

УДК 54.543.4

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ И КАРБАЗОЛ-СЕРНЫЙ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАЛАКТУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДАХ

Гашевская А.С.

*Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Томск, e-mail: asg30@tpu.ru*

В литературных источниках отмечено, что галактуроновая кислота является главным компонентом пектиновых веществ, которые обладают широким спектром фармакологических свойств, что делает их ценными и перспективными веществами для разработки лекарственных средств при лечении ряда заболеваний. В данной работе для сравнительного определения галактуроновой кислоты в растительных полисахаридах были использованы два метода: карбазол-серный метод и метод потенциометрического титрования. Результаты определения галактуроновой кислоты согласуются между собой. Однако результаты, полученные при использовании карбазол-серного метода, завышены, что связано с мешающим влиянием нейтральных сахаров на определение галактуроновой кислоты. Наиболее богатыми галактуроновой кислотой являются растительные полисахариды, выделенные из аира болотного и люцерны посевой. Содержание галактуроновой кислоты в них составляет $39,90 \pm 0,06$ и $24,10 \pm 0,06\%$ соответственно. В работе был предложен метод потенциометрического титрования для исследования конформационных свойств растительных полисахаридов. Было выявлено, что все растительные полисахариды обладают вторичной структурой в водном растворе, которая разрушается при введении солевых растворов NaCl разных концентраций 0,001; 0,025 и 0,05 М. Концентрация соли 0,05 М была достаточна для разрушения вторичной структуры растительных полисахаридов (клубок или спираль) в водном растворе, что отразилось в нормальном ходе кривой титрования слабым раствором КОН 0,01 н.

Ключевые слова: галактуроновая кислота, растительные полисахариды, карбазол-серный метод, потенциометрическое титрование

POTENTIOMETER, AND CARBAZOLE-SULFURIC METHODS FOR THE DETERMINATION OF GALACTURONIC ACID IN PLANT POLYSACCHARIDES

Gashevskaya A.S.

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, e-mail: asg30@tpu.ru

The literature has noted that galacturonic acid is the main component of pectin, which have a wide range of pharmacological properties, making them valuable and promising materials for the development of drugs for the treatment of diseases. In this paper, a comparative determination of galacturonic acid in plant polysaccharides have been used two methods: the carbazole-sulfuric method and potentiometric titration. The results of determination of galacturonic acid agreement. However, the results obtained by using the carbazole-sulfuric method overestimated, due to the interfering effect on the determination of neutral sugars galacturonic acid. The richest plant galacturonic acid is a polysaccharide extracted from Calamus and alfalfa. The content of the galacturonic acid which was $39,90 \pm 0,06$ and $24,10 \pm 0,06\%$, respectively. The paper proposed a method for the potentiometric titration study conformational properties of plant polysaccharides. It was found that all vegetable polysaccharides have secondary structure in aqueous solution, which is destroyed by the introduction of salt solutions of different concentrations of 0,001 m NaCl, 0,025 and 0,05 M. The salt concentration of 0,05 M was sufficient to disrupt the secondary structure of plant polysaccharides (coil or spiral) in an aqueous solution, which is reflected in the normal course of the titration curve of a weak solution of 0,01 N KOH.

Keywords: galacturonic acid, vegetable polysaccharides, carbazole-sulfuric method, potentiometric titration

Растительные полисахариды – важнейший класс природных соединений, находящихся практическое использование в различных областях науки и техники. Полисахариды в последние годы привлекают внимание исследователей в связи с тем, что являются веществами с широким спектром биологической активности [17].

Особое место среди растительных полисахаридов занимают пектиновые полисахариды. Они представляют собой уникальный комплекс биологически активных полисахаридов с детоксицирующими, радиопро-

текторными и другими лечебно-профилактическими свойствами [4].

