

Spektrofotometrické stanovenie acetylskupín v *O*-acetylderivátoch sacharidov

V. BÍLIK, Š. KUČÁR

*Oddelenie chémie monosacharidov a oligosacharidov
Chemického ústavu Slovenskej akadémie vied,
Bratislava*

Metóda stanovenia acetylskupín je založená na reakcii hydroxylamínu s *O*-acetylderivátmi sacharidov, pričom množstvo vzniknutej kyseliny acethydroxámovej sa vo forme farebného železitého komplexu stanovuje spektrofotometricky. Metóda je jednoduchá, presná a na stanovenie je potrebné množstvo sacharidu s obsahom 1—3 mg acetylskupiny.

Na stanovenie acetylskupín v *O,N*-acetylderivátoch sacharidov sa najčastejšie používa Kuhnova—Rothova metóda [1], pri ktorej kyslou hydrolyzou vzniknutá kyselina octová sa z reakčného prostredia oddestiluje vodnou parou a v destiláte sa stanoví acidimetrickou titráciou. H. H. Stroh a spolupracovníci [2, 3] stanovujú *O*-acetylskupiny po hydrolyze, ktorú uskutočňujú kyselinou, resp. alkoholickým lúhom známej normality a potom zvýšené množstvo kyseliny, resp. znížené množstvo lúhu stanovujú titráciou. Vo veľmi zriedených hydrolyzačných roztokoch sa preferovane hydrolyzuje väzba *O*-acetyl [2, 3], na hydrolyzu väzby *N*-acetyl sa vyžadujú zvýšené koncentrácie kyseliny, ako aj dlhší čas [1].

Na kvalitatívne určenie [4], stanovenie [5—14] a identifikáciu chromatografiou na papieri [15—17] esterov karboxylových kyselín, laktónov, acylhalogenidov a acylanhydridov sa využíva jednoduché prevedenie uvedených typov zlúčenín na hydroxámové kyseliny, ktoré so železitými soľami poskytujú farebný komplex. Absorbancia železitého komplexu hydroxámových kyselín sa sledovala v závislosti od pH roztoku [6, 10, 14] a od vplyvu substituentov monokarboxylových a dikarboxylových kyselín [11, 12]. E. Bayer a K. H. Reuther [8] rozlišujú tri typy železito-benzohydroxámových komplexov, ktoré sa navzájom líšia sfarbením a konštitúciou, pričom poukazujú na možnosť použitia hydroxámovej metódy aj na stanovenie acetylderivátov sacharidov. S. Hestrin [6] však zistil, že pentaacetylglukóza v porovnaní s acetylchloridom poskytuje pre acetylskupinu o 10 % väčšiu absorbanciu. E. A. McComb a R. M. McCready [9] stanovovali acetylskupiny v polysacharidoch a ako štandardnú látku na zostrojenie kalibračnej krivky použili penta-*O*-acetyl- β -D-glukózu.

V predloženej práci sme sa zapodievali stanovením acetylskupín v *O*-acetylderivátoch monosacharidov a disacharidov hydroxámovou metódou.

Experimentálna časť

Spektrofotometrické merania sme robili na spektrofotometri Hil'ger H 700307 pri 500 nm. Absorpčnú krivku v rozmedzí 390—650 nm sme zmerali na spektrofotometri model ORD/UV-5 fy Jasco.

Použité roztoky

Alkalický roztok hydroxylamínu sa pripraví denne čerstvým zmiešaním 7,0 % vodného roztoku $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ a 2,5 N- NaOH v pomere 1 : 1 (v/v).

1 M vodný roztok kyseliny trichlóroctovej.

Kyslý roztok FeCl_3 — 20,0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sa rozpustí vo vode a po pridaní 2,5 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej sa doplní na objem 500 ml.

Metóda stanovenia sa overovala na acetylderivátoch sacharidov (tab. 1), pripravených podľa literatúry a charakterizovaných bodom topenia a špecifickou otáčavosťou.

