

Oddelovanie aldobiurónových kyselín na vymieňači aniónov

J. ROSÍK, V. ZITKO, J. KUBALA

*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied,
Bratislava*

Zmes aldobiurónových a urónových kyselín možno rozdeliť na silne bázickom vymieňači aniónov Dowex 1 v acetátovej forme gradientovou elúciou kyseliny octovej.

V literatúre sa opisujú viaceré modifikácie na oddelenie urónových a niektorých aldobiurónových kyselín na vymieňačoch aniónov. J. X. Khym a D. G. Doherty oddelili kyselinu glukurónovú od kyseliny galakturónovej elúciou kyselinou octovou [1]. A. Hallén na takúto separáciu používal ako elučné činidlo zmes tetraboritanu a kyslého uhličitanu sodného [2]. R. Derungs a H. Deuel oddelili oligogalakturónové kyseliny gradientovou elúciou kyselinou mravčou [3]. Niektoré urónové kyseliny oddelili aj B. Larsen a A. Haug elúciou kyselinou octovou [4]. D. Dziewiatkowski separoval hexurónové kyseliny za podobných podmienok elúciou roztokom octanu sodného [5]. O. Samuelson a L. O. Wallenius rozdelili zmes aldónových a aldobiurónových kyselín [6]. O. Samuelson a L. Wictorin eluovali v mikromeradle 0,02 M octanom sodným aldobiurónové kyseliny: 2-*O*-(4-*O*-metyl- α -D-glukuronopyranozyl)-D-xylózu, 6-*O*-(β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktózu a 2-*O*-(α -D-glukuronopyranozyl)-D-xylózu. Elúciou 0,08 M octanom sodným získali kyseliny urónové v poradí: 4-*O*-metyl-D-glukurónovú, D-galakturónovú a D-manurónovú [7].

V našej práci sme sa zamerali na oddelenie týchto látok: 6-*O*-(4-*O*-metyl- β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktózy, 2-*O*-(β -D-glukuronopyranozyl)manózy, kyseliny 4-*O*-metyl-D-glukurónovej, kyseliny D-glukurónovej, 6-*O*-(β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktózy, 4-*O*-(α -D-galakturonopyranozyl)-D-galaktózy, kyseliny 4-*O*-(α -D-galakturonopyranozyl)-D-galakturónovej a kyseliny D-galakturónovej. S problémom preparatívneho oddelovania týchto látok sme sa stretli pri štrukturálnom výskume gummy marhule (*Prunus armeniaca* L.) [8], ako aj pri štrukturálnom výskume kyseliny pektínovej z planých jabĺk (*Malus sylvestris* MILL.) [9].

Experimentálna časť

Chemikálie

Na oddelovanie sa použil silne bázický vymieňač aniónov Dowex 1X8, 100/200 mesh, ktorý sa aktivoval 3 %-ným NaOH a premyl sa vodou. Nasledovalo premývanie 2 M kyselinou octovou a nakoniec vodou do neutrálnej reakcie. Takto pripraveným vymieňačom aniónov sa naplnila kolónka o rozmeroch 17 × 1030 mm.