Разнообразные по структуре и физико-химическим характеристикам растительные полисахариды обладают обширным набором фармакологических свойств. Они снижают такой важный фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний, как уровень холестерина в сыворотке крови. Показано, что ряд производных биополимеров полисахаридного типа проявляют антикоагулянтную активность [4]. Кроме того, некоторые растительные полисахариды

можно рассматривать как пребиотики, т.е. пищевые ингредиенты, которые стимулируют рост полезной микрофлоры кишечника и ограничивают размножение патогенных бактерий [7].

Также растительные полисахариды являются перспективными веществами для получения новых соединений путем химической модификации, используемых в нефтедобыче, буровых работах, пищевой, и косметической промышленности [6].

Кислые полисахариды обладают широким спектром фармакологических свойств, что делает их ценными и перспективными веществами для разработки лекарственных средств при лечении ряда заболеваний.

Известно, что галактуроновая кислота (рис. 1) является главным компонентом пектиновых веществ [11]. Одним из основных этапов исследования структуры полисахаридов является процедура определения в них содержания галактуроновой кислоты.

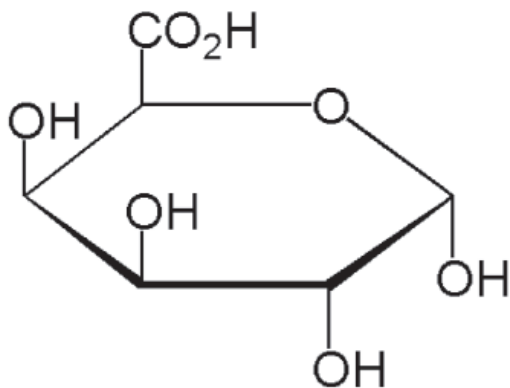


Рис. 1. Структурная формула галактуроновой кислоты

Одним из самых распространенных методов определения галактуроновой кислоты является карбазол-серный метод, основанный на цветной реакции карбазола с продуктами окисления моносахаров, образующихся после разрушения полимерных молекул полисахаридов концентрированной серной кислотой [10]. Преимуществом метода является возможность избирательного определения кислых и нейтральных сахаров. Эта особенность основана на различиях в УФ-спектрах продуктов деградации нейтральных сахаров и уоновых кислот [16]. Недостатками являются трудоемкость метода, длительность, метод требует использования вредных концентрированных кислот и щелочей, осуществляется в несколько этапов, один анализ занимает 6 часов [14].

Поэтому в данной работе в качестве альтернативы карбазол-серного метода для

сравнительного определения процентного содержания галактуроновой кислоты в полисахаридах, выделенных из разного растительного сырья, предложен метод потенциометрического титрования, позволяющий оценить количество карбоксильных групп, величину рК полимера и степень ионизации α .

Преимущества данного метода заключаются в том, он более чувствителен; исключает субъективные ошибки, связанные с визуальным установлением конечной точки титрования; позволяет осуществлять титрование в мутных и окрашенных растворах; дает возможность при определенных условиях дифференцированно определять компоненты из одной пробы [9].

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили полисахариды, выделенные из растительного сырья: аира болотного, стеблей и листьев люцерны посевной, листьев липы, девясила, клевера лугового. Выделение полисахаридов проводили в Центре внедрения технологий СибГМУ.

Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре Cary 60 (Agilent Technologies, Германия) в кварцевых кюветах 10 мм.

Потенциометрическое титрование проводили на УЛК-электрохимическом стенде (ООО Томьаналит, Томск).

Определение галактуроновой кислоты карбазол-серным методом

Данный метод основан на цветной реакции карбазола с продуктами окисления моносахаров, образующихся после разрушения полимерных молекул полисахаридов концентрированной серной кислотой.

Для увеличения селективности определения галактуроновой кислоты в растительных полисахаридах и уменьшения влияния нейтральных сахаров на результаты определения галактуроновой кислоты карбазол-серным методом разрушение полимерной молекулы проводили серной кислотой в присутствии сульфаминовой кислоты, которая препятствует реакции карбазола с альдозами, образовавшимися при гидролизе растительных полисахаридов [2].

