

УДК 615.322:664.292:543.544

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА СТАНДАРТИЗАЦИИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕКТИНОВ

Е.В. Хожяенко<sup>1,2</sup>, Р.Ю. Хотимченко<sup>1,2</sup>, В.В. Ковалев<sup>1</sup>, Е.А. Подкорытова<sup>1</sup>, М.Ю. Хотимченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17), <sup>2</sup> Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

**Ключевые слова:** пектин, молекулярно-массовое распределение, эксклюзионная хроматография, концевые восстанавливающие группы.

### DEVELOPMENT OF A METHOD OF STANDARDIZATION FOR LOW-MOLECULAR PECTINS

E.V. Khozhaenko<sup>1,2</sup>, R.Yu. Khotimchenko<sup>1,2</sup>, V.V. Kovalev<sup>1</sup>, E.A. Podkorytova<sup>1</sup>, M.Yu. Khotimchenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy Far Eastern Branch of RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation), <sup>2</sup> School of Biomedicine of Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation)

**Background.** Object of this study was developing a method of standardization of low-molecular pectins-oligouronids according to the chain-length distribution for subsequent validation.

**Methods.** Standardization of oligouronids was carried out using exclusion chromatography techniques and analysis of reducing end groups. The authors studied the eluent influence on the separation of oligouronids with molecular weights of 2.8–15.5 kDa on column with hydrophilic sorbent Shodex Asahipak GS-320 7E.

**Results.** It has been established that the optimal separation of oligouronids on molecular weight is achieved in 0.1M of sodium nitrate at 35°C and the eluent speed of 0.8 ml/min. The values of mass average and number average for oligouronids molecular weights obtained respectively with the exclusion chromatography methods and analysis of the end groups were similar that indicates a relatively small value of polydisperse samples and the validity of these methods for standardizing oligouronids.

**Conclusions.** When comparing the modified tetrazolium method and Nelson method for analyzing oligouronids end groups it was determined that Nelson method allows to obtain more accurate and reliable results and it is applicable for oligouronids standardization.

**Keywords:** pectin, chain-length distribution, exclusion chromatography, reducing end groups.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 2, p. 83–87.

Пектины – биополимеры, известные своими гелеобразующими, стабилизирующими и биологическими свойствами, благодаря чему они широко используются в фармацевтической и пищевой промышленности. Так, имеются многочисленные доказательства наличия у пектиновых полисахаридов иммуномодулирующих, противоопухолевых, противовоспалительных, детоксицирующих, сорбционных, противоязвенных свойств [1, 2, 5, 6, 9, 13, 15]. Пектиновые олигосахариды зарекомендовали себя как эффективные пребиотики [12]. Следует отметить, что практически во всех научно-исследовательских работах, посвященных изучению фармакологической активности пектинов, указывается, что она в первую очередь зависит от их физико-химических свойств. Пектиновые вещества, полученные из различных растительных источников

Хожяенко Елена Владимировна – канд. биол. наук, и.о. зав. кафедрой фармации Школы биомедицины ДВФУ; e-mail: khozhaenko.ev@dvfu.ru

(цитрусы, яблоки, свекла, морские травы и др.) разными методами и отличающиеся степенью этерификации и содержанием ангидрогалактуроновой кислоты, нейтральных сахаров, значительно различаются по своим фармакологическим свойствам и фармацевтическим параметрам [3, 14].

В подавляющем большинстве научных публикаций, посвященных фармакологии пектиновых веществ, в качестве объектов исследований фигурируют преимущественно высокомолекулярные пектины с молекулярной массой более 40 кДа [2, 3, 5–7]. Такие пектины являются гетерополимерами и имеют неоднородную молекулярную структуру, в которой присутствуют участки различного состава и с различной степенью упорядоченности. В то же время, согласно современным представлениям, степень упорядоченности молекулярной структуры поли- и олигосахаридов может существенно влиять на проявляемую ими биологическую активность. Таким образом, можно предположить, что выделение из молекул полисахаридов отдельных участков с наиболее упорядоченной структурой путем направленного гидролиза позволит получить низкомолекулярные вещества (олигоурониды), которые будут обладать принципиально новыми фармакологическими свойствами.

