиственницы.

Нейтральные полисахариды осаждаются  $\text{QN}^+$  в растворах едкого натра или кали [8, 9]; в этих условиях можно осадить почти любой нейтральный полисахарид. Но это явление не нашло практического использования. Осадки растворимы в растворах электролитов, но не растворяются в водных растворах D-галактозы или глицерина.

В щелочных условиях, необходимых для образования боратных комплексов, осаждаются многие белки. Их следует удалить ферментативным гидролизом (см. стр. 364, 367) или осаждением трихлоруксусной или хлорной кислотой перед фракционированием с помощью  $\text{QN}^+$  в растворе бората. По-видимому, возможно разделение ряда нейтральных полисахаридов в виде алкоголятов или боратных комплексов с использованием явления критической концентрации электролита.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Scott J. E., *Chem. and Ind. (London)*, 1568 (1955).
2. Jones A. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 607 (1953).
3. Bera B. C. F., Foster A. B., Stacey M., *J. Chem. Soc.*, 1955, 3788.
4. Korn E. D., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1325 (1958).
5. Davies R. I., Coulson C. B., Luna C., *Chem. and Ind. (London)*, 1544 (1957).
6. Green M., Lowther D., Jackson D., Scott J. E., неопубликованные данные.
7. Antonopoulos C. A., Borelius E., Hamström B., Gardell S., Scott J. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **54**, 213 (1961).
8. Barker S. A., Stacey M., Zweifel G., *Chem. and Ind. (London)*, 330 (1957).
9. Palmstierna H., Scott J. E., Gardell S., *Acta Chem. Scand.*, **11**, 792 (1957).
10. Bouveng H. O., Lindberg B., *Acta Chem. Scand.*, **12**, 1977 (1958).
11. Scott J. E., *Methods of Biochem. Anal.*, **8**, 145 (1960).

## Фракционирование осаждением гидроокисью бария

Х. Мейер

### ВВЕДЕНИЕ

Широко используемый метод фракционирования и очистки полисахаридов заключается в осаждении их в виде нерастворимых комплексов с металлами. Среди ряда комплексобразующих металлов наибольшее применение имеет, по-видимому, медь (раствор Фелинга) [1] (стр. 286). Эварт и Чэпмен [2] предложили использовать для идентификации камедей гидроокись бария. Авторы показали, что многие камеди можно осадить насыщенным раствором гидроокиси бария. Впоследствии было найдено, что этот реагент особенно пригоден для осаждения и очистки полисахаридов, содержащих  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-связанные остатки D-маннозы, и для их отделения от ксиланов или, наоборот, для освобождения ксиланов от маннанов [3—8]. Затем он был использован для очистки галактана с главной цепью из  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-связанных остатков D-галактозы [9].

Глюкоманнаны и галактоглюкоманнаны древесины, а также маннан слоновьего ореха, галактоманнан (гуаран) и, вероятно, многие другие маннаны полностью осаждаются из водных растворов при концентрации гидроокиси бария ниже 0,03 моль/л. 4-О-Метилглюкуроноксиланы древесины лиственных пород не выпадают в осадок, пока концентрация гидроокиси бария не достигнет 0,15 моль/л. 4-О-Метилглюкуроноарабиноксиланы и арабиногалактаны древесины хвойных растений вообще не осаждаются гидроокисью бария. Частично ацетилированные глюкоманнаны или 4-О-метилглюкуроноксиланы осаждаются не сразу, а только после проходящего сначала дезацетилирования.

Ниже даются две методики: одна для полисахаридов, растворимых в воде [10], и другая для полисахаридов, растворимых в растворах щелочей [8].

### МЕТОДИКИ

#### *Очистка растворимого в воде галактоглюкоманнана из древесины ели [10] (см. также стр. 353)*

70 г неочищенного галактоглюкоманнана, содержащего ~4% остатков L-арабинозы и 11% остатков D-ксилозы, растворяют в 3,5 л воды и прибавляют 1,5 л насыщенного раствора гидроокиси бария до полного осаждения. Осадок отделяют центрифугированием, промывают разбавленным раствором гидроокиси бария и растворяют в 1 л 2 н. уксусной кислоты. Раствор выливают при перемешивании в 4 л спирта. Осадок после центрифугирования промывают на центрифуге 2 раза 80%-ным спиртом, 4 раза абсолютным спиртом, 2 раза эфиром и сушат при уменьшенном давлении; выход 50 г. В гидролизате галактоглюкоманнана обнаруживаются только следы L-арабинозы и D-ксилозы. Если одно осаждение не дает удовлетворительной очистки, процедуру можно повторить.

#### *Очистка растворимого в щелочи глюкоманнана из коры пихты (Abies amabilis) [8] (см. также стр. 355)*

45 г неочищенного глюкоманнана растворяют в 1 л 10%-ного раствора едкого натра и по каплям прибавляют 2 л 5%-ного раствора октагидрата

гидроокиси бария. Вместо гидроокиси бария можно использовать насыщенные растворы хлористого или уксуснокислого бария. Осадок промывают дважды 5%-ным раствором едкого натра, подкисляют уксусной кислотой, прибавляют к 5 л спирта, центрифугируют и промывают, как описано в первой методике; выход 42 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Salkowski E., Z. physiol. Chem., **34**, 162 (1901); *ibid.*, **35**, 240 (1902).
2. Ewart M. H., Chapman R. A., Anal. Chem., **24**, 1460 (1952).
3. Meier H., Acta Chem. Scand., **12**, 144 (1958).
4. Meier H., Acta Chem. Scand., **12**, 1911 (1958).
5. Hamilton J. K., Thompson N. S., Pulp Paper Mag. Can., **59** [10], 233 (1958).
6. Gyaw M. O., Timell T. E., Can. J. Chem., **38**, 1957 (1960).
7. Timell T. E., Svensk Papperstidn., **63**, 472 (1960).
8. Timell T. E., Svensk Papperstidn., **64**, 651 (1961).
9. Bouveng H. O., Meier H., Acta Chem. Scand., **13**, 1884 (1959).
10. Meier H., Acta Chem. Scand., **14**, 749 (1960).

## Зонный электрофорез

Качественное, количественное и препаративное электрофоретическое разделение нейтральных полисахаридов

*Д. Х. Норткот*

### ВВЕДЕНИЕ

Качественный и количественный микроанализ смесей нейтральных полисахаридов можно провести с помощью электрофореза этих веществ в боратном буфере [1, 2]. Электрофоретическое разделение можно применять также в большом масштабе для получения индивидуальных полисахаридов из смеси [3]; при этом используют колонку, аналогичную описанной Поратом [4]. Выходы при таких разделениях вполне удовлетворительны и в препаративных методах достигают 90% [5].

Боратный буфер и полисахарид образуют несущий отрицательный заряд комплекс [1, 6], который, как можно ожидать, будет двигаться в аппарате Тизелиуса к аноду [1] (см. также стр. 411). Однако на полосках носителя и в колонках со стеклянным порошком при pH 9,3 электроэндоосмос настолько велик, что приводит к перемещению веществ в направлении к катоду.

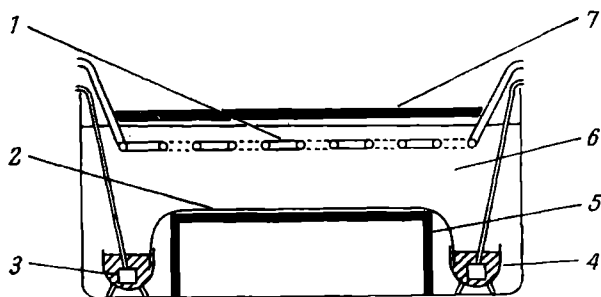
### МЕТОДИКА

#### *Качественные и количественные методы*

На полосках носителя размером 15 × 45 см в 10 см от одного края (анода) отмечают карандашом стартовую линию и места нанесения исследуемого вещества и «свидетеля». «Свидетелями» могут служить: а) очищенные полисахариды, наличие которых в смеси предполагается; б) полисахариды, которые не входят в состав смеси.

риды, служащие стандартом, например дрожжевой маннан, которые позволяют сравнить подвижность веществ в отдельных опытах с подвижностью стандартного полисахарида; в) неподвижный «свидетель», такой, как 2,3,6-три-О-метил- $\beta$ -глюкоза, который не будет образовывать боратного комплекса и поэтому не будет двигаться в электрическом поле, но будет указывать электроэндоосмотический ток буфера по носителю в направлении катода.

Полоску опрыскивают боратым буфером (0,1 *M* раствор десятиводного тетрабората натрия, pH 9,3) с каждой стороны, подвешивают для стекания избыточной жидкости, затем кладут на лист чистого стекла поверх двух стеклянных палочек, так чтобы стартовая линия была приподнята



Р и с. 1. Прибор для электрофореза на полосках носителя.

1 — змеевик холодильника; 2 — полоска носителя; 3 — платиновый электрод; 4 — электродное пространство; 5 — стеклянная рама; 6 — толуюл; 7 — стеклянная пластинка.

над стеклом и не прикасалась к палочкам. Исследуемую смесь в виде раствора в воде, боратном буфере или водного раствора с pH 9,3 наносят на полоску носителя из тонкой пипетки, так чтобы 5—10  $\mu$ л раствора, содержащего 10—50  $\gamma$  вещества, образовали на влажном носителе вдоль стартовой линии возможно более узкую полоску длиной не более 5 см.

Полоску носителя подвешивают горизонтально в ванне для электрофореза, как показано на рис. 1. Два электродных пространства содержат каждый приблизительно по 250 мл буфера (0,1 *M* раствор  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , pH 9,3); охлаждающей жидкостью служит водопроводная вода.

Для количественных исследований в качестве носителя используют чистый отбеленный шелк (весом  $\sim 9$  мг/см<sup>2</sup>) [2]. Его тщательно промывают в горячей воде с мылом, затем в нескольких сменах воды и сушат. Промывание необходимо, чтобы снизить последующий фон при колориметрических определениях. После электрофореза при 2000 в (поскольку эффективная длина полоски  $\sim 40$  см, градиент напряжения составляет приблизительно 50 в/см) и  $\sim 25$  ма в течение 90 мин полоску носителя вынимают и сушат на воздухе. Ее разрезают по длине на полоски шириной 5 см, соответствующие нанесенным полисахаридам, и каждую полоску разрезают на сегменты шириной 1 см. Сегменты нумеруют последовательно от анодного конца полоски к катодному. Из каждого сегмента вещество элюируют водой в тщательно вымытые пронумерованные градуированные пробирки и все элюаты разбавляют водой до объема 1,5 мл. В каждую пробирку прибавляют по 3,0 мл сульфированного  $\alpha$ -нафтола (раствор 0,4 г 1-нафтола в 100 мл концентрированной серной кислоты выдерживают 8 час в темноте при комнатной температуре) [7]. В процессе смешивания

растворы охлаждают, а затем нагревают 30 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения определяют поглощение растворов при 555 мк. Строят график, отражающий изменение поглощения в зависимости от расстояния от анода, т. е. от номера пробирки. Пики на графике указывают положение зон полисахаридов.

Подвижности измеряют, сравнивая расстояние между центром зоны полисахарида и зоны двигавшейся параллельно 2,3,6-три-О-метил- $\beta$ -глюкозы. Триметилглюкозу можно обнаружить на шелке после опрыскивания 1%-ным раствором *n*-анизидина в смеси равных объемов влажного *n*-бутанола и уксусной кислоты и 15-минутного нагревания при 100°. Количество полисахарида в каждой зоне можно вычислить, разделив общее поглощение данного пика на поглощение, соответствующее 1 мкг исследуемого полисахарида.

При качественных исследованиях носителем может служить бумага из стекловолокна, например стеклянная бумага ватман GF/A [2, 8]. При разметке этой бумаги ее не следует линовать, так как это будет вызывать разрывы вдоль нанесенных линий. Стартовую линию можно указать пунктиром. Электрофорез проводят при 33 в/см и 140 ма в течение 45 мин. Для обнаружения полисахаридов применяют опрыскивание воздушно-сухой полоски с обеих сторон реагентом, содержащим 1 г *n*-анизидина и 2 мл концентрированной серной кислоты в 100 мл влажного *n*-бутанола, и 15-минутное нагревание при 100°. Полисахариды образуют пурпурные зоны.

### ***Препаративный зонный электрофорез на колонках со стеклянным порошком [3]***

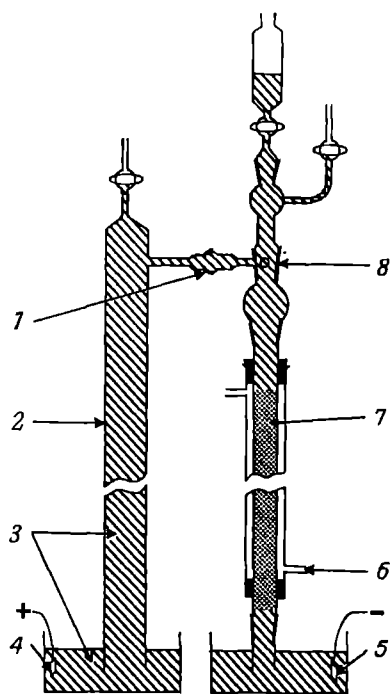
Колонку наполняют порошком, приготовленным из стеклянной ваты. Стеклянную пропитанную водой вату разрезают на куски длиной 1—2 см и растирают под слоем воды в механической ступке до получения однородной массы; затем водную суспензию размалывают 3 час в шаровой мельнице. Образовавшийся тонкий порошок промывают водой и фракционной седиментацией отделяют очень мелкие и относительно крупные частицы. Размер частиц полученного порошка варьирует от 12—20  $\times$  14—17 мк до 28—140  $\times$  14—17 мк.

Электрофоретическую колонку размером 2,5  $\times$  100 см наполняют стеклянным порошком до высоты 80 см (объем 330 мл); поскольку при этом требуется 172 мл стеклянного порошка, на каждый сантиметр длины колонки приходится  $\sim$ 2 мл жидкой фазы. Объем буфера в открытой трубке равен 1490 мл, а расстояние от анода до катода — 250 см. Электроды сделаны из платины, и каждое электродное пространство содержит 5 л боратного буфера (0,05 *M* раствора  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , pH 9,3).

Колонку наполняют, суспендируя стеклянный порошок в воде и выливая суспензию непосредственно в колонку в один прием. Массу осторожно перемешивают палочкой, которую медленно вынимают из колонки по мере оседания суспензии. Стеклянному порошку дают осесть, после чего через колонку перед ее использованием медленно пропускают в течение 3—4 дней боратный буфер.

Полисахариды наносят на колонку в виде 2—5%-ного раствора в буфере (1—2 мл), остерегаясь разрушить поверхность стеклянного порошка. Для проникновения вещества в колонку прибавляют пять порций буферного раствора по 2 мл. При нескольких первых разделениях к раствору полисахаридов прибавляют каплю бромкрезолового зеленого,

растворенного в буфере, что позволяет отчетливо видеть первоначальную зону вещества и следить за ходом последующего электрофореза и элюирования. Однако после нескольких экспериментов, когда характеристики колонки становятся известными, можно не добавлять краситель, так как разделения воспроизводятся очень хорошо. Колонку соединяют с небольшой склянкой, содержащей буфер, и первоначальной зоне, обозначенной бромкрезоловым зеленым, дают медленно опуститься вниз по колонке до необходимого положения, которое зависит от электрофоретической подвижности нанесенных полисахаридов; обычно достаточно 12—15 см.



Р и с. 2. Прибор для препаративного зонного электрофореза на колонке со стеклянным порошком.

1 и 8 — стеклянные шлифы, соединяющие две части прибора; вращением 1 соединяют буферный раствор, находящийся в колонке над стеклянным порошком, с раствором в открытой трубке в анодном пространстве; 2 — открытая трубка; 3 — буфер; 4 — анод; 5 — катод; 6 — охлаждающая вода; 7 — стеклянный порошок.

Склянку с буфером удаляют, колонку помещают в катодное пространство и соединяют с открытой трубкой, которую наполняют буфером и помещают в анодное пространство. Вращая соединительный стеклянный шлиф 8 (рис. 2), создают непрерывную замкнутую цепь из буферного раствора от анодного пространства через открытую трубку, соединительные шлифы 8 и 1 и колонку со стеклянным порошком до катодного пространства. Уровни буфера в анодном и катодном пространстве выравнивают с помощью сифона, помещаемого между ними; затем его удаляют и включают ток. Электрофорез обычно проводят 24 час при напряжении  $\sim 450$  в (1,8 в/см) и 28—30 ма. Колонку охлаждают водопроводной водой, циркулирующей в наружной рубашке.

После электрофореза колонку помещают на коллектор фракций и элюируют вещества боратым буфером под небольшим давлением (150 см вод. ст.). Фракции объемом по 5 мл собирают в пронумерованные пробирки, так что фракция № 1 содержит раствор со дна колонки. Каждая фракция соответствует 2—5 см длины колонки; за 14 час собирают  $\sim 160$  мл элюата (20—22 мин на каждую фракцию). Растворы в каждой пробирке анализируют на присутствие полисахарида с помощью суль-

фированного  $\alpha$ -нафтола (см. выше). Строят график поглощения при 555 мк для каждой занумерованной пробирки; пики на графике соответствуют положению зон полисахаридов. Пользуясь данными графика, объединяют растворы в пробирках, содержащих один и тот же полисахарид, и диализуют (стр. 299) вначале против водопроводной, а затем против дистиллированной воды при 4° в течение 24 час. Диализованные растворы упаривают в вакууме при температуре не выше 40° и осаждают полисахариды 80%-ным спиртом.

Колонку следует хранить под боратным буфером; если слой стеклянного порошка не поврежден, ее можно использовать повторно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Northcote D. H., Biochem. J., 58, 353 (1954).
2. Fuller K. W., Northcote D. H., Biochem. J., 64, 657 (1956).
3. Hoesavar B. J., Northcote D. H., Nature, 179, 488 (1957).
4. Porath J., Biochim. Biophys. Acta, 22, 151 (1956).
5. Olaitan S. A., Northcote D. H., Biochem. J., 82, 509 (1962).
6. Foster A. B., Advances in Carbohydrate Chem., 12, 81 (1957).
7. Devor A. W., J. Am. Chem. Soc., 72, 2008 (1950).
8. Lewis B. A., Smith F., J. Am. Chem. Soc., 79, 3929 (1957).

## Диализ

### *Выделение сахаров и родственных веществ с помощью диффузии через мембраны*

**В. В. Бинкли**

## ВВЕДЕНИЕ

Диализ применяется при выделении и простых, и сложных углеводов. Эффективное использование этого метода определяется главным образом выбором подходящей мембраны. При экспериментальной работе с углеводами обычно предпочитают целлюлозные мембраны (о свойствах этих мембран см. [1]). Для выделения простых сахаров размер пор мембраны должен быть относительно мал (диаметр 2--3 мк). Эти поры, однако, должны быть достаточно велики, чтобы обеспечить легкое проникновение выделяемых соединений. Простые сахара собирают (как диффузаты) обычно в виде одной или нескольких порций раствора снаружи мембранного мешка. Перемешивание растворов с обеих сторон мембраны повышает эффективность этого способа диализа.

При выделении полимерных углеводов используют отсутствие проницаемости данной мембраны. И в этом случае выбор подходящей мембраны имеет решающее значение. Поры должны быть возможно большего размера, но не должны пропускать нужное соединение (диаметр 3--5 мк); более мелкие поры могут понизить скорость отделения низкомолекулярных веществ. Если поры несколько велики, мембрану можно растянуть, и вызванное этим изменение формы пор может позволить мембране удерживать нужное соединение [2]. Размер пор целлюлозной мембраны можно

значительно уменьшить ацелированием [2]. Для выделения сложных углеводов максимальной чистоты существенным является удаление диффузата, окружающего мембрану. Это достигается непрерывной заменой диффузата свежим растворителем и перемешиванием раствора внутри мембраны в течение всего процесса диализа.

## М Е Т О Д И К А

### *Ячейка для диализа*

Мешок для диализа изготовляют из выбранной мембраны, имеющей форму трубки, длину которой рассчитывают заранее. Трубку погружают в дистиллированную воду для размягчения и закрывают один конец, завязывая один за другим два узла. Открытый конец мешка привязывают к короткой стеклянной трубке, поддерживающей мешок. Мешок наполняют водой и проверяют на утечку. После начала диализа содержимое мембранного мешка непрерывно перемешивают механически. Для сбора диффузатов удобно применять фармацевтический перколятор емкостью 2 л. Перколятор снабжают приспособлением для поддержания заданного уровня жидкости, позволяющим сливать диффузат при прибавлении свежего растворителя

### *Выделение азотсодержащих углеводных полимеров из конечной мелассы сахарного тростника*

Конечную мелассу сахарного тростника разбавляют равным объемом воды и смесь оставляют минимум на 24 час при 4—8° для оседания некоторых нерастворимых хлопьевидных веществ. 40 г надосадочной жидкости разбавляют водой до 500 мл и полученный раствор наливают в мембранный мешок, изготовленный из целлюлозной трубки длиной ~ 65 см и диаметром ~ 5,7 см с толщиной стенок ~ 0,0058 см. Мешок погружают в двухлитровый перколятор с 1800 мл воды. Содержимое мешка во время диализа, который длится 96 час, перемешивают механической мешалкой. В перколятор со скоростью 1 л/час подают воду, насыщенную толуолом. Раствор диализованных полимеров мелассы оставляют минимум на 7 дней при 4—8°, чтобы осадить тонкий нерастворимый осадок. Прозрачный маточный раствор концентрируют при пониженном давлении и температуре бани 60°. Полученный концентрат частично высушивают лиофилизацией (см. стр. 302). Окончательную сушку проводят в вакууме при 25° над фосфорным ангидридом; выход 1,5—1,7 г.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Carr C. W., Phys. Methods Chem. Anal., 4, 1 (1961).
2. Craig L. C., Konigsberg W., Stracher A., King T. P., in «Symposium on Protein Structure» (IUPAC meeting, Paris, 1957), A. Neuburger, Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., 1958, p. 104.



## Удаление воды из аморфных веществ с помощью спирта

*Р. Л. Уистлер, Дж. В. Маркс*

### ВВЕДЕНИЕ

Чтобы предотвратить ороговение аморфных веществ, таких, как амилоза и гемицеллюлоза, полученных из влажных осадков или суспензий, и сохранить их в физическом состоянии, обеспечивающем высокую химическую реакционную способность, их необходимо тщательно высушить. По одной из самых распространенных методик с этой целью проводят обработку спиртом возрастающей концентрации [1—3]. Нельсон [4] сушил гемицеллюлозу карибской сосны, промывая ее последовательно водным ацетоном, ацетоном и *n*-диоксаном [7]. Лиофилизация [5] (см. также стр. 302) полисахаридов также дает высушенные вещества с высокой реакционной способностью.

Ниже описан метод [6] высушивания крахмальной пасты спиртом. Эту методику с небольшими изменениями можно применить к другим аморфным веществам.

### МЕТОДИКА

100 мл крахмальной пасты концентрации 0,2—10% медленно прибавляют к 500 мл абсолютного спирта при энергичном перемешивании в гомогенизаторе Уоринга. Аналогичные результаты даст прибавление 85 мл пасты к 500 мл 95%-ного спирта. Применение меньших количеств спирта приводит к образованию клейких желатинообразных осадков. Крахмал отделяют на воронке Бюхнера с фильтром из бумаги ватман № 50 или 54. Следует избегать просасывания воздуха через крахмал и предохранять осадок от контакта с воздухом. Эти предосторожности не позволяют влаге конденсироваться на охлажденном крахмале. Полисахарид вновь помещают в чистый сухой стакан гомогенизатора и перемешивают 3 мин с 350 мл абсолютного (или 95%-ного) спирта. Смесь снова фильтруют с отсасыванием через бумажный фильтр на чистой сухой воронке. Такое промывание проводят еще два раза. Когда после окончательной промывки крахмал помещают на воронку Бюхнера, ее закрывают резиновой прокладкой, укрепленной резиновыми кольцами. Атмосферным давлением прокладка прижимается к поверхности осадка и вытесняет воздух. Крахмал выдерживают под вакуумом в течение 1 час, быстро измельчают и помещают в вакуум-эксикатор над безводным хлористым кальцием. Эксикатор непрерывно эвакуируют в течение нескольких часов, а затем оставляют на 36 час при пониженном давлении для удаления из вещества остатков спирта. Не вполне высушенный крахмал можно превратить с помощью шпателя в тонкий пушистый объемистый порошок, но сухое вещество легко электризуется при растирании шпателем или пестиком.

Смоченный спиртом крахмал легко поглощает влагу из воздуха. Если это произойдет, высушенное вещество будет содержать роговидные частицы с пониженной реакционной способностью. Однако при правильном высушивании образуется пушистый и мягкий на ощупь крахмал, легко вступающий в реакции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Heyne E., Whistler R. L., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2249 (1948).
2. Whistler R. L., Conrad H. E., J. Am. Chem. Soc., **76**, 1673 (1954).
3. Whistler R. L., Lauterbach G. E., Arch. Biochem. Biophys., **77**, 62 (1958).
4. Nelson R., Tappi, **43**, 313 (1960).
5. Flodsdorf E. W., Mudd S., J. Immunol., **29**, 389 (1935).
6. Whistler R. L., неопубликованные результаты.
7. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 95.

## Лиофилизация

*Р. Л. Уистлер, Дж. В. Маркс*

## ВВЕДЕНИЕ

Лиофилизация — это метод высушивания веществ в замороженном состоянии. Впервые этот метод получил широкое применение при сушке плазмы крови, впоследствии он использовался для высушивания других биологических объектов и консервирования пищевых продуктов.

Лиофилизация — чрезвычайно ценный метод высушивания крахмала и других полисахаридов; в процессе лиофилизации эти вещества не ороговеют и не становятся химически инертными. Вещество получается легким, пушистым и за счет большой поверхности обладает высокой скоростью растворения.

При проведении лиофилизации раствор полисахарида замораживают и удаляют воду сублимацией в высоком вакууме. Ниже в качестве примера приводится лиофилизация раствора крахмала, этим же способом можно высушить любой полисахарид.

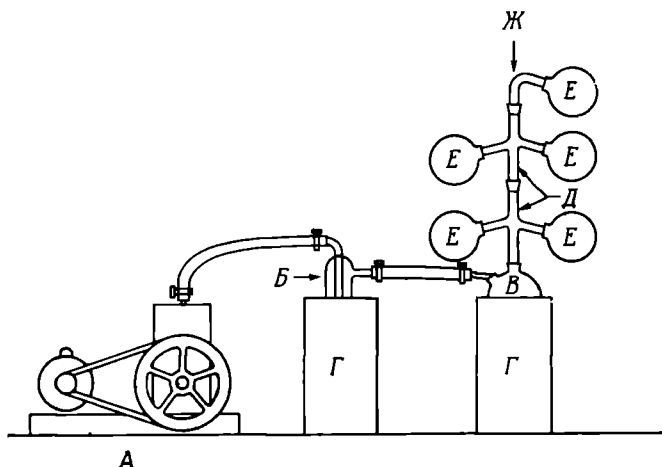
## МЕТОДИКА

*Прибор*

В продаже имеются различные аппараты для лиофилизации. Прибор, изображенный на рисунке, легко можно собрать из лабораторного оборудования. Он состоит из вакуумного насоса (*А*), ловушек (*Б*, *В*), погруженных в сосуды Дьюара (*Г*) со смесью ацетона и твердой углекислоты, и стеклянной насадки (*Д*, *Ж*) с круглодонными колбами (*Е*), содержащими высушиваемые полисахариды.

Вакуумный насос должен давать остаточное давление не выше 0,5 мм. При давлении больше 1,0 мм растворы не будут оставаться замороженными. Ловушки представляют собой вспомогательную пальцевидную ловушку (*Б*) и двугорлую круглодонную колбу емкостью 1 л (*В*), которая служит главной приемной ловушкой. Эту колбу не следует глубоко погружать в охлаждающую баню, чтобы предотвратить образование льда в ее горлах. Диаметр стеклянной насадки 30 мм, она состоит из нескольких крестообразных соединительных трубок (*Д*). Если используют нечетное

число колб, на вершине насадки ставят колено Ж. В случае четного числа колб колено можно заменить стеклянной пробкой. На рисунке показаны пять колб, но можно использовать различное число колб разной величины, что диктуется необходимостью и производительностью насоса. Обычно



не применяют колб объемом более 2 л. Соединения представляют собой стандартные конические шлифы, которые смазывают высоковакуумной силиконовой смазкой.

### Метод

Для процедуры, описанной ниже, необходимо 3 л ацетона и около 20 кг твердой углекислоты. Для меньших количеств раствора требуется, естественно, меньше углекислоты.

Вначале охлаждают ловушки в банях с ацетоном и твердой углекислотой. В сосуды Дьюара помещают сухой лед и медленно, избегая слишком сильного вспенивания, приливают ацетон. Следует применять максимальное количество сухого льда и минимальное количество ацетона.

900 мл 1%-ного раствора крахмала наливают приблизительно равными порциями в 5 круглодонных колб объемом 1 л. Объем раствора не должен превышать 20% объема колбы. Так, в колбы емкостью 500 мл наливают около 75–100 мл раствора. При увеличении порций раствора, приходящихся на каждую колбу, возрастает время, необходимое для завершения сушки. Приемная склянка объемом 1 л хорошо улавливает только 850–900 мл воды. Наполненные колбы замораживают, вращая их в бане с сухим льдом и ацетоном; крахмальный раствор при этом намерзает на внутреннюю поверхность колбы в виде панциря. Когда замораживание заканчивается, этот панцирь может растрескаться, но он останется на месте. В процессе высушивания растворы должны оставаться в замороженном состоянии. После присоединения колб к насадке и включения насоса откаивания не происходит, если давление не превышает 0,5 мм. На хорошо работающем приборе колбы покрываются инеем.

Особенно ответственными являются первые 4–5 час работы, так как в этот период происходит наибольший перенос тепла от первых порций воды в приемнике к охлаждающей бане. В ловушке должно быть достаточное количество сухого льда для поддержания ее температуры около  $-86^{\circ}$ . При значительном возрастании температуры приемника

раствор в бане «закипает». Если это происходит, прибавляют еще твердой уголекислоты и немного ацетона. Если высушиваемый раствор в колбах начинает таять, можно подставить под них баню с сухим льдом и ацетоном и снова заморозить, не снимая колбы с насадки. Однако таяния следует избегать; оно не будет происходить, если не превышена мощность насоса.

По мере высушивания крахмала слой инея на колбах (снаружи) уменьшается. Когда иней исчезнет, сушку можно считать законченной. На это, не считая первых 4—5 час, требуется обычно 3—4 час. В это время ловушки можно поддерживать в охлажденном состоянии меньшим количеством твердой уголекислоты. Хотя в указанный момент сушка практически кончается, для обеспечения полноты высушивания лучше оставить прибор работать на ночь. Хорошо наполненные бани будут сохранять низкую температуру до утра.

Крахмал, высушенный таким способом, представляет собой легкий пушистый и легко растворимый порошок.

## Получение в кислотной форме полисахаридов, содержащих уроновые кислоты

Альгиновая кислота, арабовая кислота, камедь гатти, камедь льняного семени, пектовая кислота

*Р. Г. Швайгер*

### ВВЕДЕНИЕ

Хотя большинство доступных полисахаридов в качестве составных частей содержат только нейтральные сахара, такие, как D-глюкоза, D-галактоза и L-арабиноза, существует значительное число камедей, состоящих полностью или частично из уроновых кислот. К наиболее распространенным из них относятся альгин и пектин, состоящие почти исключительно из уроновых кислот, камеди карайя, трагакантовая, гатти, мескитная, полисахариды семян псиллиума, айвы, льна, содержащие меньшие количества уроновых кислот.

Эти камеди встречаются в природе в виде солей, обычно натриевых или кальциевых; исключение составляет пектин, являющийся метиловым эфиром.

Свободные кислоты можно получить несколькими общими методами. Если кислота не растворяется в воде, полимер часто можно осадить в виде соли многовалентного металла с последующей промывкой разбавленной минеральной кислотой. Если же полиуроновая кислота растворима в воде, наиболее удобными методами являются обработка катионообменной смолой или диализ в кислой среде.

### МЕТОДИКА

#### *Получение альгиновой кислоты промыванием минеральной кислотой (см. также стр. 317)*

0,5—1,0%-ный раствор альгината натрия медленно прибавляют к перемешиваемому 1—2%-ному водному раствору хлористого кальция [1]. Волокнистый осадок отфильтровывают, промывают водой и суспендируют

в растворе соляной кислоты (около 1 н.). Суспензию перемешивают примерно 15 мин и отделяют жидкую фазу. Чтобы удалить все ионы кальция, такую обработку разбавленной соляной кислотой приходится повторить 3—5 раз. Волокна свободной альгиновой кислоты тщательно промывают водой, отжимают на воронке Бюхнера и сушат в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием.

По другому варианту вышеописанного метода волокнистый объемистый осадок альгината кальция промывают последовательно раствором соляной кислоты в 40—50%-ном метаноле, водным спиртом и водой.

Евтушенко [2] описал получение весьма чистой альгиновой кислоты диализом альгината натрия, подкисленного уксусной кислотой.

### ***Получение пектовой кислоты промыванием минеральной кислотой (см. также стр. 375)***

200 г комплекса пектина с гидроокисью алюминия, содержащего около 22 г пектина (комплекс получают как промежуточный продукт при очистке пектина [3]), тщательно измельчают и прибавляют к 310 мл 50%-ного водного изопропилового спирта, содержащего 62 г растворенного едкого натра [4]. Суспензию размешивают 15 мин при комнатной температуре. Жидкость отделяют фильтрованием, а твердую фазу промывают водой и 50%-ным водным изопропанолом, чтобы удалить избыток щелочи и соединения алюминия. При промывании водой нужно следить, чтобы не началось растворение пектата. Осадок прибавляют к 200 мл изопропанола, содержащего 75 мл концентрированной соляной кислоты, и суспензию перемешивают 30 мин при комнатной или слегка повышенной температуре. Затем пектовую кислоту отделяют, промывают водой и последовательно растворами изопропанола возрастающей концентрации, отжимают и сушат.

Вместо комплекса пектина с гидроокисью алюминия для вышеописанной обработки можно использовать 60—100 г чистого пектина, предпочтительно в виде волокнистого объемистого осадка, получаемого осаждением спиртом (см. стр. 375).

### ***Осаждение камеди льняного семени в виде свободной кислоты***

Чистые семена льна смешивают в большой склянке с 4 вес. частями воды. Смесь оставляют на 24 час [5], а затем нагревают на паровой бане до 80°, прибавляют 12%-ную соляную кислоту до получения 2%-ного раствора HCl и продолжают нагревание при 80° в течение 3 мин. Горячий раствор быстро фильтруют через воронку Бюхнера с несколькими слоями ткани и семена дважды промывают водой. Фильтрат немедленно прибавляют к 5 объемам спирта, белый волокнистый осадок, который поднимается на поверхность, отделяют и помещают в новую порцию спирта. Растворитель удаляют фильтрованием на воронке Бюхнера, осадок промывают спиртом и эфиром и быстро сушат при пониженном давлении; выход белого легкого порошка камеди льняного семени в кислотной форме 5,8%.

### ***Получение арабовой кислоты и других полиуроновых кислот обработкой катионообменной смолой***

Около 1,5 кг амберлита IR-120 помещают в стеклянную колонку и переводят в кислотную форму, пропуская достаточное количество 10%-ной соляной кислоты, а затем дистиллированную воду до получения нейтрального элюата. Затем через колонку пропускают около 12 л 7%-ного водного раствора гуммиарабика [6] и промывают дистиллированной водой. Объединяют все элюаты, имеющие кислую реакцию. Раствор сушат распылением при температуре в сушилке около 200°. Кислоту можно выделить также лиофилизацией (см. стр. 302) или высушить сменой растворителей (стр. 301). В результате получают объемистый тонкий белый порошок с содержанием золы не выше 0,05%.

Этот же метод можно применить для получения в кислотной форме камедей семян айвы и льна [7], гатти, мескистной камеди, полисахарида псилиума и всех других полисахаридов, растворимых в воде при низких рН [8]. Однако для некоторых полисахаридов необходимо применять растворы меньшей концентрации, чтобы понизить вязкость и обеспечить хорошее протекание растворов через колонку.

Полисахариды, которые в кислотной форме не растворяются в воде, например алыгиновая кислота [9], также можно превратить в свободные кислоты обработкой катионообменной смолой, если только концентрация полисахарида не превышает 0,5%. Гранулированную смолу в кислотной форме прибавляют к раствору камеди и осторожно перемешивают в течение 1 час. Затем раствор, имеющий гелеобразную консистенцию, центрифугируют или, если возможно, фильтруют через крупнопористый стеклянный фильтр, чтобы отделить смолу. Полиуроновую кислоту осаждают ацетоном или спиртом и сушат при 40° в токе воздуха.

### ***Получение кислоты гатти и других полиуроновых кислот диализом в кислой среде***

Камедь гатти [10] растворяют в воде и прибавляют серную кислоту до 1 н. концентрации. Этот раствор диализуют против дистиллированной воды, используя соотношение раствор — диализат 1 : 4. Воду меняют 1 раз в день до отрицательной реакции на сульфат-ион. Диализованный раствор концентрируют и обезвоживают кипящим четыреххлористым углеродом в аппарате непрерывного действия [11]. Эквивалентный вес свободной кислоты, определяемый титрованием, хорошо совпадает с литературными данными.

Этим же способом можно получить свободные кислоты из камеди карая, трагакантовой и почти всех других камедей, содержащих уроновые кислоты. Серную кислоту можно заменить другими кислотами, например уксусной, как указывалось выше [2]. Вместо удаления воды кипящим четыреххлористым углеродом раствор можно высушить распылением или осадить полиуроновые кислоты органическими растворителями, смешивающимися с водой, такими, как спирт или ацетон.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Green H. C., пат. США 2036934 (1936); Chem. Abstracts, 30, 3443 (1936); McNeely W. H., O'Connell J. J., Kelco Co., неопубликованные данные.
2. Евтушенко В. А., Колл. журн., 16, 255 (1954).

3. Jameson E., Taylor F. N., Wilson C. P., пат. США 1497884 (1924); Chem. Abstracts, **18**, 3237 (1924).
4. Bryant E. F., пат. США 2349138 (1944); Chem. Abstracts, **39**, 712 (1945).
5. Anderson E., Lowe H. J., J. Biol. Chem., **168**, 289 (1947).
6. Schleif R. H., Higuchi T., Busse L. W., J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., **40**, 98 (1951).
7. Swintosky J. V., Kennon L., Tingstad J., J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., **44**, 109 (1955); Swintosky J. V., Kennon L., J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., **42**, 505 (1953).
8. Wood W. H., пат. США 2666759 (1954); Chem. Abstracts, **48**, 3716 (1954).
9. McNeely W. H., Lowe O. G., Kelco Co., неопубликованные данные.
10. Hanna D., McReynolds L., Shaw E. H., Jr., Proc. S. Dakota Acad. Sci., **19**, 130 (1939).
11. Lucas H. J., Pressman D., Principles and Practice in Organic Chemistry, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., and Chapman and Hall Ltd., London, England, 1949, p. 242.

# Выделение индивидуальных полисахаридов

---

## Амилоза и амилопектин из картофельного крахмала

*Л. М. Гильберт, Г. А. Гильберт, С. П. Спразг*

### ВВЕДЕНИЕ

Предложено много различных методов фракционирования крахмала на полисахариды с разветвленной и линейной структурой. Причем наилучший метод фракционирования для одного вида крахмала не обязательно оказывается оптимальным применительно к другому виду: многое здесь зависит от источника крахмала и характера его предварительной обработки. Цель, преследуемая при фракционировании, также влияет на выбор метода. Этот раздел написан в предположении, что задача исследователя состоит в препаративном получении определенных количеств амилозы и амилопектина, а не в изучении крахмала как такового. В последнем случае нельзя рекомендовать какой-либо общий метод.

Выбранный здесь способ состоит в выщелачивании амилозы из крахмала, тщательно диспергированного в разбавленной щелочи. Такое выщелачивание можно проводить в больших масштабах при комнатной температуре в присутствии воздуха. Этим способом получают чистую амилозу, легко растворяющуюся в холодной воде с образованием сравнительно устойчивого раствора, и амилопектин, образующий нерастворимый в воде гель. Выход обоих компонентов составляет примерно 50% от теоретического. Приведенная здесь ранее не публиковавшаяся методика уже в течение ряда лет применяется в лаборатории авторов; она больше всего напоминает методику, описанную Гатин-Грузевским [1].

### МЕТОДИКА

#### *Получение картофельного крахмала*

4 кг неповрежденного картофеля очищают от кожуры, нарезают ломтиками и экстрагируют 3 л 1%-ного раствора хлористого натрия в пищевом механическом смесителе порциями по 500 г. Каждую порцию перемешивают ~0,5 мин, после чего жидкую кашу фильтруют через тонкий муслин при осторожном взбалтывании. Образовавшиеся при фильтровании лепешки объединяют и вновь экстрагируют 500 мл солевого раствора в течение 1 мин. Кашу фильтруют через муслин, как описано выше, фильтраты объединяют. Дают осесть гранулам крахмала и надосадочную жидкость вместе с частицами целлюлозы, прошедшими через муслин, декантируют и выбрасывают. Крахмал промывают три раза 1%-ным раствором хлористого натрия, затем 0,01 н. раствором едкого натра и в заключение три раза дистиллированной водой. Хранят крахмал под водой



при 4°, не допуская замерзания, вызывающего в нем изменения. Выход влажного крахмала ~ 170 г. Перед взвешиванием образца надосадочную жидкость сливают, а твердую фазу быстро отделяют от жидкой. В полученном таким путем препарате содержание сухого вещества составляет ~ 50%.

### Разделение амилозы и амилопектина

Описываемый способ удобен для получения в одну загрузку ~ 0,05—6 г амилозы и ~ 0,2—24 г амилопектина. В приведенной ниже методике указаны максимальные загрузки, при желании их можно уменьшить, однако при этом необходимо тщательно соблюдать все указанные соотношения. Необходимо отметить, что даже небольшие отклонения от приведенных условий могут снизить чистоту получаемых препаратов.

В стеклянный сосуд с 13,2 л 0,157 н. едкого натра прибавляют 160 г свежеприготовленного крахмала, взвешенного влажным и осторожно суспендированного в 1050 мл воды. Температура смеси не должна быть ниже 22°, оптимальная температура ~ 25°. Смесь осторожно перемешивают до получения прозрачного раствора, но перемешивание не должно быть очень интенсивным. Нельзя применять механическую мешалку или барботировать через смесь газ, так как такое перемешивание нарушает структуру геля амилопектина и затрудняет последующее фильтрование. Достаточно осторожного перемешивания вручную с помощью стеклянной лопатки (10 × 50 см). Общая продолжительность стояния щелочного раствора должна составлять 5 мин. Далее к смеси прибавляют 3660 мл 5%-ного раствора хлористого натрия и затем нейтрализуют 1 н. соляной кислотой до pH 6,5—7,5; pH смеси определяют по индикатору или с помощью длинного стеклянного электрода pH-метра.

Центрифугировать 20 л смеси неудобно, особенно потому, что амилопектин нельзя отделить от прозрачного раствора на корзиночной центрифуге. Однако после примерно пятнадцатичасового стояния при комнатной температуре (причем смесь должна быть защищена от сквозняков и источников тепла, в том числе и от солнечного света) гель осаждается до тех пор, пока его объем не составит  $\frac{1}{3}$  общего объема. Между гелем и раствором амилозы должна быть четкая граница. Раствор амилозы отделяют сифонированием или отсасыванием, фильтруют через пористый стеклянный фильтр № 3 диаметром 15 см, используя, если можно, погружной фильтр, и собирают в колбу емкостью 5 л. Далее раствор вновь фильтруют через фильтр № 4.

При фракционировании небольших количеств крахмала можно центрифугировать нейтрализованный раствор в тот же день. Установлено, что если центрифугировать при ~ 10 000 об/мин в течение 15 мин, то полученный продукт имеет высокую степень чистоты. Раствор амилозы, как было сказано выше, следует фильтровать дважды.

Гель амилопектина и профильтрованный раствор амилозы подвергают последующей очистке.

### Осаждение амилозы

Качество амилозы ухудшается, если хранение ее солевого раствора продолжается более нескольких дней, поэтому ее следует выделить из раствора как можно быстрее. Для избирательного осаждения амилозы из солевого раствора применяют *n*-бутанол [2]. Фильтрат насыщают дважды перегнанным *n*-бутанолом и осторожно перемешивают при комнатной температуре ~ 1 час с помощью механической мешалки. Комплекс амило-

зы с бутанолом оставляют осаждаться на 2—3 час, после чего прозрачную надосадочную жидкость отделяют сифонированием. Неполностью осадившуюся твердую фазу отделяют центрифугированием в полипропиленовых стаканах при 3000 об/мин в течение 15 мин. Комплекс перемешивают с 500 мл воды, насыщенной *n*-бутанолом, и вновь концентрируют центрифугированием, как описано выше. Для некоторых образцов крахмала может оказаться необходимым дополнительное переосаждение. Комплекс устойчив при хранении в плотно закрытом сосуде. Он легко растворим в воде при комнатной температуре. При желании большую часть бутанола можно удалить, если через раствор, помещенный в сосуд, нагреваемый на кипящей водяной бане, пропускать в течение 10 мин ток свободного от кислорода азота [3]. Из 160 г влажного картофельного крахмала получают 6—7 г амилозы. Характеристическая вязкость раствора такой амилозы в 0,5 н. едком натре при 20° колеблется в пределах 2,4—3,0. Как было найдено, синее число для различных образцов составляет от 1,35 до 1,41.

Этот метод был разработан для так называемого картофеля «основного урожая». Из хранившегося или «молодого» картофеля часто, но не всегда получают амилозу низкой чистоты (синее число 1,0—1,2). Опыты показали, что это осложнение обычно для всех приемлемых лабораторных методов получения амилозы.

### **Очистка амилопектина**

Гель амилопектина центрифугируют при 20° и 8000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, а к остатку при перемешивании прибавляют 1%-ный раствор хлористого натрия из расчета по 100 мл на 4 г исходного влажного крахмала. Смесь оставляют стоять при 18° на 20 час, гель отделяют центрифугированием при 8000 об/мин, как описано выше, и проводят повторную промывку в тех же условиях. После центрифугирования, если гель будет немедленно использован, его суспендируют в воде (полисахарид нерастворим в холодной воде), если же гель подлежит хранению, то его лиофилизируют. Из 160 г влажного крахмала получают ~24 г амилопектина, синее число для которого при 680 ммк равно 0,13.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Gatin - Gruzewska Z., Compt. rend., **146**, 540 (1908).
2. Lansky S., Kooi M., Schoch T. J., J. Am. Chem. Soc., **71**, 4066 (1949).
3. Baum H., Gilbert G. A., Wood H. L., J. Chem. Soc., 1955, 4047.

## **Количественное определение крахмала в растительных тканях**

**У. З. Хессид, Э. Ф. Ньюфелд**

### **ВВЕДЕНИЕ**

Большинство высших растений содержит крахмал. Количество этого полисахарида, обнаруживаемое в той или иной ткани в определенный момент, зависит от физиологической активности ткани. Содержание

крахмала в различных растениях и в различных тканях одного и того же растения колеблется в весьма широких пределах. Так, содержание крахмала в ткани листьев изменяется в течение суток и может снижаться до 1%. Крахмал накапливается в семенах, луковицах и клубнях. В семенах и зернах некоторых растений содержатся до 70% крахмала, а в клубнях и корнях некоторых пальм, со стволами, богатыми сердцевинной, — до 25—30%.

Хотя крахмал растворим в кипящей воде, его исчерпывающая экстракция из растительных тканей достигается с трудом вследствие высокого молекулярного веса и коллоидных свойств этого полисахарида. Наиболее эффективным растворителем крахмала является хлорная кислота.

В литературе описан ряд методов определения крахмала [1—4]. Приведенная ниже методика частично основана на методе Пачера и сотр. [1], который дает удовлетворительные результаты при анализе крахмала в тканях различных растений.

Эта методика предусматривает проведение следующих операций. Из высушенной растительной ткани экстрагируют 80%-ным спиртом растворимые сахара. Свободный от сахара остаток обрабатывают раствором хлорной кислоты, экстрагированный крахмал осаждают иодом и разлагают щелочью иод-крахмальный комплекс. Выделившийся крахмал определяют колориметрически с антроновым реактивом.

## МЕТОДИКА

### Реагенты

*80%-ный спирт.* 1680 мл 95%-ного спирта разбавляют водой до 2 л.

*52%-ная хлорная кислота.* 270 мл 72%-ной хлорной кислоты разбавляют 100 мл воды. Раствор необходимо хранить в сосуде, закрытом стеклянной пробкой.

*Иод в растворе иодистого калия.* 7,5 г иода и 7,5 г иодистого калия растворяют в 150 мл воды, полученный раствор разбавляют до 250 мл и при необходимости фильтруют с отсасыванием через бумагу ватман № 3.

*Спиртовой раствор хлористого натрия.* 350 мл спирта, 80 мл воды и 50 мл 20%-ного водного раствора хлористого натрия разбавляют водой до 500 мл.

*20%-ный водный раствор хлористого натрия.*

*0,25 н. спиртовой раствор едкого натра.* 350 мл спирта, 100 мл воды и 25 мл 5 н. едкого натра разбавляют водой до 500 мл.

*Антроновый реагент (0,1%-ный раствор в 72%-ной по объему серной кислоте).* 1 г очищенного антрона<sup>1</sup> растворяют в 1 л охлажденной серной кислоты, содержащей 760 мл концентрированной серной кислоты с удельным весом 1,84. При необходимости раствор фильтруют через пористый стеклянный фильтр. Раствор можно хранить при 4° в течение нескольких дней, однако его не следует употреблять, если он приобретает зеленую окраску.

Поскольку раствор антрона реагирует с хлопковыми волокнами и другими загрязнениями, очень важно тщательно промыть всю стеклянную аппаратуру, которая может соприкасаться с реагентом.

<sup>1</sup> Антрон достаточной чистоты выпускается рядом химических компаний. Его можно также получить по методу Мейера [5].

0,1%-ный раствор D-глюкозы. Этот раствор получают ежедневно, разбавляя приготовленный заранее 1%-ный раствор чистой D-глюкозы. Исходный раствор готовят в 0,1%-ном растворе бензоата натрия или хранят в замороженном состоянии.

### Методика

Растительные ткани, в которых будет определяться содержание крахмала, следует сушить в вакуумном сушильном шкафу при 90—95°. Длительное высушивание при низкой температуре может привести к некоторому гидролизу крахмала присутствующей в растениях амилазой<sup>1</sup>. Можно также использовать сушильную печь, снабженную вентилятором для циркулирования воздуха над тканью; в этом случае образцы сушат при 79—80°. Высушенный материал измельчают так, чтобы он проходил через сито 50—80 меш. Навески по 50—250 мг в зависимости от содержания крахмала помещают в центрифужные стаканы емкостью по 50 мл, смачивают несколькими каплями 80%-ного спирта для предотвращения комкования, прибавляют 5 мл воды и тщательно перемешивают.

Растворимые сахара экстрагируют следующим образом. Стакан с образцом помещают в горячую водяную баню, прибавляют 25 мл 80%-ного спирта, перемешивают содержимое несколько минут и центрифугируют. Спиртовой раствор декантируют и отбрасывают. Для полного удаления растворимых сахаров экстракцию повторяют еще три раза.

Для получения крахмала в виде геля свободный от сахаров остаток нагревают 15 мин на кипящей водяной бане с 5 мл воды. Суспензию охлаждают до комнатной температуры и при перемешивании прибавляют 6,5 мл 52%-ной хлорной кислоты. Стакан со смесью помещают в водяную баню с температурой ~ 25°. Непрерывное перемешивание продолжают 5 мин и периодически перемешивают еще в течение 15 мин, затем прибавляют 20 мл воды и центрифугируют. Водный раствор крахмала декантируют в мерную колбу емкостью 50 мл и повторяют экстракцию хлорной кислотой без предварительного нагревания. Стакан и палочку смывают водой. Объединенные экстракты и промывные жидкости доводят до метки и центрифугируют, надосадочную жидкость декантируют через стеклянное волокно.

10 мл аликвотной части экстракта крахмала помещают в коническую центрифужную пробирку емкостью 50 мл, прибавляют 50 мл 20%-ного раствора хлористого натрия и 2 мл раствора иода в иодиде калия и перемешивают. Если концентрация крахмала велика, то может оказаться необходимым прибавить дополнительное количество иода в иодистом калии. После по крайней мере 20-минутного стояния раствор центрифугируют и удаляют надосадочную жидкость, тщательно избегая потерь осадка. Осадок иод-крахмального комплекса суспендируют в 5 мл спиртового раствора хлористого натрия и вновь центрифугируют. Надосадочную жидкость отбрасывают и процедуру промывки повторяют еще по крайней мере один раз.

<sup>1</sup> При работе со свежими листьями или растительными тканями, содержащими малое количество крахмала и большое количество воды, свежий материал можно после взвешивания погрузить в кипящий 95%-ный этанол для инактивации ферментов. Растворимые сахара экстрагируют повторной обработкой горьким 80%-ным спиртом или экстракцией в аппарате Сокслета. После этого нерастворимый остаток высушивают и взвешивают. Для определения содержания крахмала в процентах от веса сухого образца спиртовые экстракты объединяют и упаривают досуха. Остаток взвешивают и вес его суммируют с весом остатка от спиртовой экстракции.

К плотному осадку прибавляют 2 мл 0,25 н. спиртового раствора едкого натра и осторожным встряхиванием и постукиванием по пробирке добиваются полного исчезновения голубого окрашивания. Не следует перемешивать раствор палочкой, так как клейкий осадок может прилипнуть к ней, вследствие чего для разложения комплекса потребуется продолжительное время. Выделившийся крахмал центрифугируют и промывают несколько раз спиртовым раствором хлористого натрия, как описано выше. На каждую промывку расходуют по 5 мл раствора.

В пробирку с осадком крахмала прибавляют ~ 5 мл горячей воды и смесь перемешивают стеклянной палочкой до полного растворения крахмала. Раствор количественно переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, пробирку и палочку тщательно смывают теплой водой, промывные воды добавляют в мерную колбу, раствор разбавляют до метки и тщательно перемешивают. Концентрацию крахмала определяют по методике Фейербейна [6], приведенной ниже.

Аликвотную часть крахмального раствора с ожидаемым содержанием крахмала 20—200 мкг отбирают пипеткой в промытую кислотой пробирку и разбавляют водой до 2,0 мл. Одновременно готовят серию контрольных пробирок, содержащих от 0 до 200 мкг D-глюкозы в 2 мл раствора. Пробирки погружают в холодную воду и в каждую из пипетки или бюретки прибавляют по 10 мл антронового реактива. Содержимое пробирок тщательно перемешивают. Возможно осаждение антрона, но это не влияет на результаты определения. Пробирки нагревают 15 мин на кипящей водяной бане (до максимального окрашивания), затем быстро охлаждают, погружая их в холодную воду, и измеряют поглощение при 620 мкм. При определении крахмала по калибровочной кривой для D-глюкозы соответствующие значения, полученные для D-глюкозы, необходимо умножить на 0,90.

Можно также гидролизовать крахмал кислотой [1] и, используя в качестве стандарта D-глюкозу, определять восстанавливающую способность гидролизата по одной из обычных методик [7, 8].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pucher G. W., Leavenworth C. S., Vickery H. B., *Anal. Chem.*, **20**, 850 (1948).
2. McCready R. M., Guggolz J., Silveira V., Owens H. S., *Anal. Chem.*, **22**, 1156 (1950).
3. McCready R. M., Hassid W. Z., *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1154 (1943).
4. Official and Tentative Methods of Analysis, H. A. Lepper, Ed., Association of Official Agricultural Chemists, P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C., 6th Ed., 1945, p. 410.
5. Meyer K. H., *Org. Syntheses, Coll. vol. 1*, 60 (1941).
6. Fairbairn N. J., *Chem. and Ind.*, (London), 86 (1953).
7. Somogyi M., *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
8. Park J. T., Johnson M. J., *J. Biol. Chem.*, **181**, 149 (1949).

## Агар

Приготовление агара и агарозы; метанолиз; меркаптолиз

Дж. Н. Бемиллер

### ВВЕДЕНИЕ

Агар (агар-агар) — это общий термин, используемый для обозначения галактогликанов, обладающих определенными свойствами, а именно: нерастворимых в холодной воде, но растворяющихся в кипящей воде с образованием прозрачного 1,5%-ного раствора, который при охлаждении до 32—39° дает механически прочный эластичный гель, не плавящийся при температуре ниже 85° [1]. Агар получен из различных родов и видов класса Rhodophyceae (красных водорослей) [2]. Например, в 14 образцах *Gracillaria verrucosa* выход полисахарида колебался от 35,5 до 55,6% (по сухому весу).

Когда агаровый гель замерзает, агаровый скелет сжимается, выделяя в виде отдельной фазы лед, который содержит большую часть растворимых солей и других низкомолекулярных примесей. Поэтому все продажные и лабораторные препараты очищают путем замораживания и оттаивания [2, 4—6].

Очистка посредством ацетилирования, дробного растворения и дезацетилирования дает в качестве главного компонента ( $\sim 2/3$  неочищенного препарата) [7—9] полисахарид, называемый агарозой. Кислотный и ферментативный гидролиз [10, 11], метилирование [8, 12], метанолиз [13, 14] и меркаптолиз [4, 15, 16] показывают, что молекула агарозы из *Gelidium amansii* [17], *Anfeldtia plicata* [18] и *Gelidium cartilaginium* [4] имеет линейную структуру и состоит из чередующихся единиц  $\beta$ -D-галактозы, связанных (1  $\rightarrow$  4)-связью, и 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактозы, связанных (1  $\rightarrow$  3)-связью, и содержит  $\sim 1$  остаток серной кислоты в виде кислого эфира на 10 галактозных единиц и  $\sim 1$  остаток пировиноградной кислоты в виде 4,6-O-(1'-карбоксиэтилиденеовой) группы на 51 галактозную единицу [13—19].

Далее описаны лабораторный метод приготовления агара [4], приготовление агарозы из продажного агара [8], метанолиз агара с целью получения диметилацетата агаробиозы [3,6-ангидро-4-O-( $\beta$ -D-галактопиранозил)-L-галактозы] [14] и меркаптолиз, дающий диэтилдитиоацетаты D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы [4].

### МЕТОДИКИ

#### *Агар из Gelidium cartilaginium* [4]

200 г тонко измельченной сухой водоросли экстрагируют 4 л воды при 100° в течение 2 час. Горячий экстракт фильтруют через муслин и центрифугируют в горячем виде до тех пор, пока не будет получен прозрачный раствор. При охлаждении раствор превращается в густой гель. Гель замораживают, оставляют в замороженном виде на ночь, а затем дают ему оттаять на муслине так, чтобы вода могла стечь. Остаток растворяют в 4 л воды при 90° и вновь повторяют замораживание и оттаивание. Эти операции в указанной последовательности повторяют еще 6 раз, каждый раз

центрифугируя перед замораживанием горячий раствор при 12 000 об/мин. Полученный в конечном итоге гель промывают несколько раз, быстро перемешивая его с холодной водой, обезвоживают, быстро перемешивая с несколькими порциями абсолютного спирта, а затем ацетона. Потом его отделяют на воронке Бюхнера и промывают эфиром (см. стр. 301) и получают белый порошок, выход которого 11 г.

### *Агароза [7, 9]*

Агар (15 г, 15—16% влаги) всыпают при встряхивании в коническую колбу емкостью 500 мл, содержащую 80 мл пиридина и 20 мл воды. Колбу закрывают стеклянной пробкой и встряхивание продолжают несколько минут, пока агар не будет смочен полностью. После этого колбу оставляют на 24 час при комнатной температуре. Получившуюся набухшую массу дробят стеклянной палочкой и добавляют 90 мл безводного пиридина (стр. 91, 115, 130, 152), а затем при встряхивании приливают по каплям 150 мл уксусного ангидрида. Реакция экзотермична, и набухший агар растворяется. Температура не должна превышать 70°, поэтому иногда приходится охлаждать колбу водой. После прибавления уксусного ангидрида колбу помещают в термостат при 70°. Через 10 час термостат выключают и дают ему охладиться до комнатной температуры.

Через 8 час колбу вынимают и вязкий раствор ацетилованного агара прибавляют по каплям при сильном перемешивании к 5 л смеси воды и льда. Осадок очень объемист и часто содержит некоагулировавшийся ацетилованный агар, который нужно растереть рукой со смесью льда и воды. Осадок отделяют на воронке Бюхнера, растирают с водой и смывают в 5 л воды. Осадку дают осесть, воду отсасывают через стеклянный фильтр и в стакан прибавляют 5 л воды. Через 24 час ацетилованный агар собирают на воронке Бюхнера и промывают сначала водой с температурой 20—25°, а затем водой, нагретой до 40°, до полного удаления уксусной кислоты. Продукт промывают на воронке спиртом и эфиром и сушат на воздухе в течение ночи.

Сухой ацетилованный агар помещают в делительную воронку, содержащую 600 мл хлороформа. В течение следующих 2—3 час воронку время от времени встряхивают и оставляют стоять на 20—24 час. Хлороформный раствор отделяют от нерастворимого ацетилованного «агаропектина», который образует плавающий сверху слой. В делительную воронку добавляют еще 450 мл хлороформа и процесс повторяют. Требуется еще две экстракции по 300 мл хлороформа каждая. Объединенные хлороформные вытяжки фильтруют дважды через стеклянный фильтр. К сильно перемешиваемому раствору медленно прибавляют тонкой струей равный объем петroleйного эфира. Осадок ацетилованной агарозы отделяют фильтрованием через стеклянный фильтр, промывают последовательно петroleйным эфиром и абсолютным спиртом. *Деацетилование проводят немедленно.*

Влажную ацетилованную агарозу помещают в коническую колбу с 80 мл 1 М раствора КОН в абсолютном спирте. Колбу закрывают и оставляют в темноте при комнатной температуре на 21 час, встряхивая время от времени. Содержимое колбы затем нейтрализуют по фенолфталеину разбавленной уксусной кислотой. Фенолфталеин следует прибавлять к аликвотной пробе, а не ко всей массе, так как агарозу трудно отмыть от него. Агарозу отделяют фильтрованием, промывают абсолютным спиртом и эфиром (стр. 301) и сушат в вакууме; выход 10 г.

### Меркаптолиз агара [4, 16]

Агар (5,3 г, влажность 15—16%) помещают в трехгорлую круглодонную колбу, снабженную мешалкой, капельной воронкой и хлоркальциевой трубкой. Колбу погружают в баню с водой и льдом и при 0° медленно при перемешивании добавляют концентрированную соляную кислоту. Когда образуется жидкая каша, примерно через 40 мин, добавляют по каплям при сильном перемешивании 30 мл этилмеркаптана так, чтобы температура не поднималась выше 10°, и смесь перемешивают в течение 3 час. Затем температуру повышают до 14—15° и перемешивание продолжают еще 48 час. Образовавшийся коричневый раствор выливают при перемешивании в суспензию 150 г карбоната свинца в 250 мл воды при 0°. Смесь фильтруют и из фильтрата удаляют ионы амберлитами IR-100 и IR-4B, одновременно пропуская ток азота.

Нейтральный раствор концентрируют в вакууме и получают частично кристаллизующийся сироп. Через 24 час при 5° кристаллы отделяют фильтрованием и промывают холодным спиртом. Полученный таким образом диэтилдитиоацеталь D-галактозы перекристаллизовывают из спирта; выход 710 мг, т. пл. 142—143°,  $[\alpha]_D^{25} -4^\circ$  (с 1,0 в воде),  $[\alpha]_D^{25} -4^\circ$  (с 1,0 в пиридине).

Маточный раствор и спиртовые фильтраты, полученные при промывке, концентрируют до 20 мл и экстрагируют в течение 24 час эфиром в жидкостном экстракторе. При охлаждении эфирного раствора до 25° получают дополнительное количество диэтилдитиоацетала D-галактозы; выход 295 мг. В результате концентрирования эфирного раствора до небольшого объема и последующего охлаждения до 5° выделяется кристаллический диэтилдитиоацеталь 3,6-ангидро-L-галактозы; выход 1,04 г. После перекристаллизации из этилацетата продукт плавится при 111—112°,  $[\alpha]_D^{25} +10^\circ$  (с 1,0 в воде),  $[\alpha]_D^{25} +14^\circ$  (с 1,6 в воде),  $-21^\circ$  (с 1,0 в спирте),  $-26^\circ$  (с 1,6 в пиридине).

Концентрирование в вакууме водного раствора, остающегося после экстракции эфиром, дает сиропообразный диэтилдитиоацеталь 3,6-ангидро-4-O-(β-D-галактопиранозил)-L-галактозы (агаробиозы). Это вещество было получено Хиразе и Араки [16] в кристаллическом виде с т. пл. 171—172°,  $[\alpha]_D^{25} -21^\circ$  (с 1,4 в метаноле),  $-8^\circ$  (с 3,1 в воде),  $-52^\circ$  (с 1,5 в пиридине), дезацетилированием его кристаллического гексаацетата.

### Метанолиз [13, 14]

Агар (50 г, влажность 15—16%) кипятят 1,5 час с обратным холодильником в 500 мл безводного метанола [20], содержащего 1 вес.% хлористого водорода (см. стр. 346). Смесь охлаждают, фильтруют (3,3 г остатка), нейтрализуют карбонатом серебра и снова фильтруют. Фильтрат концентрируют до сиропообразного состояния, остаток обрабатывают 500 мл 0,2 н. раствора Ba(OH)<sub>2</sub> при 60° в течение 2 час. Полученный раствор нейтрализуют твердым CO<sub>2</sub>. Фильтрат концентрируют до сиропообразного состояния и остаток высушивают; выход аморфного порошка 44,0 г. Этот продукт растворяют в 120 мл безводного метанола. При сильном перемешивании к раствору прибавляют 600 мл n-бутилового спирта, осадок отфильтровывают и промывают n-бутиловым спиртом и этилацетатом; выход 17,4 г. Фильтрат и раствор, полученный при промывке осадка, объединяют и упаривают досуха; получают 26,5 г аморфного порошка. Его растворяют в 30 мл абсолютного спирта и прибавляют 60 мл ацетона.



После стояния в течение недели в холодильнике при  $\sim 5^\circ$  выпадают кристаллы, которые отделяют фильтрованием. Выход диметилацетата агаробиозы [3,6-ангидро-4-O-( $\beta$ -D-галактопиранозил)-L-галактозы] 13,3 г, т. пл.  $162-164^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} -29^\circ$  (с 1,6 в воде),  $-37^\circ$  (с 1,1 в метаноле). Первый осадок (17,4 г) и фильтрат, оставшийся от кристаллизации, содержат еще около 5,5 г диметилацетата агаробиозы наряду с диметилацетатами моносахаридов и высших олигосахаридов, которые можно частично отделить друг от друга [14].

## ЛИТЕРАТУРА

1. The Pharmacopeia of the United States of America, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 15th Revision, 1955, p. 24.
2. Selby H. H., Selby T. A., in «Industrial Gums», R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Eds, Academic Press Inc., New York, N.Y., 1959, p. 15.
3. Kuroda K., Hokusishi Geppō, **16**, 142 (1959); Chem. Abstracts, **53**, 15423 (1959).
4. O'Neill A. N., Stewart D. K. R., Can. J. Chem., **34**, 1700 (1956).
5. Lian T. S., репр. пат. 925969 (1955); Chem. Abstracts, **52**, 2305 (1958).
6. Sulit J. I., Salcedo L. G., Panganihan P. C., Indo-Pacific Fisheries Council, Proc., 6th, 1955, 280 (1956); Chem. Abstracts, **53**, 11715 (1959).
7. Araki C., J. Chem. Soc. Japan, **58**, 1338 (1937); Chem. Abstracts, **32**, 4172 (1938).
8. Araki C., Hirase S., Bull. Chem. Soc. Japan, **33**, 291 (1960).
9. Hjertén S., Biochim. Biophys. Acta, **53**, 514 (1961); Porath J., Hjertén S., Methods Biochem. Anal., **9**, 193 (1962).
10. Araki C., Arai K., Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 339 (1956).
11. Araki C., Arai K., Bull. Chem. Soc. Japan, **30**, 287 (1957).
12. Araki C., Hirase S., Bull. Chem. Soc. Japan, **33**, 597 (1960).
13. Hirase S., Bull. Chem. Soc. Japan, **30**, 70, 75 (1957); Mem. Fac. Ind. Arts Kyoto Tech. Univ., Sci. Technol., **17** (1957).
14. Araki C., Hirase S., Bull. Chem. Soc., Japan, **27**, 109 (1954).
15. Araki C., Hirase S., Bull. Chem. Soc. Japan, **26**, 463 (1953).
16. Hirase S., Araki C., Bull. Chem. Soc. Japan, **27**, 105 (1954).
17. Araki C., Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 543 (1956); Mem. Fac. Ind. Arts Kyoto Tech. Univ., Sci. Technol., No. 5, **21** (1956); Chem. Abstracts, **51**, 16310 (1957).
18. Arai K., Nippon Kagaku Zasshi, **82**, 1416 (1961); Chem. Abstracts, **57**, 15211 (1962).
19. Hirase S., Bull. Chem. Soc. Japan, **30**, 68 (1957).
20. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 282.

## Альгиновая кислота

Выделение и фракционирование посредством осаждения хлористым калием и ионами марганца

А. Хауг

## ВВЕДЕНИЕ

Выделение альгиновой кислоты из бурых водорослей было впервые описано Стендфордом в 1881 г. [1], и, несмотря на обширную литературу, посвященную приготовлению альгиновой кислоты, используемые в нас-

тоящее время способы ее получения следуют в основном методу Стендфорда, хотя отдельные детали несколько изменены.

Альгиновая кислота рассматривалась как вполне определенное и химически однородное вещество, состоящее из остатков  $\beta$ -D-маннуроновой кислоты, связанных (1  $\rightarrow$  4)-связями [2], но в 1955 г. было найдено, что в состав молекулы альгиновой кислоты входит L-гулуруоновая кислота [3]. В свете этого открытия вопрос о возможной химической неоднородности альгиновой кислоты приобретает первостепенное значение для дальнейшего исследования ее строения<sup>1</sup>.

Мак-Дауелл [4] фракционировал альгиновую кислоту посредством осаждения ионами марганца(II), и полученные им результаты показывают, что между растворимой и осажденной фракциями могут существовать химические различия. Хауг [5] использовал для фракционирования хлористый калий и нашел, что как этот метод, так и осаждение ионами марганца по Мак-Дауеллу дают фракции с различным соотношением остатков двух уроновых кислот [6]. Ниже приводятся оба метода, так как наилучшее фракционирование было достигнуто при последовательном использовании обоих методов.

## МЕТОДИКА

### *Выделение альгината натрия*

Образец высушенной и измельченной *Laminaria digitata* весом 10 г экстрагируют 12—15 час 500 мл 0,2 н. серной кислоты при медленном встряхивании на качалке. Смесь фильтруют через толстую и пористую фильтровальную бумагу (например, шпайхер и шюль 520 В). Остаток промывают на фильтре 50—100 мл воды и фильтрат отбрасывают. Остаток экстрагируют 500 мл 1%-ного раствора соды на качалке в течение ночи. Чтобы сделать фильтрование возможным, обычно смесь нужно разбавить 1—2 л воды в зависимости от вязкости раствора альгината. Смесь фильтруют на обычной воронке без отсасывания. Для этой операции следует применять толстую и пористую фильтровальную бумагу. Фильтрование идет медленно, и лучше использовать несколько воронок. Остаток отбрасывают, а фильтрат смешивают с равным объемом спирта и перемешивают стеклянной палочкой. Обычно клейкий осадок прилипает практически полностью к палочке, и его можно выделить из смеси таким путем без фильтрования. Осадок промывают два раза спиртом и два раза эфиром и сушат при 30—40°; выход альгината натрия  $\sim$ 3 г.

Если необходимо получить особо чистый продукт, альгинат можно растворить в воде и переосадить спиртом. Для улучшения осаждения к раствору перед приливанием спирта нужно добавить хлористый натрий или другую неорганическую соль до концентрации 0,1—0,2%.

Методика остается по существу той же самой, если в качестве сырья применяют другие виды бурых водорослей. Различие состоит в том, что содержание альгиновой кислоты и характеристическая вязкость альгината обычно ниже, и поэтому фильтрование содового экстракта можно проводить при меньшем разбавлении. Излишнего разбавления следует избе-

<sup>1</sup> Недавно (см. Hirst E. L., Percival E., Wold L. K., J. Chem. Soc., 1964, 1493) было показано, что среди полисахаридов, объединяемых под названием «альгиновая кислота», имеются такие, в которых остатки D-маннуроновой и L-гулуруоновой кислот связаны друг с другом гликозидной связью.— *Прим. перев.*

гать, так как с осадком легче всего оперировать, когда он осажден из довольно вязких растворов. Из *Laminaria digitata* описанным выше методом получают белый альгинат, из других видов водорослей получают альгинаты более или менее окрашенными в коричневый цвет из-за адсорбции полимерных фенольных соединений [7].

Следует отметить, что химический состав альгината зависит от вида водоросли, используемой в качестве сырья [3, 6, 8]. Было показано также, что альгинат, приготовленный, как описано выше, из некоторых видов водорослей, например *Ascophyllum nodosum*, бывает загрязнен полисахаридами, содержащими фукозу, ксиллозу, уроновые кислоты и сульфатные группы [9].

### **Преобразование в альгиновую кислоту (см. также стр. 304)**

Для получения альгиновой кислоты 1 г альгината натрия суспендируют в 200 мл 0,1 н. соляной кислоты и перемешивают в течение 2 час на качалке при небольшом числе качаний. Кислоту удаляют декантацией или фильтрованием, остаток суспендируют в новой порции кислоты и встряхивают еще 2 час. После фильтрования альгиновую кислоту тщательно промывают водой до нейтральной реакции промывных вод, затем суспендируют в воде, встряхивают в течение 1 час, фильтруют, промывают спиртом и эфиром и высушивают.

### **Фракционирование осаждением хлористым калием**

1,8 г альгината натрия,  $[\eta]$  10 [10], полученного из *Laminaria digitata*, растворяют в 400 мл воды. Прозрачный гомогенный раствор смешивают с 400 мл насыщенного раствора хлористого калия. Смесь центрифугируют 30 мин на препаративной ультрацентрифуге «Спинко» при 58 000 g. Прозрачную жидкость тщательно отделяют от рыхлого студенистого осадка пипеткой, а гель удаляют из центрифужной пробирки, смывая его водой. Обе фракции осаждают прибавлением равного количества спирта; осадки снова растворяют в воде и еще раз осаждают спиртом, промывают спиртом, эфиром и высушивают. Обе фракции снова растворяют в таком количестве воды, чтобы получить 0,5%-ный раствор альгината, и процедуру повторяют. Выходы приведены в табл. 1.

### **Фракционирование осаждением ионами марганца**

Альгинат натрия (1,8 г),  $[\eta]$  10 [10], приготовленный из *Laminaria digitata*, растворяют в 400 мл воды и смешивают с 200 мл раствора 0,09 M по сульфату марганца(II) и 0,09 M по хлористому калию. Следует предварительно проверить pH раствора альгината и, если это окажется необходимым, довести его до 5—6, прежде чем прибавлять раствор сульфата марганца. Осадок часто трудно заметить, но его можно отделить от раствора, центрифугируя смесь 45 мин при 58 000 g. Прозрачный раствор отделяют от рыхлого студенистого осадка пипеткой. Обе фракции осаждают равным количеством спирта и суспендируют осадки в 100—200 мл воды.

К обеим суспензиям добавляют по 30 мл 0,1 M раствора этилендиаминотетрауксусной кислоты и по 10 мл раствора 0,1 M по карбонату и 0,1 M по бикарбонату натрия. Когда осадки полностью растворятся, альгинат снова осаждают равным количеством спирта, промывают спиртом и эфи-

ром и сушат. Обе фракции опять растворяют в количестве воды, достаточном для получения 0,5%-ного раствора альгината, и процедуру повторяют. Выходы приведены в табл. 1.

Таблица 1

Выходы, полученные при фракционировании альгината  
из *Laminaria digitata*, Тапча (29 августа 1961 г.)

	Выход раство- римой фракции, г	Выход нерастворимой фракции, г
Фракционирование с KCl		
Альгинат 1,8 г . . . . .	0,80	0,85
Растворимая фракция K <sub>p</sub> 0,80 г . . . . .	0,68	0,05
Нерастворимая фракция K <sub>n</sub> 0,85 г . . . . .	0,08	0,61
Фракционирование с MnSO <sub>4</sub>		
Альгинат 1,8 г . . . . .	0,85	0,84
Растворимая фракция Mn <sub>p</sub> 0,85 г . . . . .	0,74	0,02
Нерастворимая фракция Mn <sub>n</sub> 0,84 г . . . . .	0,33	0,34
Растворимая фракция KCl <sub>p</sub> 0,35 г . . . . .	0,148	0,144
Нерастворимая фракция KCl <sub>n</sub> 0,35 г . . . . .	0,188	0,140

### Комбинированный метод фракционирования

Альгиновая кислота полидисперсна, и, используя химические различия, молекулы кислоты можно разделить на две фракции; кроме того, у небольших молекул имеется тенденция накапливаться в растворимой, а у больших молекул — в нерастворимой фракциях. Поскольку фракционирование посредством осаждения хлористым калием ведет к накоплению молекул с высоким содержанием остатков D-маннуроновой кислоты в нерастворимой фракции, тогда как при фракционировании осаждением ионами марганца наблюдается обратное (см. табл. 2) [6], следует ожидать, что, объединив эти оба метода, можно получить особенно хорошие результаты.

Таблица 2

Состав фракций альгината, полученного из *Laminaria digitata*, Тапча  
(29 августа 1961 г.)

	M/G <sup>a</sup>		M/G <sup>a</sup>
Альгинат . . . . .	2,40	Mn <sub>p</sub> Mn <sub>p</sub> . . . . .	3,00
KCl <sub>n</sub> KCl <sub>n</sub> . . . . .	3,45	KCl <sub>n</sub> KCl <sub>n</sub> Mn <sub>p</sub> . . . . .	4,70
KCl <sub>p</sub> KCl <sub>p</sub> . . . . .	1,60	KCl <sub>p</sub> KCl <sub>p</sub> Mn <sub>n</sub> . . . . .	1,20
Mn <sub>n</sub> Mn <sub>n</sub> . . . . .	1,55		

<sup>a</sup> Приведены неисправленные значения соотношения количества D-маннуроновой и L-гу-  
лууроновой кислот.

Фракции, приготовленные осаждением хлористым калием, растворяют в воде и фракционируют осаждением ионами марганца, как описано выше. Выходы указаны в табл. 1.

### Анализ фракций

Состав уроновых кислот в некоторых фракциях был определен хроматографированием гидролизатов на колонках с анионитами [11] и количественным определением разделенных уроновых кислот по реакции с орцином. Результаты, выраженные в виде соотношения количеств остатков D-маннуровой и L-гулуриновой кислот (M/G), приведены в табл. 2. В полученных величинах не учитывается различная скорость распада уроновых кислот во время гидролиза [11].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Standford E. C. C., англ. пат. 142 (1881).
2. Chanda S. K., Hirst E. L., Percival E. G. V., Ross A. G., J. Chem. Soc., 1952, 1833.
3. Fisher F. G., Dörfel H., Z. physiol. Chem., 302, 186 (1955).
4. McDowell R. H., Chem. and Ind. (London), 1401 (1958).
5. Haug A., Acta Chem. Scand., 13, 601 (1959).
6. Haug A., Acta Chem. Scand., 13, 1250 (1959).
7. Haug A., Larsen B., Rapport № 22, Norwegian Institute of Seaweed Research Trondheim, Norway, 1959.
8. Haug A., Larsen B., Proc., Intern. Seaweed Symp., 4th, Biarritz, 1952 (1963).
9. Larsen B., Haug A., Proc. Intern. Seaweed Symp., 4th, Biarritz, 1952 (1963).
10. Haug A., Smidsrød O., Acta Chem. Scand., 16, 1569 (1962).
11. Haug A., Larsen B., Acta Chem. Scand., 16, 1908 (1962).

## Бактериальные полисахариды

### Экстракция хлоральгидратом

Е. Дж. Бурн, Х. Вейгел

### ВВЕДЕНИЕ

Водный раствор хлоральгидрата — прекрасный растворитель для крахмала [1], очень существенно понижающий его точку желатинизации [2]. Такие растворители, как этилендиамин и гидразингидрат, вызывают заметный гидролиз полисахарида [3]; обработка раствором хлоральгидрата оказывает незначительное воздействие на синее число картофельного крахмала [4]. Бурн и соавторы описали методику экстракции свободной от белков амилоры из различных сортов гороха [5] и крахмала из амобы *Polytomella coeca* [4]. Она основана на методе Мейера и Бернфельда [3], которые использовали описанные выше свойства хлоральгидрата в своих исследованиях крахмала. По этой методике полисахариды амилопектинового типа экстрагировали из клеток *Clostridium butircum* [6], *Cycloposhium* [7] и *Holotrich ciliates* [8]. Хотя хлоральгидрат использовали главным образом для экстракции полисахаридов типа амилозы и амилопектина, он может найти более широкое применение, так как легко растворяет такие сложные полисахариды, как гуммиарабик [9].

## МЕТОДИКИ

## Экстракция крахмала

Клетки *Polytomella coesa*, культивировавшиеся в синтетической среде, содержащей спирт или уксусную кислоту как источник углерода, отделяют с помощью центрифуги Шарплеса. Клетки разрушают, растирая с песком. Полученный материал суспендируют в 0,01 *M* фосфатном или 0,02 *M* цитратном буфере, рН 7. Центрифугирование при низких скоростях дает осадок, который состоит главным образом из крахмала, вместе с небольшими количествами минеральных примесей, белков и обломков бактериальных клеток.

Содержащий крахмал осадок (сухой вес 2 г) перемешивают в течение 1 час при 80° с 100 мл 33%-ного раствора хлоральгидрата в воде. Нерастворимый остаток, который отделяют с помощью центрифуги, перемешивают с двумя свежими порциями, по 20 мл каждая, теплового раствора хлоральгидрата.

Объединенные экстракты фильтруют через стеклянный фильтр и выливают тонкой струей в 250 мл ацетона. Хлопьевидный полисахарид отделяют; при растирании с ацетоном он становится более твердым. Последние остатки хлоральгидрата удаляют, экстрагируя полисахарид в аппарате Сокслета в течение 2 час ацетоном и затем в течение 1 час эфиром. Продукт сушат при 60° в вакууме над фосфорным ангидридом; выход около 1,7 г.

## Переосаждение крахмала

Суспензию крахмала в небольшом объеме спирта нагревают на кипящей водяной бане и, перемешивая с большой скоростью, прибавляют воду из расчета 150 мл воды на 1 г полисахарида. Перемешивание и нагревание продолжают 20 мин. Большая часть полисахарида при этом растворяется, остаток представляет собой очень тонкую суспензию. Прибавление нескольких капель 10%-ного раствора едкого натра вызывает быстрое завершение процесса растворения. Еще через 5 мин раствор оставляют охлаждаться и затем нейтрализуют соляной кислотой. Полисахарид осаждают 1,5 объемами спирта, растирают со спиртом и затем с эфиром и сушат, как указано выше.