Методика заключалась в следующем: навеску 0,1000 г растительного полисахарида растворяли в 25 мл воды при интенсивном перемешивании до полного растворения (раствор А). В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду (раствор Б). В пробирку с раствором А и раствором Б объемом 250 мкл добавляли 0,01 мл раствора сульфаминовой кислоты и тщательно перемешивали. Затем пробирки помещали в емкость со льдом и осторожно, по каплям, по стенке пробирки приливали 1,5 мл раствора тетрабората натрия в серной кислоте, охлажденного до комнатной температуры, не допуская нагревания смеси. Далее пробирки нагревали на кипящей водяной бане в течение 6 минут, после чего вновь охлаждали в емкости со льдом. В пробирку добавляли 0,05 мл раствора карбазола и помещали в кипящую водяную баню на 10 минут, затем охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность относительно раствора сравнения 525 ± 2 нм [12].

Определение галактуроновой кислоты методом потенциометрического титрования

Потенциометрическое титрование растительных полисахаридов проводили в водных растворах, а также в растворах соли NaCl, разных концентраций: 0,001; 0,025; 0,05 М.

Методика заключалась в следующем: навеску полисахарида 0,0100 г растворяли в 10 мл воды в стакане для титрования емкостью 50 мл. Для непрерывного перемешивания использовали магнитную мешалку. Электрохимическая ячейка состояла из стеклянного и хлоридсеребряного электродов. В качестве титранта использовали 0,01 Н раствор щелочи КОН. Измерение pH производили через каждые 0,2 мл добавки титранта. Точку эквивалентности определяли по методу Грана [13].

Результаты исследования и их обсуждение

Для определения галактуроновой кислоты карбазол-серным методом измеряли оптическую плотность при длине волны 525 ± 2 нм. Градуировочная зависимость оптической плотности комплекса карбазола с кислыми сахарами от концентрации галактуроновой кислоты в модельных растворах представлена на рис. 2. Прямолинейная зависимость наблюдалась в области концентраций галактуроновой кислоты от 0,03 до 0,5 мг/мл.

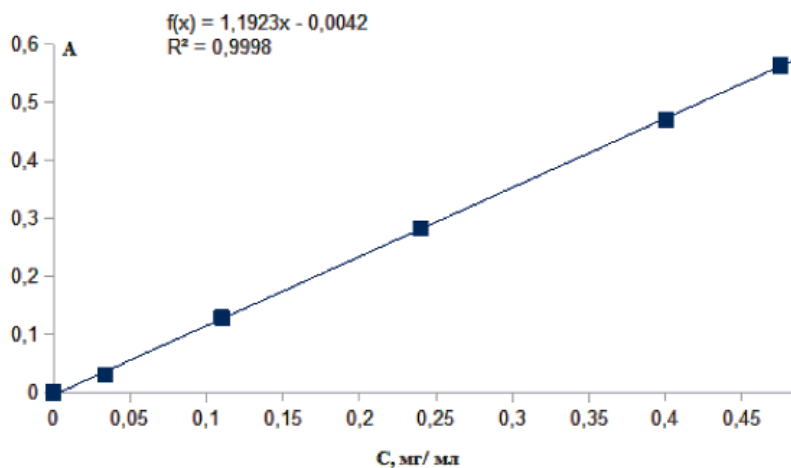


Рис. 2. Зависимость оптической плотности комплекса карбазола с кислыми сахарами от концентрации галактуроновой кислоты в модельных растворах

Общее содержание галактуроновой кислоты в исследуемых образцах полисахаридов проводили методом градуировочного графика с пересчетом результатов в процентах.

Общее содержание галактуроновой кислоты в исследуемых образцах полисахаридов, выраженное в процентах, представлено в табл. 1. Из полученных результатов видно, что наиболее богатыми галактуроновой кислотой являются растительные полисахариды аира болотного и люцерны посевной.