Для адекватной оценки качества низкомолекулярных производных пектиновых полисахаридов необходимы достоверные методы анализа их состава. Особый интерес представляет разработка стандартного метода установления молекулярно-массового распределения низкомолекулярных олигоуронидов, которые обычно характеризуются средневесовой ( $M_w$ ) и среднечисловой ( $M_n$ ) молекулярными массами. Для оценки молекулярных масс используют различные методы: осмометрию, ультрафильтрацию, анализ концевых групп, вискозиметрию, масс-спектрометрию и высокоэффективную эксклюзионную хроматографию. В настоящем исследовании мы выбрали эксклюзионную хроматографию для установления средневесовой молекулярной массы и метод определения концевых восстанавливающих групп сахаров для оценки среднечисловой молекулярной массы. На сегодняшний день эти методы являются высокочувствительными, точными и специфичными.

Эксклюзионная (гельпроникающая) хроматография представляет собой вариант жидкостной хроматографии, в которой разделение веществ

происходит за счет распределения их молекул между растворителем, находящимся внутри пор сорбента, и растворителем, протекающим между его частицами. При определении молекулярных масс полисахаридов одной из сложных задач является выбор колонки и элюента [4]. В данной работе разделение проводили на колонке с гидрофильным полимерным сорбентом Shodex Asahipak GS-320 7E. Одной из главных задач был подбор наиболее подходящего элюента для разделения олигоуридов с молекулярными массами от 1 до 20 кДа [10].

Существуют различные вариации методов определения восстанавливающих групп сахаров, основанных на их реакциях с феррицианидом калия, тетразолиевым синим, динитросалициловой, арсеномолибденовой (метод Нельсона) и бицинхониновой кислотами [11]. Для нашего исследования, исходя из требований по чувствительности (5–200 нмоль) и простоте реализации, были выбраны два метода: метод Нельсона и метод, основанный на реакции сахаров с тетразолиевым синим [11]. В основе метода Нельсона лежит реакция восстановления олигосахаридами ионов двухвалентной меди в одновалентные ионы при нагревании комплексной соли тартрата меди в щелочной среде. Образующиеся ионы одновалентной меди в щелочной среде формируются в осадок закиси меди. При последующем взаимодействии закиси меди с арсеномолибденовой кислотой происходит восстановление последней с образованием интенсивно окрашенного продукта – молибденовой сини, интенсивность окраски которой измеряется при 620 нм. В основе второго метода – восстановление тетразолиевого синего в щелочной среде с образованием интенсивно окрашенного продукта – диформаза, имеющего максимум поглощения при 660 нм. По содержанию концевых восстанавливающих групп в образце олигоурида рассчитывается его среднечисловая молекулярная масса.

Целью данного исследования была разработка метода стандартизации низкомолекулярных пектинов-олигоуридов по молекулярно-массовому распределению для последующей его валидации.

**Материал и методы.** В качестве исходного сырья для получения пектиновых олигоуридов использовали коммерческий пектин из кожуры цитрусовых (Sigma-Aldrich, США) с содержанием ангидрогалактуроновой кислоты – 74 % и степенью этерификации – 85 %. Из него путем щелочной деэтерификации в среде 70 %-ного этанола был получен пектин со степенью этерификации 1,2 % [7]. Для получения образцов олигоуридов с различной молекулярной массой низкоэтерифицированный пектин подвергали гидролизу 0,5М соляной кислотой при температуре 90°C в течение 2, 4 и 12 часов с последующей очисткой и фракционированием продуктов гидролиза на ультрафильтрационных мембранах с пределами пропускания 1, 5, 10 и 30 кДа [8]. Таким образом, были получены три образца олигоуридов, отличающихся по молекулярному составу.