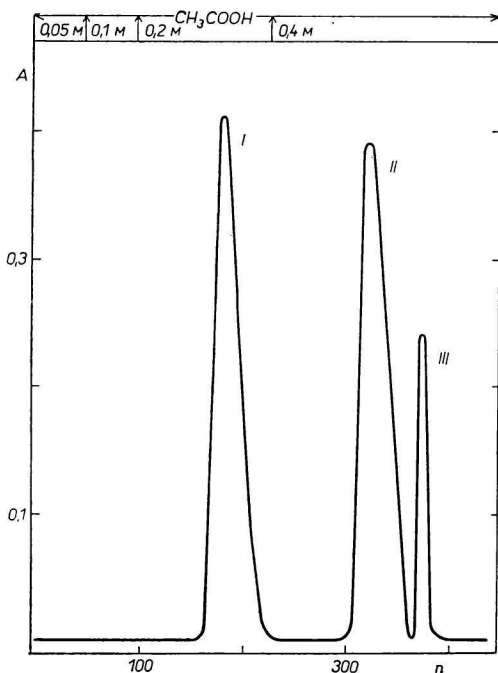
6-*O*-(4-*O*-Metyl- β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza, $R_{\text{GalA}} = 0,87$, $[\alpha]_{\text{D}} = +2,8^\circ$ (Ba sol, $c = 2,04$ vo vode); 2-*O*-(β -D-glukuronopyranozyl)manóza, $R_{\text{GalA}} = 0,68$, $[\alpha]_{\text{D}} = -27,4^\circ$ (Ba sol, $c = 2,04$ vo vode); 6-*O*-(β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza, $R_{\text{GalA}} = 0,47$, $[\alpha]_{\text{D}} = -6,0^\circ$ (Ba sol, $c = 1,43$ vo vode); kyselina 4-*O*-metyl-D-glukurónová a kyselina D-glukurónová sa pripravili v laboratórnych podmienkach a z bárnatých solí sa uvoľnili perkoláciou cez Zerolit 225 v H^+ forme [8]. 4-*O*-(α -D-Galakturonopyranozyl)-D-galaktóza, $R_{\text{GalA}} = 0,50$, $[\alpha]_{\text{D}} = +136^\circ$ ($c = 1,04$ vo vode); kyselina 4-*O*-(α -D-galakturonopyranozyl)-D-galakturónová, $R_{\text{GalA}} = 0,43$, $[\alpha]_{\text{D}} = +144^\circ$ ($c = 1,64$ vo vode) a kyselina D-galakturónová sa takisto pripravili v laboratórnych podmienkach [9].

Pracovný postup

Na kolónku s Dowexom 1 sme vniesli 10 ml vodného roztoku 168 mg 6-*O*-(4-*O*-metyl- β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktózy, 42 mg 2-*O*-(β -D-glukuronopyranozyl)manózy, 52 mg kyseliny 4-*O*-metyl-D-glukurónovej a 32 mg kyseliny D-glukurónovej, resp. 10 ml vodného roztoku 120 mg 4-*O*-(α -D-galakturonopyranozyl)-D-galaktózy, 50 mg kyseliny 4-*O*-(α -D-galakturonopyranozyl)-D-galakturónovej a 35 mg kyseliny D-galakturónovej. Frakcie po 10 ml sme zachytávali na automatickom zberači frakcií, ktorý pracoval nepretržite pri teplote miestnosti ca 22°C . Prietoková rýchlosť bola 0,3 ml/min. Ako elučné činidlo slúžila kyselina octová v rozmedzí koncentrácií 0,05–0,4 M. Množstvo použitého elučného činidla vidieť na obr. 1.

Frakcie sa kvalitatívne analyzovali reakciou s fenolom a kyselinou sírovou [10]. Absorbancia sa merala na Langovom fotokolorimetri VI pri 530 m μ v 1 cm kyvetách.

Spojené frakcie (I, II, III na obr. 1) sme analyzovali chromatografiou na papieri



Obr. 1. Frakcionácia aldobiurónových a urónových kyselín.
 n = počet frakcií; A = absorbancia; I, II, III = frakcie.

zostupnou metódou v sústave octan étylnatý—kyselina octová—voda v pomere 18 : 7 : 8 na papieri Whatman 1. Na detekciu sme použili kyslý ftalát anilínu [11]. Ako štandard slúžila kyselina D-galakturónová, na ktorú sa vzťahujú všetky R_F hodnoty.

Disociačné konštanty aldobiurónových kyselín s jednou karboxylovou skupinou vyjadrené v pK (tab. 1) sú hodnoty pH pri polovičnej ekvivalentovej spotrebe hydroxidu sodného. Potenciometrická titrácia sa vykonala na prístroji Titrator TTT 1c pri koncentrácii aldobiurónových kyselín 0,004—0,005 ekv. —COOH/l pri teplote miestnosti ca 22 °C. Na indikáciu sa použila sklená elektróda. Disociačné konštanty kyseliny D-glukurónovej a kyseliny D-galakturónovej sú hodnoty udávané v literatúre [12, 13]. Pre nedostatok materiálu sme nestanovili disociačné konštanty kyseliny 4-O-metyl-D-glukurónovej a kyseliny 4-O-(α -D-galakturonopyranozyl)-D-galakturónovej.