Таблица 1

Общее содержание галактуроновой кислоты в образцах полисахаридов

Растительное сырье	Содержание галактуроновой кислоты, %
Липа	$12,56 \pm 0,62$
Девясил	$15,55 \pm 0,78$
Аир болотный	$40,33 \pm 2,02$
Люцерна посевная	$24,31 \pm 1,22$

Несмотря на то, что карбазол-серный метод широко используется для количественного определения сахаров, он имеет ряд недостатков, таких как длительность подготовки эксперимента, использования вредных и концентрированных кислот и щелочей.

В связи с чем в качестве альтернативы в данной работе предложен метод потенциометрического титрования. На рис. 3 представлена кривая потенциометрического титрования растительных полисахаридов на примере аира болотного.

При использовании потенциометрической индикации конечной точки титрования возникают трудности, связанные с отсутствием четко выраженных перегибов на кривых титрования функциональных групп кислотного характера, что требует последующей математической обработки результатов, такой как построение кривых Грана [1]. Все кривые потенциометрического титрования растительных полисахаридов обработаны по методу Грана.

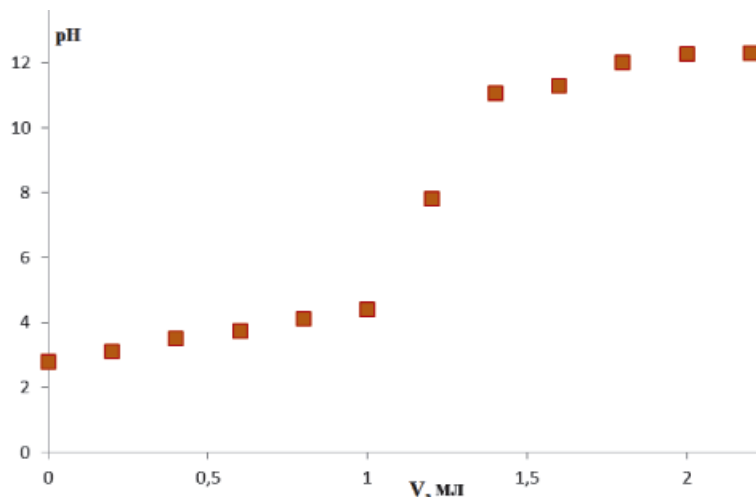


Рис. 3. Кривая потенциметрического титрования аира болотного

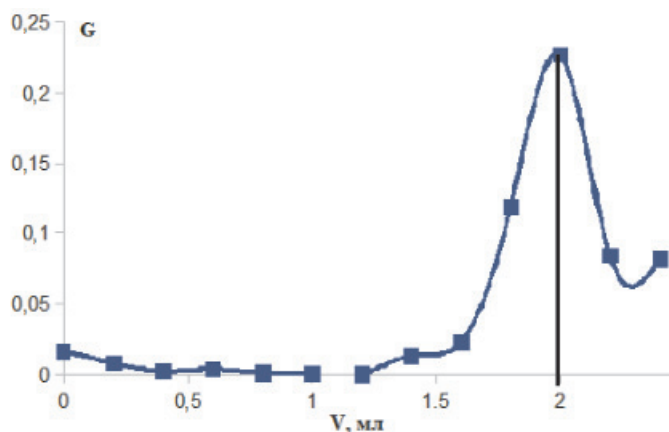


Рис. 4. Определение точки эквивалентности кривой потенциметрического титрования аира болотного методом Грана.

На рис. 4 представлен пример определения конечной точки титрования по методу Грана на примере аира болотного (зависимость величины G от объема титранта):

$$G = (W + V) \cdot 10^{-E} \text{ — для кислой среды;}$$

$$G = (W + V) \cdot 10^{(E-14)} \text{ — для щелочной среды,}$$

где V – объем титранта, мл; E – значения потенциала, B ; W – начальный объем пробы, мл.