Образец №1 представлял фракцию олигоуридов, прошедшую через ультрафильтрационную мембрану на 30 кДа и задержанную на мембране 10 кДа. Образец № 2 представлял фракцию олигоуридов, прошедшую через мембрану на 10 кДа и задержанную на мембране 5 кДа. Образец № 3 представлял фракцию олигоуридов, прошедшую через мембрану на 5 кДа и задержанную на мембране 1 кДа.

В качестве стандартов для калибровки колонки использовали набор пуллуланов с молекулярными массами 0,342–20 кДа (Sigma-Aldrich, Бельгия), европейские фармакопейные стандарты декстранов 1, 4 и 10 кДа (Sigma-Aldrich, Страсбург). Для построения калибровочных кривых при определении концевых групп применяли D-(+)-галактуроновую кислоту для аналитики (Sigma-Aldrich, Словакия).

Молекулярную массу олигоуридов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на системе Shimadzu LC-20 AD с колонкой Shodex-Asahipak GS-320 7E, с рефрактометрическим детектором RID-10A и детектором светорассеивания ELSD-LTII. С целью подбора оптимального элюента для хроматографии пектиновых олигосахаридов были протестированы такие подвижные фазы, как вода типа I, очищенная с помощью системы Millipore Simplicity, 50мМ аммиачно-ацетатный буфер, 0,1М нитрат натрия. Процесс хроматографирования проводили со скоростью 0,8 мл/мин при температуре 35 °С.

Для определения концевых групп в молекулах олигоуридов, как указывалось выше, были использованы метод Нельсона и метод, основанный на восстановлении тетразолиевого синего [11]. С целью повышения чувствительности второго метода он был модифицирован следующим образом: к 2 мл раствора исследуемого образца прибавляли 2 мл раствора, содержащего 0,1 % тетразолиевого синего, 0,05М гидроксида натрия и 0,5М калия натрия тартрата. Смесь нагревали на кипящей водяной бане 3 мин, затем охлаждали и измеряли оптическую плотность при 660 нм.

Для построения калибровочного графика в обоих методах в качестве стандарта использовали D-галактуроновую кислоту в концентрации 5–200 нмоль/мл.

Среднечисловую молекулярную массу образца олигоурида ( $M_n$ ) в дальтонах вычисляли по формуле:

$$M_n = \frac{m \times (100 - W) \times 0,884 \times 10\,000}{C \times 0,907 \times 100},$$

где:  $m$  – масса навески олигоурида, мг;  $W$  – массовая доля воды в образце олигоурида, %;  $C$  – эквивалентная концентрация D-галактуроновой кислоты, найденная по калибровочному графику, нмоль/мл; 0,907 – коэффициент пересчета D-галактуроновой кислоты в ангидро-D-галактуроновую кислоту; 0,884 – коэффициент пересчета олигоурида натрия в полигалактуроновую кислоту.

**Результаты исследования.** На первом этапе работы проводилось определение молекулярных масс образцов олигоуридов методом эксклюзионной