Výsledky a diskusia

Oddeľovaním aldobiurónových kyselín od urónových kyselín na vymieňači aniónov sa zistilo, že najskôr sa eluujú aldobiurónové kyseliny a až potom nasleduje elúcia urónových kyselín [7]. Tento poznatok sa potvrdil aj v našom prípade. Výsledky oddeľovania sú na obr. 1. Za použitia kyseliny octovej o koncentrácii 0,05 M a 0,1 M nedochádzalo k elúcii. Kyselinou octovou o koncentrácii 0,2 M sa získala frakcia (I) a chromatograficky sa identifikovala ako 6-O-(4-O-metyl- β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza. Kyselinou octovou o koncentrácii 0,4 M sa eluovala ďalšia frakcia (II) a chromatograficky sa identifikovala ako 2-O-(β -D-glukuronopyranozyl)manóza. Kyselinou octovou o tej istej koncentrácii sa eluovala frakcia (III) a chromatograficky sa identifikovala zmes kyseliny 4-O-metyl-D-glukurónovej a kyseliny D-glukurónovej.

Pri koncentrácii 0,2 M kyseliny octovej sa eluuje aj 6-O-(β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza. Na elúciu 4-O-(α -D-galakturonopyranozyl)-D-galaktózy a kyseliny D-galakturónovej je potrebná 0,4 M kyselina octová. Kyselina 4-O-(α -D-galakturonopyranozyl)-D-galakturónová (kyselina digalakturónová) sa eluuje 4 M kyselinou octovou. Aj v tomto prípade kyselina D-galakturónová sa eluuje za kyselinou aldobiurónovou.

Podľa doterajších našich skúseností je nepravdepodobné, že pri štruktúrál-
nom výskume polysacharidov sa v hydrolyzáte vyskytnú všetky tu uvedené látky. Kombináciou opísanej metódy a chromatografie na papieri možno však i toto oddelenie kompletne uskutočniť v preparatívnom meradle. Dvojice aldobiurónových kyselín, eluované kyselinou octovou o rovnakých koncentráciách [6-O-(4-O-metyl- β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza a 6-O-(β -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza eluované 0,2 M kyselinou octovou; 2-O-(β -D-glukuronopyranozyl)manóza a 4-O-(α -D-galakturonopyranozyl)-D-galaktóza eluované 0,4 M kyselinou octovou], možno ďalej oddeliť chromatografiou na papieri, keďže ich hodnoty R_F sú značne rozdielne.

Opísaná metóda je v podstate vytesňovacou elúciou a keďže hodnoty pK

Tabuľka 1
Hodnoty disociačných konštánt

Kyselina	pK	Elúcia CH ₃ COOH M
6-O-(4-O-metyl-β-D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza	3,36	0,2
6-O-(β-D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza	3,42	0,2
2-O-(β-D-glukuronopyranozyl)manóza	3,58	0,4
4-O-(α-D-galakturonopyranozyl)-D-galaktóza	3,58	0,4
D-galakturónová [12]	3,42	0,4
D-glukurónová [13]	3,33	0,4

sú veľmi blízke (tab. 1), separáciu zrejme určujú adsorpčné sily, dané konštitúciou molekuly a vzájomnou polohou funkčných skupín.

Pokiaľ nám je známe, hodnoty pK aldobiurónových kyselín sa doteraz nestanovili.

Nami navrhovanú metódu oddelovania aldobiurónových kyselín možno podľa našich skúseností aplikovať aj na ďalšie prípady, napríklad na oddelenie aldotriurónových a aldotetraurónových kyselín [8]. Metóda má výhody v tom, že sa uskutočňuje kontinuitne v jednom stupni na automatickom zberači frakcií. Pritom je možné oddeliť pomerne veľké množstvá uvedených sacharidov.