На основании рис. 4 конечная точка титрования равна объему 2 мл, что соответствует количеству карбоксильных групп $39,90 \pm 0,06\%$. Результаты по определению галактурановой кислоты методом потенциметрического титрования в образцах полисахаридов представлены в табл. 2.

Из полученных результатов видно, что наиболее богатые галактурановой кислотой являются растительные полисахариды, выделенные из аира болотного и люцерны посевной, что согласуется с результатами, полученными карбазол-серным методом.

Таблица 2

Общее содержание галактурановой кислоты в образцах полисахаридов

Растительное сырье	Содержание галактурановой кислоты, %
Аир болотный	$39,90 \pm 0,06$
Девясил	$15,10 \pm 0,04$
Липа	$12,12 \pm 0,04$
Люцерна посевная	$24,10 \pm 0,06$

Однако результаты определения галактурановой кислоты карбазол-серным методом завышены по сравнению с результатами метода потенциметрического титрования, что связано с мешающим влиянием нейтральных сахаров на определение кислых сахаров карбазол-серным методом.

Необходимо отметить преимущество метода потенциометрического титрования для определения количества свободных неэтерифицированных карбоксильных групп и возможностью использования для изучения конформационных свойств растительных полисахаридов.

Известно, что в водных растворах растительным полисахаридам свойственна высокая специфичность уровней структурной организации макромолекул, что оказывает влияние на определенные параметры, определяемые инструментальными методами анализа. Так, например, при подборе элюента для эксклюзионной хроматографии необходимо учитывать конформационные свойства растительных полисахаридов в водных и солевых растворах [8].

Полимеры являются сложными системами, которые имеют вторичную структуру в виде α -спирали и β -спирали за счет слабых электростатических сил притяжения. Данные свойства проявляются в аномальном ходе кривой титрования, по сравнению с веществами, не обладающими данными свойствами [3].

Исследование конформационных переходов растительных полисахаридов заключается в исследовании зависимости величины константы диссоциации (pK) от степени ионизации (α) [3, 8].

Величину pK определяют из данных потенциометрического титрования растительных полисахаридов и низкомолекулярного аналога (галактуроновой кислоты) по формуле

$$pK = pH - \lg \frac{\alpha}{1 - \alpha}.$$

Величина степени ионизации (α) может быть определена либо из справочных

данных, либо экспериментально из потенциометрического титрования растворов растительных полисахаридов стандартным раствором КОН. Для нахождения α принимают, что в отсутствие щелочи степень диссоциации = 0, а в точке нейтрализации = 1 и что между количеством добавленной КОН и α существует прямолинейная зависимость [5].

При титровании водных растворов растительных полисахаридов происходит разрушение вторичной структуры макромолекул вследствие взаимного отталкивания одноименных заряженных звеньев цепи. Кооперативный конформационный переход проявляется в аномальном ходе кривых титрования по сравнению с аналогичными кривыми для полиэлектролитов, макромолекулы которых не обладают вторичной структурой в водном растворе [15].

На рис. 5 представлена зависимость константы диссоциации (pK) растительных полисахаридов от степени ионизации (α) в водных растворах на примере полисахаридовaira болотного.

На рисунке можно выделить 3 участка:

I – ионизация внешних карбоксильных групп в структурированной форме ($\alpha \sim 0-0,6$).

II – участок соответствует конформационному переходу, сопровождающемуся резким увеличением величины pK от α с небольшим пологим участком. На этом участке величина pK с ростом заряда на цепи не увеличивается в связи с компенсацией разворачивания цепи за счет электростатического отталкивания одноименно заряженных групп и уменьшения линейной плотности заряда.

III – участок подъема кривой, который отвечает ионизации макромолекулы в неструктурированной форме.