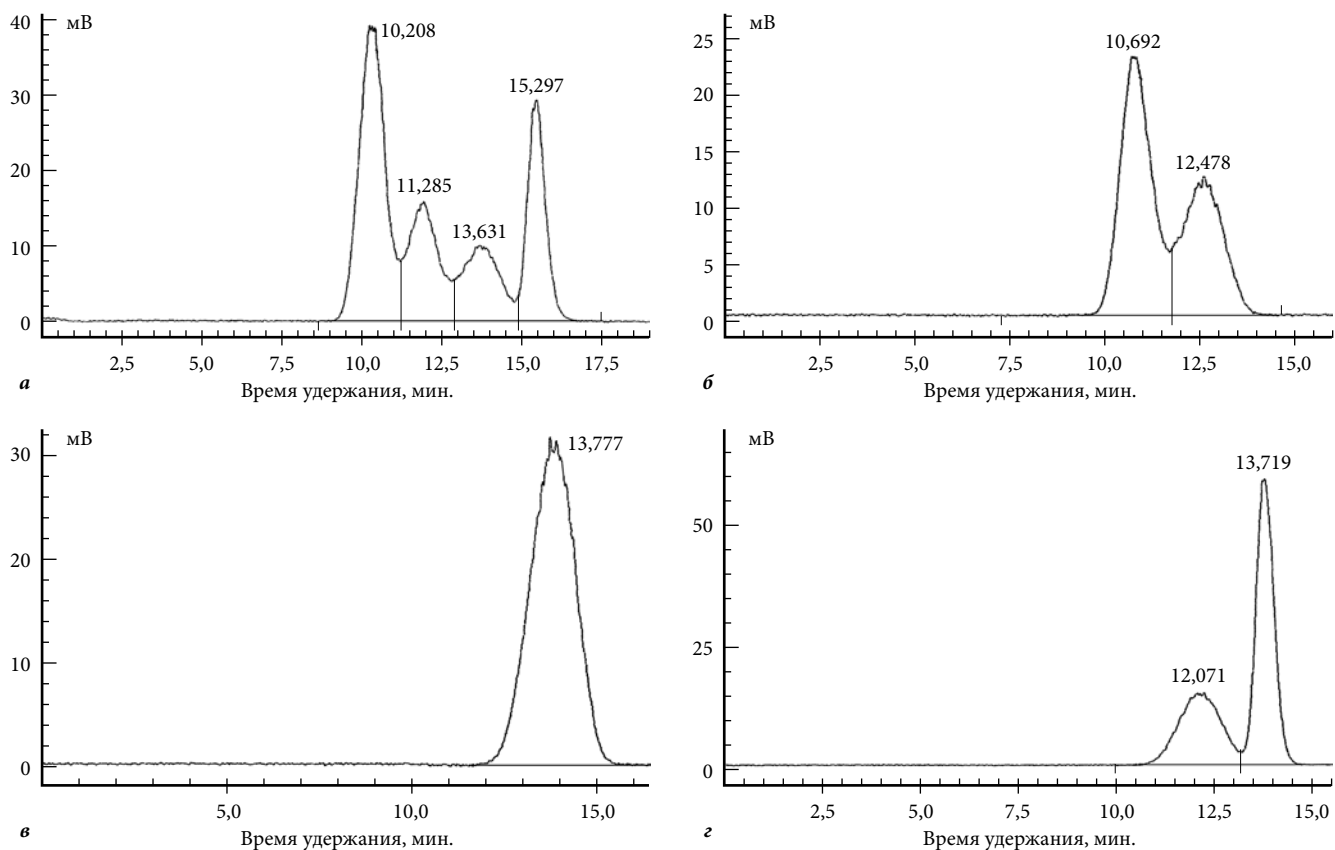


Рис. 1. Хроматограммы:  
 а – пуллуланы 20, 10, 5 и 1,2 кДа; б – образец № 1 – 15,5 кДа; в – образец № 3 – 2,8 кДа; г – образец № 2 – 6,8 кДа.

хроматографии. С целью подбора оптимальных условий разделения образцов были опробованы три различные подвижные фазы. При проведении элюирования водой при скоростях 0,5, 0,8 и 1 мл/мин наблюдалось нечеткое разделение пиков. Последовательное повышение температуры колонки до 60 °С не дало положительных результатов. При элюировании 50мМ аммиачно-ацетатным буферным раствором с рН 5,2 нормальные хроматограммы были получены для двух образцов олигоурунидов, но при этом сильно сдвигалось время выхода пуллуланов и декстранов, и построить приемлемую калибровочную кривую при использовании аммиачно-ацетатного буфера не удалось. Для подавления полиэлектролитных эффектов и разрушения ассоциатов олигоурунидов был применен 0,1М нитрат натрия при скорости потока 0,8 мл/мин. Данный подход позволил получить правильные пики для трех образцов олигоурунидов и пуллуланов (рис. 1). Стандарты декстранов фракционировались лишь при повышении концентрации подвижной фазы до 0,6М. С помощью программного обеспечения LC Solution были рассчитаны показатели средневесовых молекулярных масс (табл.).