Продукт содержит около 0,8% золы, но в нем нет сколько-нибудь заметных количеств белка; синее число равно 0,36,  $[\alpha]_D^{25} + 160^\circ$  (в 0,5 н. растворе едкого натра). При кислотном гидролизе он дает только глюкозу; предельное превращение в мальтозу с  $\beta$ -амилазой из соевых бобов составляет 54% [10].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schär E., *Pharmac. Centralhalle*, **37**, 540 (1896).
2. Schormeyer H. H., Felton G. E., Ford C. L., *Ind. Eng. Chem.*, **35**, 1168 (1943).
3. Meyer K. H., Bernfeld P., *Helv. Chim. Acta*, **23**, 875 (1940).
4. Bourne E. J., Stacey M., Wilkinson I. A., *J. Chem. Soc.*, 2694 (1950).
5. Peat S., Bourne E. J., Nicholls M. J., *Nature*, **161**, 206 (1948).
6. Hobson P. N., Nasr H., *J. Chem. Soc.*, 1951, 1855.
7. Forsyth G., Hirst E. L., Oxford A. E., *J. Chem. Soc.*, 1953, 2030.

8. Forsyth G., Hirst E. L., J. Chem. Soc., 1953, 2132.
9. Mauch R., Arch. Pharm., 240, 113 (1901).
10. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1964, vol. IV, p. 261.

## Бактериальные полисахариды

### Экстракция диэтиленгликолем

В. Т. Дж. Морган

### ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные полисахариды и соматические О-антигены, являющиеся сложными макромолекулами, содержащими полисахаридные компоненты, обычно прочно связаны с поверхностью бактериальной клетки, и лучше всего их получать путем экстракции микроорганизмов подходящим растворителем [1, 2]. В некоторых случаях лучше всего экстрагировать промытые и высушенные клетки безводным диэтиленгликолем [2-( $\beta$ -оксизтокси)этанолом] [3]. Там, где можно использовать этот реагент, экстракция диэтиленгликолем представляет собой, вероятно, наиболее удовлетворительный метод выделения больших лабильных комплексов, содержащих специфический полисахарид, являющийся носителем антигенных свойств, или где свободный нативный полисахарид существует как компонент поверхности бактериальной клетки. Кроме его способности избирательно удалять свободные полисахариды и полисахаридсодержащие антигенные комплексы, диэтиленгликоль обладает рядом достоинств. Он имеет нейтральную реакцию, смешивается с водой, спиртом и ацетоном во всех соотношениях, не содержит азота, легко удаляется диализом и может быть использован при низких температурах. Белки и нуклеиновые кислоты бактериальной клетки по большей части остаются нерастворенными, если для экстракции применяют холодный безводный реагент. Более того, использование безводного реагента при 0° сводит к минимуму вероятность того, что экстрагируемый полисахарид подвергнется деградации или модификации ферментами бактериальной клетки. Диэтиленгликоль обнаруживает специфичность действия, и наиболее успешно он был использован для экстракции *Shigella dysenteriae* [4, 5], *Salmonella thyphosa* [6], *Shigella flexneri* тип Z [7] и других грамотрицательных организмов.

### МЕТОДИКА

Рекомендуется следующая методика экстракции. Промытую и высушенную ацетоном культуру (1 кг) экстрагируют 10 частями (по весу) свежеперегнанного диэтиленгликоля. Суспензию встряхивают по несколько часов каждый день в течение 3—4 дней при комнатной температуре, прибавляют метанол (5% по объему), чтобы уменьшить вязкость, и клетки удаляют центрифугированием в закрытом стакане центрифуги Шарплеса. Прозрачный желтый надосадочный раствор пропускают через фильтровальную свечу Беркефельда, чтобы удалить небольшие количества обломков бактериальных клеток, диализуют против дистиллированной воды

при 2—4° до полного удаления гликоля и полученный опалесцирующий водный раствор концентрируют в вакууме при 16°, пока содержание твердого остатка не составит ~1%.

Бактериальные клетки, оставшиеся в центрифужном стакане, суспендируют в свежем диэтиленгликоле и снова экстрагируют; всего проводят четыре экстракции. После первой экстракции клетки оседают легче, и для третьей и четвертой экстракций используют меньшее количество гликоля.

Все четыре экстракта объединяют и фракционируют осаждением ацетоном. Водный раствор охлаждают до 0—2°, тщательно перемешивают и медленно прибавляют охлажденный до —10° ацетон, пока его концентрация не составит 50% (по объему). Некоторое количество вещества при этом осаждается, и его удаляют центрифугированием. Затем концентрацию ацетона увеличивают до 66%, при этом осаждается основная масса вещества с антигенными свойствами. Осадок снова растворяют в воде и повторно обрабатывают ацетоном, причем небольшое количество вещества снова удаляют, когда концентрация ацетона достигает 50%; остальное количество антигена осаждается при увеличении концентрации ацетона до 60%. Растворение в воде и осаждение ацетоном повторяют еще раз, полученную при этом фракцию, осаждающуюся при увеличении концентраций ацетона от 50 до 60%, растворяют в воде, диализуют на холоду против дистиллированной воды и лиофилизируют (см. стр. 302). Выход вещества ~8—10% от начального (сухого) веса подвергнутых экстракции бактерий.

Полученное вещество очищают, приготавливая его 1%-ный раствор в воде и фракционируя осаждением сульфатом аммония. Вещество, осаждающееся между 35- и 40%-ным насыщением раствора этой солью, отделяют, снова растворяют в воде и переосаждают. Полученное вещество диализуют, чтобы удалить сульфат аммония, лиофилизируют, приготавливают 1%-ный раствор в воде (вес/объем) и опять осаждают ацетоном. Вес вещества, осаждающегося при концентрации ацетона от 50 до 60% (по объему) и выделенного после диализа против дистиллированной воды при 1—2°, составляет ~5% от веса исходной культуры.

Это вещество состоит главным образом из соматического О-антигена, представляющего собой комплекс полисахарида, связанного с ним белка (липопротеина) и фосфолипида. Последний компонент удаляется при выливании 1%-ного раствора вещества при 0—2° в 10-кратное количество (по объему) охлажденной от —5 до —10° смеси эфира и спирта (1 : 1), содержащей 0,5% 10 н. соляной кислоты. При этом осаждается вещество, в значительной мере свободное от фосфолипидного компонента. Его отделяют центрифугированием, растворяют в воде и еще дважды подвергают процессу «обезжиривания».

Приготавливают 2%-ный водный раствор освобожденного от фосфолипидов вещества и фракционируют его дифференциальным центрифугированием на центрифуге «Спинко», модель L. Этим путем вещество разделяется на относительно небольшую фракцию, которая осаждается при 25 000 g, и основную массу (~ $\frac{2}{3}$  всего вещества), состоящую из соматического О-антигена [5], который осаждается в виде бесцветных, опалесцирующих, студенистых комочков между 25 000 и 105 000 g. Вещество, представляющее собой специфический полисахарид, остается в растворе. Оно не осаждается при продолжительном центрифугировании даже при 105 000 g, и его получают в виде прозрачного вязкого раствора. Каждое из веществ выделяют после диализа лиофильной сушкой.



### Свойства

Свойства полисахаридов, полученных экстракцией различных грам-отрицательных микроорганизмов диэтиленгликолем, можно обобщить следующим образом.

Свободный нативный специфический полисахарид не осаждается из водных растворов при центрифугировании при 105 000 *g* в течение нескольких часов. Это вещество дает прозрачный вязкий раствор, оно полидисперсно, имеет очень высокий молекулярный вес и относительно однородно. Препарат не имеет антигенных свойств или обладает ими в очень малой степени и мало токсичен [8].

Другой специфический полисахарид, так называемый деградированный полисахарид [9], меньшего молекулярного веса, но полностью активный в серологических тестах, можно легко получить из соматического О-антигена (полисахарид и связанный с ним белок) гидролизом 1 н. уксусной кислотой при 100°. Полисахарид остается в растворе после гидролиза, тогда как другие компоненты антигенного комплекса осаждаются.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Davies D. A. L., *Advances in Carbohydrate Chem.*, **15**, 271 (1960).
2. Morgan W. T. J., *The Nature of the Bacterial Surface*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, p. 9, 1949.
3. Morgan W. T. J., *Biochem. J.*, **31**, 2003 (1937).
4. Morgan W. T. J., Partridge S. M., *Biochem. J.*, **34**, 169 (1940); **35**, 1140 (1941).
5. Davies D. A. L., Morgan W. T. J., Mosimann W., *Biochem. J.*, **56**, 572 (1954).
6. Henderson D. W., Morgan W. T. J., *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **19**, 82 (1938).
7. Goebel W. F., Brinkley F., Perlman E., *J. Exptl. Med.*, **81**, 315 (1945).
8. Davies D. A. L., Morgan W. T. J., *Intern. Congress Microbiol.*, 2nd, Rome, 1953, 16 (1953).
9. Davies D. A. L., Morgan W. T. J., Record B. R., *Biochem. J.*, **60**, 290 (1955).

## Бактериальные липополисахариды

Экстракция смесью фенол — вода

О. Вестфаль, К. Яни

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что жидкий фенол является превосходным растворителем для многих белков. Коэффициент распределения в двухфазной смеси фенол — вода очень часто допускает почти полную экстракцию белков из водных растворов при контролируемых рН и ионной силе в один прием. И наоборот, полисахариды, мукополисахариды, липополисахариды и нуклеиновые кислоты обычно растворимы в воде, но нерастворимы в феноле. Прибавлением жидкого фенола к водным растворам можно осадить различные полисахариды (см., например, [1]). Фенол — слабая кислота, константа диссоциации которой при 18—19° в воде составляет  $1,1-4,2 \cdot 10^{-10}$  [2].

Смесь фенола и воды имеет высокую диэлектрическую постоянную. На этом основан метод распределения белков и полисахаридов и (или) нуклеиновых кислот между фенолом и водой. Отделению белков от полисахаридов и нуклеиновых кислот при экстракции смесью фенол — вода часто способствует и благоприятный коэффициент распределения, и способность этой смеси вызывать диссоциацию.

Морган и Партридж [3] показали, что диэтиленгликолевые экстракты (эндотоксический или полный О-антигенный комплекс) различных *Enterobacteriaceae*, таких, как *Shigella dysenteriae* и *Salmonella typhosa*, состоят из специфического полисахарида, белка и липидных веществ (см. стр. 323). Комплекс диссоциирует при растворении в 90%-ном жидком феноле. Если реакционную смесь диализуют против воды, белок осаждается, тогда как неизмененный полисахарид остается в полученном в результате диализа водном растворе. Тот же метод был применен Гебелем и соавторами [4] для расщепления полисахаридно-белкового комплекса из *Shigella sonnei* на растворимый в феноле белок и растворимый в воде липополисахарид. Гебель и Берри [5] также использовали этот метод для расщепления содержащего колицин К комплекса из *E. coli* K<sub>235</sub> на белок и полисахарид.

Палмер и Герлаф [6], пытаясь создать удобный метод прямой экстракции соматических полисахаридных антигенов энтеробактерий, обрабатывали целые бактериальные клетки жидким фенолом с последующей экстракцией водой. Фенол вызывал диссоциацию О-антигенного комплекса в стенках бактериальной клетки так, что последующая обработка водой велась к извлечению высоко антигенного нативного полисахарида с низким содержанием белка. Для полного извлечения полисахарида двухстадийная обработка повторялась несколько раз. Метод Палмера — Герлафа был также успешно применен и в области грамположительных бактерий М. Хейдельбергером и соавторами [7] для экстракции капсулярных полисахаридов из пневмококков, которые затем использовались как антигены, активные для человека [8].

Позднее Вестфаль и соавторы [9] показали, что экстракцию по Палмеру — Герлафу [6] можно упростить, если встряхивать бактерии прямо с эмульсией равных объемов фенола и воды в течение нескольких минут при низкой температуре (5—10°). Если смесь центрифугируют, она разделяется на верхний водный и нижний фенольный слой и нерастворимый остаток, причем водная фаза содержит весь нативный полисахарид (липополисахарид) и нуклеиновую кислоту (методика А в работе [9]).

Тот же метод был использован Бертоном и Картером [10] для экстракции клеток *E. coli* O 111. Эти исследователи гидролизovali далее очищенный, не содержащий белка липополисахарид и получили липид (липид А [11, 12]) и деградированный полисахарид. Таубер и Гарсон [13] также применяли этот метод для экстракции эндотоксических липополисахаридов из *Neisseria gonorrhoeae*. Авторы интенсивно перемешивали смесь в гомогенизаторе Уоринга в течение 8 мин. За это время большая часть клеток разрушалась, а антигенный комплекс диссоциировал. Температура смеси возрастала приблизительно от 10° в начале до 40° в конце перемешивания. После центрифугирования при комнатной температуре водный и фенольный слой разделялись. Водная фаза содержала практически весь липополисахарид.

Липополисахариды, экстрагируемые из бактерий холодными эмульсиями фенол — вода, однако, часто еще содержат переменные количества прочно связанных белков.

При температурах выше 68° фенол и вода смешиваются в любых соотношениях [14]. При охлаждении гомогенная смесь разделяется на два слоя: верхнюю водную фазу, насыщенную фенолом, и нижнюю фенольную, насыщенную водой. Так, при 15° вода содержит 8,2% фенола, а в феноле растворено 37,4% воды. Если грамотрицательные бактерии обрабатывают гомогенной смесью равных объемов фенола и воды при 65—68° [9], клетки быстрее разрушаются и значительная часть (до 40%) бактериальных веществ переходит в раствор. После охлаждения до 5—10° и центрифугирования получают три фракции: водный слой, фенольный слой и нерастворимый ни в воде, ни в феноле остаток (методика В в работе [9]). Водная фаза после диализа содержит бактериальный липополисахарид (О-антиген, эндотоксин [11, 12]), свободный от белка, и нуклеиновую кислоту. Липополисахарид и нуклеиновую кислоту можно разделить различными способами, например осаждением спиртом [9, 15, 16] (см. также стр. 285), ультрацентрифугированием [15], избирательным осаждением нуклеиновых кислот катионными детергентами, например цетилтриметиламмоний бромидом (цетавлон) [17, 17а], или комбинацией этих способов.

Оказалось, что метод имеет широкую применимость для экстракции антигенных и (или) токсических липополисахаридов, особенно содержащихся в грамотрицательных бактериях. За несколько лет в нашей лаборатории смесью фенол — вода было проэкстрагировано более 300 видов грамотрицательных бактерий (гладкие формы, S-формы): *Salmonella* [18], *Escherichia* [19], *Arizona* [20, 21] и др. [11, 20]. Дэвис и соавторы применили этот метод для экстракции липополисахаридов из *P. pestis* [22], *P. pseudotuberculosis* [23], *Chromobacterium* [24] и др.

Особенно интересно, что соматические липополисахариды шероховатых штаммов (R-форма) также можно извлечь с помощью смеси фенол — вода [25—27], в то время как многие другие методы экстракции оказываются неэффективными. Сравнимая известные методы, удобные для экстракции О-антигенных полисахаридных комплексов из S-форм энтеробактерий [11, 12, 28] с точки зрения их применимости к R-формам, Дэвис констатировал ([23], стр. 121), что «только в фенольных экстрактах были получены значительные выходы углеводов».

Об эффективности экстракции смесью вода — фенол грамотрицательных бактерий свидетельствует тот факт, что после исчерпывающей предварительной обработки другими агентами, извлекающими липополисахариды и белки, такими, как холодная трихлоруксусная кислота [29] (см. также стр. 333) или диэтиленгликоль [3, 30] (стр. 323), из проэкстрагированных бактерий эта смесь всегда извлекает еще значительные количества липополисахаридов [31—33]. Таким образом, можно считать, что экстракция смесью фенола и воды — наиболее жесткий метод экстракции сложных соматических липополисахаридов и полисахаридов грамотрицательных бактерий.

## МЕТОДИКИ

### Методика I [9, 11, 15, 34]

Грамотрицательные бактерии после культивирования на подходящей среде отделяют центрифугированием и осадок промывают раствором хлористого натрия. Бактерий убивают прибавлением ацетона и (или) автолизуют.

### Экстракция смесью фенол — вода

20 г бактерий (сухой вес), например энтеробактерий (*Escherichia*, *Salmonella* и т. д.), суспендируют в 350 мл воды при 65—68° (на водяной бане); затем при сильном перемешивании прибавляют 350 мл 90%-ного фенола, предварительно нагретого до 65—68°, и смесь выдерживают 10—15 мин при 65°, после чего охлаждают приблизительно до 10°, поместив сосуд со смесью в баню со льдом. Эмульсию центрифугируют 35—40 мин при 3000 об/мин, при этом образуется 2 слоя: водный и фенольный и нерастворимый остаток, который иногда образует слой на границе фенольной и водной фаз. Водный слой отсасывают, а фенольный слой и нерастворимый остаток обрабатывают при 65—68° новой 350 мл порцией воды, как описано выше. Объединенные водные экстракты диализуют 3—4 дня против дистиллированной воды, чтобы удалить фенол и небольшие количества бактериальных веществ низкого молекулярного веса. Диализованный, слегка опалесцирующий раствор, содержащий липополисахарид и рибонуклеиновую кислоту, концентрируют при 35—40° в вакууме до ~ 100 мл. После центрифугирования, чтобы удалить следы нерастворимого вещества, водный раствор лиофилизуют и получают почти белый очень легкий порошок; выход 1,6—2,0 г (8—10% сухого веса бактерий). Неочищенный экстракт содержит 40—50% липополисахарида (эндотоксический О-антиген) и 50—60% бактериальной рибонуклеиновой кислоты (РНК).

### Удаление нуклеиновой кислоты

Из лиофилизованного неочищенного экстракта готовят 3%-ный водный раствор, который центрифугируют 6—8 час при 80 000 g. Осадок суспендируют в воде и суспензию центрифугируют 2—3 раза по 3 час при 105 000 g. Полученный в результате осадок смывают минимальным количеством воды и лиофилизуют. Выход бактериального липополисахарида, содержащего 3% нуклеиновой кислоты, 300—500 мг (1,5—2,5% сухого веса бактерий).

Известно, что полианионные вещества образуют нерастворимые в воде соли с катионными детергентами, такими, как цетилтриметиламмоний бромид (цетавлон). Однако эти соли растворяются в растворах неорганических солей, например хлористого натрия, причем растворимость зависит от ионной силы (и pH) среды (см. обзор [35]). Используя осаждения цетавлоном, Джонс [36] очистил бактериальную нуклеиновую кислоту, а Скотт [37] фракционировал неочищенные препараты гепарина и других кислых полисахаридов (стр. 288). На основании этих результатов было найдено [17], что смесь бактериальных липополисахаридов и нуклеиновых кислот, полученную при экстракции смесью фенол — вода (методика I), можно разделить, так как нуклеиновые кислоты обладают более сильными кислотными свойствами по сравнению с липополисахаридами, которые имеют слабые анионные свойства, поскольку содержат небольшое количество фосфатных эфирных групп (см. [11, 12, 28]).

Разделение липополисахаридов и нуклеиновых кислот можно осуществить различными путями.

а) Липополисахаридный осадок после одного или двух ультрацентрифугирований часто еще содержит несколько процентов нуклеиновой кислоты. При осаждении цетавлоном это небольшое количество РНК можно отделить и получить не содержащий РНК липополисахарид (не имеющий максимума поглощения при 260 мμ) (методика II).

б) Фракция нуклеиновой кислоты, остающаяся в надосадочной жидкости после отделения осадка липополисахарида при ультрацентрифугировании, всегда содержит заметные количества бактериального липополисахарида, который в присутствии нуклеиновой кислоты не осаждается при 30 000—40 000 об/мин (см. выше). Осадив цетавлоном нуклеиновые кислоты, можно получить остающийся липополисахарид в очищенном виде. Было найдено [17], что эта липополисахаридная фракция иногда отличается по количественному составу от первоначально осажденного липополисахарида. Например, липополисахарид *E. coli* O 111 : B<sub>4</sub>, приготовленный по методике I, содержит 14% 3,6-дидезокси-*L*-ксилогексозы (колитозы, 3-дезокси-*L*-фруктозы), тогда как липополисахарид, остающийся в надосадочной жидкости после осаждения нуклеиновой кислоты цетавлоном, содержит 27—28% колитозы. Остается еще выяснить (см. [37a]), является ли это указанием на существование более чем одного специфического липополисахарида в *E. coli* O 111 : B<sub>4</sub>.

в) Неочищенный экстракт, состоящий из липополисахарида и нуклеиновой кислоты (методика I), непосредственно фракционируют, осаждая цетавлоном, и получают липополисахарид, свободный от основного количества РНК (методика III).

### Методика II

1 г неочищенного липополисахарида, содержащего 2—5% РНК, растворяют в 150 мл воды, прибавляют 15 мл 2%-ного водного раствора цетавлона и смесь перемешивают 15 мин при комнатной температуре. Мутную смесь центрифугируют 20 мин при 3000 об/мин, чтобы удалить осадившуюся РНК. Опалесцирующий надосадочный раствор лиофилизируют и пушистый остаток растворяют в 50—60 мл 0,5 М раствора хлористого натрия. Раствор выливают в десятикратный объем спирта, чтобы осадить липополисахарид; избыток цетавлона остается при этом в растворе. После стояния в течение 1—2 час при 0—4° осадок отделяют центрифугированием и снова растворяют в воде. После диализа в течение 2 дней против деионизованной воды для удаления хлористого натрия раствор лиофилизируют (стр. 302); выход липополисахарида, не содержащего РНК, ~ 900 мг.

### Методика III

Лиофилизированный неочищенный, состоящий из липополисахарида и нуклеиновой кислоты экстракт, полученный из водной фазы после экстракции смесью фенол — вода (методика I), растворяют в таком количестве 0,5 М раствора хлористого натрия, чтобы получить 0,5—1%-ный раствор. 2%-ный раствор цетавлона в 0,5 М хлористом натрии прибавляют при перемешивании, пока соотношение цетавлона и неочищенного экстракта не станет примерно равным 1,5 : 1. Затем раствор постепенно разбавляют водой и отделяют осадок центрифугированием по мере того, как он образуется. Соль РНК и цетавлона осаждается приблизительно из 0,3 М раствора хлористого натрия. Разбавленный раствор лиофилизируют (стр. 302), полученный остаток растворяют в 0,5 М растворе хлористого натрия и выливают в десятикратный объем спирта. После центрифугирования осадок растворяют в воде, диализуют и лиофилизируют; выход не содержащего РНК липополисахарида 30—40% от неочищенного экстракта.

Осаждение цетавлоном по методике III целесообразно применять в тех случаях, когда водная фаза после экстракции смесью фенол — вода содержит, кроме липополисахарида и нуклеиновой кислоты, кислый мукополисахарид [17a], как, например, у некоторых видов *Salmonella* и *Escherichia*.

Другой путь получения не содержащего нуклеиновой кислоты бактериального липополисахарида возник из наблюдения [38], что экстракция смесью фенол — вода бактерий *Salmonella*, убитых формалином, даст водную фазу, содержащую липополисахарид и лишь небольшие количества РНК или вовсе не содержащую последней. Дальнейшие исследования показали [39], что бактериальная РНК после обработки бактерий разбавленным 0,1—0,5%-ным формальдегидом больше не извлекается смесью фенол — вода (методика I), вероятно, из-за возникновения связей между РНК и бактериальным белком, приводящим к образованию нерастворимых в смеси фенол — вода комплексов. Однако «формалиновый» вариант водно-фенольной экстракции нуждается в более детальном исследовании.

### *Другие примеры применения экстракции смесью фенол — вода*

Распределение белка и полисахарида или липополисахарида между фенолом и водой было применено для расщепления и разделения специфических осадков полисахаридных антигенов с антителами [40]. В принципе осадок диспергируют в воде и прибавляют при перемешивании равный объем жидкого фенола. После разделения фаз центрифугированием водный слой содержит свободный от антител полисахаридный антиген, который можно выделить и проанализировать. Метод позволяет очищать полисахаридные антигены путем избирательного осаждения антителами [32, 40], т. е. фракционировать полисахаридные антигены по их серологической специфичности. Хоман и Ленс [41] очистили препараты гепарина, содержащие белки, используя смесь фенола с водой. Из водной фазы, которая оказалась свободной от белка, был выделен очищенный гепарин.

Недавно Бробергер и Перлман [42] смогли получить аутоантиген из толстых кишок и других тканей новорожденных детей, пораженных острым язвенным колитом. Антиген был извлечен смесью фенол — вода при 65° и, вероятно, представляет собой главным образом полисахарид.

На основании наших наблюдений [9] Шрамм и соавторы [43] развили метод расщепления нуклеопротеина вируса табачной мозаики (TMV) на растворимый в феноле белок и растворимую в воде нативную рибонуклеиновую кислоту. Они первыми смогли показать, что не содержащая белка рибонуклеиновая кислота TMV является инфекционным началом вируса. Эти результаты стимулировали широкое применение метода водно-фенольной экстракции ко многим вирусам, и было ясно показано, что соответствующая нуклеиновая кислота действует как носитель вирусной активности (см. обзор [44]).

Кирби [45—46] показал, что не содержащие белков РНК и ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) можно извлечь из тканей высших организмов посредством модифицированной методики экстракции смесью фенол — вода. Обычным способом, как и у бактерий, экстрагируется толь-

ко РНК. Если добавить липофильные или комплексобразующие соли, например *n*-аминосалицилат, то экстрагируется и не содержащая белка ДНК. Смесь РНК и ДНК после этого можно разделить избирательным осаждением ДНК.

Нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК) многих вирусов были извлечены из инфицированных тканей или холодной эмульсией, или нагретой смесью фенола и воды и было показано, что они являются инфекционным началом вирусов (см., например, [47—54]).

Из разрушенного смесью фенол — вода нуклеопротеина TMV Андерер [55] смог выделить белок TMV (из фенольного раствора). Выделенный белок снова соединялся с нуклеиновой кислотой TMV с образованием кристаллического нуклеопротеина TMV. Это показывает, что белок не денатурируется в жидком феноле необратимо. Кикхейфен [56] недавно показал, что различные ферменты — рибонуклеаза, химотрипсин, трипсин, лизоцим и др. — после растворения в жидком феноле можно количественно выделить сходным способом без потери ими ферментативной активности. Некоторые ферменты даже выдерживают нагревание в фенольном растворе до 80—100°.

Таким образом, водно-фенольная экстракция может, вероятно, применяться не только для выделения и очистки полисахаридов, липополисахаридов или нуклеиновых кислот, но в некоторых случаях также и для белков.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Robinson E. S., Flusser B. A., J. Biol. Chem., **153**, 529 (1944).
2. Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie, 4th Ed., Vol. 6, 2nd suppl., 1944, p. 123.
3. Morgan W. T. J., Partridge S. M., Biochem. J., **35**, 1140 (1941).
4. Jesaitis M. A., Goebel W. F., J. Exptl. Med., **96**, 409 (1952); Goebel W. F., Jesaitis M. A., J. Exptl. Med., **96**, 438 (1952).
5. Goebel W. F., Barry G. T., J. Exptl. Med., **107**, 185 (1957).
6. Palmer J. W., Gerlough T. D., Science, **92**, 155 (1940).
7. MacLeod C. M., Hodges R. G., Heidelberger M., Bernhard W. G., J. Exptl. Med., **82**, 445 (1945).
8. Heidelberger M., Angew. Chem., **66**, 403 (1954).
9. Westphal O., Lüderitz O., Bister F., Z. Naturforsch., **7B**, 148 (1952).
10. Burton A. J., Ph. D. Dissertation, University of Illinois, Urbana, Illinois, 1961.
11. Westphal O., Lüderitz O., Angew. Chem., **66**, 407 (1954).
12. Westphal O., Ann. Inst. Pasteur, **98**, 789 (1960).
13. Tauber H., Garson W., J. Biol. Chem., **234**, 1391 (1959).
14. Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie, 4th Ed., vol. 6, 1923, p. 114; Bailey C. R., J. Chem. Soc., **127**, 1951 (1925).
15. Westphal O., Lüderitz O., Eichenberger E., Keiderling W., Z. Naturforsch., **7B**, 536 (1952).
16. Nadi M., Egami F., Hamamura N., Nomma J. Y., Biochem. Z., **330**, 421 (1958).
17. Jann K., Westphal O., неопубликованные данные.
- 17a. Ørskov F., Ørskov I., Jann B., Jann K., Nature, **200**, 144 (1963).
18. Kauffmann F., Lüderitz O., Stierlin H., Westphal O., Zentr. Bakteriол. Parasitenk., Abt. I, Orig., **178**, 442 (1960).
19. Kauffmann F., Lüderitz O., Stierlin H., Braun O. H., Westphal O., Zentr. Bakteriол. Parasitenk., Abt. I, Orig., **180**, 180 (1960).

20. Westphal O., Kauffmann F., Lüderitz O., Stierlin H., *Zbl Bakt. Zentr. Bakteriол., Parasitenk. Abt. I, Orig.*, **179**, 336 (1960).
21. Kauffmann F., Jann B., Krüger L., Lüderitz O., Westphal O., *Zentr. Bakteriол. Parasitenk., Abt. I, Orig.*, **186**, 509 (1962).
22. Davies D. A. L., *Biochem. J.*, **63**, 109 (1956).
23. Davies D. A. L., *J. Gen. Microbiol.*, **18**, 118 (1958).
24. Crumpton M. J., Davies D. A. L., *Biochem. J.*, **70**, 129; 729 (1958).
25. Westphal O., Lüderitz O., *Proc. Intern. Congr. Microbiol.*, 6th, Rome. 1953, **2**, 22 (1955).
26. Lüderitz O., Kauffmann F., Stierlin H., Westphal O., *Zentr. Bakteriол. Parasitenk., Abt. I, Orig.*, **179**, 180 (1960).
27. Kauffmann F., Krüger L., Lüderitz O., Westphal O., *Zentr. Bakteriол. Parasitenk., Abt. I, Orig.*, **182**, 57 (1961).
28. Westphal O., Lüderitz O., *Pathol. Microbiol.*, **24**, 870 (1961).
29. Boivin A., Mesrobianu, *Compt. rend. soc. biol.*, **112**, 76; **611**, 1009; **113**, 490; **114**, 307 (1933); *Rev. Immunol.*, **1**, 553 (1935); **2**, 113 (1936); **3**, 319 (1937).
30. Morgan W. T. J., *Biochem. J.*, **31**, 2003 (1937).
31. Westphal O., in «Polysaccharides in Biology», Josiah Macy, Jr., Foundation. New York, N.Y., 1957, p. 115.
32. Rauss K., Kontrohr T., Vertenyi A., Ketyi I., *Biochem. Z.*, **336**, 126 (1962).
33. O'Neill G., Todd J. P., *Nature*, **190**, 344 (1961).
34. Kabat E. A., Mayer M., *Experimental Immunochemistry*, Charles C. Thomas Publishers, Springfield, Illinois, 2nd, Ed., 1931, p. 833.
35. Scott J. E., *Methods Biochem. Anal.*, **8**, 145 (1960).
36. Jones A. S., *Biochem. Biophys. Acta*, **10**, 607 (1953).
37. Scott J. E., *Chem. and Ind. (London)*, 1568 (1955).
- 37a. Barry G. T., Tsai T., *Federation Proc.*, **22**[2], 206 (1963).
38. Westphal O., Kauffmann F., неопубликованные данные.
39. Westphal O., Jeanloz R. W., неопубликованные данные.
40. Lüderitz O., O'Neill G., Westphal O., *Biochem. Z.*, **333**, 136 (1960).
41. Horman J. D., Lens J., *Biochim. Biophys. Acta*, **2**, 333 (1948).
42. Broberger O., Perlman P., *J. Exptl. Med.*, **110**, 657 (1959).
43. Schuster H., Schramm G., Zillig W., *Z. Naturforsch.*, **11B**, 339 (1956); Gierer A., Schramm G., *Nature*, **177**, 702 (1956); *Z. Naturforsch.*, **11B**, 138 (1956).
44. Colter J. S., *Progr. Med. Virol.*, **1**, 1 (1958).
45. Kirby K. S., *Biochem. J.*, **66**, 495 (1957); **71**, 27P (1959).
46. Kirby K. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **36**, 117 (1959); **47**, 18 (1961); **55**, 382 (1962).
47. Colter J. S., Bird H. H., Brown R. A., *Nature*, **179**, 859 (1957); Colter J. S., Bird H. H., Moyer A. W., Brown R. A., *Virology*, **4**, 522 (1958).
48. Wecker A., Schäfer W., *Z. Naturforsch.*, **12B**, 415 (1957); Wecker A., *Virology*, **7**, 241 (1959); *Z. Naturforsch.*, **14B**, 370 (1959).
49. Diener T. O., Weaver M. L., *Virology*, **8**, 530 (1959).
50. Huppert J., Sanders F. K., *Nature*, **182**, 515 (1958).
51. Sprunt K., Redman W. M., Alexander H. E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **101**, 104 (1959).
52. Schlegel D. E., *Virology*, **11**, 329 (1960).
53. Ito Y., *Virology*, **12**, 596 (1960).
54. Bellet A. J. D., Burness A. T. H., *Nature*, **190**, 235 (1961).
55. Anderer F. A., *Z. Naturforsch.*, **14B**, 642 (1959).
56. Kickhöfen B., Bürger M., *Biochim. Biophys. Acta*, **65**, 190 (1962).



## Бактериальный липогликопротеин (соматические О-антигены)

Экстракция трихлоруксусной кислотой

А. М. Шт а у б

### ВВЕДЕНИЕ

Среди различных способов, предложенных для экстракции соматического О-антигена из клеточных стенок грамотрицательных бактерий [1], наиболее простым является метод Буавена и Месробеану [2], которые впервые выделили это вещество в 1933 г. Позднее другие исследователи [3, 4] несколько видоизменили этот метод, например они использовали сухие клетки вместо влажных. По опыту нашей лаборатории, наиболее эффективна исходная методика Буавена и Месробеану, особенно если экстракт концентрируют, осаждая спиртом при  $-4^{\circ}$ .

### МЕТОДИКА

Грамотрицательные бактерии выращивают в течение 18 час на агаре в склянках Ру и смывают 0,9%-ным раствором хлористого натрия ( $\sim 20$  мл солевого раствора на одну склянку). После двух промывок 0,9%-ным раствором хлористого натрия во взвешенной центрифужной пробирке клетки взвешивают вместе с пробиркой и суспендируют в пятикратном по весу количестве воды, охлажденной до  $0^{\circ}$ , прибавляют равный объем 0,5 н. раствора трихлоруксусной кислоты, охлаждают до  $4^{\circ}$  и оставляют при этой температуре на 3 час. По окончании выдержки смеси дают нагреться до комнатной температуры, затем ее центрифугируют<sup>1</sup>, нейтрализуют до рН 6,5 концентрированным и затем разбавленным раствором едкого натра и осаждают комплекс двумя объемами спирта при  $-4^{\circ}$ , выливая охлажденный до  $0^{\circ}$  раствор в спирт, охлажденный до температуры от  $-10$  до  $-15^{\circ}$ . Осадок, который образуется при стоянии в течение ночи при  $-4^{\circ}$ , отделяют центрифугированием при той же температуре, растворяют в 0,1 первоначального объема дистиллированной воды, нейтрализуют, если это необходимо, и диализуют (стр. 299) в течение двух дней против водопроводной воды и затем еще два дня против дистиллированной воды. Чтобы удалить остатки микробных клеток, полученный раствор можно центрифугировать при 27 000 g.

Раствор можно и лиофилизовать, но при этом возможна некоторая денатурация, поэтому лучше хранить раствор на холоду с консервантом, например «мертиолатом», при разбавлении 1 : 5000. Замораживание, как и лиофилизация, по-видимому, вызывает некоторую денатурацию. Раствор сохраняет свои иммунологические свойства длительное время, но токсичность при хранении уменьшается.

Такие препараты никогда не бывают химически и иммунологически тождественны от опыта к опыту; содержание азота в них может изменяться от 2 до 4%. Оно колеблется также в зависимости от вида бактерий; для *S. typhi* хорошие препараты содержат  $\sim 2,5\%$  азота.

<sup>1</sup> Установлено, что если центрифугировать при  $4^{\circ}$ , то выделяется сильно опалесцирующий продукт, который содержит значительно больше азота и гораздо менее токсичен.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Westphal O., Ann. Inst. Pasteur, 98, 789 (1960).
2. Boivin A., Mesrobianu L., Compt. rend. soc. biol., 112, 76 (1933).
3. Freeman G. G., Challinor S. W., Wilson J., Biochem. J., 34, 307 (1940).
4. Webster M. E., Sagin J. F., Landy M., Johnson A. G., J. Immunol., 74, 455 (1955).

## Соматический деградированный полисахарид грамотрицательных бактерий

А. М. Штауб

### ВВЕДЕНИЕ

Комплексы, выделенные из грамотрицательных бактерий экстракцией фенолом [1] (см. стр. 325), содержат и липид, и полисахарид. Вещество, полученное экстракцией трихлоруксусной кислотой (см. стр. 333), еще более сложно: в его состав входит также и белок. При щелочной экстракции выделены липополисахариды, содержащие небольшие количества липидов. Чтобы получить чистый полисахарид, необходимо подвергнуть гидролизу уксусной кислотой комплекс или высушенные клетки. Обычно для этого достаточно 0,1 н. уксусной кислоты, но иногда необходимо использовать 1 н. уксусную кислоту. Эта методика, впервые использованная Уайтом [2], была применена позднее Фрименом [3], который выделил высокоочищенный полисахарид.

Такие полисахариды несколько более деградированы, чем полисахариды, присутствующие в необработанных комплексах. Так, препараты, экстрагированные щелочью, не содержат чувствительных к основаниям групп, например ацетоксильных [4] или фосфатных эфирных. Однако их молекулы достаточно велики: они не проходят через целлофан при диализе и сохраняют большинство специфических группировок, присутствующих в нативных комплексах.

### МЕТОДИКА

#### *Высывивание бактерий*

Бактерий, выращенных на агаре, смывают 0,9%-ным раствором хлористого натрия и промывают дважды раствором соли и трижды ацетоном (~500 мл на 15 г сухих клеток). После последнего промывания жидкую пасту нужно размазать тонким слоем по стенкам центрифужной пробирки и перемешивать, чтобы получить тонкий порошок сухих клеток, которые просеивают через два слоя тонкой марли. При этом удаляется основная масса частиц агара; следы агара, еще присутствующие в тонком порошке, удаляются при последующих стадиях очистки.

### Экстракция и очистка полисахарида

50—60 г порошка суспендируют медленно и равномерно в 900 мл воды<sup>1</sup>. Суспензию нагревают на кипящей водяной бане и, когда температура достигнет 90°, прибавляют 100 мл горячей уксусной кислоты<sup>1</sup>. Смесь нагревают 1,5 час с обратным холодильником на кипящей водяной бане, затем охлаждают и центрифугируют. Клетки гидролизуют еще раз в тех же условиях и оба надосадочных раствора упаривают отдельно досуха в вакууме при 55°. Сухие остатки суспендируют в воде; первый — в 100 мл и второй — в 50 мл. Нерастворившиеся порции промывают водой, объединяют надосадочный и промывной растворы и неочищенные полисахариды осаждают; прибавляют 1 объем спирта и оставляют раствор стоять в течение ночи при 4°. Осадок переносят в небольшой объем воды, в котором он не должен раствориться. Если часть материала растворяется, ее нужно прибавить снова к надосадочному раствору и осадить 6 объемами спирта. Операцию повторяют, используя все меньшие и меньшие объемы, пока при прибавлении 1 объема спирта уже не будет выпадать осадок или пока этот осадок не будет полностью растворим в воде. Обычно необходимо 5—6 осаждений. Последний раз осаждают из 20 мл воды. Чтобы ускорить осаждение и 1 и 6 объемами спирта, нужно добавить некоторое количество ацетата натрия.

На второй стадии очистки в качестве осадителя используют 94-, 96- или 98%-ную уксусную кислоту в зависимости от вида бактерий. Для некоторых видов бактерий, например для *S. typhi* и *S. typhi murium*, как указывает Фримен [3], такую очистку следует проводить трижды. Однако во многих случаях при более чем одном осаждении наблюдаются значительные потери, поэтому часто лучше повторных осаждений не проводить. В некоторых случаях после осаждения спиртом в препарате остается очень небольшое количество примесей, и стадия осаждения уксусной кислотой может быть опущена.

Окончательная очистка заключается в попеременном осаждении 1 и 6 объемами спирта. Ее проводят до тех пор, пока при прибавлении 1 объема спирта не будет образовываться осадка или пока осадок не будет полностью растворим в воде. Часто достаточно одного осаждения. Наконец, раствор диализуют (см. стр. 299) против дистиллированной воды и лиофилизуют (см. стр. 302).

Такие полисахариды всегда являются смесью молекул, представляющих собой более или менее деградированные фракции полисахарида, присутствующего в липополипептидном комплексе. Их средний молекулярный вес составляет 20 000—40 000.

Такие препараты иммунологически тождественны от опыта к опыту. Однако содержание азота в них колеблется от 0,4 до 0,8%<sup>2</sup> из-за присутствия небольших количеств остаточного D-глюкозамина и аминокислот. Содержание фосфора колеблется от 0,4 до 0,9%, вероятно, по большей части из-за фосфата, присутствующего в скелете полисахарида [5].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Westphal O., Luderitz O., Bister F., Z. Naturforsch., 76, 148 (1952).
2. White P. B., J. Pathol. Bacteriol., 34, 325 (1931).

<sup>1</sup> Объемы изменяют, если концентрация уксусной кислоты должна быть выше 0,1 н.

<sup>2</sup> Оно может быть выше, если полисахариды содержат гексозамины.

3. Freeman G. G., Biochem. J., 37, 601 (1943).
4. Kotelko K., Staub A. M., Tinelli R., Ann. Inst. Pasteur, 100, 618 (1961).
5. Staub A. M., Westphal O., Bull. soc. chim. biol., в печати.

## Группоспецифические мукополисахариды крови

У. Т. Дж. Морган

### ВВЕДЕНИЕ

Группоспецифические мукополисахариды крови человека обычно получают экстракцией 90- или 95%-ным фенолом лиофилизированных биологических жидкостей, таких, как слюна, желудочный сок, жидкость кисты яичника, меконий, а также тканей, обработанных протеолитическими ферментами. Большинство активных веществ нерастворимо в этом растворителе. Если же они оказываются растворимыми, как, например, вещества, выделенные из тканей, обработанных пепсином при pH 1—2, то их легко можно осадить прибавлением небольших количеств спирта. Мукополисахариды, полученные этим путем, в основном свободны от неспецифических белков и жиров, содержащихся в нативных выделениях и экстрактах тканей, и представляют собой материал, который после дальнейшей очистки фракционным осаждением из водных растворов подходящим органическим растворителем наиболее часто употребляется для химических и серологических исследований (см. Кабат [1] и Морган [2]).

### МЕТОДИКА

Жидкость, полученную из псевдомуцинозной цистаденомы яичника, сохраняют при 1—3° под слоем толуола и лиофилизируют как можно скорее после выделения. Для приготовления серологически различных группоспецифических веществ крови получают материал от так называемых «секреторов», принадлежащих к группам A<sub>1</sub>, B, O, A<sub>1</sub>B и A<sub>2</sub>B, и от «несекреторов». В последнем случае эта жидкость служит источником специфического Lea-антигена, который не дает серологической реакции с антисыворотками A, B и H [3, 4].

Жидкость кисты лиофилизируют, экстрагируют 90- [5] или лучше 95%-ным раствором фенола и центрифугируют, чтобы отделить нерастворившийся материал (см. также стр. 325).

Каждые 50 г сухого вещества кисты экстрагируют три раза последовательно уменьшающимися количествами (500, 250 и 150 мл) жидкого фенольного реагента. Экстракт 95%-ным фенолом и промывной спирт отбрасывают. Если используют 90%-ный раствор фенола, то некоторое количество специфического вещества можно выделить из фенольного раствора, прибавляя к нему 10%-ный спирт. Нерастворимый в феноле остаток промывают спиртом для удаления фенола, смешивают с двух- или трехкратным объемом воды и диализуют против дистиллированной воды до полного удаления спирта (стр. 299). Полученный при этом продукт в большинстве случаев растворим в воде, но часто содержит некоторые количества нерастворимого в воде геля, который можно легко удалить цент-

рифугированием. Основной надосадочный раствор и промывную жидкость, полученную при отделении нерастворимого в воде геля, объединяют, концентрируют и лиофилизируют (стр. 302). В результате получают группоспецифическое вещество крови, свободное от основной массы посторонних белков и жиров.

2%-ный раствор его насыщают сульфатом аммония, нагревают на водяной бане до 55—60° и выдерживают при этой температуре 5—10 мин [6]. Во многих препаратах основная часть мукополисахарида осаждается из раствора и после охлаждения ее можно отделить центрифугированием или фильтрованием. Процесс осаждения насыщенным сульфатом аммония при 55—60° следует повторить, снова растворив осадок, так как клейкость материала не позволяет полностью удалить раствор сульфата аммония и растворенное в нем вещество. И материал, нерастворимый в насыщенном сульфате аммония при 55—60°, и вещество, остающееся в растворе, являются группоспецифическими веществами крови. Их получают, удаляя сульфат аммония диализом при 1—3° и лиофилизуя недиализуемый остаток. Относительные количества каждого из этих веществ, находящиеся в отдельном образце жидкости кисты, изменяются весьма значительно. Образцы жидкости кисты с В-активностью, встречавшиеся до сих пор, дают специфический мукополисахарид, растворимый в насыщенном растворе сульфата аммония при 55—60°. Из обоих веществ готовят 2%-ные водные растворы, к растворам прибавляют 1 об. % ацетата калия и проводят фракционное осаждение, прибавляя 1%-ный спиртовой раствор ацетата калия (стр. 285). Осаждение вещества, нерастворимого в насыщенном сульфате аммония при 55—60°, начинается при 45%-ной концентрации спирта и в основном заканчивается при 55%-ной концентрации его. Материал выделяют и переосаждают в тех же условиях. Группоспецифическое вещество, растворимое в сульфате аммония при 55—60°, начинает осаждаться при ~50%-ной концентрации спирта, и большая его часть выделяется при 60%-ной концентрации спирта. Этот материал также следует переосадить в тех же условиях.

Оба препарата группоспецифического вещества растворяют в воде, тщательно диализуют против дистиллированной воды при 1—2° и центрифугируют 1 час при 30 000 g. Полученный в результате бесцветный вязкий раствор лиофилизируют. Были предложены методы выделения, основанные на электродекантации или образовании боратных комплексов, но они не получили распространения.

### Свойства

Материал, приготовленный по описанной выше методике, часто ведет себя как гомогенное вещество при ультрацентрифугировании [7], электрофорезе (стр. 411), в серологических тестах (стр. 430), например при количественном титровании по ингибированию гемагглютинации, при количественном осаждении и осаждении в гелях [8], имеет постоянный моносахаридный и аминокислотный состав [9].

Группоспецифические вещества независимо от их серологической специфичности весьма сходны по физическим и химическим свойствам. Препараты содержат 80—85% углеводов и 15—20% аминокислот. Все вещества содержат L-фукозу, D-галактозу, N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин и 16 или 17 аминокислот. L-Треонин, L-серин и L-пролин составляют около половины белковой части, а серусодержащие и ароматические аминокислоты отсутствуют или присутствуют лишь

в очень небольших количествах. Сиаловая кислота [10], содержание которой изменяется от 1 до 18%, также является компонентом многих препаратов, причем при высоком содержании ее в препарате наблюдается незначительное содержание L-фукозы, и наоборот. Сиаловая кислота, которая, как полагают, не имеет существенного значения для проявления групповой специфичности А, В, О или Le<sup>a</sup>, скорее всего представляет собой N-ацетилнейраминовую кислоту. Вещества гидролизуются папаином и фицином [11, 12], но не изменяются под действием трипсина, пепсина и многих других протеолитических ферментов, полученных из *Cl. welchii*, *Cl. tertium*, *Helix pomatia* и *Trichomonas foetus* [1, 2, 9, 13].

## ЛИТЕРАТУРА

1. K a b a t E. A., Blood Group Substances, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1956.
2. M o r g a n W. T. J., Proc. Roy. Soc., B, 151, 308 (1960).
3. G r u b b R., M o r g a n W. T. J., Brit. J. Exptl. Pathol., 30, 198 (1949).
4. A n n i s o n E. F., M o r g a n W. T. J., Biochem. J., 50, 460 (1952).
5. M o r g a n W. T. J., K i n g H. K., Biochem. J., 37, 640 (1943).
6. P u s z t a i A., M o r g a n W. T. J., Biochem. J., 80, 107 (1961).
7. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1965, vol. V, p. 34.
8. K a b a t E. A., Experimental Immunochemistry, 2nd. Ed., Charles C. Thomas, Publishers, Springfield, Illinois, 1961.
9. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 271.
10. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 246.
11. P u s z t a i A., M o r g a n W. T. J., Biochem. J., 81, 639 (1961).
12. M o r g a n W. T. J., P u s z t a i A., Biochem. J., 81, 648 (1961).
13. W a t k i n s W. M., Biochem. J., 71, 261 (1959).

## Каппа-карагенан

Выделение  $\kappa$ -карагенана из красных водорослей

Т. Дж. Пентер

### ВВЕДЕНИЕ

$\kappa$ -Карагенан — это сульфированный галактан, встречающийся в красной водоросли *Chondrus crispus* в количествах до 30%. Сходные вещества присутствуют в *Chondrus ocellatus* [1], *Hypnea specifera* [2], *Furcellaria fastigiata* [3] и, вероятно, также во многих других видах Gigartinaceae [4, 5].  $\kappa$ -Карагенан был впервые выделен в чистом виде Куком и сотр. [5, 6]; они установили, что хлористый калий осаждает полисахарид избирательно и количественно из водных экстрактов *Chondrus crispus*.

Полисахарид состоит из остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-D-галактозы в молярном соотношении 1,1—1,5 : 1 и содержит 1 сульфозэфирную группу на каждые 2—2,5 моносахаридные единицы в зависимости от исходного вещества. О'Нейл [7] и другие авторы [1—3] показали, что углеводная цепь полисахарида состоит главным образом из повторяющихся звеньев 3,6-ангидро-4-O- $\beta$ -D-галактопиранозил- $\alpha$ -D-галактозы, но способ, которым они соединены друг с другом, и положение сульфатных групп еще не выяснено полностью.

$\kappa$ -Карагенан чрезвычайно неустойчив к действию кислот и может претерпевать структурные изменения под воздействием щелочей; следовательно, во время его выделения следует избегать граничных значений pH. Его можно экстрагировать из сухой водоросли горячей водой [1, 5, 7] или горячим водным раствором ацетата натрия при pH 7 [3], но экстракции препятствует плотная внешняя белковая оболочка водоросли, и для получения высоких выходов необходима повторная экстракция остатка. Экстракты, полученные этим путем, могут также содержать танниноподобные пигменты, которые следует удалять с помощью активированного угля, чтобы избежать загрязнения продукта [3]. В приведенном методе [3] для разрушения белка и удаления окрашенных примесей используется кратковременная предварительная обработка очень разбавленной хлористой кислотой. Почти количественную экстракцию полисахарида можно затем провести за одну операцию, причем полученный продукт не содержит азота и окрашенных примесей, однако он слегка деградирован.

### МЕТОДИКА

Свежесобранную водоросль тщательно отделяют от посторонних примесей, промывают холодной водой и сушат в токе воздуха при 40°, пока содержание влаги будет не выше 10 вес.%. Высушенную водоросль измельчают на мельнице Уили, чтобы полученный порошок проходил через сито в 20 меш, и экстрагируют ацетоном в аппарате Сокслета. Остаток встряхивают на лоток и сушат при комнатной температуре.

Стеклянный прибор, состоящий из круглодонной колбы емкостью 5 л, снабженной капельной воронкой и мощной мешалкой, помещают под тягу. В колбу наливают 2 л воды и прибор нагревают на термостатированной водяной бане до 75°, вносят измельченную, проэкстрагированную ацетоном водоросль (сухой вес 50 г) и образовавшуюся кашу перемешивают

10 мин при 75°. Раствор 150 мл хлористой кислоты, полученный при пропускании 4%-ного водного раствора хлорита натрия через колонку с амберлитом IR-120 (H<sup>+</sup>), прибавляют по каплям с постоянной скоростью в течение 30 мин. В это время pH реакционной смеси медленно падает приблизительно до 3,5. Затем смесь немедленно нейтрализуют 100 г ацетата натрия и перемешивают еще 1 час, после чего прибавляют 3 л воды, предварительно нагретой до 60°, и горячую смесь центрифугируют.

Раствор переносят в целлофановую трубку для диализа и диализуют три раза против 20 л 1%-ного водного раствора ацетата натрия в течение 24 час. Раствор, оставшийся в диализной трубке, охлаждают до 4° и при энергичном перемешивании к нему медленно приливают 1 л 20%-ного (по объему) водного раствора хлористого калия. Желеобразный осадок отделяют центрифугированием и промывают 1 л 4%-ного водного раствора хлористого калия. Осадок диспергируют в 2 л 1%-ного водного раствора ацетата натрия и диализуют против 1%-ного водного раствора ацетата натрия до полного растворения студенистых частиц. Осаждение хлористым калием с последующим превращением полисахарида в натриевую соль повторяют еще два раза.

Водный раствор натриевой соли полисахарида диализуют против дистиллированной воды, чтобы удалить избыток ацетата натрия, и затем медленно выливают при энергичном перемешивании в 3 объема спирта. Осадок отделяют фильтрованием через крупнопористый стеклянный фильтр, промывают абсолютным спиртом, эфиром и высушивают над силикагелем в вакуум-эксикаторе. Выход белого, волокнистого полисахарида 10—15 г (в зависимости от вида водоросли и времени года, когда она была собрана).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Araki C., Hirase S., Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 770 (1956).
2. Clingman A. L., Nunn J. R., J. Chem. Soc., **1959**, 493.
3. Painter T. J., Can. J. Chem., **38**, 112 (1960); J. Chem. Soc., **1964**, 1396.
4. Yaphé W., Can. J. Botany, **37**, 751 (1959).
5. Smith D. B., Cook W. H., Arch. Biochem. Biophys., **45**, 232 (1953).
6. Smith D. B., Cook W. H., Neal J. L., Arch. Biochem. Biophys., **53**, 192 (1954).
7. O'Neill A. N., J. Am. Chem. Soc., **77**, 2837, 6324 (1955).

## Хитин

Дж. Н. Бемиллер

## ВВЕДЕНИЕ

Хитин представляет собой линейный полимер, состоящий из остатков 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы, связанных  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-связями [1]. Он выполняет роль главного органического скелетного вещества у беспозвоночных и компонента клеточной стенки у низших растений (грибов и зеленых водорослей). Хитин не встречается в чистом виде, а только как часть сложных систем; он находится в тесном контакте с карбонатом кальция, белком и другими органическими веществами. Из-за нераствори-



мости хитина и участия в тесной ассоциации с другими веществами для его выделения необходимы жесткие методы, позволяющие удалить посторонние вещества; эти методы вызывают частичную деградацию хитина.

Хитин обычно приготавливают из панцирей ракообразных обработкой сильными кислотами и щелочами. Имеется несколько методик. Ригби [2] обрабатывал остатки ракообразных горячим 1%-ным раствором карбоната натрия, 1—5%-ной соляной кислотой при комнатной температуре и затем 0,4%-ным горячим раствором карбоната натрия. Блумберг и соавторы [3] приготавливали хитин из панцирей южноафриканского лагушта обработкой горячим 5%-ным раствором едкого натра, холодным раствором гипохлорита натрия и теплой 4—6%-ной соляной кислотой. Хэкмен [4] экстрагировал хитин из панцирей омаров 2 н. соляной кислотой при комнатной температуре, холодной 2 н. соляной кислотой и горячим 1 н. раствором едкого натра. Стейси и соавторы [5] использовали методику Хэкмена для панцирей крабов. Уистлер и Бемиллер [6] обрабатывали панцири омаров 10%-ным раствором едкого натра при комнатной температуре, органическими растворителями и 37%-ной соляной кислотой при  $-20^{\circ}$ . Экстракция декальцинированных панцирей омаров 90%-ной муравьиной кислотой по Роземану с соавторами [7] позволяет быстро удалить окрашенные примеси и сокращает время щелочной обработки. Ниже приведены методики Хэкмена [4], Уистлера и Бемиллера [6] и Роземана с соавторами [7]. Подобными методами [8] хитин можно также получить из грибов.

Очистка хитина может заключаться в растворении хитина в холодной 40%-ной соляной кислоте и последующем осаждении его при разбавлении раствора холодной водой [9], но такая обработка вызывает значительное укорочение цепей [10]. Данные анализов препаратов хитина на содержание азота и ацетильных групп часто занижены по сравнению с теоретическими значениями (6,9 и 21,2% соответственно), рассчитанными для полимера 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -D-глюкозы.

Хитозан (стр. 504) — это групповое название веществ, получаемых при обработке хитина щелочами; эти вещества имеют различную степень деацетилирования и деполимеризации.

## МЕТОДИКИ

### Метод Хэкмена [4]

Панцири омаров моют под струей воды и сушат в сушильном шкафу при  $100^{\circ}$ . Чистые и высушенные панцири (220 г) оставляют стоять с 2 л 2 н. соляной кислоты в течение 5 час при комнатной температуре, тщательно промывают, высушивают при  $100^{\circ}$  и измельчают в тонкий порошок с помощью молотковой мельницы. Тонко измельченный материал (91 г) экстрагируют 48 час 500 мл 2 н. соляной кислоты при  $0^{\circ}$ , энергично встряхивая смесь через небольшие промежутки времени. Нерастворившийся материал отделяют центрифугированием, промывают и экстрагируют 500 мл 1 н. раствора едкого натра при  $100^{\circ}$  в течение 12 час, содержимое колбы при этом встряхивают через небольшие промежутки времени. Нерастворимый материал отделяют центрифугированием и экстрагируют еще четыре раза горячим раствором щелочи, каждая экстракция длится 12 час. Нерастворившийся материал отделяют центрифугированием и промывают в центрифужном стакане до нейтральной реакции. Затем хитин промывают несколько раз абсолютным спиртом и эфиром и сушат в вакуум-эксикаторе

над фосфорным ангидридом; выход 37,4 г (17%). Препарат представляет собой порошок кремового цвета, в нем 6,8% азота и нет золы.

### **Метод Уистлера и Бемиллера [6]**

Панцири омаров моют под струей воды и сушат в вакууме при 50°. Чистые высушенные панцири (500 г) измельчают и вымачивают 3 дня в 10%-ном растворе едкого натра, не содержащем кислорода, при комнатной температуре; щелочной раствор меняют каждый день. Освобожденные от белка частицы промывают водой до полного удаления щелочи, растирают с 95%-ным спиртом, фильтруют и промывают на фильтре, пока фильтрат не станет бесцветным; всего в этой операции расходуется ~6 л 95%-ного спирта. Частицы растирают затем с небольшими порциями следующих органических растворителей: ацетона (1 л), абсолютного спирта (2,5 л), эфира (500 мл). Почти бесцветные частицы сушат затем в вакууме и высыпают в 37%-ную соляную кислоту, охлажденную до -20°. Смесь выдерживают при этой температуре 4 час. Набухшие частицы отделяют центрифугированием при 0° и промывают водой при 0° до нейтральной реакции промывных вод. После промывания несколькими порциями 95%-ного спирта, абсолютного спирта и эфира в указанном порядке и высушивания в вакууме кислотную обработку, промывку и высушивание повторяют. Выход хитина ~100 г (20%), препарат содержит 0,15% золы (сульфаты) и 7,1% азота.

### **Метод Роземана и соавторов [7]**

Декальцинированные панцири омаров (10 г) (см. «Метод Хэкмена») встряхивают 18 час на механической качалке с 100 мл 90%-ной аналитически чистой муравьиной кислоты при комнатной температуре. Смесь фильтруют, осадок хорошо промывают водой и обрабатывают 2,5 час 500 мл 10%-ного раствора едкого натра при нагревании на водяной бане. После фильтрования белый остаток промывают водой до нейтральной реакции, затем несколько раз абсолютным спиртом и эфиром и сушат в вакууме. Выход 60—70%, содержание азота и ацетильных групп 6,95 и 19,2% соответственно.

## **Л И Т Е Р А Т У Р А**

1. Mc Neely W. H., in «Industrial Gums», R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Eds., Academic Press Inc., New York, N. Y., 1959, p. 193; Foster A. B., Webber J. M., *Advances in Carbohydrate Chem.*, **15**, 371 (1960).
2. Rigby G. W., пат. США 2040879 (1936); *Chem. Abstracts*, **30**, 4598 (1936).
3. Blumberg R., Southall C. L., Rensburg N. J., van, Volckman O. B., *J. Sci. Food Agr.*, **2**, 571 (1951).
4. Hackman R. H., *Australian J. Biol. Sci.*, **7**, 168 (1954).
5. Barker S. A., Foster A. B., Stacey M., Webber J. M., *J. Chem. Soc.*, 1953, 2218.
6. Whistler R. L., BeMiller J. N., *J. Org. Chem.*, **27**, 1161 (1962).
7. Horowitz S. T., Roseman S., Blumenthal H. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046 (1957).
8. Smithies W. R., *Biochem. J.*, **51**, 259 (1952).
9. Zechmeister L., Tóth G., *Z. physiol. Chem.*, **223**, 53 (1934); Karrer P., Hoffmann A., *Helv. Chim. Acta*, **12**, 616 (1929).
10. Clark G. L., Smith A. F., *J. Phys. Chem.*, **40**, 863 (1936).

## Гликопротеин из хряща

М. Шуберт

### ВВЕДЕНИЕ

Хондроитинсульфат хряща существует в нативной ткани почти полностью в виде соединения с белком. Метод его выделения и фракционирования, который приведен ниже, основан на опытах с носовым хрящем быка [1—4], но аналогичные вещества были выделены также из реберного хряща человека [4, 5] и с небольшим выходом из аорты [4, 6]. Получение этого соединения из носового хряща свиньи заслуживает особого упоминания, поскольку недавно было отмечено, что в этой ткани имеется хондроитинсульфат, свободный от белка [7].

### МЕТОДИКА

Через несколько часов после забоя носовую перегородку животного вырезают в холодной комнате ( $+5^{\circ}$ ), очищают от перихондрия, прополаскивают в холодной воде и разрезают на мелкие кусочки, которые обезживают и измельчают, обрабатывая отдельные порции по 20 г 200 мл спирта в течение 10 мин в гомогенизаторе Уоринга. Измельченный хрящ промывают в центрифужных стаканах спиртом и эфиром и сушат в вакууме. Вес сухого хряща составляет  $\sim 25\%$  веса влажного хряща. Высушенный материал может храниться месяцами без заметного изменения в свойствах выделяемых из него веществ.

Сухой измельченный хрящ (4 г) и 280 мл холодной воды помещают в гомогенизатор «Виртис-45», снабженный двумя бритвенными лезвиями. Стакан гомогенизатора погружают в баню со льдом и перемешивают смесь 30 мин на предельной скорости (при 45 000 об/мин), причем к концу операции температура гомогената не должна превышать  $12^{\circ}$ . К гомогенату при хорошем перемешивании прибавляют 630 мл холодного спирта, оставляют стоять 15 мин, а затем центрифугируют на холоду в течение 30 мин при 2000 об/мин. Опалесцирующий надосадочный раствор декантируют через комочек стеклянного волокна в центрифужный стакан.

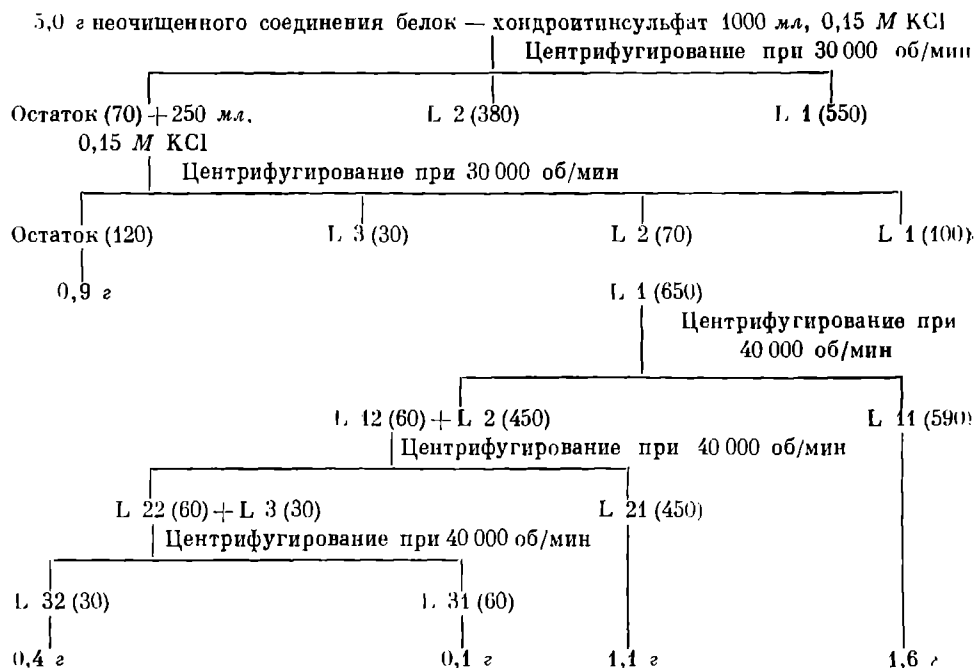
Выделенный осадок, объем которого равен  $\sim 130$  мл, подвергают дальнейшей обработке. К нему прибавляют 225 мл холодной воды и гомогенизируют, как указано выше, в течение 30 мин. К гомогенату прибавляют 580 мл спирта, центрифугируют и декантируют опалесцирующий надосадочный раствор через тот же комочек стеклянного волокна. Остаток промывают спиртом и эфиром в центрифужном стакане и сушат в вакууме; выход 2,46 г.

К объединенным опалесцирующим надосадочным растворам, объем которых составляет  $\sim 1500$  мл, прибавляют 15 г ацетата калия, что вызывает немедленное выпадение рыхлого осадка. Осадок отделяют центрифугированием, промывают спиртом и эфиром и сушат в вакууме; выход 1,5 г. На этой стадии продукт содержит  $< 0,1\%$  оксипролина,  $25\%$  белка и  $75\%$  хондроитинсульфата и его можно разделить центрифугированием на две резко различные фракции.

Неочищенный гликопротеин (5,0 г) растворяют в 1000 мл 0,15 М раствора хлористого калия, перемешивая ~2 час; при этом образуется опалесцирующий раствор, который центрифугируют 1 час при 30 000 об/мин, в результате чего из раствора выпадает осадок. Половину надосадочного раствора выливают в одну колбу (L 1), а третью часть — в другую колбу (L 2), остаток опять центрифугируют в тех же стаканах и полученный надосадочный раствор опять делят на фракции L 1 и L 2. Остаток (70 мл) перемешивают 1 час с 250 мл свежего 0,15 М раствора хлористого калия, центрифугируют еще 1 час при 30 000 об/мин и разделяют на L 1, L 2, L 3 и остаточную фракции. На схеме показаны приблизительные объемы каждой фракции, получающейся после этой операции.

### Схема фракционирования

(цифры в скобках — приблизительный объем каждой фракции, мл)



Соединенные фракции L 1 (~650 мл) центрифугируют при 40 000 об/мин в течение часа, при этом образуется лишь незначительный осадок. Девять десятых надосадочного раствора сливают (L 11). Остаток соединяют с L 2 и центрифугируют сходным образом. Схема показывает последовательность операций. К каждой из фракций L 11, L 21 и L 31 добавляют по 2 объема спирта; образовавшиеся хлопьевидные осадки центрифугируют, промывают спиртом и эфиром и высушивают. На приведенной схеме внизу указан вес этих осадков, представляющих собой наиболее трудно осаждаемую фракцию, обозначаемую PP-L.

Два других продукта, указанных на схеме, выделяют прибавлением 3 объемов спирта к L 32 и остатку, взятым порознь. Они содержат главным образом легко осаждаемую фракцию PP-H исходного неочищенного протеи-

нополисахарида, и их вес после промывания и высушивания указан внизу на схеме. Эти два продукта объединяют и перемешивают с 250 мл 0,15 *M* раствора хлористого калия в холодной комнате в гомогенизаторе «Виртис-45» при минимальной скорости в течение 15 мин. Образовавшийся сильно опалесцирующий раствор центрифугируют на малой скорости, при ~500 об/мин. Образовавшийся небольшой осадок отбрасывают и надосадочный раствор центрифугируют при 30 000 об/мин. Осадок РР-Н промывают спиртом, эфиром и высушивают; выход 0,9 г.

Следующие данные полезны для характеристики фракции РР-Л. Раствор в воде (10 мг в 3 мл) поглощает при 280 мμ ( $0,50 \pm 0,05$ ); отношение поглощения при 255 мμ к поглощению при 280 мμ равно 0,7. Препарат осаждается как однородное вещество, седиментационный коэффициент его в 0,15 *M* растворе хлористого калия  $S_{20}^{\circ}$  10,5; содержит 4,2% азота, 27% D-галактозамина и 15% белка; при электрофорезе по методу свободной границы или в крахмальном блоке движется как однородное вещество и легко разрушается щелочью с образованием хондроитинсульфата.

Охарактеризовать фракцию РР-Н гораздо труднее, поскольку она легко осаждается, а ее растворимость уменьшается после освобождения от фракции РР-Л. Она содержит 8% азота, 20% D-галактозамина и ~56% белка; также разрушается щелочью с образованием хондроитинсульфата.

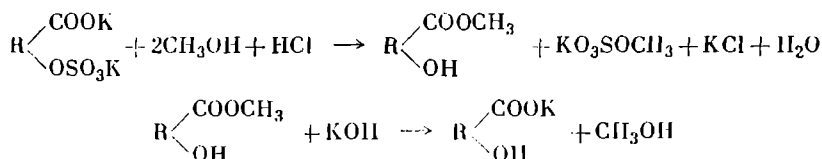
Обе фракции, и РР-Л и РР-Н, содержат также D-глюкозамин и нейраминовую кислоту.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Shatton J., Schubert M., J. Biol. Chem., **211**, 565 (1954).
2. Malawista I., Schubert M., J. Biol. Chem., **230**, 535 (1958).
3. Gerber B. R., Franklin E. C., Schubert M., J. Biol. Chem., **235**, 2870 (1960).
4. Buddecke E., Kroeze W., Lanka E., Z. physiol. Chem., **331**, 196 (1963).
5. Johnson B., Schubert M., J., Clin. Invest., **39**, 1752 (1960).
6. Buddecke E., Schubert M., Z. physiol. Chem., **325**, 189 (1961).
7. Patat F., Elias H., Z. physiol. Chem., **316**, 1 (1959).

## Хондроитин из хондроитинсульфата

М. Шуберт



## ВВЕДЕНИЕ

Многие встречающиеся в природе полисахариды содержат сульфогруппы. В случае хондроитинсульфата сульфогруппы удаляют действием почти безводной серной кислоты при низкой температуре [1]. Ниже приводится другой двустадийный метод, который [2], по-видимому, дает лучший выход.

## МЕТОДИКА

Калиевую соль хондроитинсульфата можно получить из гликопротеина РР-Л (см. стр. 343), выделяемого из носового хряща быка под действием едкого кали [3]. Метанольный 0,06 М раствор хлористого водорода получают при пропускании сухого хлористого водорода в метанол; концентрацию раствора доводят до нужной после титрования образца. Можно также прибавить 5 мл хлористого ацетила к 1000 мл метанола и оставить раствор стоять на несколько часов. Тонко измельченную, тщательно высушенную калиевую соль хондроитинсульфата (5,0 г) и 1000 мл кислого метанольного раствора встряхивают в течение 1 дня, после чего смесь центрифугируют и прозрачный раствор отбрасывают, а остаток обрабатывают таким же образом еще 2 раза. Полученный в результате совершенно белый осадок растворяют в 100 мл воды, затем осаждают, прибавляя 600 мл спирта, отделяют от раствора центрифугированием. Выделенный продукт промывают в центрифужном стакане спиртом и эфиром и сушат в вакууме. Выход продукта, представляющего собой метиловый эфир хондроитина, 2,8 г.

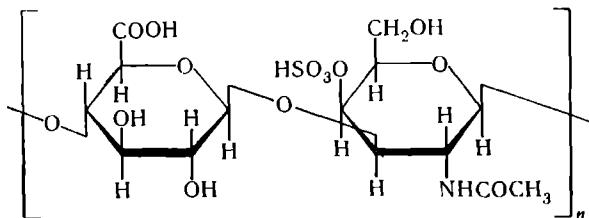
Метиловый эфир хондроитина (2,5 г) растворяют в 100 мл 0,1 М водного раствора едкого кали и раствор оставляют стоять в течение 1 дня при  $\sim 25^\circ$ . К прозрачному бесцветному раствору прибавляют раствор 1 мл ледяной уксусной кислоты и 1 г ацетата калия в 10 мл воды. Полученную калиевую соль хондроитина осаждают 400 мл спирта, отделяют центрифугированием, промывают в центрифужном стакане спиртом и эфиром и высушивают в вакууме. Выход 2,3 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wolfrom M. L., Montgomery R., J. Am. Chem. Soc., **72**, 2859 (1950).
2. Kantor T. G., Schubert M., J. Am. Chem. Soc., **79**, 152 (1957).
3. Gerber B. R., Franklin E. C., Schubert M., J. Biol. Chem., **235**, 2870 (1960).

## Хондроитин-4-сульфат

Р. В. Джинлоз



## ВВЕДЕНИЕ

Хондроитин-4-сульфат (хондроитинсульфат А) — полисахарид, состоящий из чередующихся остатков  $\beta$ -D-глюкопиранозируоновой кислоты и 2-ацетида-2-деокси- $\beta$ -D-галактопиранозил-4-сульфата, соединенных (1  $\rightarrow$  3)- и (1  $\rightarrow$  4)-связями соответственно [1, 2], был выделен из хрящей

различного происхождения, из кожи, роговицы глаза, склеры, костей, пуповины, мочи, хондросаркомы и т. д. [3].

Получение хондроитин-4-сульфата в крупных масштабах основано на экстракции ткани раствором щелочи, удалении белков и фракционном осаждении смеси полисахаридов спиртом. Первоначально для экстракции полисахарида использовали холодный 2%-ный раствор едкого кали или едкого натра [4, 5]. В методике с более мягкими условиями используются растворы нейтральных солей [4, 6], но при этом экстрагируется лишь незначительная часть хондроитин-4-сульфата, если хрящ не был предварительно выдержан в течение 4—6 недель при 0° [7]. Ниже приводится методика, предусматривающая экстракцию растворами нейтральной соли и слабой щелочи [7]. Удаление белка из раствора достигается осаждением фосфорновольфрамовой кислотой [8], денатурацией амиловым спиртом и хлороформом [5] (см. стр. 261) и адсорбцией на каолине с предварительной обработкой формальдегидом [9] или без нее [7]. Последний метод описан ниже.

Хондроитинсульфат можно также осадить в виде комплексных солей кобальта [10].

### МЕТОДИКА

Чистый хрящ получают из свежей бычьей трахеи или носовой перегородки после удаления всех нехрящевых тканей. Его измельчают и высушивают, выдерживая последовательно по нескольку часов в 10—20 порциях ацетона, и в заключение высушивают на воздухе. Суспензию 50 г препарата в 1 л раствора, содержащего 300 г хлористого калия и 10 г карбоната калия, встряхивают в течение 2 дней. Жидкость затем сливают, а хрящ обрабатывают 1 л того же раствора еще 2 дня. К соединенным вместе экстрактам добавляют 20 мл уксусной кислоты, 20 г ацетата калия и 20 г каолина. Суспензию перемешивают полчаса, фильтруют через фильтр-целл и диализуют в течение ночи против проточной водопроводной воды. Раствор обрабатывают второй раз, как описано выше, уксусной кислотой, ацетатом калия и каолином. После фильтрования раствор концентрируют до одной десятой его объема, прибавляют 10 г ацетата калия, выливают при механическом перемешивании в 1 л спирта и оставляют на ночь. Раствор центрифугируют, осадок промывают абсолютным спиртом и эфиром и высушивают в вакууме. Выход из хряща трахеи 4—6 г, из хряща носовой перегородки 7—8 г.

Для дальнейшей очистки 10 г продукта растворяют в 200 мл воды и прибавляют 10 мл уксусной кислоты. Этот раствор перемешивают 6 раз по полчаса с 10-граммовыми порциями каолина. После каждой операции смесь фильтруют через фильтр-целл с отсасыванием. К раствору прибавляют 5 г хлористого кальция и 200 мл абсолютного спирта. Через два дня образуются 6,5 г кристаллоподобного осадка. Его отфильтровывают и растворяют в 400 мл воды. К этому раствору добавляют 15 мл уксусной кислоты и 1 г хлористого кальция, затем медленно приливают 200 мл абсолютного спирта. Через 24 час отделяют центрифугированием аморфный осадок (0,3—0,4 г) и медленно прибавляют ~25 мл абсолютного спирта до устойчивого помутнения. Через день добавляют еще 50 мл абсолютного спирта и раствор оставляют на неделю. При этом выпадает кристаллоподобный осадок; выход 5—6 г. Этот осадок отделяют центрифугированием, промывают спиртом, абсолютным эфиром и сушат (см. стр. 301). Оставшийся хондроитинсульфат можно осадить, добавив 200 мл спирта.

Оптическое вращение  $[\alpha]_D^{25}$  фракций составляет  $-30$ ,  $-25$  и  $-22$  (вода) соответственно. Кальциевую соль средней фракции, которая, как было показано, является чистым хондроитин-4-сульфатом [2], превращают в натриевую или калиевую соль, пропуская через колонку, наполненную дауэксом 50-X8 в натриевой или калиевой форме. Иначе эти соли можно получить, пропуская раствор через колонку с дауэксом 50-X8 в кислой форме и собирая элюат прямо в избыток раствора ацетата натрия или калия. Соли хондроитинсульфата осаждают, прибавляя при перемешивании 2 объема спирта. Их отделяют центрифугированием, промывают абсолютным спиртом и абсолютным эфиром и высушивают в вакууме при комнатной температуре [11].

### АНАЛИЗ

В настоящее время нет специфических методов, кроме выделения, позволяющих отличить хондроитин-4-сульфат от хондроитин-6-сульфата и дерматансульфата. Отделение хондроитин-4-сульфата от хондроитин-6-сульфата основано на фракционировании кальциевых солей осаждением спиртом и определении оптического вращения [3]. В ИК-спектрах обоих хондроитинсульфатов имеются характерные особенности [12]. По чувствительности к гиалуронидазе хондроитин-4-сульфат отличается от дерматансульфата и аналогичен хондроитин-6-сульфату. Количественное определение хондроитин-4-сульфата основано на определении D-галактозамина [13] и глюкуроновой кислоты [14].

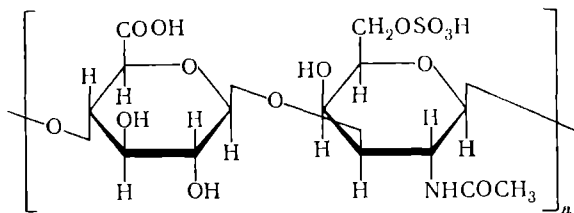
### ЛИТЕРАТУРА

1. Davidson E. A., Meyer K., J. Am. Chem. Soc., **77**, 4796 (1955).
2. Jeanloz R. W., Advances in Enzymology, **25**, 433 (1963).
3. Meyer K., Davidson E., Linker A., Hoffman P., Biochem. Biophys. Acta, **21**, 506 (1956).
4. Levene P. A., La Forge F. B., J. Biol. Chem., **15**, 69, 155 (1913); Jorpes E., Biochem. Z., **204**, 354 (1928).
5. Meyer K. H., Odier M. E., Siegrist A. E., Helv. Chim. Acta, **31**, 1400 (1948).
6. Meyer K., Smyth E. M., J. Biol. Chem., **119**, 507 (1937); Blix G., Snelmann O., Arkiv Kemi, **19A**, No. 32 (1945).
7. Einbinder J., Schubert M., J. Biol. Chem., **185**, 725 (1950); **191**, 591 (1951).
8. Fürt O., Bruno T., Biochem. Z., **294**, 153 (1937).
9. Masamune H., Osaki S., Tohoku J. Exptl. Med., **45**, 121 (1943).
10. Mathews M. B., Dorfman A., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 41 (1953).
11. Jeanloz R. W., неопубликованные данные.
12. Orr S. F. D., Biochem. Biophys. Acta, **14**, 173 (1954); Mathews M. B., Nature, **181**, 421 (1958).
13. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 216.
14. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 464.



## Хондроитин-6-сульфат

*Р. В. Джиллоз*



Хондроитин-6-сульфат (хондроитинсульфат С)— полисахарид, состоящий из чередующихся остатков  $\beta$ -D-глюкопиранозилурановой кислоты и 2-ацетида-2-деокси- $\beta$ -D-галактопиранозил-6-сульфата, связанных (1  $\rightarrow$  3)- и (1  $\rightarrow$  4)-связями соответственно [1], был выделен из пуповины человека, хряща, сухожилий, сердечных клапанов, кожи, слюны, хордомы и т. д. [2]. Полисахарид, полученный из хряща акулы, обладает такой же химической структурой, и его невозможно отличить от полисахарида, выделенного из хордомы, на основании данных элементарного анализа, оптического вращения, растворимости в спирте, ферментативного расщепления и инфракрасного спектра. Хондроитин-6-сульфат получают в промышленных масштабах из хряща акулы. Метод выделения тождествен описанному Масамуне и Осаки [3] для хондроитин-4-сульфата. Для выделения хондроитин-6-сульфата из хряща акулы также можно использовать способ, применяемый для выделения хондроитин-4-сульфата (см. стр. 346).

Методы, позволяющие отличить хондроитин-4-сульфат от хондроитин-6-сульфата, приведены на стр. 348. Оптическое вращение натриевой соли хондроитин-6-сульфата составляет  $[\alpha]_D^{20} -12^\circ$  (в воде).

## ЛИТЕРАТУРА

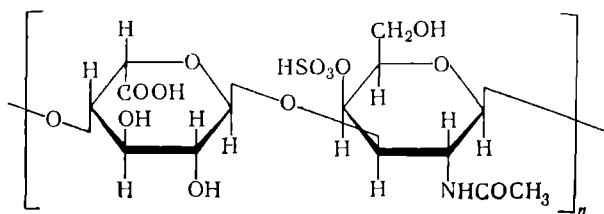
1. Hallén A., Jeanloz R. W., неопубликованные данные.
2. Meyer K., Davidson E., Linker A., Hoffman P., *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 506 (1956).
3. Masamune H., Osa ki S., *Tohoku J. Exptl. Med.*, **45**, 121 (1943).