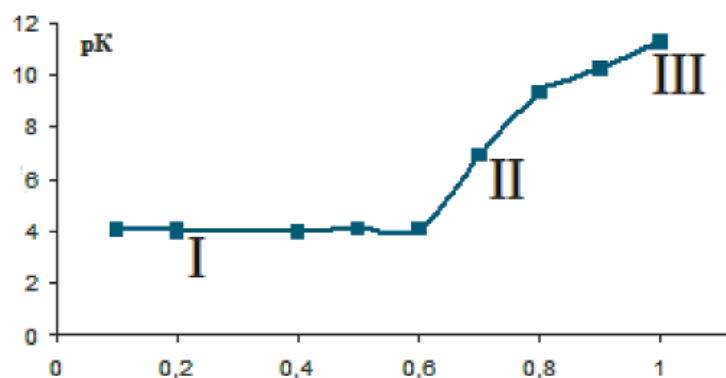


Рис. 5. Зависимость константы диссоциации от степени ионизации полисахаридовaira болотного

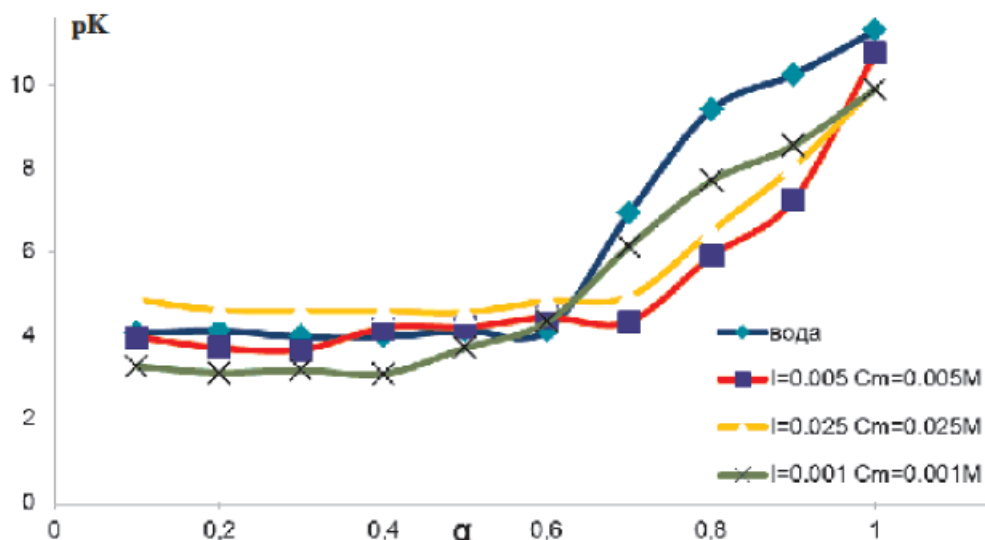


Рис. 6. Зависимости константы диссоциации от степени ионизации аира болотного, полученные при нейтрализации полимера в водном растворе NaCl разных концентраций

Согласно рис. 5 можно отметить, что кривая титрования имеет участок II, что указывает на наличие вторичной структуры (спираль или клубок) в водном растворе.

С введением в раствор растительных полисахаридов сильного электролита происходит ионизация полимера в неструктурированной форме и участок II исчезает.

На рис. 6 представлена кривая титрования зависимости величины pK от α растительных полисахаридов в водном растворе и в солевых растворах разной концентрации на примере аира болотного.

Очевидно, что в водном растворе NaCl при повышении его концентрации аномальный переход кривой титрования не наблюдается. В растворах солей для растительных полисахаридов свойственно разрушение вторичной структуры. В связи с этим в водном растворе NaCl (0,005 M) кривая титрования приобретает стандартный вид. Таким образом, методом потенциометрического титрования можно учесть результаты исследования конформационных свойств растительных полисахаридов при подборе подвижной фазы для определения молекулярной массы методом эксклюзионной хроматографии.