РАЗДЕЛЕНИЕ АЛЬДОБИУРОНОВЫХ КИСЛОТ НА АНИОНИТЕ

И. Росик, В. Зитко, И. Кубала

Химический институт Словацкой академии наук,
Братислава

Описано разделение альдобинуриновых и уриновых кислот с помощью сильно щелочного анионита Dowex 1X8 в ацетатной форме градиентом уксусной кислоты. При концентрации 0,2 м уксусной кислоты была элюирована 6-О-(4-О-метил-β-Д-глюкуронопиранозил)-Д-галактоза, 0,4 м уксусной кислотой 2-О-(β-Д-глюкуронопиранозил)-манноза и смесь кислот: 4-О-метил-Д-глюкуроновая и Д-глюкуроновая. При концентрации 0,2 м уксусной кислоты элюируется также 6-О(β-Д-глюкуронопиранозил)-Д-галактоза, пока что 4-О-метил (α-Д-галактуронопиранозил)-Д-галактоза элюируется 0,4 м уксусной кислотой а также Д-галактуроновая кислота. 4-О-(α-Д-галактуронопиранозил)-Д-галактуроновая кислота элюируется 4 м уксусной кислотой. Пары альдобинуриновых кислот, элюированные одинаковыми концентрациями уксусной кислоты можно дальше разделить хроматографией на бумаге. Этим способом можно в препаративном масштабе разделить большое количество веществ, чем методами описанными в литературе. Определены значения констант диссоциации приведенных альдобинуриновых кислот.

Preložil M. Fedoroňko

TRENNUNG DER ALDOBIURONSÄUREN AM ANIONENAUSTAUSCHER

J. Rosík, V. Zitko, J. Kubala

Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften,
Bratislava

In der vorliegenden Arbeit wird die Trennung der Aldobiuronsäuren und Uronsäuren beschrieben, u. zw. an dem stark basischen Anionenaustauscher Dowex 1X8 (in Acetat-form) und mittels der Essigsäure-Gradientelution. Mit 0,2 M-Essigsäure wurden 6-O-(4-O-Methyl- β -D-glucuronopyranosyl)-D-galactose, und mit 0,4 M-Essigsäure 2-O-(β -D-Glucuronopyranosyl)-mannose und ein Gemisch von 4-O-Methyl-D-glucuronsäure und D-Glucuronsäure eluiert. Bei der Essigsäurekonzentration von 0,2 M wird auch 6-O-(β -D-Glucuronopyranosyl)-D-galactose eluiert, während 4-O-(α -D-Galacturonopyranosyl)-D-galactose sowie auch D-Galacturonsäure mit 0,4 M-Essigsäure eluiert werden. 4-O-(α -D-Galacturonopyranosyl)-D-galacturonsäure wird mit 4 M-Essigsäure eluiert. Eine weitere Trennung der mit gleichkonzentrierten Essigsäurelösungen eluierten Aldobiuronsäurenpaare ist mit Hilfe der Papierchromatographie möglich. Dieses Arbeitsverfahren ermöglicht eine präparative Trennung von größeren, als in der Literatur bisher bekannten Stoffmengen. Die Werte der Dissoziationskonstanten angeführter Aldobiuronsäuren wurden ermittelt.

Preložil M. Liška

LITERATÚRA

1. Khym J. X., Doherty D. G., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 3199 (1952).
2. Hallén A., *Acta Chem. Scand.* **14**, 2249 (1960).
3. Derungs R., Deuel H., *Helv. Chim. Acta* **37**, 657 (1954).
4. Larsen B., Haug A., *Acta Chem. Scand.* **15**, 1397 (1961).
5. Dziewiatkowski D., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 167 (1962).
6. Samuelson O., Wallenius L. O., *J. Chromatography* **12**, 236 (1963).
7. Samuelson O., Wictorin L., *Svensk Papperstidn.* **67**, 555 (1964).
8. Zitko V., Rosík J., Bruteničová M., Kubala J., *Collection Czech. Chem. Commun.* **30**, 3501 (1965).
9. Zitko V., Rosík J., Kubala J., *Collection Czech. Chem. Commun.* **30**, 3902 (1965).
10. Montgomery R., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 591 (1961).
11. Partridge S. M., *Nature* **164**, 443 (1943).
12. Speiser R., Hills C. H., Eddy C. R., *J. Phys. Chem.* **49**, 328 (1945).
13. Pauli W., Kölbl W., Linsker A., *Kolloid-Z.* **79**, 273 (1937).

Do redakcie došlo 22. 2. 1965
V revidovanej podobe 4. 9. 1965

Adresa autorov:

Inž. Jozef Rosík, inž. Vladimír Zitko, CSc., J. Kubala, Chemický ústav SAV,
Bratislava, Dúbravská cesta.