## Дерматансульфат

( $\beta$ -гепарин, хондроитинсульфат В)

Ферментативное удаление белка

*Р. В. Джиллоз*



## ВВЕДЕНИЕ

Дерматансульфат, полисахарид, состоящий из чередующихся остатков  $\alpha$ -L-идопиранозилуруновой кислоты и 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\beta$ -D-галактопиранозил-4-сульфата, связанных (1  $\rightarrow$  3)- и (1  $\rightarrow$  4)-связями соответственно [1], был выделен из кожи свиньи [2, 3] и из легочной ткани рогатого скота [4]. Он был также обнаружен в сухожилиях, сердечном клапане, аорте [5], селезенке, мозгу и затылочной связке [3]. У больных, страдающих синдромом Гелера, болезнью, поражающей соединительную ткань человека, дерматансульфат накапливается в больших количествах в тканях и выделяется с мочой [6].

Получение дерматансульфата в больших масштабах производится из легочной ткани крупного рогатого скота, причем исходным сырьем служат остаточные растворы, получаемые при промышленном производстве гепарина. Дерматансульфат получают через стадию фракционного осаждения бариевых и цинковых солей [4] и очищают фракционированием медных солей [7]. В меньшем масштабе дерматансульфат получают из кожи свиньи [3]. Обе методики приведены ниже.

## МЕТОДИКА

*Выделение из легочной ткани крупного рогатого скота*

К раствору, оставшемуся после осаждения неочищенного гепарина, получаемого экстракцией из легочной ткани рогатого скота, прибавляют избыток 95 %-ного этанола. Полученный осадок (1 кг) растворяют в 11 л 10 %-ного раствора хлористого цинка и к раствору прибавляют 9 л метанола. После центрифугирования осадок дважды промывают 5 %-ным раствором хлористого цинка в 45 %-ном метаноле, чистым метанолом и затем эфиром. Выход продукта 100 г,  $[\alpha]_D^{20} -25^\circ$  (в воде).

Выделенный продукт растворяют в 1,8 л воды и к раствору прибавляют 600 мл ледяной уксусной кислоты и раствор 240 г ацетата бария в 2,4 л 25 %-ной уксусной кислоты, предварительно нагретый до  $80^\circ$ . Осадок отделяют центрифугированием и дважды промывают 5 %-ным раствором ацетата бария в 25 %-ной уксусной кислоте. Затем его диспергируют в 1 л воды, прибавляют 1 л 10 %-ного раствора карбоната натрия. Осадок карбоната бария отфильтровывают и промывают дважды небольшими количествами 5 %-ного раствора карбоната натрия. Фильтрат подкисляют до pH 6 уксусной кислотой и осаждают дерматансульфат 3 л метанола; выход 30 г. Продукт отделяют центрифугированием и промывают 95 %-ным этанолом и эфиром. Полученный дерматансульфат на этой стадии еще содержит небольшое количество гепарина;  $[\alpha]_D^{20} -32^\circ$  (в воде).

После растворения продукта в 6,2 л 10 %-ного раствора хлористого цинка к полученному раствору при энергичном перемешивании прибавляют 5 л метанола. Осадок отделяют центрифугированием и промывают 5 %-ным раствором хлористого цинка в 45 %-ном метаноле, пока при прибавлении к надосадочному раствору равного объема метанола перестанет выпадать осадок гепарина. Осадок затем промывают 95 %-ным этанолом и эфиром. Выход 25 г,  $[\alpha]_D^{20} -51^\circ$  (в воде).

Этот продукт растворяют в 600 мл воды и приливают 200 мл уксусной кислоты. Дерматансульфат осаждают прибавлением 800 мл 10 %-ного раствора ацетата бария в 25 %-ной уксусной кислоте, предварительно нагретого до  $80^\circ$ . Бариевую соль дерматансульфата отделяют центрифуги-

рованием и промывают 5%-ным раствором ацетата бария в 25%-ной уксусной кислоте, пока при прибавлении к надосадочному раствору равного объема метанола перестанет выпадать осадок (что свидетельствует об отсутствии в продукте хондроитинсульфата), после чего бариевую соль диспергируют в 250 мл воды и прибавляют 250 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. После фильтрования раствор подкисляют до pH 6 уксусной кислотой и продукт осаждают прибавлением 600 мл метанола. Выход натриевой соли дерматансульфата 20 г,  $[\alpha]_D^{20} -60^\circ$  (с 2,2 в воде).

Дерматансульфат очищают далее следующим образом. Растворяют 200 мг препарата в 20 мл воды, прибавляют 2 мл насыщенного раствора едкого натра и 16 мл раствора реагента Бенедикта. Смесь периодически встряхивают в течение 15 мин и затем центрифугируют. Осадок промывают 2 н. раствором едкого натра, содержащим 0,5 объема раствора реагента Бенедикта, растворяют в минимальном количестве разбавленной уксусной кислоты и переосаждают, прибавляя 4—5 объемов ледяной уксусной кислоты. После растворения в воде раствор пропускают через колонку  $2,2 \times 25$  см с дауэксом 50 (200—400 меш, X-8, H<sup>+</sup>). Элюат нейтрализуют едким натром и после концентрирования в вакууме до небольшого объема осаждают 2 объемами 95%-ного спирта. Осадок отделяют центрифугированием, промывают 95%-ным спиртом, эфиром и высушивают в вакууме. Выход 140 мг,  $[\alpha]_D^{25} -85^\circ$  (с 1,0 в воде).

### *Выделение из кожи свиньи*

Свежую свиную кожу, полученную в замороженном виде с бойни, очищают по возможности от жира, охлаждают и измельчают. Фильтрованием через марлю на воронке Бюхнера можно удалить значительное количество жира.

Суспензию 4 кг измельченной кожи в 7 л воды подкисляют до pH 1,5 соляной кислотой, прибавляют 15 г пепсина, покрывают слоем толуола и оставляют на 1—2 дня при 37°. Толуол удаляют и с помощью раствора едкого натра доводят pH раствора до 7,5. Вводят еще 15 г трипсина, суспензию снова покрывают слоем толуола, инкубируют в течение 1 дня при 37°, фильтруют и охлаждают. Затем прибавляют концентрированный раствор ацетата кальция и ледяную уксусную кислоту в таких количествах, чтобы их концентрации были соответственно равны 2,5% и 0,25 н. К суспензии приливают 1,25 объема 95%-ного спирта и оставляют на ночь при 4—5°, затем центрифугируют и осадок промывают спиртом. Промытый осадок вновь суспендируют в 800 мл 0,5 н. раствора уксусной кислоты, содержащего 400 г ацетата натрия. После прибавления 2,5 л хлороформа и 1,2 л *n*-пентанола смесь сильно встряхивают в течение 10 мин, после чего 30 мин центрифугируют. Прозрачный надосадочный раствор сливают и прибавляют избыток 95%-ного спирта до полного осаждения. После центрифугирования осадок растворяют в 800 мл 0,5 н. раствора уксусной кислоты, содержащего 400 г ацетата натрия. Этот раствор перемешивают полчаса с 24 г реагента Ллойда (алюмосиликатный адсорбент) и 8 г каолина и центрифугируют. Твердый материал промывают раствором ацетата натрия в уксусной кислоте, и из объединенных вместе надосадочных растворов 1,5 объемами спирта осаждают полисахарид. После центрифугирования осадок растворяют в 500 мл воды и раствор перемешивают с 50 мл даукса 50 (X-8, H<sup>+</sup>). Смолу отфильтровывают и промывают водой. К объединенным фильтратам прибавляют концентрированный раствор ацетата натрия и ледяную уксусную кислоту, пока их концентрация не достигнет 5%.

и 0,5 н. соответственно. Затем прибавляют равный объем абсолютного спирта и после стояния при 4—5° в течение ночи суспензию центрифугируют и осадок промывают 95%-ным спиртом. Промытый осадок растворяют в 400 мл воды и раствор центрифугируют 1 час при 20 000 об/мин (100 000 g). К прозрачному надосадочному раствору прибавляют ацетат кальция и уксусную кислоту до концентраций, указанных выше. Затем при перемешивании вводят абсолютный спирт до концентрации 20% и смесь оставляют на 24 час при 0°. По окончании выдержки смесь центрифугируют и осадок промывают 20%-ным спиртом, содержащим те же количества ацетата натрия и уксусной кислоты, что и надосадочный раствор, затем спиртом и, наконец, эфиром. Выход 2,87 г,  $[\alpha]_D -59^\circ$  (в воде).

### АНАЛИЗ

В настоящее время нет специфических методов качественного и количественного определения дерматансульфата, кроме выделения. Фракционирование цинковых или кальциевых солей спиртом в сочетании с осаждением медной соли вышеописанным способом можно проводить на минимальном количестве материала. При достаточном его количестве идентификация основана на определении оптического вращения. Можно также идентифицировать D-галактозаминный компонент методом хроматографии на бумаге и L-идуроновую кислоту по цветной реакции, используя «соотношение карбазол/орцин» [8]. Количественное определение чистого дерматансульфата основано на количественном определении D-галактозамина [9].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Jeanloz R. W., Stoffyn P. J., Trémège M., Federation Proc., **16**, 201 (1957); Jeanloz R. W., Stoffyn P. J., Federation Proc., **17**, 249 (1958); Stoffyn P. J., Jeanloz R. W., Federation Proc., **21**, 81 (1962).
2. Meyer K., Chaffee E., J. Biol. Chem., **138**, 491 (1941).
3. Meyer K., Davidson E., Linker A., Hoffman P., Biochem. Biophys. Acta, **21**, 506 (1956).
4. Marbet R., Winterstein A., Helv. Chim. Acta, **34**, 2311 (1951).
5. Meyer K., Rapport M. M., Science, **113**, 596 (1951).
6. Dorfman A., Lorincz A. E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **43**, 443 (1957).
7. Cifonelli J. A., Ludowieg J., Dorfman A., J. Biol. Chem., **233**, 541 (1958).
8. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 497.
9. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 216.

## Галактоглокоманнаны

Из древесины голосемянных

Т. Е. Таймала

### ВВЕДЕНИЕ

Древесина голосемянных содержит ряд близких полисахаридов, отличающихся главным образом относительным количеством галактозы и молекулярным весом. Два из них присутствуют в наибольшем количестве: растворимый в воде полисахарид, обычно содержащий остатки D-галактозы, D-глюкозы и D-маннозы в отношении 1 : 1 : 3 [1], и растворимый в щелочи галактоглокоманнан (часто называемый также «глюкоманнан»), содержащий остатки этих сахаров в соотношении 0,1—0,2 : 1 : 3. Соединенные  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-связями остатки D-маннозы и D-глюкозы образуют остов; к некоторым из этих остатков, вероятно, непосредственно присоединены концевые остатки D-галактозы и цепи, состоящие из галактозных остатков, связанных (1  $\rightarrow$  6)-связями. В обоих полисахаридах присутствуют также ацетатные группы (см. стр. 362). Общая методика выделения этих полисахаридов предусматривает предварительное удаление лигнина и последующие фракционные экстракции и осаждения различными щелочными растворами. Приведенная ниже методика разработана применительно к древесине тсуги восточной (*Tsuga canadensis*), которая обычно содержит до 20% различных галактоглокоманнанов [2].

Другой пример см. стр. 294. Приготовление ацетилированного галактоглокоманнана см. стр. 362.

### МЕТОДИКА

#### Голоцеллюлоза

Древесину тсуги восточной (1100 г, 40—80 меш), предварительно тщательно проэкстрагированную смесью спирта и бензола 1 : 2, суспендируют вместе с некоторым количеством силиконового смачивающего агента в 18 л водопроводной воды при 70—80° в 22-литровой круглодонной колбе, снабженной мешалкой из нержавеющей стали. К смеси прибавляют 120 мл уксусной кислоты и затем 360 г хлорита натрия. Реакцию ведут при интенсивном перемешивании [4], температуру поддерживают на уровне 75°  $\pm$  5°, нагревая колбу на открытом пламени. Через 1 час добавляют те же количества реагентов, вновь дают 1 час выдержки и этот процесс повторяют до тех пор, пока общее время реакции не составит 5—7 час (в зависимости от содержания лигнина и степени измельчения древесины). По окончании окисления твердым частицам дают осесть, лучше оставить на ночь. Выпавший осадок промывают несколько раз декантацией холодной водопроводной водой, переносят на большую воронку Бюхнера и промывают дистиллированной водой до полного удаления кислоты. Затем осадок промывают спиртом и сушат на воздухе. Выход белой голоцеллюлозы 800  $\pm$  50 г. Продукт должен еще содержать 2—3% лигнина по Класону [5]. Недостаточная делигнификация будет мешать последующему фракционированию; если же весь лигнин удален, неизбежна чрезмерная потеря углеводного материала.

### *Растворимый в воде галактоглоукоманнан*

В 12-литровой круглодонной колбе, закрытой резиновой пробкой с небольшим отверстием, 840 г голоцеллюлозы суспендируют в 6 л 24%-ного водного раствора едкого кали вместе с некоторым количеством смачивающего агента. Воздух вытесняют из колбы азотом и смесь встряхивают непрерывно в течение 8 час при комнатной температуре, после чего оставляют на ночь. Твердый остаток отделяют фильтрованием на большой воронке с крупнопористым стеклянным фильтром и промывают 4 л воды. Экстракт и промывные воды объединяют и выливают в четырехкратный объем спирта, содержащего 3—4 л уксусной кислоты. Образующийся осадок отфильтровывают на большой воронке Бюхнера и промывают последовательно 70%-ным этанолом, абсолютным этанолом (или метанолом) и петролейным эфиром с т. кип. 30—60°. Полученный препарат сушат в вакууме над едким кали или хлористым кальцием и получают белый порошок; выход 198 г.

Смесь полисахаридов растворяют в 2 л воды, добавляют равный объем 20%-ного водного раствора едкого кали и прибавляют по каплям 8 л 5%-ного водного раствора гидроокиси бария [6]. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием, трижды промывают водой и обрабатывают этанолом, содержащим избыток уксусной кислоты. Осадок выделяют, как описано выше, и получают 70 г галактоглоукоманнана. Материал, остающийся в растворе при прибавлении гидроокиси бария, после нескольких похожих обработок дает чистый арабино-4-О-метилглюкуроноксилан. Выделенный галактоглоукоманнан очищают еще одной аналогичной обработкой гидроокисью бария. Конечный выход его составляет 50 г, что соответствует 4,5% веса исходной древесины, свободной от экстрактивных веществ. Галактоглоукоманнан содержит остатки D-галактозы, D-глюкозы и D-маннозы в соотношении 1 : 1 : 3 и иногда небольшие количества L-арабинозы и D-ксилозы. Он растворим в воде,  $[\alpha]_D - 8^\circ$ . В среднем молекула состоит из 40—50 гексозных остатков.

### *Растворимый в щелочи галактоглоукоманнан*

Часть голоцеллюлозы, остающуюся после экстракции едким кали, промывают большим количеством воды. Затем еще во влажном состоянии ее переносят в 12-литровую колбу и обрабатывают, как описано выше, 6 л 24%-ного водного раствора едкого кали [7], содержащего 4% борной кислоты [8]. Из экстракта выделяют, как описано выше, белый порошок; выход 76 г. Твердый остаток, подкисленный разбавленной уксусной кислотой и промытый до нейтральной реакции, дает почти чистую, хотя и сильно деградированную целлюлозу (460 г, или 42%). Неочищенный галактоглоукоманнан растворяют в 1,5 л 10%-ного водного раствора едкого натра и прибавляют по каплям 5%-ный водный раствор гидроокиси бария. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием и дважды промывают 5%-ным едким натром. Затем его встряхивают при 0° с 50%-ной уксусной кислотой и выливают в четырехкратный объем спирта. Осадок отделяют, как описано выше, и получают 70 г белого порошка, что соответствует 6,4% веса исходной древесины. Галактоглоукоманнан содержит остатки D-галактозы, D-глюкозы и D-маннозы в соотношении 0,2 : 1 : 3, он нерастворим в воде и растворим в 10%-ном водном растворе едкого натра, где его удельное вращение составляет  $[\alpha]_D - 40^\circ$ . Среднечисловая

степень полимеризации равна 100—150. Эту гемицеллюлозу обычно называют глюкоманнаном. Оба галактоглюкоманнана при электрофорезе в 0,05 *M* боратном буфере дают только один подвижный пик.

Описанная методика, вероятно, применима к древесине любых голосемянных. Она была также использована для выделения галактоглюкоманнанов из коры хвойных пород [7]. Растворимый в щелочи галактоглюкоманнан был также выделен и очищен при помощи медных комплексов [10, 11].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hamilton J. K., Partlow E. V., Thompson N. S., J. Am. Chem. Soc., **82**, 451 (1960).
2. Timell T. E., Tappi, **44**, 88 (1961).
3. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1965, vol. V, p. 45.
4. Wise L. E., Murphy M., D'Addieco A. A., Paper Trade J., **122** [2], 35 (1946).
5. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1965, vol. V, p. 185.
6. Meier H., Acta Chem. Scand., **12**, 144 (1958).
7. Hamilton J. K., Quimby J. R., Tappi, **40**, 781 (1957).
8. Jones J. K. N., Wise L. E., Jappe J. P., Tappi, **39**, 139 (1956).
9. Timell T. E., Svens Papperstidn., **64**, 651 (1961).
10. Hamilton J. K., Kircher H. W., Thompson N. S., J. Am. Chem. Soc., **78**, 2508 (1956).
11. Timell T. E., Tyminski A., Tappi, **40**, 519 (1957).

## Глюкоманнаны

### *Из древесины покритосемянных*

*Т. Е. Таймелл*

## ВВЕДЕНИЕ

Древесина покритосемянных содержит 3—5% глюкоманнана, построенного из остатков D-глюкозы и D-маннозы, соединенных  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-связями [1, 2]. Соотношение между сахарами обычно близко к 1 : 2, но по крайней мере для двух видов березы оно равно 1 : 1,1 [3]. Остатки галактозы отсутствуют. Преобладающей гемицеллюлозой в этом рода древесине всегда является 4-О-метилглюкуроноксиан, который можно получить в очень чистом состоянии и с хорошим выходом прямой экстракцией древесины водным раствором едкого кали. Для выделения глюкоманнана необходимо, однако, предварительно удалить лигнин. Ниже приведена методика выделения глюкоманнана из древесины березы белой (*Betula papyrifera*), но, вероятно, ее можно использовать для получения глюкоманнана из древесины всех лиственных пород [3, 4]. Другие примеры см. стр. 362.

## МЕТОДИКА

Свободную от экстрактивных веществ древесную муку из березы белой (1050 г, 40—60 меш) обрабатывают уксусной кислотой и хлоритом натрия, как описано на стр. 353. Обработка длится 7 час. Выход голоцеллюлозы составляет 775 г (74%). Белую голоцеллюлозу экстрагируют 8 л 24%-ного (по весу) водного раствора едкого кали при комнатной температуре в течение 12 час. Экстракт содержит чистый 4-О-метилглюкуроноксилан. Твердый остаток тщательно промывают водой и еще во влажном виде суспендируют в 4 л 24%-ного раствора едкого натра, содержащего 4% борной кислоты. Смесь встряхивают в атмосфере азота при комнатной температуре 10 час и, обрабатывая экстракт обычным образом, получают твердый порошок; выход 31 г (2,9% от веса древесины). Этот препарат содержит остатки D-глюкозы, D-маннозы и D-ксилозы в соотношении 42 : 44 : 14.

Неочищенный глюкоманнан растворяют в 1,5 л 10%-ного водного едкого натра и прибавляют по каплям при перемешивании 3 л 5%-ного водного раствора гидроокиси бария. Осадок отделяют центрифугированием, промывают дважды 5%-ным раствором едкого натра и три раза водой. Прибавляют лед и ледяную уксусную кислоту и выливают в четырехкратный объем спирта. Осадок отделяют обычным способом и получают белый тяжелый порошок; выход 23 г (2,2% от веса древесины). Этот глюкоманнан содержит остатки D-глюкозы, D-маннозы и D-ксилозы в соотношении 46 : 51 : 3. Дальнейшие осаждения гидроокисью бария сильно понижают выход, но редко приводят к полному удалению всего ксилана, являющегося примесью. Осаждение медного комплекса прибавлением реактива Фелинга (см. стр. 286) иногда более эффективно для удаления ксилана [3, 4]. В глюкоманнанах из древесины лиственных пород не было обнаружено даже следов галактозы. Эта гелицеллюлоза имеет удельное вращение  $-30 \pm 5^\circ$  в 10%-ном растворе едкого натра. В среднем макромолекула содержит от 25 до 70 гексозных остатков.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Jones J. K. N., Merler E., Wise L. E., Can. J. Chem., **35**, 634 (1957).
2. Hamilton J. K., Thompson N. S., Tappi, **42**, 752 (1959).
3. Timell T. E., Svensk Papperstidn., **63**, 472 (1961); Tappi, **43**, 844 (1960).
4. Adams G. A., Can. J. Chem., **39**, 2423 (1961).

## Гликоген

Дж. Н. Бемиллер

## ВВЕДЕНИЕ

Гликоген — это общее название группы запасных полисахаридов, которые найдены, по-видимому, в клетках всех животных организмов и во многих микроорганизмах. Гликоген, или гликогеноподобные полисахариды, сходны по химической структуре с амилопектинами (см. стр. 308), но отличаются от последних тем, что содержат более высокую пропорцию



$\alpha$ -D-(1  $\rightarrow$  6)-связей и, следовательно, более разветвлены и имеют меньшую среднюю длину цепей. Таким образом, внутренняя часть молекулы гликогена более компактна, чем у обычных амилопектинов, и менее доступна для воздействия ферментов. Гликогены значительно отличаются по физическим свойствам от обычных амилопектинов, хотя они и сходны по структуре. Гликогены имеют меньшее сродство к иоду, более низкую вязкость, более высокий молекулярный вес и меньшую молекулярную асимметрию; в противоположность амилопектинам они реагируют с конканавалином А. Имеются обзоры структур и свойств амилопектинов и гликогенов [1, 2].

Гликогеноподобный полисахарид растений, называемый иногда фитогликогеном, рассматривается Двопчем и Уистлером [3] как сильно разветвленный амилопектин лишь на основе происхождения, так как химическая структура гликогеноподобных полисахаридов не определена детально. Во многих случаях нельзя провести четкой границы между гликогевами и амилопектинами, так как гликогены различаются в зависимости от вида и условий жизни животного, т. е. они обнаруживают метаболическую гетерогенность [4]. Например, гликоген печени при гликогеновой болезни типа 4 по физико-химическому поведению не отличается от амилопектина, а гликогеноподобные полисахариды сахарной кукурузы напоминают животные гликогены [1].

Гликоген выделен из многих тканей лабораторных животных, включая рыб и беспозвоночных. Непользуемые ткани включают печень, мышцы и мозг. Другой обычный источник гликогена — двустворчатые моллюски (*Antodonta*). Приводимая здесь методика описывает экстракцию гликогена из печени и мышц лабораторных животных. Именно эти ткани наиболее часто используются в лабораторных исследованиях. Дрожжевой гликоген можно приготовить по другой методике [5] (см. также стр. 382).

Многие годы гликоген экстрагировали из тканей животных горячим 20—60%-ным раствором едкого кали или едкого натра [6, 7]. Однако некоторые исследователи недавно показали, что гликоген расщепляется щелочными растворами в анаэробных условиях; поэтому были разработаны новые методы экстракции. Один из этих методов заключается в экстракции холодным раствором трихлоруксусной кислоты. По этому методу получают несколько гидролизованый препарат с некоторой полидисперсностью [4, 8, 9]. По другому методу, где в качестве экстрагирующего растворителя применяется диметилсульфоксид [10], очевидно, получают более высокомолекулярный гликоген, полидисперсность которого не установлена; выход гликогена в этом случае ниже. Оба эти метода приводятся в данной статье.

Для получения высокомолекулярного гликогена была также использована экстракция водой при 0—4° [11, 12]. Сообщалось, что такие препараты обладают исключительной полидисперсностью. Это может означать, что диметилсульфоксид преимущественно экстрагирует из печени «легкодоступный» гликоген в узком интервале молекулярных весов и не экстрагирует более низкомолекулярный метаболически активный «остаточный» гликоген [4, 9]. Оррелл и Бьюдинг [12] установили, что белок по существу полностью удаляется из препаратов, полученных экстракцией водой, посредством встряхивания со смесью хлороформа и октанола по методу Севага ([13] п стр. 261) или обработки ферментами трипсином или химотрипсином (см. стр. 349 и 364). Ферментативная обработка, вероятно, была бы полезной для удаления белка из препаратов

гликогена, полученных при экстракции другими способами, но в указанных работах не дано детального описания проведенных экспериментов.

В любом случае следует избегать горячей воды [15], кислот и щелочей, если нужно получить «нативный» гликоген.

## М Е Т О Д И К А

### *Образцы тканей*

Животный гликоген можно экстрагировать из многих тканей; чаще всего используют печень и мышцы. При этом очень важно состояние лабораторных животных, так как гликоген очень быстро мобилизуется и расщепляется (особенно в печени) и изменяет свойства в зависимости от того, сытое животное или голодное, здоровое или больное и т. д. В любом случае, чтобы получить не деградированный ферментами или химическими реагентами гликоген из печени или мышечных тканей животного (в желаемом состоянии), его не следует возбуждать, пугать или подвергать напряженным упражнениям перед забоем: животное должно быть спокойным и должно находиться в привычных условиях [16].

Животных следует убивать быстро, с наименьшими физическими или психическими страданиями [17]. По-видимому, наиболее часто используемый метод заключается в переломе позвоночника в районе затылка или повреждении головного мозга. Небольших животных, с которыми легко обращаться и которые имеют относительно тонкий череп, можно убивать ударом по голове. Кроликов лучше убивать ударом по основанию черепа, но необходимая меткость достигается только практикой. Небольших животных можно убивать также отсечением головы тяжелым острым ножом, но их следует сначала анестезировать.

Более крупных животных убивают химическими агентами, например хлороформом [17]; с этой целью хлороформ вводят в специально предназначенную камеру. Такие камеры производятся несколькими фирмами ветеринарных инструментов.

Используемую ткань, например печень, нужно удалить как можно быстрее после смерти животного (за 15 сек, если это возможно). Затем ее следует быстро заморозить, для чего тонкие срезы ткани помещают между кусками сухого льда или бросают мелкие кусочки в жидкий воздух или смесь спирта и сухого льда. Замороженную ткань можно хранить в течение нескольких дней.

### *Экстракция раствором трихлоруксусной кислоты [4]*

Замороженную ткань (29 г) измельчают в 300 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты при 0°. (Используют различные методы измельчения. Так, например, печень растирают в ступке с песком, охлажденным до 0°, а мышечную ткань перемешивают в «Омни-Миксере», охлажденном до 0°.) Смесь сразу же центрифугируют в рефрижераторной центрифуге при 0° и гликоген немедленно осаждают, выливая надосадочный раствор в 3 объема спирта. Остаток снова быстро экстрагируют 300 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты при 0° и повторяют центрифугирование и осаждение. Экстракцию и последующие операции проводят еще дважды (всего 4 раза). Неочищенный гликоген оставляют осаждаться, затем отделяют

декантацией и центрифугируют. Очищают его многократным осаждением спиртом из осветленного водного раствора. Процедуру очистки повторяют до тех пор, пока для образования осадка станет необходимым добавление бромистого лития. Диспергированный гликоген диализуют против холодной дистиллированной воды и лиофилизируют (стр. 299 и 302). Выход гликогена из печени крысы 0,92 г (3,2%).

Гликоген из печени крысы, приготовленный этим способом, содержит  $< 0,02\%$  азота,  $< 0,05\%$  фосфора и не содержит золы. Он имеет значение  $10^{13}S_{20}$  около 160 (1%-ная водная взвесь;  $20,0^\circ$ ; ультрацентрифуга «Спинко» модель Е) [18] и обнаруживает значительную гетерогенность. Молекулярный вес такого гликогена  $80,8 \cdot 10^6$  (определено по светорассеянию). Водные суспензии опалесцируют.

### Экстракция диметилсульфоксидом [10]

Замороженную ткань ( $\sim 30$  г) помещают в механический гомогенизатор с 300 мл диметилсульфоксида и перемешивают  $\sim 2$  мин. Смесь центрифугируют в течение 20 мин при 1800 об/мин, надосадочный раствор фильтруют через фильтровальную бумагу ватман № 54 с отсасыванием и быстро выливают в 3 л метанола, содержащего 5 г хлористого натрия. Остаток после центрифугирования снова экстрагируют 300 мл диметилсульфоксида тем же способом и профильтрованный надосадочный раствор прибавляют к тому же метанольному раствору. Светло-коричневый осадок сырого гликогена отделяют деkantацией и центрифугированием и растворяют в 80—100 мл диметилсульфоксида. Раствор центрифугируют при помощи настольной центрифуги (6500 об/мин) и гликоген осаждают из надосадочного раствора 3 объемами спирта. Процедуру повторяют дважды с уменьшающимися количествами диметилсульфоксида, пока раствор гликогена не станет почти бесцветным и лишь слегка опалесцирующим. Затем продолжают очистку тем же способом, применяя вместо диметилсульфоксида воду, чтобы растворить осадок частично очищенного гликогена. После трех дополнительных осаждений из воды водную взвесь гликогена осторожно встряхивают в делительной воронке в течение 10—15 час с равным объемом смеси хлороформа и изоамилового спирта (3 : 1 по объему) [13, 14]. Водный слой отделяют и центрифугируют при  $\sim 6500$  об/мин в течение 1 час. Процедуру повторяют несколько раз, последний надосадочный раствор диализуют против холодной дистиллированной воды и лиофилизируют. Выход гликогена из печени крысы 0,5 г (1,7%).

Гликоген печени крысы, приготовленный этим способом, содержит  $< 0,06\%$  азота, имеет значение  $10^{13}S_{20} \sim 360$  (1%-ная водная взвесь;  $20,0^\circ$ ; ультрацентрифуга «Спинко» модель Е) [18] и не обнаруживает гетерогенности. Водная смесь имеет голубовато-белую опалесценцию.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Manners D. J., *Advances in Carbohydrate Chem.*, **12**, 261 (1957).
2. Greenwood C. T., *Advances in Carbohydrate Chem.*, **7**, 289 (1952); **11**, 335, 385 (1956).
3. Dvornch W., Whistler R. L., *J. Biol. Chem.*, **181**, 889 (1949).
4. Stetten M. R., Katzen H. M., Stetten D., Jr., *J. Biol. Chem.*, **222**, 587 (1956).
5. Stockhausen F., Silberstein K., *Biochem. Z.*, **287**, 276 (1936).

6. Bernard C., Compt. Rend., **44**, 578 (1859); Pfluger E., Arch. ges. Physiol., Pfluger's, **103**, 169 (1904).
7. Somogyi M., Methods in Enzymology, S. P., Colowick and N. O. Kaplan, Eds, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1957, vol. 3, p. 3.
8. Sahyun M., Alsberg C. L., J. Biol. Chem., **89**, 33 (1930).
9. Stetten M. R., Katzen H. M., Stetten D., Jr., J. Biol. Chem., **232**, 475 (1958).
10. Whistler R. L., BeMiller J. N., Arch. Biochem. Biophys., **98**, 120 (1962).
11. Lazarow A., Anat. Rec., **84**, 31 (1942).
12. Orrell S. A., Jr., Bueding E., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3800 (1958).
13. Sevag M. G., Biochem. Z., **273**, 419 (1934).
14. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1965, vol. V, p. 5.
15. См., например, Greenwood C. T., Manners D. J., Proc. Chem. Soc. (London), **26** (1957).
16. См. Short D. J., in «The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals», A. N. Worden and W. Lane-Petter, Eds, The Universities Federation for Animal Welfare, London, England, 2nd Ed., 1957, p. 141.
17. Croft P. G., in «The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals», A. N. Worden and W. Lane-Petter, Eds, The University Federation for Animal Welfare, London, England, 2nd Ed., 1957, p. 155.
18. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1964, vol. IV, p. 207.

## Гемицеллюлоза

Экстракция из однолетних растений щелочными растворами

*Р. Л. Уистлер, М. С. Фезер*

### ВВЕДЕНИЕ

Гемицеллюлозу можно выделить из растительного материала экстракцией щелочными растворами [1]. Фракция А гемицеллюлозы выделяется при нейтрализации экстракта, а фракция Б осаждается спиртом из остающегося раствора [2].

Для экстракции гемицеллюлозы использовали различные концентрации щелочи, начиная с раствора карбоната натрия [3] до крепких растворов едкого натра или едкого кали. Вообще выход гемицеллюлозы зависит от концентрации щелочи, применяемой для экстракции, причем щелочные растворы с концентрацией выше 10% дают лишь небольшое увеличение выхода [4].

Гемицеллюлоза Б лучше растворяется в слабых щелочах, чем гемицеллюлоза А [5]. Поэтому гемицеллюлозу Б можно экстрагировать из растительного материала более или менее избирательно очень слабыми растворами щелочи, например насыщенной известковой водой.

Удаление кислорода во время щелочных экстракций сводит к минимуму окислительное расщепление гемицеллюлозы.

Гемицеллюлоза, выделенная из растительного материала, в котором имеется значительное количество лигнина, часто содержит примесь лигнина [6]. Следовательно, природный растительный материал перед экстракцией целесообразно освободить от лигнина [7, 10] (см. стр. 378).

## МЕТОДИКА

### *Экстракция 10%-ным раствором едкого натра*

10%-ный раствор едкого натра, приготовленный разбавлением профильтрованного 60%-ного свободного от карбонат-иона раствора, освобождают от кислорода, пропуская через него азот в течение по крайней мере 2 час. Для этой цели лучше всего использовать трубку со стеклянным фильтром на конце. Следы кислорода удаляют из азота пропусканием через промывалку с раствором Физера [8, 9].

Приблизительно 200 г тонко измельченного растительного материала или голоцеллюлозы (см. [10] и стр. 378, 353, 363) помещают в трехгорлую 5-литровую колбу, снабженную механической мешалкой. В колбу приливают 4 л освобожденного от кислорода 10%-ного раствора едкого натра и пропускают свободный от кислорода азот. Экстракцию проводят при перемешивании в течение 18—24 час при 25°.

Щелочную кашицу фильтруют с отсасыванием через ткань на воронке Бюхнера. Чтобы удалить максимально возможное количество жидкости, к верхней части воронки с помощью резинового кольца прикрепляют лист тонкой резины. Его прикрепляют так, чтобы он мог давить на фильтруемую массу.

Прозрачный фильтрат немедленно переносят в стакан и охлаждают в бане со льдом; гемицеллюлозу А осаждают, подкисляя раствор 50%-ной уксусной кислотой до pH 5, и отделяют центрифугированием. Гемицеллюлозу Б выделяют из надосадочного раствора осаждением 3 объемами 95%-ного спирта или ацетона.

### *Экстракция насыщенной известковой водой*

Насыщенную известковую воду готовят, перемешивая суспензию гидроокиси кальция в 4 л воды 6—12 час. Раствор отфильтровывают от избытка гидроокиси кальция и удаляют кислород (см. выше).

Экстракцию выполняют, как описано выше. На начальных стадиях экстракции периодически измеряют pH смеси, чтобы убедиться, что известковая вода не нейтрализована. Если произошла нейтрализация, прибавляют немного твердой гидроокиси кальция, пока pH опять не достигнет максимума.

После экстракции смесь охлаждают и нейтрализуют 50%-ной уксусной кислотой, растительные остатки и небольшие количества гемицеллюлозы А удаляют фильтрованием через ткань. Гемицеллюлозу Б получают из фильтрата осаждением 3 объемами спирта или ацетона.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schulze E., Ber., 22, 1192 (1889).
2. O'Dwyer M. H., Biochem. J., 20, 656 (1926).
3. Norman A. G., Biochem. J., 31, 1579 (1937).

4. Wise L. E., Murphy M., D'Addieco A. A., Paper Trade J., **122** [2], 35 (1946).
5. Whistler R. L., Bachrach J., Bowman D. R., Arch. Biochem., **19**, 25 (1948).
6. Rogers S. C., Mitchell R. L., Ritter G. J., Anal. Chem., **19**, 1029 (1947).
7. Wise L. E., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **17**, 63 (1945).
8. Fieser L. F., J. Am. Chem. Soc., **46**, 2639 (1924).
9. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II, p. 478.
10. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1964, vol. III p. 10.

## Нативный ацетилованный полисахарид древесины

### Экстракция диметилсульфоксидом

Г. О. Боуенг, Б. Линдберг

### ВВЕДЕНИЕ

Некоторые природные полисахариды частично этерифицированы, обычно уксусной кислотой. Когда такие полисахариды выделяют экстракцией щелочью, ацильные группы гидролизуются. Однако ацетилованные полисахариды можно экстрагировать из древесных голоцеллюлоз диметилсульфоксидом или предварительной обработкой диметилсульфоксидом с последующей экстракцией горячей водой [1]. Здесь описано выделение ксилана из древесины березы [2] и глюкоманнана из древесины сосны [3], содержащих 17 и 6% О-ацетильных групп соответственно. Первый получают сразу в чистом виде, тогда как второй требует очистки хроматографированием на диэтиламиноэтилцеллюлозе [4].

Эту методику, возможно с небольшими изменениями, можно применять для выделения ацетилованных полисахаридов из других растительных источников.

### МЕТОДИКА

#### *Ксилан древесины березы [2]*

Проекстратированные ацетоном воздушно-сухие березовые опилки (460 г, размер частиц 1—2 мм) энергично перемешивают с 4 л смеси льда и воды. В смесь через трубку, снабженную пористым стеклянным диском, в течение 5 мин пропускают быстрый ток хлора, при этом температуру поддерживают в пределах от нуля до +5°, прибавляя лед. Смесь быстро фильтруют на воронке Бюхнера и промывают два раза водой (2 × 1 л) и три раза спиртом (3 × 1 л). Опилки затем переносят в сосуд с 4 л кипящего 3%-ного раствора моноэтаноламина в спирте. Смесь перемешивают 5 мин, темный раствор отфильтровывают и опилки повторно обрабатывают 3%-ным кипящим спиртовым раствором моноэтаноламина и промывают охлажденной до 0° водой (2 × 1 л).

Обработку хлором и этаноламином повторяют дважды. После последней обработки опилки промывают спиртом ( $3 \times 1$  л) и эфиром ( $2 \times 1$  л) вместо промывки холодной водой и сушат на воздухе. Выход голоцеллюлозы  $\sim 370$  г. Эта методика приготовления голоцеллюлозы предложена Таймеллом и Джэном [5].

Голоцеллюлозу (300 г) перемешивают с 3 л свежеперегнанного диметилсульфоксида при комнатной температуре в течение ночи и отделяют полученный экстракт фильтрованием через металлическое сито или стеклянный фильтр. Обработку повторяют еще раз. Объединенные экстракты выливают в 4 объема спирта. При прибавлении уксусной кислоты (обычно  $\sim 50$  мл) происходит полное осаждение полисахарида. Осадку дают осесть, отделяют максимально возможное количество надосадочной жидкости декантацией и остаток центрифугируют. Осадок промывают один раз спиртом и затем растворяют в 1 л воды. Нерастворившуюся часть (1–2%) удаляют центрифугированием при 20 000 г или фильтрованием. Прозрачный раствор подкисляют до pH 4 уксусной кислотой и полисахарид осаждают 3 л спирта. Осадок отделяют фильтрованием на стеклянном фильтре, тщательно промывают спиртом и ацетоном и сушат в вакууме.

Полученный указанным способом полисахарид имеет вид слегка окрашенного порошка. Выход его составляет 45 г,  $[\alpha]_D^{20} -60^\circ$  (с 1,0 в воде), степень полимеризации  $\sim 200$ , он содержит 16,9% О-ацетильных групп и 11,8% уроновых кислот. Если применять голоцеллюлозу, приготовленную хлоритным методом [5], выход полисахарида бывает ниже. Однако, если голоцеллюлозу пропитать 5%-ным холодным спиртовым раствором моноэтаноламина, промыть спиртом и эфиром и высушить на воздухе перед экстракцией диметилсульфоксидом, выход полисахарида примерно такой же [6].

### ГАЛАКТОГЛЮКОМАННАН ДРЕВЕСИНЫ СОСНЫ [3]

Проекстрагированные ацетоном сосновые опилки (размер частиц 0,5–2 мм) освобождают от лигнина хлоритным методом (см. [5] и стр. 353) при  $60^\circ$  и pH 4,7<sup>1</sup>; выход голоцеллюлозы  $\sim 70\%$ . Голоцеллюлозу (450 г) дважды экстрагируют в течение ночи свежеперегнанным диметилсульфоксидом ( $2 \times 4$  л), промывают холодной водой и затем дважды экстрагируют водой ( $2 \times 10$  л) при  $100^\circ$  в течение 30 мин. Объединенные водные экстракты концентрируют в вакууме при температуре не выше  $40^\circ$  до объема 2 л. Раствор подкисляют соляной кислотой до pH 4, прибавляют 8 л спирта, образовавшийся осадок отделяют декантацией и центрифугированием, тщательно промывают спиртом и ацетоном и сушат в вакууме. Около 65% осажденного вещества, т. е. примерно 14 г, составляет галактоглокоманнан, содержащий О-ацетил, а остаток состоит из ксилана и других полисахаридов.

Колонку размером  $4 \times 40$  см, наполненную порошком диэтиламиноэтилцеллюлозы (патман DE 50), промывают 0,5 М фосфатным буфером

<sup>1</sup> Недавно было показано, что во время обработки этаноламином происходит миграция аццла между С-2 и С-3 кепозного остатка и частичное дезацетилирование. Удаление лигнина хлоритным методом более приемлемо в этом отношении.

Если 2- или 3-О-ацетил- $\beta$ -метил-D-маннопиранозид обрабатывают водой при  $100^\circ$  и pH 5, образуется равновесная смесь обоих изомеров. Вероятно, соотношение О-ацетильных групп в природных глюкоманнанах примерно такое же [7, 8].

с pH 5,5 и водой. Смесь полисахаридов (3 г) растворяют в 20 мл воды и наносят на колонку. Колонку промывают водой (фракция 1, 3 л), 0,05 М раствором однозамещенного фосфата натрия (фракция 2, 3 л), 0,5 М раствором однозамещенного фосфата натрия<sup>1</sup> (фракция 3, 2 л) и 1,1 М раствором едкого натра (фракция 4, 2 л).

Фракции 1 и 2 содержат только галактоглоукоманнан, как показывает гидролиз и хроматографирование гидролизата, тогда как фракции 3 и 4 содержат галактоглоукоманнан, смешанный с другими полисахаридами. Фракцию 2 диализуют или удаляют из нее неорганические соли, пропуская раствор через смесь амберлита IR-120 (H<sup>+</sup>) и амберлита IR-45 (OH<sup>-</sup>), объединяют с фракцией 1 и лиофилизуют (см. стр. 302). Выход чистого глюкоманнана ~ 750 мг. Он содержит D-галактозу, D-глюкозу и D-маннозу в соотношении 5 : 18 : 77; содержание O-ацетильных групп ~ 6%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hägglund E., Lindberg B., McPherson J., Acta Chem. Scand., 10, 1160 (1956).
2. Bouveng H. O., Garegg P. J., Lindberg B., Acta Chem. Scand., 14, 742 (1960).
3. Meier H., Acta Chem. Scand., 15, 1381 (1961).
4. Neukom H., Deuel H., Heri W. J., Kündig W., Helv. Chim. Acta, 43, 64 (1960).
5. Timell T. E., Jahn E. C., Svensk Papperstidn., 54, 831 (1954).
6. Bouveng H. O., Acta Chem. Scand., 15, 96 (1961).
7. Garegg P. J., Acta Chem. Scand., 16, 1849 (1962).
8. Garegg P. J., готовится к печати.

## Гепарин

Ферментативное удаление белка и приготовление кристаллических бариевой и бензидиновой солей

*Р. В. Джинлоз*

## ВВЕДЕНИЕ

Гепарин — это полисахарид, состоящий из остатков D-глюкозамина и D-глюкуроновой кислоты с N-сульфатными и O-сульфатными группами. Структура гепарина до сих пор не выяснена полностью, но твердо установлено наличие (1 → 4)-связей между чередующимися остатками α-D-глюкопиранозилуруоновой кислоты и 2-сульфаминно-2-дезоксид-глюкопиранозы [1, 2]. Гепарин был впервые выделен в значительных количествах из печени [3], а позднее найден во многих других тканях. В связи с интересом к гепарину как к лекарственному препарату, препятствующему свертыванию крови, его приготовление в больших масштабах было объектом многих исследований, и имеется ряд патентов на промышленный спо-

<sup>1</sup> Вместо однозамещенного фосфата натрия лучше использовать ацетат калия, так как его растворимость в спирте делает возможным прямое осаждение полисахаридов спиртом и устраняет необходимость диализа.



соб его получения. Недавно Фостером и Хаггардом опубликован исчерпывающий обзор свойств и методов получения гепарина [4].

Большая часть методов выделения основывается на методике Чарльза и Скотта [5], которые использовали бычью печень и бычьи легкие как недорогой источник гепарина. Ткань подвергают автолизу и затем экстрагируют щелочным раствором. Растворимый белок удаляют, разрушая его с помощью ферментов, а жиры извлекают спиртом. Эта методика была упрощена: обработке протеолитическими ферментами подвергалась непосредственно ткань [6, 7]. Предложен ряд методик окончательной очистки гепарина. Наибольшую ценность имеет метод, предусматривающий приготовление бензидиновой соли, которую затем превращают в кристаллическую кислую бариевую соль [8]. Кристаллическую кислую или нейтральную бариевую соль фракционируют. Новейшие методы заключаются во фракционировании цетилпиридиниевой соли [9—10] (см. также стр. 288) и адсорбции на колонках с различными ионообменными смолами [11] и ЭКТЕОЛА-целлюлозой [12]. Приведенная ниже методика основана на первоначальной методике Чарльза и Скотта [5, 8], и очистка проводится с использованием кристаллической кислой бариевой соли [13].

## МЕТОДИКА

### *Неочищенный гепарин*

Тонко измельченную ткань, например бычью печень, бычьи легкие или тонкие кишки (45 кг), суспендируют в 20—25 л воды и оставляют для автолиза на 20—24 час при 30—40° в присутствии 500 мл толуола или 2 л хлороформа. К смеси прибавляют 7,5 л насыщенного раствора сульфата аммония и такое количество раствора едкого натра, чтобы pH смеси повысилось до 9,0—9,5. Раствор нагревают при перемешивании 1 час при 50—60° и затем при 70° до полной коагуляции белка. Горячий раствор фильтруют через целит. После охлаждения его подкисляют до pH 2—2,5 концентрированной серной или концентрированной соляной кислотой. Смесь затем нагревают до 60° и фильтруют. Осадок промывают 20 л горячей разбавленной кислоты (pH 2—2,5) и суспендируют в 6 л 95%-ного спирта в течение 20 час. Большую часть спирта удаляют декантацией, осадок отделяют центрифугированием и растворяют в 6 л воды; pH раствора доводят до 8,0, затем прибавляют 25 г трипсина и 10 мл толуола. Раствор оставляют на 36 час при 37—40°, причем через каждые 12 час pH снова доводят до 8,0. К полученной смеси прибавляют 12 л 95%-ного спирта и раствор слегка подкисляют соляной кислотой. Спустя 24 час раствор декантируют. Осадок отделяют центрифугированием и растворяют в 1,5 л воды, содержащей достаточное количество 0,5 н. едкого натра, чтобы растворить его. Чтобы разрушить оставшийся трипсин, раствор нагревают до 75° и после охлаждения центрифугируют. К прозрачному надосадочному раствору прибавляют 2 объема ацетона и слегка подкисляют его соляной кислотой. Через 15 час осадок отделяют центрифугированием, промывают 95%-ным спиртом и сушат при комнатной температуре. Из 45 кг бычьей печени в среднем получают 56 г неочищенного гепарина (активность: 1 международная единица на 1 мг) [14].

Полученное вещество (20 г) растворяют в 3 л воды и прибавляют 60 мл ледяной уксусной кислоты и 30 г реагента Ллойда — алумосиликатного адсорбента. После стояния в течение ночи гепарин отделяют центрифугированием и дважды промывают спиртом. Затем его растворяют в 2 л

воды и опять обрабатывают 20 г реагента Ллойда, после того как рН доведено до 5 прибавлением уксусной кислоты. После фильтрования рН снижают до 4 и снова прибавляют 20 г реагента Ллойда. Затем прибавляют такие количества хлористого натрия и ацетона, чтобы концентрация первого составила 0,85, а второго 25%. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием и отбрасывают, а гепарин осаждают из прозрачного раствора, прибавляя ацетон, пока его концентрация не достигнет 66%. После стояния в течение ночи раствор центрифугируют, осадок промывают спиртом и сушат. Полученный материал (6 г) растворяют в 300 мл воды и прибавляют 10%-ный раствор хлористого кадмия, пока не прекратится осаждение. Через 4—5 час смесь центрифугируют. К прозрачному раствору добавляют хлористый натрий до концентрации 0,85% и гепарин осаждают 2 объемами ацетона, отделяют его центрифугированием и сушат, как описано выше. Активность: 12—13 международных единиц на 1 мг [14].

### *Очистка через бензидиновую и кристаллическую кислую бариевую соль*

Раствор 1 г этого материала в 300 мл воды подкисляют до рН 5 уксусной кислотой и прибавляют 10 мл насыщенного раствора оксалата аммония. Смесь нагревают до 50° и центрифугируют. Всю операцию повторяют до прекращения образования осадка. Раствор концентрируют до объема 50 мл, гепарин осаждают 450 мл уксусной кислоты, центрифугируют, промывают спиртом и эфиром и высушивают. К раствору 1 г этого продукта в 20 мл воды прибавляют 5%-ный раствор хлоргидрата бензидина в разбавленной соляной кислоте. Раствор бензидина прибавляют до тех пор, пока не прекратится образование осадка. Осадок отделяют центрифугированием, промывают метанолом и сушат. Затем его суспендируют в 50 мл воды и подщелачивают суспензию водным раствором аммиака. Смесь нагревают при 75° до образования прозрачного раствора, после чего медленно охлаждают до 6° и отделяют кристаллический бензидин центрифугированием. К надосадочному раствору прибавляют 2 объема метанола и 2 объема эфира. Осадок отделяют центрифугированием, промывают спиртом, затем эфиром и сушат, после чего растворяют в 50 мл воды и осаждают гепарин, прибавляя 450 мл ледяной уксусной кислоты. Отделяют его центрифугированием, промывают дважды 90%-ной уксусной кислотой, спиртом и эфиром и сушат.

Раствор 3 г полученного аморфного гепарина в 120 мл воды и 40 мл 5%-ного раствора ацетата бария оставляют стоять на несколько дней при 15—20°. Раствор центрифугируют, надосадочный раствор фильтруют через плотную фильтровальную бумагу и затем нагревают до 65°. К теплomu раствору прибавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты и раствор оставляют медленно охлаждаться при комнатной температуре. Кристаллический осадок отделяют центрифугированием и промывают последовательно 80%-ной уксусной кислотой, ледяной уксусной кислотой, 95%-ным спиртом и, наконец, эфиром. Выход гепарина 1,9—2,1 г с активностью 119 международных единиц на 1 мг [15],  $[\alpha]_D^{25} + 44^\circ$  (в воде).

### А Н А Л И З

В настоящее время нет специфических методов качественного и количественного определения гепарина, кроме выделения. От других кислых полисахаридов его легко отделяют в виде цетилпиридиниевых солей

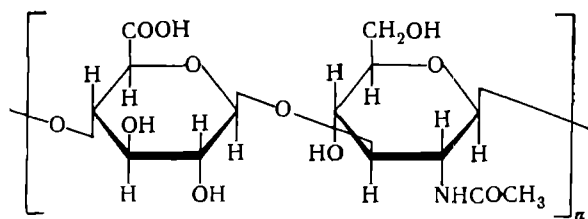
[16] (см. также стр. 288). Опубликованы методы определения гепарина, основанные на измерении содержания 2-дезоксигепарин-2-сульфаминогрупп [17, 18]. Эти методы не позволяют отличать гепарин от гепаринсульфата, который также содержит 2-дезоксигепарин-2-сульфаминовые группы, но цетилпиридиниевые соли этих двух полисахаридов можно легко разделить. Определение чистоты полученного препарата обычно основывается на биологической активности. Среди имеющихся методов идентификации следует отметить предложенные Чарльзом и Скоттом [14], Фостером [15], Штудером и Винтерштейном [19] и Свопом и Квизенга [20].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wolfrom M. L., Vercellotti J. R., Horton D., J. Org. Chem., **27**, 705 (1962); **28**, 278, 279 (1963); **29**, 540, 547 (1964).
2. Danishefsky I., Eiber H. B., Williams A. H., J. Biol. Chem., **238**, 2895 (1963).
3. Howell W. H., Am. J. Physiol., **63**, 434 (1922—1923).
4. Foster A. B., Huggard A. J., Advances in Carbohydrate Chem., **10**, 335 (1955).
5. Charles A. F., Scott D. A., J. Biol. Chem., **102**, 425 (1933).
6. Scott J. E., Ph. D. Thesis, Manchester University, Manchester, England, 1956.
7. Schiller S., Slover G. A., Dorfman A., J. Biol. Chem., **236**, 983 (1961).
8. Charles A. F., Scott D. A., Biochem. J., **30**, 1927 (1936).
9. Scott J. E., Gardell S., Nilsson I. M., Biochem. J., **67**, 7p (1957).
10. Laurent T. C., Arch. Biochem. Biophys., **92**, 224 (1961).
11. Green J. P., Nature, **186**, 472 (1960).
12. Ringertz N. R., Reichard P., Acta Chem. Scand., **13**, 1467 (1959).
13. Wolfrom M. L., Weisblat D. I., Karabinos J. V., W. H. McNeely, McLean J., J. Am. Chem. Soc., **65**, 2077 (1943).
14. Scott D. A., Charles A. F., J. Biol. Chem., **102**, 437 (1933).
15. Foster R. H. K., Nutley N. J., J. Lab. Clin. Med., **27**, 820 (1942).
16. Scott J. E., Methods of Biochem. Anal., **8**, 145 (1960).
17. Lagunoff D., Warren G., Arch. Biochem. Biophys., **99**, 396 (1962).
18. Gibbons R. A., Wolfrom M. L., Arch. Biochem. Biophys., **98**, 374 (1962).
19. Studer A., Winterstein A., Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, **9**, 6 (1951).
20. Swoap O. F., Kuizenga M. H., J. Am. Pharm. Assoc., **38**, 563 (1949).

## Гиалуроновая кислота

*Р. В. Джинлоз*



## ВВЕДЕНИЕ

Гиалуроновая кислота, полисахарид, состоящий из чередующихся остатков  $\beta$ -D-глюкопиранозилуруновой кислоты и 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозы, связанных (1 $\rightarrow$ 3)- и (1 $\rightarrow$ 4)-связями соответственно [1], была найдена среди основных веществ соединительной ткани. Ее основной источник — стекловидное тело быка, синовиальная жидкость быка и пуповина человека. Последняя наиболее удобна для получения гиалуроновой кислоты в крупном масштабе, но если извлекать всю гиалуроновую кислоту, продукт бывает загрязнен смесью хондроитин-4-сульфата и хондроитин-6-сульфата [2] и требует дополнительной очистки.

Описаны многочисленные способы выделения гиалуроновой кислоты из пуповины, включая экстракцию этой ткани водой [3], разбавленным раствором хлористого натрия [4], разбавленным раствором ацетата натрия [5], разбавленным [6] и концентрированным [7] растворами фенола и забуференным раствором трихлоруксусной кислоты [8].

Обработка трипсином и пепсином при комнатной температуре [4] или папаином при повышенной температуре [9] — методы, позволяющие быстро перевести в раствор большие количества ткани.

Предварительная очистка достигается осаждением гиалуроновой кислоты уксусной кислотой в виде «муцинового сгустка» [6] или фракционным осаждением спиртом [3]. Белковые примеси удаляют адсорбцией на каолине или реагентом Ллойда [3], или денатурацией амиловым спиртом и хлороформом ([10] и стр. 261). Методы, в которых используется адсорбция на угле или на дауэксе 1, не подходят для крупномасштабных опытов.

Гиалуроновую кислоту можно освободить от примеси хондроитинсульфатов осаждением цетилпиридинийхлоридом или адсорбцией на ЭКТЕОЛА-целлюлозе. В крупномасштабных опытах при высаливании сульфатом аммония в присутствии пиридина [2] получают продукт, не содержащий каких-либо сульфатов (содержание S < 0,1%). В настоящем разделе описан новый метод [2], предусматривающий растворение ткани при обработке пепсином и трипсином, последующее удаление белка смесью амилового спирта и хлороформа и окончательную очистку осаждением сульфатом аммония в присутствии пиридина.

## МЕТОДИКА

Пуповину человека (3 кг свежей ткани или 410 г высушенной) тщательно очищают от крови и плацентарной ткани и выдерживают в ацетоне от 2 до 10 недель. Ткань разрезают на куски  $\sim 2$  см длиной и промывают 12 л ацетона, дважды 12 л дистиллированной воды в течение 2—4 час и затем водой в течение 24 час. Кусочки пуповины измельчают далее с помощью мясорубки и полученную массу суспендируют в равном объеме дистиллированной воды. Прибавляя разбавленную соляную кислоту, доводят pH раствора до 2,0 и вносят 9,0 г пепсина «Дифко» (1 : 10 000). Смесь покрывают слоем толуола и выдерживают 24 час при 37°, постоянно контролируя pH во время инкубации. Затем смесь подщелачивают до pH 7,4 концентрированным раствором едкого натра, прибавляют 16 г трипсина «Дифко» (1 : 250), выдерживают 24 час при 37° и центрифугируют при малых скоростях в течение 30 мин. Раствор охлаждают до 5°, подкисляют до pH 2 соляной кислотой (5 н.) и прибавляют 2 объема 95%-ного спирта. Осадок отделяют центрифугированием, суспендируют в 1 л воды

и диализуют в течение 24 час против проточной водопроводной воды. За это время продукт переходит в раствор.

После прибавления 1 л раствора, содержащего 160 г уксусной кислоты и 300 г ацетата натрия, раствор энергично встряхивают на механической качалке со смесью 3,3 л хлороформа и 1,7 л *n*-амилового спирта в течение 10 мин и затем центрифугируют в течение 30 мин. Надосадочный водный раствор отделяют сифонированием и остаток снова обрабатывают смесью *n*-амиловый спирт — хлороформ, пока на поверхности раздела фаз не перестанет появляться денатурированный белок. К водному раствору гиалуроновой кислоты прибавляют 4 л 95%-ного спирта и отделяют осадок центрифугированием. Его растворяют в минимальном количестве воды и диализуют против проточной водопроводной воды в течение 24 час.

Полученный раствор разбавляют до объема 2 л и при сильном перемешивании прибавляют последовательно 2 кг сульфата аммония и 200 мл пиридина. Смесью оставляют на несколько часов при 0—5°, затем центрифугируют 1 час. Остаток промывают спиртом, центрифугируют и взбалтывают с водой. Суспензию диализуют против проточной водопроводной воды 24 час и полученный раствор обрабатывают второй раз сульфатом аммония и пиридином, как описано выше. Полученный в результате раствор лиофилизуют (см. стр. 302). Выход натриевой соли гиалуроновой кислоты 23 г (5,6% от веса сухой пуповины),  $[\alpha]_D^{25}$  —67° (в воде).

### А Н А Л И З

Как и для других кислых полисахаридов соединительной ткани, для гиалуроновой кислоты не существует специфических методов определения и для окончательной идентификации этих продуктов их необходимо выделить и определить удельное вращение и составляющие. Чистая гиалуроновая кислота не содержит серы. Предварительная идентификация основывается на образовании мутной суспензии в присутствии белка при pH 4,2, но эта проба требует, чтобы гиалуроновая кислота была частично расщеплена [5, 11]. Высокая вязкость большинства препаратов гиалуроновой кислоты, миграция в электрическом поле, изменения в цвете толуидинового голубого (метахромазия), реакция с алцианом голубым и чувствительность к гиалуронидазе используются для предварительной идентификации, но ни один из этих методов не достаточен для окончательной идентификации. Для отделения от других кислых полисахаридов в микромасштабе используют осаждение в виде цетилпиридиниевых солей. Количественное определение основано на определении D-глюкозамина (см. стр. 48) и D-глюкуроновой кислоты [12].

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Weissmann B., Meyer K., J. Am. Chem. Soc., **76**, 1753 (1954); Jeanloz R. W., Stoffyn P. J., Federation Proc., **21**, 81 (1962); см. также Jeanloz R. W., Advances in Enzymology, **25**, 433 (1963).
2. Jeanloz R. W., Forchielli E., J. Biol. Chem., **186**, 495 (1950).
3. Meyer K., Palmer J. W., J. Biol. Chem., **114**, 689 (1936).
4. Hadidian Z., Pirie N. W., Biochem. J., **42**, 260 (1948).
5. Meyer K., Physiol. Rev., **27**, 335 (1947).
6. Meyer K., J. Biol. Chem., **176**, 993 (1948).

7. Rogers H. J., Biochem. J., **39**, 435 (1945).
8. Jancsik W. E., Kaiser E., Nature, **169**, 114 (1952).
9. Scott J. E., Methods Biochem. Anal., **8**, 145 (1960).
10. Sevag M., Biochem. Z., **273**, 419 (1934).
11. Grossfeld H., Meyer K., Godman G., Proc. Soc. Expt. Biol. Med., **88**, 31 (1955).
12. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds., Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 464.

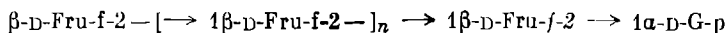
## Инулин

Получение инулина из клубней георгина

Г. О. Аспиналл, Е. Л. Херст

### ВВЕДЕНИЕ

Инулин — это фруктан, точнее глюкофруктан, который встречается как запасной полисахарид в клубнях георгинов и других растений семейства сложноцветных, например в *Helianthus tuberosus* и в видах *Inula* [1—3]. Он открыт Розе, который выделил его из экстракта клубней артишока [4]. Хотя некоторые небольшие структурные особенности инулина еще не установлены, с полной определенностью известно, что он является линейным полисахаридом, в котором цепи связанных (2→1)-связями β-D-фруктофуранозных остатков оканчиваются α-D-глюкопиранозным остатком, связанным как в сахарозе [2, 5, 6]:



Удобнее всего получать инулин из клубней георгина, а наиболее подходящее время для экстракции — ранняя осень. Так как инулин синтезируется в растении из сахарозы в результате постепенного трансфруктозилирования [7], экстракты содержат серию структурно сходных полимергомологов, и даже наиболее высокомолекулярный материал с удельным вращением  $[\alpha]_D -40^\circ$ , который выделяют после «перекристаллизации» из воды, имеет относительно низкий молекулярный вес ~ 5000—6000. Общий выход инулина с переменным удельным вращением  $[\alpha]_D$  от  $-34$  до  $-38^\circ$  обычно составляет ~ 9—10%. Приведенный здесь метод Херста и соавторов [2] основан на методике Национального бюро стандартов (циркуляр C440), которую цитирует Мак-Дональд [1].

### МЕТОДИКА

Клубни георгинов (3,3 кг) измельчают и выделившийся сок отфильтровывают через ткань. Через 1 час фильтрат затвердевает; его растирают с 1,5 л горячей воды, добавляют известковую воду до pH 8 и удаляют осадок фильтрованием. Нагретый до 60—70° раствор нейтрализуют до pH 7 разбавленным водным раствором щавелевой кислоты, прибавляют активированный уголь, фильтруют и охлаждают до 3°; при этом выделяется инулин. Выделившееся твердое вещество выдерживают в ацетоне

в течение ночи и сушат. Выход 50 г. Маточный раствор концентрируют при 40° и остаточном давлении 15 мм до 300 мл. В результате получают еще 35 г инулина.

Измельченные клубни экстрагируют 5 л воды при 60° в течение 1,5 час и экстракт обрабатывают, как описано выше. Выход инулина в этом случае составляет 64 г, и еще 108 г инулина получают из маточного раствора. При повторной экстракции измельченных клубней 4 л воды при 60° в течение 1 час выделяют еще 29 г инулина; общий выход 286 г. Различные фракции имеют удельное вращение от —34 до —38°.

Инулин очищают «перекристаллизацией» из воды. Образец полисахарида с  $[\alpha]_D$  —35° растворяют в горячей воде, при охлаждении раствора из него выпадает инулин. Полисахарид отделяют фильтрованием, процесс повторяют 7 раз. Полученный инулин ( $[\alpha]_D$  —40°) сушат, промывая ацетоном. Хроматография на бумаге гидролизата образца полисахарида, для гидролиза которого применяют 2%-ный раствор щавелевой кислоты, показывает присутствие в нем фруктозы и небольших количеств глюкозы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. McDonald E. J., *Advances in Carbohydrate Chem.*, **2**, 253 (1946).
2. Hirst E. L., McGilvray D. I., Percival E. G. V., *J. Chem. Soc.*, 1950, 1297.
3. Bell D. J., Palmer A., *J. Chem. Soc.*, 1952, 3763.
4. Rose V., *Neues Allgem. Jahrb. Chem. (Gehrens)*, **3**, 217 (1804).
5. Feingold D. S., Avigad G., *Biochem. Biophys. Acta*, **22**, 196 (1956).
6. Holzer K., Wittmann-Zinke H., Zinke A., *Monatsh.*, **88**, 268 (1957).
7. Bacon J. S. D., *Ann. Rept. Progr. Chem. (Chem. Soc. London)*, **50**, 281 (1953).

## Ламинаран

(из бурых морских водорослей)

В. А. И. Блэк

## ВВЕДЕНИЕ

Глюкан ламинаран является общим для бурых морских водорослей (Phaeophyceae), где он присутствует только в талломе. Он был впервые выделен из бурых водорослей Шмидебергом [1], а позднее Крефтингом и Торупом [2], Килином [3], Грузевской [4], Колином и Рикардом [5], Лунде [6], Нисизава [7], Ле Глоагеком и Хертером [8], Бэрри [9] и Блэком [10]. Ламинаран встречается в бурых водорослях в двух формах, которые различаются по растворимости в холодной воде, хотя они очень сходны химически.

Описанные здесь методы [10] относятся к выделению «нерастворимой в холодной воде» формы из таллома *Laminaria Cloustoni* Edm. (*L. hyperbo-*

rea Fosl.), сухое вещество которых содержит в некоторые периоды года до 36% ламинарана, и «растворимой в воде» формы из таллома *L. digitata* Lamour (*L. flexicaulis*), которые содержат до 25% ламинарана, считая на сухое вещество.

## МЕТОДИКА

### «Нерастворимая в холодной воде» форма ламинарана

250 г измельченных таллом, что эквивалентно 59,5 г сухого вещества (содержащего в процентах от веса сухого вещества: 28,0% золы, 9,2% маннита и 24,5% ламинарана), перемешивают в двухлитровом стакане с 500 мл 0,125 н. соляной кислоты и 1 мл 40%-ного формальдегида; в результате образуется раствор 0,09 н. по соляной кислоте. После перемешивания в течение 30 мин при 70° остатки водоросли отфильтровывают через ткань и промывают два раза водой (2 × 100 мл) с температурой 70°. Фильтрат и промывные воды перемешивают 3 час и оставляют стоять на 2 дня. Осадившийся ламинаран отделяют центрифугированием, промывают 100 мл спирта и 100 мл эфира и сушат в вакууме над фосфорным ангидридом. Этим методом выделяют 83% всего количества ламинарана, содержащегося в водоросли, и 60% этого ламинарана осаждается из водного кислого фильтрата при стоянии. Вместо свежей водоросли можно использовать высушенную водоросль, перемолотую так, чтобы она проходила через сито 60 меш. В этом случае экстракцию проводят на холоду. При этом извлекается 95% ламинарана, но выход осадившегося ламинарана тот же, что и при применении свежей водоросли, хотя продукт получается более белым.

Выделенный ламинаран «перекристаллизовывают» из 10%-ного водного раствора, выход 82%,  $[\alpha]_D^{25}$  колеблется в пределах от  $-12$  до  $-14^\circ$  (в воде).

### «Растворимая в воде» форма ламинарана

Высушенные и перемолотые талломы *L. digitata* (26,0 г вещества, содержащего в процентах от веса сухого вещества: 19,3% золы, 17,8% маннита, 23,8% ламинарана, которое полностью проходит через сито 60 меш) перемешивают с 250 мл 0,09 н. соляной кислоты в литровом стакане на холоду в течение 2 час. Смесь центрифугируют и остатки водоросли промывают 0,05 н. соляной кислотой (2 × 50 мл). Надосадочный и промывные растворы объединяют и прибавляют к ним спирт, пока концентрация последнего не достигнет 85%. Осадок отделяют центрифугированием, промывают 50 мл спирта и 50 мл эфира и сушат на воздухе. При этой обработке извлекается 88% ламинарана из водоросли и 70% всего ламинарана осаждается 85%-ным спиртом. Неочищенный ламинаран загрязнен фукоидином; очищают его следующим способом: 15,5 г ламинарана (72,5% ламинарана [11], 7,3% золы) растворяют в 180 мл воды, раствор пропускают через колонку, содержащую 20 мл ионообменной смолы зеокарб-225, и промывают колонку 50 мл воды. К элюату прибавляют спирт до 85%-ной концентрации последнего; при этой концентрации ламинаран выделяется в полукolloидном виде. Его коагуляцию вызывают, прибавляя раствор 0,2 г хлористого натрия и 1 мл воды. Белый осадок отделяют центрифугированием и высушивают в вакууме. Выход 13,4 г, содержание золы 1,3%, ламинарана 82,2%,  $[\alpha]_D^{25} -12^\circ$  (в воде).



## ПРОИЗВОДНЫЕ ЛАМИНАРАНА

Методики их получения применимы как к «водорастворимому», так и к «водонерастворимому» ламинарану. С хорошими выходами выделены оксиэтиловый, оксипропиловый и бензиловый эфиры, а также ацетат, бензоат и карбанилат [12]. Последний легко получают с количественным выходом следующим способом.

Безводный ламинаран (2,5 г) нагревают с 40 мл пиридина и 10 мл фенилизотиоцианата при 100° в течение 7,5 час, встряхивая смесь время от времени. Смесь оставляют затем стоять на ночь при комнатной температуре. Образовавшийся коричневый раствор центрифугируют, чтобы удалить небольшой осадок. Надосадочную жидкость выливают в 200 мл спирта и прибавляют 250 мл воды; при этом образуется коллоидный раствор сложного эфира, коагуляцию которого вызывают прибавлением 6 мл насыщенного раствора хлористого натрия. Осадок отделяют центрифугированием и промывают водой. Сложный эфир очищают, растворяя его в 50 мл ацетона, прибавляя 200 мл спирта и осаждая 250 мл воды, содержащей небольшое количество хлористого натрия. Трикарбанилат отделяют центрифугированием, промывают 50%-ным (по объему) спиртом (2 × 100 мл) и сушат в вакууме сначала над хлористым кальцием, потом над фосфорным ангидридом. Выход количественный,  $[\alpha]_D^{20}$  —7° (в хлороформе), —52° (в пиридине) (*c* 0,04), т. пл. 175—185° (без разл.).

Карбанилат представляет собой белый порошок; он растворим в хлороформе, пиридине, ацетоне, ледяной уксусной кислоте, этилацетате и тетрагидрофуране, слегка растворим в спирте и нерастворим в воде, эфире, бензоле, четыреххлористом углеороде и петролейном эфире.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schmiedeberg J. E. O., Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte, Leipzig, Tageblatt der Versammlung, No. 58, 427 (1885).
2. Krefting A., Torup S., Pharmacia (Kristiania), 6, 151 (1909).
3. Kylin H., Z. physiol. Chem., 83, 171 (1913); 94, 337 (1915); 101, 236 (1918).
4. Gruzewska Z., Bull. soc. chim. biol., 5, 216 (1923).
5. Colin H., Ricard P., Compt. Rend., 188, 1449 (1929).
6. Lunde G., Angew. Chem., 50, 731 (1937).
7. Nisizawa K., Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku [B] 5, 9 (1940).
8. Le Gloahac V. C. E., Herter J. R., пат. США 2188092 (1940); Chem. Abstracts, 34, 3849 (1940).
9. Barry V. C., Sci. Proc. Roy. Dublin Soc., 21, 615 (1938); 22, 59 (1939).
10. Black W. A. P., Cornhill W. J., Dewar E. T., Woodward F. N., J. Appl. Chem. (London), 1, 505 (1951).
11. Cameron M. C., Ross A. G., Percival E. G. V., J. Soc. Chem. (London), 67, 161 (1948).
12. Black W. A. P., Dewar E. T., J. Sci. Food Agr., 5, 176 (1954).

## Нигеран

(из *Aspergillus niger*)

С. А. Баркер

### ВВЕДЕНИЕ

В ранних работах [1, 2] описано выделение глюкана с очень высоким оптическим вращением около  $+250^\circ$  из *Penicillium expansum* и *Aspergillus niger*. Позднейшие исследования [3, 4] показали, что продуцирование этого глюкана ограничивается лишь определенными штаммами *Aspergillus niger*, а именно штаммом 152, и что весьма важно присутствие в культуральной среде ионов цинка [5]. Целый ряд углеводов, например D-глюкозу, D-фруктозу, D-сорбит, D-ксилозу, мальтозу, сахарозу, крахмал и инулин, можно использовать как единственный источник углерода в среде [5]. Первоначальное название полисахарида «микодекстран» [1, 2], подразумевающее некоторое родство с  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-декстранами, было изменено на «нигеран» [5] после того, как оказалось [4, 6], что нигеран на самом деле является линейным глюканом, в котором чередуются  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)- и  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи.

### МЕТОДИКА

*Aspergillus niger* 152 должен подрачиваться с трехмесячными интервалами на среде из экстракта солода (8%) и агара (2%); эту культуру следует использовать для инокуляции при приготовлении в крупных масштабах жидких культур на искусственной среде, содержащей углеводы (обычно сахарозу) как единственный источник углерода вместе с минеральной средой Куррье [7]. По типичной методике [5] среду (250 мл) готовят в пенициллиновых кюветах. В ней содержится 37,5 г сахарозы, 0,625 г нитрата аммония, 0,25 г однозамещенного фосфата калия, 0,0625 г гептагидрата сульфата магния, 0,25 мл 1 н. соляной кислоты, 0,010 г гептагидрата сульфата цинка и 0,010 г гептагидрата сульфата железа(II). Среду стерилизуют автоклавированием при 1,1 атм в течение 20 мин. Чтобы ватная пробка не намокала и не препятствовала свободному доступу воздуха во время роста, ее следует обернуть калькой. Охлажденный раствор инокулируют спорами плесени из запасной культуры, выращиваемой на смеси агара и солода, и инкубируют при  $30^\circ$ . В первые 1—3 дня споры лопаются и развивается подводная сеть сильно разветвленных нитей, которые вытягиваются по направлению к поверхности жидкости. Эти нити дают начало второй, аэробной фазе роста, результатом которой является образование плавающего на поверхности мицелия. В стандартных условиях мицелий полностью созревает на 7-й—10-й день, и на этой стадии вес полученного сухого материала составляет 3,354 г. Мицелий отделяют от культуральной среды и 6 раз тщательно промывают холодной дистиллированной водой. Затем его гомогенизируют в гомогенизаторе Уоринга и водную суспензию (100 мл) кипятят 30 мин при атмосферном давлении, а затем фильтруют в горячем состоянии. Два экстракта, полученные один за другим этим путем, объединяют и выдерживают 18 час при  $0^\circ$ . Хлопьевидный нигеран, который при этом осаждается, отделяют центрифугированием, промывают водой при  $0^\circ$ ,

суспендируют в воде и лиофилизуют. Выход чистого нигерана 0,137 г,  $[\alpha]_D + 225^\circ$  (в 1 н. растворе едкого натра). Далее менее гомогенные фракции, вероятно, несколько деградированного нигерана можно выделить автоклавированием мицеллия с водой (100 мл) при 1,1 атм в течение 30 мин (выход 0,049 г,  $[\alpha]_D + 254^\circ$ ) и экстракцией 50 мл холодного 1 н. раствора едкого натра в течение 24 час при комнатной температуре. Нигеран выделяется при нейтрализации профильтрованного экстракта. Выход 0,264 г,  $[\alpha]_D + 234^\circ$ . Нигеран дает характерный инфракрасный спектр; особенно следует отметить пики при 921 (интенсивный), 905 (слабый), 860 (средний), 840 (интенсивный), 789 (интенсивный)  $\text{см}^{-1}$ . В параллельном опыте, в котором в среду не добавляли сульфат железа, выход нигерана вдвое выше [5]. Возможно, однако, что железо все же необходимо и что следовые количества его были внесены при инокуляции. Поэтому, вероятно, следует ожидать, что такой высокий выход не будет стабильным.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dox A. W., Niedig R. E., J. Biol. Chem., 18, 167 (1914).
2. Dox A. W., J. Biol. Chem., 20, 83 (1915).
3. Yuill J. L., Chem. and Ind. (London), 755 (1952).
4. Barker S. A., Bourne E. J., Stacey M., J. Chem. Soc., 1953, 3084.
5. Barker S. A., Carrington T. R., J. Chem. Soc., 1953, 3588.
6. Barker S. A., Bourne E. J., O'Mant D. M., Stacey M., J. Chem. Soc., 1957, 2448.
7. Currie J. N., J. Biol. Chem., 31, 15 (1917).

## Пектин и пектовая кислота

Экстракция пектина из кожуры цитрусовых  
и превращение пектина в пектовую кислоту

*Р. М. Мак-Креди*

## ВВЕДЕНИЕ

Открытие пектина, желеобразующего вещества плодов и овощей, приписывают Воклену, 1790 г. [1]. Браконно в 1825 г. [2] омылил пектин и получил пектовую кислоту. Ввиду сложности пектиновых веществ Американское химическое общество учреждало комитеты по номенклатуре в 1927 и 1944 гг., чтобы дать определения и названия этой группе углеводов [3]. Кертеш в 1951 г. [4] опубликовал монографию по химии пектиновых веществ, а недавно появились обзоры, описывающие их свойства [5—7].

Поступающий в продажу пектин обычно получают из яблок и отходов от консервирования цитрусов, но его можно производить также из других фруктов и овощей. Пектин составляет  $\sim 1/3$  сухого вещества кожуры цитрусовых, и выход пектина легко можно довести до 90% от его общего содержания. Фреми в 1840 г. [8] нашел, что пектин лучше всего экстрагировать кипящими разбавленными кислотами; описанный здесь лабора-

торный метод основан на использовании кислоты в качестве растворителя для экстракции [9].

Пектин можно превратить в пектовую кислоту действием фермента пектинэстеразы, кислоты или щелочных реагентов в условиях, при которых гидролизуются метиловые эфиры. Описанный здесь метод превращения пектина в пектовую кислоту с использованием едкого натра — это по существу метод Браконно [2], в который введен контроль за температурой и рН.

## МЕТОДИКА

### *Экстракция и выделение пектина*

Апельсины первого сорта (можно также использовать лимоны или грейпфруты) разрезают пополам и очищают от кожицы. Кожуру (500 г) режут на ломтики толщиной 2 мм прямо в четырехлитровый сосуд с 2,5 л кипящей воды, приливают около 8 мл концентрированной соляной кислоты (уд. вес 1,19) до рН  $2,2 \pm 0,1$  и, чтобы облегчить фильтрование, прибавляют 20 г бумажной массы. Смесь нагревают при перемешивании в течение 30 мин при 95—100°, чтобы облегчить фильтрование, прибавляют 40 г кизельгура и фильтруют с отсасыванием через холст, покрытый слоем кизельгура. Остаток на фильтре промывают 500 мл кипящей воды. Объединенные фильтрат и промывную воду быстро охлаждают до температуры ниже 25°, чтобы свести к минимуму тепловое разрушение пектина. К охлажденному раствору пектина прибавляют 1,5 объема этанола (можно использовать изопропиловый спирт или ацетон), содержащего 2 мл концентрированной соляной кислоты (уд. вес 1,19) на 1 л. Смесь перемешивают вручную медленно и тщательно и оставляют стоять на 30 мин с тем, чтобы пектин всплыл на поверхность. Большую часть не содержащего пектина раствора можно отделить сифонированием. Осадок отфильтровывают через марлю или нейлон и отжимают. Образовавшийся на фильтре ком переносят в 2 объема 50%-ного спирта, растирают, тщательно перемешивают и снова отжимают на ткани. Трех промывок обычно бывает достаточно, чтобы удалить большую часть соляной кислоты и зольных веществ. Когда реакция с нитратом серебра на хлорид-ион в промывных растворах будет отрицательной, осадок, отжатый на фильтре, растирают с 2 объемами 95%-ного спирта, быстро и тщательно перемешивают, отжимают на ткани, измельчают и сушат 16 час в вакууме при 60°. Выход ~ 18 г. Высушенный белоснежный пектин измельчают так, чтобы он проходил через сито 60 меш. Препарат содержит: 9,5% —  $\text{OCH}_3$ -групп и 83,3% уроновых кислот;  $[\alpha]_D^{20} + 230^\circ$  (с 0,5 в воде при рН 2,5).

### *Приготовление пектовой кислоты (см. стр. 304)*

Сухой измельченный пектин (10 г), например нестандартизованный продажный пектин NF (Савкист Грауэрс, Онтарио, Калифорния, США), смачивают 95%-ным спиртом, чтобы предупредить образование комков, и быстро при сильном перемешивании прибавляют 1 л воды с температурой 25°. Перемешивание продолжают ~ 10 мин до полного растворения. Затем приливают ~ 60 мл 1 н. раствора едкого натра до рН 12, и поддерживают это значение рН в течение 1 час. Из образовавшегося раствора пектата натрия осаждают пектовую кислоту, прибавляя по каплям до рН 1,5 ~ 10 мл соляной кислоты с уд. весом 1,19 г/см<sup>3</sup> при сильном пере-

мешивании смеси. Гель пектовой кислоты отжимают на ткани, измельчают, растирая с 2 объемами 50%-ного спирта, и тщательно перемешивают. Пектовую кислоту снова отжимают на ткани и повторяют подобную промывку 50%-ным спиртом обычно 3—4 раза, пока промывной раствор не будет давать отрицательную реакцию с нитратом серебра на хлорид-ион. После этого волокнистую пектовую кислоту растирают с 2 объемами 95%-ного спирта, перемешивают, отфильтровывают через ткань, отжимают, измельчают и сушат 16 час в вакууме при 60°. Высушенное предназначено для анализа вещество измельчают до частиц размером 60 меш. Пектовая кислота — белоснежный порошок, нерастворимый в воде, но ее можно растворить, титруя водную суспензию разбавленной щелочью до pH 4; выход ~ 8 г, содержание уроновых кислот 92,1%,  $[\alpha]_D^{25} + 272^\circ$  (с 0,25 в воде при pH 4).

### ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Пектиновые вещества — это углеводные полимеры, состоящие главным образом из неразветвленных цепей, которые построены из остатков  $\alpha$ -D-галактуроновой кислоты, связанных (1 → 4)-связями. Простых химических производных, которые могли бы служить для характеристики пектиновых веществ, нет, однако результаты химического и физического анализов [4, 7, 10] могут дать полезную информацию. Для сухого пектина из цитрусовых обычно характерно следующее: содержание уроновых кислот 83%, —OCH<sub>3</sub> 10%, —OCCN<sub>3</sub> 0,3%,  $[\eta]$  3,5, желирующее число 200,  $[\alpha]_D^{25} + 230^\circ$ , качественная гидроксамовая реакция на сложный эфир положительна [11]. Сухая пектовая кислота из цитрусовых, приготовленная, как описано выше, обычно дает следующие результаты анализа: содержание уроновых кислот 92%,  $[\alpha]_D^{25} + 272^\circ$ , эквивалентный вес 192, гидроксамовая реакция на сложные эфиры отрицательна.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Vauquelin M., Ann. chim., 5, 92 (1790).
2. Braconnot H., Ann. chim. phys., Series 2, 28, 173 (1825).
3. Brinton C. S., Dore W. H., Wichmann H. J., Willaman J. J., Wilson C. P., J. Am. Chem. Soc., 49, Proc. 38 (1927); Baker G. L., Joseph G. H., Kertesz Z. I., Mottern H. H., Olsen A. G., Chem. Eng. News, 22, 105 (1944).
4. Kertesz Z. I., The Pectic Substances, Interscience Publishers, Inc., New York, N.Y., 1951.
5. Whistler R. L., Smart C. L., Polysaccharide Chemistry, Academic Press Inc., New York, N.Y., 1953, Chapt. 7.
6. McCready R. M., Owens H. S., Econ. Bot., 8, 29 (1954).
7. Bender W. A., in «Industrial Gums», R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Eds, Academic Press Inc., New York, N.Y., 1959.
8. Fremy E., J. prakt. Chem., 3, 1 (1840); J. pharm. Belg., 26, 368 (1840).
9. McCready R. M., Shepherd A. D., MacLay W. D., Fruit. Prod. Jour., 27, 36 (1947).
10. Owens H. S., McCready R. M., Shepherd A. D., Schultz T. H., Phippen E. L., Miers J. C., Erlandsen R. F., MacLay W. D., U.S. Dept. Agr., Bur. Agr. Ind. Chem., Mimeo. Circ. Ser., AIC 340 (1952).
11. McCready R. M., Reove R. M., J. Agr. Food Chem., 3, 260 (1955).

## Ксиланы

Арабиноглюкуроноксилан, арабиноксилан и ксилан;  
очистка с использованием медных комплексов и  
очистка фракционным осаждением ацетатов

Г. А. Адамс

### ВВЕДЕНИЕ

Ксиланы, которые содержатся во всех наземных растениях и некоторых морских водорослях, можно выделить экстрагированием водными щелочами; некоторые из ксиланов, содержащиеся в злаках («камедевая фракция»), растворимы в воде. Ксиланы большинства наземных растений построены из цепей  $\beta$ -D-ксилопиранозных остатков, соединенных (1  $\rightarrow$  4)-связями, к которым в виде боковых цепей могут быть присоединены L-арабиноза, D-глюкуроновая кислота и 4-O-метилглюкуроновая кислота (все одновременно и некоторые из них) [1—3]. Ксиланы водорослей содержат в дополнение к обычным, связанным (1  $\rightarrow$  4)-связью остаткам  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-ксилопиранозные звенья [3]. В ксиланах эндосперма семян обычно нет уроновых кислот; для них характерно высокое содержание остатков L-арабинозы [3]. Голоцеллюлозы являются лучшими источниками кислых ксиланов, чем исходный растительный материал: ксиланы из них экстрагируются легче и в выделенных ксиланах не содержится лигнина.

### МЕТОДИКА

#### *Арабиноглюкуроноксилан*

Приведенный здесь метод получения кислого ксилана описан Адамсом и Кастанье [4, 5]; методика очистки является видоизмененной методикой Чанда и соавторов [6].

*Предварительная обработка пшеничной соломы.* Чистую зрелую пшеничную солому освобождают от колосьев, корней, листьев и измельчают при помощи мельницы Уили. Отбирают фракцию, проходящую через сито в 40 меш и остающуюся на сите в 60 меш, и экстрагируют ее смесью бензол — спирт (2 : 1 по объему) в аппарате Сокслета три раза по 24 час, затем в течение 24 час экстрагируют спиртом и высушивают при комнатной температуре.

*Приготовление голоцеллюлозы* (см. также [7]). Прозэкстрагированную солому (70 г) суспендируют в 3500 мл воды, перемешивая в шестилитровом стакане. Суспензию помещают в термостатированную водяную баню, нагретую до  $75 \pm 0,5^\circ$ . Когда температура смеси достигнет нужного значения, прибавляют при перемешивании 4,2 мл ледяной уксусной кислоты и 52,5 г хлорита натрия в указанной последовательности. Хлорит натрия нужно прибавлять медленно во избежание сильного вспенивания. Удаление лигнина проводят в хорошо работающем вытяжном шкафу. Через час снова прибавляют те же реагенты и в таком же количестве и продолжают нагревание. Через три часа такой обработки pH возрастает от 4,2 до 4,7. Трех обработок хлоритом достаточно для уменьшения количества лигнина до постоянного уровня. Дальнейшие обработки вызывают зна-

чительные потери голоцеллюлозы, содержание лигнина при этом не снижается. Смесь затем быстро охлаждают до 25°, фильтруют через ткань на воронке Бюхнера, промывают водой до полного удаления кислоты, промывают спиртом и высушивают на воздухе. Выход белой волокнистой голоцеллюлозы 75%, содержание лигнина в ней составляет 1,2%. *Получение арабиноглокуроноксилана.* Хлоритную голоцеллюлозу (50 г) перемешивают в 1000 мл 5%-ного раствора едкого кали при 25° в течение 8 час. Аппарат для экстракции состоит из двухлитровой стеклянной бутылки, снабженной мешалкой Гершберга. Бутылку закрывают пробкой с отверстиями для стержия мешалки, ввода и вывода азота. Во время экстракции над поверхностью раствора непрерывно пропускают азот. Экстракт отделяют фильтрованием через пористый стеклянный фильтр № 3, погруженный в раствор. Экстракцию повторяют всего три раза тем же способом и остаток промывают водой. Экстракты и промывные растворы слегка опалесцируют, и их очищают центрифугированием на суперцентрифуге Шарплеса из нержавеющей стали. Прозрачный раствор нейтрализуют при охлаждении соляной кислотой и концентрируют до 0,1 первоначального объема при помощи пленочного испарителя при температуре не выше 40° [8]. Полученный раствор диализуют последовательно против водопроводной и дистиллированной воды до полного удаления хлорид-ионов. Длительность этой операции 36 час. Диализованный раствор опять концентрируют при температуре < 40° и при перемешивании прибавляют 3 объема спирта. Тяжелый белый осадок неочищенного ксилана промывают последовательно 75- и 95%-ным спиртом и эфиром. Другой метод высушивания гемицеллюлозы состоит в удалении спирта отсасыванием и выпариванием. Неочищенный ксилан взбалтывают затем в небольшом количестве воды и вновь выделяют с помощью лиофильной сушки. Выход 28—30% от исходной голоцеллюлозы, приблизительный состав: D-ксилоза 70%, L-арабиноза 9%, D-глюкоза 5%, следы D-галактозы, уроновая кислота 11%.

*Очистка ксилана.* Сырой ксилан (15 г) растворяют в 1500 мл 5%-ного раствора едкого кали и к нему из бюретки прибавляют свежеприготовленный раствор Фелинга (A + B, равные объемы). Образуется студенистый голубой медный комплекс, осаждение обычно бывает полным после прибавления ~ 200 мл раствора Фелинга. Прозрачный надосадочный раствор декантируют через стеклянный фильтр № 3, а осадок промывают водой. Промытый осадок суспендируют в воде перемешиванием, охлаждают взвесью ледяной водой и, чтобы разложить медный комплекс, прибавляют холодную 1 н. соляную кислоту; при этом образуется прозрачный зеленый раствор, который при сильном перемешивании выливают в 4 объема спирта. Ксилан выделяют центрифугированием в виде хлопьевидного зеленоватого осадка. Спирт сливают, осадок взбалтывают в небольшом количестве воды. Полученную кашку подкисляют и ксилан осаждают спиртом. Операцию повторяют до тех пор, пока не образуется белый осадок (обычно 2 раза).

Неочищенный ксилан суспендируют в воде, в которой он почти полностью растворим, и диализуют против проточной дистиллированной воды до полного освобождения от хлорид-иона. Раствор концентрируют при температуре ниже 35° и выделяют ксилан лиофильной сушкой в виде пористой белой массы (стр. 302). Выход неочищенного ксилана 75—80%. Состав ксилана пшеничной соломы: азот 0,21%, уроновая кислота 10,6%, D-ксилоза 71,7%, L-арабиноза 13,6%;  $[\alpha]_D^{25} = 92^\circ$  (с 1 в 2,5%-ном растворе едкого натра).

### Арабиноксилан

Приготовление нейтрального ксилана из пшеничной муки описано Перлином [10].

**Экстракция.** 1500 г неотбеленной пшеничной муки и 3000 мл воды перемешивают в гомогенизаторе Уоринга в течение 4 мин при 15°. Суспензию центрифугируют и надосадочный раствор фильтруют через стеклянное волокно. Прозрачный экстракт подкисляют соляной кислотой до pH 3 и прибавляют к нему спирт до 70%-ной концентрации последнего. Объемистый белый осадок отделяют центрифугированием, тщательно промывают спиртом, затем эфиром и высушивают в вакууме над фосфорным ангидридом и парафином. Выход неочищенного полисахарида ~ 1,1% от веса муки. Выделенный полисахарид ацетилируют (см. далее).

**Очистка.** Арабиноксилан (4 г) суспендируют в 28 мл формамида и образующуюся мягкую пасту смешивают с 56 мл пиридина. При непрерывном перемешивании прибавляют в течение 1,5 час 28 мл уксусного ангидрида и повышают температуру до 50°. После стояния в течение 20 час при комнатной температуре раствор выливают в ледяную воду, осадок ацетата отделяют фильтрованием, промывают водой и сушат в вакууме при 55°. При повторном ацетилировании без формамида образуется 5,3 г неочищенного ацетилированного полисахарида ( $-\text{OCCN}_3$  39,8%, азот 1,1%). Полученное вещество встряхивают 1—2 дня с 50 объемами хлороформа. К прозрачному экстракту прибавляют пертолейный эфир (т. кип. 65—110°) до отчетливого помутнения раствора. Выделившийся продукт промывают петролейным эфиром и смесью петролейного эфира и хлороформа с той же пропорцией компонентов, что и в надосадочном растворе, снова растворяют в хлороформе и опять осаждают петролейным эфиром. Осадок промывают петролейным эфиром и сушат в вакууме над фосфорным ангидридом и парафином. Последовательным прибавлением петролейного эфира к хлороформному раствору диацетата ксилана получают ряд фракций. Анализ на содержание фурфурола [11], ацетила [9, 11, 12] и азота и определение удельного вращения [14] позволяют отобрать среднюю фракцию (~ 30%), которая приближается к диацетату ксилана (рассчитано для диацетата ксилана: фурфурол 32%, ацетил 39,9%). Отобранную фракцию опять растворяют в хлороформе и снова фракционируют петролейным эфиром. Выделенные фракции деацетилируют встряхиванием с 0,2 н. раствором едкого кали (5 мл на 1 г) в течение 18—20 час. В некоторых случаях перед прибавлением щелочи образец необходимо растворить в ацетоне. Реакционную смесь затем разбавляют водой в 2—3 раза, подкисляют соляной кислотой до pH 2 и прибавляют 3 объема спирта. Деацетилированный продукт выделяют центрифугированием, промывают спиртом и эфиром и сушат в вакууме над фосфорным ангидридом и парафином. Деацетилированный продукт можно выделять также лиофилизацией. Типичный состав нейтрального ксилана пшеничной муки: L-арабиноза 36%, D-ксилоза 62%, D-галактоза 1%;  $[\alpha]_D^{25} - 108^\circ$ .

### Ксилан

Ксилан можно проэкстрагировать из голоцеллюлозы кукурузных початков 10%-ным раствором едкого кали и осадить из фильтрата, подкислив его уксусной кислотой до pH 4—5 (см. [15] и стр. 360). Этот общий метод можно применить для экстракции ксилана из большинства растительных тканей с небольшими изменениями; для некоторых древесных



тканей экстракция более эффективна, если концентрацию едкого кали увеличить до 16% [10].

**Экстракция.** Воздушно-сухую голоцеллюлозу кукурузных початков [13] помещают в четырехлитровую круглодонную колбу и экстрагируют при комнатной температуре в течение 15 час 3,5 л 10%-ного раствора едкого кали, освобожденного от кислорода. Смесь непрерывно перемешивают, постоянно пропуская над поверхностью раствора ток азота, из которого предварительно с помощью раствора Физера удален кислород. Затем смесь быстро фильтруют через ткань на воронке Бюхнера и фильтрат немедленно подкисляют 50%-ной уксусной кислотой до pH 4,5—5,0 при охлаждении льдом. После стояния в течение 3 час раствор центрифугируют в ультрацентрифуге при 40 000 об/мин и осадок — ксилан или гемицеллюлозу А — отделяют.

Полученный ксилан представляет собой почти чистый продукт, и его можно использовать во многих случаях без дополнительной очистки. В этих случаях ксилан можно обезводить взбалтыванием с 500 мл 95%-ного спирта и фильтрованием. Нужно позаботиться, чтобы воздух не проходил через осадок во время фильтрования. С этой целью, прежде чем включить насос, воронку Бюхнера плотно покрывают листом тонкой резины. Чтобы обеспечить удаление воды, обработку спиртом повторяют три раза, используя для последней промывки абсолютный спирт. Осадок промывают эфиром для удаления большей части спирта и немедленно помещают в вакуум-эксикатор над хлористым кальцием. При таком высушивании предупреждается ороговение и получается легкий пушистый белый порошок.

**Очистка.** При необходимости ксилан можно очистить перед высушиванием повторным растворением и переосаждением. Неочищенный ксилан (40 г) перемешивают в течение ночи с 500 мл воды. Смесь центрифугируют и остаток растворяют в 800 мл 4%-ного раствора едкого кали, не содержащего кислорода. Раствор тотчас же фильтруют и подкисляют до pH 4,5—5,0 50%-ной уксусной кислотой. Смесь центрифугируют в ультрацентрифуге, осадок снова растворяют, как описано выше, и еще раз осаждают. Суспензию осажжденного ксилана диализуют против дистиллированной воды и затем лиофилизируют или фильтруют и сушат, как описано выше. В ходе очистки удаляются более растворимые примеси. Выход ксилана 20% от исходной голоцеллюлозы, приблизительный состав: D-ксилоза 94%, уроновая кислота 3%;  $[\alpha]_D^{25}$  —  $106^\circ$  (с 0,5 в 1 н. растворе едкого натра) [11],  $[\alpha]_D^{25}$  —  $116^\circ$  (с 1,0 в 1 н. растворе едкого натра) [12].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Whistler R. L., *Advances in Carbohydrate Chem.*, 5, 269 (1950).
2. Whistler R. L., Smart C. L., *Polysaccharide Chemistry*, Academic Press Inc., New York, N.Y., 1953, p. 134.
3. Aspinall G. O., *Advances in Carbohydrate Chem.*, 14, 429 (1959).
4. Adams G. A., Castagne A. E., *Can. J. Research*, B26, 325 (1948).
5. Adams G. A., Castagne A. E., *Can. J. Chem.*, 29, 109 (1951).
6. Chanda S. K., Hirst E. L., Jones J. K. N., Percival E. G. V., *J. Chem. Soc.*, 1289 (1950).
7. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 21.
8. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 4.

9. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 57.
10. Perlman A. S., Cereal Chem., 28, 370 (1951).
11. Hughes E. E., Acree S. F., J. Research Natl. Bur. Standards, 21, 327 (1938)
12. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 448.
13. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 201.
14. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1965, vol. V, p. 34.
15. Whistler R. L., Bachrach J., Bowman D. R., Arch. Biochem., 19, 25 (1948).

## Дрожжевые полисахариды

Выделение гликогена, глюкана и маннана из пекарских дрожжей

Т. Е. Эдвардс

### ВВЕДЕНИЕ

Уже давно известно, что пекарские дрожжи содержат три различных полисахарида. Гликогенopodobный компонент описан Эррера в 1885 г. [1], о глюкане, названном «дрожжевая целлюлоза», сообщал в 1894 г. Сальковский [2], позднее было показано, что этот глюкан отличается от целлюлозы [3], в 1894 г. маннан был впервые получен Сальковским [4]. Тревелин и соавторы [5] определили относительное содержание этих веществ в дрожжах, а Эдди — их содержание в клеточных стенках [6].

Глюкан представляет собой нерастворимое вещество, остающееся после обработки дрожжей щелочным раствором для удаления маннана и уксусной кислотой для удаления гликогена. Маннан отделяют от гликогена осаждением его медного комплекса. Приводимый здесь метод экстракции гликогена по существу является комбинацией методик Норткота [7] и Белла и Норткота [8], а метод получения глюкана представляет собой модифицированный метод двух последних авторов [8]. Методика получения маннана, описанная здесь, является гораздо менее жесткой, чем описанная ранее Хэуорсом и соавторами [9]. Приводимые ниже методы не являются количественными.

### МЕТОДИКА

#### Дрожжевой гликоген [10]

Свежие пекарские дрожжи (6 кг) измельчают и взбалтывают с 4,8 л 6%-ного раствора едкого натра; суспензию перемешивают при нагревании на водяной бане, пока температура не достигнет 60°. После разбавления суспензии водой до 40 л охлажденную суспензию центрифугируют<sup>1</sup>. Выделенное твердое вещество снова суспендируют в 10 л 3%-ного раство-

<sup>1</sup> Это лучше всего достигается применением центрифуги непрерывного действия, в которой твердая фаза собирается на отделяемом роторе, например применением центрифуг фирмы «Шарплес».

ра едкого натра в течение 3 час. После разбавления 20 л воды твердое вещество отделяют центрифугированием, затем суспендируют в 10 л воды, нагревают до 80° и фильтруют через стеклянный фильтр, предварительно доведя pH смеси до 4,5, что облегчает выполнение этой операции. Твердое вещество еще раз нагревают при 80° в течение 2 час с 5 л 3%-ного раствора едкого натра. После центрифугирования твердый остаток суспендируют в воде, доводят pH до 4,5 и отделяют твердое вещество фильтрованием. После промывания 10 л холодного 2%-ного раствора уксусной кислоты выделенный продукт последовательно промывают 5 л спирта, эфиром и петролейным эфиром; выход неочищенного вещества, содержащего гликоген и глюкан, 112 г.

Гликоген выделяют, нагревая суспензию полученного вещества (112 г) с 2 л 0,5 н. уксусной кислоты при 75°. После охлаждения студенистую массу отделяют центрифугированием и трижды по 1 час промывают водой (3 × 700 мл) нагретой до 75°. Объединенные уксуснокислый экстракт и водные промывные растворы охлаждают до 4° и обрабатывают избытком спирта, чтобы его концентрация достигла в итоге 75% (по объему). Отфильтровывают осадившийся гликоген, промывают его 75%-ным водным спиртом и сушат в вакууме над пятиокисью фосфора при комнатной температуре; выход 3,44 г.<sup>1</sup>

Содержание углеводов определяют, смачивая предварительно высушенный в вакууме при 60° над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> образец (49,6 мг) спиртом и нагревая его с 3 мл 0,3 н. раствора едкого натра. Через 3 мин, когда гликоген растворится, раствор нейтрализуют 0,3 н. серной кислотой и разбавляют до 25 мл. Две аликвотные части раствора по 5 мл смешивают с 4,3 мл 5 н. серной кислоты и 5 мл воды и нагревают 4 час при 98°. После охлаждения раствор нейтрализуют 6 н. едким натром и разбавляют до 25 мл. Для измерения восстанавливающей способности глюкозы по методу Перта и Уилана [11] с использованием раствора Шомодьи [12] отбирают аликвотные части раствора (по 5 мл). Гликоген содержит 99% D-глюкозы;  $[\alpha]_D^{20} + 189^\circ$  (с 0,11 в воде; в пересчете на содержание углеводов), не содержит золы и азота.

### *Дрожжевой глюкан [13]*

Твердый остаток после экстракции гликогена промывают водой (3 × 1,5 л) и нагревают в автоклаве при 135° в течение 1 час с 2 л 0,02 M раствора ацетата натрия (pH 7). После охлаждения прибавляют 2 л воды, отделяют твердое вещество центрифугированием, вновь нагревают в автоклаве при 135°, но на этот раз лишь с 3 л воды и промывают водой, пока промывные воды, отделяемые центрифугированием не перестанут давать красное окрашивание с раствором иода (что свидетельствует об отсутствии гликогена). Студенистое вещество отделяют центрифугированием, обезвоживают, обрабатывая 3 объемами спирта, и промывают последовательно спиртом, эфиром и петролейным эфиром. Выход глюкана 39 г, содержание золы 0,4%, азота 0,6%.

Содержание углеводов в веществе, высушенном в вакууме при 60° над фосфорным ангидридом в течение 36 час, измеряют, нагревая 75,2 мг глюкана с 5 мл 90%-ной аналитически чистой муравьиной кислоты на кипящей водяной бане в течение 2 час. После прибавления 20 мл 3 н. серной кислоты смесь нагревают еще 3 час, охлаждают, нейтрализуют и раз-

<sup>1</sup> В результате повторной экстракции студенистого осадка уксусной кислотой получают еще 3,64 г гликогена.

бавляют до 50 мл. Содержание D-глюкозы определяют по Перту и Уилану [11] с раствором Шомодьи [12]. Поскольку такая же обработка аналитически чистой D-глюкозы вызывает разрушение 5,2% ее первоначального количества, с учетом поправки содержание глюкозы в образце глюкана составляет 90,3%.

Для три-O-ацетилглюкана, полученного по методу Белла и Норткота [8],  $[\alpha]_D^{25}$  — 62° (с 0,58 в хлорформе).

### *Дрожжевой маннан [14]*

Прессованные пекарские дрожжи (4,5 кг) измельчают и нагревают 2 час в автоклаве при 140° с 2 л воды и 200 мл 0,2 М цитратного буфера (рН 7). После охлаждения и отделения студенистого осадка на центрифуге его еще раз нагревают в автоклаве с 5 л воды. Объединяют надосадочные растворы и концентрируют их в вакууме до 2,5 л. К полученному раствору добавляют уксусную кислоту до 1 н. концентрации, выделившуюся коричневую слизь промывают небольшим количеством разбавленной уксусной кислоты и отбрасывают. Объединенные промывные растворы и уксуснокислый раствор быстро нейтрализуют 6 н. едким натром и концентрируют приблизительно до 2 л. Чтобы осадить маннан, медленно при перемешивании прибавляют 4 л спирта, маннан отфильтровывают и дважды промывают 60%-ным спиртом.

Неочищенное вещество растворяют снова примерно в 2 л воды, бурый остаток отделяют центрифугированием и отбрасывают. Надосадочный раствор подщелачивают едким натром и при перемешивании прибавляют реактив Фелинга (3,5% сульфата меди, 5% едкого натра, 1,7% соли Рошелле), пока его избыток не обнаружится по окрашиванию надосадочного раствора. Комплекс после неоднократного промывания водой, нагретой до 40°, суспендируют в 670 мл воды и разлагают, медленно прибавляя при механическом перемешивании концентрированную соляную кислоту. Когда весь комплекс растворится, прибавляют небольшой избыток кислоты и профильтрованный раствор выливают при перемешивании в 3 объема спирта. Отфильтрованный полимер промывают спиртом, опять растворяют в 1,4 л воды, а затем осаждают 3 объемами спирта. Выход неочищенного маннана 74 г. Его растворяют в 460 мл воды и прибавляют 139 мл ледяной уксусной кислоты и 5 г активированного угля. После непродолжительного перемешивания (несколько минут) суспензию центрифугируют и надосадочный раствор выливают при перемешивании в 2 л спирта. Выделенное твердое вещество обрабатывают тем же способом еще два раза. После растирания со спиртом маннан высушивают в вакууме над фосфорным ангидридом; выход 45 г,  $[\alpha]_D^{25} + 89^\circ$  (с 0,23 в воде). Содержание углеводов измеряют, как и для гликогена, полным гидролизом до D-маннозы<sup>1</sup>, которую определяют с реагентом Шомодьи по модифицированному методу Перта и Уилана. Для полного проявления восстанавливающей способности D-маннозу нужно нагревать с реагентом Шомодьи 50 мин. Хроматография на бумаге [15, 16] полностью гидролизованного образца маннана обнаруживает присутствие следов вещества, движущегося с той же скоростью, что и глюкоза (растворитель: бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5, проявитель: нитрат серебра и едкий натр [17]).

<sup>1</sup> Необходима поправка на потерю D-маннозы за счет ее деструкции кислотами. Эта потеря составляет 2 и 3% соответственно, если D-маннозу нагревают в условиях полного кислотного гидролиза маннана (1,5 н. серная кислота, 4 и 6 час при 98°).

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Errera G., *Compt. Rend.*, **101**, 253 (1885).
2. Salkowski E., *Ber.*, **27**, 3325 (1894).
3. Zechmeister L., Toth G., *Biochem. Z.*, **270**, 309 (1934); **284**, 133 (1936).
4. Salkowski E., *Ber.*, **27**, 497, 925 (1894).
5. Trevelyan W. E., Harrison J. S., *Biochem. J.*, **50**, 298 (1952).
6. Eddy A. A., *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B.*, **149**, 425 (1958).
7. Northcote D. H., *Biochem. J.*, **53**, 248 (1953).
8. Bell D. J., Northcote D. H., *J. Chem. Soc.*, **1950**, 1944.
9. Haworth W. N., Hirst E. L., Isherwood F. A., *J. Chem. Soc.*, **1937**, 784.
10. Peat S., Whelan W. J., Edwards T. E., *J. Chem. Soc.*, **1955**, 355.
11. Pirt S. J., Whelan W. J., *J. Sci. Food Agr.*, **2**, 224 (1951).
12. Somogyi M., *J. Biol. Chem.*, **160**, 69 (1945).
13. Peat S., Whelan W. J., Edwards T. E., *J. Chem. Soc.*, **1958**, 3862.
14. Peat S., Whelan W. J., Edwards T. E., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 29.
15. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 21, 395.
16. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 54.
17. Trevelyan W. E., Procter D. P., Harrison J. S., *Nature*, **166**, 444 (1950).

# Методы определения молекулярного веса

## Соотношение вязкость — молекулярный вес

Определение молекулярного веса амилозы и амилопектина с помощью характеристической вязкости<sup>1</sup>

С. Т. Гринсуд

### ВВЕДЕНИЕ

Из всех свойств растворов полимеров, которые связаны с молекулярным весом, вязкость наиболее легко поддается измерению. Важными количественными характеристиками вязкости являются удельная вязкость ( $\eta_{уд}$ )<sup>2</sup> и приведенная вязкость ( $\eta_{уд}/c$ )<sup>1</sup>. Поскольку полимеры не образуют идеальных растворов, приведенная вязкость зависит от концентрации. Приведенная вязкость, отнесенная к неопределенной концентрации, полученная при экстраполяции значений  $\eta_{уд}/c$  к  $c = 0$ , называется предельной приведенной, или характеристической, вязкостью  $[\eta]$ <sup>1</sup>:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{уд}/c)$$

Из определения  $\eta_{уд}$  следует, что  $[\eta]$  также можно выразить эквивалентным соотношением:

$$\bullet \quad [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} [(\ln \eta_{отн})/c]$$

Было показано, что характеристическая вязкость и молекулярный вес  $M$  связаны общим уравнением

$$[\eta] = KM^\alpha,$$

где  $K$  и  $\alpha$  — эмпирические константы для данной системы полимер — растворитель.

Таким образом, определение молекулярного веса по вязкости не является абсолютным методом и требует калибровки с помощью независимых определений. Значения  $K$  и  $\alpha$  получают следующим образом. Образцы полимера делят на фракции с узким распределением по молекулярным весам и определяют молекулярный вес каждой фракции<sup>3</sup>. Затем константы находят по графику зависимости  $\ln M$  от  $\ln [\eta]$ . Такая методика трудна и утомительна. Величины, полученные для компонен-

<sup>1</sup> В оригинале используется номенклатура ЮПАК:  $\eta_{уд}/c$  — «viscosity number»,  $[\eta]$  — «limiting viscosity number». В переводе использована более употребительная в русской литературе терминология:  $\eta_{уд}/c$  — приведенная вязкость и  $[\eta]$  — характеристическая вязкость.

<sup>2</sup>  $\eta_{уд} = (\eta_{отн} - 1) = (\eta/\eta_0) - 1 = (\eta - \eta_0)/\eta_0$ , где  $\eta$  и  $\eta_0$  — соответственно вязкость раствора и растворителя и  $\eta_{отн}$  — относительная вязкость.

<sup>3</sup> Следует использовать такой метод определения молекулярного веса, как светорассеяние, поскольку он дает величину средневесового молекулярного веса  $\bar{M}_w$ , к которой аппроксимируется величина средневязкостного молекулярного веса  $\bar{M}_\eta$ , т. е.  $\bar{M}_\eta \rightarrow \bar{M}_w$  при  $\alpha \rightarrow 1$ .

тов крахмала разными исследователями, не согласуются между собой. Используя указанное соотношение, не удается рассчитать *абсолютные величины молекулярных весов* (табл. 1). Однако само по себе измерение вязкости представляет наиболее удобный метод точного определения *относительных* величин. Таким путем, например, легко можно обнаружить незначительную деградацию. Это особенно хорошо видно на примере амилозы, полностью линейного полисахарида, для которого случайный разрыв одной связи на молекулу не обнаруживается химическими методами, хотя такой разрыв вызывает весьма значительное понижение характеристической вязкости. Поэтому измерение вязкости широко применяют при исследовании крахмала.

Т а б л и ц а 1

Вычисленные величины  $\bar{M}_w (\times 10^{-5})$  для различных значений характеристической вязкости

[ $\eta$ ]	Литература			
	1	2	3	4
	$\bar{M}_w \cdot 10^{-5}$			
100	2,4	3,5	2,3	1,6
200	4,8	7,2	5,7	3,4
300	7,2	11,8	9,7	5,2
400	9,6	16,3	14,1	7,1
500	12,0	21,0	18,9	9,1

Наиболее широко применяемыми и удобными растворителями для амилозы и амилопектина служат 0,5 или 1 *M* растворы едкого натра или кали. Использование щелочных растворов устраняет трудности, связанные с нестойкостью ее водных растворов: амилоза выпадает в виде нерастворимого осадка. Однако при применении щелочных растворов необходимо соблюдать меры предосторожности, исключающие возможность окислительной деградации (см. ниже).

В качестве растворителя свободных компонентов крахмала можно также использовать диметисульфид.

### Соотношение характеристической вязкости — молекулярный вес

При определении молекулярного веса по  $[\eta]$  используют концентрации, выраженные в граммах на миллилитр (*г/мл*), а не в граммах на 100 мл (*г/100 мл*).

**Амилоза.** Для расчета средневесового молекулярного веса  $\bar{M}_w$  были предложены различные соотношения.

Так, для определения  $\bar{M}_w$  по  $[\eta]$  в 1 *M* растворе едкого кали предложены следующие соотношения:

$$[\eta] = 8,4 \cdot 10^{-2} (\bar{M}_w), \quad (1)^1$$

$$[\eta] = 1,18 \cdot 10^{-3} (\bar{M}_w)^{0,89} \quad (2)$$

<sup>1</sup> Вычислено из исходного соотношения  $\bar{C}\bar{P}_n = 7,4 \times [\eta]$ , где  $\bar{C}\bar{P}_n$  — среднечисловая степень полимеризации, при допущении, что  $\bar{M}_w \approx 2\bar{M}_n$ .

и для определения  $\bar{M}_w$  по  $[\eta]$  в 0,5 *M* растворе едкого кали:

$$[\eta] = 8,50 \cdot 10^{-3} (\bar{M}_w)^{0,76}, \quad (3)$$

$$[\eta] = 1,44 \cdot 10^{-3} (\bar{M}_w)^{0,93}. \quad (4)$$

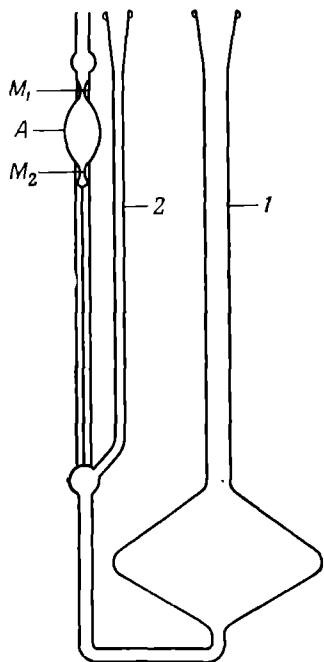
Как видно из табл. 1, величины  $\bar{M}_w$ , полученные из этих уравнений, заметно различаются.

Для определения  $\bar{M}_w$  по  $[\eta]$  в растворах диметилсульфоксида были предложены следующие соотношения:

$$[\eta] = 1,12 \cdot 10^{-3} (\bar{M}_w)^{0,87}, \quad (5)$$

$$[\eta] = 3,06 \cdot 10^{-2} (\bar{M}_w)^{0,64}. \quad (6)$$

**Амилопектин.** По характеристической вязкости амилопектина нельзя судить о размерах его молекул, заметные отличия в  $[\eta]$  появляются только у деградированных образцов. Никаких соотношений, связывающих  $\bar{M}_w$  амилопектина с  $[\eta]$ , не было найдено, хотя Керр и сотр. [5] сообщали о приблизительно линейной зависимости  $[\eta]$  от среднечисловой степени полимеризации  $(\overline{СП})_n$ , а именно  $(\overline{СП})_n = [\eta] \cdot 12$ .



Р и с. 1. Модифицированный вискозиметр Уббелюде.

бокового отвода, позволяет разбавлять раствор непосредственно в вискозиметре [6].

## МЕТОДИКА

### Аппаратура

Наиболее удобным прибором для определения характеристической вязкости компонентов крахмала служит капиллярный вискозиметр.

Рекомендуется прибор типа вискозиметра Уббелюде, которому следует отдать предпочтение перед приборами типа вискозиметра Освальда или Фенске. Капилляр этого вискозиметра (рис. 1) снабжен на конце боковым отводом; такое приспособление вносит поправку на кинетическую энергию (см. ниже). В вискозиметре такого типа давление, вызывающее истечение раствора через капилляр, не зависит от объема жидкости, а шарик, припаянный ко дну

### Теория

Можно показать, что абсолютная вязкость ( $\eta$ ), определенная в капиллярном вискозиметре, выражается уравнением

$$\eta = A \cdot d \cdot t - B \cdot d/t,$$

где  $d$  — плотность жидкости,  $t$  — время истечения данного объема,  $A$  и  $B$  — константы прибора, определяемые при калибровке,  $B \cdot d/t$  — поправка на энергию, сохраняющуюся в жидкости в связи с тем, что



жидкость вытекает из капилляра с конечной скоростью. Для вискозиметров с оптимальной, тщательно выполненной конструкцией поправка на кинетическую энергию может не приниматься в расчет [7]. Во всех прочих случаях поправку необходимо вносить.

Для каждого вискозиметра константы  $A$  и  $B$  можно определить, измерив время истечения  $t$  для двух или более аналитически чистых жидкостей с известной абсолютной вязкостью и плотностью, например для ацетона, бензола и  $n$ -бутанола (табл. 2). Приведенное выше уравнение можно записать иначе:

$$\eta/d \cdot t = A - B/t^2$$

При этом константы удобно определить из графика зависимости  $\eta/d \cdot t$  от  $1/t^2$ . Член  $B/t$  должен составлять незначительный процент ( $<0,1$ ) от  $A \cdot t$ .

Таблица 2

Абсолютная вязкость и плотность некоторых растворителей<sup>a</sup>

Жидкость		Температура, °C			
		20	25	30	35
Ацетон	Плотность, г/см <sup>3</sup>	0,7901	0,7845	0,7787	0,7729
	Вязкость, спз	0,323	0,308	0,293	0,279
Бензол	Плотность, г/см <sup>3</sup>	0,8788	0,8728	0,8681	0,8628
	Вязкость, спз	0,647	0,601	0,561	0,525
$n$ -Бутанол	Плотность, г/см <sup>3</sup>	0,8098	0,8062	0,8026	0,7990
	Вязкость, спз	2,80	2,27	2,27	1,97
Вода	Плотность, г/см <sup>3</sup>	0,9982	0,9971	0,9957	0,9941
	Вязкость, спз	1,005	0,894	0,801	0,723

<sup>a</sup> Значения вязкости взяты из «International Critical Tables».

Поскольку поправка на кинетическую энергию обратно пропорциональна времени истечения, вискозиметр, согласно нашему опыту работы, должен быть сконструирован так, чтобы время истечения растворителя составляло от 150 до 200 сек. Кроме того, в этом случае повышается точность измерения  $\eta_{уд}$  для данного раствора.

Если поправку на кинетическую энергию можно не принимать в расчет, то для растворителя и раствора соответственно  $\eta_0 = A \cdot d_0 \cdot t_0$  и  $\eta = A \cdot d \cdot t$ , где  $d_0$ ,  $d$  и  $t_0$ ,  $t$  — плотность и время истечения для растворителя и раствора. Следовательно, для разбавленных растворов, в которых  $c < 0,005$  г/мл,

$$\eta_{уд} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 = (A \cdot d \cdot t - A \cdot d_0 \cdot t_0)/A \cdot d_0 \cdot t_0 = (d \cdot t - d_0 \cdot t_0)/d_0 \cdot t_0 = (t - t_0)/t_0,$$

поскольку  $d \approx d_0$ . Таким образом,  $\eta_{уд}$  легко можно определить, зная два значения  $t$ .

Если необходимо ввести поправку на кинетическую энергию, используют следующее соотношение:

$$(\eta_{уд}/c)_{испр} = (\eta_{уд}/c)_{набл} \{[(t_0^2 \cdot A/B) + 1]/[(t_0^2 \cdot A/B) - 1]\},$$

где  $A$  и  $B$  — константы вискозиметра.

Для многих растворов полимеров наблюдаемая величина  $\eta_{уд}$  зависит от значений усилий сдвига, развивающихся в растворе. Усилие сдвига зависит от физических параметров вискозиметра, и, следовательно, наблюдаемая величина  $\eta_{уд}$  может зависеть от примененного прибора. В капиллярном вискозиметре средняя скорость сдвига  $\bar{G}$  определяется выражением

$$\bar{G} = 8V/3r^3t,$$

где  $V$  — объем жидкости, протекающей за время  $t$  через капилляр радиусом  $r$ . В настоящее время доказано, что вязкость высокомолекулярной амилозы зависит от скорости сдвига [2]. Поэтому усилия сдвига лучше определять и включать в публикации. В работе [8] описаны модифицированные капиллярные вискозиметры для исследования влияния усилий сдвига.

### М Е Т О Д И К А

При проведении вискозиметрических определений в первую очередь необходимо тщательно термостатировать прибор (продажный или собственного изготовления<sup>1</sup>) с точностью не менее  $\pm 0,05^\circ$ . Подставка прибора должна предусматривать установку вискозиметра в фиксированном, воспроизводимом вертикальном положении. В процессе работы все операции следует проводить в условиях, исключающих попадание пыли. Вискозиметр основательно очищают хромовой смесью, тщательно промывают профильтрованной дистиллированной водой и затем высушивают, споласкивая профильтрованным ацетоном с последующей продувкой профильтрованным воздухом. Все пипетки и сосуды для растворителей и растворов необходимо тщательно очистить и затем осушить растворителями, освобожденными от пыли.

В вискозиметр помещают минимальный рабочий объем жидкости, который с помощью пипетки аккуратно вводят непосредственно в шарик на колене 1 (см. рис. 1). Прежде чем начать измерение, дают установиться тепловому равновесию. Необходимое для этого время можно сократить, если перед измерением жидкости хранить в закрытых сосудах в термостате. Затем, придерживая пробку, которой закрыто колено 2, жидкость перемещают в шарик А, создавая для этого в колене 1 избыточное давление азота, профильтрованного через крупнопористый стеклянный фильтр. После того как движущийся вверх уровень жидкости пересечет риску  $M_1$ , избыточное давление сбрасывают и вынимают пробку из колена 2. В результате у конца капилляра создается «висящий уровень». После этого с помощью секундомера<sup>2</sup> измеряют время, в течение которого поток жидкости проходит от риски  $M_1$  до риски  $M_2$ . Необходимо сделать по крайней мере три измерения. Практически воспроизводимость отсчетов должна составлять 0,1 сек.

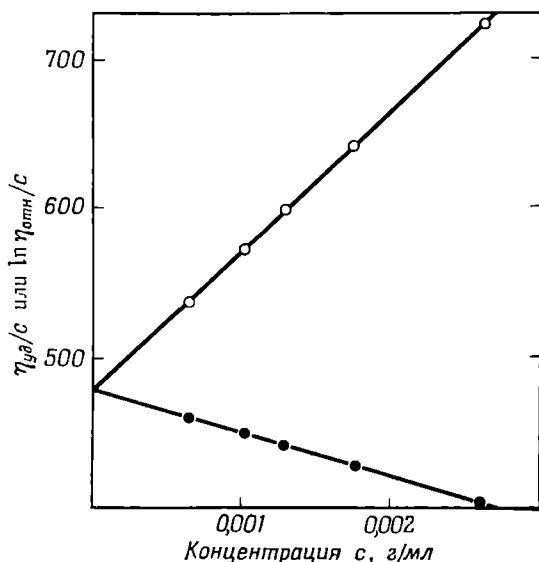
Для получения серии концентраций можно использовать два метода (рабочий объем в обоих случаях составляет 10 мл).

<sup>1</sup> Для определения вязкости водных растворов пригодны вискозиметры со следующими размерами: капилляр длиной  $\sim 12$  см и диаметром  $\sim 0,05$  см; объем шарика для растворителя  $\sim 4$  мл; объем шарика для разбавления  $\sim 50$  мл; рабочий объем 10—15 мл; время истечения растворителя 150—200 сек.

<sup>2</sup> Следует использовать секундомер с циферблатом на 10 сек, позволяющий вести отсчет с точностью до 0,05 сек. Секундомер предварительно выверяют и далее работают при сравнимом состоянии завода ведущей пружины.

А. В вискозиметр помещают 10 мл раствора и измеряют время истечения. Затем прибавляют растворитель порциями по 5 мл и для каждого разбавления измеряют время истечения. (Растворитель с помощью пипетки вводят в колено 1, следя за тем, чтобы жидкость попадала непосредственно в шарик. Раствор перемешивают, осторожно продувая через колено 2 слабый ток азота.)

Б. В вискозиметр помещают 10 мл растворителя и измеряют время истечения, после чего прибавляют две порции по 4 мл раствора полимера и для каждой концентрации измеряют время истечения.



Р и с. 2. Типичный график для определения характеристической вязкости амилозы в щелочном растворе.

График показывает зависимость  $\eta_{уд}/c$  от  $c$  (○) и  $\ln \eta_{отн}/c$  от  $c$  (●).

Преимущества второго метода состоят в том, что при этом каждый раз определяется время истечения растворителя. Кроме того, он более удобен для получения последовательности концентраций, взятых через один и тот же интервал.

Определения для 4—5 разбавлений могут быть сделаны в течение часа. Для каждого разбавления определяют  $\eta_{уд}$ ,  $\eta_{уд}/c$ ,  $\ln \eta_{отн}$  и  $\ln \eta_{отн}/c$ . Значение  $[\eta]$  находят по двоиному графику в координатах  $\eta_{уд}/c$  —  $c$  или  $\ln \eta_{отн}/c$  —  $c$  (рис. 2).

**Приготовление растворителей.** Раствор едкого кали (1 или 0,5 М) готовят из аналитически чистого реагента и тщательно фильтруют через пористый стеклянный фильтр № 4. Выполненный целиком из стекла удобный в применении прибор показан на рис. 3. Щелочь фильтруют повторно с осторожным отсасыванием через боковой отвод до тех пор, пока в пробе после встряхивания в пробирке при рассмотрении на прямом свете не будет видно пылинок.

Диметилсульфоксид высушивают, встряхивая с окисью кальция по крайней мере в течение 24 час, и перегоняют в вакууме в аппаратуре, целиком собранной из стекла. При перегонке отбирают среднюю фрак-

цию. Растворитель хранят в колбе, закрытой стеклянной пробкой, в эксикаторе над безводным хлористым кальцием [3].

*Приготовление растворов амилозы.* Для приготовления щелочного раствора рекомендуется по возможности использовать амилозу в виде комплекса с *n*-бутанолом. Избыток *n*-бутанола можно удалить центрифугированием комплекса. За 5 мин при  $\sim 1000\text{ g}$  1 мл комплекса дает  $\sim 25\text{ мг}$  амилозы. При прибавлении щелочи комплекс мгновенно растворяется. Измерение можно производить сразу же после осторожного фильтрования раствора под небольшим давлением азота через пористый стеклянный

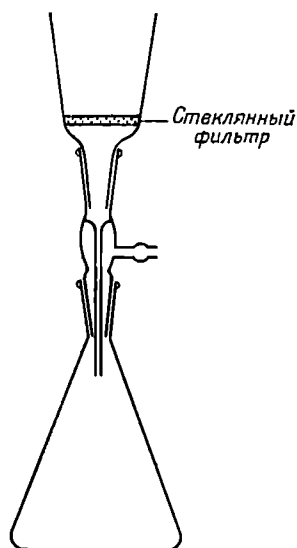


Рис. 3. Прибор для обеспиливания щелочных растворов, целиком выполненный из стекла.

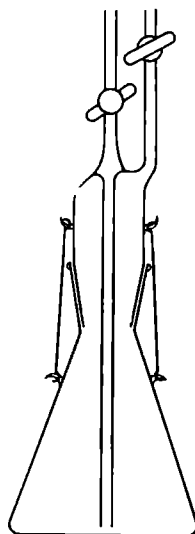


Рис. 4. Прибор для диспергирования амилозы в атмосфере азота, целиком выполненный из стекла.

фильтр № 4. В дальнейших предосторожностях для предохранения от контакта с кислородом нет необходимости, поскольку измерения можно полностью закончить в течение часа.

Обезвоженные образцы амилозы не могут растворяться в щелочи с достаточной легкостью; в этом случае необходимо перемешивание в атмосфере азота. Для этого удобна колба, показанная на рис. 4. Перед прибавлением образца через щелочь в течение 15 мин пропускают ток азота, после прибавления амилозы азот пропускают еще в течение 15 мин, затем краны закрывают и содержимое колбы перемешивают с помощью магнитной мешалки до полного растворения. Полученный раствор фильтруют, как описано выше.

Раствор амилозы в диметилсульфоксиде можно приготовить следующим образом. Смесь образца и растворителя оставляют в закрытом стеклянной пробкой сосуде, помещенном в эксикатор над безводным хлористым кальцием, до практически полного растворения [3]. Иногда необходимо кратковременное перемешивание магнитной мешалкой для полного диспергирования. Раствор быстро фильтруют через пористый стеклянный фильтр, предохраняя от влаги воздуха.

Концентрации растворов следует подбирать таким образом, чтобы вискозиметрические измерения можно было выполнять в интервале концентраций  $\sim 0,0003$ — $0,003$  г/мл.

*Приготовление растворов амилопектина.* Амилопектин легче всего растворяется в лиофилизованном состоянии; другие способы выделения обычно приводят к плохо растворимым продуктам. Щелочные растворы готовят перемешиванием в атмосфере азота, а растворы в диметилсульфоксиде — путем выдерживания смеси без доступа влаги, как описано выше.

Вискозиметрические определения следует производить с растворами концентрации порядка  $0,0005$ — $0,005$  г/мл.

*Определение концентрации щелочных растворов.* Амилозу и амилопектин можно высушить, нагревая в вакууме при  $70^\circ$  в течение 24 час, и затем непосредственно взвесить с соблюдением мер предосторожности, необходимых при работе с гигроскопичными веществами. Тем не менее такая методика трудна, и высушенный этим путем полисахарид не всегда растворяется полностью, вследствие чего часть вещества может быть потеряна при фильтровании. Поэтому удобнее определять концентрацию растворов по окончании вискозиметрических измерений путем гидролиза алиquotной части раствора до D-глюкозы с последующим определением восстанавливающего сахара. Разумеется, такая процедура обязательна при непосредственном использовании комплекса амилозы с *n*-бутанолом. Рекомендуется метод определения восстанавливающего сахара с помощью щелочного феррицианида [9].

Определение следует выполнять трижды. Алиquotные части раствора, содержащие до 3 мг полисахарида каждая, отбирают пипеткой в пробирки, снабженные пришлифованными стеклянными пробками, нейтрализуют 0,5 М серной кислотой, прибавляют еще по 1 мл 1,5 М серной кислоты, после чего пробирки закрывают. Полисахарид гидролизуют нагреванием на кипящей водяной бане в течение 2 час. Охлажденные пробы нейтрализуют 1 М раствором едкого кали, используя в качестве индикатора 2 капли бромкрезолового зеленого. Каждый раствор разбавляют до объема  $\sim 10$  мл дистиллированной водой, прибавляют 2,5 мл 0,2 М раствора карбоната натрия и 2,5 мл 0,05 М раствора феррицианида калия и пробирки вновь помещают в кипящую водяную баню на 15 мин. После этого пробирки погружают в холодную воду на 5—10 мин, к охлажденной пробе приливают 5 мл 2,5 М серной кислоты и две капли индикатора ксиленцианол FF и титруют 0,01 М раствором сульфата церия. В точке перехода цвет титруемой смеси меняется от желто-зеленого до буровато-желтого.

Расход реагента в холостом опыте должен составлять  $\sim 0,1$  мл, а разброс результатов не должен превышать  $\pm 2\%$ . Для построения калибровочной кривой подготавливают серию стандартных растворов растворимого крахмала фирмы «AnalaR», содержащих от 0,5 до 3,0 мг крахмала, и с каждым раствором проводят все описанные выше операции, включая титрование сульфатом церия. Полученные результаты наносят на график в координатах расход сульфата церия (мл) — содержание крахмала (мг). В повторном калибровании нет необходимости, так как сульфат церия легко можно стандартизовать по соли Мора.

*Определение концентрации растворов в диметилсульфоксиде.* Концентрацию амилозы в этом растворителе можно определить с помощью измерения оптического вращения [3];  $[\alpha]_D^{25} + 171^\circ$ .

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cowie J. M. G., Greenwood C. T., J. Chem. Soc., 1957, 2862.
2. Cowie J. M. G., Makromol. Chem., 42, 230 (1961).
3. Everett W. W., Foster J. F., J. Am. Chem. Soc., 81, 3459, 3464 (1959).
4. Husemann E., Burchard W., Pfannemüller B., Werner R., Stärke, 13, 195 (1961).
5. Kerr R. W., Cleveland F. C., Katzbeck W. J., J. Am. Chem. Soc., 73, 111 (1951).
6. Davis W. E., Elliott J. H., J. Colloid Sci., 4, 313 (1949).
7. Cannon M. R., Manning R. E., Bell J. D., Anal. Chem., 32, 355 (1960).
8. Schurz J., Immergut E. H., J. Polymer Sci., 9, 279 (1952); Fox T. G., Fox J. C., Flory P. J., J. Am. Chem. Soc., 73, 1901 (1951); Cragg L. H., Oene H., van, Can. J. Chem., 39, 203 (1961).
9. Lampitt L. H., Fuller C. H. F., Cotton L., J. Sci. Food. Agr., 6, 656 (1955); Banks W., Greenwood C. T., Thomson J., Makromol. Chem., 31, 197 (1959).

## Д и ф ф у з и я

Дж. Ф. Фостер

В любом неомогенном растворе, т. е. растворе, в котором имеется градиент концентрации, происходит диффузия и в отсутствие внешних сил система приходит в состояние, при котором концентрация делается всюду одинаковой. Коэффициент диффузии  $D$  определяется из первого закона Фика, согласно которому

$$\text{Поток} = c \frac{\partial x}{\partial t} = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1)$$

В этом уравнении описывается поток, проходящий через воображаемую плоскую площадку, перпендикулярную оси  $x$ , вдоль которой имеется градиент концентрации  $\partial c / \partial x$ . В системе CGS коэффициент диффузии имеет размерность  $\text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$ . Сочетание первого закона Фика с законом сохранения массы позволяет легко вывести второй закон Фика, связывающий изменение концентрации раствора в данном объеме во времени со второй производной концентрации по координате  $x$ :

$$\partial c / \partial t = D \partial^2 c / \partial x^2 \quad (2)$$

Коэффициент диффузии можно связать с химическим потенциалом растворенного вещества, определяемым выражением

$$\bar{F}_2 = F_2^\circ + RT \ln v_2 c_2 \quad (3)$$

Таким образом, движущей силой диффузии является отрицательный градиент химического потенциала, т. е.  $-(\partial \bar{F}_2 / \partial x)$ . Считая ускорение незначительным, эту силу можно приравнять произведению средней скорости переноса на коэффициент трения  $f$ :

$$\frac{\partial x}{\partial t} = -\frac{RT}{fc} \left( 1 + \frac{\partial \ln v_2}{\partial c} \right) \frac{\partial c}{\partial x} \quad (4)$$

Из уравнений (1) и (4) видно, что коэффициент диффузии  $D$  определяется выражением

$$D = \frac{RT}{f} \left( 1 + \frac{\partial \ln v_2}{\partial c} \right) \quad (5)$$

или для идеального раствора

$$D = RT/f \quad (6)$$

Зная коэффициент диффузии  $D$  и коэффициент седиментации  $S$ , можно определить молекулярный вес. Установить точное значение  $D$  относительно трудно, и до последнего времени эти значения определяются сравнительно грубо. Для этой цели используются два основных метода.

*Метод стационарного состояния* основан на интегрировании уравнения (1) (первый закон Фика). Измеряют скорость переноса растворенного вещества из одной камеры в другую через тонкую трубку или чаще через пористую стеклянную пластинку. Такой метод особенно удобен, если имеется чувствительный метод анализа растворенного вещества, например в случае ферментов. Но в целом эта группа методов не является абсолютной и требует калибровки с помощью веществ с известным коэффициентом диффузии.

*Метод свободно расплывающейся границы* основан на интегрировании уравнения (2) (второй закон Фика). Вначале создают резкую границу между раствором и растворителем и затем наблюдают расплывание границы во времени. Для случая идеальной диффузии градиент концентрации как функция времени и  $x$  определяется уравнением

$$\partial c / \partial x = \frac{c_0}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot e^{-x^2/4Dt} \quad (7)$$

Графически эта зависимость в любой момент времени  $t$  выражается гауссовской кривой с центром при  $x = 0$  (положение первоначальной резкой границы). Поскольку шлиреновская оптика в сущности прямо дает  $\partial c / \partial x$  как функцию  $x$ , именно такую систему обычно и применяют. Существует несколько различных методов оценки  $D$  по данным, получаемым при использовании шлиреновской оптики. Чаще всего коэффициент диффузии определяют из графика зависимости отношения высоты кривой к площади, ограничиваемой этой кривой,  $H_{\text{макс}}/A$  от  $\sqrt{t}$ . Наклон кривой определяет величину  $D$ .

Для растворов неоднородных веществ движение границы не будет описываться простой гауссовской кривой, а фактически представляет суммарный результат наложения таких кривых для каждого из компонентов. В этом случае достигается весовое усреднение коэффициента диффузии, и точное значение доли того или иного компонента зависит от применяемого метода анализа. Для неидеальных растворов  $D$  является функцией концентрации и, следовательно, зависит от  $x$ . В этом случае граница имеет искривленную форму. Таким образом, в принципе можно отличить эффекты, вызываемые неомогенностью раствора, от эффектов, связанных с неидеальностью раствора, хотя здесь нет непосредственной количественной интерпретации.

В последние годы были существенно улучшены способы измерения  $D$  за счет использования чувствительных оптических интерференционных методов. Сейчас в некоторых случаях можно определить  $D$  с точностью до четвертого или даже пятого знака. В то же время в связи с развитием

техники определения молекулярного веса другими методами [новые методики равновесия и подхода к равновесию в ультрацентрифугировании, светорассеяние (см. [2])] интерес к измерению коэффициента диффузии понизился. Пожалуй, в настоящее время наиболее важную роль измерение диффузии играет в исследовании эффектов взаимодействия в многокомпонентных системах, в изучении неидеальности растворов и т. д. Интерференционная оптическая техника позволяет проводить такие измерения.

Более подробные сведения можно найти в превосходном обзоре Гостинга [1], в котором изложены теория, экспериментальные методы и результаты, полученные этими методами. Особое внимание в обзоре уделено применению интерференционной оптики.

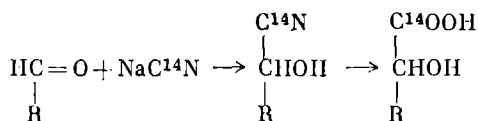
## ЛИТЕРАТУРА

1. Gosting L. J., *Advances in Protein Chem.*, **11**, 429 (1956).
2. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1964, vol. IV, p. 191.

## Определение восстанавливающих концевых групп

Реакции с цианидом, меченным  $C^{14}$

Г. С. Исбелл



## ВВЕДЕНИЕ

Микрометод определения восстанавливающих сахаров по реакции с цианидом натрия- $C^{14}$  [1] может быть с некоторыми модификациями применен для концевых восстанавливающих групп полисахаридов [2, 3]. Полисахарид в забуференном растворе обрабатывают цианидом натрия- $C^{14}$ , стандартизованным по реакции с D-глюкозой. Избыток цианида удаляют в виде синильной кислоты, а содержание  $C^{14}$  в остатке устанавливают, измеряя его радиоактивность. В предлагаемых условиях клинические декстраны и другие восстанавливающие полисахариды, устойчивые к щелочам, присоединяют цианид в количестве, строго эквивалентном числу присутствующих восстанавливающих концевых групп.

## МЕТОДИКА

### Определение восстанавливающих концевых групп клинического декстрана

Образец лиофилизованного декстрана, содержащий такое количество концевых групп, которое эквивалентно менее 0,0001 ммоль цианида натрия, помещают в небольшую взвешенную пробирку, открытый конец



которой оттянут с тем, чтобы ее потом можно было запаять. Образец высушивают при  $80^\circ$  и остаточном давлении 0,1 мм и взвешивают. Для контрольного опыта в такую же пробирку вносят водный раствор, содержащий 0,02 мг D-глюкозы, и воду испаряют током сухого воздуха. В каждую пробирку, в том числе и в пробирку для холостого опыта, добавляют одну каплю толуола и 100 мкл 0,0005 М раствора цианида натрия, меченного  $C^{14}$ , содержащего карбонат натрия. Применяемый цианид натрия должен содержать достаточное количество  $C^{14}$  ( $\sim 1$  мккюри), чтобы можно было получить удовлетворительные результаты при определении радиоактивности с помощью выбранного метода отсчета. Препараты цианида натрия, меченного  $C^{14}$ , обычно содержат немного гидроксида натрия. В используемом здесь реагенте щелочь переведена в карбонат натрия добавлением бикарбоната натрия. Пробирки запаивают в пламени горелки и выдерживают 10 дней при комнатной температуре. Затем их вскрывают, добавляют несколько капель 10%-ной муравьиной кислоты и раствор упаривают током воздуха под *хорошо действующей тягой*. Добавляют разбавленную муравьиную кислоту, чтобы удалить последние следы синильной кислоты, раствор упаривают еще 4 или 5 раз, измеряют радиоактивность тем или иным подходящим методом [4, 5] и вносят поправку, полученную из холостого опыта.

Общая радиоактивность прямо пропорциональна количеству концевых восстанавливающих групп в образце и удельной активности использованного цианида. Если в веществе содержится одна восстанавливающая концевая группа на молекулу, то его среднечисловой молекулярный вес определяется из соотношения

$$M_n = 180a_{\text{гл}}/a_{\text{д}},$$

где  $M_n$  — среднечисловой молекулярный вес декстрана,  $a_{\text{гл}}$  и  $a_{\text{д}}$  — активность, отнесенная к 1 мг D-глюкозы и декстрана соответственно.

Описанная методика, хотя она и проста, требует проведения реакции в течение продолжительного времени. В случае термостойких полисахаридов это время можно сократить до 18 час за счет повышения температуры до  $55^\circ$ . Концентрация цианида должна быть возможно более высокой, так как в сильно разбавленных растворах реакция может и не пройти до конца. Но работать с растворами декстрана большей концентрации, чем это здесь указано, неудобно, так как реакционная масса становится вязкой. Низкие значения молекулярного веса (присоединение большого количества цианида) получают в случае гликогена и других чувствительных к щелочам полисахаридов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 409.
2. Isbell H. S., Science, **113**, 532 (1954).
3. Moyer J. D., Isbell H. S., Anal. Chem., **30**, 1975 (1958).
4. Schwebel A., Isbell H. S., Moyer J. D., J. Res. Natl. Bur. Stds., **53**, 221 (1954).
5. «Liquid Scintillation Counting», C. G. Bell, Jr., and F. N. Hayes, Eds., Pergamon Press New York, N.Y., 1958.

## Определение восстанавливающих концевых групп с помощью периодатного окисления

*Дж. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит, А. М. Унрау*

### ВВЕДЕНИЕ

Определение концевых восстанавливающих групп в полисахаридах представляет собой дополнительный метод анализа концевых групп и расчета степени полимеризации (СП) полисахаридов.

Восстановление полисахарида боргидридом натрия [1] превращает остаток восстанавливающей концевой альдозы в остаток полиола, который при последующем периодатном окислении дает 1 мол. экв. формальдегида в том случае, если углеводная цепь связана с гидроксильными группами при С-2, С-5 или С-6 полиола, или 2 мол. экв. формальдегида, если в связи участвуют гидроксилы при С-3 или С-4 полиола. Метод определения восстанавливающих концевых групп [2] (ср. [3]), включающий восстановление, периодатное окисление и колориметрическое определение формальдегида реакцией с хромотроповой кислотой, был применен к олигосахаридам и полисахаридам.

Полисахарид растворяют в воде или разбавленной щелочи и обрабатывают боргидридом натрия до полного восстановления. Избыток боргидрида разрушают уксусной кислотой и восстановленный полисахарид окисляют периодатом натрия, отбирают аликвотные части раствора, обрабатывают их ацетатом или формиатом свинца для осаждения периодат- и иодат-ионов и формальдегид отделяют от окисленного полисахарида диализом. Было показано, что высокие концентрации полиальдегидов мешают проведению цветной реакции формальдегид — хромотроповая кислота, так что стадия диализа весьма существенна, особенно если выделяется относительно небольшое количество формальдегида [2]. Периодат- и иодат-ионы следует удалить осаждением [2] (ср. [4]), чтобы предотвратить появление мешающей окраски за счет выделения свободного иода в кислых условиях при проведении колориметрической реакции. Формальдегид затем определяют реакцией с хромотроповой кислотой [5].

Приведенное ниже определение степени полимеризации нерастворимого ламинарана (СП 17) иллюстрирует общую методику [2].

### МЕТОДИКА

Реактив для определения формальдегида [5] готовят следующим образом: растворяют 1 г хромотроповой кислоты в 100 мл дистиллированной воды, фильтруют и доводят до объема 500 мл 12,5 М серной кислотой (получена смешением 2 объемов концентрированной серной кислоты с 1 объемом воды).

Навеску образца полисахарида 56,3 мг растворяют в воде или, если необходимо, в разбавленном растворе щелочи. К раствору добавляют 30 мг боргидрида натрия и выдерживают примерно 48 час, пока не закончится восстановление. Избыток боргидрида разрушают уксусной кислотой, доводя pH раствора до 5,5. Раствор охлаждают до 5°, добавляют 5 мл 0,5 М раствора периодата натрия, после чего доводят объем до 25 мл. Окисление проводят в темноте, периодически отбирая аликвотные пробы по 2 мл; их переносят в пробирки и осаждают периодат добавлением 3 мл насыщенного раствора ацетата свинца. В пробирку помещают отрезок

трубки для диализа с 5 мл дистиллированной воды, эту систему оставляют на ночь для уравнивания. Концентрацию формальдегида в трубке для диализа определяют по реакции с хромотроповой кислотой, как описано ниже.

В центрифужные пробирки вносят аликвотные пробы диализата (1 мл), содержащие 1,5—8,0 γ формальдегида, и добавляют 10 мл реактива. Выпавший при этом сульфат свинца отделяют центрифугированием и образующиеся прозрачные растворы переносят в пробирки<sup>1</sup> (19 × 150 мм), нагревают 30 мин на кипящей водяной бане, защищая от света, охлаждают и измеряют поглощение при 570 мμ на спектрофотометре против раствора, полученного в холостом опыте.

Количество формальдегида определяют по калибровочной кривой, построенной с использованием вещества известного строения, например эритрита.

Средняя степень полимеризации ( $\overline{СП}$ ) вычисляется по формуле

$$\overline{СП} = \frac{Y(30 \cdot n)}{162X},$$

где  $Y$  — вес полисахарида, г;

$X$  — вес формальдегида (мол. вес 30), г;

$n$  — число молей формальдегида, выделившегося при окислении восстанавливающей концевой группы; так,  $n = 2$  для восстанавливающего звена, связанного в положении 3 или 4, и  $n = 1$  для восстанавливающего звена, связанного в положении 2, 5 или 6; 162 — вес мономерной единицы (ангидрогексоза), г.

Для пентогликанов в приведенную выше формулу вместо 162 подставляют 132. В случае гетерогликанов молекулярный вес рассчитывают из сопоставления с молекулярным весом полисахарида известного строения, который, как и исследуемый полисахарид, образует 1 или 2 моля формальдегида в зависимости от природы связей у восстанавливающей группы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Abdel-Akher M., Hamilton J. K., Smith F., J. Am. Chem. Soc., 73, 4691 (1951).
2. Unrau A. M., Smith F., Chem. and Ind. (London), 330 (1957).
3. Hough L., Perry M. B., Chem. and Ind. (London), 768 (1956).
4. O'Dea J. F., Gibbons R. A., Biochem. J., 55, 580 (1953).
5. MacFadyen D. A., J. Biol. Chem., 158, 107 (1945).

## Осмометрия в паровой фазе

Дж. ван Дем, В. Принс

### ВВЕДЕНИЕ

Определение молекулярного веса химического вещества в растворе можно в принципе осуществить, проведя достаточно чувствительное

<sup>1</sup> В зарубежных лабораториях колориметрические определения проводят непосредственно в пробирках, в наших лабораториях раствор из пробирок переливают в кюветы, в которых и ведут определение. — Прим. перев.

измерение какого-либо коллигативного (т. е. определяемого только количеством, а не природой молекул) свойства раствора [1]. Поскольку «подсчитывают» число молекул растворенного вещества, то если образец полидисперсный, как это имеет место в случае любого полимера, получают среднечисловое значение молекулярного веса.

Для соединений со среднечисловым молекулярным весом до 30 000 невозможно, по существу, использовать обычную осмометрию растворов из-за проницаемости мембраны для растворенного вещества. В этой области значений молекулярных весов обычно используют криоскопию, эбуллиоскопию или изотермическую перегонку [1] (см. стр. 406). Однако различные экспериментальные затруднения весьма часто ограничивают применимость этих методов. Криоскопия, например, обладает тем недостатком, что многие соединения становятся нерастворимыми до того, как будет достигнута температура замерзания раствора. Эбуллиоскопические определения обычно проводят при повышенных температурах, что может вызвать разложение растворенного вещества. Изотермическая перегонка, за исключением микрометода, требует затраты большого количества времени.

Осмометрия в паровой фазе представляет собой альтернативный метод, быстрый, требующий всего нескольких миллиграммов образца (вещество возвращается неизмененным) и в значительной мере не зависящий от условий. В этом методе, предложенном Хиллом [2] и усовершенствованном Болдсом [3], разность давления паров раствора и растворителя используется следующим образом. Каплю раствора и каплю растворителя помещают на два спая термопары и выдерживают в атмосфере, насыщенной парами чистого растворителя. Из-за пониженного давления пара раствора какое-то небольшое количество пара сконденсируется на капле раствора, повышая тем самым температуру капли и термоконтакта. Возникающая термо-э. д. с. измеряется гальванометром. По другому варианту капли помещают на поверхность термисторов, сопротивление которых зависит от температуры. Разность температур между двумя каплями в этом случае проявляется в разбалансировке мостика Уитстона, в который входят термисторы, и ее можно измерить.

Детальный обзор такого рода осмометрии в паровой фазе сделан недавно Симоном и Томлинсоном [4]. Промышленность уже сейчас выпускает приборы, позволяющие определить молекулярный вес в органических растворителях вплоть до  $M_n \approx 3000$  с точностью до 1%; верхний предел составляет  $M_n \approx 20\,000$ , точность измерения здесь  $\sim 10\%$ . При работе с водными растворами чувствительность приборов с термопарой или с термисторами гораздо ниже; так, для  $M_n \approx 500$  точность определения составляет 1%, верхним пределом является  $M_n \approx 3000$ , для которого точность измерения составляет 10%. Вполне эквивалентной заменой промышленным приборам может служить самодельный осмометр в паровой фазе, конструирование, разработка и ограничения при применении которого описаны здесь; он напоминает оригинальную конструкцию Болдса, и его можно собрать в лаборатории с небольшой затратой времени и средств. Чтобы проиллюстрировать основной принцип и указать путь к дальнейшему улучшению, приведем вначале некоторые общие расчеты конструкции.

## МЕТОДИКА

*Расчеты конструкции*

Понижение давления паров, обусловленное наличием растворенного вещества, в наиболее общем виде выражается следующим уравнением:

$$\frac{p_0 - p}{p_0} = v_1 \left[ \frac{c}{M_n} + Bc^2 + \dots \right], \quad (1)$$

где  $c$  — концентрация растворенного вещества, г/мл;  $M_n$  — его среднечисловой молекулярный вес;  $v_1$  — молярный объем растворителя;  $B$  — второй вириальный коэффициент, являющийся мерой отклонения от поведения идеального раствора;  $p$  и  $p_0$  — давление паров раствора и растворителя соответственно. Как только некоторое количество паров сконденсируется на капле раствора, теплота конденсации вызовет повышение температуры этой капли. Часть тепла будет потеряна за счет излучения, проводимости и теплообмена с окружающей средой.

Очевидно, что было бы выгодно как можно больше снизить потери тепла. Если бы такой потери тепла не было, то теоретическая разность температур  $(T - T_0)_{\text{теор}}$  между каплями раствора и растворителя выражалась бы уравнением Клаузиуса — Клапейрона:

$$(T - T_0)_{\text{теор}} = \frac{p_0 - p}{p_0} \cdot \frac{RT^2}{L}, \quad (2)$$

где  $L$  — молярная теплота конденсации растворителя. На практике некоторые потери тепла неизбежны, поэтому вместо указанного равновесия наступает стационарное состояние, при котором непрерывно теряется часть тепла, выделяющегося за счет конденсации. Чтобы получить высокую термо-э. д. с., следует использовать константан-манганиновую пару. Теплопроводность этих сплавов очень низка. Поэтому, если взять для термопары проволочку диаметром 0,005 см, большая часть потерь тепла будет происходить за счет теплопередачи через воздух и лишь незначительная часть — за счет проводимости проволочек. Разность температур между двумя контактами термопары определяется, как показали расчеты [5], уравнением

$$T - T_0 = \frac{(p_0 - p)/p_0}{d \ln p/dT + (RT/LDp_0) [\lambda + A]}, \quad (3)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии паров растворителя в воздухе при давлении  $p_0$ ;  $\lambda$  — теплопроводность воздуха и  $A$  — член, обусловленный теплопередачей через проволочки термопары; он зависит от геометрической формы, теплопроводности константана и манганина и изолирующего материала. Можно показать, что стационарное состояние, описываемое уравнением (3), обычно достигается за несколько минут [4]. В принципе, разумеется, экспериментально получаемая разность температур не должна оставаться постоянной, так как разбавление капли вследствие непрерывной конденсации ведет к снижению концентрации растворенного вещества и, следовательно, к уменьшению эффекта понижения давления паров. На практике, однако, этот фактор не следует принимать во внимание, так как для поддержания стационарного состояния нужно, чтобы сконденсировалось лишь совершенно ничтожное количество паров растворителя.

Чем ближе к единице отношение экспериментальной к теоретической разности температур, тем больше тепловая эффективность. При указанных выше размерах проволочек термопары эффективность равна примерно 0,65. Следует отметить, что величина  $A$  в уравнении (3) может быть того же порядка, что и  $\lambda$ , и поэтому этим членом нельзя пренебрегать, как это сделал Болде [3]. Только работая в вакууме или заменив воздух на водород, можно существенно увеличить эффективность до 90 %, что, однако, требует значительно более сложного аппаратного оформления.

С другой стороны, увеличения термо-э. д. с. можно добиться, используя ряд термоконтактов, соединенных последовательно, и помещая попеременно капли раствора и растворителя. Термобатарея в том виде, как ее предложил Хилл, совершенно неэффективна из-за очень большой потери тепла, обусловленной ее теплопроводностью (см. [3]). Если берут очень тонкие проволочки для термопары, то потери тепла за счет теплопередачи в проводах между каплями можно свести к минимуму. Действительно, можно вычислить [5], что разность температур между каплями раствора и растворителя, расположенных в наборе последовательно, та же, что и для удаленных друг от друга капель [см. уравнение (3)]. Это соблюдается, если длина проволочки между контактами превышает 0,5 см. Таким образом, можно прямо получить общую э. д. с., в  $n$  раз большую, чем при одной термопаре. В то же время, однако, происходит и увеличение электрического сопротивления. Достоверные данные при измерении э. д. с. можно получить, используя гальванометры высокой чувствительности, внутреннее сопротивление которых ( $R_r$ ) составляет  $\sim 50$  ом. Так как каждая термопара, изготовленная в соответствии с изложенными выше соображениями, имеет внутреннее сопротивление  $R_1$  порядка 20 ом, то измеряемое гальванометром напряжение  $V_n$  не будет в  $n$  раз больше напряжения  $V_1$ , возникающего в одном соединении, а будет связано с ним выражением

$$V_n = nV_1 \cdot \frac{R_r + R_1}{R_r + \frac{2n+1}{3} \cdot R_1} \quad (4)$$

В таком случае использование, скажем, более 5 термопар (т. е. 10 капель) не приводит к дальнейшему существенному увеличению измеряемого напряжения.

Для успешного определения небольшой разности температур, порядка  $0,001^\circ$ , очевидно, необходимо также поместить ячейку с каплями на контактах в хороший термостат. Требование постоянной температуры не является, однако, очень строгим, так как все контакты можно сгруппировать близко друг к другу, так что их температура будет повышаться или понижаться (в зависимости от отклонения температуры в бане) в совершенно одинаковой мере. Опыт показывает, что при рабочих температурах  $25-40^\circ$  достаточна точность термостатирования  $\pm 0,01^\circ$ .

### Аппаратура

Простая и удобная стеклянная ячейка осмометра изображена на рис. 1. Чтобы предотвратить загрязнение смазкой, все шлифы снабжены тефлоновыми пробками. Капли помещают на термоконтакты  $A$  с помощью длинной стеклянной трубочки через боковой отросток  $B$ . При этом ячейка может оставаться в термостате и тепловое равновесие быстро восстанавли-

ливается после введения капель. Фильтровальная бумага *В*, помещенная в жидкость и доходящая до дна, пропитана растворителем и обеспечивает постоянное давление пара, служащее для сравнения. Во время проведения опыта центральную стеклянную трубочку поворачивают так, чтобы находящиеся на ней термоконтакты были обращены к фильтровальной бумаге. Повернув центральную трубочку на  $180^\circ$ , сбрасывают капли в сток *Г*, откуда их потом можно удалить через трубку *Д*. Пробка *Е* изолирует ячейку во время проведения опыта.

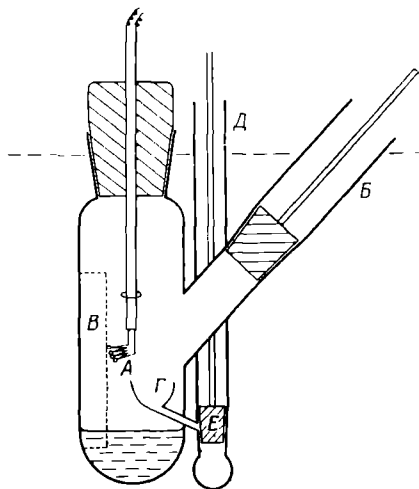


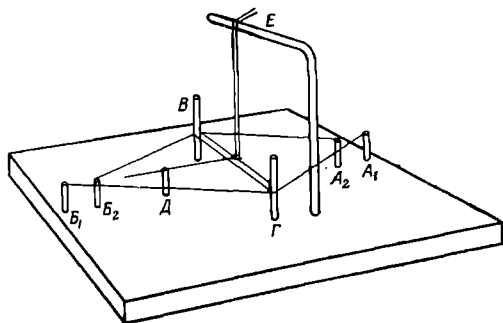
Рис. 1. Ячейка осмометра.

*А* — батарея термоконтактов, состоящая из двух последовательно соединенных термопар; *Б* — боковой отросток для введения капель; *В* — фильтровальная бумага, насыщенная растворителем; *Г* — сток для смывания капель; *Д* — трубка для удаления капель из резервуара, закрываемого пробкой *Е*.

На рис. 2 показано, как спаивают термоконтакты *А* из константан-манганиновых проволочек толщиной 0,005 см (по Болдсу). Спаи образуются на стеклянных палочках *В* и *Г* толщиной 1 мм. Манганиновую проволоку натягивают между опорными точками  $A_1 - Г - В - A_2$ . Две константановые проволочки с началом в  $B_1$  и  $B_2$  огибают стеклянные палочки *В* и *Г* соответственно и, проходя через надрезанное игольное ушко, закрепленное в *Д*, натягиваются в *Е*. После спайки в *В* и *Г* всю ненужную проволоку отрезают, оставляя только проволочки между *В*, *Г* и *Е*. Подобным образом можно изготовить любые требуемые многоконтактные батареи.

На рис. 1 изображена батарея из четырех контактов. Через центральную стеклянную трубку вводят большего (чем у проволочки термопары) сечения изолированную медную проволоку и спаивают ее у основания с тонкими константановыми проволочками системы термопар (*Е* на рис. 2). При работе с водными растворами рекомендуется для упрочнения конструкции и запаивания стеклянных трубок использовать эпоксидный клей. Капли водных растворов легко прилипают к петлям термоконтактов, однако капли органических растворителей не очень хорошо прилипают к металлу. Кроме того, под действием некоторых органических жидкостей эпоксидная смола может набухать. Поэтому для органических жидкостей следует применять другую батарею термоконтактов, скрепленную, например, силикатным цементом. Он не набухает в органических растворителях, и, что более важно, если тонким слоем цемента покрыть петли термоконтактов, но только так, чтобы совершенно не задеть проволочек, соединяющих эти петли, то к ним будут легко приставать капли органических жидкостей.

Электрические провода соединяют с высоко чувствительным гальванометром (см. предыдущий раздел) через переключатель с переменной полярностью. Использование такого переключателя позволяет исключить возникающие в местах соединений паразитические термо-э. д. с.



Р и с. 2. Растяжка проволочек для пайки термопар (по Болдсу [3]).

$A_1$ -Г-В- $A_2$  — манганин;  $B_1$ -Г-Е и  $B_2$ -В-Е — константан.

цепи: измеряют напряжение в обоих положениях переключателя и усредняют его. Так как переключатель может слегка нагреваться при работе, целесообразно залить его маслом, чтобы это тепло рассеивалось.

Помимо указанного, необходим термостат, отрегулированный, например, на  $30 \pm 0,01^\circ$ , с окошками для наблюдения.

#### Проведение эксперимента и калибровка

Перед проведением опыта на дно ячейки наливают слой растворителя и помещают капли растворителя и раствора на контакты. Если используются многоконтактные батареи, то, разумеется, следует обратить внимание, чтобы капли раствора и растворителя были помещены на чередующиеся контакты. Затем батарею поворачивают к пропитанной растворителем фильтровальной бумаге. Это надо делать каждый раз одинаково, поэтому лучше сделать отметки на центральной стеклянной трубке и тефлоновой пробке. Обычно примерно через 10 мин получают сходящиеся результаты отсчета. Тогда обращают полярность и снова снимают показания. Капли сливают в сток и на контакты наносят новые капли, но в обратном порядке, т. е. каплю раствора помещают на контакт, где в первом опыте была капля растворителя, и наоборот. Снимают показания гальванометра при обоих положениях переключателя полярности и результаты, полученные в этом и предыдущих опытах, усредняют. Такой прием позволяет исключить возможную асимметрию осмометра.

Поскольку приборы не являются идеальными и нет полной уверенности в строгой справедливости применения уравнения (3), необходима их калибровка по раствору с известным понижением давления паров. Для водных растворов подходящим стандартом служит сахараза; степень понижения давления паров растворами сахаразы низкой концентрации непосредственно следует из ее молекулярного веса [уравнение (1), если пренебречь вторым вириальным членом], более точно ее можно определить, зная активности растворов сахаразы [6]. Для растворов в органических растворителях, например бензоле или толуоле, можно использовать в качестве стандарта антрацен.



Другой метод работы, который, однако, требует больших количеств вещества (примерно 200 мг), состоит в следующем. Раствор с неизвестным давлением паров (неизвестен молекулярный вес растворенного вещества) помещают на дно ячейки и на половину контактов. На остальные контакты наносят капли раствора сравнения, меняя концентрацию выбранного стандарта, пока стрелка гальванометра не перестанет отклоняться. В этом положении давления паров равны и наступаст равновесное, а не стационарное состояние. Капли имеют ту же температуру, что и термостатированный раствор исследуемого вещества на дне ячейки, поэтому ни конденсации, ни испарения из капли раствора сравнения больше не происходит. Таким образом, нет и потерь тепла, которые надо было бы учитывать. Именно поэтому этот метод должен быть несколько более точным.

При применении любого из этих методов может возникнуть необходимость в проведении измерений для ряда концентраций с тем, чтобы провести экстраполяцию на бесконечное разведение и исключить отклонения от свойств идеального раствора [см. уравнение (1)]. Поправки эти, однако, обычно малы, если только не происходит ассоциации или диссоциации растворенного вещества.

### Чувствительность

Чувствительность осмометра в паровой фазе зависит не только от числа контактов, но и от ряда других факторов. Из уравнений (1) и (3) видно, что разность температур  $T - T_0$  пропорциональна молярному объему растворителя  $v_1$ . Поскольку  $v_1$  воды во много раз меньше  $v_1$  большинства органических растворителей, определение молекулярного веса в водном растворе будет гораздо менее точным, чем в растворе органического растворителя.