Выводы

Проведено сравнительное определение галактурановой кислоты в растительных полисахаридах карбазол-серным методом и методом потенциометрического титрования. Результаты определения галактурановой кислоты карбазол-серным методом завышены по сравнению с результатами метода потенциометрического титрования, что связано с мешающим влиянием нейтральных сахаров на определение кислых сахаров карбазол-серным методом. Наиболее богатыми галактурановой кислотой являются растительные полисахариды, выделенные из аира болотного. Отмечено, что метод потенциометрического титрования является достаточно простым в использовании, экспрессным и недорогим по сравнению с карбазол-серным методом.

Исследованы конформационные свойства растительных полисахаридов при анализе кривых титрования растворов полисахаридов (зависимость pK от α) без и с последующим добавлением растворов NaCl разных концентраций. Выявлено, что при концентрации NaCl 0,05 M аномальный ход кривой титрования не наблюдается, что связано с ионизацией

полимера из неструктурированной формы, вторичная структура полимера исчезает при введении сильного электролита в раствор полисахарида.

Список литературы

1. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитриук. – Новосибирск, – 2000.
2. Кабанов В.А. Практикум по высокомолекулярным соединениям / под ред. В.А. Кабанова // Химия. – М., 2005.
3. Моравец Г. Макромолекулы в растворе. – М.: «Мир», 2000.
4. Оводов Ю.С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность // Биоорган. хим. – 1998. – Т. 24. – № 7. – С. 483–501.
5. Генфорд П.М. Физическая химия полимеров. – М.: «Химия», 2005.
6. Усов А.И., Выделение и исследование полисахаридов: дис. ... д-ра техн. наук. – М., 2002.
7. Хотимченко Ю.С., Ермак И.М., и соавт. Фармакология не крахмальных полисахаридов // Вестник ДВО РАН. – 2005. – № 1. – С. 234–237.
8. Цветков В.Н. Структура макромолекул в растворах / В.Е. Эскин, С.Я. Френкель. – М.: «Наука», 2004.
9. Dubois M., Colorimetric method for determination of sugars and related substances / Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. // *Analyt. Chem.* – 2006. – Vol. 28. – P. 350–35.
10. Galambos J.T. The reaction of carbazole with carbohydrates: I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars // *Anal. Biochem.* – 2001. – Vol. 19. – P. 119–132.
11. Kulicke W.M. Characterization of water-soluble polysaccharides of the molar mass and particle size as well as their distribution / C. Clasen, C. Lohman // *Macromol. Symp.* – 2005. – Vol. 223. – P. 151–174.
12. Taylor K.A. *Anal. Biochem* / Buchanan-Smith J.G. – 1998. – P. 190–201.
13. Teresa M., Laguna R., Medrano R., Polymer characterization by size-exclusion chromatography with multiple detection // *Journal of Chromatogr. A.* – 2001. – Vol. 919. – P. 13–19.
14. Tullia, M.C. Colometric method for determination of sugar // *Analytical chemistry.* – 1999. – Т. 56. – № 8. – P. 89–94.
15. Wang Guang-li, Wu Song-quan, Wu Qiao-feng. Separation, purification and identification of acidic polysaccharide fraction extracted from *Boletus edulis* and its influence on mouse lymphocyte proliferation in vitro // *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* – 2013. – № 12. – P. 431–437.
16. Whistler R.L., Smart C.L., *Polysaccharide Chemistry*, Academic Press Inc. – New York, N.Y., 1999. – P. 27.
17. Xubo Fang, Bo Jiang, and Xiaolan Wang. Purification and Partial Characterization of an Acidic Polysaccharide with Complement Fixing Ability from the Stems of *Avicennia Marina* // *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* – 2006. – Vol. 39, № 5, September. – P. 546–555.
18. Xubo Fang, Bo Jiang, and Xiaolan Wang. Purification and Partial Characterization of an Acidic Polysaccharide with Complement Fixing Ability from the Stems of *Avicennia Marina* // *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* – 2006. – Vol. 39, № 5, September. – P. 546–555.