

# Aldobiurónové kyseliny z polysacharidov gúm zo stromov rodu *Prunus* (I)

## Metylačná analýza

J. ROŠÍK, A. KARDOŠOVÁ, J. KUBALA

*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied,  
Bratislava*

Vykonala sa metylačná analýza troch aldobiurónových kyselín. Produkty hydrolýzy sa identifikovali plynovou chromatografiou na dvoch zakotvených fázach, a to Carbowax 6000 a neopentylglykolsebakát.

Aldourónové kyseliny sú hlavným štiepnym produktom parciálnej hydrolýzy polysacharidov rastlinných gúm. Niektoré z doteraz izolovaných aldobiurónových kyselín sú uvedené v monografiách [1, 2]. Jedným zo spôsobov stanovenia konštitúcie aldobiurónových kyselín je identifikácia produktov hydrolýzy týchto kyselín a produktov hydrolýzy ich permetylovaných derivátov. V našej práci sme sa zamerali na identifikáciu metylovaných aldobiurónových kyselín, ktoré sme izolovali z polysacharidov 6 rozličných gúm zo stromov rodu *Prunus* (uvedených v tab. 1):

Tabuľka 1

Návažky oligosacharidov na metyláciu a ich výťažky  
po metylácii v miligramoch

Oligosacharid získaný z polysacharidu gummy	Oligosacharidy					
	A		B		C	
	návažok	výťažok	návažok	výťažok	návažok	výťažok
1. čerešne ( <i>P. avium</i> L. var. <i>juliana</i> L.)	51,3	27,7	—	—	—	—
2. planej čerešne ( <i>P. avium</i> L. subsp. <i>avium</i> )	50,4	34,7	—	—	56,3	50,7
3. slivky ( <i>P. domestica</i> L. subsp. <i>domestica</i> )	51,6	26,7	51,7	49,5	61,0	54,5
4. broskyne ( <i>P. persica</i> (L.) BATSCH)	39,3	21,0	41,0	33,1	28,6	23,5
5. višne ( <i>P. cerasus</i> L.)	50,0	27,8	34,0	26,2	35,0	24,5
6. marhule ( <i>P. armeniaca</i> L.)	50,5	24,1	50,5	42,8	51,7	40,5

A: 6-O-( $\beta$ -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza;

B: 6-O-(4-O-metyl- $\beta$ -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza;

C: 2-O-( $\beta$ -D-glukuronopyranozyl)-D-manóza.

1. 6-*O*-( $\beta$ -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza (A);
2. 6-*O*-(4-*O*-metyl- $\beta$ -D-glukuronopyranozyl)-D-galaktóza (B);
3. 2-*O*-( $\beta$ -D-glukuronopyranozyl)-D-manóza (C).

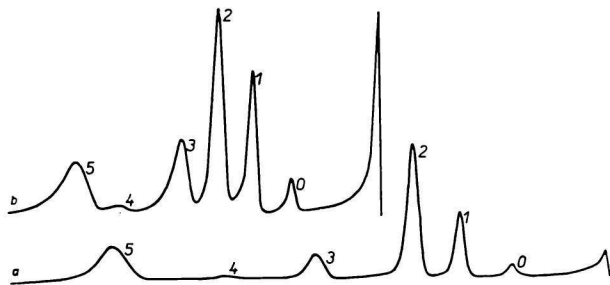
V prácach [7, 8] sme uviedli štrukturálne charakteristiky polysacharidov gúm broskyne a slivky a konštatovali sme, že obidva obsahujú pomerne značné množstvá D-manózy, avšak oligosacharid C sme nezistili. Väčšie množstvá aldobiuónových kyselín na účely metylačnej analýzy sme získali parciálnou hydrolyzou ďalších množstiev uvedených polysacharidov, pričom sa nám podarilo izolovať aj oligosacharid C.

D-Galaktóza a D-manóza sú v týchto aldobiuónových kyselinách viazané na kyselinu D-glukurónovú, resp. jej 4-*O*-metyléter  $\beta$ -glykozidickými väzbami, čo vyplýva z hodnôt ich optických otáčavostí.

Obr. 1. Plynový chromatogram štandardov.  
 $R_T$  1,16 — metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl-D-galaktózid (1);  $R_T$  3,45 a  $R_T$  4,47 — metyl-2,3,5-tri-*O*-metyl-D-galaktózid (2, 3); zakotvená fáza Carbowax 6000 (3 % na Celite).