Можно провести приблизительный подсчет напряжения  $V_n$ , снимаемого с многоконтактной батареи, объединив уравнения (1), (3) и (4), где  $V_1 = E_1 R_T / (R_T + R_i)$  и  $E_1 = (T - T_0) \frac{dE_1}{dT}$ . Для константан-манганиновой термопары  $\frac{dE_1}{dT} = 42 \text{ мкВ}/^\circ\text{C}$ . В приведенной ниже таблице указаны

Напряжение  $V$  на гальванометре, снимаемое с термоэлектрического осмометра, при работе с 1%-ыми растворами веществ с возрастающим молекулярным весом. Точность отсчета гальванометра 0,003 мкВ,  $n$  — число термопар в батарее

$M_n$	Растворитель	$T - T_0, ^\circ\text{C}$	$V, \text{ мкВ}$		
			$n = 1$	$n = 2$	$n = 5$
500	Вода . . . .	0,00390	0,117	0,197	0,455
	Бензол . . .	0,02295	0,690	1,157	2,678
1 000	Вода . . . .	0,00195	0,059	0,098	0,228
	Бензол . . .	0,01147	0,344	0,578	1,339
5 000	Вода . . . .	0,00039	0,012	0,020	0,046
	Бензол . . .	0,00229	0,069	0,116	0,268
20 000	Вода . . . .	0,00010	0,003	0,005	0,012
	Бензол . . .	0,00057	0,017	0,029	0,067

некоторые значения разности  $T - T_0$  и  $V_n$  для 1%-ных растворов. Соответствующие измерения проведены на осмометре, описанном в этой статье; сопротивление гальванометра  $R_g$  50 ом, чувствительность 0,03 мкв, что отвечает отклонению в 1 мм по шкале на расстоянии 1 м.

### Обсуждение

Необходимо иметь в виду, что при применении осмометрии в паровой фазе, как и любого другого метода, основанного на коллигативных свойствах растворов, происходит отсчет *всех* молекул растворенного вещества. Примеси неорганических солей из-за диссоциации (в воде) и малых размеров по сравнению с размерами большинства органических молекул могут, следовательно, влиять на полученные результаты, поэтому их необходимо тщательно удалить. Правда, если количество примесей известно, можно ввести вычисленные поправки. Кроме того, хотя основной упор в этой статье делался на определение молекулярного веса, измеряемые характеристики являются, в сущности, осмотической активностью растворителя. Это может найти некоторое применение. При исследовании плазмы крови, например, часто не столько интересуются молекулярным весом растворенных веществ, сколько общей осмотической активностью.

Поскольку метод осмометрии в паровой фазе все еще находится в стадии развития, вполне вероятно, что чувствительность приборов можно еще увеличить. Мы уже указали на возможность использования многоконтактных батарей. Можно уделить внимание и проблеме гальванометра. Хотя этот прибор незаменим для такого рода работ, еще остается проверить, приведет ли усиление за счет соединения двух гальванометров [7] к увеличению чувствительности.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bonnar R. U., Dimbat M., Stross F. H., Number-Average Molecular Weight, Interscience Publishers, Inc., New York, N.Y., 1958.
2. Hill A. V., Proc. Roy. Soc. (London), **A127**, 9 (1930).
3. Baldes E. J., J. Sci. Instr., **11**, 223 (1934); *Biodynamica*, **46**, 1 (1939); **47**, 1 (1939).
4. Simon W., Tomlinson C., *Chimia (Aarau)*, **14**, 301 (1960).
5. van Dam J., *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **83**, 129 (1964).
6. Robinson R. A., Stokes R. H., *J. Phys. Chem.*, **65**, 1954 (1961).
7. Strong J., *Procedures in Experimental Physics*, Printice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1938, pp. 327, 444.

### Изотермическая перегонка

*Е. Т. Гринвуд*

### В В Е Д Е Н И Е

Изотермическая перегонка — один из немногих методов, которые можно использовать для измерения среднечислового молекулярного веса  $\bar{M}_n$  в пределах его значений 1000—20 000. Для химии полисахаридов этот интервал молекулярных весов имеет большое значение, так как

в него входят многие гемицеллюлозы. Сопоставление величин  $\bar{M}_n$  гемицеллюлоз с результатами химического анализа концевых групп необходимо, чтобы определить, является ли полисахарид линейным или разветвленным; и хотя точность метода изотермической перегонки не очень высока, она достаточна для этих целей.

Если два раствора с различной концентрацией растворенного вещества в одном и том же растворителе помещают вместе в замкнутую систему с постоянной температурой, будет происходить перегонка растворителя из раствора с низкой концентрацией в раствор с высокой концентрацией. Такая *изотермическая перегонка* представляет собой основу изопиестических методов, в которых перегонка длится до установления равновесия паров, и динамических методов, где измеряется только скорость перегонки.

Берджер [1] предложил очень простой изопиестический метод, заключающийся в том, что капли стандартного и неизвестного растворов втягивают в капилляр, разделяя их пузырьками воздуха. За поведением капель в горизонтальном капилляре наблюдают с помощью катетометра. В зависимости от давления паров капли сохраняют свой размер, уменьшаются или увеличиваются. Если используются стандартные растворы с набором концентраций, то с точностью до примерно 10% можно определить молярность того раствора, который будет изопиестичен неизвестному. Хотя этот метод и применяли для исследования нитратов крахмала [2], он дает более удовлетворительные результаты при работе с низкомолекулярными веществами ( $M < 1000$ ).

Клейссон [3] описал изопиестический метод, по которому растворы стандартного и исследуемого веществ в платиновых тиглях помещают в эксикатор, контролируя ход перегонки взвешиванием тиглей, но этот метод не был еще применен к полисахаридам.

Динамический метод Джи [4] успешно использовался в нашей лаборатории для самых разнообразных производных полисахаридов в различных растворителях. Конструкция прибора из стекла очень проста, но совершенно необходимо иметь термостатированную с высокой точностью ( $\pm 0,001^\circ$ ) баню.

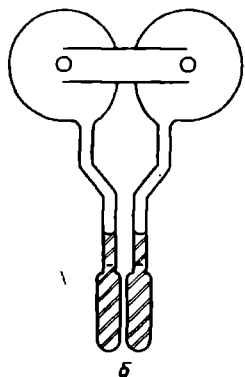
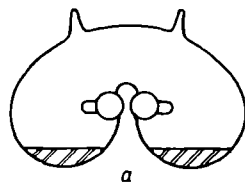
## МЕТОДИКА

### Прибор

Прибор состоит из двух шариков диаметром 3—4 см, соединенных короткой U-образной трубкой диаметром 2,5 см. Каждый шарик снабжен трубками для заполнения (рис. а) и к каждому из них перпендикулярно плоскости U-образной трубки присоединена измерительная трубка (изготовленная из стеклянной трубки со строго одинаковым по всей длине диаметром 3 мм), заканчивающаяся резервуаром объемом примерно 3 мл (рис. б), прямо над которым нанесена метка.

Прибор устанавливают в термостат на подвижную подставку так, чтобы его можно было бы поворачивать из положения а в положение б (см. рисунок).

Трубки для заполнения



Прибор для изотермической перегонки.

### Проведение опыта

Прибор устанавливают в положение *a* и в каждый шарик вводят равные объемы растворителя и раствора. Перед замораживанием в жидком азоте жидкости дают стечь в измерительные капилляры (положение *b*). Одну трубку для заполнения запаивают, а вторую оттягивают и подсоединяют через ловушку к масляному вакуумному насосу. Последовательным замораживанием в жидком азоте, откачиванием в течение 15 мин и подогреванием до комнатной температуры при пониженном давлении достигается тщательное удаление газов из обеих жидкостей. Эту операцию повторяют трижды, прежде чем запаить вторую трубку для заполнения. Затем прибор помещают в термостат в положении *a*.

Через 2 час, по достижении температурного равновесия, прибор поворачивают в положение *b* и дают растворителю и раствору стечь в измерительные капилляры. Так как неполное стекание приводит к значительным ошибкам, то перед тем, как произвести отсчет высоты уровня жидкости над меткой на трубке, следует выждать некоторое время, примерно полчаса. Отсчет нужно производить катетометром с точностью 0,001 см. После этого прибор поворачивают в положение *a* на определенное время, в течение которого происходит перегонка, затем возвращают в положение *b* и через полчаса проводят новое измерение уровня. Время между отсчетами следует выбрать таким, чтобы изменение высоты уровня было бы не менее 0,5 мм.

По полученным результатам строят графики зависимости падения уровня жидкости в трубке с растворителем и повышения уровня в трубке с раствором от времени и определяют скорости перегонки (мм/час). В идеальных условиях эти скорости должны быть равны.

### Расчет

Скорость перегонки  $R$  пропорциональна разности давления паров  $\Delta p$  в шариках. Было найдено, что

$$\Delta p/p = kR,$$

где  $\Delta p/p$  — относительное понижение давления паров, а  $k$  — эмпирическая калибровочная постоянная для данного прибора. Линейная зависимость сохраняется до  $\Delta p/p = 10^{-4}$  [4]. Из закона Рауля следует, что

$$kR = (w/m)/(w/m + W/M),$$

где  $w$  — вес растворенного вещества с молекулярным весом  $m$ , а  $W$  — вес растворителя с молекулярным весом  $M$ . Следовательно, молекулярный вес растворенного вещества находят непосредственно из значений  $k$ ,  $R$  и весовой концентрации раствора.

Поскольку реальный раствор отличается от идеального, необходимо провести определения при нескольких концентрациях раствора, построить график зависимости  $1/M_{\text{каж}}$  (где  $M_{\text{каж}}$  — кажущееся значение молекулярного веса, получаемое в эксперименте) от концентрации и экстраполировать на бесконечное разведение [5].

### Растворители и вещества для калибровки

В качестве растворителей можно использовать бензол, четыреххлористый углерод и 1,3-диоксалан. Хлороформ, как было найдено, дает большую ошибку, вероятно, вследствие фотохимического разложения.

Все растворители должны быть тщательно высушены перед использованием. Калибровка для любого растворителя проводится измерением скоростей перегонки растворов с различным молярным содержанием стандартного вещества (эквивалентного концентрации 0,5—2,5%). К веществам, пригодным для калибровки, относятся триолеин (мол. вес 885), тристеарин (мол. вес 891), ундекаацетаты раффинозы (мол. вес 966) и целлотриозы (мол. вес 966). Величина  $k$  должна быть измерена для растворов разных веществ различной молярности с точностью  $\pm 5\%$ , что определяет точность самого метода.

### Дополнительные факторы

Определение молекулярного веса данным методом длится долго, так как скорость перегонки обратно пропорциональна молекулярному весу, но затраты времени на манипуляции с прибором и снятие показаний невелики.

Как уже говорилось, низкомолекулярные примеси оказывают сильное влияние на коллигативные свойства растворов, поэтому растворители и исследуемые вещества необходимо *очень тщательно* высушить.

Теоретическому верхнему пределу метода соответствует молекулярный вес, равный примерно 20 000, но на практике лимитирующим фактором является строгий температурный контроль. Например, температурная зависимость давления паров бензола такова, что для измерения значений  $\Delta p/p$  до  $10^{-4}$  разность температур между обеими частями прибора допускается не более чем  $0,002^\circ$ . Весьма существенно поэтому хорошее термостатирование.

Этот метод был модифицирован Пареттом [5] для изопиестического определения молекулярного веса путем сравнения растворов неизвестного и известного веществ. К обоим растворам добавляют осушитель — сульфат кальция, и прибор непрерывно встряхивают для более быстрого достижения равновесия. Осушитель, однако, затрудняет стекание жидкостей в измерительные капилляры.

### Другие методы

Надо отметить, что следить за ходом изотермической перегонки растворителя можно и по повышению температуры, вызываемому конденсацией паров растворителя. На этом принципе основаны термоэлектрические методы. Характеристики приборов, применяемые при использовании таких методов, находят эмпирически, а сами приборы должны быть прокалиброваны. В первоначальных приборах теплота конденсации измерялась с помощью термоэлементов. Более точно это можно сделать с помощью термопар или термисторов. Если используют пару одинаковых термисторов, то один из них помещают в растворитель, второй — в раствор и включают их в цепь мостика Уитстона. При довольно несложной конструкции прибора точность измерения составляет 1%. Этот метод универсален; можно использовать и органические и водные растворы; измерения выполняются с малым количеством вещества. Единственная трудность метода заключается в необходимости поддержания строго постоянной температуры [6]. Термоэлектрический метод представляется многообещающим, тем более что промышленность выпускает необходимое оборудование. В настоящее время исследуется возможность применения этого метода к полисахаридам.

## ЛИТЕРАТУРА

1. B a r g e r G., J. Chem. Soc., 85, 286 (1904).
2. C a e s a r G. V., G r u e n b u t N. S., C u s h i n g M. L., J. Am. Chem. Soc., 69, 617 (1947).
3. C l a e s s o n C., Arkiv Kemi, 1, 81 (1949).
4. G e e G., Trans. Faraday Soc., 36, 1162 (1940).
5. P a r r e t t e R. L., J. Polymer Sci., 15, 447 (1955).
6. W i l s o n A., B i n i L., H o f s t a d e r R., Anal. Chem., 33, 135 (1961); T o m l i n s o n C., Mikrochim. Acta, 457 (1961).

## Электрофорез с подвижной границей

*Р. Л. Уистлер, К. С. Кэмпбелл*

### ВВЕДЕНИЕ

Электрофорез в ячейке Тизелиуса применяется для определения гомогенности полисахаридов [1—5] и для определения числа компонентов в смесях полисахаридов.

Полисахариды движутся в электрическом поле со скоростями, которые зависят от заряда молекулы, ее формы и молекулярного веса. Нейтральные полисахариды могут давать комплексы с боратым буфером [6] и приобретать таким образом заряд, который будет вызывать движение их молекул в электрическом поле.

### МЕТОДИКА

#### *Оборудование*

Раствор полисахарида помещают в U-образную прямоугольную ячейку для электрофореза, которая разделена на три секции таким образом, что ток жидкости через ее канал может быть прерван горизонтальным смещением центральной секции. При заполнении и монтаже ячейки раствор полисахарида помещают в ее нижнюю секцию. Одну часть центральной секции ячейки также заполняют раствором полисахарида, а другую — буфером, против которого предварительно был диализован исследуемый раствор. Буфер помещают также в верхнюю секцию ячейки и в сосуды, соединенные с верхней секцией.

При возвращении центральной секции ячейки в нормальное положение между раствором полисахарида и буфером образуется резкая граница. Для удобства наблюдения положение этой границы можно изменять в вертикальном направлении, прибавляя буфер в одну из склянок, соединенных с ячейкой. В ячейке поддерживают температуру 4°, при которой вода обладает максимальной плотностью, что сводит к минимуму конвекционные токи.

Смещение границы измеряют по фотографиям, сделанным через различные промежутки времени. Оптическое устройство работает по принципу регистрации изменения показателя преломления раствора в месте границы. Этот принцип иногда называют методом Шлирена. В новейших аппаратах для электрофореза использованы многочисленные модификации этого метода [7].

### Метод

Приготавливают 2%-ный раствор полисахарида в боратном буфере с рН 9,6 и ионной силой 0,097 [8] и диализуют его (см. стр. 299) против приблизительно 400 мл буферного раствора в течение 16—24 час.

Для отрицательно заряженных частиц полисахарида используют нормальное расположение полюсов прибора для электрофореза. Если применяются указанный буфер и ячейка для раствора полисахарида объемом 2 мл, то напряжение и силу тока подбирают так, чтобы их произведение приблизительно равнялось 0,9 *вт*. Для этого буфера такой результат достигается при напряжении ~145 *в* и силе тока 6 *ма*. Время, необходимое для разделения, колеблется в пределах от 45 *мин* до 2 *час*.

### Применение

Подвижность полисахарида вычисляют по формуле

$$\mu = \frac{d \cdot A \cdot K}{t \cdot I \cdot R \cdot m},$$

где  $\mu$  — подвижность, *см*<sup>2</sup>/*в*·*сек*;  $d$  — расстояние, пройденное границей, *см*;  $A$  — площадь поперечного сечения электрофоретической ячейки, *см*<sup>2</sup>;  $K$  — константа проводимости ячейки, *см*<sup>-1</sup>;  $t$  — время, *сек*;  $I$  — сила тока, *а*;  $R$  — сопротивление буфера, *ом*;  $m$  — коэффициент увеличения оптической системы. Подвижность, вычисленная по этой формуле, является константой для данного полисахарида в данном буфере.

Даже если полисахарид очищен до такой степени, что он дает один пик на диаграмме Шлирена, он все еще может представлять собой смесь, так как несколько полисахаридов могут обладать одинаковой подвижностью. Смена буфера помогает иногда выявить различия в полисахаридах со сходными подвижностями. Если для образца полисахарида наблюдается единственный пик в различных буферных растворах, вещество можно считать «электрофоретически гомогенным».

Другим важным показателем гомогенности вещества, движущегося как один пик, является испытание «обратного перемещения границы». Если пик соответствует одному гомогенному компоненту, изменение направления тока не вызовет обострения диаграммы Шлирена. Однако если пик образован гетерогенным материалом, такое изменение направления тока сделает его на диаграмме Шлирена более острым.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Colvin J. R., Cook W. H., Adams G. A., Can. J. Chem., **30**, 603 (1952).
2. Northcote D. H., Biochem. J., **58**, 353 (1954).
3. Foster A. B., J. Chem. Soc., 1953, 982.
4. Preece I. A., Hobkirk R., Chem. and Ind., (London), 257 (1955).
5. Lewis B. A., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3929 (1957).
6. Foster A. B., Newton-Hearn P. A., Stacey M., J. Chem. Soc., 1956, 30.
7. Longsworth L. G., Anal. Chem., **23**, 346 (1951).
8. Clark W. M., Lubs H. A., J. Bacteriol., **2**, 1 (1917).



## Приготовление и исследование пленок

*Э. Пассaglia, Р. Х. Мариссо*

### ВВЕДЕНИЕ

#### *Применение углеводных пленок*

Существует две различные области применения углеводных пленок. Первая включает изучение фундаментальных свойств молекул этих веществ классическими методами, такими, как дифракция рентгеновских лучей и инфракрасная спектроскопия. В этом случае пленка представляет собой просто удобный препарат с однородным распределением молекул по отношению к электромагнитному лучу. Эти экспериментальные методы могут дать сведения о конформации молекулы, связях между мономерами в полисахариде, о его кристаллической структуре, ориентации кристаллитов, двойном лучепреломлении и т. д. Для таких исследований необходимы пленки с одноосной или предпочтительно молекулярной ориентацией. Их приготовление описано в разделе «Ориентированные пленки» (стр. 417).

Упомянутые выше свойства молекулы углеводов обычно не имеют технического значения в том смысле, что их величины не включаются в торговую характеристику имеющихся в продаже пленок. Однако эти свойства составляют основную информацию, которую можно использовать для характеристики твердого состояния полисахарида в пленке. Организация твердого состояния, или текстура полисахаридных пленок, феноменологически определяет большинство их коммерчески важных свойств.

Оценка коммерчески важных свойств пленок и является второй областью их использования при исследовании. Хотя эти свойства можно связать со структурой молекулы полимера, обычно их рассматривают как характеристические для всего объема вещества, а не для индивидуальных молекул или молекулярных агрегатов. Объясняется это тем, что важными и удобными для измерения объемными свойствами материала являются только механическая прочность, проницаемость для паров, оптическая прозрачность и устойчивость к свету.

Наконец, показано, что полимерные пленки можно использовать для измерения ряда свойств, которые лучше описываются термодинамически. Главные из них — температура перехода в стеклообразное состояние, температура плавления, степень набухания в разных жидкостях и параметры взаимодействия полимер — растворитель.

#### *Характеристики углеводных пленок*

В отношении испытаний и научных исследований полисахаридные пленки можно разделить на две категории: поддерживаемые и неподдерживаемые. К последним относятся различные углеводные пленки и покрытия (на основе целлюлозы, альгината, амилозы), играющие заметную роль в технике. В эту же категорию включают большое число природных полисахаридных пленок, обладающих необычной «жесткостью», которые продуцируются бактериями, водорослями и другими морскими организмами. Все эти материалы обладают такими механическими свойствами, которые позволяют обращаться с ними так же удобно, как с листом бумаги.

Поддерживаемые пленки обычно хрупки, легко ломаются и не обладают необходимой жесткостью, чтобы выдержать обычную серию испытаний, обязательных для коммерческих пленок. Действительно, эта категория редко включает пленки, представляющие технический интерес, чаще всего это — вещества, которые переводят в состояние пленки, чтобы облегчить какие-либо измерения. Это могут быть даже низкомолекулярные углеводы, которые высушивают в форме стекловидной пленки на твердом носителе.

Неподдерживаемые пленки типичны для высокомолекулярных веществ. Средняя длина цепи  $\sim 75$ — $100$  мономерных единиц является, по-видимому, пределом, ниже которого следует получать поддерживаемые пленки. Разветвления цепи могут несколько повысить этот предел, а менее полярные производные, например метиловые эфиры, образуют пленки и при степени полимеризации 50. Механические свойства полисахаридных пленок обычно непрерывно улучшаются с увеличением длины цепи до величины порядка 300—500. Дальнейший рост этой величины вызывает незначительное изменение механических свойств, хотя может улучшать отдельные показатели, например сопротивление излому.

Благодаря большому количеству водородных связей полностью высушенные полисахаридные пленки тверды и хрупки, подобно резинам с высокой степенью поперечной сшивки. Присутствующая при нормальных условиях в количестве 5—10% вода производит ярко выраженное смягчающее действие. Однако для получения оптимальных механических свойств обычно необходимо добавить пластификатор в количестве 10—20%. Пластификаторами служат «молекулярные смазки»; они разрушают взаимодействие между молекулами полимера, что придает большую внутреннюю подвижность полимерным цепям. Хороший пластификатор должен обладать сродством к субстрату и низкой упругостью паров во избежание «утечки».

Оптическая активность природных и синтетических полисахаридов указывает на их стереорегулярность. Это свойство значительно увеличивает вероятность и степень кристаллизации. Действительно, целлюлозные мембраны водорослей, например *Valonia ventricosa*, имеют почти 100%-ную кристалличность [1], что находит отражение в их необычно высокой жесткости [2]. Некоторые производные полисахаридов и природные полисахариды, по-видимому, образуют типичные слоистые кристаллы [3, 4]. Полисахариды, регулярность строения которых нарушена присутствием нескольких различных моносахаридов, неоднородной этерификацией или разветвлениями, образуют пленки, практически лишенные кристалличности (по данным рентгенографического анализа) [5], хотя в них и остаются короткие упорядоченные участки [6]. В отсутствие пластификатора некристаллические области полисахаридных пленок можно рассматривать как находящиеся в стеклообразном состоянии. В этих областях в технически важных пленках присутствуют пластификаторы, придающие им резиноподобные свойства.

Все полисахаридные пленки чувствительны к воде, но благодаря ограниченному набуханию кристаллических областей существуют весьма большие различия в набухании при соприкосновении с водой. Низкая кристалличность способствует набуханию и растворению, поэтому химически гетерогенные или разветвленные полисахариды обычно растворимы в воде. Чувствительность к воде можно изменять в широких пределах с помощью поперечной сшивки, и этот путь действительно приобрел большое техническое значение в производстве синтетических волокон.

Некоторые растворимые в воде полиурониды переводят в нерастворимые пленки обработкой многовалентными катионами [7]. Наконец, разнообразных изменений растворимости полисахаридных пленок можно достигнуть с помощью получения производных. Так, например, низкая степень нерегулярного замещения ацетильными или метильными группами может сделать растворимой в воде даже целлюлозу [8].

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПЛЕНОК

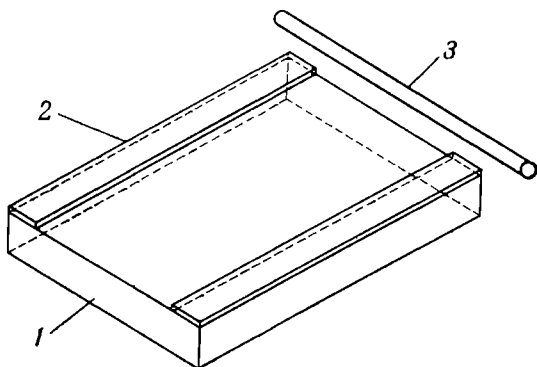
Различные лабораторные способы приготовления пленок основаны на промышленных процессах, разработанных первоначально для производства искусственных волокон, а позднее примененных и для получения пленок. К ним относятся «сухое прядение» — получение нити испарением растворителя, «мокрое прядение» — получение нити осаждением из раствора, «прядение из расплава» — получение нити продавливанием расплавленного полимера через отверстия. Первые два способа были впервые применены для производных целлюлозы, а третий был введен при производстве нейлона.

### *Испарение растворителя*

Это наиболее простой путь получения больших чистых и однородных по толщине пленок. Чтобы предотвратить растекание по поверхности,

Р и с. 1. Схематическое изображение прибора для получения полисахаридных пленок с использованием летучего растворителя. Раствор нужной концентрации наносят на пластинку и дают растворителю испариться. Толщина слоя определяется высотой краевых планок.

1 — стеклянная пластинка; 2 — краевые планки; 3 — стеклянная палочка для разравнивания.



на которой получают пленку, необходим довольно вязкий раствор. Концентрация имеет меньшее значение, хотя 3—5%-ная концентрация является обычно нижним пределом, а 20%-ная — чаще всего удовлетворительной. Частицы геля и загрязнения следует удалить фильтрованием или центрифугированием. В растворе также не должно быть пузырьков воздуха. Это достигается эвакуированием, центрифугированием или просто при стоянии раствора.

Хорошей поверхностью для нанесения обладает тяжелая стеклянная пластинка размером  $\sim 20 \times 38$  см. Идеальным прибором служит пластинка, снабженная снимающим ножом, движущимся по направляющим ребрам, хотя здесь имеется большая свобода для других решений. Так, например, на рис. 1 изображен вполне эффективный простой аппарат с ограничивающими планками вдоль краев пластинки и с тяжелой стеклянной палочкой для разравнивания. Для приготовления пленки вязкий раствор наносят на пластинку со снимающим ножом или стеклянной палочкой для разравнивания и дают растворителю испариться при комнатной температуре или в вентилируемом сушильном шкафу при тем-

температуре, достаточно далекой от температуры кипения растворителя, чтобы предотвратить образование пузырьков.

Пленки, полученные из производных полисахаридов, обычно легко отделяются от стекла, но пленки из самих полисахаридов иногда прилипают к нему чрезвычайно прочно. Эту трудность можно обойти, если пластинку предварительно обработать силиконовым разделяющим реагентом, например диметилдихлорсиланом. При необходимости к раствору полисахарида прибавляют пластификатор, который в этом случае будет равномерно распределен в образующейся пленке.

### Осаждение

Некоторые важные полисахариды, такие, как целлюлоза и хитин, растворимы только в водных растворах солей или специальных комплексобразующих растворителях, содержащих различные неорганические ионы. Эти вещества превращают в пленки с помощью коагуляции — очистки, обычного процесса получения нитей в производстве вискозы «мокрым» способом. Мы можем различать процесс «вискозного типа», в котором используется растворимость в щелочи частично замещенных ксантатов целлюлозы и который включает как регенерацию, так и коагуляцию, происходящие в осадительной ванне, и процесс, при котором осуществляется только коагуляция. В любом случае профильтрованный вязкий раствор наносят на пластинку, которую погружают в осадительную ванну с раствором, вызывающим быструю коагуляцию и способствующим удалению солей из получаемой пленки за счет осмоса. Удобными ваннами служат большие прямоугольные стеклянные кристаллизаторы.

Природа осадителя, естественно, зависит от примененного растворителя. Для большинства полисахаридов удовлетворительным растворителем служит 3—7%-ный раствор едкого натра, а хорошим осадителем — насыщенный раствор сульфата аммония. Наиболее прочными получаются пленки, обладающие минимальным объемом в первоначальном состоянии геля, поэтому желательно применять растворы полимера максимальной концентрации. Обычно осажденная пленка всплывает с поверхности стеклянной пластинки и легко может быть перенесена в промывную ванну и затем в ванну с водой. В заключение пленку высушивают на стеклянной пластинке или на специальной раме, чтобы предотвратить сморщивание.

Для полисахаридов, нерастворимых в щелочи, таких, как целлюлоза, очень хорошим растворителем является куприэтилендиамин [9]. В качестве осадителя применяют пропанол, а затем пленку промывают водой.

В случае осаждения обработку пластификатором обычно проводят на стадии окончательной промывки. Желаемый уровень пластификатора, обычно глицерина, достигается контролированием его концентрации в растворе, примененном для промывки. Иногда испарение растворителя и осаждение из раствора комбинируют, например, если пленку производного полисахарида, полученную первым способом, регенерируют в нативный полимер. Так, структуру полимера в твердом состоянии, отличающуюся очень низкой упорядоченностью, но превосходной прочностью и выносливостью, получают превращением линейных полисахаридов в пленки в виде ацетатов, испарением растворителя с последующим регенерированием под действием метилата натрия [10].

### Формовки

Производные полисахаридов обычно имеют четкие температуры размягчения или плавления. Если поместить порошкообразное вещество между слоями алюминиевой фольги на плиты лабораторного пресса, нагретые предварительно до этой температуры, то относительно легко можно получить тонкую прозрачную пленку. Для контроля за толщиной пленки можно пользоваться прокладками. Хотя совершенно сухие полисахариды редко обладают температурой размягчения, некоторые из них можно подвергнуть такой обработке, если добавить пластификатор. Это приводит к снижению температуры плавления. Благодаря своей растворяющей способности, вероятно, наиболее эффективным пластификатором служит вода. Если необходим пластификатор длительного действия, полимер обычно заранее смешивают с растворяющей его высококипящей жидкостью. Пластифицированный полимер можно затем обрабатывать в расплавленном состоянии при гораздо более низких температурах, а полученные пленки будут более гибкими. В случае необходимости пластификатор можно экстрагировать из пленки органическим растворителем. Изложенный метод особенно удобен для ацетилированных производных, температуры плавления которых близки к температурам разложения [11].

Высококristаллические полисахариды, такие, как целлюлоза и хитин, не подходят для описанного метода формовки. Однако их можно спрессовать в тонкие прозрачные пленки, если превратить предварительно в поддающиеся прессованию порошки путем размалывания или кислотного гидролиза. Под давлением порядка нескольких тонн на квадратный дюйм возникают относительные смещения отдельных фрагментов вдоль плоскостей излома между кристаллитами, в результате чего образуется компактный прозрачный диск.

### Разрезание

Часто разрезание дает пленки с хорошо выраженной молекулярной ориентацией относительно некоторой оси в образце; примером могут служить тангенциальные, радиальные и поперечные срезы древесины. Они особенно ценны для цитологических наблюдений и позволяют также определять важные параметры кристаллов и молекул (см. раздел «Исследование свойств пленок»).

Срезы толщиной 5—10 мк легко сделать обычным ручным микротомом. Если материал необычно тверд, его можно предварительно размягчить в кипящей воде или действием пара. В случае затруднений с приготовлением срезов следует обратиться к специальной литературе [12].

### Ориентированные пленки

Часто при практическом использовании углеводных пленок (см. раздел «Применение углеводных пленок») необходимы ориентированные пленки. Природные полисахариды часто находятся в этом состоянии, и простым наблюдением в микроскоп направления волокон можно определить направление молекулярной ориентации. Обычно природные полисахаридные мембраны имеют слоистые структуры, и пленки различной толщины можно получить погружением в разбавленную кислоту. Иногда соприкасающиеся слои имеют различную фибриллярную ориентацию,

но осторожное манипулирование анатомическими иглами дает мембраны с единственным направлением фибрилл. Толщина бактериальных мембран, образующихся на поверхности культуральной среды, определяется временем между инокуляцией и отделением полученной мембраны. Эти мембраны обычно имеют произвольную ориентацию фибрилл, но благодаря невысокому содержанию твердого вещества их можно легко перевести в состояние с предпочтительной фибриллярной ориентацией с помощью растяжения или прокатки [2].

Пленки полисахаридов, полученные осаждением из растворов, после окончательной промывки содержат от 100 до 1200 % воды. В этом состоянии их ориентируют простым растяжением и высушиванием в растянутом состоянии, хотя легкость деформации изменяется в широких пределах в зависимости от природы вещества и степени набухания. Последнюю можно подвергать значительным изменениям, поэтому наилучшие условия следует определять экспериментально. Осажденные из раствора гели полисахаридов трудно растянуть больше чем на несколько сотен процентов.

Состояние очень высокой степени растяжения и последующей ориентации достигается при гетерогенном дезацетилировании ацетильного производного, например в газообразном аммиаке при высоких температурах, как в хорошо известном процессе Фортизана. Поскольку ацетаты большинства полисахаридов очень удобно получать в состоянии растяжения в глицерине или силиконовом масле при 250—300° или под давлением пара, этот способ приготовления ориентированных полисахаридных пленок рекомендуется в первую очередь. Ацетилцеллюлозу со степенью замещения 2,5 [13] можно растянуть на 400—600 % в 3%-вом растворе фенола [14]. Дезацетилирование метилатом натрия дает исходный полисахарид с сохраненной ориентацией.

Метилированные производные и нитраты полисахаридов легко растягиваются при нагревании, но исходные вещества нельзя регенерировать без значительной деструкции. Пластифицированные полисахариды можно прокатывать в ювелирной роликовой мельнице [15]. Успех этого метода зависит от пластичности образца, поэтому желательно исследовать влияние содержания пластификатора. Этот метод дает часто образцы как с одноплоскостной, так и с диаксиальной ориентацией.

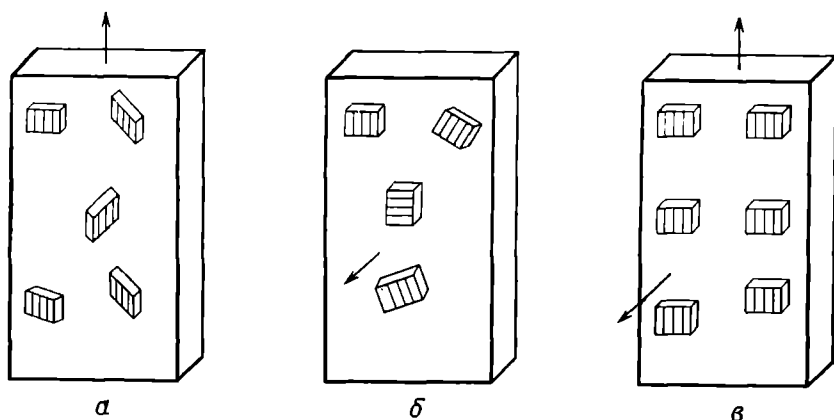
## *Исследование свойств пленок*

### **Молекулярные свойства**

*Дифракция рентгеновских лучей* (см. также [16]). Хотя в недавней работе показано, что даже мало упорядоченные или подобные жидкому состоянию полимеров можно интерпретировать с помощью дифракции рентгеновских лучей [17], метод наиболее пригоден для кристаллических полимеров. Рентгенограмма волокна дает сведения о конформации цепи, расстояниях между цепями, способах их упаковки и размерах кристаллической ячейки.

Дифракция рентгеновских лучей дает наибольший эффект при применении к ориентированным образцам. В случае полисахаридных пленок обычно встречаются три типа ориентации: произвольная, фибриллярная и одноплоскостная. Примеры двух последних ориентаций приведены на рис. 2.

При произвольной ориентации кристаллиты в пленке ориентированы совершенно случайно, как и следует из названия. При фибриллярной ориентации (этот тип ориентации обычно возникает за счет растяжения) одна ось кристаллитов, как правило, совпадающая с осью цепи макромолекулы, ориентирована в направлении растяжения. Неупорядоченность существует за счет поворотов около этой оси. При одноплоскостной ориентации ось кристалла перпендикулярна плоскости пленки, или, другими словами, одна из плоскостей кристалла параллельна поверхности пленки. Эта единственная ось, как правило, не является осью

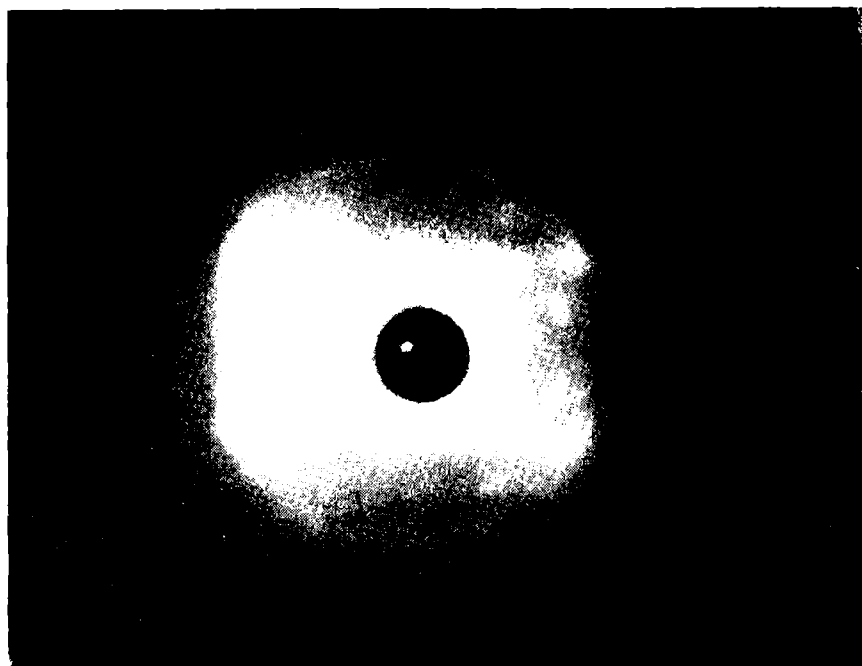


Р и с. 2. Графическое изображение (а) фибриллярной ориентации, (б) моноаксиальной ориентации и (в) комбинации фибриллярной и одноплоскостной ориентации. Маленькие параллелепипеды соответствуют кристаллитам, а линии — осям молекулярных цепей.

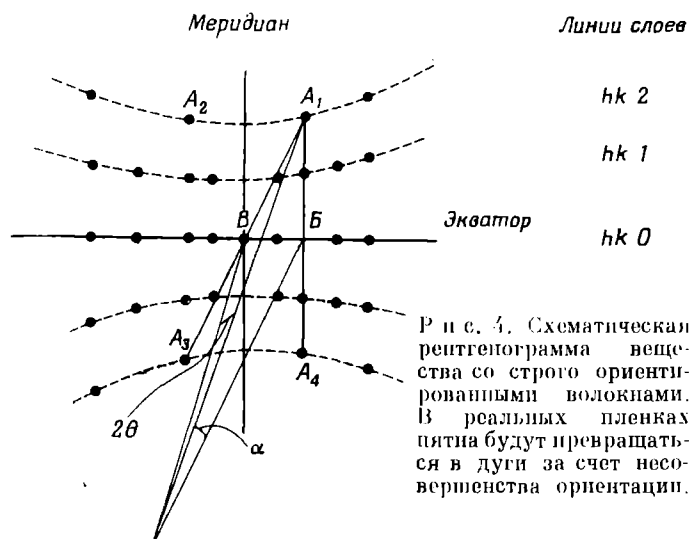
молекулярных цепей, и такая ориентация образуется обычно за счет анизотропного сжатия при высушивании из влажного состояния непосредственно после регенерирования. Например, пленки целлюлозы при таком высушивании уменьшаются главным образом в толщине, но не в длине или ширине, что приводит к ориентации этого типа. Тип ориентации, изображенный на рис. 2, в, является комбинацией двух последних случаев и приближается к абсолютной ориентации, характерной для одиночного кристалла. Для полисахаридных пленок никогда не удастся получить столь строгую ориентацию, как демонстрируется на этом рисунке. В действительности ориентация различных кристаллитов отклоняется от идеальной в большей или меньшей степени в зависимости от обработки, примененной для получения ориентированной пленки.

Как уже упоминалось, наиболее обычным типом ориентации является фибриллярная ориентация. Типичный пример рентгенограммы для пленки триацетата амлозы, растянутой в горячем состоянии и имеющей фибриллярную ориентацию, приведен на рис. 3. Диаграмма снята с использованием метода плоской пленки, и в дальнейшем все обсуждение в этой главе будет основано на результатах, полученных при применении этого прямого метода. Диаграмма, очень сходная с показанной на рис. 3, получилась бы при облучении монокристалла триацетата амилозы в направлении, перпендикулярном кристаллографической оси, совпадающей с молекулярной осью, при одновременном вращении кристалла около этой оси. Идеальная фибриллярная диаграмма состоит из резких пятен. Эти пятна

представляют собой дифракционные максимумы, соответствующие кристаллографическим плоскостям, которые вызывают избирательную дифракцию.



Р и с. 3. Рентгенограмма волокна триацетата амилозы после растяжения (300%) в глицерине при 170°. Направление волокна вертикальное.

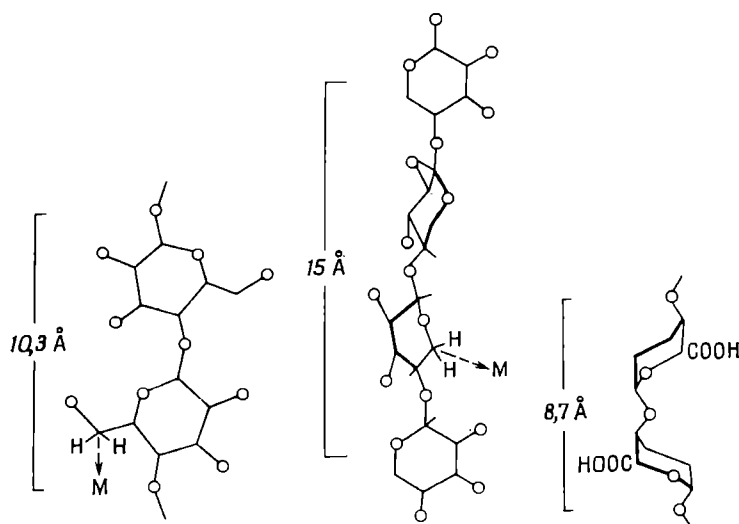


Р и с. 4. Схематическая рентгенограмма вещества со строго ориентированными волокнами. В реальных пленках пятна будут превращаться в дуги за счет несовершенства ориентации.

Рентгенограмму волокна можно рассматривать как состоящую из экваториальных, меридиональных рефлексов и рефлексов слоевых линий, как схематически показано на рис. 4. Каждая последующая слоевая



линия, считая от экватора, соответствует рефлексам с увеличенным миллеровским индексом, обычно  $l$ . Экваториальные рефлексy ( $l = 0$ ) соответствуют отрезкам, перпендикулярным осям волокон. Они особенно важны, так как позволяют непосредственно выяснить, каким способом упакованы расположенные параллельно молекулярные цепи. Такой же важный параметр выводят из меридиональных рефлексов, соответствующих плоскостям, пересекающим оси волокон под прямыми углами. Поскольку для кристаллов полимеров ось волокна, молекулярная ось и одна из кристаллографических осей (обычно обозначаемая  $c$ ) совпадают, «повторяющееся



Р и с. 5. Конформации цепей целлюлозы (ось второго порядка), ксилана [22] (ось третьего порядка) и альгиновой кислоты [35] (ось второго порядка). Эти данные получены из положения волокон и меридиональных рефлексов на рентгенограмме.

звено» волокна ( $I$ ) совпадает с повторяющимся отрезком молекулярной структуры вдоль цепи полимера. Так, меридиональные рефлексy в различных кристаллических полисахаридах выявляют значительные различия в конформациях основной цепи, что показано на рис. 5.

Хотя читателю следует обратиться к специальным руководствам [18] по полной расшифровке рентгенограмм волокон, мы все же приведем расчет повторяющегося звена волокна со ссылкой на обозначения рис. 4. С учетом геометрии кристалла, а также того факта, что волокно имеет цилиндрическое симметричное распределение кристаллографических осей относительно собственной оси, среди неэкваториальных рефлексов можно выбрать четыре эквивалентных пятна, например  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  и  $A_4$ . Повторяющееся звено можно рассчитать из этих четырех эквивалентных пятен на слоевой линии второго порядка с помощью уравнения

$$I = \frac{n\lambda}{\sin \alpha}, \quad (1)$$

где  $I$  — повторяющееся звено волокна,  $\lambda$  — длина волны рентгеновских лучей,  $\alpha$  — внешний угол конуса дифракции, а  $n$  — порядок слоевой линии ( $l = 1, 2, 3$ , и т. д.). Если при расчете использованы правильные

значения  $n$ ,  $I$  одинаково для всех слоевых линий. Можно показать, что

$$I = \frac{2\lambda (\overline{AC}^2 + \overline{OC}^2)^{1/2}}{\overline{AB}}. \quad (2)$$

Величина повторяющегося звена является одним из размеров элементарной ячейки; кроме того, эта величина может оказаться весьма полезной при доказательстве строения, как это было в случае целлюлозы.

Степень превращения пятен рентгенограммы в концентрические дуги служит мерой дезориентации упорядоченных областей относительно оси растяжения (оси волокна) [19]. Так, например, угловое отклонение олопковых микрофибрилл идентично азимутальному расхождению экваториальных дуг. Средняя ориентация упорядоченных областей относительно оси волокон непосредственно связана с асимметрией механических свойств ориентированных пленок.

Другой текстуральный параметр полимерных пленок — величина и форма упорядоченных областей. В том случае, когда величина таких областей не превышает  $\sim 1000 \text{ \AA}$  в некотором данном направлении, дифракционные пятна для соответствующих нормальных плоскостей становятся диффузными. Это так называемое «уширение линий» происходит в радиальном направлении от центра плоской пленки. Его легко измерить с помощью соответствующего денситометра и рассчитать по формуле

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}, \quad (3)$$

где  $D$  — размер частицы или ее диаметр в направлении, перпендикулярном семейству плоскостей, соответствующих измеряемой линии,  $\lambda$  — длина волны излучения,  $\theta$  — угол Брегга,  $K$  — константа, обычно принимаемая за 1,0. Уширение линии,  $\beta$ , полученное при экспериментальных измерениях, исправляют, вычитая фактор  $\beta_0$ , соответствующий ширине дифракционных пятен для образца с бесконечно большими кристаллами.

Для природных волокон целлюлозы найдено, что уширение рефлексов на экваторе много больше уширения на меридиане [19]. Из данных такого рода можно заключить, что кристаллиты природной целлюлозы больше  $500 \text{ \AA}$  в длину и имеют ширину около  $50 \text{ \AA}$ . Этот вывод был впоследствии исчерпывающе подтвержден электронномикроскопическими наблюдениями [20].

*Инфракрасная спектроскопия* (см. также [21]). Если получить полисахаридные пленки сравнительно легко, то простым способом выяснения природы инфракрасных полос является превращение доступных гидроксильных в OD-группы. Это приводит к исчезновению всех полос, обусловленных валентными и деформационными колебаниями абсорбированной воды и OH-групп, и к появлению новых полос поглощения, отвечающих колебаниям OD-групп. Неактивные атомы водорода, связанные с углеродными атомами, в этих условиях не обмениваются.

Для превращения OH-групп в OD-группы необходимо просто погрузить пленку в  $D_2O$ , находящуюся в закрытой ячейке с окнами из хлористого серебра, а затем высушить образец при пониженном давлении над пятиокисью фосфора. Пленку удерживают внутри ячейки с помощью стандартного пленочного держателя, который должен оставлять возможно большую поверхность пленки свободной для прохождения инфракрасного луча. Если образец способен легко набухать в парах воды или растворим в воде, замещение можно произвести, пропуская ток азота, насы-

щенного  $D_2O$ , через ячейку с пленкой. После дейтерирования образца ячейка не должна сообщаться с атмосферой, так как в пленках подходящей для инфракрасных измерений толщины ( $\sim 5$  мк) обратный обмен водорода в лабораторном воздухе проходит за несколько минут.

На рис. 6 показаны типичные полисахаридные спектры, в данном случае кислых ксиланов, до и после обработки парами  $D_2O$ . Большое изменение в поглощении при  $3400\text{ см}^{-1}$  связано непосредственно с фракцией доступных гидроксильных групп, а новая полоса при  $2500\text{ см}^{-1}$  обусловлена валентными колебаниями  $O-D$ . Полоса при  $1635\text{ см}^{-1}$ , исчезающая при дейтерировании, принадлежит абсорбированной воде;

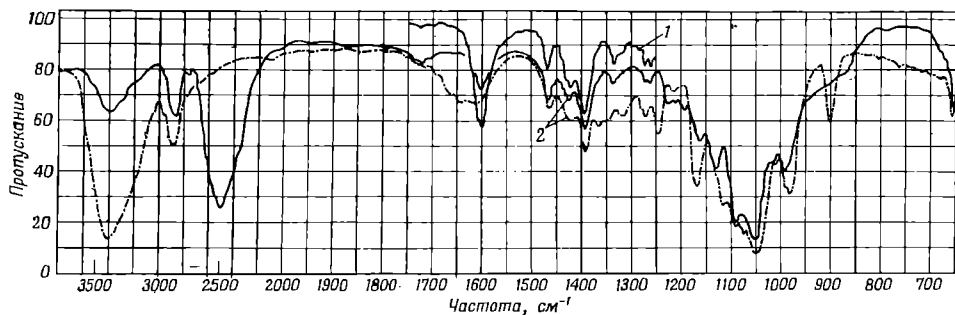


Рис. 6. Инфракрасные спектры солей 4-О-метилглюкуроноксиланов из белого вяза (1) и ваточника (2).

— до обработки парами  $D_2O$ ; — — — после обработки парами  $D_2O$ .

исчезновение деформационных колебаний  $O-H$  в интервале  $1475-1250\text{ см}^{-1}$  и сохранение четких полос при  $1470$ ,  $1380$  и  $1335\text{ см}^{-1}$  служит веским доводом в пользу отнесения этой группы полос к деформационным колебаниям  $C-H$  [22].

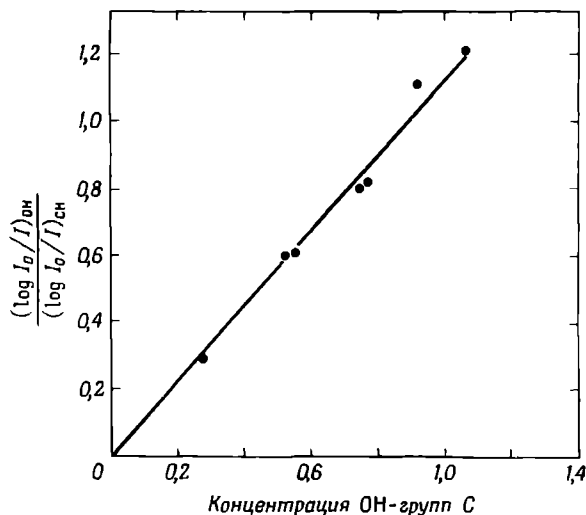
Манн и Мерримен [23, 24] превратили метод дейтерирования в полезный способ измерения доступности гидроксильных групп в целлюлозе, т. е. определения доли гидроксильных групп в данном образце, способных к обмену с атомами дейтерия тяжелой воды. Этот параметр имеет важное значение для механических свойств регенерированной целлюлозы. Метод применим только в том случае, если кристаллические области относительно недоступны для  $D_2O$ . Рассматривая области валентных колебаний  $O-H$  и  $O-D$  на спектре рис. 6, можно определить относительную доступность для разных образцов из отношения оптической плотности полосы  $O-D$  при  $2500\text{ см}^{-1}$  к оптической плотности оставшейся полосы  $O-H$  при  $3400\text{ см}^{-1}$ . Для перевода метода на абсолютную основу необходимо знать соотношение коэффициентов экстинкции  $k_{OD}/k_{OH}$ . Для целлюлозы это соотношение определено, и уравнение

$$\frac{(\log I_0/I)_{OD}}{(\log I_0/I)_{OH}} = \frac{k_{OD}C_{OD}}{k_{OH}C_{OH}} = 1,41 \frac{C_{OD}}{C_{OH}}, \quad (4)$$

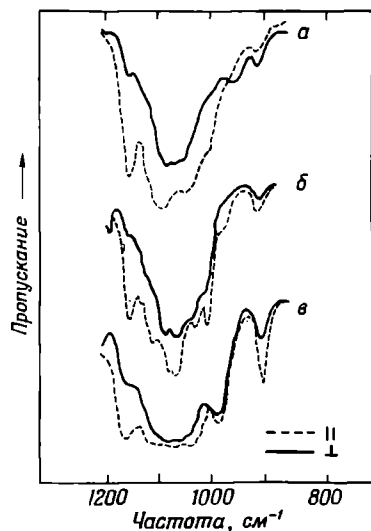
в котором  $C_{OD} + C_{OH} = 1$ , позволяет определять абсолютную доступность.

В случае аналитического использования полисахаридных пленок поступают так же, как при работе с порошкообразными веществами в таблетках с бромистым калием. Для определения некоторых функциональных групп, например нитратной группы в нитрате целлюлозы, при-

готовляют однородные пленки с такой толщиной, при которой исследуемая полоса поглощает 30—70% падающего излучения. Для образцов с высокой степенью нитрованности особенно удобна полоса О — Н-группы при 3 мк. Поскольку измерение толщины пленок затруднительно, лучше ввести внутренний стандарт, используя соотношение между полосами



Р и с. 7. Зависимость приведенного поглощения полосы валентных колебаний О — Н от концентрации гидроксильных групп в волокнах нитроцеллюлозы разных степеней нитрованности [4].



Р и с. 8. Поляризованные инфракрасные спектры дезацетилированного хитина (а), целлюлозы II (б) и ксилана (в) в области 1200—900  $\text{см}^{-1}$ . Во всех трех случаях виден сильный параллельный дихроизм полосы 1160  $\text{см}^{-1}$ .

О — Н и С — Н. Предполагая, что  $C_{СН}$  не зависит от содержания нитратных групп, из закона Бера получаем

$$\frac{(\log I_0/I)_{ОН}}{(\log I_0/I)_{СН}} = \frac{k_{ОН}C_{ОН}}{k_{СН}C_{СН}} = k \cdot C_{ОН}. \quad (5)$$

На рис. 7 приведен график этой зависимости по данным Куна [25]; линейность графика доказывает, что инфракрасная спектроскопия тонких пленок действительно может служить методом определения нитратной группы и других групп.

Одной из важнейших целей спектроскопии полимеров является получение сведений о конформации и ориентации цепей. Это достигается почти исключительно изучением дихроизма различных полос поглощения. Дихроизм проявляется только в ориентированных образцах полимеров и связан с ориентацией момента перехода  $M$  для данной колебательной частоты. Экспериментально определяется дихроическое отношение  $R$ :

$$R = \frac{D_{||}(\nu_0)}{D_{\perp}(\nu_0)}, \quad (6)$$

где  $D_{||}$  — оптическая плотность при длине волны  $\nu_0$  с направлением колебаний электрического вектора падающего поляризованного излучения, параллельным оси растяжения,  $D_{\perp}$  — аналогичная величина для

случая, когда ось растяжения повернута на  $90^\circ$  в плоскости пленки. Ряд недавних обзоров описывает относительно простые экспериментальные приемы [26, 27].

Полисахариды представляют собой плодотворную область для применения метода дихроизма. В случае полисахаридов с известной химической структурой, таких, как целлюлоза или хитин, дихроизм определенных частот можно точно предсказать, если из данных рентгеноструктурного анализа известна конформация цепей. Например, можно ожидать, что асимметричные валентные колебания группировки  $C-O-C$  будут проявлять сильный параллельный дихроизм [28]. Хотя предсказать точную частоту этого фундаментального колебания затруднительно, очевидно, что наблюдение дихроизма окажет существенную помощь в идентификации этой полосы поглощения. На рис. 8 показаны поляризованные спектры природной целлюлозы, дезацетилированного хитина и ксилана в области, где ожидаются частоты колебаний группы  $C-O-C$ . Обнаружение частоты асимметричных валентных колебаний  $C-O-C$  возможно на основании того факта, что одна из полос,  $1160\text{ см}^{-1}$ , проявляет сильный параллельный дихроизм во всех трех спектрах, как и следует ожидать на основании химического строения и рентгеноструктурных данных.

Дихроизм является наиболее прямым методом определения в молекулах полисахаридов конформации боковых групп, обладающих свободным вращением. Например, наблюдая дихроизм валентных и деформационных колебаний группы  $CH_2$  [28], можно приписать оксиметильным группам в кристаллах целлюлозы конформацию, показанную на рис. 5. Метод полезен также при морфологических исследованиях сложного растительного материала, такого, как древесина. Классические методы — двойное лучепреломление или дифракция рентгеновских лучей — непригодны для выяснения ориентации аморфных компонентов в таких комплексах. Измерение дихроизма на модельных пленках и на срезах древесины позволило легко установить, что многие так называемые гемицеллюлозы ориентированы параллельно микрофибриллам целлюлозы [29]. В случае ксиланов, например, это заключение основано на значениях  $R_{CH_2}$  (перпендикулярный дихроизм), полученных при измерениях радиальных срезов древесины. Это приблизительно соответствует ориентации момента перехода для группы  $CH_2$ , показанной стрелкой на рис. 5.

#### Объемные свойства

*Механические свойства.* По-видимому, наиболее важными объемными свойствами полисахаридных и вообще углеводных пленок являются их механические свойства. Из всех механических испытаний пленок, основным, несомненно, служит определение кривой напряжение — деформация. По этой кривой находят следующие важные параметры: исходный модуль, удлинение при разрыве, предел прочности при растяжении и энергию разрыва, или площадь под кривой напряжение — деформация. иногда называемую жесткостью.

Способы построения кривой напряжение — деформация для углеводных пленок такие же, как и для других материалов. Обычно используют прибор фирмы «Инстрон»<sup>1</sup>. Если материал доступен в значительных

<sup>1</sup> Выпускается фирмой «Инстрон Эндржиниринг Корпорейшн», Кантон, Массачусетс.

количествах, вырезают полосы размером  $2 \times 10$  см и находят кривую напряжение — деформация после измерения толщины пленки. Скорость растяжения чрезвычайно важна для резиноподобных материалов и не имеет большого значения в случае углеводных пленок; обычно она составляет 20 %/мин.

Весьма важным фактором при изучении углеводных пленок является влажность. Перед испытанием пленки следует выдерживать 24 час в определенных условиях. Нормальными условиями считаются температура 25° и 50 %-ная относительная влажность. Для изменения этих условий в широких пределах можно сконструировать закрытые камеры, через

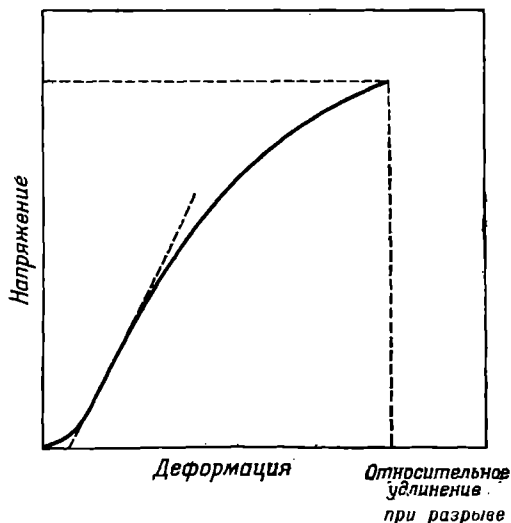


Рис. 9. Типичная кривая напряжение — деформация для полисахаридного материала. Небольшой первоначальный участок с выпуклостью вниз обусловлен удалением складок в относительно сухой пленке; в мокрых пленках он выражен более резко. Исходный модуль находят по наклону пунктирной линии.

которые циркулирует воздух с желаемой относительной влажностью, полученной уравниванием с растворами серной кислоты нужной концентрации.

Схематическая кривая напряжение — деформация для полисахаридов показана на рис. 9.

Исходный модуль определяют, проводя касательную к начальной части кривой напряжение — деформация, которая для углеводов обычно направлена выпуклостью вверх. Однако часто очень небольшой первый участок кривой направлен выпуклостью вниз и касается оси абсцисс. Это явление игнорируют, так как оно объясняется обычно удалением имеющихся на пленке складок. Для образцов, испытываемых при высокой влажности или даже мокрых, если углевод нерастворим (как, например, целлюлоза), особенно трудно определить первый участок кривой напряжение — деформация, так как кривые выпуклы книзу только на очень коротком отрезке. В таких случаях обычно экстраполируют в обратном направлении первый несомненно прямолинейный или выпуклый вверх участок кривой напряжение — деформация. Этот способ, хотя и не вполне удовлетворительный, все же является лучшим в большинстве случаев.

Конечно, весьма существенно знать ориентацию пленки, подвергаемой испытанию на разрыв. Эту ориентацию можно определить рентгенографическими методами. Однако в опытах по растяжению ориентированных пленок нас интересует измерение свойств как функции угла с главным направлением ориентации. Если рассматривать пленку между скре-

ценными поляроидами, то погашение будет происходить в тех случаях, когда главное направление ориентации параллельно или перпендикулярно направлению поляризатора. Поэтому если имеется дополнительная информация, например известно направление растяжения, то направление ориентации можно определить однозначно. Этот метод в ряде случаев предпочтительнее рентгенографического анализа, так как позволяет легко определить упорядоченные области даже для пленок с плохой ориентацией.

Существуют многочисленные механические испытания, предназначенные для изучения влияния времени на механические свойства пленок. Они широко применяются для пленок из синтетических полимеров [30], но очень редко — для полисахаридных пленок по нескольким причинам. Во-первых, по сравнению со многими другими полимерами свойства полисахаридов мало зависят от времени. Во-вторых, что более важно, полисахариды в значительной степени нелинейны [31], так что временная зависимость в свою очередь зависит от растяжения (при релаксации напряжения), от нагрузки (при ползучести) и от предыстории испытуемого полисахарида.

Для технического использования пленок важны прочность на разрыв и на износ. Оценка этих параметров производится стандартными методами определения сопротивления материалов.

*Проницаемость для паров.* Относящиеся к этой теме вопросы прекрасно освещены в недавно вышедшей монографии [32]. Если пленка помещена таким образом, что парциальное давление газа, находящегося по разные стороны от нее, неодинаково, то наблюдается диффузия газа через пленку, происходящая до выравнивания этого давления. Считается, что это явление вызвано растворимостью газа во внешнем слое пленки, пропорциональной его давлению. Таким образом, внутри пленки появляется градиент концентрации и, следовательно, происходит диффузия газа через пленку. В стационарном состоянии, если  $q$  — количество газа, диффундирующего через единицу площади,  $D$  — константа диффузии,  $c$  — концентрация, а  $x$  — расстояние внутри пленки, выполняется закон Фика:

$$q = -D \frac{dc}{dx}. \quad (7)$$

Если концентрации (или парциальные давления) по обе стороны пленки поддерживаются постоянными, выражение (7) можно проинтегрировать, что дает

$$q = \frac{D(c_1 - c_2)}{l}, \quad (8)$$

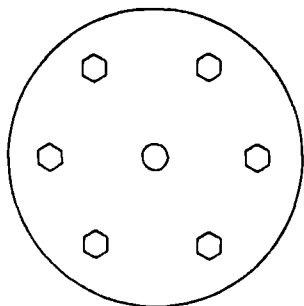
где  $l$  — толщина пленки, а  $c_1$  и  $c_2$  — концентрации у двух ее поверхностей. В соответствии с вышеупомянутым положением о том, что концентрация пропорциональна давлению,

$$q = \frac{DS(p_1 - p_2)}{l}, \quad (9)$$

где  $c = Sp$  и  $S$  — коэффициент растворимости. Произведение  $DS$  называется константой проницаемости и служит фактором, по которому оцениваются пленки.

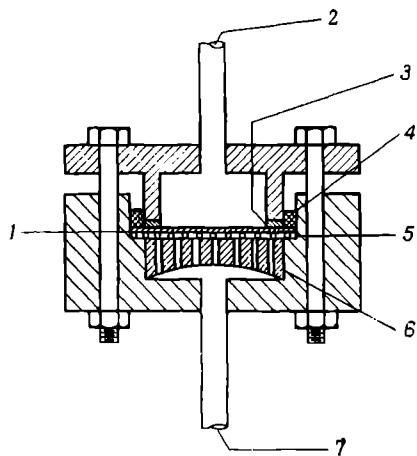
Таким образом, оценка проницаемости пленки означает в первую очередь определение ее константы проницаемости. Это выполняется в ячейке, изображенной на рис. 10. Пленку поддерживают с помощью перфори-

рованной пластинки из пористого стекла или нержавеющей стали. Прибор присоединяют к вакуумной системе, чтобы получить области высокого и низкого давлений, как показано на рисунке. Нужно следить, чтобы



давление на неподдерживаемой (верхней) стороне пленки было всегда выше, чем на поддерживаемой (нижней) ее стороне. Газ вводят в область высокого давления, а область низкого давления эвакуируют. Скорость тока газа определяют по притоку давления в области низкого давления, и если оно мало (несколько миллиметров), а высокое давление поддерживается постоянным, например равным одной атмосфере, то их разность практически постоянна, и

$$DS = \frac{ql}{P_1 - P_2} \quad (10)$$



Следовательно, константу проницаемости можно определить, измеряя скорость потока газа через пленку, т. е. скорость возрастания давления, приведенного к нормальным температуре и давлению, толщину пленки и ее площадь.

Эксперимент несложен. Определяя поведение пленки в начале опыта, можно найти  $D$  и, следовательно,  $S$ . Важно определять эти параметры для всех пленок, которые могут в принципе использоваться в качестве упаковочного материала.

*Другие свойства.* Важным свойством углеводных пленок является способность их к набуханию, которая может быть использована при характеристике поперечно сшитых систем [33] или при изучении взаимодей-

Р и с. 10. Ячейка для определения проницаемости пленок для паров [32].  
1 — пленка, 2 — область давления, 3 — прокладка, 4 — ртутный затвор, 5 — пористая пластинка, 6 — пластинка с отверстиями, 7 — область вакуума.

ствия полимер — растворитель в набухающих системах [34]. Пленка служит удобной формой для измерения площади, ведущей к прямому измерению объема. При применении этого метода ориентация, естественно, должна быть случайной. Если же пленка ориентирована, необходимо вводить поправки [33].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rånby B. G., in «Fundamentals of Papermaking Fibers», Francis Bolam, Ed., British Paper and Board Maker's Association, 1958, pp. 55—82.
2. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 9.
3. St. John Manley R., J. Polymer Sci., 47, 509 (1960).
4. Marchessault R. H., Morehead R. F., Walter N. M., Glandemans C. P. J., Timell T. E., J. Polymer Sci., 51, S86 (1961).
5. Rånby B. G., Svensk Papperstidn., 55, 115 (1952).



6. Sisson W. A., *Ind. Eng. Chem.*, **30**, 530 (1938).
7. McNeely W. H., in «Industrial Gums», Whistler R. L. and BeMiller J. N., Eds., Academic Press Inc., New York, N.Y., 1959, p. 64.
8. Malm C. J., Barkey K. J., Solo M., May D. C., *Ind. Eng. Chem.*, **49**, 79 (1957).
9. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 75.
10. Haskell V. C., Owens D. K., *Textile Res. J.*, **30**, 993 (1960).
11. Russell J., VanKerpel R. G., *J. Polymer Sci.*, **25**, 77 (1957).
12. Sass J. E., in «Botanical Microtechnique», Iowa State College Press, Ames, Iowa, 3rd Ed., 1958.
13. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 193.
14. Freund E., Deutsch F., *Rayon Textile Monthly*, **21**, 280 (1940).
15. Dulmage W. J., *J. Polymer Sci.*, **26**, 277 (1957).
16. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 144.
17. Alexander L. E., Michalik E. R., *Acta Cryst.*, **12**, 105 (1959).
18. Howson J. A., Walter N. M., in «Physical Methods in Chemical Analysis», W. G. Berl, Ed., Academic Press Inc., New York, N.Y., 2nd Ed., 1960, vol. I, p. 129.
19. Howson J. A., Sisson W. A., in «Cellulose and Cellulose Derivatives», E. Ott, H. M. Spurlin and M. W. Grafflin, Eds., Interscience Publishers, Inc., New York, N.Y., 2nd Ed., 1954, Part I, p. 231.
20. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 356.
21. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 104.
22. Marchessault R. H., Liang C. Y., *J. Polymer Sci.*, **59**, 357 (1962).
23. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 10.
24. Mann J., Marriam H., *Trans. Faraday Soc.*, **52**, 481 (1956).
25. Kuhn L. P., *Anal. Chem.*, **22**, 276 (1950).
26. Krimm S., *Chem. Phys.*, **32**, 313 (1960); *Fortschr. Hochpolymer-Forsch.*, **2**, 51 (1960).
27. Elliot A., in «Advances in Spectroscopy», H. W. Thompson, Ed., Interscience Publishers, Inc., New York, N.Y., 1959.
28. Liang C. Y., Marchessault R. H., *J. Polymer Sci.*, **37**, 385 (1959); **39**, 269 (1959).
29. Liang C. Y., Bassett K. H., McGinness E. A., Marchessault R. H., *Tappi*, **43**, 1017 (1960).
30. Ferry J. D., *Viscoelastic Properties of Polymers*, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., 1961.
31. Passaglia E., Koppchelle H. P., *J. Polymer Sci.*, **33**, 281 (1958). See also Meredith R., *The Mechanical Properties of Textile Fibers*, Interscience Publishers, Inc., New York, N.Y., 1956.
32. Stannett V. T., Szwarc M., Bhargava R. L., Meyer J. A., Meyers A. W., Rogers C. E., *Permeability of Plastic Films and Coated Paper to Gases and Vapors*, TAPPI Monograph Series No. 23, Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 360 Lexington, Ave., New York 17, N.Y., 1962.
33. Bruck S. D., *J. Research Natl. Bur. Standards*, **65A**, 485 (1961).
34. Flory P. J., *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, New York, 1953.
35. Astbury W. T., *Nature*, **155**, 667 (1945).

## Специфические иммунологические реакции полисахаридов

И. З. Аллен

### ВВЕДЕНИЕ

Связь между структурой антигена и специфичностью антитела была впервые установлена в классических работах Ландштайнера [1], который ввел большое количество группировок известной структуры в белки и показал, что введенные группы могут служить детерминантами специфичности антител. Специфичность взаимодействия антиген — антитело возникает за счет комплементарности определенных участков антител-глобулинов и активных групп антигенной структуры. Антисыворотки с выясненной специфичностью представляют собой поэтому набор разнообразных уникальных реагентов, которые можно применять для получения информации о структуре. Более того, высокая чувствительность и специфичность иммунологических реакций делают их особенно ценными как независимый источник сведений о химическом строении и гомогенности иммунологически активных соединений.

Открытие Доше и Эйвери в 1917 г. в фильтратах культур пневмококков «растворимого специфического вещества» привело к выделению и характеристике Хейдельбергером и сотр. [2] специфических капсулярных полисахаридов у пневмококков типов I, II и III. Иммунохимия полисахаридных антигенов, собственно, была начата в 1923 г. работой Хейдельбергера, который твердо установил участие углеводов в иммунологических реакциях и показал, что иммунологическая специфичность пневмококков определяется капсулярными полисахаридами, различающимися для всех изученных серологических типов. Капсулярные полисахариды пневмококков сыграли также важную роль в исследованиях Хейдельбергера и Кендалла [3, 4] по механизму и количественной теории реакции осаждения между антигеном и антителом. Использование не содержащего азота полисахаридного антигена упрощает анализ образующегося при реакции осадка, так как весь осажденный азот должен принадлежать специфическому антителу.

Начало количественной иммунохимии положили работы Хейдельбергера, применившего точные химические методы к иммунологическим реакциям; развитая им методика количественного осаждения позволила точно определять поведение структурно родственных антигенов, а также точно анализировать антитела весовым методом. Теория, детали практического использования и ограничения иммунохимической методики подробно описаны Кабатом [5].

Обширные исследования систем декстран — антидекстран, проведенные Кабатом [6, 7], привели к появлению простых модельных систем для приложения количественных иммунохимических методов к установлению структуры полисахаридов и отношений между структурой антигена и иммунологической специфичностью. Антигенность гомополисахаридов, построенных из D-глюкозы с преобладанием  $\alpha$ -(1 → 6)-связей, позволила определить верхний предел величины активных групп природного полисахаридного антигена, а также размер комплементарной области активной зоны антидекстрана [8].

Для получения информации о связи химического строения с иммунологической специфичностью в системах углеводов — антиуглевод применяют следующие типы иммунологических исследований: а) количественное осаждение близкородственных полисахаридов гомологичными антисыворотками с последующим построением кривых осаждения [9, 10]; б) количественное осаждение гетерологичными или перекрестно реагирующими антисыворотками [11—13]; в) ингибирование осаждения в гомологичных или перекрестно реагирующих системах олигосахаридами или простыми сахарами [6—8, 11]; г) специфическое связывание олигосахаридов с антителом, определяемое методом равновесного диализа [14]; д) связывание комплемента и ингибирование связывания комплемента [15, 16]; е) получение искусственных антигенов с углеводными детерминантными группами конденсацией простых сахаров известного строения с белками через азофенильную группу и сравнение специфичности появляющихся антител с известными изменениями в структуре введенных групп [17, 18] или использование гаптенного ингибирования для выяснения специфичности антисыворотки [19—22].

Эти иммунохимические методы могут оказаться полезными при определении степени очистки и получении сведений о гетерогенности полисахаридных препаратов; при фракционировании смесей; при обнаружении потери биологической активности или расщепления в процессе очистки; при установлении идентичности неизвестных составных частей сложных полисахаридов; при обнаружении структурного сходства или различий между полисахаридами; при получении информации о последовательности моносахаридов и типах связей в участках структуры, реагирующих с антителом, а также при определении стереохимических требований и размеров активных центров молекул антител.

### **Иммунохимические критерии гомогенности и чистоты**

Иммунохимические методы могут дать сведения о гетерогенности препарата полисахарида, содержащего минимум два различных мономера, каждый из которых обеспечивает реакцию с некоторой специфической антисывороткой. Если эти два мономера входят в состав одной и той же молекулы, то соотношение между ними в специфических осадках, которые полисахариды образуют с антителами, реагирующими с каждым мономером, должно оставаться неизменным. И наоборот, если два мономера являются составными частями разных полисахаридов или находятся в разных полисахаридах в различных пропорциях, соотношение между ними в специфических осадках меняется. Так, например, было найдено, что в галактане, осажденном антипневмококковой сывороткой типа II, соотношение уроновая кислота/D-галактоза в 5 раз выше, чем у галактана, осажденного антисывороткой типа XIV, и примерно в 2 раза выше, чем у исходного галактана; это указывает, что исходный галактан содержит компонент с высоким содержанием уроновой кислоты [23]. Аналогичным способом было установлено, что аравийская камедь (гуммиарабик) [24] и специфический полисахарид *Cryptococcus neoformans* A [25] представляют собой смеси.

Определение количества данного мономера в антигене, осаждаемом избытком антитела, было использовано для установления степени чистоты полисахаридных антигенов и получения сведений о том, что данное антитело реагирует именно с данным антигеном и осаждает его специфически (см. обзор [5]). Показано, что этот принцип широко применяв-

нийся для анализа групповых веществ крови [26], имеет общее значение. Для анализа специфических осадков было использовано количественное определение гексозаминов [27—29], 6-дезоксигексоз [30, 31], радиоактивности [32]. D-галактозы и уроновой кислоты [23, 25] и кетоз [33].

### *Иммунохимические методы изучения структуры полисахаридов*

Показано, что иммунохимические методы можно использовать для обнаружения потери активности или расщепления высокомолекулярных полисахаридов в процессе выделения. Из исследований, проведенных с различными препаратами пневмококковых капсулярных полисахаридов типа II и специфическими кроличьими антисыворотками, вытекает, что некоторые препараты подверглись расщеплению, так как уменьшилась их способность осаждать антитело, понизилось содержание 6-дезоксигексозы в специфических осадках, образованных с избытком антитела, а в падосадочных растворах оставались неосажденными и антиген, и антитело [31, 34]. Было изучено влияние различий в молекулярном весе фракций декстрана на способность осаждать антидекстран человека, а также антипневмококковые сыворотки типа II лошади и кролика [11, 35]. На осаждение антидекстрана человека молекулярный вес фракций влияет относительно мало, но при перекрестных реакциях фракций декстрана с антипневмококковыми сыворотками типа II он играет более значительную роль. Перекрестно реагирующие системы показывают постепенное понижение осаждающей способности декстрановых фракций при уменьшении молекулярного веса от 412 000 до 10 600.

Специфичные для отдельных типов пневмококков антисыворотки представляют собой набор реагентов, активность которых соответствует разнообразным структурным деталям, являющимся антигенными детерминантными группами пневмококковых полисахаридов. Хотя информация о тонкой структуре антигенных детерминант этих полисахаридов все еще отрывочна, о специфичности антисывороток против низших типов пневмококковых полисахаридов накоплено достаточно сведений, чтобы применять их в качестве таких реагентов. Обширные исследования перекрестных реакций многих полисахаридов известного строения с антипневмококковыми сыворотками, проведенные Хейдельбергером [12, 13a], дали сведения об иммунохимической специфичности этих сывороток и одновременно — ключи к структуре тип-специфичных полисахаридов.

Коротким путем к идентификации неизвестных составных частей полисахаридов и установлению их строения может служить изучение их перекрестных реакций с антипневмококковыми сыворотками. Так, отчетливая перекрестная реакция камеди кета с лошадиной антипневмококковой сывороткой типа I привела к выводу, что в состав камеди входит не открытая в ней ранее D-галактуроновая кислота [36]. Это заключение было затем подтверждено идентификацией D-галактуронозой кислоты среди продуктов гидролиза камеди. Реакция галактана из легких с антипневмококковой сывороткой типа II позволила идентифицировать содержащуюся в нем в небольших количествах уроновую кислоту как D-глюкуроновую [23], а реакция капсулярного полисахарида *Aerobacter aerogenes* A4 (тип 8) с антипневмококковыми сыворотками типа II и V дала возможность идентифицировать входящую в его состав уроновую кислоту как D-глюкуроновую или ее 4-O-метилпроизводное [13b]. Групповой

специфичный углевод клеточной стенки гемолитического стрептококка группы А и его V и D производные [37], которые перекрестно реагируют с антипневмококковыми сыворотками типов II и VI [38, 39] содержат L-рамнозу и N-ацетил-D-глюкозамин. На основании этих перекрестных реакций было предсказано, что по крайней мере часть остатков L-рамнозы в составе вещества клеточной стенки несет заместитель в положении 3, так как пневмококковые полисахариды типов II и VI содержат в группировках, определяющих серологическую специфичность, замещенную в положении 3 L-рамнозу. Это предсказание было подтверждено иммунохимическим изучением стрептококкового полисахарида, окисленного периодатом [40]; окисление разрушило остатки N-ацетил-D-глюкозамина, но все остатки L-рамнозы сохранились. Дальнейшее химическое подтверждение существования остатков L-рамнопиранозы с заместителем в положении 3 было получено после выделения 2,4-ди-O-метил-L-рамнозы из полисахарида клеточной стенки стрептококков после метилирования и гидролиза [41].

Сходство и различие между родственными полисахаридами легко можно обнаружить с помощью количественного иммунохимического анализа. Если для иммунизации человека использовать декстраны, различающиеся содержанием  $1 \rightarrow 6$  и других типов связей, можно получить антисыворотки, специфичность которых направлена против  $\alpha$ -D-глюкозы со связью  $1 \rightarrow 6$ ,  $1 \rightarrow 4$ ,  $1 \rightarrow 3$  или  $1 \rightarrow 2$ , присутствующей в иммунизирующем антигене [6—10]. Декстраны, содержащие  $\alpha$ -D-глюкопиранозные остатки, соединенные преимущественно ( $1 \rightarrow 6$ )-связями, дают антитела, направленные против концевых невосстанавливающих участков длиной 6—7 остатков  $\alpha$ -D-глюкозы с ( $1 \rightarrow 6$ )-связями между ними [6—8, 42]. Было показано, что для большого числа декстранов способность взаимодействовать с такой специфичной для ( $1 \rightarrow 6$ )-связей антидекстрановой сывороткой человека, определяемая весовым методом по реакции количественного осаждения [9, 10], зависит от содержания ( $1 \rightarrow 6$ )-связей, найденного методом периодатного окисления. В то время как декстраны, содержащие 70% и больше ( $1 \rightarrow 6$ )-связей, осаждают антитело одинаково, уменьшение количества этих связей ниже 70% вызывает снижение активности декстрана.

Два препарата декстрана (NRRL B-1299 S-3 и B 742 LR) значительно отличаются по иммунологическим свойствам от всех других изученных декстранов. Оказалось, что декстран B-1299 S-3 обладает большей, а препарат B 742 LR — меньшей активностью в реакции осаждения антидекстрана, чем это можно было ожидать, судя по содержанию в них  $1 \rightarrow 6$ -связей. Такое же anomальное поведение для этих двух декстранов было отмечено в независимых исследованиях способности декстрана осаждать (на единицу веса) перекрестно реагирующие антитела из лошадиной и кроличьей антипневмококковых сывороток типа II и лошадиной антипневмококковой сыворотки типа XX как функции числа ( $1 \rightarrow 6$ )-связей [11]. Найденные отличия в реакционной способности показывают, что эти препараты отличаются от других декстранов с тем же содержанием ( $1 \rightarrow 6$ )-связей и по структуре, а возможно, и по числу и величине концевых невосстанавливающих изомальтодекстриновых групп. Структурные отличия, не проявляющиеся при периодатном окислении, были найдены и для декстрана B 742, так как этот препарат при ферментативном гидролизе декстраназой превращается в восстанавливающие сахара в меньшей степени, чем другие декстраны со сходным содержанием ( $1 \rightarrow 6$ )-связей [10, 43, 44].

Антидекстрановые сыворотки человека, специфичные по отношению к остаткам  $\alpha$ -D-глюкозы со связями  $1 \rightarrow 4$ ,  $1 \rightarrow 3$  или  $1 \rightarrow 2$ , образуются при иммунизации декстранами, содержащими высокий процент связей  $1 \rightarrow 4$ ,  $1 \rightarrow 3$  и  $1 \rightarrow 2$  соответственно. Было найдено, что способность декстранов осаждать эти типы антидекстрановых сывороток зависит от содержания в полисахаридах ( $1 \rightarrow 4$ )-, ( $1 \rightarrow 3$ )- или ( $1 \rightarrow 2$ )-связей [8, 10]. Аномальное поведение декстрана NRRL B 1142 в реакциях с ( $1 \rightarrow 3$ )-специфичными сыворотками позволяет отличать этот препарат от других декстранов, содержащих сравнимые количества ( $1 \rightarrow 3$ )-связей [10].

Подробно изучены количественные реакции осаждения декстранов и антипневмококковых сывороток [11]. Декстраны способны осаждать перекрестно реагирующее антитело сывороток типа II и XX аналогично осаждению антидекстрана человека. Декстраны, содержащие 70% и более ( $1 \rightarrow 6$ )-связей, осаждают антитело одинаково, но реакционная способность их падает, если содержание ( $1 \rightarrow 6$ )-связей становится ниже 70%. Количественные исследования реакции ингибирования показали, что наилучшими ингибиторами осаждения декстранов антисыворотками типов II и XX являются олигосахариды ряда изомальтодекстринов. Декстраны с высоким содержанием ( $1 \rightarrow 2$ )-связей дают значительную перекрестную реакцию с антисывороткой типа XII, так как способны осаждать большую часть азота антитела; и наоборот, декстраны с высоким содержанием ( $1 \rightarrow 6$ )-связей наименее реакционноспособны. Найдено, что наилучшим ингибитором перекрестной реакции антисыворотки типа XII и декстрана с большим содержанием ( $1 \rightarrow 2$ )-связей является койбиоза [11].