На втором этапе работы оценивались характеристики и возможности двух различных методов определения концевых восстанавливающих групп олигоурунидов. При анализе D-галактурановой кислоты методом Нельсона и модифицированным методом на основе тетразолиевого синего показана высокая

Таблица  
 Молекулярно-массовые характеристики олигоурунидов

№ образца	Mw, кДа	Mn, кДа	Mw/Mn
1	2,8	1,35	2,08
2	6,8	6,7	1,02
3	15,5	11,8	1,31

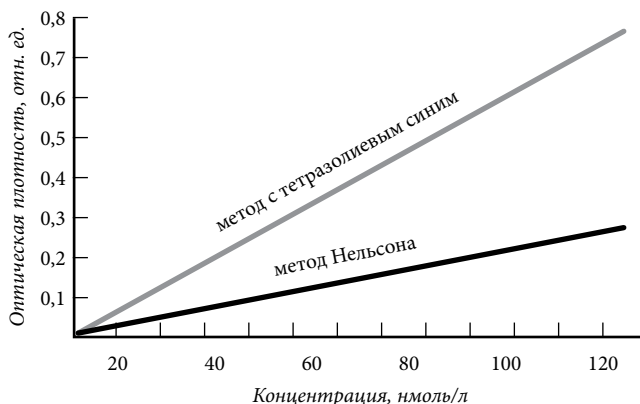


Рис. 2. Калибровочный график по D-галактурановой кислоте.

чувствительность и точность. Калибровочные графики демонстрировали практически линейную зависимость интенсивности окраски раствора от концентрации галактурановой кислоты в диапазоне от 5 до 125 нмоль/л (рис. 2). При этом чувствительность тетразолиевого метода оказалась примерно в 2,6 раза выше, чем метода Нельсона.

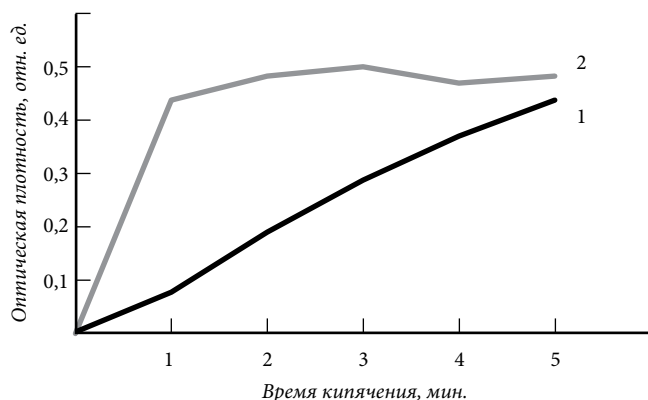


Рис. 3. Кинетика реакции с тетразолиевым синим:

1 – олигоурид – образец № 1, 250 мкг/мл; 2 – D-галактурановая кислота, 80 нмоль/мл.