Metylačná analýza oligosacharidu A a oligosacharidu B vedie k zaujímavým výsledkom. Produktmi hydrolyzy týchto úplne metylovaných oligosacharidov, identifikovanými chromatografiou na papieri, sú kyselina 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónová a 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-galaktóza. Predpokladali sme, že plynová chromatografia potvrdí tieto výsledky. Na zázname plynového chromatografu

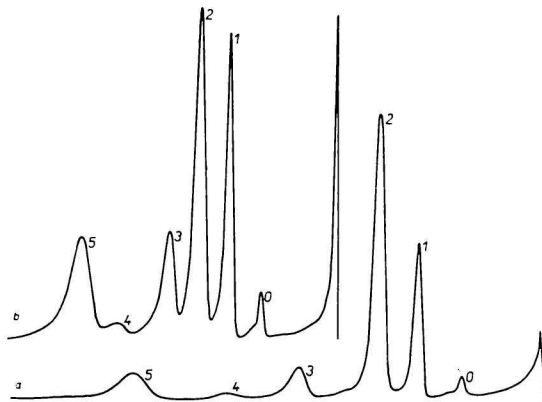


Obr. 2. Plynový chromatogram produktov metanolýzy metylovaného oligosacharidu A, izolovaného z polysacharidu gummy višne.

- a) Zakotvená fáza Carbowax 6000 (3 % na Celite):  $R_T$  1,16 — pravdepodobne metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl-D-galaktózid (0);  $R_T$  1,79 a  $R_T$  2,32 — metylester-metyl-glykozid kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej (1, 2);  $R_T$  3,45 a  $R_T$  4,47 — metyl-2,3,5-tri-*O*-metyl-D-galaktózid (3, 4);  $R_T$  5,84 — metyl-2,3,4-tri-*O*-metyl-D-galaktózid (5).
- b) Zakotvená fáza neopentylglykolesebakát (10 % na Celite):  $R_T$  1,05 — pravdepodobne metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl-D-galaktózid (0);  $R_T$  1,53 a  $R_T$  1,89 — metylester-metyl-glykozid kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej (1, 2);  $R_T$  2,32 a  $R_T$  3,08 — metyl-2,3,5-tri-*O*-metyl-D-galaktózid (3, 4);  $R_T$  3,55 — metyl-2,3,4-tri-*O*-metyl-D-galaktózid (5).

sa však objavili ďalšie píky. Retenčný čas dvoch píkov ( $R_T$  3,45 a  $R_T$  4,47) bol totožný s retenčným časom použitého štandardu metyl-2,3,5-tri-*O*-metyl-D-galaktozidu. Retenčný čas tretieho píku ( $R_T$  1,16) sa zhoduje s retenčným časom metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl-D-galaktozidu. Plynový chromatogram je na obr. 1. Súhlasné výsledky sa zistili pri použití dvoch rozličných zakotvených fáz, a to Carbowax 6000 a neopentylglykolebakát.

Na obr. 2 a 3 sú plynové chromatogramy produktov hydrolýzy úplne metylovaných oligosacharidov *A* a *B*.



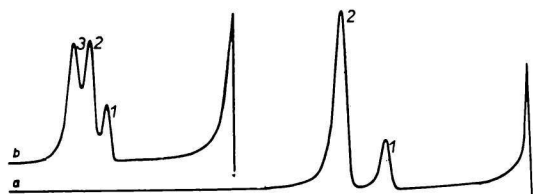
Obr. 3. Plynový chromatogram produktov metanolýzy metylovaného oligosacharidu *B*, izolovaného z polysacharidu gummy broskyne.

- a) Zakotvená fáza Carbowax 6000 (3 % na Celite):  $R_T$  1,16 — pravdepodobne metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl-D-galaktozid (0);  $R_T$  1,79 a  $R_T$  2,32 — metylester-metylglykozid kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej (1, 2);  $R_T$  3,45 a  $R_T$  4,47 — metyl-2,3,5-tri-*O*-metyl-D-galaktozid (3, 4);  $R_T$  5,84 — metyl-2,3,4-tri-*O*-metyl-D-galaktozid (5).
- b) Zakotvená fáza neopentylglykolebakát (10 % na Celite):  $R_T$  1,06 — pravdepodobne metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl-D-galaktozid (0);  $R_T$  1,53 a  $R_T$  1,89 — metylester-metylglykozid kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej (1, 2);  $R_T$  2,31 a  $R_T$  3,07 — metyl-2,3,5-tri-*O*-metyl-D-galaktozid (3, 4);  $R_T$  3,54 — metyl-2,3,4-tri-*O*-metyl-D-galaktozid (5).

Prítomnosť metyl-2,3,5-tri-*O*-metyl-D-galaktozidu nevieme dostatočne vysvetliť.

K podobným výsledkom dospeli aj G. O. Aspinall a R. M. Fairweather, ktorí obidva uvedené oligosacharidy získali z polysacharidu gummy *Araucaria bidwilli* [9]. Pri použití bután-1,4-diolsukcinátu ako zakotvenej fázy a pri teplote 175 °C identifikovali okrem metylester-metylglykozidu kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej a metyl-2,3,4-tri-*O*-metyl-D-galaktozidu aj metyl-2,3,5-tri-*O*-metyl-D-galaktozid, zatiaľ čo pri použití polyfenyléteru [*m*-bis(*m*-fenoxyfenoxy)benzénu] a pri teplote 200 °C sa tá istá látka neprejavila na plynovom chromatograme.