Перекрестные реакции декстранов с антисыворотками типа IX трудно интерпретировать по данным количественного осаждения из-за гетерогенности перекрестно реагирующей фракции антитела. Однако количественное изучение ингибирования показывает, что в реакции декстранов с антисывороткой типа IX существуют по меньшей мере две формы антитела, различающиеся по специфичности. Одна форма, по-видимому, специфична по отношению и к  $\alpha$ -( $1 \rightarrow 4$ )-, и к  $\alpha$ -( $1 \rightarrow 3$ )-связям, причем, вероятно, концевой невосстанавливающий моносахарид должен быть связан  $\alpha$ -( $1 \rightarrow 4$ )-связью, как в 4-O- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-3-O- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-D-глюкопиранозе; вторая форма специфична к концевым ( $1 \rightarrow 3$ )-связям [11].

Более простые иммунологические методы, в которых используется не количественное определение азота антитела, а визуальное наблюдение осаждения, также позволяют обнаружить гетерогенность декстранов. Различают декстраны серотипа А и серотипа В, первые реагируют перекрестно с антипневмококковыми сыворотками типов II, XII и XX, а вторые реагируют перекрестно с антисыворотками типов II и XX и незначительно или совсем не реагируют с антисывороткой типа XII. После сравнения серологического поведения большой группы декстранов способность их реагировать с антисыворотками типов II и XX была связана с наличием в веществе остатков D-глюкозы с заместителем в положении 6, а способность реагировать с антисыворотками типа XII — с содержанием остатков глюкозы, несущих заместитель в положении 2 [45].

### *Ингибирование олигосахаридами*

Простые вещества, родственные или идентичные по структуре реакционноспособным группировкам антигена, могут конкурировать с анти-

геном за специфические активные центры молекулы антитела и поэтому препятствовать взаимодействию антигена с антителом. Чем больше сходство между структурами низкомолекулярного аналога и антигенной детерминантной группировки, тем эффективнее ингибирование [1, 5]. Изучение ингибирования приобретает все большее значение, так как не только дает информацию о специфичности антисывороток, но позволяет определить размер активного центра антитела и окончательно подтверждает выводы о структуре, сделанные на основании других типов иммунохимических исследований. Если олигосахариды, представляющие собой все возможные соединения, которые как фрагменты могут входить в структуру антигенных детерминант, доступны для испытаний, наблюдение за ингибированием можно максимально использовать для получения информации о последовательности мономеров, типах гликозидных связей и числе моносахаридов, входящих в полную структуру детерминантных групп.

Применение олигосахаридного ингибирования для установления структуры детерминантных групп полисахаридного антигена лучше всего иллюстрируется работами Кабата [6—9], касающимися системы декстран — антидекстран, где были полностью использованы возможности метода количественного ингибирования гаптенами. В опытах с антидекстрановыми сыворотками, полученными в ответ на иммунизацию декстранами с высоким содержанием  $(1 \rightarrow 6)$ -связей, было показано, что наиболее мощными ингибиторами реакции осаждения являются изомальтодекстрины [6—8]. Специфичность их для  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6)-связей следует из факта, что изомальтоза, взятая в молярном соотношении, служит более сильным ингибитором, чем дисахариды D-глюкозы с  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4)-,  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)- или  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  2)-связями. Для каждой сыворотки графики зависимости ингибирующей активности от молярной концентрации имеют вид семейства кривых. Эти кривые ингибирования указывают, что ингибирующая активность увеличивается с увеличением длины цепи; каждая дополнительная  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6)-связь и каждый новый остаток D-глюкозы вызывают рост ингибирующей активности. Однако относительный прирост ингибирующей активности уменьшается с увеличением длины цепи и достигает некоторого предельного значения для гексасахарида, который является лучшим ингибитором большинства изученных сывороток. Для одной антидекстрановой сыворотки показано, что изомальтогептаоза несколько более эффективна, чем изомальтогексаоза [86]. Эти данные свидетельствуют, что специфичность антидекстранов такого типа направлена против концевых невозстанавливающих последовательностей  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6)-связанных остатков D-глюкозы и что наибольший участок структуры, комплементарный активному центру антитела, построен из 6—7 D-глюкозных единиц.

Молекулярные количества гомологичных изомальтодекстринов, например гекса- или гептасахарида, вызывающие 50%-ное ингибирование, различны для отдельных индивидуальных антидекстранов. Это объясняют тем, что молекулы антидекстрана неоднородны по величине своих активных центров, но что каждая индивидуальная сыворотка содержит группу антидекстрановых молекул с активными центрами различной величины. Хотя верхним пределом этой величины является комплементарность к гекса- или гептасахариду, содержание антидекстрановых молекул с активными центрами любой данной величины может быть неодинаковым для различных антидекстранов [6—8].

Эта гипотеза была подтверждена разделением антидекстранов на две популяции антител [42]. В результате специфической адсорбции антидекстрана на нерастворимом декстрани (сефадексе) и элюировании изомальтотриозой или изомальтотетраозой можно получить фракцию антитела, которая сильнее ингибируется меньшими олигосахаридами, что указывает на значительное содержание молекул антител с активными центрами малых размеров. Элюирование изомальтогексаозой дает вторую фракцию антитела с преимущественным содержанием активных центров большого размера, так как эту фракцию ингибируют только высшие олигосахариды. Таким образом, количественное галтенное ингибирование позволило не только точно определить величину и строение активных групп, с которыми соединяется антитело, но и показало, что антитело (даже к одному антигену) не гомогенно в отношении величины активных центров.

Существование антисывороток человека со специфичностью, которая направлена против мономеров со связями, отличными от  $1 \rightarrow 6$ , также было продемонстрировано с помощью олигосахаридного ингибирования. Оказалось, что мальтодекстрины представляют собой самые эффективные ингибиторы антисыворотки, образующейся при иммунизации декстраном с высоким содержанием  $(1 \rightarrow 4)$ -связей [8в]. Антидекстраны, образованные при иммунизации декстранами с большим количеством  $(1 \rightarrow 3)$ - или  $(1 \rightarrow 2)$ -связей, были обнаружены также с помощью количественного ингибирования, наиболее эффективного в случае нигерозы и койбиозы соответственно [106].

Ингибирование осаждения или агглютинации послужило критерием для установления олигосахаридных структур, обуславливающих специфичность А-, В-, О(Н)-, Le<sup>a</sup>- и Le<sup>b</sup>-антигенов групп крови. Как только из групповых веществ крови выделяют и идентифицируют новые олигосахариды или как только становятся доступными синтетические вещества, их испытывают на ингибирующую способность; строение антигенных детерминант выводят затем из структуры наиболее сильного ингибитора. Изучение ингибирования показало, что среди олигосахаридов, выделенных из групповых веществ крови, до сих пор самым эффективным ингибитором системы А-анти-А является трисахарид  $\alpha$ -N-ацетил-D-галактозаминил-( $1 \rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-галактозил-( $1 \rightarrow 3$ )-N-ацетил-D-глюкозамин [46], а системы В-анти-В — дисахарид O- $\alpha$ -D-галактопиранозил-( $1 \rightarrow 3$ )-D-галактоза [47]. См. исчерпывающие обзоры, посвященные роли иммунохимии в выяснении структуры групповых веществ крови [26, 48].

Метод олигосахаридного ингибирования сыграл важную роль в идентификации углеводных структур, ответственных за серологическую специфичность полисахаридных О-антигенов *Salmonella*, а также в выяснении структурных изменений О-антигенов, сопровождающих лизогенную конверсию [49, 50].

Иммунологические методы, в которых используется не точное определение азота антитела, а визуальное наблюдение агглютинации или ее ингибирования, оказались полезными при изучении химизма реакции агглютинации *Staphylococcus aureus* (Копенгаген) специфическими кроличьими антисыворотками и привели к выяснению деталей тонкой структуры тейхоевой кислоты, входящей в состав клеточных стенок этого штамма бактерий. Поскольку при ферментативном гидролизе очищенной  $\beta$ -ацетилглюкозаминидазой отщепляется N-ацетил-D-глюкозамин, было сделано предположение, что гликозидные связи N-ацетил-D-глюкозамина, входящего в состав тейхоевой кислоты, имеют  $\beta$ -конфигурацию [51].



Однако оказалось, что агглютинация препаратов клеточных стенок анти-сывороткой специфически ингибируется  $\alpha$ -фенил-N-ацетил-D-глюкозаминидом, а не  $\beta$ -фенил-N-ацетил-D-глюкозаминидом. Иммунохимические данные, следовательно, указывали на присутствие остатков N-ацетил-D-глюкозамина с  $\alpha$ -конфигурацией гликозидных связей. Парадокс был объяснен, когда установили, что в антигене — тейхоевой кислоте — на каждые семь остатков  $\beta$ -N-ацетил-D-глюкозаминилрибита приходится один  $\alpha$ -N-ацетил-D-глюкозаминилрибит [52]. Главное антитело, присутствующее в кроличьих антисыворотках против штамма Копенгаген, специфично по отношению к остаткам N-ацетил-D-глюкозамина с  $\alpha$ -конфигурацией, которые входят в состав детерминантных групп антигена [53]. Самым мощным ингибитором агглютинации служит  $\alpha$ -N-ацетил-D-глюкозаминилполирибитфосфат — конечный продукт действия  $\beta$ -ацетилглюкозаминидазы на свободную от аланина тейхоевую кислоту *S. aureus* (Копенгаген). Антисыворотки, приготовленные против *S. aureus* штаммов Н и Дункан, оказались специфичными для остатков  $\beta$ -N-ацетил-D-глюкозамина.

### МЕТОДИКА

Существует много различных методов анализа специфических осадков в количественной иммунохимии. Выбор конкретной методики в значительной степени диктуется содержанием антитела в применяемых сыворотках и экономией в использовании ценных реагентов, таких, как антигены, сыворотки и олигосахариды, доступность которых может быть ограниченной. Детальное описание имеющихся методов, которые можно применять для анализа любого желаемого количества азота антитела, от одного до нескольких сотен микрограммов, дано Кабатом [5]. Количественный метод осаждения, описанный ниже в качестве примера, был применен для анализа систем декстран — антидекстран [8—11], но он может иметь и более широкое применение.

#### *Качественная преципитиновая проба*

Антисыворотки, применяемые для качественных и количественных определений, должны быть свободны от липидов и частиц. Там, где это возможно, используют стерильную стеклянную посуду и принимают все возможные предосторожности против бактериального загрязнения. Сыворотки можно центрифугировать в стерильных конических пробирках емкостью 12 мл при 4° и 2000 об/мин; липиды, поднимающиеся к поверхности, отсасывают, а надосадочную жидкость декантируют в чистую стерильную коническую пробирку. Продолжительное центрифугирование повторяют до тех пор, пока не прекратится образование осадка в течение 8-часового центрифугирования при охлаждении. 0,1—0,5 мл сыворотки переносят в небольшую пробирку и прибавляют 0,01—0,1 мл раствора антигена. Количество антигена, необходимое для получения четкой реакции, зависит от содержания антитела в примененной антисыворотке. Большое количество полисахарида может дать растворимые комплексы, поэтому вначале следует вносить немного антигена. Если 5—10  $\gamma$  антигена не дают реакции, можно внести 50, 100, 250 и 500  $\gamma$ . Все полисахариды, используемые в качестве антигенов, и олигосахариды, галтены, растворяют в стерильном 0,85%-ном растворе хлористого натрия, к которому добавлена капля хлороформа. После перемешивания пробирку инкубируют 1 час при 37° и оставляют на ночь в холодильнике. Одно-

временно готовят холостые и контрольные растворы, содержащие антисыворотку с раствором хлористого натрия, антиген с раствором хлористого натрия и нормальную сыворотку с антигеном. Последний контроль необходим, чтобы исключить возможность неспецифического осаждения белков сыворотки полисахаридом; например, показано, что растворимый ламинаран дает небольшой осадок с нормальной сывороткой человека [33]. Образование осадка или помутнение наблюдают визуально. В случае слабой или сомнительной реакции появление осадка можно подтвердить центрифугированием.

### *Метод количественного осаждения*

Аликвотные части сыворотки объемом 0,5—3,0 мл, содержащие 5—30 γ азота антитела, с помощью калиброванной аналитической пипетки переносят в конические центрифужные пробирки емкостью 8 мл с отметкой при 2,5 мл. К этому постоянному объему сыворотки прибавляют возрастающие количества антигена; применяя калиброванные микропипетки, можно работать с малыми объемами. Конечный общий объем во всех пробирках должен быть одинаковым; для приведения объемов растворов к постоянной величине прибавляют 0,85%-ный раствор хлористого натрия. В качестве контрольных используются две пробирки, содержащие только сыворотку. Содержимое пробирок тщательно, но осторожно перемешивают вращением каждой пробирки в штативе, после чего пробирки закрывают стерильными резиновыми пробками, нагревают 1 час на водяной бане при 37° и помещают в холодильник на 1 неделю. В течение этого времени содержимое пробирок нужно перемешивать вращением дважды в день.

По истечении недели пробирки центрифугируют 1 час при 2000 об/мин в охлаждаемой центрифуге, затем их вынимают и помещают в баню со льдом. Надосадочную жидкость из каждой пробирки осторожно декантируют в конические пробирки объемом 12 мл (с пометками, позволяющими идентифицировать их содержимое) и все пробирки емкостью 8 мл, содержащие осадок, переворачивают в штативе над чистым полотенцем. После полного стекания раствора пробирки с осадками энергично встряхивают, вновь помещают в баню со льдом и прибавляют по 0,5 мл охлажденного до 0° 0,85%-ного раствора хлористого натрия. Каждый осадок тщательно суспендируют встряхиванием и прибавляют еще 2,5 мл 0,85%-ного раствора хлористого натрия, охлажденного до 0°, чтобы сполоснуть стенки пробирок. Пробирки закрывают вымытыми резиновыми пробками и снова помещают в охлаждаемую центрифугу; параллельно, чтобы избежать потери следов преципитата, центрифугируют повторно сывороточные маточные растворы.

После центрифугирования растворов в обеих партиях пробирок при 2000 об/мин в течение 1 час надосадочную жидкость из пробирок объемом по 12 мл сливают, а промывные солевые растворы из пробирок по 8 мл выливают каждый в соответствующую пробирку емкостью 12 мл. Осадки промывают вторично, как указано выше. Пробирки снова центрифугируют; растворы из больших пробирок отбрасывают, а вторые промывные растворы из основных пробирок декантируют в соответствующие им пробирки для надосадочных жидкостей, которые снова центрифугируют и сливают. На этой стадии осадки в основных пробирках уже промыты два раза. Осадки из маточных растворов промывают 3 мл 0,85%-ного хлористого натрия при 0°; после центрифугирования надосадочную жидкость декантируют и отбрасывают.

Дважды промытые осадки в пробирках по 8 мл суспендируют в 2 каплях воды, прибавляют 1 каплю 0,5 н. раствора едкого натра и осторожно встряхивают до растворения осадков. Воду и 0,5 н. раствор едкого натра прибавляют также в пробирки объемом по 12 мл и их содержимое количественно переносят с небольшим количеством воды в соответствующие основные пробирки. В каждую пробирку приливают воду до отметки 2,5 мл, закрывают и перемешивают. Аликвотные части полученных растворов (по 2,0 мл) переносят в широкогорлые пробирки объемом по 40—50 мл (для легкого перемешивания) и прибавляют 6,0 мл 12,5%-ного раствора карбоната натрия. После перемешивания добавляют 1,0 мл 0,1%-ного раствора сульфата меди; раствор снова перемешивают и оставляют на 1 час. Затем при постоянном перемешивании медленно прибавляют 1 мл свежеразбавленного тирозинового реагента Фолина — Чиокалто (1 объем реагента и 2 объема воды); для развития полной окраски необходимо 30 мин. Поглощение измеряют на спектрофотометре при 750 мμк против 2,0 мл воды, к которой прибавлены все реагенты. Реагент Фолина стандартизируют по известным количествам нормального гаммаглобулина человека, специфического аггитела или лошадиного гаммаглобулина, если используются лошадиные сыворотки. Если же нужно определить относительно большие количества азота аггитела порядка 50—100 γ, растворенные осадки можно количественно перенести в микроколбы Кьельдаля и определять азот по микрометоду Кьельдаля, модифицированному Маркхэмом (см. [51]).

В опытах по количественному олигосахаридному ингибированию вначале устанавливают содержание аггитела в используемой сыворотке и выбирают подходящие количества антигена и антисыворотки для максимального осаждения. К отмеренному объему исследуемой сыворотки прибавляют известные количества олигосахарида в возрастающей концентрации. После доведения растворов в пробирках до одинакового конечного объема и перемешивания пробирки помещают на 30 мин в водяную баню при 37°. После этого прибавляют антиген, снова перемешивают и выдерживают при 37° еще 30 мин. Одновременно готовят контрольные растворы, содержащие только сыворотку и сыворотку с антигеном. Пробирки помещают в холодильник на неделю, причем растворы перемешивают дважды в день. Затем выполняют промывку, описанную выше. Степень ингибирования вычисляют по разности в поглощении растворов, содержащих ингибитор, и контрольных растворов.

Растворимость осадков, полученных с аггителами лошади, сильно зависит от температуры [54], поэтому осаждение или ингибирование с лошадиными антисыворотками проводят в бане со льдом и поддерживают низкую температуру в течение всего процесса. Указанные выше стадии, предусматривающие инкубацию при 37°, применяют только для сывороток человека или кролика; в случае антисывороток лошади их проводят в бане со льдом при 0°.

Применение для изучения олигосахаридного ингибирования метода Фолина — Чиокалто (метод шкалы с убывающей концентрацией) описано Кабатом и Шиффманом [55], расходовавшими 5—8γ олигосахарида на каждую пробу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Landsteiner K., The Specificity of Serological Reactions, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1945.
2. Heidelberger M., Avery O. T., J. Exptl. Med., 38, 73 (1923); 40, 301

- (1924); Heidelberg M., Goebel W. F., Avery O. T., *ibid.*, **42**, 727 (1925).
3. Heidelberg M., Kendall F. E., *J. Exptl. Med.*, **50**, 809 (1929); **61**, 563 (1935).
4. Heidelberg M., *Lectures in Immunochemistry*, Academic Press Inc., New York, N.Y., 1956.
5. Kabat E. A., Mayer M. M., *Experimental Immunochemistry*, Charles C. Thomas Publishers, Springfield, Illinois, 2nd Ed., 1961.
6. Kabat E. A., *J. Cellular Comp. Physiol.*, **50**, **Suppl. 1**, 79 (1957); in «Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides» Ciba Foundation Symposium, J. and A. Churchill, Ltd., London, England, 1958, p. 42; *Federation Proc.*, **21**, 694 (1962).
7. Kabat E. A., *Bull. soc. chim. biol.*, **42**, 1459 (1960).
8. Kabat E. A., *J. Immunol.*, а) **77**, 377 (1956); б) **84**, 82 (1960); в) *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3709 (1954).
9. Kabat E. A., Berg D., *J. Immunol.*, **70**, 514 (1953).
10. Allen P. Z., Kabat E. A., *J. Am. Chem. Soc.*, а) **78**, 1890 (1956); б) **81**, 4882 (1959).
11. Goodman J. W., Kabat E. A., *J. Immunol.*, **84**, 333 (1960); **84**, 347 (1960); **85**, 342 (1960).
12. Heidelberg M., *Proc. Intern. Congr. Biochem.*, 4th, Vienna, 1958, **1**, 52 (1959).
13. Heidelberg M. а) *Ann. Rev. Biochem.*, **25**, 641 (1956); б) *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, **Suppl. 1**, 169 (Sept. 1962) [see also *ibid.*, **99**, 356 (1962)].
14. Karush F., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3380 (1957); *Advances in Immunol.*, **2**, 1 (1962).
15. Murakami W. T., Van Vunakis H., Lehrer H. I., Levine L., *J. Immunol.*, **89**, 116 (1962).
16. Levine L., *Federation Proc.*, **21**, 711 (1962); Wasserman E., Levine L., *J. Immunol.*, **87**, 290 (1961).
17. Goebel W. F., *J. Exptl. Med.*, **64**, 29 (1936); *ibid.*, **64**, 469 (1938); Goebel W. F., Avery O. T., Babers F. H., *ibid.*, **60**, 599 (1934); Goebel W. F., Hotchkiss R. D., *ibid.*, **66**, 191 (1937).
18. Avery O. T., Goebel W. F., *J. Exptl. Med.*, **50**, 533 (1929); Avery O. T., Goebel W. F., Babers F. H., *ibid.*, **55**, 769 (1932).
19. Beiser S. M., Burke G. C., Tanenbaum S. W., *J. Mol. Biol.*, **2**, 125 (1960).
20. Mage M., Bassett E. W., Tanenbaum S. W., Beiser S. M., *J. Immunol.*, **90**, 318 (1963).
21. Rapport M. M., Graf L., Yariv J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 438 (1961).
22. Yariv J., Rapport M. M., Graf L., *Biochem. J.*, **85**, 383 (1962).
23. Heidelberg M., Dische Z., Brock-Neely W., Wolfrom M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3511 (1955).
24. Heidelberg M., Adams J., Dische Z., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2853 (1956).
25. Rebers P. A., Barker S. A., Heidelberg M., Dische Z., Evans E. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1135 (1958).
26. Kabat E. A., *Blood Group Substances*, Academic Press Inc., New York, N.Y., 1956.
27. Bendich Z., Kabat E. A., Bezer A., *J. Exptl. Med.*, **83**, 485 (1946).
28. Kabat E. A., Baer H., Day R. L., Knaub V., *J. Exptl. Med.*, **91**, 433 (1950).
29. Johns R. G. S., Marack J. R., *J. Hyg.*, **51**, 55 (1953).

30. Kabat E. A., Baer H., Knaub V., J. Exptl. Med., **89**, 1 (1949).
31. Beiser S. M., Kabat E. A., Schor J. M., J. Immunol., **69**, 297 (1952).
32. Kabat E. A., Berg D., Rittenberg D., Pontecorvo L., Eidinoff M. L., Hellman L., J. Am. Chem. Soc., **76**, 564 (1954).
33. Allen P. Z., Kabat E. A., J. Exptl. Med., **105**, 383 (1957).
34. Heidelberger M., Kendall F. E., Scherp H. W., J. Exptl. Med., **64**, 559 (1936).
35. Kabat E. A., Bezzer A. E., Arch. Biochem. Biophys., **78**, 306 (1958).
36. Heidelberger M., Tyler J. M., Mukherjee S., J. Immunol., **5**, 666 (1962).
37. McCarty M., J. Exptl. Med., **104**, 629 (1956).
38. Heidelberger M., McCarty M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **45**, 235 (1959).
39. Heidelberger M., Rebers P. A., J. Bacteriol., **80**, 145 (1960).
40. Estrada-Parra S., Heidelberger M., Rebers P. A., J. Biol. Chem., **238**, 510 (1963).
41. Heymann H., Maunniello J. M., Barkulis S. S., J. Biol. Chem., **238**, 502 (1963).
42. Schlossman S. F., Kabat E. A., J. Exptl. Med., **116**, 535 (1962).
43. Tsuchiya H. M., Jeanes A., Bricker H. M., Wilham C. A., J. Bacteriol., **64**, 513 (1952).
44. Sery T. W., Hehre E. J., J. Bacteriol., **71**, 373 (1956).
45. Hehre E. J., Bull. soc. chim. biol., **42**, 1581 (1960).
46. Schiffman G., Kabat E. A., Leskowitz S., J. Am. Chem. Soc., **84**, 73 (1962).
47. Watkins W. M., Morgan W. T. J., Vox Sanguinis, **7**, 129 (1962).
48. Morgan W. T. J., Proc. Roy. Soc. (London) Series B, **151**, 308 (1960).
49. Robbins P. W., Uchida T., Biochem., **1**, 323 (1962); Federation Proc., **21**, 702 (1962).
50. Staub A. M., Tinelli R., Bull. soc. chim. biol., **42**, 1637 (1960).
51. Juergens W. G., Sanderson A. R., Strominger J. L., Bull. soc. chim. biol., **42**, 1669 (1960).
52. Sanderson A. R., Juergens W. G., Strominger J. L., Biochem. Biophys. Research Commun., **5**, 472 (1961).
53. Nathenson S. G., Strominger J. L., J. Biol. Chem., **237**, 3839 (1962).
54. Heidelberger M., Proc. Intern. Congr. Allergology, 4th, New York, **30** (1962).
55. Kabat E. A., Schiffman G., J. Immunol., **88**, 782 (1962).

# Методы установления строения

---

## Полный кислотный гидролиз полисахаридов

Дж. А. Адамс

### ВВЕДЕНИЕ

Большое разнообразие природных полисахаридов, содержащих различные моносахариды, связанные гликозидными связями с неодинаковой лабильностью к действию кислот, делает нецелесообразным создание универсального метода их полного кислотного гидролиза. В зависимости от моносахаридного состава каждого отдельного полисахарида, размеров окисных циклов входящих в него сахаров и конфигурации гликозидных связей для нескольких общих типов полисахаридов можно использовать соответствующие условия кислотного гидролиза.

Основой для разработки этих методов служат следующие предпосылки: фуранозидные связи более лабильны, чем пиранозидные связи;  $\alpha$ -гликозидные связи обычно более лабильны, чем  $\beta$ -связи; пентогликаны в пиранозной форме гидролизуются легче пиранозидных гексогликанов; повышенную устойчивость к кислотному гидролизу полисахариду придают входящие в его состав уроновые кислоты и аминсахара. Гидролиз сложных полисахаридов проводят преимущественно путем ступенчатой деградации кислотами повышающейся силы. Удаление определенных сахаров при мягкой кислотной обработке может дать полезную информацию о природе сахаров и характере их гликозидной связи. Еще одно преимущество ступенчатого кислотного гидролиза состоит в образовании деградированных молекул менее сложного строения, структура которых легче поддается изучению. Эти рассуждения относятся к полисахаридам, содержащим фуранозные остатки или дезоксисахара, легко удаляемые мягкой кислотной обработкой, и к остаткам, содержащим уроновые кислоты, требующим жестких условий гидролиза.

Полисахариды, о которых пойдет речь ниже, произвольно разбиты на группы, с тем чтобы описать наиболее подходящие для каждой данной группы методы кислотного гидролиза. Приведенные методы можно применить для постепенного ступенчатого гидролиза некоторых полисахаридов.

### МЕТОДИКИ

#### $\alpha$ -D-Гексогликаны

Типичными полисахаридами этой группы являются крахмалы, декстраны, декстрины Шардингера, гликогены (см. стр. 356 и сл.) и другие  $\alpha$ -D-глюканы. Свенсон и Кори [1] показали, что устойчивость  $\alpha$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-связей к действию кислот одинакова как в линейной, так и в разветвленной молекуле полисахаридов;  $\alpha$ -D-(1  $\rightarrow$  6)-связи более устойчивы к дей-

ствию кислот, чем  $\alpha$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-связи, а циклические структуры, содержащие  $\alpha$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-связи, более прочны, чем открытые цепи. Конечный продукт кислотного гидролиза — D-глюкоза, но наряду с ней могут образовываться в небольших количествах генциобиоза, изогенциобиоза, производные фурфурола, левулиновой кислоты и другие продукты деградации. При мягком кислотном гидролизе эти побочные продукты образуются в ничтожных количествах. Приведенный здесь метод [2] обычно применяют для гидролиза указанных выше полисахаридов.

### ГИДРОЛИЗ

Образец вещества весом 2,5—3,0 г (в пересчете на сухой вес) суспендируют в смеси 200 мл воды и 20 мл соляной кислоты (уд. вес 1,125) и нагревают 2,5 час в колбе с обратным холодильником. Содержимое колбы вначале слегка перемешивают, чтобы образовалась равномерная суспензия полисахарида, и для равномерного кипения (во избежание выбрасывания) в колбу бросают кипятыльники. Лучше всего нагревать колбу на паровой или на кипящей водяной бане. По истечении указанного времени колбу охлаждают, раствор переносят в мерную колбу объемом 250 мл, добавляют раствор едкого натра до слабокислой среды, доводят до метки, фильтруют через бумажный фильтр и определяют восстанавливающую способность аликвотной пробы (по глюкозе) с помощью метода Нельсона [3] или любого другого метода.

### $\beta$ -D-Гексозгликаны

Целлюлоза и другие  $\beta$ -D-гексозгликаны, нерастворимые в воде и в разбавленных кислотах, гидролизуются в две стадии, включающие солиubilизацию 72%-ной серной кислотой и последующий гидролиз кипящей 3%-ной серной кислотой. Ниже описан метод Зеemана и сотр. [4].

### ГИДРОЛИЗ

Образец полисахарида измельчают так, чтобы он проходил через сито 30 меш, и высушивают на воздухе до низкого содержания влаги, которое затем определяют. В стакане объемом 30 мл взвешивают такое количество полученного воздушно-сухого порошка, в котором содержалось бы примерно 0,35 г целлюлозы. Приливают 5 мл 72%-ной серной кислоты, охлажденной до 15°, смесь тщательно размешивают, погружают стакан в баню с теплой (30°) водой и выдерживают при этой температуре 45 мин, перемешивая смесь через каждые 5—10 мин. При гидролизе хлопка или древесной массы желательно сначала приготовить однородную смесь с 1 мл 72%-ной серной кислоты, а затем добавить остальные 4 мл кислоты. По истечении 45 мин смесь смывают из стакана в колбу Эрленмейера 140 мл воды. Разбавленный раствор выдерживают 1 час в автоклаве при 0,055 атм, после этого охлаждают, разбавляют точно до 250 мл, нейтрализуют избытком карбоната кальция, фильтруют и анализируют на содержание сахаров методом Шаффера—Шомодьи [5] или любым другим подходящим методом. Вторичный гидролиз лучше всего проводить в автоклаве, хотя кипячение при атмосферном давлении в течение 4,5 час приводит к такому же выходу восстанавливающих сахаров.

## Пентогликаны

### Пиранозидопентогликаны

К обычным полисахаридам этого типа относятся ксиланы [6], легко гидролизующиеся разбавленными минеральными кислотами. Методика полного кислотного гидролиза ксилана описана в статье Вольфрома и Бемиллера, посвященной получению D-ксилозы [7].

### Фуранозидопентогликаны

Арабины, представители этой группы полисахаридов, характеризуются исключительной лабильностью к действию кислот. Некоторые арабины подвергаются автогидролизу при кипячении с водой [8]. Большинство гидролитических методов включает обработку 0,01 н. минеральной кислотой при 80—90° в течение 15—25 час [9]. Здесь приведена методика, примененная для гидролиза арабинана из пектина цитрусовых [10, 11].

### ГИДРОЛИЗ

Несочищенный арабинан,  $[\alpha]_D^{20} - 128^\circ$  (в воде) (содержание золы 6,4%, ангидроуроново́й кислоты 5%), гидролизуют 0,01 н. серной кислотой при 90° в течение 25 час. За ходом гидролиза следят по изменению оптического вращения или восстанавливающей способности или используют любой другой подходящий метод. Если арабинан содержит другие полисахариды, не затрагиваемые при мягкой кислотной обработке, — галактан и пектовую кислоту яблочного пектина [12] — гидролизат выливают в спирт, арабиноза при этом переходит в раствор, а оставшиеся неразрушенными устойчивые полисахариды выпадают в осадок.

### Полисахариды, содержащие уроновые кислоты

Эти полисахариды, к которым относится большое число гемицеллюлоз и камедей, дают при гидролизе нейтральные сахара и сравнительно устойчивые альдобиноуроновые кислоты [22], гидролиз которых удается обычно провести лишь в таких жестких условиях, при которых несомненно происходит частичное разрушение некоторых пентоз. Кроме того, при нагревании с разбавленными минеральными кислотами уроновые кислоты декарбоксилируются с образованием продуктов разложения неизвестного строения [13]. Лучше всего гидролиз гемицеллюлоз и камедей, содержащих уроновые кислоты, проводить до стадии образования альдобиноуроновых кислот, а затем восстановить карбоксильную группу до первичной спиртовой; образующийся нейтральный дисахарид уже легко гидролизруется разбавленными кислотами. Изложенные принципы воплощены в приведенной здесь методике Адамса и Бишопа [14] (см. также стр. 230), применивших ее для гидролиза кислой гемицеллюлозы из пшеничных отрубей.

### ГИДРОЛИЗ

75 г гемицеллюлозы нагревают с 1500 мл 1 н. серной кислоты на кипящей водяной бане до достижения постоянной восстанавливающей силы раствора (10 час). К горячему раствору осторожно добавляют гидроокись бария до pH 6,0. Сульфат бария отфильтровывают, раствор и промывные



воды пропускают через колонку с амберлитом IR-120 ( $H^+$ ) ( $30 \times 150$  мм) для удаления катионов. Компоненты, содержащие уроновые кислоты, адсорбируют затем на колонке с амберлитом IR-4B ( $OH^-$ ) ( $30 \times 200$  мм). Колонку промывают водой до отрицательной реакции на свободные сахара с антроном (см. стр. 24); нейтральные сахара можно разделить методом хроматографии на бумаге или на колонке. Кислые компоненты элюируют 1 н. серной кислотой, элюат нейтрализуют гидроокисью бария, отфильтровывают неорганические соли и удаляют из фильтрата избыток ионов бария амберлитом IR-120 ( $H^+$ ). Кислый раствор концентрируют при  $30^\circ$  до вязкого светлого сиропа; выход 6,8 г. Эта кислая фракция состоит в основном из альдобиоуроновых кислот с меньшим количеством свободных мономерных уроновых кислот, кроме того, она содержит небольшое количество альдотриуроновых кислот и высших кислых олигомеров и полимеров. Эти разнообразные кислые компоненты можно разделить хроматографическими методами.

### *Гликуроногликаны (полиурониды)*

В эту группу входят два обычных полисахарида — пектовая (см. стр. 375) и альгиновая кислоты (см. стр. 317), являющиеся соответственно полимерами D-галактуроновой кислоты и D-маннуровой и L-гулуриновой кислот. Оба полисахарида устойчивы к действию кислот и подвергаются деградации, если применяемые условия гидролиза слишком жесткие. В настоящее время нет общего метода гидролиза, применимого к обоим веществам, и ниже приводятся методы проведения гидролиза каждого из них.

#### **Гидролиз пектовой кислоты**

Детальное описание условий гидролиза D-галактуроногликана (пектовая кислота цитрусовых) дают Линк и Недден [15].

Наиболее подходящим является следующий способ проведения гидролиза. 80 г галактуроногликана добавляют к 4 л кипящей 2,5%-ной серной кислоты небольшими порциями, чтобы избежать образования тяжелой клейкой массы, которая имеет тенденцию прилипать ко дну и обугливаться. Чтобы предотвратить выбрасывание и не дать вязкому материалу прилипнуть ко дну, рекомендуется добавить десяток стеклянных бусин. Содержимое колбы кипятят с обратным холодильником 15 час, причем температура верхнего слоя жидкости в колбе должна быть в продолжение всего гидролиза  $100-101^\circ$ . Для поддержания температуры на этом уровне колбу помещают в асбестовую рубашку. Лучше пользоваться электрическим нагревателем, а не горелкой Бунзена, так как малейший перегрев и обугливание осложняют получение чистой бариевой соли кислоты.

По окончании гидролиза раствор охлаждают и фильтруют, чтобы удалить непрогидролизованное вещество и нерастворимые продукты распада, образовавшиеся при действии серной кислоты на свободные уроновые кислоты. Фильтрацию можно провести очень быстро, если на льняную ткань в воронке Бюхнера насыпать слой асбеста или бумажной массы. Прозрачный раствор обычно бывает лимонно-желтого цвета, если не было перегревов. Серную кислоту удаляют в два приема. Приблизительно  $9/10$  всей кислоты удаляют, добавляя раствор 290 г  $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$  в 2,5 л воды при  $40^\circ$ . Раствор гидроокиси бария следует добавлять медленно при

энергичном перемешивании раствора, чтобы избежать местного перегрева или защелачивания. Сосуд, в котором проводят нейтрализацию, лучше поместить в водяную баню, чтобы температура не поднималась выше 40°.

После добавления гидроокиси бария раствор должен быть кислым по конго. Для завершения нейтрализации добавляют суспензию 40 г тонко измельченного карбоната бария (небольшой избыток) в воде, при этом свободная D-галактуроновая кислота переходит в бариевую соль. Затем добавляют 10—15 г целита, 5 г активированного угля и нагревают 15 мин. Все операции — нейтрализацию и обесцвечивание — проводят при непрерывном перемешивании смеси.

Неорганические соли и адсорбенты удаляют фильтрованием охлажденного раствора через слой бумажной массы или асбеста, помещенный на плотный бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Осадок промывают на фильтре 300 мл кипящей воды.

Полученный коричневатый раствор концентрируют при 30—35° и остаточном давлении 12—15 мм, до 200—300 мл, хлопьевидный осадок и неорганические бариевые соли, выпадающие при концентрировании раствора, отделяют фильтрованием через слой асбеста, а раствор обрабатывают 5 г активированного угля. Светло-коричневый раствор медленно, при энергичном перемешивании выливают в 4 объема 95%-ного спирта. Выпавшую бариевую соль D-галактуроновой кислоты через 30 мин фильтруют и осадок на фильтре обезживают, промывая последовательно горячим 95%-ным спиртом, 99%-ным спиртом и, наконец, сухим эфиром.

#### Гидролиз альгиновой кислоты

Для гидролиза альгиновой кислоты предложен целый ряд методик; мы приводим методику Фишера и Дерфеля [16], поскольку она предусматривает отщепление и предохранение от разрушения L-гулуруновой и D-маннуруновой кислот.

Первоначальный гидролиз больших количеств альгиновой кислоты проводят обработкой 95%-ной серной кислотой при 3° в течение 14 час или 80%-ной кислотой при комнатной температуре (14 час). В любом случае, прежде чем приливать к измельченной альгиновой кислоте (25 г) серную кислоту (100 мл), последнюю охлаждают от —5 до —10°. Во избежание комкования вязкую массу тщательно растирают до образования максимально равномерной смеси. После выдерживания в течение указанного времени смесь разбавляют измельченным льдом и водой до 0.5 н. концентрации по серной кислоте. Полученный раствор нагревают 6 час на кипящей водяной бане, нейтрализуют мелко раздробленным чистым карбонатом кальция, фильтруют и осадок сульфата кальция промывают на фильтре. Объединенные ярко-желтый фильтрат и промывные воды концентрируют в вакууме примерно до 200 мл, пропускают через колонку с амберлитом 1R-120 (H<sup>+</sup>) и упаривают в вакууме до образования подвижного сиропа. Этот сироп медленно концентрируют в эксикаторе и вносят затравку D-маннофурануrolактона с т. пл. 191° (см. стр. 225). В результате выкристаллизовывается некоторое количество лактона, но это происходит только в том случае, если исходная альгиновая кислота содержала D-маннуруновой кислоты больше, чем L-гулуруновой. После отделения кристаллического D-маннуrolактона остающуюся смесь D-маннуrolактона и L-гулуруновой кислоты разделяют хроматографически.

### Полисахариды, содержащие аминосахара

Условия гидролиза полисахаридов этого типа определяются в значительной степени их составом. Полисахариды, содержащие N-ацетил-D-глюкозамин, лучше всего гидролизовать соляной кислотой, присутствие же уроновых кислот делает использование HCl нежелательным [17]. Легкость, с которой освобождаются свободные аминосахара при гидролизе аминополисахаридов, сильно колеблется [18]. Кислотный гидролиз полисахаридов, содержащих N-ацетилгексозамины, вызывает удаление N-ацетильных групп [19]. Полисахариды, содержащие уроновые кислоты и N-ацетилгексозамины, устойчивы к гидролизу, и для проведения гидролиза устойчивой альдобеоуроновой кислоты рекомендуется предварительно ее восстановить [20].

Приведенные ниже способы гидролиза группового вещества А крови человека (см. стр. 336), предложенные Морганом и сотр. [21], демонстрируют, какие условия применяются для проведения гидролиза многих гексозаминсодержащих полисахаридов.

#### Гидролиз

Отдельные образцы полисахарида гидролизуют 0,5 и 6 н. соляной и 1 н. уксусной кислотами. Гидролиз проводят в небольших (по 2—3 мл) запаянных стеклянных ампулах, которые нагревают в течение определенного времени на кипящей водяной бане. Ампулы затем охлаждают, содержимое переносят в небольшие стеклянные чашки и упаривают досуха в вакууме над гранулированным едким натром и концентрированной серной кислотой. Небольшие количества хлористого натрия не мешают определению восстанавливающей способности и гексозаминов, и поэтому после гидролиза 0,5 н. соляной кислотой гидролизат не упаривают досуха, а нейтрализуют равным объемом 0,5 н. раствора едкого натра.

Гидролиз 6 н. HCl приводит к значительному распаду и образованию осадка гуминовых веществ после двухчасового нагревания. Ход гидролиза можно проследить, определяя количество освобождающегося  $\alpha$ -аминного азота и азота  $\alpha$ -аминокислот. Освобождение  $\alpha$ -аминного азота достигает максимума через 4 час и составляет примерно 91% общего азота, тогда как максимального уровня азота  $\alpha$ -аминокислот можно достичь лишь после 16-часового нагревания. Проведение гидролиза в течение 16 час ведет к существенной потере гексозаминов и других сахаров.

При гидролизе 0,5 н. соляной кислотой происходит быстрое отщепление восстанавливающих веществ и гексозаминов. Содержание отщепившихся восстанавливающих сахаров и гексозаминов достигает максимума примерно в одно и то же время (4—5 час). Гидролиз 1 н. уксусной кислотой при 100° приводит к медленному отщеплению N-ацетилгексозаминов (максимальное значение наблюдателя через 10—12 час), тогда как восстанавливающая способность достигает максимума не раньше чем через 48 час.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Swanson M. A., Cori C. F., J. Biol. Chem., 172, 797 (1948).
2. «Official Methods of Analysis», The Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C., 9th Ed., 1960, p. 289.
3. См. [2]. стр. 427, 430.

4. Saeman J. F., Buhl J. L., Harris E. E., *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **17**, 35 (1945).
5. Shaffer P. A., Somogyi M., *J. Biol. Chem.*, **100**, 695 (1933).
6. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1965, vol. V, p. 170.
7. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 88.
8. Smith F., *J. Chem. Soc.*, **1939**, 744.
9. Andrews P., Hough L., Powell D. B., *Chem. and Ind. (London)*, 658 (1956).
10. Beaven G. H., Hirst E. L., Jones J. K. N., *J. Chem. Soc.*, **1939**, 1865.
11. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1965, vol. V, p. 74.
12. Hirst E. L., Jones J. K. N., *J. Chem. Soc.*, **1939**, 454.
13. Link K. P., Nieman C., *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 2474 (1930).
14. Adams G. A., Bishop C. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2842 (1956).
15. Link K. P., Neddén R., *J. Biol. Chem.*, **94**, 307 (1931—1932).
16. Fischer F. G., Dörfel H. Z., *Z. Physiol. Chem.*, **302**, 186 (1955).
17. Stacey M., Barker S. A., *Polysaccharides of Micro-organisms*, Oxford University Press, London, England, 1960, p. 39.
18. Bendick A., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **166**, 283 (1946).
19. Morgan W. T. J., *Biochem. J.*, **30**, 909 (1936).
20. Weissman B., Meyer K., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4729 (1952).
21. Aminoff D., Morgan W. T. J., Watkins W. M., *Biochem. J.*, **46**, 426 (1950).
22. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York—London, 1962, vol. I, p. 301.

## Частичный кислотный гидролиз

Получение полимергомологичных олигосахаридов; ксилодекстрины  
из ксилана

**М. Л. Вольфром, Н. Е. Франкс**

### ВВЕДЕНИЕ

Описано выделение олигосахаридов, содержащих связанные между собой  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-связью моносахариды, при ацетоллизе линейного полисахарида (целлюлозы) с последующим хроматографированием на колонке с силикагелем [1, 2] и выделение олигосахаридов с  $\alpha$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-, (1  $\rightarrow$  6)- и (1  $\rightarrow$  3)-связями при кислотном гидролизе разветвленного полисахарида (амилопектин) [3]. В последнем случае используется последовательное хроматографирование ацетилированных сахаров на колонке с углем [4] (см. также стр. 13) и на колонке с силикагелем. Миллер, Дин и Блюм [5, 6] выделили олигосахариды из кислотного гидролизата целлюлозы методом хроматографии на колонке с углем, обработанным стеариновой кислотой [7] с применением градиентного элюирования. Уистлер и Ту [8—10] сообщили о выделении целого ряда кристаллических полимергомологов при действии дымящей соляной кислоты на ксилан кукурузного початка с последующим хроматографированием гидролизата на колонке с углем. Детальное описание этой методики приведено ниже.

## МЕТОДИКА [9]

*Гидролиз*

30 г ксилана (переосажденная фракция А, полученная из голоцеллюлозы кукурузного початка [11]) растворяют в 1,5 л дымящей соляной кислоты ( $d_4^{16}$  1,21) при  $-16^\circ$ , растворение длится 30 мин. Гидролиз ведут при  $0^\circ$  и прекращают его, когда, судя по определению оптического вращения, отщепилось от  $1/2$  до  $2/3$  теоретического количества D-ксилозы. Для получения больших количеств ксилобиозы гидролиз следует вести дольше, а если необходимо выделить больше высших олигосахаридов, время гидролиза сокращают. Гидролиз останавливают, нейтрализуя реакционную смесь бикарбонатом натрия с добавлением льда при перемешивании. Для предотвращения вспенивания добавляют 2 мл *n*-октанола. Нейтральный раствор ( $\sim 4$  л) выдерживают при  $5^\circ$  3 дня, что облегчает отделение солей. Надосадочную жидкость декантируют и фильтруют. Проводят гидролиз еще 2 таких же загрузок полисахарида и объединенные фильтраты используют для хроматографического разделения сахаров.

*Хроматография на колонке с углем*

Полученные фильтраты (12 л) подвергают хроматографическому разделению на колонке ( $75 \times 850$  мм) со смесью уголь — целит (2 : 3 по весу) по методу Уистлера и Дерсо [4] (см. стр. 13) с использованием автоматического прибора Дерсо, Шолла и Уистлера [11].

После того как гидролизат пропустят через колонку, ее промывают 60 л воды для удаления солей и D-ксилозы. Затем последовательно элюируют колонку пятью 8-литровыми порциями 5%-ного спирта, собирая отдельно каждую порцию элюата. Вслед за этим колонку промывают пятью 8-литровыми порциями 15%-ного спирта и, наконец, двумя 8-литровыми порциями 50%-ного спирта. Все полученные фракции элюата (каждую отдельно) упаривают досуха и проводят приблизительное определение количества олигосахаридов в каждой из них методом нисходящей хроматографии на бумаге в системе *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3, по объему) в течение 22—25 час. Для разделения высших олигосахаридов требуется другая система (*n*-бутанол — пиридин — вода, 5 : 5 : 3) и большее время ( $\sim 90$  час). Обнаружение сахаров проводят с помощью реактива Толленса; полоски опрыскивают, сушат и нагревают 2 мин при  $100^\circ$  в сушильном шкафу.

В олигосахаридных фракциях можно обнаружить следы D-ксилозы. Если колонку промыть только тремя порциями 5%-ного спирта, а затем 15%-ным спиртом, то первая 8-литровая порция 15%-ного спирта содержит только ксилотриозу; выход 10%.

Дальнейшая очистка олигосахаридных фракций достигается повторным хроматографированием 10%-ных водных растворов на колонках ( $49 \times 650$  или  $75 \times 850$  мм) со смесью уголь — целит 1 : 1 (по весу).

*Ксилобиоза*

Полученный из соответствующих фракций (1 и 2 при элюировании 5%-ным спиртом) сухой порошок растворяют в таком количестве воды, чтобы получился 10%-ный раствор, и адсорбируют на колонке с углем. Колонку промывают последовательно 15 л воды и 8 л 5%-ного спирта,

спиртовой раствор, упаренный до сиропа, дает только одно пятно при хроматографировании на бумаге. 2 г сухого порошка, полученного при тщательном высушивании этого сиропа, растворяют в 1—2 мл воды, добавляют 50 мл метанола, нагретого до 60°, и смесь оставляют стоять на 5 мин. От еще теплого раствора отфильтровывают небольшой хлопьевидный осадок (вероятно, целит) и оставляют на ночь при 5°. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывают и перекристаллизовывают из метанола; т. пл. 185—186°,  $[\alpha]_D^{25} -32 \rightarrow -25,5^\circ$  (в воде).

#### Ксилотриоза

Этот сахар лучше всего выделять в чистом виде из 15%-ного спиртового элюата, как говорилось выше. Его также можно получить при повторном хроматографировании объединенных 3-, 4- и 5-й фракций 5%-ного спиртового элюата и 1-й фракции 15%-ного спиртового элюата. Колонку промывают 15 л воды и 18 л 2%-ного спирта, причем эти элюаты отбрасывают. Затем колонку промывают 36 л 9%-ного спирта, последние  $\frac{2}{3}$  элюата содержат только ксилотриозу. Концентрирование этой порции элюата приводит к сиропу, который при высушивании превращается в порошок. 8 г этого порошка растворяют в 28 мл воды, добавляют 35 мл абсолютного спирта, раствор нагревают 5 мин, хлопьевидный осадок отфильтровывают и к горячему раствору добавляют спирт до концентрации последнего 85%. При охлаждении раствора выпадают кристаллы, их отделяют и перекристаллизовывают из горячего 85%-ного спирта; т. пл. 205—206°,  $[\alpha]_D^{25} -39^\circ \rightarrow -47^\circ$  (в воде).

#### Ксилотетраоза

Сухой порошок, полученный из фракции 2 15%-ного спиртового элюата, растворяют в воде и 10%-ный раствор хроматографируют на колонке с углем. Колонку промывают 15 л воды, 16 л 2%-ного спирта и 8 л 15%-ного спирта и все эти элюаты отбрасывают. Следующими 15 л 15%-ного спирта вымывают только ксилотетраозу, что подтверждается при хроматографировании на бумаге элюата, упаренного до сиропа. 1 г сухого порошка, выделившегося при высушивании этого сиропа, растворяют в 5 мл воды, добавляют метанол до концентрации 85%. Раствор нагревают, фильтруют, добавляют 23 мл горячего *n*-бутанола. Через 2—5 мин из горячего раствора начинают выпадать кристаллы, их отделяют и перекристаллизовывают подобным же образом; т. пл. 219—220°,  $[\alpha]_D^{25} -49^\circ \rightarrow -60^\circ$  (в воде).

#### Ксилопентаоза и ксилгексаоза

Фракции 1 и 2 50%-ного спиртового элюата объединяют, растворяют в воде и наносят, как обычно, на колонку (49 × 650 мм) со смесью уголь — целит 1 : 1 (по весу). Колонку промывают 4 л воды, 8 л 15%-ного и 2 л 20%-ного спирта; все эти элюаты отбрасывают. Следующими 6 л 20%-ного спирта вымывают только ксилопентаозу. После этого промывают колонку 2 л 30%-ного спирта (получают смесь пента- и гексасахарида), а следующими 4 л 30%-ного спирта вымывают чистую ксилгексаозу. Каждый элюат, содержащий индивидуальный олигосахарид, упаривают и высушивают до порошка.

2 г измельченной сухой ксилопентаозы растворяют в 50 мл воды и добавляют 20 мл абсолютного спирта. Смесь нагревают до 60°, филь-

руют и приливают горячий абсолютный спирт до концентрации 80%. При очень плавном охлаждении кристаллизация наступает уже через 5 мин. Перекристаллизацию проводят таким же образом; т. пл. 231—232°,  $[\alpha]_D^{25}$  —66 (в воде). Судя по данным анализа, полученный сахар представляет собой полугидрат  $2C_{25}H_{42}O_{21} \cdot H_2O$ .

Примерно 1,5 г сухой порошкообразной ксилогексаозы растворяют в 10 мл воды, добавляют 22 мл абсолютного спирта, нагревают до 60°, фильтруют, приливают 18 мл абсолютного спирта и дают смеси постепенно остыть до комнатной температуры в течение ночи. Перекристаллизацию выпавших кристаллов проводят таким же образом; т. пл. 236—237°,  $[\alpha]_D^{25}$  —73° (в воде). Ксилогексаоза существует в виде дигидрата  $C_{30}H_{50}O_{25} \cdot 2H_2O$ .

#### Ксилогептаоза

Для получения этого олигосахарида проводят отдельно гидролиз и хроматографирование. Приблизительно 90 г ксилана гидролизуют 4,5 л дымящей соляной кислоты (уд. вес 1.42) при 0°, пока количество образовавшейся D-ксилозы не составит  $\frac{2}{3}$  от теоретического. Раствор выливают на лед и нейтрализуют бикарбонатом натрия. Профильтрованный раствор наносят на колонку (75 × 850 мм) со смесью уголь — целит 1 : 1 (по весу). Некоторое количество сахаров десорбируется при промывании колонки 60 л воды, 24 л 5%-ного и 24 л 15%-ного спирта. Адсорбент аккуратно вытряхивают из колонки, делят на две равные части, нижнюю половину отбрасывают, а из верхней готовят колонку размером 54 × 790 мм. Эту колонку промывают сначала 8 л воды (элюат отбрасывают), затем последовательно 20%-ным (4 × 2 л), 30%-ным (4 × 2 л) и 40%-ным спиртом (4 × 2 л). Каждую порцию элюата отдельно упаривают досуха в вакууме при 45° и анализируют методом хроматографии на бумаге в системе *n*-бутанол — пиридин — вода 5 : 5 : 3 (по объему) в течение 73 час, обнаружение сахаров проводят реактивом Толленса [13].

1 г ксилогептаозы (полученной из четвертой двухлитровой порции 30%-ного спиртового элюата или из первой трехлитровой порции 40%-ного спиртового элюата) растворяют в 10 мл воды. К раствору прибавляют 20 мл абсолютного спирта, подогревают и фильтруют. При охлаждении до комнатной температуры происходит кристаллизация; выход 0,5 г, т. пл. 232—234°. Чистый гептасахарид получают после двух перекристаллизаций из 75%-ного спирта; т. пл. 240—242° (побурение при 236°),  $[\alpha]_D^{25}$  —74° (с 1 в воде). Данные анализа указывают, что ксилогептаоза существует в виде дигидрата.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. McNeely W. H., Binkley W. W., Wolf from M. L., J. Am. Chem. Soc., **67**, 527 (1945).
2. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 143.
3. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1964, vol. IV, p. 250.
4. Whistler R. L., Dursio D. F., J. Am. Chem. Soc., **72**, 677 (1950).
5. Miller G. L., Dean J., Blum R., Arch. Biochem. Biophys., **91**, 24 (1960).
6. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 134.

7. Alm R. S., Acta Chem. Scand., **6**, 1186 (1952).
8. Whistler R. L., Tu C.-C., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1389 (1951).
9. Whistler R. L., Tu C.-C., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3609 (1952).
10. Whistler R. L., Tu C.-C., J. Am. Chem. Soc., **75**, 645 (1953).
11. Whistler R. L., Bowman D. R., Bachrach J., Arch. Biochem., **19**, 25 (1948).
12. Durso D. F., Schall E. D., Whistler R. L., Anal. Chem., **23**, 425 (1951).
13. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M.L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 21.

## Частичный кислотный и ферментативный гидролиз

Некоторые методы, позволяющие повысить выход олигосахаридов

*Т. Дж. Нейтс*

### ВВЕДЕНИЕ

Известны специфические ферменты, превращающие некоторые полисахариды в олигосахариды с высоким выходом. Оказалось, что эти ферменты гидролизуют большие фрагменты гораздо быстрее, чем мелкие, что приводит к накоплению низших олигосахаридов в реакционной смеси. Многие ферменты, однако, не обладают такой избирательностью к большим фрагментам; то же относится и к обычному кислотному катализу. В этих случаях можно применять искусственные методы защиты низших олигосахаридов от дальнейшего гидролиза. Один из таких методов предусматривает использование недиализующихся катализаторов — ферментов [1—4] или полимерных кислот [5—6], а низшие олигосахариды по этому методу непрерывно отдиализовываются из реакционной смеси по мере их образования.

Другой метод основан на неравномерном распределении противоионов в растворе полиэлектролита. Вначале в полисахарид вводят некоторое количество основных групп и затем гидролизуют полимерной кислотой [7, 8]. Основные молекулы полисахарида притягиваются электростатически к полианионам кислоты, окруженным локализованными участками с высокой концентрацией водородных ионов. Происходит быстрый гидролиз, но образующиеся нейтральные олигосахариды уже могут свободно диффундировать с полианионов и теперь на них действует лишь средняя кислотность раствора. Поэтому выделившийся олигосахарид будет гидролизываться относительно медленно и будет накапливаться в реакционной смеси. В случае необходимости можно осуществить более полную защиту олигосахаридов, отдиализовывая их из кислого раствора. Выходы различных олигосахаридов при применении данного метода зависят от распределения основных групп в исходном веществе; необязательно, что выход каждого олигосахариды будет улучшен, но можно существенно увеличить выходы определенных индивидуальных олигосахаридов.

Ниже даны три примера деградации полисахаридов, в которых олигосахариды защищают от дальнейшего гидролиза искусственными методами. Первый пример — это гидролиз инулина растворимой в воде полистиролсульфокислотой, проводимый внутри целлофановой трубки. Этот



метод применим лишь к очень кислотолабильным полимерам, так как в условиях, требуемых для гидролиза более устойчивого полисахарида, затрагивается сама целлофановая мембрана.

Второй пример показывает возможность применения этого метода к довольно устойчивым полисахаридам. В крахмал вводят ограниченное число диэтиламиноэтильных групп (ДЭАЭ) и проводят избирательный гидролиз полистиролсульфонокислотой в целлофановой трубке.

Третий пример иллюстрирует использование метода непрерывного диализа для контроля протекания реакций, катализируемых ферментами. Дегградация ксилана происходит под действием неочищенного препарата фермента, выделенного из грибов и обладающего ксиланазной активностью. Так как этот фермент не проявляет целлюлазной активности, то можно использовать целлофановую мембрану.

## МЕТОДИКИ

### *Получение водорастворимой полистиролсульфонокислоты [5]*

Под тягой собирают полностью стеклянный прибор, состоящий из литровой трехгорлой колбы, снабженной мощной мешалкой, капельной воронкой и обратным холодильником. Колбу помещают в термостатируемую водяную баню с температурой  $75^{\circ}$ . Вносят раствор 4,75 г полистирола ( $M_n = 100\,000$ ) в 80 мл хлороформа, при перемешивании добавляют порциями в течение 1 час смесь 30 мл хлорсульфоновой кислоты и 60 мл диоксана (смесь получена смешением компонентов при  $0^{\circ}$ ) и перемешивают при  $75^{\circ}$  12 час. Затем добавляют смесь 20 мл диоксана и 20 мл хлорсульфоновой кислоты, через 12 час добавляют новую порцию смеси и перемешивают еще 24 час. Полученный темно-коричневый раствор охлаждают, летучие продукты отгоняют в вакууме на пленочном испарителе [9], а смолистый остаток растворяют в 2 л воды, нейтрализуют 20%-ным водным раствором едкого натра ( $\sim 200$  мл), переносят в трубку для диализа и диализуют против проточной водопроводной воды 7 дней.

Раствор неотдиализованного продукта фильтруют через муслин и пропускают через колонку ( $80 \times 4$  см), наполненную смесью равных частей сильного катионита и сильного анионита. Концентрацию кислоты в элюате определяют потенциометрически титрованием 0,01 н. NaOH. Раствор концентрируют на пленочном испарителе до концентрации 0,04 н. и повторно диализуют против дистиллированной воды при комнатной температуре, пока в диализат не перестанут переходить окрашенные продукты. Наконец, диализуют против дистиллированной воды при  $80^{\circ}$  в течение  $\sim 12$  час, доводят концентрацию кислоты до 0,04 н. и используют в дальнейшем этот основной раствор.

Большинство продажных препаратов полистирола в высшей степени коллидисперсны, и, чтобы получить совершенно педиализующийся продукт, надо тщательно удалить низкомолекулярные продукты. Это можно осуществить исчерпывающим диализом или фракционным осаждением органическими растворителями до или после сульфирования. Прежде чем проводить частичный гидролиз, необходимо проверить, не будет ли кислота диффундировать через мембрану в выбранных условиях. Это лучше всего сделать, наблюдая за изменением поглощения диализата при 225 мμ, где кислота имеет максимум поглощения.

### **Частичный кислотный гидролиз инулина [5]**

К раствору 1,0 г инулина в 25 мл воды добавляют 25 мл 0,0133 н. раствора полистиролсульфокислоты. Смесь переносят в мешочек для диализа, для чего на расстоянии 5 см от края целлофановой трубки для диализа длиной 35 см завязывают узел, наливают раствор, сдавливая трубку, выгоняют воздух и на расстоянии 5 см от другого края трубки завязывают второй узел. Оба конца мешочка привязывают к оси мотора, погружают в вертикальном положении в стакан с водой (1 л), помещенный в термостатируемую (60°) водяную баню. Мешочек медленно вращают, обеспечивая тем самым перемешивание.

Через каждый час воду в стакане меняют, подогревая предварительно новую порцию дистиллированной воды до 60°. Следует принять меры предосторожности, чтобы в атмосфере лаборатории не содержалось летучих оснований, которые могли бы проникнуть в реакционную смесь и нейтрализовать разбавленную кислоту. Через 14 час объединенные диализаты (14 л) упаривают в вакууме при 30—40° до бесцветного сиропа; выход 0,95 г. Продукт состоит из моносахаридов (25% по весу) и из смеси от дисахаридов до гептасахаридов включительно (примерно по 10% каждого). Остальное приходится на высшие олигосахариды.

Состав продукта можно менять, меняя скорость диализа относительно скорости гидролиза. Так, увеличение площади мембраны на единицу объема реакционной смеси приводит к увеличению выхода высших олигосахаридов за счет моносахаридов и низших олигосахаридов. Тот же результат получают при снижении температуры реакции гидролиза; это обусловлено тем, что температурный коэффициент гидролиза составляет ~10%/град, а температурный коэффициент диализа — всего 2,5%/град. Разумеется также, что выход того или иного олигосахарида можно менять, подбирая мембраны с различной пористостью.

### **Частичный кислотный гидролиз крахмала [8]**

Раствор 12 г крахмала в 80 мл 5%-ного (вес к объему) водного раствора едкого натра нагревают до 85° и добавляют 3,5 г хлоргидрата 2-хлортириламины. Смесь перемешивают 30 мин при 85°, быстро охлаждают, нейтрализуют, добавляя примерно 90 мл 1 н. соляной кислоты, и разбавляют водой до 300 мл. Этот раствор трижды диализуют в течение 24 час против 5 л дистиллированной воды и доводят до 1 л в мерной колбе. Концентрацию продукта (~12 мг/мл) определяют, отбирая пробу раствора, упаривая ее и взвешивая остаток. Определение [10] азота или хлорида показывает, что на каждые 7 остатков D-глюкозы приходится одна диэтиламиноэтильная (ДЭАЭ) группа.

25 мл раствора ДЭАЭ-крахмала (12 мг/мл) смешивают с 25 мл 0,04 н. раствора полистиролсульфокислоты и помещают в мешочек для диализа (см. предыдущую методику). Образующийся при этом студневидный осадок быстро растворяется при нагревании. Мешочек с диализуемым раствором перемешивают в стакане с 2 л дистиллированной воды, нагретой до 80°, и через 5, 6, 9, 12 и 15 час диализат заменяют свежей двухлитровой порцией горячей (80°) воды. Объединенные диализаты (10 л) концентрируют в вакууме примерно до 100 мл. Образующийся раствор обрабатывают смешанным ионообменником (анионит в карбонатной форме), фильтруют, упаривают досуха; выход ~220 мг, что соответствует 95% веса исходного,

незамещенного крахмала. Продукт содержит 20% D-глюкозы и ~60% олигосахаридов (от дисахаридов до гептасахаридов).

Состав продукта, получаемого по этому методу, определяется прежде всего степенью замещения полисахарида ДЭАЭ-группами. Так, уменьшение степени замещения приводит к увеличению выхода высших олигосахаридов за счет D-глюкозы и низших олигосахаридов. Изменение степени замещения лучше всего осуществлять, меняя концентрацию 2-хлортриэтиламина при проведении реакции [8, 10].

### **Частичный ферментативный гидролиз ксилана [2, 3]**

40 г ксилана из древесины березы [11] суспендируют в 2 л 0,2%-ного (вес к объему) водного раствора ферментного препарата — пектиназы. Этой смесью заполняют несколько мешочков для диализа (заполнять их следует только до  $\frac{1}{2}$  их объема, чтобы в них могла поступать вода за счет разности осмотического давления). Эти мешочки подвешивают вертикально и погружают в 20-литровый сосуд с 18 л воды, покрытой слоем толуола. Перемешивание ведут при 37°, через каждые 24 час в течение недели воду меняют, объединенные диализаты упаривают в вакууме при 40° до 200 мл. Добавляют 100 мл спирта, раствор фильтруют через 10 г смеси целит — уголь (1 : 1), промывают и объединенные фильтрат и промывные жидкости выпаривают досуха. С выходом 96% (в расчете на ксилан) получают продукт, содержащий 34% D-ксилозы и 66% смеси от дисахаридов до гептасахаридов включительно.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Painter T. J., Can. J. Chem., **37**, 497 (1959).
2. Painter T. J., Timell T. E., Proc. Cellulose Conf., 2nd, Syracuse, 1959.
3. Timell T. E., Chem. and Ind. (London), 999 (1959).
4. Perila O., Bishop C. T., Can. J. Chem., **39**, 815 (1961).
5. Painter T. J., Chem. and Ind. (London), 1214 (1960).
6. Painter T. J., Morgan W. T. J., Nature, **191**, 39 (1961).
7. Painter T. J., Morgan W. T. J., Chem. and Ind. (London), 437 (1961).
8. Painter T. J., J. Chem. Soc., **1962**, 3932.
9. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I.
10. McKernan W., Ricketts C. R., Chem. and Ind. (London), 1490 (1959).
11. Glaudemans C. P. J., Timell T. E., J. Am. Chem. Soc., **80**, 941, 1209 (1958).

## **Кислотный гидролиз слабых связей**

*Дж. А. Адамс*

### **ФУРАНОЗИДНЫЕ СВЯЗИ**

#### **Введение**

Фуранозидные связи сахаров гораздо более лабильны к кислотам, чем пиранозидные, и легко гидролизуются при мягкой обработке кислотами [1]. Исключение составляют некоторые 3,6-ангидрогексозиды, в кото-

рых фуранозная структура прочнее пиранозной [2]. Некоторые арабины подвергаются автогидролизу при кипячении в воде за счет кислотности, создаваемой ассоциированной с полисахаридом пектовой кислотой [3]. Остатки арабинофуранозы, присоединенные к сложным полисахаридам, могут быть избирательно удалены при нагревании полисахарида с разбавленной кислотой [4]. В данной статье приводится метод избирательного отщепления L-арабинозы от растворимого в воде пентогликана пшеничной муки [5].

### Методика

1 г пентогликана из пшеничной муки нагревают 4,5 час с 150 мл 0,05 н. серной кислоты при 75—77°. Раствор охлаждают затем до 0°, образующийся нерастворимый осадок отделяют центрифугированием. К надосадочной жидкости добавляют спирт до концентрации 85% и отделяют выпавший осадок. Из полученной надосадочной жидкости отгоняют спирт и проводят полный гидролиз остатка и выпадавших осадков действием 0,1 н. серной кислоты. Как показывают данные хроматографии на бумаге, ~90% общего количества L-арабинозы отщепилось от исходного пентогликана при мягком кислотном гидролизе. Оставшаяся L-арабиноза распределена между осадками, представляющими собой в основном неизмененные ксиланы. Совершенно такие же результаты дает гидролиз 0,05 н. серной кислотой при 98° в течение 35 мин или 0,05 н. щавелевой кислотой при 75° в течение 12,5 час.

## 2-ДЕЗОКСИПИРАНОЗИДНЫЕ СВЯЗИ

### Введение

Гликозиды 2-дезоксисахаров характеризуются чрезвычайной легкостью гидролиза [6]. Гликофуранозиды дезоксисахаров гораздо более лабильны к действию кислот, чем гликопиранозиды. Гликозиды 2-дезоксигексоз гораздо устойчивее гликозидов соответствующих 2-дезокси-пентоз, а N-гликозиды 2-дезоксисахаров более лабильны, чем O-гликозиды этих же сахаров [7].  $\alpha$ -Арил-2-дезоксид-глюкопиранозиды менее стабильны по отношению к кислотному гидролизу, чем соответствующие алкильные производные [8]. Условия гидролиза некоторых 2-дезоксиметилгликозидов, описанные Оверендом и сотр. [9], приведены ниже.

### O-2-Дезоксигликозиды

а) 2-Дезокси- $\alpha$ -метил-L-рибопиранозид. 0,0452 г 2-дезоксид- $\alpha$ -метил-L-рибопиранозид растворяют в 5 мл 0,0005 н. соляной кислоты и раствор нагревают при 100°. Поляриметрические измерения позволяют следить за ходом гидролиза.

Время, мин	Начальный момент	3,5	7,5	11,5	17,5	27,5
$[\alpha]_D^{20}$ , град	-0,34	+11	+37	+47	+51	+51

Через 27 мин раствор энергично восстанавливает фелингову жидкость.

б) 2-Дезокси- $\beta$ -метил- $\alpha$ -D-рибопиранозид. Такая же обработка  $\beta$ -аномера дает следующие результаты:

Время, мин	Начальный момент	4	9	15	25
$[\alpha]_D^{20}$ , град	-190	+112	+66	+49	-149

Следовательно, лабильность этого гликозида к кислотам примерно такая же, как и  $\alpha$ -D-изомера.

в) 2-Дезокси- $\alpha$ , $\beta$ -метил- $\alpha$ -D-рибофуранозид. В 15 мл 0,005 н. соляной кислоты растворяют 0,1505 г этого фуранозида (исходное значение  $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$ ) и быстро нагревают до  $100^\circ$ ; оптическое вращение уже через 3 мин достигает постоянной величины.

г) 2-Дезокси- $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид. 0,25 г глюкозида гидролизуют 35 мл 0,05 н. соляной кислоты при  $15^\circ$ , контролируя ход реакции поляризметрически (исходное значение  $[\alpha]_D^{20} = +130^\circ$ ). Через 30 мин реакция еще не заканчивается.

д) 2-Дезокси- $\alpha$ -метил-D-глюкофуранозид. 0,022 г этого вещества гидролизуют 4 мл 0,005 н. соляной кислоты при комнатной температуре; гидролиз проходит полностью за 8 мин.

#### N-2-Дезоксигликозиды

Лабильность N-2-дезоксигликозидных связей к действию кислот иллюстрируется гидролизом гуанозина, описанным Левином и Мори [10].

#### Методика

Дважды перекристаллизованный гуанозин суспендируют в 50 мл 0,01 н. соляной кислоты и смесь доводят до кипения. При этом из образовавшегося вначале раствора вскоре начинает выпадать хлоргидрат гуанина. Смесь кипятят еще 10 мин с обратным холодильником, охлаждают и отфильтровывают хлоргидрат гуанина. К фильтрату добавляют сульфат серебра, отфильтровывают хлорид серебра, избыток ионов серебра удаляют сероводородом, а серную кислоту осаждают гидроокисью бария. Прозрачный раствор упаривают в вакууме, последние следы влаги удаляют упариванием с бензолом и затем со спиртом. Спиртовый раствор выдерживают в эксикаторе при пониженном давлении; через 24—48 час выкристаллизовывается 2-дезоксид-рибоза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Haworth W. N., Hirst E. L., J. Chem. Soc., 1930, 2615.
2. Shafizadeh F., Advances in Carbohydrate Chem., 13, 28 (1953).
3. Hirst E. L., Jones J. K. N., J. Chem. Soc., 1939, 496.
4. Smith F., Montgomery R., Chemistry of Plant Gums and Mucilages, Reinhold Publishing Corp., New York, N.Y., 1959, p. 80.
5. Perlman A. S., Cereal Chem., 28, 382 (1951).
6. Elderfield R. C., Advances in Carbohydrate Chem., 1, 149 (1945).
7. Butler K., Laland S., Overend W. G., Stacey M., J. Chem. Soc., 1950, 1433.

8. Shafizadeh F., Stacey M., J. Chem. Soc., 1957, 4612.
9. Overend W. G., Stacey M., Stanek J., J. Chem. Soc., 1949, 2841.
10. Levine P. A., Mori T., J. Biol. Chem., 83, 803 (1929).

## Метилирование полисахаридов и фракционирование продуктов метилирования

*Е. Л. Херст, Э. Персивал*

### ВВЕДЕНИЕ

Метилирование полисахаридов играет неоценимую роль при выяснении типов связей между различными остатками моносахаридов. Идентификация индивидуальных метилированных сахаров в гидролизате метилированного полисахарида позволяет определить положение всех неметилированных гидроксильных групп в моносахариде, на основании чего можно сделать вывод, что атомы углерода, несущие эти свободные гидроксильные группы, участвуют в образовании связей этого моносахарида в полисахариде. Кроме того, по результатам метилирования можно также определить число остатков в средней повторяющейся единице, природу концевых групп и мест разветвления.

Классическим является метод метилирования полисахаридов, предложенный Хэуорсом, состоящий в обработке полисахарида диметилсульфатом в присутствии водного раствора едкого натра. Методика Хэуорса подвергалась различным модификациям и разрабатывались другие методы метилирования применительно к отдельным полисахаридам. Здесь приводятся описания этих методов. Для полного метилирования многих полисахаридов необходимо проводить обработку несколько раз, причем зачастую различными методами.

После первого метилирования камедей иногда необходимо провести диализ реакционной смеси для выделения частично метилированного продукта. Но, как правило, полисахариды, содержащие уроновые кислоты, можно легко отделить осаждением при подкислении реакционной смеси. В этом случае смесь перед добавлением кислоты должна быть тщательно охлаждена. При работе с некоторыми камедями можно использовать щелочной раствор и как растворитель, и как реагент. Первое метилирование тогда лучше всего проводить при температуре ниже 5°, увеличив продолжительность реакции с 2—3 до 6—12 час.

Некоторые растворимые в воде полисахариды становятся нерастворимыми по мере протекания метилирования; в этом случае надо добавлять ацетон, диоксан или другой подобный растворитель, чтобы метилированный продукт находился в растворе. Чтобы избежать чрезмерного загрязнения полисахарида сульфатом натрия, образующимся в результате реакции, во время заключительного нагревания интенсивность перемешивания снижают. Это приводит к тому, что полисахарид выпадает в виде комков, а не мелких частиц. Если метилированный полисахарид при этой операции, оседает на дно, его можно отмыть от адсорбированного сульфата натрия перемешиванием с горячей или кипящей водой с последующей декантацией.

Иногда может понадобиться выделение низкомолекулярных полисахаридов экстракцией хлороформом. Частично метилированные полисахари-

риды могут, однако, не переходить в хлороформный слой, и тогда надлежит проводить или экстракцию *n*-бутанолом, или диализ. Если метилированный полисахарид проходит сквозь мембрану, его можно отделить от неорганических веществ осаждением 50—60%-ным спиртом.

Ниже приведено детальное описание метилирования следующих полисахаридов — целлюлозы (по Хэурсу), триацетата глюкоманнана (модифицированная методика Хэурса), деградированной альгиновой кислоты (по Мензису), гликана типа амилопектина (метилирование в жидком аммиаке), а также частично метилированных полисахаридов — вишневой камеди (по Пурди), арабиногалактана (модифицированная методика Хэурса) и маннана (модифицированная методика Пурди).

В методики некоторых экспериментов по сравнению с первоначально опубликованными вариантами внесены изменения, являющиеся результатом позднейших исследований.

## МЕТОДИКИ

### *Метилирование по Хэурсу [1]*

Исходный материал следует измельчить как можно мельче. Если, например, берут фильтровальную бумагу, то это достигается энергичным встряхиванием небольших кусочков бумаги с водой и тщательным растиранием полученного после упаривания сухого остатка.

#### Метилирование целлюлозы [2]

Измельченную целлюлозу (4,5 г) перемешивают с 350 мл ацетона в трехгорлой колбе, снабженной механической мешалкой и двумя капельными воронками. При энергичном перемешивании добавляют по каплям одновременно 200 мл диметилсульфата и 400 мл 30%-ного раствора едкого натра<sup>1</sup>, разделенных на 10 равных порций, которые добавляют через каждые 25 мин<sup>2</sup>. После добавления всего количества щелочи и диметилсульфата разрушают избыток последнего и отгоняют ацетон, повышая температуру до 85°. Метилированную целлюлозу отделяют фильтрованием, промывают несколько раз горячей водой, растирают с ацетоном, измельчают до порошкообразного состояния и экстрагируют кипящим хлороформом. Из хлороформного экстракта беззольную метилированную целлюлозу высаживают петролевым эфиром (т. кип. 30—60°); выход 80—95%, содержание ОСН<sub>3</sub>-групп 43,4%. Повторное метилирование в аналогичных условиях приводит к три-О-метилцеллюлозе (найдено: ОСН<sub>3</sub> 45,0%, вычислено для C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>:ОСН<sub>3</sub> 45,6%).

#### Метилирование ацетата целлюлозы [2]

Метилирование 10 г растворимого в ацетоне ацетата целлюлозы (40% СН<sub>3</sub>СО-групп) в 200 мл ацетона можно провести по описанной выше методике. По окончании реакции отгоняют ацетон, объем которого при метилировании остается примерно постоянным, твердый полисахарид отфильтровывают из горячего раствора, растирают с 1 л кипящей воды

<sup>1</sup> Метилирование полисахаридов, содержащих большое количество D-ксилозы, протекает легче при 40—60° и использовании 45%-ного раствора едкого кали.

<sup>2</sup> Проведение метилирования в атмосфере азота уменьшает разрушение лабильных к щелочам полисахаридов.

для удаления неорганических примесей, фильтруют, растирают с уксусом и эфиром, сушат и получают три-О-метилцеллюлозу в виде мелкого порошка; выход 85—98%, содержание  $\text{ОСН}_3$ -групп 45,6%.

### *Модифицированная методика Хэурса*

Ацетат полисахарида или полисахарид, частично метилированный по методу Хэурса, можно превратить в полностью метилированный полисахарид при обработке твердым едким натром и диметилсульфатом в тетрагидрофуране.

#### **Метилирование три-О-ацетилглюкоманнана [3]**

К раствору 6 г триацетата глюкоманнана [3] в 100 мл сухого тетрагидрофурана добавляют в течение двух дней семью порциями 84 мл диметилсульфата и 70 г порошкообразного твердого едкого натра. После добавления второй порции реагентов смесь нагревают до кипения для завершения деацетилирования, затем реакцию проводят при комнатной температуре, причем для сохранения гомогенности раствора добавляют 150 мл тетрагидрофурана. По окончании добавления реагентов смесь кипятят 1 час, охлаждают, фильтруют, осадок растворяют в воде и экстрагируют хлороформом. Метилированный глюкоманнан, полученный после упаривания фильтрата и промывных жидкостей, растворяют в 600 мл хлороформа, раствор промывают водой и хлороформный слой упаривают в вакууме. После очистки путем экстракции уксусом получают метилированный глюкоманнан в виде желтых комков, покрытых коркой; выход 4,38 г. Этот продукт экстрагируют уксусом и полученный раствор выливают в петroleйный эфир, в результате получают метилированный глюкоманнан с содержанием  $\text{ОСН}_3$ -групп 45,3% (вычислено 45,6%); выход 3,69 г (87%).

#### **Метилирование частично метилированного арабиногалактана [4]**

К перемешиваемому раствору 2,08 г частично метилированного арабиногалактана (34,7%  $\text{ОСН}_3$ ) в 50 мл чистого тетрагидрофурана, содержащего 10 г порошкообразного едкого натра, добавляют по каплям 12 мл диметилсульфата и перемешивают 16 час при 23—28°. Затем, чтобы растворить осадок, добавляют воду, разрушают избыток диметилсульфата и отгоняют тетрагидрофуран в токе азота, выдерживая смесь при температуре 60° по крайней мере 1 час. Полисахарид выделяют экстракцией хлороформом и осаждением из хлороформного раствора петroleйным эфиром (т. кип. 30—60°). После повторного метилирования по этой схеме получают продукт, в ИК-спектре которого отсутствует полоса поглощения групп  $\text{ОН}$ ; выход 1,47 г (66%), содержание  $\text{ОСН}_3$ -групп 40,7%.

#### **Метилирование по Мензису [5]**

Провести полное метилирование кислых полисахаридов, таких, как пектовые или альгиновые кислоты, по методу Хэурса очень трудно. Более эффективной в этом случае оказалась модификация метода Мензиса [5], предусматривающая использование гидроокиси таллия(I) и иодистого метила. К особым преимуществам метода относится то, что



метилованию подвергаются и спиртовые гидроксилы, и гидроксилы карбоксильных групп, что приводит к образованию метилового эфира метилированного полисахарида.

### Метилирование деградированной альгиновой кислоты [6]

30 г полисахарида [66] помещают в воду, дают набухнуть и затем переводят в раствор добавлением небольшого количества ( $\sim 20$  мл) 1 н. раствора гидроокиси таллия(I)<sup>1</sup>. К раствору при перемешивании добавляют 150 мл 3,5 н. раствора гидроокиси таллия(I), выпавшее таллиевое производное немедленно отфильтровывают, промывают метанолом и тщательно высушивают в темноте при 60° и остаточном давлении 20 мм. Если надо провести метилирование миллиграммовых количеств полисахарида, можно просто лиофилизовать смесь полисахарида и гидроокиси таллия(I) (см. стр. 302). Полученный лимонно-желтый продукт измельчают и кипятят с 250 мл иодистого метила, содержащего небольшое количество безводного метанола (метанол можно не добавлять, если таллиевая соль полисахарида растворима в иодистом метиле). На этой стадии *необходимым условием является полное отсутствие влаги, а доступ света должен быть максимально ограничен*. Часто лучше проводить реакцию с иодистым метилом в автоклаве при 100°; в этом случае для нейтрализации могущей образоваться кислоты добавляют окись таллия(I) или окись серебра (см. примечание на стр. 463). О завершении метилирования часто свидетельствует изменение окраски раствора от желто-коричневой до канареечно-желтой — окраски иодида таллия(I). Когда смесь перестает быть щелочной (примерно через 60 час), ее упаривают при 30° и остаточном давлении 10 мм. Продукт представляет собой смесь частично метилированной альгиновой кислоты и иодида таллия(I). Нейтральные полисахариды отделяют от иодида таллия растворением в кипящем метаноле; полисахариды, содержащие большое количество уроновых кислот или сульфатных групп, по-видимому, остаются в осадке вместе с иодидом таллия(I), и для их выделения необходимо провести экстракцию горячей водой. Лучше всего провести последовательные исчерпывающие экстракции кипящими метанолом, 50%-ным водным метанолом и водой. При упаривании объединенных экстрактов получают 11,0 г желтого твердого вещества; его растворяют в воде, смешивают со 150 мл 1 н. раствора гидроокиси таллия(I) и выпаривают досуха. Остаток измельчают и кипятят с иодистым метилом, приняв соответствующие (упомянутые выше) меры предосторожности. Полученный в результате частично метилированный продукт снова растворяют в спирте и обрабатывают 55 г этилата таллия(I) (приготовление см. ниже) вместо гидроокиси таллия в 180 мл бензола. Под действием иодистого метила происходит частичное метилирование альгиновой кислоты (содержание групп  $\text{OCH}_3$  примерно 40%). Это вещество можно превратить в полностью метилированный полисахарид при метилировании по Пурди (см. ниже).