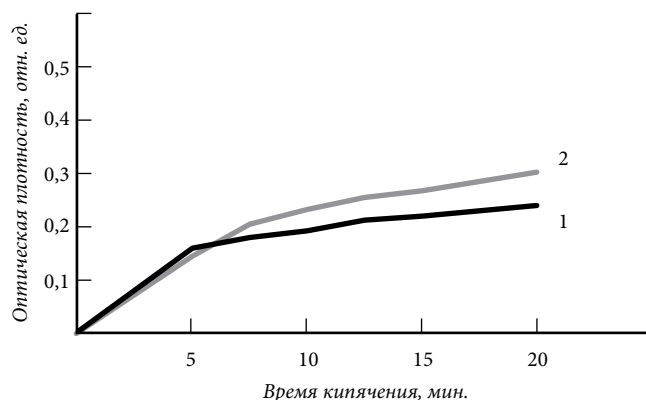


Рис. 4. Кинетика реакции по методу Нельсона:

1 – олигоурид – образец №1, 1000 мкг/мл; 2 – D-галактурановая кислота, 100 нмоль/мл.

В следующем эксперименте оценивалась пригодность указанных методов для анализа концевых групп в молекулах олигоуридов. С этой целью исследовалось влияние длительности тепловой обработки (кипячения) образцов на воспроизводимость результатов определений. Длительность тепловой обработки в эксперименте для метода Нельсона составляла от 5 до 20 мин., а для метода с тетразолиевым синим – от 1 до 5 мин. Указанные диапазоны были выбраны исходя из рекомендуемого авторами оптимального времени обработки образцов – 10 мин для метода Нельсона и 3 мин для метода с тетразолиевым синим. Было установлено, что при использовании метода с тетразолиевым синим динамика развития окраски имела неодинаковый характер для D-галактурановой кислоты и олигоурида образца № 1 (рис. 3). Для D-галактурановой кислоты интенсивность окраски сначала быстро возрастала, а затем, начиная со 2-й минуты, стабилизировалась и в дальнейшем практически не зависела от времени тепловой обработки. В то же время для олигоурида интенсивность окраски непрерывно возрастала в течение всего времени обработки. При этом зависимость интенсивности окраски от времени обработки для олигоурида составила 0,097 единиц оптической плотности/мин.

При использовании метода Нельсона интенсивность окраски для D-галактурановой кислоты и олигоурида медленно и равномерно возрастала с увеличением времени тепловой обработки (рис. 4). Графики кинетики реакции для D-галактурановой кислоты и олигоурида имели близкие значения тангенса угла наклона. При этом зависимость окраски от времени обработки для олигоурида была даже несколько меньше, чем для D-галактурановой кислоты и составляла 0,004 единицы оптической плотности/мин. В дальнейшем анализ концевых групп в образцах олигоуридов проводили по методу Нельсона, время кипячения образцов – 10 мин. Результаты определения среднечисловой молекулярной массы олигоуридов приведены в таблице.

**Обсуждение полученных данных.** При эксклюзионной хроматографии олигоуридов возникают

различные электростатические взаимодействия молекул растворенного вещества как между собой, так и с поверхностью сорбента. Склонность олигоуридов к ассоциации обусловлена присутствием гидроксильных и карбоксильных групп, способных образовывать многочисленные водородные и ионные связи, а также благодаря наличию участков с регулярной структурой, способных к образованию энергетически выгодных псевдокристаллических форм. При ассоциации олигоуридов происходит образование молекулярных агрегатов, что ухудшает разделение молекул на колонке и приводит к фактическому завышению определяемой величины молекулярной массы. Другой причиной ухудшения разделения олигоуридов может быть взаимодействие их отрицательно заряженных молекул с поверхностью сорбента, которая также может нести небольшой отрицательный заряд. Описанные процессы могут быть причиной плохого разделения олигоуридов при использовании воды в качестве элюента. Для подавления указанных эффектов целесообразно применение растворов электролитов – аммиачно-ацетатного буфера с pH 5,2 и нитрата натрия. При pH 5,2 происходит ионизация определенной части карбоксильных групп молекул олигоуридов и они приобретают определенный отрицательный заряд, достаточный для взаимного отталкивания. Это несколько улучшает разделение олигоуридов, но ухудшает разделение пуллуланов и декстранов. Лучшие результаты были получены при использовании раствора нитрата натрия в концентрации не ниже 0,1M. При этом удалось достичь приемлемого разделения как олигоуридов, так и пуллуланов.