Metylovaný oligosacharid *C* poskytol po metanolýze metylester-metylglykozid kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej a metyl-3,4,6-tri-*O*-metyl-D-manozid. Pri použití Carbowaxu 6000 ako zakotvanej fázy sa pík metyl-3,4,6-tri-*O*-metyl-D-manozidu prekrýva s druhým píkom metylester-metylglykozidu kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej, kým pri použití neopentylglykolsebakátu ako zakotvanej fázy možno obidve látky rozlíšiť. Na obr. 4 sú plynové chromatogramy produktov metanolýzy úplne metylovaného oligosacharidu *C*.



Obr. 4. Plynový chromatogram produktov metanolýzy metylovaného oligosacharidu *C*, izolovaného z polysacharidu gummy slivky.

a) Zakotvená fáza Carbowax 6000 (3 % na Celite):  $R_T$  1,79 — metylester-metylglykozid kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej (1);  $R_T$  2,32 — metylester-metylglykozid kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej a metyl-3,4,6-tri-*O*-metyl-D-manozid (2; píky sa prekrývajú).

b) Zakotvená fáza neopentylglykolsebakát (10 % na Celite):  $R_T$  1,53 a  $R_T$  1,89 — metylester-metylglykozid kyseliny 2,3,4-tri-*O*-metyl-D-glukurónovej (1, 3);  $R_T$  1,68 — metyl-3,4,6-tri-*O*-metyl-D-manozid (2).

### Experimentálna časť

Spôsob izolácie kyslých oligosacharidov opisujeme v prácach [3—8].

Chromatografiu na papieri sme robili v sústavách:

S<sub>1</sub>: etylacetát—pyridín—voda 8 : 2 : 1,

S<sub>2</sub>: etylacetát—kyselina octová—voda 18 : 7 : 8,

S<sub>3</sub>: *n*-butanol—etanol—voda 4 : 1 : 5,

S<sub>4</sub>: metyletylketón nasýtený vodou.

Oddeľovanie sme uskutočnili na papieri Whatman 1. Na detekciu sme používali anilíniumhydroftalát [10].

Plynová chromatografia metylderivátov metylglykozidov monosacharidov sa robila na prístroji Pye-Argon. Ako zakotvená fáza sa použil Carbowax 6000 (3 % na Celite) pri 164 °C a neopentylglykolsebakát (10 % na Celite) pri 166 °C. Rozpúšťadlom analyzovanej zmesi bol chloroform.

### *Metylácia aldobiurónových kyselín*

Všetky vzorky aldobiurónových kyselín sa osobitne metylovali obvyklou metódou dimetylsulfátom a hydroxidom sodným [11]. Parciálne metylované produkty sa ďalej metylovali metyljodidom a kyslíčnikom strieborným [12]. Výsledné produkty nevykazovali absorpciu OH v infračervenom spektre. Množstvá oligosacharidov použitých na metyláciu a ich výťažky po metylácii uvádzame v tab. 1. Časť vzoriek sa metanolizovala

12 hodín 5 % metanolicou kyselinou soľnou a zmes metylderivátov metylglykozidov po neutralizácii uhlíčanom strieborným sa analyzovala plynovou chromatografiou. Časť vzoriek sa hydrolyzovala 72 % kyselinou sírovou [13] a v hydrolyzáte po neutralizácii uhlíčanom bárnatým sa chromatografiou na papieri za použitia štandardov identifikovali metylderiváty sacharidov. Metylované oligosacharidy mali tieto hodnoty optických otáčavostí:

6-*O*-(2,3,4-tri-*O*-metyl- $\beta$ -D-glukuronopyranozyl)-2,3,4-tri-*O*-metyl-D-galaktóza:  $[\alpha]_D = -17^\circ$  (*c* 1 v chloroforme);

2-*O*-(2,3,4-tri-*O*-metyl- $\beta$ -D-glukuronopyranozyl)-3,4,6-tri-*O*-metyl-D-manóza:  $[\alpha]_D = -25^\circ$  (*c* 1 v chloroforme);

6-*O*-(2,3,4-tri-*O*-metyl- $\beta$ -D-glukuronopyranozyl)-2,3,4-tri-*O*-metyl-D-galaktóza:  $[\alpha]_D = -20^\circ$  (*c* 1 v chloroforme) — pôvodná kyselina 4-*O*-metyl-D-glukurónová.

### АЛЬДОБИУРОНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ КАМЕДИ ПОЛИСАХАРИДОВ ДЕРЕВЬЕВ РОДА *Prunus* (I) МЕТИЛАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Й. Росик, А. Кардошова, Й. Кубала

Химический институт Словацкой академии наук,  
Братислава

Был проведен метилационный анализ трех альдобииуроновых кислот. Полученные вещества этих метилированных олигосахаридов были идентифицированные с помощью хроматографии на бумаге и газовой хроматографии на двух неподвижных фазах именно Carbowax 6000 и неопентилгликол себацата. Путем гидролиза перметилированных 6-*O*-( $\beta$ -D-глюкуронопиранозил)-D-галактозы и 6-*O*-(4-*O*-метил- $\beta$ -D-глюкуронопиранозил)-D-галактозы были получены метилэфир: метилглюкозид 2,3,4-три-*O*-метил-D-глюкуроновой кислоты, метил-2,3,5-три-*O*-метил-D-галактозид, метил-2,3,4-три-*O*-метил-D-галактозид и также вероятно метил-2,3,4,6-тетра-*O*-метил-D-галактозид. При гидролизе полнометилированной 2-*O*-( $\beta$ -D-глюкуронопиранозил)-D-маннозы были получены: метилэфир метилглюкозид 2,3,4-три-*O*-метил-D-глюкуроновая кислота и метил-3,4,6-три-*O*-метил-D-манозид. Метил-3,4,6-три-*O*-метил-D-манозид совпадает с вторым пиком метилэфира метилглюкозида 2,3,4-три-*O*-метил-D-глюкуроновой кислоты на Carbowax 6000 а на неопентилгликол себацата эти два замещенные различаются.

Preložil M. Fedoroňko

### ALDOBIURONIC ACIDS OF THE POLYSACCHARIDES OF GUMS FROM THE TREES OF GENUS *PRUNUS* (I) METHYLATION ANALYSIS

J. Rosík, A. Kardošová, J. Kubala

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences,  
Bratislava

Methylation analysis of three aldobiuronic acids was carried out. The products obtained on hydrolysis of the methylated oligosaccharides were identified by paper and gas chromatography, respectively. Carbowax 6000 and neopentylglykol sebacate polyester were used as the stationary phases. The hydrolysis of the fully methylated 6-*O*-( $\beta$ -D-glucurono-

pyranosyl)-D-galactose and 6-O-(4-O-methyl- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl)-D-galactose afforded: methylester of methyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucuronic acid, methyl-2,3,5-tri-O-methyl-D-galactoside, methyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-galactoside and probably methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactoside. The hydrolysis of the fully methylated 2-O-( $\beta$ -D-glucuronopyranosyl)-D-mannose gave: methylester of methyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucuronic acid and methyl-3,4,6-tri-O-methyl-D-mannoside. Methyl-3,4,6-tri-O-methyl-D-mannoside was overlapped by the second peak of methylester of methyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucuronic acid on Carbowax 6000, however, on neopentylglykol sebacate polyester these derivatives were distinguishable.

Preložila A. Kardošová

#### LITERATÚRA

1. Staněk J., Černý M., Pacák J., *Oligosacharidy*, 307. Nakladatelství ČSAV, Praha 1962.
2. Bailey R. W., *Oligosaccharides*, 130. Pergamon Press, London 1965.
3. Zitko V., Rosík J., Bruteničová M., Kubala J., *Collection Czech. Chem. Commun.* **30**, 3501 (1965).
4. Rosík J., Zitko V., Bauer Š., Kubala J., *Collection Czech. Chem. Commun.* **31**, 1072 (1966).
5. Rosík J., Zitko V., Kubala J., *Collection Czech. Chem. Commun.* **31**, 1569 (1966).
6. Rosík J., Zitko V., Bauer Š., Kubala J., *Collection Czech. Chem. Commun.* **31**, 3353 (1966).
7. Rosík J., Bruteničová-Sósková M., Zitko V., Kubala J., *Chem. zvesti* **20**, 577 (1966).
8. Rosík J., Kardošová A., Zitko V., Kubala J., *Chem. zvesti* **21**, 13 (1967).
9. Aspinall G. O., Fairweather R. M., *Carbohydrate Res.* **1**, 83 (1965).
10. Partridge S. M., *Nature* **164**, 443 (1949).
11. Haworth W. N., *J. Chem. Soc.* **107**, 8 (1915).
12. Purdie T., Irving J. C., *J. Chem. Soc.* **83**, 1021 (1903).
13. Croon J., Herrstrom G., Kull G., Lindberg B., *Acta Chem. Scand.* **14**, 1338 (1960).

Do redakcie došlo 9. 2. 1967

Adresa autorov:

Ing. Jozef Rosík, CSc., Ing. Alžbeta Kardošová, Jozef Kubala, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava, Dúbravská cesta 5.