Выходы при метилировании по Мензису зависят от типа полисахарида; так, метилированная камедь тернослива была получена с выходом 56% [9].

<sup>1</sup> Гидроокись таллия(I) можно приготовить несколькими способами. а) В кипящую воду помещают металлический таллий и продувают кислород. Реакция идет медленно, за ее ходом можно следить, оттитровывая аликвотные пробы стандартным раствором кислоты. Раствор можно сконцентрировать упариванием в вакууме. б) К раствору сульфата таллия(I) приливают раствор гидроокиси бария и удаляют выпавший сульфат бария. в) Раствор соли таллия пропускают через сильный анионит.

### Получение этилата таллия(I)

Существует несколько методов получения этилата таллия(I) [8].

а) Влажную неочищенную гидроокись таллия(I) (67 г) встряхивают с 20 мл спирта при 20°, через 10 мин спирт декантируют и повторяют обработку. При добавлении третьей порции спирта твердый остаток как бы плавится, и, наконец, после окончательной обработки 10 мл спирта отделяют этилат таллия(I); выход 57 г (76%). Препарат содержит по результатам титрования 82,8% таллия (вычислено 81,95%).

б) При осторожном нагревании перемешивают 456 г окиси таллия(II) и 180 мл формалина (уд. вес 1,084). После окончания бурной реакции смесь разбавляют и фильтруют. При этом возвращается 96 г непрореагировавшей окиси таллия. Слабощелочной фильтрат нейтрализуют муравьиной кислотой, при этом выпадает кристаллический формиат таллия(I); выход 350 г (89%), т. пл. 103°. 50 г этого вещества растворяют в 50 мл воды и кипятят с раствором 8 г натрия в 150 мл спирта. Затем смесь фильтруют в делительную воронку и отделяют этилат таллия(I); выход 41,1 г (82%). Титрование раствора после обработки его активированным углем дает значение 82,9% Тl.

Этилат таллия(I) можно хранить ограниченное время в запаянных ампулах под спиртом в темноте.

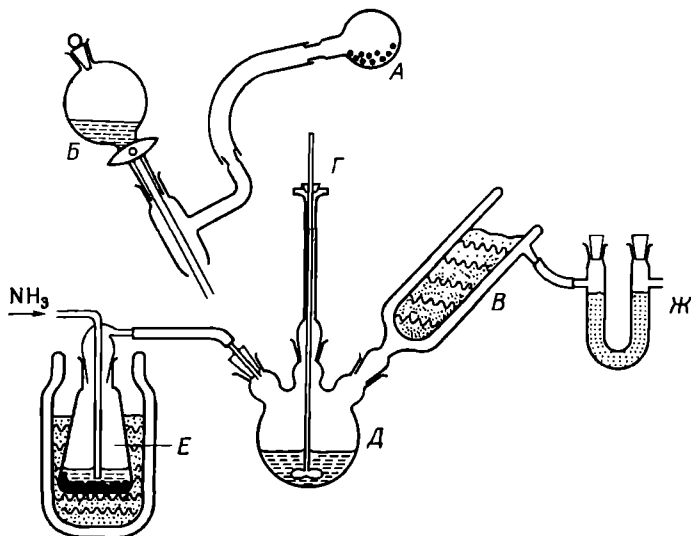
### Метилирование в жидком аммиаке [10]

Полисахариды, набухающие или растворяющиеся в жидком аммиаке, можно, как правило, прометиловать достаточно полно в этой среде, используя иодистый метил и металлические натрий или калий. Если выдерживать полисахарид в растворах амида натрия или калия в жидком аммиаке, может пройти его деградация. Поэтому избыток щелочного металла необходимо свести до минимума и как можно сильнее ограничить время реакции. Было также показано, что в растворе натрия в жидком аммиаке происходит деметилирование полисахаридов с высокой степенью метилирования [11] и поэтому на конечных стадиях метилирования полисахарида концентрация натрия в растворе должна быть минимально возможной. Молярное соотношение иодистого метила и натрия на конечной стадии метилирования должно составлять 1,5 : 1 [10в].

### Метилирование глюкана типа амилопектина [12]

Сухой полисахарид (3,0 г) помещают (см. рисунок) в трехгорлую колбу Д, снабженную мешалкой с затвором и обратным холодильником В, содержащим смесь метанол — сухой лед. Колбу Д наполняют 200 мл сухого аммиака, высушенного над натрием в ловушке Е, затем присоединяют форштосс с капельной воронкой В и колбочкой с натрием А. К раствору при перемешивании добавляют из колбочки А маленькими кусочками ( $4 \times 230$  мг) натрий, для чего колбочку слегка постукивают и аккуратно вращают. Такой способ добавления натрия исключает возможность его контакта с атмосферой. Через 15—30 мин, когда исчезнет голубая окраска, обусловленная наличием свободного натрия, из капельной воронки В добавляют 4,0 мл иодистого метила и смесь кипятят 15—30 мин. Натрий и иодистый метил добавляют еще 4 раза с 30-минутными интервалами. После этого холодильник заменяют хлоркальциевой трубкой, оставляют смесь на ночь при комнатной темпера-

туре, чтобы дать аммиаку улетучиться, а затем нагревают 1 час при  $50^{\circ}$ . К сухой смеси по каплям добавляют 50 мл воды и водный раствор диализуют до полного удаления неорганических солей. Частично метилированный полисахарид выделяют лиофилизацией (см. стр. 302) и подвергают дополнительному двукратному метилированию в тех же самых условиях;



выход около 50% (найдено  $\text{OCH}_3$ -групп 45,3%, вычислено для три-О-метилгексогликана 45,6%). Выход продукта после первого метилирования довольно низкий, что обусловлено потерей низкомолекулярных веществ во время диализа. В работе [10в] указаны выходы в 88—95%.

Исбелл и сотр. [13, 10г] разработали микрометод метилирования этим способом и расширили возможности его использования для метилирования радиоактивным иодистым метилом. Полисахарид смешивают с 3—4-кратным количеством (по весу) Filter — Cel; этим методом можно провести полное метилирование даже 20 мг образца.

### Метилирование по Пурди [14]

Часто окончательное метилирование полисахарида проводят по методу Пурди. Чтобы можно было применить этот метод, частично метилированный продукт должен растворяться в иодистом метиле или в смеси иодистого метила и небольшого количества метанола или ацетона.

#### Метилирование частично метилированной вишневой камеди в растворе иодистого метила [15]

3 г частично метилированной вишневой камеди растворяют в 70 мл иодистого метила и небольшими порциями добавляют 25 г сухой окиси серебра<sup>1</sup>. Смесь осторожно кипятят при перемешивании 8 час, фильтруют,

<sup>1</sup> Горячий профильтрованный раствор гидроокиси бария (100 г октагидрата гидроокиси бария в 1 л воды) добавляют к горячему раствору нитрата серебра (100 г в 500 мл воды), осевшую окись серебра промывают кипящей водой до полного удаления избытка гидроокиси бария, фильтруют, сушат сначала на пористой пластинке, затем в сушильном шкафу при  $100^{\circ}$  и хранят в эксикаторе.

осадок солей серебра экстрагируют кипящим ацетоном или хлороформом. Объединенные фильтраты и экстракты упаривают и получают метилированный полисахарид. Если образуются коллоидные растворы солей серебра, их можно отделить постепенным добавлением петролейного эфира к хлороформному раствору, так как коллоид оседает раньше метилированного полисахарида.

#### **Метилирование частично метилированного маннана в присутствии N,N-диметилформамида [16]**

Частично метилированный высушенный сиропообразный маннав (2,6 г) растворяют в 50 мл сухого N,N-диметилформамида (ДМФА), добавляют 20 мл иодистого метила и 20 г окиси серебра. Смесь встряхивают на качалке при комнатной температуре в темноте в течение 65 час, фильтруют и промывают серый осадок ДМФА. К объединенным фильтрату и промывным жидкостям добавляют новую порцию иодистого метила (20 мл) и окиси серебра (20 г). Снова встряхивают в течение суток, отфильтровывают соли серебра и к светло-желтому раствору добавляют 100 мл воды. Выпавшие при этом соли серебра растворяют, добавляя раствор цианистого калия. Образовавшийся мутный раствор экстрагируют хлороформом (8 × 50 мл), экстракт упаривают и остаток метилируют в приведенных выше условиях. После четырехкратного повторения операций из хлороформного экстракта выделяют в виде сиропа полностью метилированный полисахарид; выход 2 г, в ИК-спектре отсутствует полоса поглощения групп ОН (см. ниже).

#### **Контроль за полнотой метилирования с помощью инфракрасной спектроскопии**

В ИК-спектрах полисахаридов гидроксильные группы, связанные водородными связями, дают характеристическую широкую полосу поглощения при 3600—3200  $\text{см}^{-1}$ . По мере протекания метилирования интенсивность этой полосы падает, причем полностью метилированный полисахарид не даст поглощения в этой области. Анализируемый метилированный продукт должен быть абсолютно безводным и полностью освобожден от следов гидроксилсодержащих растворителей, хотя этого, однако, бывает очень трудно добиться. Наличие в полисахариде аминогрупп может также затруднить интерпретацию спектра [17].

Спектр полисахарида лучше всего снимать на образцах в виде пасты с вазелиновым маслом или гексахлорбутадиеном. Уже 1—3 мг образца дают хорошие результаты, однако если спектрофотометр снабжен микрокуветами и соответствующими конденсорами, то можно обойтись и несколькими микрограммами.

#### **Фракционирование метилированных полисахаридов**

Метилированный продукт можно очистить путем фракционного осаждения из раствора в ацетоне, спирте или хлороформе добавлением петролейного эфира или охлаждением [18]; можно также проводить экстракцию кипящей смесью этих двух растворителей, взятых в различном соотношении [19].

## Фракционирование метилированного ксилана [19]

20 г метилированного ксилана делят на 2 порции и каждую обрабатывают 150 мл смеси петролейного эфира (т. кип. 60—65°) и хлороформа, постепенно увеличивая концентрацию последнего. Смесь осторожно кипятят на водяной бане в течение 2 час, затем дают осесть нерастворимому осадку, а прозрачный раствор декантируют. Растворитель упаривают в вакууме, а остаток сушат над пятиокисью фосфора при 90—95° и остаточном давлении 15 мм до постоянного веса. Полученные результаты сведены в таблицу. В случае необходимости некоторые фракции можно подвергнуть повторному метилированию.

Номер фракции	Смесь растворителей, СНС1 <sub>3</sub> — петролейный эфир	Выход, %	Содержание золы (в виде сульфатов), %	Содержание ОСН <sub>3</sub> -групп, %	$[\alpha]_D^{20}$ , град
1	0 : 100	0,6	Нет	1,5	—3
2	10 : 90	0,9	0,04	4,2	—7
3	15 : 85	0,25	0,09	18,5	—26,5
4	20 : 80	0,4	0,11	22,0	—33
5	25 : 75	0,4	0,11	38,9	—83
6	30 : 70	41,3	0,2	37,9	—85
7	35 : 65	37	1,4	36,7	—84,5
8	Остаток	15,9	6,2	34,8	—

## ЛИТЕРАТУРА

1. Haworth W. N., J. Chem. Soc., **107**, 8 (1915).
2. Haworth W. N., Hirst E. L., Thomas H. A., J. Chem. Soc., **1931**, 821.
- 2a. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III.
3. Hamilton J. K., Kircher H. W., J. Am. Chem. Soc., **80**, 4703 (1958).
4. Falconer E. J., Adams G. A., Can. J. Chem., **34**, 338 (1956); Adams G. A., Bishop C. T., Can. J. Chem., **38**, 2380 (1960).
5. Fear C. M., Menzies R. C., J. Chem. Soc., **1926**, 937.
6. a) Hirst E. L., Jones J. K. N., J. Chem. Soc., **1938**, 496; б) Hirst E. L., Jones J. K. N., Jones W. O., J. Chem. Soc., **1939**, 1880.
7. O'Donnell J. J., Percival E., J. Chem. Soc., **1959**, 2168.
8. Menzies R. C., J. Chem. Soc., **1930**, 1573.
9. Hirst E. L., Jones J. K. N., J. Chem. Soc., **1939**, 1482.
10. a) Muskat I. E., J. Am. Chem. Soc., **56**, 693 (1934); б) Freudenberg K., Boppel H., Ber., **71**, 2505 (1938); в) Hodge J. E., Karjala S. A., Hilbert G. E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 3312 (1951); г) Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. II.
11. Hess K., Schulze H. A., Krajnc B., Ber., **73**, 1069 (1940).
12. Mackie I. M., Percival E., J. Chem. Soc., **1959**, 1151.
13. Isbell H. S., Frush H. L., Bruckner B. H., Kowkabany G. N., Wampler G., Anal. Chem., **29**, 1523 (1957); Beattie A., Percival E., Biochem. J., **79**, 531 (1961).
14. Purdie T., Irvine J. C., J. Chem. Soc., **83**, 1021 (1903).

15. Jones J. K. N., J. Chem. Soc., 1947, 1055.
16. Kuhn R., Trischmann H., Löw I., Angew. Chem., 67, 32 (1955); Ball D. H., Adams G. A., Can. J. Chem., 37, 1015 (1959).
17. Barker S. A., Foster A. B., Siddiqui I. R., Stacey M., J. Chem. Soc., 1958, 2361.
18. Rebers P. A., Smith F., J. Am. Chem. Soc., 76, 6097 (1956).
19. Chanda S. K., Hirst E. L., Jones J. K. N., Percival E. G. V., J. Chem., Soc., 1950, 1289.

## Гидролиз метилированных полисахаридов

Г. О. Боуенг, Б. Линдберг

### ВВЕДЕНИЕ

Гидролиз метилированных полисахаридов, приводящий к смеси метилированных моносахаридов, является самостоятельной стадией структурного анализа полисахаридов с помощью метилирования. Важно, чтобы происходящие при гидролизе деметилирование и деградация были сведены до минимума; обсуждение с этой точки зрения достоинств и недостатков различных методов гидролиза можно найти в литературе [1, 2]. Поскольку большинство метилированных полисахаридов нерастворимо в горячих водных растворах кислот, сначала обычно проводят предварительную фрагментацию в неводных растворителях или в смеси их с водой.

По первой из приведенных ниже методик [3] первоначальная обработка проводится 90%-ной муравьиной кислотой, а окончательный гидролиз всех гликозидных связей и удаление О-формильных групп, появившихся при предварительной обработке, осуществляют действием разбавленной серной кислоты. Другая методика [4] предусматривает обработку метилированного полисахарида 72%-ной серной кислотой и последующий полный гидролиз образовавшихся растворимых в горячей воде фрагментов горячей 8%-ной серной кислотой.

Было показано [5], что при упаривании водных гидролизатов может происходить потеря тетра-О-метилгексоз и три-О-метилпентоз вследствие их довольно заметной летучести, поэтому перед упариванием гидролизата целесообразно экстрагировать эту группу веществ хлороформом.

### МЕТОДИКИ

#### *Гидролиз с использованием муравьиной и разбавленной серной кислот [3]*

Раствор 2 г метилированного полисахарида (глюкан, вырабатываемый грибами *Pullularia pullullans*) в 100 мл 90%-ной водной муравьиной кислоты выдерживают 1 час при 100°, охлаждают и упаривают в вакууме до сиропа. Сироп растворяют в 100 мл 0,25 М серной кислоты, нагревают 14 час при 100°, нейтрализуют карбонатом бария и центрифугируют. Осадок промывают водой (2 × 25 мл) и спиртом (3 × 50 мл). Объединенные растворы упаривают в вакууме до сиропа при температуре бани не выше 40°; выход смеси метилированных моносахаридов 2,0—2,1 г.

### Гидролиз 72%-ной и 8%-ной серной кислотой [4]

Метилированный полисахарид (арабиноксилан из древесины сосны, 1,3 г) помещают в круглодонную колбу и при охлаждении водой со льдом растворяют в 10 мл 72%-ной серной кислоты. Раствор оставляют на 1 час при комнатной температуре, добавляют 80 мл воды и нагревают 4 час при 100°. Смесь нейтрализуют карбонатом бария, фильтруют, осадок на фильтре тщательно промывают водой и спиртом. Фильтрат упаривают в вакууме при температуре бани не выше 40°; выход 1,2—1,3 г. Полученный сироп содержит, помимо нейтральных, кислые метилированные моносахариды в виде бариевых солей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bouveng H. O., Lindberg B., *Advances in Carbohydrate Chem.*, **15**, 53 (1960).
2. Croon I., Herrström G., Kull G., Lindberg B., *Acta Chem. Scand.*, **14**, 1338 (1960).
3. Bouveng H. O., Kiessling H., Lindberg B., McKay J. E., *Acta Chem. Scand.*, **16**, 615 (1962).
4. Garegg P. J., Lindberg B., *Acta Chem. Scand.*, **14**, 871 (1960).
5. Gardiner J. G., Percival E., *J. Chem. Soc.*, 1958, 1414.

## Периодатное окисление полисахаридов Общие методы

*Г. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит*

### ВВЕДЕНИЕ

При действии иодной кислоты или ее солей на вицинальные гликоли ( $\alpha$ -гликоли) происходит расщепление углеродной цепи с образованием двух альдегидных групп, причем поглощается 1 мол. экв. периодата. В случае  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -триолов происходит двойное расщепление углеродной цепи с образованием 2 альдегидных групп и 1 моля муравьиной кислоты; при таком окислении поглощается 2 моля периодата [1]. Таким образом, невозстанавливающие концевые звенья полисахарида или неконцевые остатки, связанные (1  $\rightarrow$  6)-связью и имеющие 3 рядом расположенные гидроксильные группы, расщепляются с образованием 1 моля муравьиной кислоты и поглощением 2 молей периодата. При окислении неконцевых остатков, связанных (1  $\rightarrow$  2)- или (1  $\rightarrow$  4)-связями, расходуется 1 моль периодата, а муравьиная кислота не образуется. Те остатки моносахаридов, которые не содержат соседних гидроксильных групп, например неконцевые остатки, связанные (1  $\rightarrow$  3)-связями, или места разветвлений с заместителями при C-2 и C-4, не затрагиваются при действии периодата.

Следовательно, окисление полисахарида и количественное определение поглощенного периодата и выделившейся муравьиной кислоты, а также определение количества оставшихся неизменными моносахаридных остатков дают информацию о природе и соотношении гликозидных связей в данном полисахариде [1—4].

Определение количества образовавшейся муравьиной кислоты можно использовать для вычисления степени полимеризации (молекулярного веса) линейного (1 → 4)-полимера, так как известно, что при окислении линейной цепи образуются 3 молекулы муравьиной кислоты: одна из невозстанавливающего и две из восстанавливающего конечного остатка. В случае же разветвленных полисахаридов количество муравьиной кислоты характеризует соотношение конечных и неконцевых моносахаридных остатков в повторяющемся звене. При окислении сильно разветвленных полисахаридов, например гликогена, доля муравьиной кислоты, образующейся за счет окисления восстанавливающего конечного остатка, становится незначительной. Этот метод не применим, если в состав цепи входят остатки с (1 → 6)-связями, при окислении которых также образуется муравьиная кислота.

Ниже приведены общие методы [1, 5] окисления полисахаридов. Обычно полисахарид окисляют разбавленным раствором периодата натрия на холоду, измеряя через определенные промежутки времени количества образовавшейся муравьиной кислоты и израсходованного периодата. Концентрацию периодата определяют титрованием [6—8] или — при работе с микроколичествами веществ — спектрофотометрически [9, 10]. Муравьиную кислоту определяют прямым титрованием стандартным раствором щелочи [11—13], или косвенно — по количеству иода, выделившегося из раствора иодида и иодата калия [12, 14], или по выделению углекислого газа (определяемого манометрически [15]) из бикарбонатного буферного раствора.

## МЕТОДИКИ

### *Периодатное окисление полисахаридов*

Полисахарид растворяют или суспендируют в воде, охлаждают до 5° и прибавляют раствор метапериодата натрия (100%-ный избыток от теоретического количества). Полученный раствор разбавляют водой до концентрации периодата не выше 0,05 М. Чтобы окисление прошло полностью, концентрация полисахарида не должна превышать 1% [16]. Окисление проводят при 5° в темноте, чтобы свести к минимуму возможность протекания побочных реакций. В тех же условиях одновременно проводят и холостой опыт.

Через определенные промежутки времени отбирают аликвотные пробы растворов и измеряют расход периодата и количество выделившейся муравьиной кислоты. Если окисляемый полисахарид дает с водой суспензию, то перед отбором пробы для анализа ее следует энергично взболтать.

### *Определение расхода периодата*

#### *Арсенитный метод [1, 6]*

В колбу, содержащую 1,5 г бикарбоната натрия и избыток стандартного раствора арсенита натрия, добавляют при встряхивании 5 мл аликвотную пробу анализируемого раствора и 1 мл 20%-ного раствора иодистого калия. Через 15 мин избыток арсенита натрия оттитровывают стандартным 0,1 н. раствором иода (по крахмалу). Количество поглощенного полисахаридом периодата рассчитывают в молях на 1 остаток ангидро-глюкозы.



### Иодометрический метод [7, 8]

К 5 мл аликвотной пробы анализируемого раствора быстро добавляют смесь 40 мл воды, 2 мл 20%-ного раствора иодистого калия и 3 мл 0,5 н. серной кислоты. Выделившийся иод немедленно оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата натрия (по крахмалу).

### Спектрофотометрический метод [9, 10]

За расходом периодата можно следить по уменьшению поглощения иона периодата при 222,5 мμ с поправкой на поглощение иодата. Эти измерения можно проводить с количествами сахаров, определяемыми формулой  $\mu M \cdot P = 70 - 100$ , где  $\mu M$  — число микромолей сахара,  $P$  — число молей периодата, расходуемых на окисление 1 моля сахара. Для веществ, поглощающих 1 моль периодата, достаточными являются количества 12—18 мг.

Образец растворяют в 10 мл 0,015 *M* раствора периодата натрия и выдерживают в темноте при 35°. Микрошприцем отбирают аликвотные пробы, разбавляют их в 250 раз и измеряют поглощение полученного раствора на спектрофотометре при 223 мμ. В качестве растворов сравнения применяют исходный раствор периодата (разбавленный в 250 раз) и эквимольный раствор иодата (поглощение составляет ~ 0,6 и 0,1 соответственно). Поглощение 0,015 *M* раствора периодата натрия не меняется в течение 48 час при 35°. Удовлетворительные результаты дают полисахариды, хорошо растворимые в воде или легко диспергируемые в горячей воде.

### Определение муравьиной кислоты

#### Потенциометрическое титрование [11]

Из исследуемого раствора через определенные интервалы отбирают аликвотные пробы по 10 мл и добавляют 1 мл не содержащего кислот этиленгликоля. Смесь встряхивают и оставляют при комнатной температуре не менее чем на 10 мин. Через раствор в течение 10 мин пропускают ток азота, а затем титруют 0,01 *M* раствором едкого натра, свободного от карбонатов (тоже в токе азота) с использованием потенциометра со стеклянным электродом.

#### Титрование щелочью в присутствии индикаторов [12, 13]

Аликвотную пробу анализируемого раствора обрабатывают этиленгликолем, как описано выше, и титруют 0,01 *M* раствором едкого натра или гидроокиси бария, используя в качестве индикатора метиловый красный. Одновременно такой же обработке этиленгликолем подвергают аликвотную пробу холостого опыта. Разность в расходе щелочи между анализируемым раствором и раствором холостого опыта показывает количество выделившейся при окислении полисахарида муравьиной кислоты.

#### Иодометрическое титрование [12, 14]

К 20 мл аликвотной пробе анализируемого раствора добавляют 0,5 мл не содержащего кислот этиленгликоля и через 10 мин избыток иодистого калия. К раствору приливают избыток (10 мл) 0,01 н. раствора тиосуль-

фата натрия и непрореагировавший тиосульфат оттитровывают 0,01 н. раствором иода (по крахмалу). Так же анализируют и раствор холостого опыта.

#### Манометрический метод [15]

При применении указанного метода используют респирометр постоянного объема типа респирометра Варбурга, который калибруют, проводя периодатное окисление известного соединения, например эритрита, в условиях окисления полисахарида. Чтобы защитить от света реакционные сосуды, в которых проводят окисление, в баню респирометра заливают воду, в которой растворена черная краска. Ниже приводится типичная методика окисления при pH 5,7. В сосуд помещают 1,9 мл 0,02 М раствора бикарбоната натрия и 1,0 мл 0,1 М раствора метапериодата натрия, в боковой отросток вводят 0,1 мл 0,02 М раствора бикарбоната натрия и 0,5 мл раствора, содержащего 3,4 мг полисахарида. В боковой отросток второго сосуда (холостой опыт) вместо раствора полисахарида помещают 0,5 мл воды. Через прибор в течение 1 час продувают углекислый газ и затем оставляют на 1 час для установления равновесия и проверки на герметичность. После этого поворачивают боковой отросток, смешивая компоненты. Через выбранные промежутки времени отмечают изменение давления и по калибровочной кривой рассчитывают количество муравьиной кислоты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Jackson E. L., in «Organic Reactions», vol. 2, John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1944, p. 341.
2. Smith F., Montgomery R., Methods Biochem. Anal., 3, 153 (1956).
3. Bobbit J. M., Advances in Carbohydrate Chem., 11, 1 (1956).
4. Smith F., Montgomery R., The Chemistry of Plant Gums and Mucilages, Reinhold Publishing Corp., New York, N.Y., 1959.
5. Dyer J. R., Methods Biochem. Anal., 3, 111 (1956).
6. Fleury P., Lange J., J. pharm. chim. [8], 17, 107 (1933).
7. Malaprade L., Compt. Rend., 186, 382 (1928).
8. Rankin J. C., Jeanes A., J. Am. Chem. Soc., 76, 4435 (1954).
9. Dixon J. S., Lipkin D., Anal. Chem., 26, 1092 (1954).
10. Aspinall G. O., Ferrier R. J., Chem. and Ind. (London), 1216 (1957).
11. Anderson D. M. W., Greenwood C. T., Hirst E. L., J. Chem. Soc., 1955, 225.
12. Halsall T. G., Hirst E. L., Jones J. K. N., J. Chem. Soc., 1947, 1427.
13. Brown F., Halsall T. G., Hirst E. L., Jones J. K. N., J. Chem. Soc., 1948, 27.
14. Abdel-Akher M., Smith F., J. Am. Chem. Soc., 73, 994 (1951).
15. Perllin A. S., J. Am. Chem. Soc., 76, 4101 (1954).
16. Bahl O. P., Smith F., неопубликованные данные.

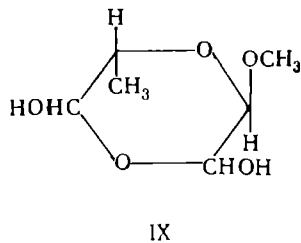
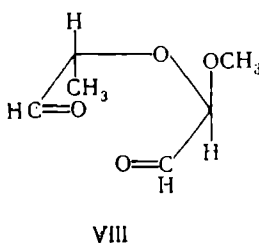
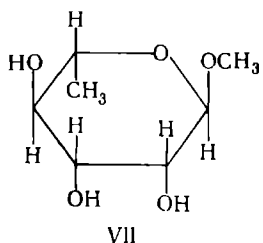
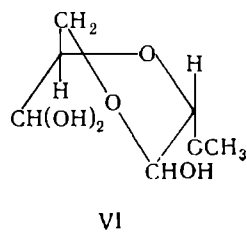
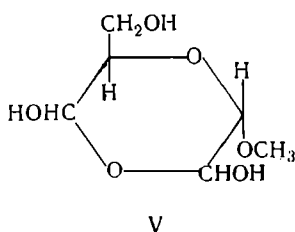
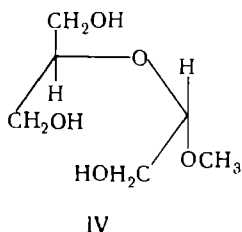
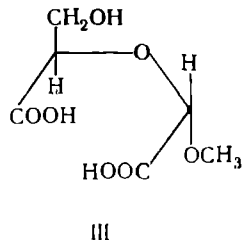
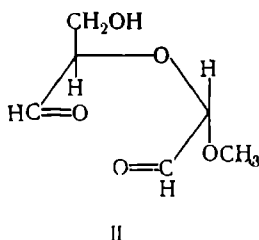
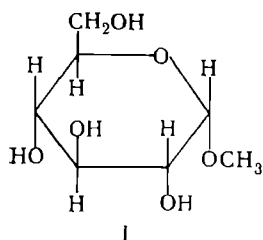
## Контролируемая деградация полисахаридов с помощью периодатного окисления, восстановления и гидролиза (распад по Смит)

*И. Дж. Гольдштейн, Р. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит*

### ВВЕДЕНИЕ

Окисление иодной кислотой или ее солями простых гликозидов, например  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (I), приводит к диальдегиду (II) и муравьиной кислоте [1, 2]. Полученный диальдегид далее окисляют бромом в соответствующую двухосновную кислоту (III). Сочетание этих двух реакций окисления было использовано при изучении структуры гликозидов [2], в частности, для определения конфигурации гликозидного центра. Восстановлением диальдегида (II) с помощью боргидридов металлов можно получить соответствующий полиол (IV). Сопоставление структур гликозидов на основании идентификации образующихся полиолов — задача гораздо более простая, так как полиолы содержат лишь один асимметрический центр [3]; этот подход применим также и к олигосахаридам [4].

Изучение диальдегидов типа II показало [5—7], что они существуют не в виде свободных альдегидов, а в виде циклических полуацеталей (V и VI). То, что так называемые диальдегиды на самом деле представляют

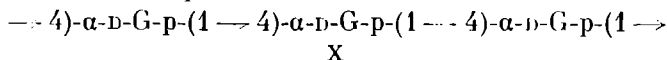


собой соединения с циклической структурой, было доказано тем, что они не поглощают в области инфракрасного спектра, характерной для альдегидной группы, и что при действии ацилирующих агентов они ведут себя подобно спиртам, а не альдегидам<sup>1</sup>. Так, продукт периодатного окисления (VIII)  $\alpha$ -метил-L-рамнопиранозида (VII) образует за счет присоединения молекулы воды кристаллический циклический полуацеталь (IX), из которого легко можно получить кристаллический ди-*n*-нитробензоат [8].

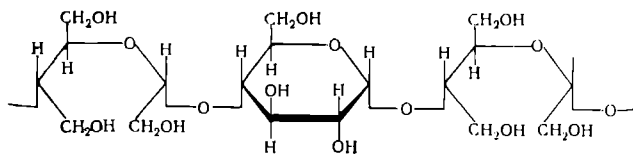
Особый интерес представляет то, что спирты, подобные IV, легко гидролизуются разбавленными минеральными кислотами при комнатной температуре, т. е. ведут себя подобно истинным ацеталам; в то же время циклические полуацетали V, VI и IX относительно устойчивы.

Хотя полиолы уже и раньше применялись для детального изучения строения полисахаридов [9, 10], именно выявление большей по сравнению с обычными гликозидами неустойчивости спиртов типа IV к действию разбавленных кислот при комнатной температуре обеспечило создание нового и более эффективного метода контролируемой деградации полисахаридов [11]. Так, если углеводный остаток в полисахариде был расщеплен периодатом, а затем восстановлен, то образующийся спиртовой фрагмент, будучи истинным ацеталем, лабилен к действию кислот. Если углеводный остаток, не затронутый при периодатном окислении, связан с расщепленным звеном, то гликозидная связь уцелевшего остатка относительно более устойчива к кислоте. Используя заметное различие в устойчивости истинных ацеталей и гликозидов, можно получать из самых разнообразных полисахаридов гликозиды моно-, ди- и олигосахариды, строение которых проливает свет на детали строения исходных полисахаридов [11—13].

Покажем это на примере. Если остаток D-глюкопиранозы расположен между двумя другими остатками D-глюкопиранозы и связан (1 → 4)-связью (X) и если только этот «центральный» участок остался незатронутым при периодатном окислении, то последовательность реакций: периодатное окисление (в этом случае неполное), восстановление до XI и мягкий кислотный гидролиз — приводит к 2-O-D-глюкопиранозил-D-эритриту (XII). Этот гликозид получают из продукта неполного периодатного окисления гликогена и крахмала.



X

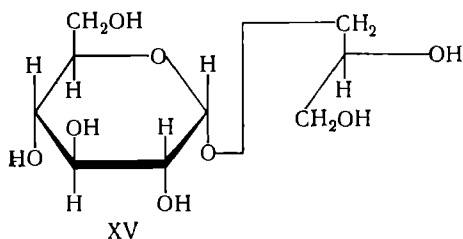
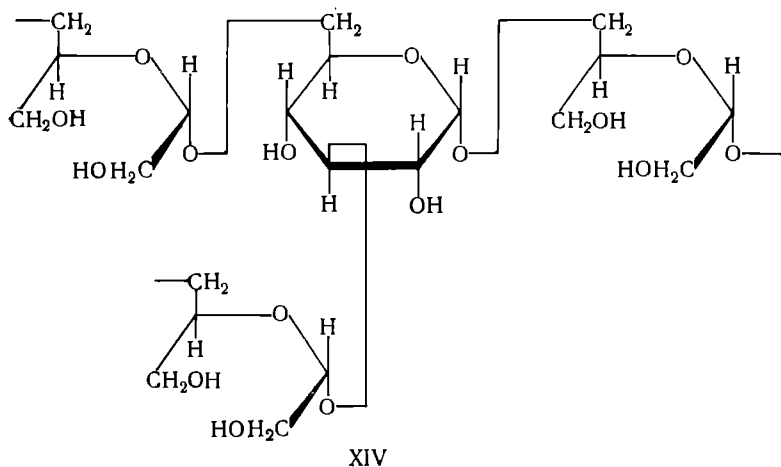
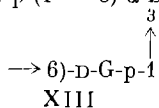
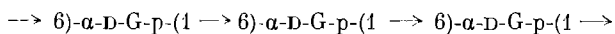


XI

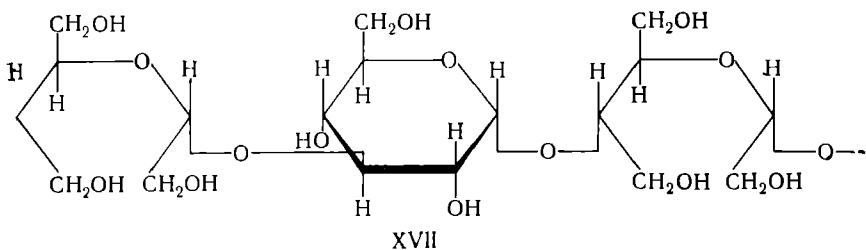
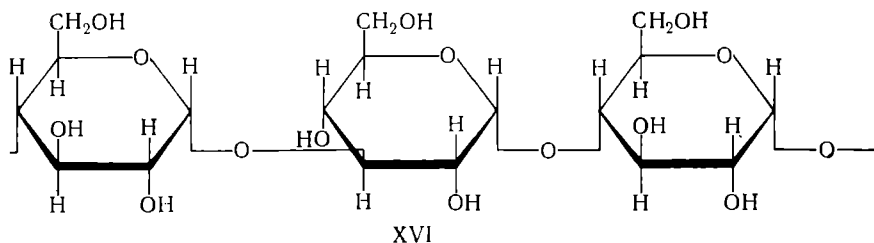
Участок цепи полисахаридов, изображенный схематически ниже (XIII), в котором моносахаридные звенья связаны (1 → 6)-связью, а центральное звено замещено в положении 3 и устойчиво к окислению, как, например

<sup>1</sup> Тем не менее говорить о полном отсутствии у соединений типа II альдегидных функций нельзя, поскольку они, в частности, восстанавливаются боргидридами металлов и вступают в альдольную конденсацию с нитрометаном, что применяется при синтезе 3-нитро (и соответственно 3-амино)-3-дезоксисахаров. — *Прим. перев.*

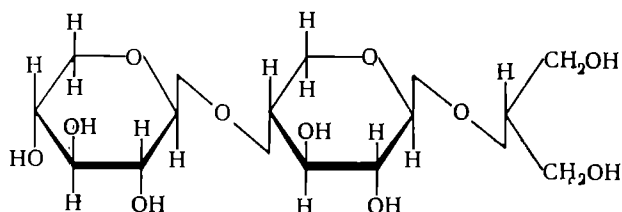
в декстрани, дает при контролируемой деградации из полиола XIV 3-O- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-D-глицерин (XV).



Аналогично, если полисахарид, например нигеран, состоит из остатков глюкозы, соединенных чередующимися  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)- и  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4)-свя-

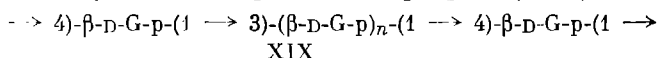


зями (XVI), то с помощью тех же реакций получают через промежуточный полиол XVII 2-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-D-эритрит (XII) [11]. Эта процедура применима и к пентозосодержащим полисахаридам, например гемицеллюлозам. С ее помощью было показано, что гетерополисахарид из костра безостого (*Bromis inermis*) дает 2-О- $\beta$ -D-ксилобиозил-D-глицерин [О- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1  $\rightarrow$  4)-О- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1  $\rightarrow$  2)-D-глицерин] (XVIII). С установлением строения XVIII стало ясно, что эта гемицеллюлоза должна отличаться новой структурной особенностью, связанной с наличием разветвления у соседних остатков ксилозы [13, 14].

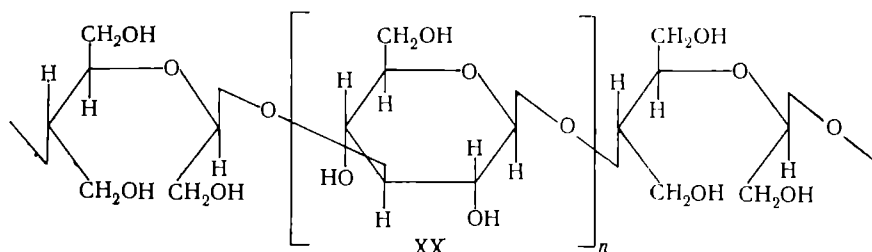


XVIII

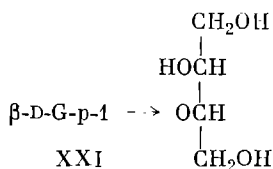
Этим методом из  $\beta$ -D-глюкана (XIX) овсяной муки был получен полиальдегид, который под действием боргидрида натрия дает соответствующий полиол (XX). Мягкий кислотный гидролиз XX показал, что исходный глюкан содержит остатки D-глюкопиранозы, связанные чередующимися (1  $\rightarrow$  4)- и (1  $\rightarrow$  3)-связями [11, 12], так как одним из продуктов распада является 2-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-D-эритрит (XXI). Выделение из



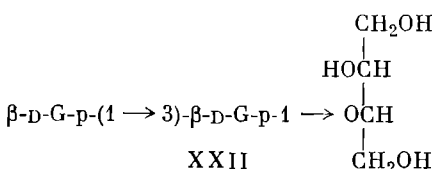
XIX



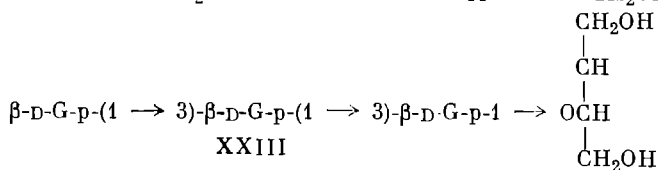
XX



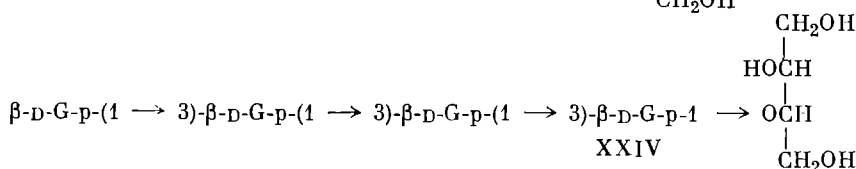
XXI



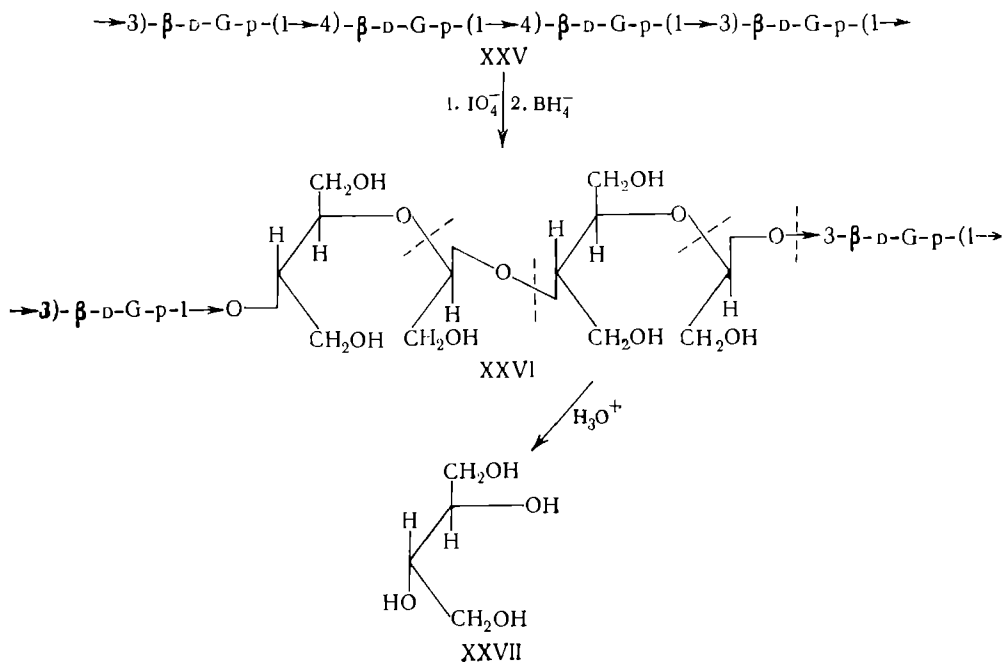
XXII



XXIII



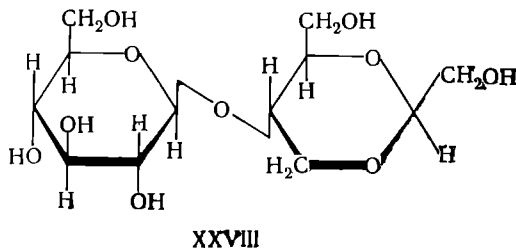
XXIV



гидролизата 2-О-β-ламинарибиозил-Д-эритрита [О-β-Д-глюкопиранозил-(1 → 3)-О-β-Д-глюкопиранозил-(1 → 2)-Д-эритрита] (XXII) доказывает наличие в полисахариде участка цепи, где два (1 → 3)-связанных остатка β-Д-глюкопиранозы расположены между остатками β-Д-глюкопиранозы с (1 → 4)-связями. Присутствие участков цепи, содержащих три и четыре (1 → 3)-связанных остатка β-Д-глюкопиранозы между звеньями с (1 → 4)-связью доказано выделением и идентификацией 2-О-β-ламинаритриозил-Д-эритрита [О-β-Д-глюкопиранозил-(1 → 3)-О-β-Д-глюкопиранозил-(1 → 3)-О-β-Д-глюкопиранозил-(1 → 2)-Д-эритрита] (XXIII) и соответственно 2-О-β-ламинаритетразил-Д-эритрита (XXIV). То, что все эти фрагменты, образующиеся из разных участков полисахарида, содержат только β-глюкозидные связи, подтверждает ферментативный гидролиз β-Д-глюкозидазой, приводящий к Д-глюкозе и эритриту.

Образование, наряду с соединениями XXI—XXIV, эритрита XXVII показывает, что в полисахариде имеются участки, состоящие из двух или более остатков Д-глюкопиранозы, связанных (1 → 4)-связью. К эритриту приводит последовательность реакций XXV → XXVII.

Этот новый метод контролируемой деградации полисахаридов может также приводить к образованию ацетала гликолевого альдегида и 2-О-β-



D-глюкопиранозил-D-эритрита (XXVIII). Такую возможность надо принимать в расчет, особенно если желательно идентифицировать 2-O-β-D-глюкопиранозил-D-эритрит [15].

## М Е Т О Д И К И (СМ. ТАКЖЕ СТР. 467)

### *Контролируемая деградация β-D-глюкана овса*

#### Периодатное окисление

Выделенный из овсяной муки β-D-глюкан (0,733 г),  $[\alpha]_D^{20} +9^\circ$  (в растворе едкого натра), обрабатывают 500 мл 0,04 М раствора периодата натрия при 5° в течение 135 час. Расход периодата составляет 0,58 моля на один остаток ангидроглюкозы и достигает постоянного уровня через 90 час. Чтобы разрушить непрореагировавший периодат, к смеси добавляют вычисленное количество этиленгликоля (0,98 г) и через полчаса раствор помещают в трубку для диализа и диализуют против дистиллированной воды для удаления неорганических солей. Ионы периодата и иодата можно также осадить ацетатом свинца.

#### Восстановление боргидридом натрия

К диализованному раствору (750 мл), содержащему окисленный полисахарид, добавляют в один прием 1,1 г боргидрида натрия и оставляют при комнатной температуре на 10 час. Затем добавляют по каплям 1 н. соляную кислоту для разрушения избытка боргидрида и нейтральный раствор концентрируют в вакууме при 40° до 150 мл.

#### Частичный кислотный гидролиз

К полученному нейтральному раствору полиола добавляют соляную кислоту до ~0,5 н. концентрации и подкисленный раствор оставляют на 8 час при комнатной температуре. Чтобы удалить ионы хлора и натрия, гидролизат последовательно деионизуют дуолитом А-4 (ОН<sup>-</sup>) и амберлитом IR-120 (Н<sup>+</sup>), а затем упаривают в вакууме при 40° досуха. Остаток трижды упаривают со 150 мл метанола, чтобы удалить борную кислоту в виде летучего метилбората; выход 0,45 г. Исследование нейтрального гидролизата методом хроматографии на бумаге в системе пиридин — этилацетат — вода (2 : 5 : 7 по объему) показывает наличие эритрита и целой серии менее подвижных гликозидов эритрита.

#### Выделение компонентов

Разделение компонентов гидролизата проводят с помощью препаративной хроматографии на бумаге ватман ЗММ в системе пиридин — этилацетат — вода (2 : 5 : 7 по объему). Участки хроматограммы, соответствующие индивидуальным соединениям, элюируют водой, элюаты фильтруют и упаривают в вакууме досуха. Полученные продукты очищают и характеризуют обычным образом, так были идентифицированы следующие соединения: а) эритрит (XXVII), 0,030 г,  $R_{\text{глюкоза}} (R_{\text{гл}})$  1,73, т. пл. 122° (из спирта); б) 2-O-β-D-глюкопиранозил-D-эритрит (XXI), 0,155 г,  $R_{\text{гл}}$  0,75, т. пл. 192—193° (из водного метанола),  $[\alpha]_D^{20} -17^\circ$  (с 2,0 в воде) [16]; в) 2-O-β-D-ламинарибиозил-D-эритрит (XXII), 0,020 г,  $R_{\text{гл}}$  0,44



$[\alpha]_D^{25} -16^\circ$  (с 0,8 в воде); г) 2-О-β-ламинаритриозил-Д-эритрит (XXIII), 0,011 г,  $R_{гд}$  0,26, т. пл. 214—248°; д) 2-О-β-Д-ламинаритетраозил-Д-эритрит (XXIV), 0,005 г,  $R_{гд}$  0,18; е) 2,4-бис-оксиметил-5-О-β-Д-глюкопиранозил-1,3-диоксан (XXVIII), 0,020 г,  $R_{гд}$  1,27,  $[\alpha]_D^{25} +11^\circ$  (с 2,8 в воде). Ацетилирование XXVIII уксусным ангидридом в пиридине дает кристаллический гексаацетат, т. пл. 156,5° (из спирта). При метилировании этого гексаацетата по Хэуорсу и Пурди (см. стр. 458) образуется кристаллическое гексаметильное производное, т. пл. 65,5—66,5°,  $[\alpha]_D^{25} +22^\circ$  (с 3,5 в хлороформе).

### **Контролируемая деградация гемицеллюлозы из костра безостого (*Bromis inermis*)**

#### **Периодатное окисление гемицеллюлозы из костра безостого**

10 г гемицеллюлозы костра безостого окисляют 3,5 л 0,1 н. иодной кислоты в темноте при 7° в течение 21 дня, пока расход периодата не станет постоянным и равным 0,88 моля на 1 остаток ангидроксидозы. Нерастворимый остаток (2,55 г) отделяют центрифугированием, надосадочную жидкость, содержащую основное количество полиальдегида, нейтрализуют карбонатом бария и отфильтровывают неорганические соли.

#### **Восстановление и мягкий кислотный гидролиз**

Раствор, содержащий полиальдегид, обрабатывают 5,5 г боргидрида натрия, добавляя его в один прием, оставляют при комнатной температуре на 12 час, а затем нейтрализуют уксусной кислотой, концентрируют до 160 мл и подкисляют 0,2 н. соляной кислотой до pH 1. После шестичасовой выдержки при комнатной температуре раствор нейтрализуют бикарбонатом натрия, упаривают досуха, остаток трижды обрабатывают 1%-ным раствором хлористого водорода в метаноле, упаривают в вакууме при 25° и получают гидролизат, не содержащий борной кислоты. При упаривании этого гидролизата, предварительно деионизованного последовательной обработкой катионитом и анионитом, получают сироп; выход 3,78 г.

#### **Выделение компонентов гидролизата**

Порцию гидролизата (2,5 г) фракционируют на колонке с активированным углем, используя градиентное элюирование (0—10%-ный раствор спирта в воде) (см. стр. 13). Компоненты характеризуют обычными методами. Были идентифицированы следующие соединения: а) этиленгликоль (0,12 г) в виде бис-*n*-нитробензоата, т. пл. 145° (из смеси метанола и этанола); б) глицерин (0,74 г) в виде трис-*n*-нитробензоата, т. пл. 195—196° (из хлороформа со спиртом) в) эритрит (XXVII), 0,27 г, т. пл. 118—119° (из спирта); г) 2-О-β-Д-глюкопиранозил-Д-эритрит (XXI), 0,21 г, т. пл. 185—187° (из метанола),  $[\alpha]_D^{25} -16^\circ$  (с 1 в воде) [16]; д) 2-О-β-Д-ксилопиранозилглицерин, 0,64 г, т. пл. 109—111°,  $[\alpha]_D^{25} -47^\circ$  (с 1,2 в воде) [17]; после перекристаллизации из изопропанола и обработки хлористым бензоилом в пиридине получен пентабензоат, т. пл. 105—106° (из метанола),  $[\alpha]_D^{25} -36^\circ$  (с 2,1 в лутидине); е) 2-О-β-Д-ксилобиозилглицерин (XVIII), 0,06 г,  $[\alpha]_D^{25} -46^\circ$  (с 1,3 в воде); этерификация *n*-нитробензоилхлоридом в пиридине приводит к кристаллическому гептакис-*n*-нитробензоату, т. пл. 134—137°,  $[\alpha]_D^{25} -30^\circ$  (с 1 в хлороформе).

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. H é r i s s e y H., F l e u r y P., J o l y M., J. pharm. chim., [8], **20**, 149 (1934).
2. J a c k s o n E. L., H u d s o n C. S., J. Am. Chem. Soc., **58**, 378 (1936); **59**, 994 (1937).
3. S m i t h F., V a n C l e v e J. W., J. Am. Chem. Soc., **77**, 3091 (1955).
4. H a m i l t o n J. K., H u f f m a n G. W., S m i t h F., J. Am. Chem. Soc., **81**, 2176 (1959).
5. C a d o t t e J. E., D u t t o n G. G. S., G o l d s t e i n I. J., L e w i s B. A., S m i t h F., V a n C l e v e J. W., J. Am. Chem. Soc., **79**, 691 (1957).
6. G o l d s t e i n I. J., S m i t h F., Chem. and Ind. (London), 40 (1958).
7. G o l d s t e i n I. J., L e w i s B. A., S m i t h F., Chem. and Ind. (London), 595 (1958).
8. G o l d s t e i n I. J., L e w i s B. A., S m i t h F., J. Am. Chem. Soc., **80**, 939 (1958).
9. S m i t h F., S p r i e s t e r s b a c h D., Abstracts Papers, Am. Chem. Soc., **128**, 15D (1955).
10. A b d e l - A k h e r M., H a m i l t o n J. K., M o n t g o m e r y R., S m i t h F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4970 (1952).
11. G o l d s t e i n I. J., H a y G. W., L e w i s B. A., S m i t h F., Abstracts Papers, Am. Chem. Soc., **135**, 3D (1959).
12. S m i t h F., M o n t g o m e r y R., Chemistry of Plant Gums and Mucilages, Reinhold Publishing Corp., New York, N.Y., 1959, p. 377.
13. S m i t h F., Intern. Symp. Carbohydrate Chem., Birmingham, England, 1962.
14. M y h r e D., Ph. D. Thesis, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, 1962.
15. L e w i s B. A., S m i t h F., Abstracts Papers, Am. Chem. Soc., **144**, 8D (1963).
16. C h a r l s o n A. J., P e r l i n A. S., Can. J. Chem., **34**, 1200 (1956).
17. C h a r l s o n A. J., G o r i n P. A. J., P e r l i n A. S., Can. J. Chem., **35**, 365 (1957).

### Периодатное окисление нейтральных полисахаридов: окисление до формальдегида

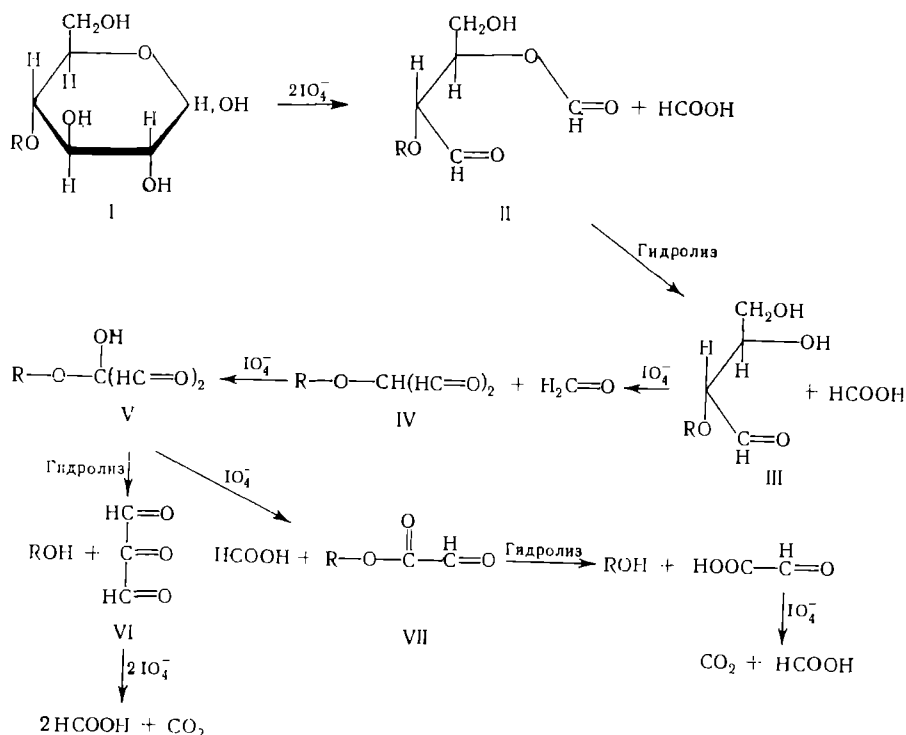
Окислительное расщепление олиго- и полисахаридов с восстанавливающего конца, полумикроопределение образующегося формальдегида; применение для структурного анализа

*Л. Х а ф*

### В В Е Д Е Н И Е

При периодатном окислении находящейся на восстанавливающем конце олиго- или полисахарида альдогексозы, соединенной с ближайшим остатком моносахарида ( $1 \rightarrow 2$ )-, ( $1 \rightarrow 3$ )- или ( $1 \rightarrow 4$ )-связью, образуются 1 моль формальдегида и производное диальдегида малоновой кислоты (IV). Это производное является лишь промежуточным продуктом, так как оно подвергается дальнейшему окислению [1] (этот процесс часто называют «переокисление»), приводящему к муравьиной кислоте и 1 моль углекислого газа. При этом освобождается гликозидный гидроксил предпоследнего моносахарида, который теперь является восстанавливающим концом и начинает сам окисляться.

При таком окислении линейный полимер, содержащий остатки альдогексоз, связанные только (1 → 2)-, (1 → 3)- или (1 → 4)-гликозидными связями, может быть полностью разрушен с восстанавливающего конца



с образованием 1 моля формальдегида и 1 моля углекислого газа на 1 остаток гексозы. Так же будет окисляться и линейный полимер, содержащий (1 → 2)- или (1 → 3)-связанные остатки альдопентоз. Все это можно увидеть на примере окисления 4-О-замещенной альдогексозы (I), находящейся на восстанавливающем конце в мальтозе, целлобиозе, лактозе, целлюлозе, крахмале и гликогене. Окисление протекает через образование формильного производного (II) [2], гидролиз которого приводит к 2-О-замещенной тетросте (III), окисляющейся до формальдегида и производного диальдегида малоновой кислоты (IV). Активация связи C — H, расположенной по соседству с двумя альдегидными группами в IV, вызывает дальнейшее окисление с образованием соответствующего оксипроизводного (V) [1, 3, 4]. Это производное, являющееся полуацеталем, разрушается или за счет гидролиза до мезоксалевого альдегида (1,2,3-пропантриона) (VI), или за счет окисления до эфира глиоксиловой кислоты (VII). В обоих случаях конечный результат один и тот же; выделяется 1 моль углекислого газа и освобождается следующий моносахарид [5—7].

В соответствии с этой схемой (1 → 4)-связанные дигексозиды, такие, как мальтоза, лактоза и целлобиоза, окисляются с поглощением 11 молей периодата и образованием 9 молей муравьиной кислоты, 1 моля углекислого газа и 2 молей формальдегида [6, 8, 9]. Ламинарибиоза [3-О-(β-D-глюкопиранозил)-D-глюкопираноза] и софороза [2-О-(β-D-глюкопиранозил)-D-глюкопираноза], как и следует ожидать, дают 1 моль углекислого газа и 2 моля формальдегида [5, 6, 10]. Для определения формальдегида

можно с успехом применять полумикрометод, основанный на модифицированной колориметрической реакции с хромотроповой кислотой [11], проводимой после удаления иона периодата из реакционной среды [12]. При окислении полисахаридов к реакционной смеси добавляют *n*-оксибензальдегид, так как в его отсутствие обычно получают низкие выходы формальдегида. Предположение о том, что это обусловлено конденсацией формальдегида с производным диальдегида малоновой кислоты [13], неверно; вероятно, формальдегид взаимодействует с диальдегидами, образующимися при окислении пиранозидов и фуранозидов [14]. Количество углекислого газа, выделившегося при периодатном окислении углеводов, легко определить манометрическим методом в приборе Варбурга [6] (см. стр. 470). Необходимо отметить, что измерение скорости образования формальдегида и углекислого газа следует проводить до получения постоянного значения.

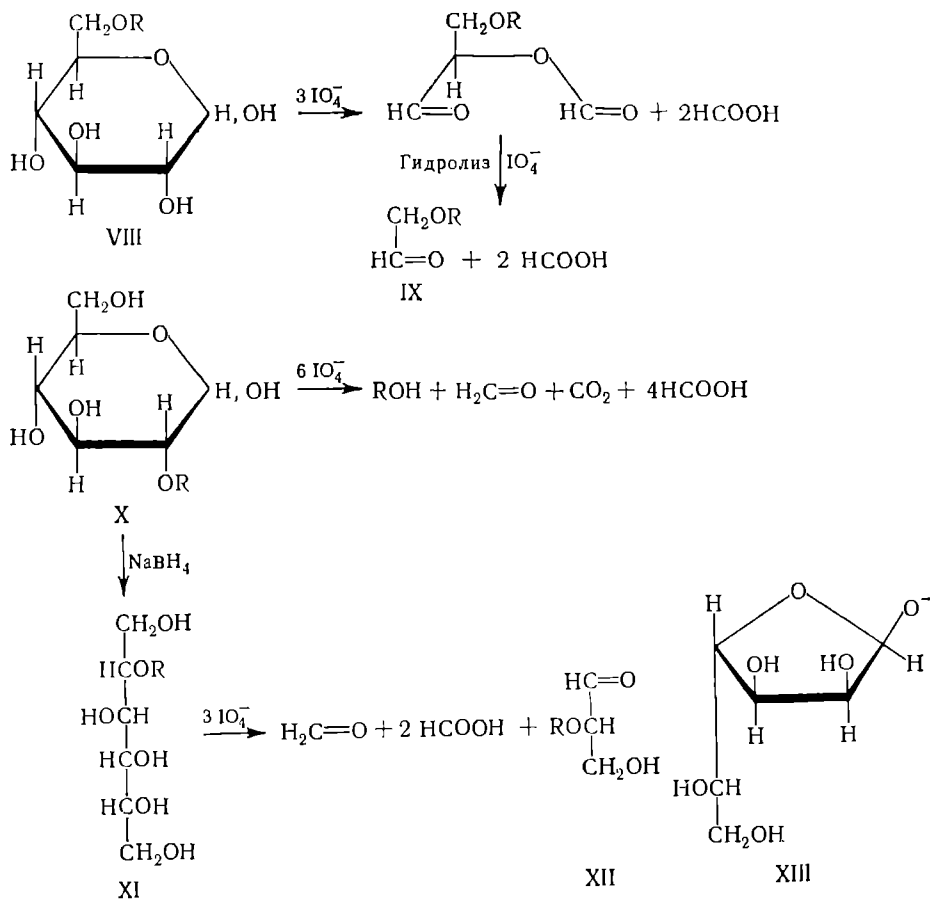
Скорость образования формальдегида зависит от многих факторов: от концентрации периодата и углеводного соединения, от температуры и особенно от pH реакционной смеси [7]. Условия проведения реакции периодатного окисления углеводов должны быть очень тщательно определены, и, если нужны точные данные, необходимо провести соответствующие контрольные эксперименты. Гидролиз формиатов (II) и эфиров глиоксильной кислоты (VII) — промежуточных продуктов реакции — в 0,015 *M* растворе периодата при pH  $\sim 3,6$  и температуре 18° протекает, как правило, очень медленно; следовательно, именно эта стадия определяет скорость последующего окисления [2, 7]. Скорость гидролиза этих эфиров до некоторой степени определяется индуктивным эффектом заместителей в спиртовом компоненте [2]. При более высоких и более низких значениях pH скорость гидролиза существенно возрастает, особенно при pH  $> 7$ . Так, выделение 2 молей формальдегида при окислении (1  $\rightarrow$  4)-дигексопиранозидов 0,015 *M* раствором периодата заканчивается через 5 мин при pH 8 (фосфатный или бикарбонатный буфер) и температуре 50° или через 4 час при 18°, тогда как при pH 3,6 и температуре 50 и 18° реакция не заканчивалась и по истечении 4 и 48 час соответственно [5]. В фосфатном буфере скорость периодатного окисления углеводов повышается, и, несмотря на то, что выход формальдегида при использовании этого буфера всегда количественный, установлено, что в ходе реакции происходит окисление диальдегидов, сопровождающееся появлением лишнего количества углекислого газа [6, 15].

При окислении 0,05 *M* раствором периодата нерастворимого ламинарана (см. стр. 371) — гетерогенного полисахарида бурых водорослей — в течение 40 час при 18° и pH 8 количество выделившегося формальдегида достигает постоянной величины, равной 0,5 моля на один остаток сахара [5], что соответствует данным [16—18] о содержании в нем большого числа (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-глюкопиранозильных остатков. В незабуференном растворе метaperиодата натрия ламинаридекстрины [олиго-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-глюкопиранозиды] подвергаются переокислению, причем скорость поглощения периодата прямо пропорциональна степени полимеризации или длине цепи этих олигосахаридов [19].

Обнаружить (1  $\rightarrow$  2)-гликозидную связь на восстанавливающем конце можно, определив полумикрометодом выходы формальдегида, выделяющегося при периодатном окислении полисахарида (X), и продукта его восстановления боргидридом натрия до соответствующего производного полиола [10]. Окисление 2-О-замещенного гексита (XI) или пентита приводит к образованию 1 моля формальдегида и 1 моля 2-О-замещенного

глицеринового альдегида (XII), устойчивого к окислению и, следовательно, останавливающего дальнейшее окисление. Так, при окислении софорита, продукта восстановления софорозы, выделяется лишь 1 моль формальдегида, углекислый газ при этом не образуется.

Если восстанавливающая концевая группа содержит заместитель при первичном гидроксилье, т. е. при С-6 гексозы (VIII) или С-5 пентозы, периодатное окисление ведет к устойчивому 2-О-замещенному гликолевому альдегиду (IX) и ни формальдегида, ни углекислого газа не образуется, что облегчает идентификацию этого типа связи [5, 6, 20]. Мелибиоза [6-О-( $\alpha$ -D-галактопиранозил)-D-глюкоза] и генциобиоза [6-О-( $\beta$ -D-глюкопиранозил)-D-глюкоза] не дают формальдегида даже при продолжительном окислении. Присутствие (1  $\rightarrow$  6)-связи в цепи альдогексоз, связанных (1  $\rightarrow$  2)-, (1  $\rightarrow$  3)- или (1  $\rightarrow$  4)-связями, препятствует дальнейшему окислительному разрушению. Положение этого звена по отношению к восстанавливающему концу может быть установлено по результатам количественного определения формальдегида, выделившегося при периодатном окислении (рН 8). Выделение только 1 моля формальдегида из панозы [О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1  $\rightarrow$  6)-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1  $\rightarrow$  4)-D-глюкозы] подтверждает ее структуру [5]. Клинический декстран не дает формальдегида, и это указывает на наличие (1  $\rightarrow$  6)-связи в восстанавливающей концевой



группе [5]. Применение указанного метода к маннану, выделенному из культуральной среды *Penicillium charlesii* G. Smith и содержащему, как было раньше показано, восемь остатков маннопиранозы с (1 → 2)-связями и одно (1 → 6)-разветвление, позволило установить, что это разветвление расположено в середине цепи, т. е. по обе стороны от него находится по 4 остатка маннопиранозы, поскольку при окислении выделилось 3 моля формальдегида [5]. Количество формальдегида, образующегося при периодатном окислении (рН 3) галактана из *P. charlesii* G. Smith, содержащего остатки D-галактофуранозы, связанные (1 → 5)-связью (формальдегид образуется за счет окисления псевдостанавливающей концевой группы XIII), соответствует ранее полученным данным, что средняя длина цепи — 10 единиц [13].

При окислении целлобиита из остатка сорбита быстро выделяется 2 моля формальдегида, образование третьего моля из глюкозидного остатка протекает медленнее [5, 10]. Таким образом, можно определить остаток гексита в полимере и молекулярный вес полимера, зная расход периодата в начальный момент окисления (определяемый по кривой зависимости расхода периодата от времени). Окисление следует проводить при  $\text{pH} > 5$ , так как образующиеся на промежуточных стадиях реакции окисальдегиды при  $\text{pH} 3-5$  могут циклизироваться в ацетали [21], которые при дальнейшем окислении дают формиаты, снижая тем самым выход формальдегида. Если концевой остаток гексита содержит заместители при C-2, C-5 или C-6, то он дает 1 моль формальдегида на молекулу полимера, тогда как в случае (1 → 3)- или (1 → 4)-связей формальдегида на начальной быстрой стадии реакции выделяется 2 моля формальдегида. Результаты определения этим методом молекулярного веса маннана *P. charlesii* находятся в соответствии с данными, полученными другими методами. Подобный подход был использован для определения соотношения концевых остатков маннита и D-глюкозы в ламинаране и средней длины полисахаридных молекулах с такими же концевыми группами [16, 18]. Был разработан полумикрометод, позволяющий проводить восстановление олигосахаридов боргидридом и последующее периодатное окисление *in situ* без выделения восстановленного продукта [40].

Применение этих методов к полисахаридам с высоким молекулярным весом требует соблюдения условий, в которых образование формальдегида и углекислого газа протекало бы довольно быстро, но не происходило бы ни гидролиза гликозидных связей, ни сколько-нибудь существенного случайного окисления макромолекулы. При нейтральных значениях  $\text{pH}$  случайные разрывы мальтодекстринов [олиго-(1 → 4)-D-глюкопиранозидов] сопровождают ожидаемое расщепление с восстанавливающего конца [19].  $\alpha$ -Декстрин Шардингера [циклопента-(1 → 4)-D-глюкан], не будучи восстанавливающим соединением, не должен давать формальдегида, однако при его окислении через 22 час при  $\text{pH} 7$  и  $23^\circ$  образуется 1,6 моля формальдегида [19]. Продолжительное окисление  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозидов при различных значениях  $\text{pH}$  (от 1 до 8) приводит к появлению незначительного количества формальдегида, но из  $\alpha$ -метилмальтозида, как и из циклодекстрина, при  $\text{pH} 7,5$  и  $5,0$  его образуется довольно много [22]. Пэрриш и Уилан [19] получили удовлетворительные результаты при  $\text{pH} 2$  и  $50^\circ$ . Было найдено, что в этих условиях эквивалентные количества мальтодекстринов переокисляются с совершенно одинаковой скоростью. Это подтвердилось и при окислении модельных соединений —  $\beta$ -метилмальтозида и  $\beta$ -метилцеллобиозида [22]. Сравнение констант скоростей переокисления (при  $\text{pH} 1,9$  и  $50^\circ$ ) ряда мальто-

декстринов и синтетических амилоз позволило определить значения степеней полимеризации амилоз; найденные значения соответствовали известным величинам, если они не превышали 100 [19]. Этот метод позволяет работать всего лишь с 1,5 мг сахара. Определение скорости перекисления занимает приблизительно 20 час.

## МЕТОДИКИ

Обычно используют следующие буферные растворы (их предварительно разбавляют водой до объема 250 мл):

pH	Составные части
2	6,8 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и 52,5 мл 1 н. $\text{HCl}$
3,6	6,8 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и 45,0 мл 1 н. $\text{HCl}$
5,0	4,7 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и 0,9 мл ледяной $\text{CH}_3\text{COOH}$
7,0	3,58 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 0,90 г $\text{KH}_2\text{PO}_4$
~7,5	100 мл насыщенного водного раствора $\text{NaHCO}_3$
7,7	5,37 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 0,23 г $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Полисахарид, который надо окислить, высушивают в вакууме при 60° над осушителем или определяют содержание влаги и вносят соответствующую поправку.

Точно взвешенную навеску вещества (~0,0002 моля) растворяют в смеси 5 мл буферного раствора, 1 мл 0,1 н. раствора *n*-оксибензальдегида и 1 мл 0,3 *M* раствора метальериодата натрия и быстро разбавляют водой до 20 мл. Реакционную смесь, находящуюся в закрытом сосуде, помещают в термостат, защищая от света.

Используемый для определения формальдегида реагент готовят следующим образом: 2 г чистой хромотроповой кислоты и 0,2 г хлорида олова(II) растворяют в сосуде из темного стекла в 200 мл воды и прибавляют 66%-ную (по объему) серную кислоту до объема 1 л. Реагент можно хранить в темноте при 0° несколько месяцев.

Для определения количества выделившегося в результате окисления формальдегида отбирают аликвотную пробу (1 мл) и переносят ее в центрифужную пробирку, содержащую 1 мл 20%-ного (вес/об.) раствора дитионата свинца, свежеприготовленного из дитионата бария [11, 23]. Выпавший осадок периодата и иодата свинца отделяют центрифугированием, аликвотную часть надосадочной жидкости (1 мл) тщательно смешивают с 10 мл реагента в центрифужной пробирке и оставляют в темноте на 30 мин. Раствор осветляют центрифугированием, переносят в пробирки с притертой пробкой из стекла пирекс и нагревают на кипящей водяной бане 40 мин в темноте. Окрашенный раствор охлаждают до комнатной температуры и измеряют поглощение при 570 мμ на спектрофотометре. Для построения стандартной калибровочной кривой (0—100 γ формальдегида) проводят окисление эритрита строго в тех же условиях и по кривой рассчитывают содержание формальдегида в анализируемой пробе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Huebner C. F., Ames S. R., Bubl E. C., J. Am. Chem. Soc., 68, 1621 (1946).
2. Hough L., Taylor T. J., Thomas G. H. S., Woods B. M., J. Chem. Soc., 1958, 1212.

3. Wolfrom M. L., Bobbit J. M., J. Am. Chem. Soc., 78, 2489 (1956);  
Bose J. L., Foster A. B., Stephens R. W., J. Chem. Soc., 1959, 3314.
4. Schwarz J. C. P., MacDougall M., J. Chem. Soc., 1956, 3065.
5. Hough L., Perry M. B., Chem. and Ind. (London), 768 (1956).
6. Hough L., Woods B. M., Chem. and Ind. (London), 1421 (1957).
7. Cantley M., Hough L., Pittet A. O., Chem. and Ind. (London), 1126 (1959).
8. Neumüller G., Vasseur E., Arkiv Kemi, 5, 235 (1953).
9. Head F. S. H., Hughes G., J. Chem. Soc., 1954, 603.
10. Hough L., Woods B. M., Perry M. B., Chem. and Ind. (London), 1100 (1957).
11. O'Dea J. F., Gibbons R. A., Biochem. J., 55, 580 (1953).
12. MacFadyen D. A., J. Biol. Chem., 158, 107 (1945).
13. O'Dea J. F., Chem. and Ind. (London), 1338 (1953).
14. Hough L., Pittet A. O., неопубликованные данные.
15. Lindstedt G., Nature, 156, 448 (1945).
16. Anderson F. B., Hirst E. L., Manners D. J., Ross A. G., J. Chem. Soc., 1958, 3233.
17. Peat S., Whelan W. J., Evans J. M., J. Chem. Soc., 1960, 175.
18. Smith F., Unrau A. M., Chem. and Ind. (London), 881 (1959).
19. Parrish F. W., Whelan W. J., Nature, 183, 999 (1959).
20. Whelan W. J., Bines B. J., Biochem. J., 61, i (1955).
21. Cantley M., Hough L., Pittet A. O., Chem. and Ind. (London), 1253 (1959); J. Chem. Soc., 1963, 2527.
22. Hough L., Cantley M., Woods B. M., неопубликованные данные.
23. Fernelius W. C., Inorganic Syntheses, McGraw-Hill, New York, N.Y., vol. 2, 1964, p. 167.

## Определение средней длины цепи полисахаридов с помощью периодатного окисления, восстановления и анализа образующегося полиола

Г. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит

### ВВЕДЕНИЕ

Полиальдегиды, образующиеся при периодатном окислении полисахаридов, в мягких условиях не гидролизуются (гидролиз их в указанных условиях возможен только при применении некоторых особых приемов [1]) и дают карбонилсодержащие фрагменты, с которыми трудно дальше работать. Поэтому перед проведением дальнейших структурных исследований удобнее восстановить эти полиальдегиды в полиолы [2] (см. стр. 471). При гидролизе полиола разбавленной минеральной кислотой образуется смесь простых полиоксисоединений, гликолевого альдегида и свободных сахаров, если в молекуле полиола были фрагменты, устойчивые к периодату. Так, окисление (1 → 4)-глюкана приводит к образованию глицерина из концевого невосстанавливающего остатка и эритрита из неконцевых остатков [3]. Идентификация и количественное определение этих полиолов и свободных сахаров, если они присутствуют в гидролизате, дают информацию о природе связей в исходном полисахариде [3—5].



На количественном определении полиолов, образовавшихся при гидролизе полимерного полиоксисоединения, основан метод определения соотношения концевых и неконцевых остатков, что отвечает среднему повторяющемуся звену [3, 4, 6]. Так, соотношение эритрита (или треита, как в случае (1 → 4)-галактана) и глицерина равно соотношению неконцевых и концевых групп в полисахариде или соотношению три-О-метилгексозы и тетра-О-метилгексозы, если анализируется метилированный полисахарид. Глицерин и тетрит легко разделяют методом хроматографии на бумаге; количественное определение их основано на периодатном окислении и определении формальдегида реакцией с хромотроповой кислотой [7].

При проведении такого рода исследований полисахарид окисляют периодатом (как описано на стр. 467) и освобождают от ионов периодата и иодата одним из следующих методов. Если полиальдегид нерастворим в реакционной смеси или если он становится нерастворимым после замораживания и оттаивания раствора [8], то его отделяют центрифугированием и промывают водой до полного удаления неорганических солей. В случае растворимого полиальдегида периодат разрушают добавлением этиленгликоля, а избыток этиленгликоля и ионы иодата удаляют диализом; ионы периодата и иодата можно также осадить ацетатом свинца.

После удаления неорганических солей полиальдегид сразу восстанавливают боргидридом натрия.

Гидролиз полиола проводят разбавленной минеральной кислотой и гидролизат после деионизации ионообменными смолами исследуют методом хроматографии на бумаге.

Сказанное иллюстрируется ниже на примере амилопектина [4].

## МЕТОДИКИ

### *Восстановление и гидролиз (см. также стр. 471)*

Полисахарид окисляют 0,05 *M* метапериодатом натрия в темноте при 2—4° до достижения постоянного расхода периодата. Как уже указывалось выше, если образовавшийся полиальдегид нерастворим в реакционной смеси или становится нерастворимым после замораживания и оттаивания [8], продукт отфильтровывают или центрифугируют и промывают дистиллированной водой или диализуют (см. стр. 299) до удаления неорганических ионов. В противном случае иодат и периодат осаждают ацетатом свинца, смесь фильтруют или центрифугируют и осадок промывают водой. Для отделения ацетата натрия раствор полиальдегида диализуют или концентрируют при 35—40° до небольшого объема, полиальдегид высаживают метанолом и осадок промывают метанолом до полного удаления ацетата натрия.

5 г полиальдегида из амилопектина растворяют или суспендируют в 300 мл воды, добавляют в один прием 2 г боргидрида натрия и оставляют на 12—24 час. Раствор нейтрализуют уксусной кислотой для разрушения избытка боргидрида натрия и упаривают в вакууме досуха. Остаток обрабатывают 100 мл 1%-ного раствора хлористого водорода в метаноле при комнатной температуре и упаривают в вакууме; эту операцию проводят еще 2—3 раза для отгонки метилбората.

Образовавшийся высокомолекулярный полиол гидролизуют кипячением с 0,1 *N*. HCl в течение 10 час. Охлажденный раствор деионизуют с помощью ионообменных смол и упаривают в вакууме до сиропа. Эритрит и глицерин в гидролизате разделяют хроматографией на бумаге.

### Хроматографическое разделение полиолов

Порцию гидролизата высокомолекулярного полиола (0,91 г) растворяют в спирте и доводят спиртом объем раствора до 10 мл. Аликвотную часть полученного раствора (0,1 мл) наносят полосой на лист бумаги ватман № 1 (20 × 56 см) и хроматографируют нисходящим способом в системе *n*-бутанол — спирт — вода (4 : 1 : 5, по объему) в течение 36 час. Затем с обоих краев бумаги вырезают полоски, опрыскивают их реактивом Толленса [9], отмечают на непроявленной хроматограмме зоны, соответствующие глицерину и эритриту, и экстрагируют каждую индивидуальную компоненту 20 мл воды. Контролем служат экстракты соответствующих зон чистого листа бумаги, также подвергнутого обработке смесью *n*-бутанол — спирт — вода. Экстракты фильтруют через стеклянную вату, содержание полиолов в них определяют по приводимому ниже методу Ламберта и Нейша [7]. Для определения глицерина и эритрита используют алиquotные пробы экстракта объемом 15 и 4 мл соответственно.

### Количественное определение полиолов

#### Окисление иодной кислотой

В мерную колбу емкостью 100 мл помещают алиquotную пробу экстракта, не превышающую по объему 20 мл и содержащую такое количество полиола, которое при окислении даст от 0,12 до 0,55 мг формальдегида. Пробы разбавляют водой до объема 20 мл, подкисляют 1 мл 10 н. серной кислоты, добавляют при помешивании 5 мл 0,1 М раствора периодата натрия и строго через 5 мин — 5 мл 1 М раствора арсенита натрия. Спустя 10—20 сек после добавления арсенита появляется окраска иода, которая затем постепенно исчезает. Через 5—10 мин объем раствора доводят водой до метки и тщательно его перемешивают.

#### Определение формальдегида

Реактив для определения формальдегида готовят растворением 1 г хромотроповой кислоты в 100 мл воды, раствор фильтруют и к нему добавляют серную кислоту (2 : 1, по объему) до 500 мл. Реактив хранят в стеклянной бутылке темного стекла со стеклянной пробкой, срок хранения не более 2—3 недель.

Аликвотные пробы анализируемого раствора (по 1 мл) помещают в пробирки (19 × 150 мм), добавляют по 10 мл реактива, нагревают 30 мин на кипящей водяной бане в штативе с металлическими стенками, чтобы во время нагревания на них не попадал прямой свет, затем охлаждают и измеряют поглощение при 570 мкм. Холостой опыт (окисление и колориметрирование) проводят с контрольным экстрактом чистой хроматографической бумаги (см. выше). Количество полиола (глицерина или эритрита), соответствующее выделившемуся формальдегиду, определяют по стандартной калибровочной кривой, построенной на известном чистом веществе, например эритрите.

В гидролизате 914 мг высокомолекулярного полиола из амилопектина найдено: глицерина 28 мг, эритрита 562,5 мг, следовательно, среднее повторяющееся звено содержит 16 остатков.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Moyer J. D., Isbell H. S., Anal. Chem., **29**, 1862 (1957).
2. Abdel-Akher M., Hamilton J. K., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4691 (1951).
3. Abdel-Akher M., Hamilton J. K., Montgomery R., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4970 (1952).
4. Hamilton J. K., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **78**, 5907 (1956).
5. Sloan J. W., Alexander B. H., Lohmar R. L., Wolff I. A., Rist C. E., J. Am. Chem. Soc., **76**, 4429 (1954).
6. Smith F., Montgomery R., Methods Biochem. Anal., **3**, 153 (1956).
7. Lambert M., Neish A. C., Can. J. Research, **23B**, 83 (1950).
8. Abdel-Akher M., Smith F., Arch. Biochem. Biophys., **78**, 451 (1958).
9. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 21.

## Определение остатков сахаров в частично окисленных полисахаридах

*Г. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит*

### ВВЕДЕНИЕ

Некоторые участки полисахаридов остаются незатронутыми при периодатном окислении вследствие особого положения гликозидных связей [1] или вследствие того, что окислению не дают пройти до конца. Неокисленные моносахариды нельзя определять непосредственно в продукте окисления: альдегидные группы полиальдегида будут реагировать с колориметрическим реагентом и, следовательно, мешать определению. То же относится и к продукту восстановления боргидридом, так как при гидролизе высокомолекулярного полиола образуется гликолевый альдегид (за счет остатков моносахарида C-1 и C-2).

Один из методов, требующий значительного времени, но позволяющий преодолеть это затруднение, состоит в восстановлении продукта периодатного окисления до полиола с последующими гидролизом, хроматографическим разделением и определением сахаров обычными методами [2].