Во многих случаях анализ концевых групп является наиболее простым и удобным способом установления молекулярной массы поли- и олигосахаридов. При выборе метода анализа для конкретного вещества основными критериями являются его достаточная чувствительность и воспроизводимость. В этом плане тетразолиевый синий является удобным реагентом для определения свободной D-галактурановой кислоты, благодаря простоте и скорости метода и хорошей воспроизводимости результатов анализа. Метод позволяет

проводить определение D-галактуроновой кислоты при концентрации 5 нмоль/мл и выше. Как видно из графика кинетики реакции (рис. 3) данный метод не подходит для анализа полимеров D-галактуроновой кислоты – олигоурунидов, так как в ходе самого анализа с высокой скоростью происходит образование новых восстанавливающих групп, вступающих в реакцию с тетразолиевым синим. Данное явление может объясняться малой устойчивостью олигоурунидов в щелочной среде, необходимой для анализа, что приводит к их гидролизу и, соответственно, к появлению новых концевых групп. Таким образом представленная на рис. 2 кинетическая кривая реакции олигоурунидов с тетразолиевым синим скорее всего отражает кинетику гидролиза олигоурунидов.

Метод Нельсона обладает несколько меньшей чувствительностью по сравнению с предыдущим, но дает хорошую воспроизводимость результатов при анализе олигоурунидов. Он позволяет проводить определение D-галактуроновой кислоты при концентрации 20 нмоль/мл и выше. Сходство графиков кинетики реакции для олигоурунида и D-галактуроновой кислоты (рис. 4) показывает, что реакция ионов меди с олигоурунидом протекает аналогично их реакции с D-галактуроновой кислотой. То есть в данном случае процесс тепловой обработки олигоурунида не приводит к образованию новых концевых групп, что свидетельствует об отсутствии его гидролиза в заметных количествах. Развитие окраски при анализе олигоурунида стабилизируется на 5–6-й минуте тепловой обработки и в дальнейшем ее изменение не превышает 0,004 единицы оптической плотности /мин, что в 24 раза меньше, чем в методе с тетразолиевым синим. В точке графика, соответствующей 10-й мин тепловой обработки относительная погрешность измерения, вызванная изменением окраски во времени составляет 2%/мин. То есть при выдерживании времени тепловой обработки с точностью  $\pm 15$  с указанная погрешность не превышает 0,5%.

Таким образом метод Нельсона может быть рекомендован в качестве достаточно надежного и точного для определения концевых групп в молекулах олигоурунидов в процессе их стандартизации.

Приведенные в таблице значения средневесовой и среднечисловой молекулярных масс олигоурунидов, полученные, соответственно, методами эксклюзионной хроматографии и анализа концевых групп имеют близкие значения, что свидетельствует об относительно небольшой величине полидисперсии образцов и пригодности указанных методов для стандартизации олигоурунидов.

*Работа поддержана Министерством образования и науки РФ, код проекта 413.*

#### Литература

1. Хасина Э.И., Требухов Е.Е., Хотимченко Ю.С., Ковалев В.В. Средство, обладающее адаптогенной активностью, и композиция на его основе. Патент на изобретение RUS 2129010.
2. Хотимченко Ю.С., Хасина Э.И., Ковалев В.В. и др. Эффективность пищевых некрахмальных полисахаридов при экс-

- периментальном токсическом гепатите // Вопросы питания. 2000. Т. 69, № 1–2. С. 22–26.
3. Harding S.E., Berth G., Ball A. [et al.]. The molecular weight distribution and conformation of citrus pectins in solution studied by hydrodynamics // Carbohydrate Polymers. 1991. Vol. 16, No. 1. P. 1–15.
  4. He Y., Hou W., Thompson M. [et al.]. Size exclusion chromatography of polysaccharides with reverse phase liquid chromatography // Journal of Chromatography A. 2014. Vol. 1323. P. 97–103.
  5. Jeurink P.V., Van Esch B.C.A.M., Rijnierse A. Mechanisms underlying immune effects of dietary oligosaccharides // The American Journal of Clinical Nutrition. 2013. Vol. 98, No. 2. P. 572S–577S.
  6. Khotimchenko M.Yu. Lipid-lowering activity of low-esterified pectins in experimental ethanol-induced liver injury // Russian Journal of Marine Biology. 2009. Vol. 35, No. 4. P. 351–354.
  7. Khotimchenko M.Y., Kolenchenko E.A., Khotimchenko Y.S. [et al.]. Cerium binding activity of different pectin compounds in aqueous solutions // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010. Vol. 77, No. 1. P. 104–110.
  8. Khotimchenko M., Kovalev V., Kolenchenko E., Khotimchenko Y. Acidic method for the low molecular pectin preparation // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012. Vol. 4, No. 1. P. 279–283.
  9. Khotimchenko M., Sergushchenko I., Khotimchenko Yu. The effects of low-esterified pectin on lead-induced thyroid injury in rats // Envir. Toxicol. Pharmacol. 2004. Vol. 17, No. 2. P. 67–71.
  10. Methacanon P., Krongsin J., Gamonpilas C. Pomelo (Citrus maxima) pectin: Effects of extraction parameters and its properties // Food Hydrocolloids. 2014. Vol. 35. P. 383–391.
  11. Moretti R., Thorson J.S. A comparison of sugar indicators enables a universal high-throughput sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase assay // Analytical Biochemistry. 2008. Vol. 377, No. 2. P. 251–258.
  12. Morris V.J., Belshaw N.J., Waldron K.W., Maxwell E.G. The bioactivity of modified pectin fragments // Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2013. Vol. 1, No. 1. P. 21–37.
  13. Peng Q., Xu Q., Yin H. [et al.]. Characterization of an immunologically active pectin from the fruits of Lycium ruthenicum // Int. Journal of Biological Macromolecules. 2014. Vol. 64. P. 69–75.
  14. Popov S.V., Markov P.A., Popov G.Yu. [et al.]. Anti-inflammatory activity of low and high methoxylated citrus pectins // Biomedicine and Preventive Nutrition. 2013. Vol. 3, No. 1. P. 59–63.
  15. Salman H., Bergman M., Djaldetti M. [et al.]. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells // Biomed. Pharmacother. 2008. Vol. 62, No. 9. P. 579–582.

*Поступила в редакцию 02.04.2014.*

#### Разработка метода стандартизации низкомолекулярных пектинов

Е.В. Хожаенко<sup>1,2</sup>, Р.Ю. Хотимченко<sup>1,2</sup>, В.В. Ковалев<sup>1</sup>, Е.А. Подкорытова<sup>1</sup>, М.Ю. Хотимченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17), <sup>2</sup> Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

**Резюме.** Разработан метод стандартизации олигоурунидов по их молекулярно-массовому распределению с использованием эксклюзионной хроматографии и анализа концевых восстанавливающих групп. Исследовалось влияние элюента на разделение олигоурунидов с молекулярными массами 2,8–15,5 кДа на колонке с гидрофильным сорбентом Shodex Asahipak GS-320 7E. Установлено, что оптимальное разделение олигоурунидов по молекулярным массам достигается в 0,1М нитрате натрия при 35°C и скорости элюента 0,8 мл/мин. Проведена оценка модифицированного тетразолиевого метода и метода Нельсона для анализа концевых групп олигоурунидов. Установлено, что метод Нельсона позволяет получать более точные и надежные результаты и пригоден для стандартизации олигоурунидов.

**Ключевые слова:** пектин, молекулярно-массовое распределение, эксклюзионная хроматография, концевые восстанавливающие группы.