Более быстрый метод [3] основан на метанолизе полиола. Образующийся диметилацеталь гликолевого альдегида легко отгоняется в вакууме, полученный остаток содержит полиол (из фрагментов окисленных сахаров) и метилгликозиды. Содержание сахаров в метанолизате можно непосредственно определить по реакции с фенолом и серной кислотой [4] или любым другим методом. При этом определяют содержание альдоз в высокомолекулярном полиоле, зная которое можно рассчитать количество уцелевших звеньев. В качестве иллюстрации ниже приводится методика исследования окисленного периодатом крахмала [3].

### МЕТОДИКА

*Восстановление полисахарида боргидридом (см. стр. 471)*

К 50—100 мг окисленного периодатом крахмала (60%-ное окисление) добавляют 6 мл водного раствора боргидрида натрия, содержащего 5 мг боргидрида в 1 мл, и оставляют на ночь [2].

### **Метаноллиз высокомолекулярного полиола**

Раствор, содержащий высокомолекулярный полиол, нейтрализуют 1 н. соляной кислотой и упаривают досуха. Остаток кипятят 2 час с 5 мл 2,5%-ного раствора хлористого водорода в метаноле, нейтрализуют карбонатом свинца, фильтруют и упаривают досуха. К остатку добавляют метанол и снова упаривают в вакууме досуха, чтобы удалить последние следы диметилацетата гликолевого альдегида.

### **Определение сахаров реакцией с фенолом и серной кислотой [4, 5]**

Остаток, содержащий метилгликозиды, растворяют в 100 мл воды, отбирают аликвотную пробу (1 мл), добавляют к ней 1 мл 5%-ного раствора фенола и быстро вливают 5 мл концентрированной серной кислоты. Поглощение измеряют при 490 мк, концентрацию глюкозы в пробе определяют по стандартной калибровочной кривой. Содержание глюкозы в образце: найдено 41%, рассчитано по расходу периодата 40%.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Smith F., Montgomery R., Chemistry of Plant Gums and Mucilages, Reinhold Publishing Corp., New York, N.Y., 1959, p. 209.
2. Abdel-Akher M., Hamilton J. K., Montgomery R., Smith F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4970 (1952).
3. Bahl O. P., Mullar T. L., Smith F., J. Org. Chem., **29**, 1076 (1964).
4. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., Anal. Chem., **28**, 350 (1956).
5. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L. and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 395.

## **Распад по Бэрри**

**И. С. О'Колла**

### **ВВЕДЕНИЕ**

Распад по Бэрри представляет собой метод расщепления фрагментов олиго- и полисахаридов, подвергшихся окислению периодатом или тетраацетатом свинца. Бэрри первый применил эту реакцию для полного распада окисленного крахмала и для удаления концевых групп в полисахаридах с (1 → 3)-связями [1]. Позднее метод Бэрри был применен О'Колла для ступенчатого удаления концевых групп из разветвленного полисахарида — галактана улитки [2]; Диллон и сотр. использовали его при изучении гуммиарабика [3].

С тех пор распад широко применяется для детального изучения структуры самых разнообразных углеводов и особенно сложных полисахаридов. Обзор применения метода распада по Бэрри сделали Боувенг и Линдберг [4].

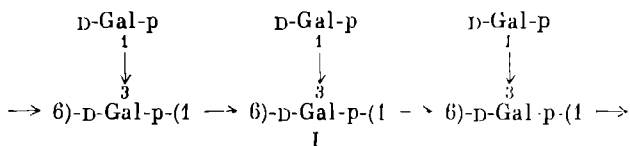
Для проведения распада продукт окисления углевода обрабатывают фенилгидразином в разбавленной уксусной кислоте. Образующийся нерастворимый окрашенный комплекс содержит примерно 1 молекулу фенилгидразина, связывающую каждую диальдегидную группировку [5]. Этот комплекс разрушается при нагревании с водным или спиртовым раствором фенилгидразина в присутствии уксусной кислоты; при этом освобождаются фенолозаксоны и неокисленная часть молекулы, их можно разделить и идентифицировать. Остатки сахаров, уцелевшие после первой деградации и ставшие уязвимыми к действию периодата, удаляют с помощью повторного окисления и деградации. При изучении гуммиарабика потребовалось применить последовательно три окисления и деградации, чтобы «вскрыть» устойчивый скелет молекулы. Приводимые ниже примеры показывают, как можно применять метод деградации для расщепления различных типов окисленных фрагментов, которые могут встретиться в окисленных олиго- и полисахаридах, и какую информацию о структуре можно получить.

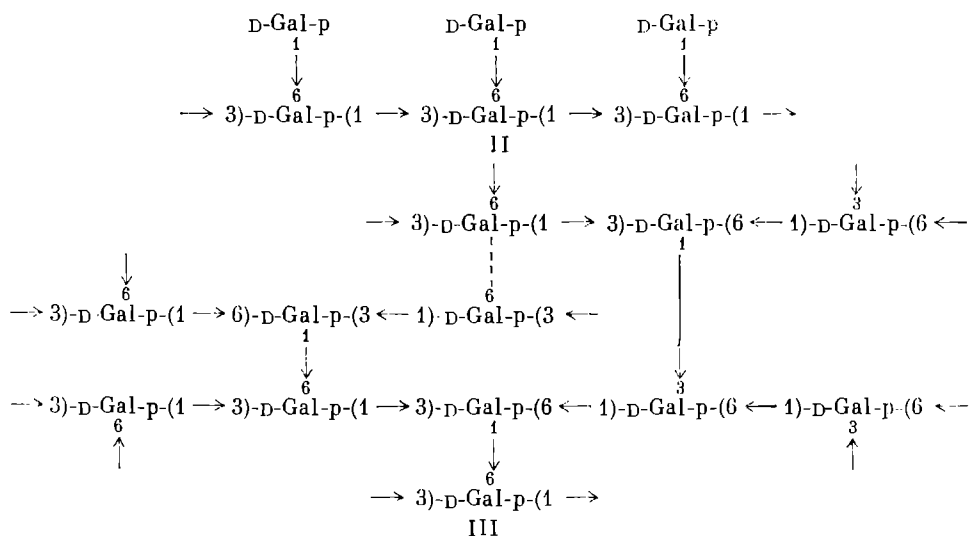
Недостатком метода является то, что в деградированном полисахариде остается некоторое количество азотсодержащих фрагментов. Азот может частично присутствовать в виде фенилозона, образуемого восстанавливающим концом полисахарида, а остальное его количество обусловлено или неполным гидролизом окисленных остатков, или образованием циклических систем типа рубазоновой кислоты [6]. При повторном проведении распада эти остатки могут вновь окисляться и конденсироваться с фенилгидразином [7].

## МЕТОДИКИ

*Ступенчатое отщепление невосстанавливающих концевых групп в некоторых полисахаридах*

При гидролизе метилированного галактана, выделенного из улитки, образуются эквимольные количества 2,4-ди-О-метил- и 2,3,4,6-тетра-О-метил-D-галактозы; это указывает, что половина всех остатков галактозы находится на невосстанавливающих концах и может быть разрушена при периодатном окислении. На основании результатов метилирования можно представить две структуры (I и II). Полисахарид, обладающий строением I, должен полностью разрушиться при второй деградации, если же справедлива структура II, то полисахарид не должен больше разрушаться. Было найдено, что после первой деградации половина вещества возвращается в виде полимерного галактана (возможны обе структуры). Однако после второй деградации снова половина вещества вернулась в виде полисахарида, тот же результат был получен и после третьей и четвертой деградаций. Это доказывает, что ни структура I, ни структура II не отвечает галактану улитки. Полученные результаты говорят о двустороннеразветвленной структуре (III) галактана или же о наличии скелета, содержащего (1  $\rightarrow$  3)-связанные остатки галактозы, причем к каждой из них присоединена структура такого типа.





Распад по методу Барри был также успешно применен при исследовании гуммиарабика [3], арабиногалактана лиственницы [8], камедей из *Dilsea edulis* [9] и *Cladophora rupestris* [10].

#### Окисление (см. стр. 467)

Раствор 5 г галактана в 50 мл воды обрабатывают 200 мл 0,18 М раствора метапериодата натрия. Ход окисления контролируют, определяя количество муравьиной кислоты (в аликвотных пробах по 1 мл) и расход периодата (в аликвотных пробах по 0,25 мл). Окисление заканчивается через 16 час; при этом расход периодата в расчете на 162 г галактана составил 1,16 моля и выделилось 0,55 моля муравьиной кислоты.

#### Выделение окисленного продукта

Раствор, содержащий окисленный продукт, обрабатывают этиленгликолем для восстановления периодата и освобождают от иодата диализом или осаждением ацетатом свинца. Избыток ионов свинца осаждают серной кислотой (см. также стр. 484). Тремя объемами спирта высаживают окисленный полисахарид и высушивают до порошкообразного состояния;  $[\alpha]_D +11^\circ$  (с 1,0 в воде). Если нет необходимости выделять окисленный продукт, то непосредственно к раствору, свободному от ионов иодата, добавляют 20 мл фенилгидразина и 20 мл уксусной кислоты. Нерастворимый продукт конденсации, содержащий примерно 1 остаток фенилгидразина на 1 диальдегидную группировку, выделяется в виде вязкой коричневой массы.

#### РАСПАД

К 4,7 г окисленного галактана или суспензии его комплекса с фенилгидразином в 80 мл воды добавляют 30 г фенилгидразина и 60 мл уксусной кислоты и нагревают при  $100^\circ$  2 час. Комплекс с фенилгидразином постепенно растворяется. К окрашенному раствору приливают 3 объема спирта, отфильтровывают выпавший полисахарид, исчерпывающе экстрагируют его уксусной кислотой, спиртом и эфиром. В результате получают 2,3 г

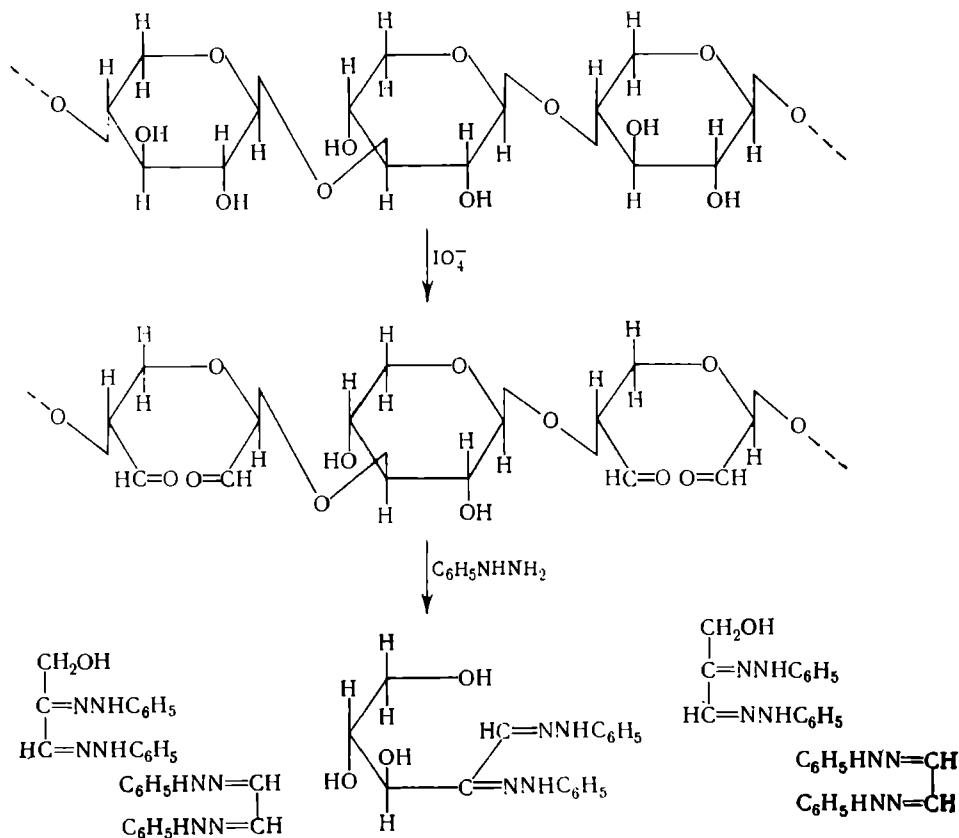
светло-желтого растворимого в воде порошка;  $[\alpha]_D + 31^\circ$  (с 0,4 в воде), содержание азота 1,1%.

Исследование спиртовых растворов озонов методом круговой хроматографии [11] показало наличие лишь фенилозона глицеринового альдегида и бис-фенилгидразона глиоксаля. Отсутствие высших озонов указывает, что распад молекулы был неглубоким.

Вторую, третью и четвертую деградации проводят подобным образом и в каждом случае получают деградированный галактан с выходом 50% от исходного. Количество связанного азота при этом, однако, нарастает, и после четвертой деградации продукт содержит 2,4% азота; природа связи атомов азота неизвестна.

**Расщепление линейного полисахарида, содержащего некоторое количество устойчивых к периодатному окислению фрагментов**

Хорошим примером расщепления такого рода служит деградация ксилана красной водоросли *Rhodymenia palmata*, описанная Бэрри и Мит-



Р и с. 1. Распад ксилана.

челлом [11]. Ксилан поглощает 0,686 моля периодата на 1 остаток ангидроксилозы, количество образующейся муравьиной кислоты отвечает средней длине цепи в 15,7 единицы (см. стр. 484). Определение расхода

периодата и количества выделившейся муравьиной кислоты не позволяет различать полисахариды с  $(1 \rightarrow 2)$ - и  $(1 \rightarrow 4)$ -связями, но, судя по результатам метилирования [12], ксилан содержит  $(1 \rightarrow 4)$ - и  $(1 \rightarrow 3)$ -связи в соотношении 4 : 1. Основные продукты распада — бис-фенилгидразон глиоксала и фенилозаксон глицеринового альдегида. Следовательно, реакция идет, как указано на рис. 1, и основным типом связи является  $(1 \rightarrow 4)$ -связь. Кроме упомянутых озазонов, образуется только «ксилосазон», а это означает, что остатки с  $(1 \rightarrow 3)$ -связями не связаны один с другим непосредственно и что ксилан не представляет собой смесь двух полисахаридов с  $(1 \rightarrow 4)$ - и  $(1 \rightarrow 3)$ -связями.

Дегградация нигерана [13], содержащего чередующиеся  $(1 \rightarrow 3)$ - и  $(1 \rightarrow 4)$ -связи, может служить примером использования этого типа расщепления в случае линейного глюкана.

#### Вещество, образующееся из окисленного ксилана и фенилгидразина

3 г ксилана окисляют 5,85 г метапериодата натрия в 200 мл воды; контроль за ходом реакции поляриметрический. Через 120 час после окончания реакции ( $[\alpha]_D +2,12^\circ$ ) ионы периодата и иодата осаждают ацетатом свинца и отфильтровывают (см. стр. 484), а избыток ионов свинца осаждают серной кислотой. Раствор окисленного ксилана (360 мл,  $[\alpha]_D +1,25^\circ$ ) обрабатывают при комнатной температуре 7,5 мл фенилгидразина в 18 мл 10%-ной уксусной кислоты и получают оранжевый осадок; выход 2,53 г. (Найдено: N 11,1%; вычислено для продукта конденсации одной молекулы фенилгидразина с остатком одной окисленной молекулы ксилозы: N 15,7%.)

#### Дегградация производного окисленного ксилана

Полученный оранжевый порошок (2,36 г), 60 мл спирта, 7 мл фенилгидразина, 9 мл ледяной уксусной кислоты и 30 мл воды кипятят 4 час с обратным холодильником. При концентрировании раствора выкристаллизовывается бис-фенилгидразон глиоксала; выход 1,46 г. Из фильтрата при разбавлении водой выпадает 2,60 г смолистого осадка, его растворяют в бензоле и хроматографируют на колонке с 80 г окиси алюминия. Ниже показаны результаты фракционирования.

Номер фракции	Элюент	Выделенное вещество
1—3	130 мл бензола	бис-Фенилгидразон глиоксала, 0,571 г
10, 11	80 мл смеси бензол — эфир (1 : 1)	Фенилозаксон глицеринового альдегида, 0,283 г, т. пл. $130^\circ$ (из бензола)
13—15	200 мл смеси бензол — эфир (1 : 1)	N-Ацетилфенилгидразин, 0,462 г, т. пл. $128^\circ$ (из бензола с петролейным эфиром)
16	150 мл эфира	Некристаллический продукт, 0,442 г
22—26	Смесь спирт — вода (1 : 1)	«Ксилосазон» (фенилозаксон D-треопентозы), 0,346 г; перекристаллизовывают из водного метанола

Кроме того, смесью спирт — вода (9 : 1) вымывают зону красного цвета, содержащую 12 мг рубазоновой кислоты [6], образовавшейся путем конденсации фенилозаксона глицеринового альдегида с фенилгидразином.

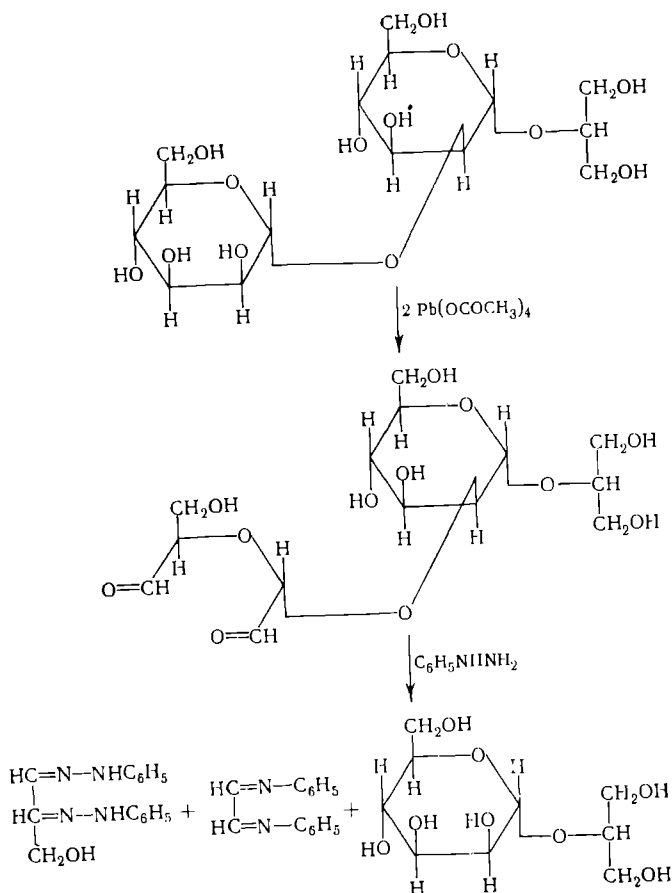


### Разделение фенилозонов круговой хроматографией на бумаге

Из бумаги ватман № 1 вырезают круг диаметром 30 см и на расстоянии 2 см от центра наносят смесь фенилозонов. Бумагу зажимают между двумя стеклянными пластинками (одна из них имеет отверстие) и с помощью фитиля подают систему толуол — спирт — вода (270 : 30 : 1, по объему) в центр хроматограммы. Через 2 час фенилозаны разделяются на отчетливо заметные дуги правильной формы. При опрыскивании аммиачным раствором нитрата серебра они темнеют. Значения  $R_f$  соединений, измеренные вдоль различных осей, несколько различаются между собой. Ниже приводятся средние значения  $R_f$ , полученные в нескольких опытах (при пробеге в разных направлениях) для фенилозонов следующих соединений: глиоксали 0,96; глицеринового альдегида 0,75; эритрозы 0,55; рамнозы 0,54; арабинозы 0,48; ксилозы 0,47; галактозы 0,42; глюкозы 0,41; мальтозы 0,046. N-Ацетилфенилгидразин имеет ту же величину  $R_f$ , что и фенилозаны D-глицеро-тетрозы, и мешает его обнаружению.

### Распад олигосахаридов

Горин и Перлин [14] использовали этот метод распада для отщепления от O- $\alpha$ -D-маннопиранозил-(1  $\rightarrow$  2)-O- $\alpha$ -D-маннопиранозил-(1  $\rightarrow$  2)-



Р и с. 2. Распад олигосахарида.

глицерина концевой маннозы. Получив известный 2-О- $\alpha$ -D-маннопиранозил-D-глицерин, они тем самым установили  $\alpha$ -конфигурацию одной связи (рис. 2). Избирательное окисление концевого остатка маннопиранозы тетраацетатом свинца позволило провести эту деградацию. Ступенчатую деградацию такого же типа провел Линдберг [15] при установлении строения О- $\alpha$ -D-маннопиранозил-(1  $\rightarrow$  3)-О- $\alpha$ -D-галактопиранозил-(1  $\rightarrow$  2)-глицерина.

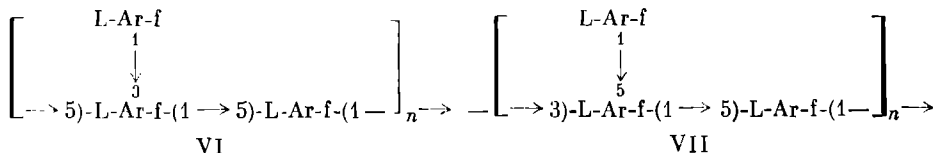
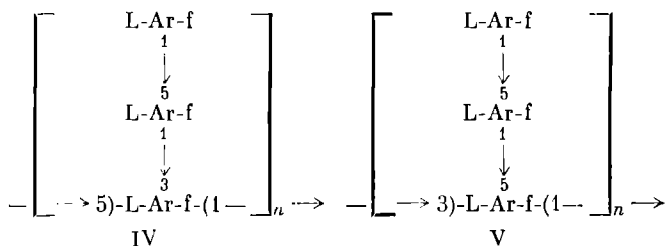
### Методика

248 мг маннобиозилглицерина растворяют в 1 мл воды, прибавляют уксусную кислоту, доводят объем до 50 мл и вводят 560 мг (2,1 мол. экв.) тетраацетата свинца. Через 18 час (к этому времени уже весь окислитель прореагировал) смесь обрабатывают 1,3 мл 10%-ной щавелевой кислоты в уксусной кислоте, фильтруют и фильтрат упаривают досуха. Остаток растворяют в 25 мл воды, содержащей 1 мл фенолгидразина и 1 мл уксусной кислоты. Раствор нагревают при 100° 30 мин, а затем упаривают до сиропообразного состояния и растворяют в водном аммиаке. Раствор обрабатывают хлороформом, деионизуют амберлитами IR-120 (H<sup>+</sup>) и IR-4B(OH<sup>-</sup>) и вновь упаривают до сиропа. Полученный продукт (122 мг) фракционируют на колонке с целлюлозой, используя насыщенный водой *n*-бутанол. Выделенный в виде сиропа 2-О- $\alpha$ -D-маннопиранозилглицерин идентифицируют с помощью инфракрасного спектра и в виде гекса-*n*-нитробензоата. Выход 42 мг,  $[\alpha]_D^{+59}$  (с 1,4 в воде).

### Деградация арабинана свеклы

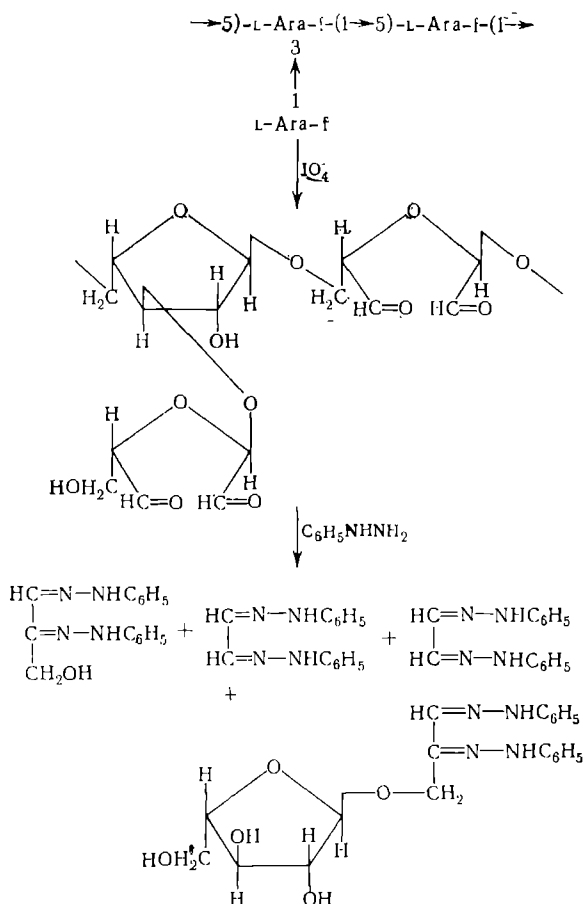
Арабинан свеклы — разветвленный полисахарид, при его гидролизе образуются L-арабиноза, в меньших количествах D-галактоза, L-рамноза и D-галактуроновая кислота [16], причем количество последних сахаров зависит от метода выделения арабинана [17]. Гидролиз полностью метилированного полисахарида приводит к эквимольной смеси 2-О-метил-, 2,3-ди-О-метил- и 2,3,5-три-О-метил-L-арабиноз [18].

Согласно этим данным, полисахарид может иметь структуру IV—VII, кроме того, возможны и некоторые другие разветвленные структуры.



После однократной деградации не остается полимерного материала, что исключает структуры IV и V, но соответствует VI и VII. В состав смеси, полученной после деградации арабинана, входят бис-фенолгидразон

глиоксаля, фенилозона глицеринового альдегида и 2 озона гликозидов — фенилозона 3-О-*L*-арабинофуранозида глицеринового альдегида и фенилозона 3-О-*D*-галактозида глицеринового альдегида. Расположение остатков *D*-галактозы в полисахариде не вполне ясно, но с очевидностью вытекает, что некоторые остатки *D*-галактозы неуязвимы для периодата и что они связаны с С-5 окисляемого остатка *L*-арабинозы или с С-6



Р и с. 3. Распад арабинана свеклы.

остатка *D*-галактозы. На рис. 3 показана схема распада основной части молекулы, приводящего к фенилозону 3-О-*L*-арабинофуранозида глицеринового альдегида.

Различить структуры VI или VII можно, если применять для окисления методику Аспинала и Никольсона [19].

#### МЕТОДИКА

Арабинан свеклы поглощает за 5 час 1 моль периодата на 185 г полисахарида. К 2 г окисленного продукта (его выделяют по описанной для других полисахаридов методике) в 100 мл воды добавляют 10 мл фенолгидразина в 10 мл уксусной кислоты, при этом выпадает желтый комплекс

с фенилгидразином, и нагревают до 95°. Суспензия быстро становится коричневой, и осадок растворяется. Раствор нагревают 10 мин, затем охлаждают и исчерпывающе экстрагируют эфиром. В экстракте с помощью круговой хроматограммы обнаруживают *бис*-фенилгидразон глиоксаля, фенилозакон глицеринового альдегида и N-ацетилфенилгидразин, высшие озазоны найдены не были. Водный раствор содержит два вещества, подвижность которых на хроматограмме соответствовала подвижности озазонов дисахаридов. Его упаривают до коричневого сиропа;  $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$  (в спирте). Порцию сиропа гидролизуют 1 н. серной кислотой в присутствии бензальдегида и в нейтрализованном гидролизате методом хроматографии на бумаге обнаруживают L-арабинозу и следы D-галактозы. Озазоны разделяют препаративно на бумаге в системе толуол — спирт — вода (270 : 30 : 1, по объему) и экстрагируют. Гидролиз озазона, присутствующего в большем количестве, на смоле зеокарб 215 по методу Файнена и О'Колла [21] приводит к L-арабинозе, идентифицированной в гидролизате с помощью хроматографии на бумаге. Экстракцией смолы спиртом, содержащим аммиак, получают продукт, который, судя по круговой хроматограмме, представляет собой фенилозакон глицеринового альдегида. Аналогичные исследования озазона, присутствующего в меньшем количестве, показали, что он содержит D-галактозу и фенилозакон глицеринового альдегида.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Barry V. C., Nature, **152**, 538 (1943).
2. O'Colla P. S., Proc. Roy. Irish Acad., Sect. B, **55**, 165 (1952).
3. Dillon T., O'Ceallachain D. F., O'Colla P. S., Proc. Roy. Irish Acad., Sect. B, **55**, 331 (1952); **57**, 31 (1954).
4. Bouveng H. O., Lindberg B., Advances in Carbohydrate Chem., **15**, 53 (1960).
5. Barry V. C., McCormick J. E., Mitchell P. W. D., J. Chem. Soc., **1954**, 3692; **1954**, 4020.
6. Barry V. C., McCormick J., Hensecke G., Grosche P., Demuth I., Müller U., Englemann H., Crawick G., Ann., **648**, 96 (1961).
7. O'Donnell J. J., Percival E., J. Chem. Soc., **1959**, 2313.
8. Bouveng H. O., Acta Chem. Scand., **15**, 78 (1961).
9. Barry V. C., McCormick J., J. Chem. Soc., **1957**, 2777.
10. O'Donnell J. J., Percival E., J. Chem. Soc., **1959**, 1739.
11. Barry V. C., Mitchell P. W. D., J. Chem. Soc., **1954**, 4020.
12. Percival E. G. V., Chanda C. K., Barry V. C., Dillon T., Hawkins E., O'Colla P. S., Nature, **166**, 787 (1950).
13. Barker S. A., Bourne E. J., Stacey M., J. Chem. Soc., **1953**, 493.
14. Gorin P. A. J., Perlman A. S., Can. J. Chem., **35**, 262 (1957).
15. Lindberg B., Acta Chem. Scand., **9**, 1093 (1955).
16. Andrews P., Hough L., Powell D. B., Woods B. M., J. Chem. Soc., **1959**, 774.
17. Goodban A. E., Owens H. S., J. Polymer Sci., **23**, 825 (1957).
18. Hirst E. L., Jones J. K. N., J. Chem. Soc., **1948**, 2311.
19. Aspinall G. O., Nicolson A., J. Chem. Soc., **1960**, 2503.
20. Finan P. A., O'Colla P. S., Chem. and Ind. (London), 1387 (1955).

# Производные полисахаридов

---

## Окисление в уроновые кислоты в полисахаридах

Г. О. Аспиналл

### ВВЕДЕНИЕ

Избирательное окисление свободных первичных гидроксильных групп остатков моносахаридов в полисахаридах изучено сравнительно мало из-за неспецифичности большинства окислителей [1]; исключение составляет окисление целлюлозы двуокисью азота. Преобладающая реакция при обработке целлюлозы двуокисью азота — это окисление остатков D-глюкозы в D-глюкуроновую кислоту, хотя в настоящее время известно, что этот реагент не абсолютно специфичен для первичных гидроксильных групп и что одновременно в некоторой степени происходит окисление вторичных гидроксидов [2—4]. Окисление целлюлозы не сопровождается значительной деполимеризацией [1], однако, неизвестно, сохраняются ли в условиях окисления гликозидные связи, лабильные к разбавленным минеральным кислотам. Окисление целлюлозы двуокисью азота можно провести прямым действием газообразного реагента или в инертном растворителе, таком, как четыреххлористый углерод. Последний вариант, основанный на методике Кенъона и сотр. [5], описан в этой статье.

Избирательное окисление первичных гидроксильных групп в водном растворе кислородом над платиновым или палладиевым катализатором, которое часто используют для получения гликозидов уроновых кислот [6, 7], было применено также к полисахаридам [8, 9]. Реакция с полисахаридами протекает очень медленно и в результате реакции окисляется лишь небольшая доля (~15%) доступных группировок. Приведенная здесь методика, согласно которой реакция проводится в присутствии избытка бикарбоната натрия для нейтрализации образующихся кислотных групп, была предложена Аспиналлом и Никольсоном [8] для окисления арабиногалактана европейской лиственницы (ε-галактана).

### МЕТОДИКА

#### *Окисление целлюлозы двуокисью азота в четыреххлористом углероде*

Используются следующие реагенты: измельченная целлюлоза (20 меш); четыреххлористый углерод, очищенный промывкой 50%-ным водным раствором едкого натра и дистиллированной водой, высушенный над хлористым кальцием и перегнанный в приборе с колонкой, наполненной спиральной стеклянной насадкой, т. кип. 76,0—76,5°; двуокись азота, очищенная перегонкой, т. пл. —11,2°.

Целлюлозу (1 часть) помещают в сосуд для работы при повышенном давлении, закрывающийся стеклянной пробкой, и прибавляют смесь двуокиси азота (45 частей) и четыреххлористого углерода (45 частей). Плотный закрытый сосуд встряхивают на механической качалке в течение 24 час при комнатной температуре (21°). Образовавшуюся целлулоновую кислоту отделяют от окислительной смеси, продувают воздухом для удаления летучих веществ, промывают четыреххлористым углеродом, погружают в дистиллированную воду и промывают декантацией до нейтральной реакции промывных вод по бромтимоловому синему. Вещество сушат на воздухе до постоянного веса. Перед проведением анализа его дополнительно высушивают ~12 час при 55° в вакууме над пятиокисью фосфора. Содержание уранового ангидрида, определенное методом декарбоксилирования [10—12] составляет 23,0%.

### *Каталитическое окисление арабиногалактана европейской лиственницы*

Растворы 5 г арабиногалактана в 150 мл воды и 0,5 г бикарбоната натрия в 100 мл воды встряхивают с 10 мг платинового катализатора (окись платины по Адамсу [13] после восстановления водородом) для удаления возможных ядов. К перемешиваемой смеси этих растворов прибавляют еще 1 г катализатора и в течение 14 дней пропускают через смесь кислород при 70°, причем для компенсации потерь за счет упаривания время от времени прибавляют воду. После охлаждения платину отделяют центрифугированием, раствор концентрируют и окисленный полисахарид осаждают 3 объемами спирта. Полисахарид растворяют в воде, раствор пропускают через колонку с амберлитом IR-120(H<sup>+</sup>) для удаления ионов натрия и кислый полисахарид осаждают спиртом; выход 3,2 г, содержание уранового ангидрида 7,5% (метод Кэя и Кента [14]). При гидролизе полисахарида (1 н. серная кислота, 4 час при 100°) с последующим хроматографированием на бумаге в системе растворителей этилацетат — уксусная кислота — вода (3 : 1 : 3, по объему; верхний слой) обнаруживают, кроме галактозы и арабинозы, два кислых олигосахарида; R<sub>галактоза</sub> 0,5 и 0,25.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. McBurney L. F., in «Cellulose and Cellulose Derivatives», E. Ott, H. M. Spurlin and Grafflin M. W., Eds, Interscience Publishers, Inc., New York, N. Y., 2nd Ed., 1954, part 1, p. 140—167.
2. McGee P. A., Fowler W. F., Jr., Unruh C. C., Kenyon W. O., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2700 (1948).
3. Nevell T. P., J. Textile Inst., **42**, T91 (1951).
4. Parkinson J. R., Tappi, **41**, 661 (1958).
5. McGee P. A., Fowler M. F., Jr., Taylor E. W., Unruh C. C., Kenyon W. O., J. Am. Chem. Soc., **69**, 355 (1947).
6. Mehlretter C. L., Advances in Carbohydrate Chem., **8**, 231 (1953).
7. Heyns K., Stärke, **13**, 207 (1961).
8. Aspinall G. O., Nicolson A., J. Chem. Soc., **1960**, 2503.
9. Aspinall G. O., Cairncross I. M., J. Chem. Soc., **1960**, 3998.
10. Taylor E. W., Fowler W. F., Jr., McGee P. A., Kenyon W. O., J. Am. Chem. Soc., **69**, 342 (1947).
11. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. 1, p. 461.

12. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., and Wolfson M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 108.
13. Adams R., Voorhees V., Shriner R. L., Organic Syntheses, Coll. Vol. 1, 463 (1944).
14. Kaye M. A. G., Kent P. W., J. Chem. Soc., 1953, 79.

## Восстановление уроновых кислот в полисахаридах

Г. О. Аспиналл

### ВВЕДЕНИЕ

Первое успешное восстановление входящих в состав полисахаридов остатков гексуроновых кислот в гексозы было проведено на метилированных полисахаридах при действии алюмогидрида лития в эфире или тетрагидрофуране [1, 2] и привело к веществам, гидролизующимся много легче по сравнению с исходными. Этот реагент, однако, непригоден для восстановления кислотных групп в незамененных полисахаридах, которые не растворяются в растворителях типа эфира, и в ацетилированных полисахаридах, которые хотя и растворяются в подобных растворителях, но выпадают в осадок в результате восстановления сложноэфирных групп, более легкого, чем восстановление карбоксилов. Восстановление остатков уроновых кислот можно вести в водном растворе при действии боргидридов натрия [3] или калия [4], если кислотные группы предварительно этерифицированы в мягких условиях. Метиловые эфиры можно получить обработкой кислого полисахарида диазометаном в условиях, когда метилирование гидроксильных групп незначительно [3]. При получении хондроитина с восстановленными карбоксильными группами хондроитин-4-сульфат (хондроитинсульфат А) этерифицировали метанольным раствором хлористого водорода, в результате были удалены и сульфатные группы [5] (см. стр. 507). Применение этого реагента, вероятно, нежелательно, если полисахариды содержат лабильные к кислотам группировки. 2-Оксиэтиловый эфир пектовой кислоты сизаля [4] был получен реакцией полисахарида с окисью этилена в водном растворе [6].

Другая методика включает применение диборана — реагента, который в противоположность боргидридам натрия или калия, восстанавливает карбоксилы легче, чем сложноэфирные группы [7]. По этому методу реакцию ацетилированного полисахарида с дибораном проводят в диглиме [8] или в диметоксиэтаноле [9]. В процессе восстановления происходит частичное дезацетилирование; омыление завершают действием водной щелочи.

Ниже приводятся оба метода. Восстановление специфического полисахарида пневмококков типа VIII проводится по методике Джонса и Перри [3]; метиловый эфир полисахарида восстанавливают боргидридом натрия. Восстановление дибораном ацетилированной камеди из *Acacia senegal* (гуммиарабик) было выполнено в нашей лаборатории А. Дж. Карлсоном [10] и основано на методе, предложенном Смитом и Стефеном [8]. При применении обеих методик для полного восстановления остатков уроновых кислот может возникнуть необходимость в повторении всего цикла операций.

## МЕТОДИКА

**Восстановление полисахарида пневмококков типа VIII**

4 г лиофилизованного полисахарида SVIII (см. стр. 302) смачивают метанолом и прибавляют эфирный раствор диазометана. После того, как прекратится вначале энергичное выделение азота (10 мин), избыток диазометана и растворителя удаляют отгонкой. Остаток растворяют в 150 мл воды и полученный подвижный раствор прибавляют в течение 1 час при сильном перемешивании к раствору 2 г боргидрида натрия в 50 мл воды. Раствор перемешивают ~12 час и избыток боргидрида разрушают подкислением 2 н. серной кислотой. Реакционную смесь выливают при перемешивании в 4 объема спирта и осадок полисахарида отделяют центрифугированием. Полученное вещество повторно обрабатывают, как описано выше, после чего его деионизуют и лиофилизуют. Конечный продукт легко растворим в воде с образованием нейтрального подвижного раствора; выход 3,2 г,  $[\alpha]_D +130^\circ$  (с 0,5 в воде). Декарбосилирование [11] дает лишь следы двуокиси углерода, а нафторезорциновая проба на урновые кислоты [12] (см. стр. 38) отрицательна. Гидролиз образца полисахарида в запаянной трубке 96%-ной муравьиной кислотой в течение 10 час при  $100^\circ$  и далее 1 н. серной кислотой в течение 2 час при  $100^\circ$  с последующим хроматографированием на бумаге указывает на присутствие галактозы и глюкозы в соотношении 1 : 3. В тех же условиях исходный полисахарид SVIII дает глюкуроновую кислоту, галактозу и глюкозу в соотношении 1 : 1 : 2.

**Восстановление ацетилированной арабовой кислоты**

Арабовую кислоту (мол. экв. 1380) получают из камеди *Acacia senegal* осаждением из водного раствора, подкисленного соляной кислотой, 4—5 объемами спирта (стр. 304). Ацетилирование проводят уксусным ангидридом и пиридином в формамидном растворе по методу Карсона и Маклея [13]. 30 г ацетилированной арабовой кислоты,  $[\alpha]_D -21^\circ$  (с 0,94 в хлороформе), растворяют в 400 мл 1,2-диметоксиэтана, высушенного перегонкой над алюмогидридом лития. К раствору прибавляют боргидрид лития и для образования диборана приливают раствор 10 г эфира трехфтористого бора в 40 мл 1,2-диметоксиэтана порциями по 5 мл в течение 1,5 час. После каждого прибавления закрытую склянку встряхивают, вначале осторожно, а затем энергично, чтобы разрушить образующийся гель. В процессе прибавления приливают дополнительно 200 мл растворителя, если реакционная смесь становится слишком густой. Смесь оставляют на ночь, а затем выливают в 1500 мл ледяной воды, нейтрализуют до слабощелочной реакции и упаривают при  $40^\circ$  и остаточном давлении 20 мм до густой пасты. Пасту растворяют в 0,1 н. растворе едкого натра, доводят pH до 9 и нагревают 2 час при  $55^\circ$ . Полученный раствор диализуют (стр. 299) 48 час против водопроводной воды и 24 час против дистиллированной воды, фильтруют, концентрируют при  $40^\circ/20$  мм и выливают в смесь 750 мл спирта и 250 мл эфира. Клейкий осадок растирают со спиртом, отделяют центрифугированием и сушат в вакуумном сушильном шкафу при  $40^\circ$ ; выход 20 г.

Неочищенный полисахарид растворяют в 200 мл воды, деионизуют, пропуская через колонки с амберлитом IR-120 ( $H^+$ ) и IR-45 ( $OH^-$ ), кон-



центрируют до 100 мл и лиофилизуют. Выход восстановленного полисахарида 15 г,  $[\alpha]_D -16^\circ$  (с 0,94 в воде), мол. экв. 7800. Четырехчасовой гидролиз восстановленного полисахарида в 0,5 н. серной кислоте при  $100^\circ$ , согласно результатам последующего хроматографирования на бумаге, дает рамнозу, арабинозу, галактозу, глюкозу и только следы альдобиноуроновой кислоты (6-O- $\beta$ -D-глюкуронозил-D-галактозы).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Abdel-Akher M., Smith F., Nature, **166**, 1037 (1950).
2. Aspinall G. O., Hirst E. L., Matheson N. K., J. Chem. Soc., **1956**, 989.
3. Jones J. K. N., Perry M. B., J. Am. Chem. Soc., **79**, 2787 (1957).
4. Aspinall G. O., Cañas-Rodríguez A., J. Chem. Soc., **1958**, 4020.
5. Wolfrom M. L., Juliano B. O., J. Am. Chem. Soc., **82**, 1673 (1960).
6. Deuel H., Helv. Chim. Acta, **30**, 1523 (1947).
7. Brown H. C., Subba Rao B. C., J. Am. Chem. Soc., **82**, 681 (1960).
8. Smith F., Stephen A. M., Tetrahedron Letters, No. 7, 17 (1960).
9. Aspinall G. O., Fanshawe R. S., J. Chem. Soc., **1961**, 4215.
10. Aspinall G. O., Charlson A. J., Hirst E. L., Young R., J. Chem. Soc., **1963**, 1696.
11. Johansson A., Lindberg B., Theander O., Svensk Papperstidn., **57**, 41 (1954).
12. Tollens B., Ber., **41**, 1788 (1908).
13. Carson J. F., MacLay W. D., J. Am. Chem. Soc., **68**, 1015 (1946).

## Карбанилаты

Получение и удаление карбанилатных группировок

*Дж. Н. Бемиллер*

## ВВЕДЕНИЕ

Карбанилаты (фенилкарбаматы) получают главным образом для определения количества и положения ацетильных групп в частично ацетилированных полисахаридах [1, 2, 3]. Карбанилаты особенно удобны для этого, так как они легко образуются в условиях, исключающих гидролиз или миграцию ацильных групп; кроме того, карбанилатные группы устойчивы к метанолизу [4—6] и кислотному гидролизу и медленно и не полностью отщепляются водными растворами щелочей [7]. Их можно удалить восстановлением алюмогидридом лития в тетрагидрофуране [1] или действием метилата натрия в метаноле [8].

Ниже приводятся два метода получения карбанилатов (фенилкарбаматов). По одному из них ацетат целлюлозы реагирует с фенилизоцианатом в безводном пиридине с образованием ацетат-карбанилата целлюлозы [9, 10]. По другому методу глюкуроноксиан, содержащий 13,2% О-ацетильных групп, реагирует с фенилизоцианатом в безводном N,N-диметилформамиде [1]. Продукт реакции превращают далее в N-метилпроизводное,

деацетируют в смеси N,N-диметилформамида или тетрагидрофурана и водной серной кислоты и метилируют по методу Пурди. Карбанилатные группы удаляют восстановлением алюмогидридом лития в тетрагидрофуране (см. также стр. 230 и 499) и образующийся частично метилированный полисахарид гидролизуют. Частично метилированные моносахариды разделяют и идентифицируют, устанавливая таким образом положение О-ацетильных групп (положение О-метильных групп в конечном веществе соответствует положению О-ацетильных групп в исходном полисахариде).

Получен ряд других карбанилатов полисахаридов, в том числе карбанилаты целлюлозы [2, 9—12], амилозы, амилопектина и крахмала [13, 14], предельного β-декстрина и декстрина, полученного нагреванием крахмала [13], циклогептаамилозы [13], полисахарида сахарной кукурузы [11], декстранов [11, 13], гликогена [13], ламинарана [11], лихенана [11], лутеозы [11], полисахарида *Phytomonas tumefaciens* [11] и дрожжевого полиглюкана [11].

Описано получение карбанилатов некоторых производных моносахаридов [15—17].

Были получены различные замещенные фенилкарбаматы, но они не имеют преимуществ перед незамещенными фенилкарбаматами [10, 14]. Алифатические изоцианаты реагируют медленно и неполно и непригодны для получения производных [9].

## МЕТОДИКА

### Ацетат-карбанилат целлюлозы [9, 10]

10 г ацетата целлюлозы (30,8% ацетильных групп) (см. [18]) сушат 48 час при 100° и растворяют в 100 г безводного пиридина (см. стр. 91, 115, 130) в сухой колбе. К этому раствору приливают 8,6 г фенилизотианата (в 1,25 раза больше количества, рассчитанного для свободных гидроксильных групп). Колбу закрывают краном Бунзена и нагревают 10 час при 50°. Охлажденную реакционную смесь обрабатывают 10 мл метанола для удаления избытка фенилизотианата и выливают тонкой струей при быстром перемешивании в 500 мл метанола. Белый волокнистый осадок отделяют, растворяют в ацетоне и переосаждают, выливая ацетоновый раствор в метанол. После второго такого переосаждения волокна тщательно промывают дистиллированной водой и сушат 4 час при 60°; выход количественный.

	Содержание, %			Степень замещения		
	CH <sub>3</sub> CO—	N	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO—	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> —	—OH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO <sub>2</sub> —
Исходный ацетат целлюлозы . . . . .	30,8	0	0	1,66	1,34	0
Продукт . . . . .	18,3	4,83	41,1	1,66	0	1,34
Теоретические значения для полного карбанилирования . . . . .	18,25	4,78	40,8	1,66	0	1,34

### Ацетат-карбанилат глюкуроноксилана [1]

8 г полисахарида (стр. 362), высушенного в вакууме над пятиокисью фосфора, растворяют в 200 мл безводного N,N-диметилформамида<sup>1</sup>. К раствору прибавляют 20 мл фенилизотиоцианата и нагревают 3 час при 100°. При выливании смеси в спирт образуется объемистый осадок, который отфильтровывают на стеклянном фильтре, промывают спиртом, эфиром и сушат. Описанную выше процедуру повторяют и после окончательной очистки переосаждением получают вещество в виде крупнозернистого желтоватого порошка; выход 15,2 г,  $[\alpha]_D^{20}$  —92° (с 1,0 в N,N-диметилформамиде).

### Восстановление метилированного карбанилата глюкуроноксилана [1]

4,80 г метилированного карбанилата глюкуроноксилана помещают в круглодонную колбу емкостью 500 мл, снабженную обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, и растворяют в 200 мл безводного тетрагидрофурана<sup>2</sup>. При прибавлении 300 мг алюмогидрида лития раствор превращается в гель. Гель разрушают осторожным нагреванием на паровой бане, прибавляют еще 1,2 г алюмогидрида лития и реакционную смесь перемешивают на магнитной мешалке; гель при этом медленно растворяется. Смесь перемешивают в течение ~12 час при комнатной температуре, затем для завершения реакции кипятят 1 час, прибавляют несколько миллилитров воды и нейтрализуют разбавленной фосфорной кислотой. После фильтрования осадок промывают водой, охлажденной до 0°, объединяют фильтрат и промывные воды упаривают в вакууме и прибавляют к 3 объемам спирта при быстром перемешивании. Образующийся осадок отфильтровывают на стеклянном фильтре, промывают спиртом и растворяют в воде при 0—10°. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр и выливают при перемешивании в 3 объема спирта. Обычно двумя такими переосаждениями удаляют основную массу неорганических солей. Конечный осадок отфильтровывают, промывают спиртом и эфиром, сушат в вакууме и получают белый порошок; выход 1,64 г (84%),  $[\alpha]_D^{20}$  —86° (с 1,0 в воде).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Bouveng H. O., Acta Chem. Scand., **15**, 96 (1961).
2. Malm C. J., Tanghe L. J., Laird B. C., Smith G. D., Anal. Chem., **26**, 188 (1954).
3. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 203.
4. Wolf from M. L., Pletcher D. E., J. Am. Chem. Soc., **62**, 1151 (1940).
5. Hearon W. M., Hiatt G. D., Fordyce C. R., J. Am. Chem. Soc., **66**, 955 (1944).
6. Reeves R. E., J. Am. Chem. Soc., **70**, 259 (1948).
7. Hearon W. M., Hiatt G. D., Fordyce C. R., J. Am. Chem. Soc., **65**, 833 (1943).

<sup>1</sup> N,N-Диметилформамид можно очистить, встряхивая с твердой гидроокисью калия, затем с окисью кальция и перегоняя при атмосферном давлении над пятиокисью фосфора [19].

<sup>2</sup> Тетрагидрофуран очищают, встряхивая с твердой гидроокисью калия и перегоняя при атмосферном давлении над алюмогидридом лития [20].

8. Salmon M. R., Powell G., J. Am. Chem. Soc., **61**, 3507 (1939).
9. Hearon W. M., Hiatt G. D., Fordyce C. R., J. Am. Chem. Soc., **65**, 829 (1943).
10. Hearon W. M., Lobsitz J. L., J. Am. Chem. Soc., **70**, 296 (1948).
11. Wolff I. A., Watson P. R., Rist C. E., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4897 (1953).
12. Gerbaux I. R., Compt. Rend. 27<sup>e</sup> Congr. intern. chim. ind., Brussels, 1954, 3; Industrie chim. belge **20**, Spec. No. 387, 392 (1955); Bull. soc. chim. Belges, **65**, 270 (1956).
13. Wolff I. A., Rist C. E., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2779 (1948).
14. Wolff I. A., Watson P. R., Rist C. E., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3061 (1952).
15. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., and Wolfrom M. L., Eds, Academic Press Inc., New York — London, 1962, vol. I, p. 206.
16. Hearon W. M., J. Am. Chem. Soc., **70**, 297 (1948).
17. Bouveng H. O., Acta Chem. Scand., **15**, 87 (1961).
18. Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R. L., Ed., Academic Press Inc., New York — London, 1963, vol. III, p. 201.
19. Leader G. R., Gormley J. F., J. Am. Chem. Soc., **73**, 5731 (1951).
20. Fieser L. F., Experiments in Organic Chemistry, D. C. Heath and Co., Boston, Massachusetts, 1957, p. 292.

## Н-Дезацетилирование

Хитозан из хитина

Д. Хортон, Д. Р. Лайнбек

### ВВЕДЕНИЕ

Под действием оснований амидные связи расщепляются труднее, чем сложноэфирные, и в обычных условиях происходит только О-дезацетилирование полных ацетатов аминосахаров. В жестких щелочных условиях ацетамидогруппа, рядом с которой в *цис*-положении находится гидроксильная группа, может подвергаться Н-дезацетилированию, но соответствующие *транс*-изомеры гораздо более устойчивы [1] (см. также стр. 119).

Остатки аминосахаров в полисахаридах, содержащих аминосахара, обычно Н-ацетилированы. Исключением является гепарин, имеющий Н-сульфатные группы; его легко можно Н-десульфировать обработкой разбавленным метанольным раствором хлористого водорода [2] (стр. 507). Однако Н-ацетильные группы нельзя удалить под действием кислых агентов, не вызвав гидролиза полисахарида, поэтому для Н-дезацетилирования лучше применять щелочи.

Для расщепления амидных связей в белках можно использовать [3] обработку безводным гидразином при 100°; этот же реагент был предложен для Н-дезацетилирования препаратов хондроитинсульфата [4—6]. Другие исследователи применяли этот метод для Н-дезацетилирования группового вещества крови А из слизистой оболочки свиных желудков [7]. Этот реагент вызывает незначительную деструкцию простых полисахаридов, таких, как гликоген или крахмал [8], но в случае полисахаридов, содержащих аминосахара, он дает сильно расщепленные продукты. а Н-дезацетилирование обычно бывает неполным [4—7].

Хитин, являющийся 2-ацетиамидо-2-дезоксид-глюканом с  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-связями, имеет 2,3-*транс*-расположение заместителей в моносахаридных звеньях и поэтому чрезвычайно устойчив к большинству реагентов, включая водную щелочь. Как было показано Винтерштейном [9] и Хоппе-Зайлером [10], сплавление хитина с едким кали при 180° дает вещество с меньшим содержанием ацетильных групп; Хоппе-Зайлер назвал это вещество хитозаном. Впоследствии хитозан был изучен Араки [11] и весьма подробно исследован Фюртом и Руссо [12], установившими, что из хитина удаляется примерно  $\frac{3}{4}$  ацетильных групп. Позднее Леви [13] пришел к выводу, что вещество, полученное подобным способом, содержит 1 ацетильную группу на 1 остаток дисахарида. Другой метод получения хитозана, включающий обработку хитина 40%-ным водным раствором едкого натра при 110° в течение 4 час [14], дает продукт, по рентгенографическим данным [15], очень сходный с хитозаном, полученным по методике Фюрта и Руссо. При продолжительной обработке хитина горячим концентрированным раствором едкого натра получают почти полностью N-деацетилированный, но расщепленный продукт [14, 16, 17]. Удаление N-ацетильных групп в процессе реакции можно контролировать по исчезновению полосы поглощения амидного карбонила в инфракрасном спектре [18].

Описаны усовершенствования первоначального метода сплавления со щелочью [19—21], позволяющие получать хитозан с ничтожным содержанием ацетильных групп. Приведенная ниже методика получения хлоргидрата хитозана основана на методе сплавления со щелочью и последующем фракционировании, предложенном Роземаном и сотр. [20], в то время как методика получения свободного хитозана [19] включает стадию диализа для удаления низкомолекулярных продуктов расщепления. Разработан также более простой способ, включающий обработку хитина водным едким натром [14, 17] и удобный для приготовления непосредственно N-деацетилированного хитозана.

## МЕТОДИКА

### *Получение хлоргидрата хитозана методом сплавления со щелочью [12, 19, 20]*

30 г хитина (стр. 340) и 150 г гранулированного едкого кали сплавляют в никелевом тигле в токе азота. Перемешиваемый расплав нагревают 30 мин при 180° и затем осторожно выливают в спирт. Желатиноподобный осадок промывают спиртом и далее водой до нейтральной реакции промывных вод. Неочищенный хитозан растворяют в 5%-ной водной уксусной кислоте и осаждают разбавленной щелочью; эту процедуру повторяют трижды. Гель растворяют при 50° в 0,1 н. соляной кислоте и прибавляют концентрированную соляную кислоту до полного осаждения неочищенного хлоргидрата хитозана, после чего раствору дают охладиться до комнатной температуры;  $[\alpha]_D^{20}$  —18° (в разбавленной соляной кислоте) [11, 12]. Соль очищают, растворяя в минимальном количестве кипящей воды и прибавляя к охлажденному раствору концентрированную соляную кислоту до полного осаждения. Затем смесь нагревают, чтобы растворить твердую фазу, медленно охлаждают в сосуде Дьюара и кристаллическую соль отфильтровывают. Эту стадию очистки проводят дважды. Вещество промывают спиртом, затем эфиром и сушат в вакууме над пятиокисью фосфора. Выход 15 г, содержание ацетильных групп  $\sim 1\%$ , что соответствует удалению N-ацетильных групп примерно на 95%.

Если нужно получить более полно N-дезацетилированное вещество, стадию окончательной очистки [12] проводят еще несколько раз. После 12 таких «перекристаллизаций» можно получить хлоргидрат хитозана, содержащий лишь следы ацетильных групп.

### *Хитозан (свободное основание) [19]*

Неочищенный хлоргидрат хитозана, полученный, как описано выше, обрабатывают избытком раствора едкого натра и диализуют несколько дней против дистиллированной воды. Продукт отделяют центрифугированием, промывают спиртом, эфиром и сушат в вакууме над пятиокисью фосфора. Полученный таким образом хитозан содержит 1,4% ацетильных групп и имеет, по данным иодометрического определения, минимальную длину цепи, равную ~ 20 моносакхаридным остаткам.

### *Получение хитозана действием водного раствора едкого натра [14, 17]*

50 г хитина (стр. 340) нагревают с 2,4 л 40%-ного водного раствора едкого натра 6 час при 115° в отсутствие воздуха. Охлажденную смесь фильтруют и осадок промывают водой до нейтральной реакции по фенол-фталеину; выход 40 г. Высушенное вещество представляет собой хитин, N-дезацетилированный примерно на 82%. Этот хитозан (38 г) очищают следующим образом. Его диспергируют в 1 л 10%-ной водной уксусной кислоты, через 24 час смесь центрифугируют и к прозрачному надосадочному раствору прибавляют по каплям 40%-ный водный раствор едкого натра. Белый хлопьевидный осадок, выпадающий при pH 7, отделяют центрифугированием, промывают несколько раз водой, спиртом и эфиром и сушат. Выход 28,5 г, содержание ацетильных групп ~ 4%, что соответствует хитину, N-дезацетилированному примерно на 85%.

Вещество со степенью N-дезацетилирования 97% можно получить, нагревая описанный выше хитозан в течение 1 час при 90° с 10-кратным по весу количеством 40%-ного раствора едкого натра, выделение и промывку проводят, как описано выше; выход ~ 90%.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Baker B. R., Joseph J. P., Schaub R. E., Williams J. H., J. Org. Chem., **19**, 1786 (1954); Baker B. R., Joseph J. P., Williams J. H., J. Am. Chem. Soc., **77**, 1 (1955).
2. Kantor T. G., Schubert M., J. Am. Chem. Soc., **79**, 152 (1957).
3. Akabori S., Ohno K., Narita K., Bull. Chem. Soc. Japan, **25**, 214 (1952).
4. Matsushima Y., Fujii N., Bull. Chem. Soc. Japan, **30**, 48 (1957).
5. Wolf from M. L., Juliano B. O., J. Am. Chem. Soc., **82**, 2588 (1960).
6. Yosizawa Z., Sato T., Biochem. J. (Tokyo), **51**, 155 (1962).
7. Yosizawa Z., Biochim. Biophys. Acta, **52**, 588 (1961); Yosizawa Z., Sato T., Biochim. Biophys. Acta, **52**, 591 (1961); Yosizawa Z., J. Biochem. (Tokyo), **51**, 1, 145 (1962); Yosizawa Z., Ino K., Fujiwara Y., J. Biochem. (Tokyo), **51**, 162 (1962).
8. Yosizawa Z., Sato T., Tôhoku J. Exptl. Med., **76**, 100 (1962).
9. Winterstein E., Ber., **27**, 3113 (1894).
10. Hoppe-Seyler F., Ber., **27**, 3329 (1894); **28**, 82 (1895).

11. Araki T., Z. physiol. Chem., **20**, 498 (1895).
12. von Fürth O., Russo M., Beitr. chem. Physiol. Pathol., **8**, 163 (1906); Chem. Zentr., **77**, II, 133 (1906).
13. Löwy E., Biochem. Z., **23**, 47 (1909).
14. Rigby G. W., пат. США 2040879 (1936); Chem. Abstracts, **30**, 4598 (1936).
15. Clark G. L., Smith A. F., J. Phys. Chem., **40**, 863 (1936).
16. Meyer K. H., Wehrli H., Helv. Chim. Acta, **20**, 353 (1937).
17. Wolfrom M. L., Maher G. G., Chaney A., J. Org. Chem., **23**, 1990 (1958); Wolfrom M. L., Shen H. T. M., J. Am. Chem. Soc., **81**, 1764 (1959).
18. Darmon S. E., Rudall K. M., Discussions Faraday Soc., No. **9**, 251 (1950).
19. Jeanloz R. W., Forchielli E., Helv. Chim. Acta, **33**, 1690 (1950).
20. Horowitz S. T., Roseman S., Blumenthal H. J., J. Am. Chem. Soc., **79**, 5046 (1957).
21. Barker S. A., Foster A. B., Stacey M., Webber J. M., J. Chem. Soc., **1958**, 2218.

## Десульфирование гепарина

*И. Данишевский*

### ВВЕДЕНИЕ

Обычные препараты гепарина содержат  $\sim 5$  сульфатных групп на 1 тетрасахаридный фрагмент. Эти сульфаты присутствуют в двух формах: N-сульфаты, или сульфамидные группы, и O-сульфаты, или эфиры серной кислоты. N-Сульфаты можно удалить гидролизом гепарина разбавленной кислотой [1, 2]. Отщепление O-сульфатов требует более продолжительного гидролиза или более жестких условий. Вольфром и Монтгомери [3] полностью десульфировали гепарин, обрабатывая его уксусным ангидридом и безводной серной кислотой.

В этой статье приведен метод гидролиза сульфамидных групп и метод удаления большей части O-сульфатов вместе с N-сульфатами, заключающийся в обработке гепарина метанольным раствором хлористого водорода в условиях аналогичных условиям десульфирования хондроитинсульфата по методу Кантора и Шуберта [4]. Однако в отличие от хондроитинсульфата гепарин нельзя десульфировать полностью этим реагентом. Если же продукт метанолиза гепарина N-ацетилировать, а затем снова обрабатывать метанольным раствором хлористого водорода, можно удалить дополнительное количество сульфата. Приведенные ниже методы описаны Данишевским и сотр. [2].

### МЕТОДИКА

#### *N*-Десульфированный гепарин

5 г натриевой соли гепарина (стр. 364) растворяют в 300 мл 0,04 н. соляной кислоты и нагревают 2,5 час при  $100^\circ$ . Раствор диализуют (стр. 299) в течение 24 час против проточной воды и концентрируют в вакууме при температуре не выше  $50^\circ$  до объема 100 мл<sup>1</sup>. При перемешивании медленно

<sup>1</sup> Вещество до некоторой степени способно диализоваться. Если минеральную кислоту и сульфат удалить пропусканием гидролизата через анионит (например, дауэкс 2), можно исключить стадию диализа и несколько повысить выход.

приливают 100 мл спирта и затем 100 мл спирта, насыщенного ацетатом натрия. Смесь выдерживают 24 час в холодильнике и N-десульфированный гепарин отделяют центрифугированием. Осадок промывают несколько раз спиртом и затем эфиром. Выход после высушивания над пятиокисью фосфора 2,7—3,1 г. Элементарный состав: С 25,53%, Н 3,57%, N 2,49%, S 8,95%; найдены ангидроглюкозамин 24,6%, свободный аминный азот 2,3%, молярное соотношение N и S 2 : 3;  $[\alpha]_D^{25} + 59^\circ$  (с 2 в воде).

### *Метилловый эфир N-десульфированного гепарина*

5 г гепарина суспендируют в 800 мл 0,06 M раствора хлористого водорода в безводном метаноле<sup>1</sup> и встряхивают 24 час на качалке при 5°. Образовавшееся нерастворимое вещество отделяют центрифугированием, снова суспендируют в том же объеме 0,06 M метанольного хлористого водорода и встряхивают еще 24 час. Этот процесс проводят еще дважды, полученный осадок промывают метанолом и сушат. Вещество растворяют в 75 мл воды, осаждают 3 объемами спирта, насыщенного ацетатом натрия, и оставляют на ночь в холодильнике. Осадок отделяют, промывают 5 раз спиртом, 2 раза эфиром и сушат; выход ~ 2,3 г. Результаты анализов следующие:  $[\alpha]_D^{25} + 75^\circ$  (с 2 в воде); элементарный состав: С 32,83%, Н 4,58%, N 2,53%, S 6,57%; найдено ангидроглюкозамин 25,5%, метоксил 5,37%; свободный аминный азот 2,5%; молярное соотношение N и S 1 : 1.

### *N-Ацетилированный частично десульфированный метилловый эфир гепарина, его дальнейшее десульфирование*

К 1 г продукта метанолиза в 20 мл воды прибавляют 2 мл метанола, 1 мл уксусного ангидрида и 25 мл анионита дауэкс 1 (карбонатная форма<sup>2</sup>). Раствор, в котором поддерживается pH 6,5—7,0, встряхивают 2 час при 0—4°. После чего смолу отфильтровывают, а раствор упаривают до 10 мл и приливают 40 мл спирта. Образовавшийся осадок растворяют в 20 мл воды и раствор пропускают через колонку с амберлитом IR-120(H<sup>+</sup>). Колонку промывают водой, элюат нейтрализуют до pH 8 и концентрируют в вакууме при комнатной температуре до 40 мл. Продукт ацетилирования, получаемый после прибавления 120 мл спирта, промывают спиртом и сушат. Выход 650—700 мг; элементарный состав: С 34,58%, Н 4,62%, N 2,26%, S 5,89%; найдено ангидроглюкозамин 27,3%, метоксил 6,18%, ацетил 5,20%, свободного аминного азота нет;  $[\alpha]_D^{25} + 57^\circ$  (с 2 в воде).

Метанолиз этого ацетамидного производного гепарина по описанному выше методу вызывает дальнейшее десульфирование. В конечном продукте молярное соотношение N и S равно 2 : 1; элементарный состав: С 41,90%, Н 5,91%, N 3,15%, S 3,44%; найдено ангидроглюкозамин 29,9%, ацетил 7,12%,  $[\alpha]_D^{25} + 71^\circ$  (с 2 в воде).

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Jorpes E., Bostrom H., Mutt V., J. Biol. Chem., 183, 607 (1950).
2. Danishefsky I., Eiber H. B., Carr J. J., Arch. Biochem. Biophys., 90, 114 (1960).
3. Wolfrom M. L., Montgomery R., J. Am. Chem. Soc., 72, 2859 (1950).
4. Kantor T. G., Schubert M., J. Am. Chem. Soc., 79, 152 (1956).

<sup>1</sup> Метанольный раствор хлористого водорода можно получить, пропуская сухой хлористый водород в абсолютный метанол или прибавляя к метанолу хлористый ацетил.

<sup>2</sup> Вместо анионита можно использовать бикарбонат натрия, но в этом случае необходимо более тщательно контролировать pH.



# СО Д Е Р Ж А Н И Е

Предисловие . . . . .	5
-----------------------	---

## МОНОСАХАРИДЫ И ОЛИГОСАХАРИДЫ

Методы выделения и очистки . . . . .	9
Кристаллизация углеводов и их производных ( <i>А. Томпсон, М. Л. Вольфром</i> ) . . . . .	9
Микроперегонка производных углеводов ( <i>Д. Хортон</i> ) . . . . .	12
Хроматография на колонках с углем ( <i>Р. Л. Уистлер, Д. Н. Бемиллер</i> ) . . . . .	13
Хроматография на колонке с целлюлозой ( <i>Р. Л. Уистлер, Д. Н. Бемиллер</i> ) . . . . .	16
Методы анализа . . . . .	20
Цветные реакции углеводов ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	20
Общие цветные реакции ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	21
Цветные реакции кетоз с карбазолом и серной кислотой ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	24
Цветные реакции тетроз ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	25
Цветные реакции пентоз ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	26
Цветные реакции гексоз ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	30
Цветные реакции гептоз и октоз ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	36
Цветные реакции гексуроновых кислот ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	38
Цветные реакции 6-дезоксип-, 3-дезоксип- и 3,6-дидезоксигексоз ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	42
Цветные реакции 2-дезоксисахаров ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	44
Цветные реакции гексозаминов ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	48
Цветные реакции, основанные на восстанавливающих свойствах сахаров ( <i>З. Дише</i> ) . . . . .	53
Определение и расчет числа 1,2-гликольных групп ( <i>А. С. Перлин</i> ) . . . . .	54
Периодатное окисление ( <i>Р. Д. Гутри</i> ) . . . . .	58
Окисление периодатом ( <i>Дж. К. Спек, мл.</i> ) . . . . .	67
Периодатное окисление ( <i>Р. Д. Гутри</i> ) . . . . .	71
Определение положения радиоактивного углерода в альдозах ( <i>Дж. К. Н. Джонс, Р. Дж. Студли</i> ) . . . . .	73
Производные для идентификации . . . . .	78
Фенилозаны ( <i>Н. К. Рихтмайер</i> ) . . . . .	78
Фенилозотриазолы ( <i>Н. К. Рихтмайер</i> ) . . . . .	81
Простые и сложные эфиры . . . . .	86
Метилловые эфиры моно- и дисахаридов ( <i>Е. Л. Херст, Е. Персивал</i> ) . . . . .	86
Бензилловые эфиры ( <i>Х. Г. Флетчер, мл.</i> ) . . . . .	90
Трифенилметилловые эфиры ( <i>Г. Р. Баркер</i> ) . . . . .	91
2,5- и 3,6-Ангидросахара и их производные ( <i>Б. А. Льюис, Ф. Смит, А. М. Стефен</i> ) . . . . .	94
Ангидросахара типа $\alpha$ -окисей ( <i>Л. Ф. Визгинс</i> ) . . . . .	108
Расщепление метиловых эфиров ( <i>Л. Хаф, Р. С. Теобальд</i> ) . . . . .	110
Расщепление связи углерод — кислород ( <i>Т. Г. Боннер, Е. Дж. Бурн</i> ) . . . . .	113
Ацетилирование ( <i>М. Л. Вольфром, А. Томпсон</i> ) . . . . .	115
Дезацетилирование ( <i>А. Томпсон, М. Л. Вольфром, Е. Паксу</i> ) . . . . .	119
Тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопиранозилбромид ( <i>Р. У. Лемье</i> ) . . . . .	123
Тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозилхлорид ( <i>Р. У. Лемье</i> ) . . . . .	125
Аномерные три-О-бензоил-D-арабинофуранозилбромиды ( <i>Х. Г. Флетчер, мл.</i> ) . . . . .	126
1,3,4,6-Тетрабензоат D-фруктофуранозы ( <i>Дж. В. Ван Клиф</i> ) . . . . .	128



Карбанилаты ( <i>В. М. Хирон</i> ) . . . . .	130
Карбонаты ( <i>Г. Р. Баркер</i> ) . . . . .	132
Сульфонаты ( <i>Ф. Д. Крамер</i> ) . . . . .	134
Тозилаты ( <i>Р. С. Типсон</i> ) . . . . .	136
Восстановительное десульфониrowание ( <i>Р. С. Типсон</i> ) . . . . .	139
Замещение первичных сульфонилоксигрупп ( <i>Р. С. Типсон</i> ) . . . . .	141
Альдозо-1-фосфаты ( <i>Е. В. Путман</i> ) . . . . .	143
Фосфорилирование действием дифенилхлорфосфата ( <i>К. Е. Баллу, Д. Л. Мак-Дональд</i> ) . . . . .	151
Фосфат гликолевого альдегида ( <i>К. Е. Баллу, Д. Л. Мак-Дональд</i> ) . . . . .	152
Сульфаты ( <i>Р. Л. Уистлер, В. В. Спенсер, Дж. Н. Бемиллер</i> ) . . . . .	156
<b>Бензилиденовые и изопропилиденовые производные</b> . . . . .	161
Бензилиденовые производные ( <i>Х. Г. Флетчер, мл.</i> ) . . . . .	161
Изопропилиденовые производные ( <i>О. Т. Шмидт</i> ) . . . . .	162
<b>Гликозиды</b> . . . . .	169
$\alpha$ -Метил-D-глюкопиранозид ( <i>Г. Н. Болленбек</i> ) . . . . .	169
Синтез метилгликопиранозидов по методу Кенигса — Кнорра ( <i>Дж. Кончи, Г. А. Левви</i> ) . . . . .	171
Синтез арилгликозидов по методу Кенигса — Кнорра ( <i>Дж. Кончи, Г. А. Левви</i> ) . . . . .	174
Синтез дисахаридов по реакции Кенигса — Кнорра ( <i>Е. А. Таллей</i> ) . . . . .	176
Синтез арилгликозидов по методу Гельфериха ( <i>Дж. Кончи, Г. А. Левви</i> ) . . . . .	179
Гликофуранозиды из циклических карбонатов ( <i>Е. Л. Херст, Э. Персивал</i> ) . . . . .	181
Получение гликозидов из дитиоацеталей ( <i>Е. Паку</i> ) . . . . .	184
1-Тиогликозиды ( <i>Д. Хортон</i> ) . . . . .	196
Триацетат 1,6-ацгидро- $\beta$ -D-глюкопиранозы (триацетат левоглюкозана) ( <i>Дж. Х. Колеман</i> ) . . . . .	200
<b>Ациклические производные</b> . . . . .	203
Ациклические производные моносахаридов ( <i>М. Л. Вольфром, А. Томпсон</i> ) . . . . .	203
<b>Непредельные сахара</b> . . . . .	206
D-Глюкаль и гликالي ( <i>В. Рот, В. Пигман</i> ) . . . . .	206
<b>Способы обращения конфигурации</b> . . . . .	210
Обращение конфигурации ( <i>Б. Р. Бэйкер</i> ) . . . . .	213
Обращение конфигурации, протекающее с участием соседних групп ( <i>Б. Р. Бэйкер</i> ) . . . . .	215
Обращение конфигурации, протекающее с участием соседней группы ( <i>Б. Р. Бэйкер</i> ) . . . . .	218
<b>Продукты окисления и восстановления</b> . . . . .	221
D-Глюкуроновая кислота ( <i>К. Л. Мельтреттер</i> ) . . . . .	221
D-Идуоновая кислота ( <i>М. Л. Вольфром, Г. Х. Томас</i> ) . . . . .	223
D-Маннуоновая кислота ( <i>Р. Л. Уистлер, Дж. Н. Бемиллер</i> ) . . . . .	225
Восстановление боргидридом натрия ( <i>М. Л. Вольфром, А. Томпсон</i> ) . . . . .	228
Восстановление гидридами металлов ( <i>В. А. Льюис, Ф. Смит, А. М. Стефен</i> ) . . . . .	230
<b>Получение олигосахаридов</b> . . . . .	240
Олигосахариды D-глюкозамина ( <i>Дж. Дистлер, С. Роземан</i> ) . . . . .	240
$\alpha$ -Ламинарибиоза ( <i>В. Барри, Дж. Маккормик</i> ) . . . . .	243
Мальтоотриоза ( <i>Дж. Г. Пазур</i> ) . . . . .	245
$\alpha$ -Паноза ( <i>С. Пан</i> ) . . . . .	247
Софороза ( <i>О. Т. Шмидт</i> ) . . . . .	251
$\beta$ , $\beta$ -Трегалоза ( <i>П. Э. Аллен</i> ) . . . . .	254

## ПОЛИСАХАРИДЫ

<b>Общие методы выделения полисахаридов</b>	259
Растворение полисахаридов (А. О. Ниттет)	259
Удаление белков (А. М. Штауб)	261
Удаление белков с помощью трифтортрихлорэтана (Л. С. Марковиц, Ч. Ф. Ланге, мл.)	262
Фракционирование на колонках с целлюлозой (С. Гарделл)	264
Фракционирование на колонках с диэтиламиноэтилцеллюлозой (Г. Нейком, В. Кюндиг)	268
Фракционирование кислых мукополисахаридов на колонках с целитом и фосфатом кальция (Дж. М. Боунесс)	271
Гель-фильтрация (Г. А. Гранат)	273
Разделения с помощью молекулярных сит (Н. А. Ли, Р. Монтомери)	280
Фракционное осаждение спиртом (Р. Л. Уистлер, Дж. Л. Сачелла)	285
Фракционирование с использованием медных комплексов (Дж. К. Н. Джонс, Р. Дж. Студли)	286
Фракционное осаждение четвертичными аммонийными солями (Дж. Е. Скотт)	288
Фракционирование осаждением гидроокисью бария (Х. Мейер)	294
Зонный электрофорез (Д. Х. Норткот)	295
Диализ (В. В. Бинкли)	299
Удаление воды из аморфных веществ с помощью спирта (Р. Л. Уистлер, Дж. В. Маркс)	301
Липофиллизация (Р. Л. Уистлер, Дж. В. Маркс)	302
Получение в кислотной форме полисахаридов, содержащих уроновые кислоты (Р. Г. Швайгер)	304
<b>Выделение индивидуальных полисахаридов</b>	308
Амилоса и амилопектин из картофельного крахмала (Л. М. Гильберт, Г. А. Гильберт, С. П. Спрэгг)	308
Количественное определение крахмала в растительных тканях (У. З. Хессид, Э. Ф. Ньюфелд)	310
Агар (Дж. Н. Бемиллер)	314
Альгиновая кислота (А. Хауг)	317
Бактериальные полисахариды (Е. Дж. Бурн, Х. Вейдел)	321
Бактериальные полисахариды (В. Т. Дж. Морган)	323
Бактериальные липополисахариды (О. Вестфаль, Г. Яни)	325
Бактериальный липогликопротеин (А. М. Штауб)	333
Соматический деградированный полисахарид грамотрицательных бактерий (А. М. Штауб)	334
Группоспецифические мукополисахариды крови (В. Т. Дж. Морган)	336
Капша-карагепан (Т. Дж. Пейттер)	339
Хитин (Дж. Бемиллер)	340
Гликопротеин из хряща (М. Шуберт)	343
Хондроитин из хондроитинсульфата (М. Шуберт)	345
Хондроитин-4-сульфат (Р. В. Джинлоз)	346
Хондроитин-6-сульфат (Р. В. Джинлоз)	349
Дерматансульфат (Р. В. Джинлоз)	349
Галактоглокоманы (Т. Е. Таймелл)	353
Глюкоманы (Т. Е. Таймелл)	355
Гликоген (Дж. Н. Бемиллер)	356
Гемипцеллюлоза (Р. Л. Уистлер, М. С. Фезер)	360
Пативный ацетилированный полисахарид древесины (Г. О. Боуенг, Б. Линдберг)	362
Гепарин (Р. В. Джинлоз)	364
Гиалуроновая кислота (Р. В. Джинлоз)	367
Инулин (Г. О. Аспикалла, Е. Л. Херст)	370
Ламинаран (В. А. П. Блэк)	371
Нигерап (С. А. Баркер)	374
Пектин и пектовая кислота (Р. М. Мак-Креди)	375
Ксиланы (Г. А. Адамс)	378
Дрожжевые полисахариды (Т. Е. Эдвардс)	382

<b>Методы определения молекулярного веса</b> . . . . .	386
Соотношение вязкость — молекулярный вес ( <i>К. Т. Гринвуд</i> ) . . . . .	386
Диффузия ( <i>Дж. Ф. Фостер</i> ) . . . . .	394
Определение восстанавливающих концевых групп ( <i>Г. С. Исбелл</i> ) . . . . .	396
Определение восстанавливающих концевых групп с помощью периодатного окисления ( <i>Дж. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит, А. М. Унрау</i> ) . . . . .	398
Осмометрия в паровой фазе ( <i>Дж. ван Дем, В. Принс</i> ) . . . . .	399
Изотермическая перегонка ( <i>К. Т. Гринвуд</i> ) . . . . .	406
<b>Физические методы исследования</b> . . . . .	411
Электрофорез с подвижной границей ( <i>Р. Л. Уистлер, К. С. Кэмпбелл</i> ) . . . . .	411
Приготовление и исследование пленок ( <i>Э. Пассаглия, Р. Х. Маршессо</i> ) . . . . .	413
Специфические иммунологические реакции полисахаридов ( <i>П. Э. Аллен</i> ) . . . . .	430
<b>Методы установления строения</b> . . . . .	442
Полный кислотный гидролиз полисахаридов ( <i>Дж. А. Адамс</i> ) . . . . .	442
Частичный кислотный гидролиз ( <i>М. Л. Вольфром, Н. Е. Франкс</i> ) . . . . .	448
Частичный кислотный и ферментативный гидролиз ( <i>Т. Дж. Пейнтер</i> ) . . . . .	452
Кислотный гидролиз слабых связей ( <i>Дж. А. Адамс</i> ) . . . . .	455
Метилирование полисахаридов и фракционирование продуктов метилирования ( <i>Е. Л. Херст, Э. Персивал</i> ) . . . . .	458
Гидролиз метилированных полисахаридов ( <i>Г. О. Боуэнг, Б. Линдберг</i> ) . . . . .	466
Периодатное окисление полисахаридов. Общие методы ( <i>Г. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит</i> ) . . . . .	467
Контролируемая деградация полисахаридов с помощью периодатного окисления, восстановления и гидролиза (распад по Смиту) ( <i>И. Дж. Гольдштейн, Г. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит</i> ) . . . . .	471
Периодатное окисление нейтральных полисахаридов: окисление до формальдегида ( <i>Л. Хаф</i> ) . . . . .	478
Определение средней длины цепи полисахаридов с помощью периодатного окисления, восстановления и анализа образующегося полиола ( <i>Г. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит</i> ) . . . . .	484
Определение остатков сахаров в частично окисленных полисахаридах ( <i>Г. В. Хэй, Б. А. Льюис, Ф. Смит</i> ) . . . . .	487
Распад по Бэрри ( <i>П. С. О'Колла</i> ) . . . . .	488
<b>Производные полисахаридов</b> . . . . .	497
Окисление в уроновые кислоты в полисахаридах ( <i>Г. О. Аспиналл</i> ) . . . . .	497
Восстановление уроновых кислот в полисахаридах ( <i>Г. О. Аспиналл</i> ) . . . . .	499
Карбонилаты ( <i>Дж. Н. Бемиллер</i> ) . . . . .	501
N-Дезацетилирование ( <i>Д. Хортон, Д. Р. Лайнбек</i> ) . . . . .	504
Десульфирование гепарина ( <i>И. Данишевский</i> ) . . . . .	507

## МЕТОДЫ ХИМИИ УГЛЕВОДОВ

Редактор Р. И. Краснова

Художник А. Д. Смеляков

Художественный редактор Н. А. Фильчагина

Технический редактор Ф. Х. Третьякова



Сдано в производство 13/III 1967 г. Подписано к печати 29/VII 1967 г. Бумага тип. № 1  
70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>=16 бум. л. 44,8 печ. л. Уч.-изд. л. 39,67. Изд № 3/3989. Цена 3 р. 04 к. Зак. 878

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1-й Рижский пер., 2

Московская типография № 16 Главполиграфпрома Комитета по печати  
при Совете Министров СССР  
Москва, Трехпрудный пер., 9