Tabuľka 1

Stanovenie acetyl skupín v *O*-acetylderivátoch sacharidov

	Zlúčenina	% CH_3CO		Chyba %
		vypočítané	zistené	
<i>I</i>	penta- <i>O</i> -acetyl-L-arabit [18] (str. 212)	59,40	59,77	0,62
<i>II</i>	hexa- <i>O</i> -acetyl-D-manit [18] (str. 212)	59,45	59,71	0,43
<i>III</i>	hexa- <i>O</i> -acetyl-dulcitol [18] (str. 212)	59,45	59,71	0,43
<i>IV</i>	tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-xylopyranóza [18] (str. 212)	54,10	54,51	0,76
<i>V</i>	penta- <i>O</i> -acetyl- β -D-glukopyranóza [18] (str. 212)	55,14	55,59	0,81
<i>VI</i>	penta- <i>O</i> -acetyl- α -D-galaktopyranóza [18] (str. 213)	55,14	54,28	1,56
<i>VII</i>	1,6-anhydro-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-glukopyranóza [18] (str. 396)	44,95	45,43	1,06
<i>VIII</i>	metyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glukopyranozid [18] (str. 212)	47,53	47,15	0,80
<i>IX</i>	metyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-galaktopyranozid [18] (str. 212)	47,53	48,13	1,26
<i>X</i>	fenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glukopyranozid [18] (str. 398)	40,57	40,56	0,03
<i>XI</i>	fenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galaktopyranozid [18] (str. 398)	40,57	40,99	1,03
<i>XII</i>	metyl-tri- <i>O</i> -acetyl-6-trityl- α -D-glukopyranozid [19]	22,95	22,97	0,08
<i>XIII</i>	tetra- <i>O</i> -acetyl-6-tozyl- β -D-glukopyranóza [20]	34,26	34,63	1,06
<i>XIV</i>	okta- <i>O</i> -acetyl-sacharóza [18] (str. 212)	50,75	51,16	0,80
<i>XV</i>	okta- <i>O</i> -acetyl-trehalóza [18] (str. 212)	50,75	50,84	0,17
<i>XVI</i>	okta- <i>O</i> -acetyl- β -maltóza [18] (str. 212)	50,75	51,29	1,06
<i>XVII</i>	okta- <i>O</i> -acetyl- β -laktóza [18] (str. 212)	50,75	50,23	0,98
<i>XVIII</i>	N-acetyl-D-glukozamín [21]	19,46	0	

Metóda stanovenia

Do 50 ml odmernej banky sa pridá zvážené množstvo acetylovaného sacharidu alebo jeho metanolický roztok (s obsahom 1–3 mg CH_3CO) a metanol, aby úhrnný objem bol 10 ml. Ďalej sa pridajú 4 ml alkalického roztoku hydroxylamínu (zmes sa dobre premieša) a po 10 minútach sa pridá 10 ml 1 M roztoku kyseliny trichlóroctovej, 10 ml kyslého roztoku FeCl_3 , zmes sa doplní vodou na objem 45–48 ml a nechá sa stáť 30 minút. Potom sa roztok doplní vodou na objem 50 ml a v priebehu 30 minút sa meria na spektrofotometri pri 500 nm v 1 cm kvetách oproti roztoku zo slepého pokusu.

Kalibračná krivka

Do 100 ml odmernej banky sa naváži 101,0 mg metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glukozidu, ktorý sa rozpustí v metanole a doplní sa metanolom na objem 100 ml. Z roztoku (1 ml = 0,48 mg CH₃CO) sa do 50 ml odmerných baniek odpipetuje 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 ml a v každom prípade sa celkový objem upraví pridaním metanolu na 10 ml; v ďalšom sa postupuje, ako sa uvádza v metóde stanovenia. Z nameraných hodnôt (tab. 2) absorbcancie (*A*) vyplýva pre stanovenie mg CH₃CO (*C*) vzťah

$$C = 2,555 A + 0,024.$$

Rozptyl bodov okolo regresnej priamky (S_{xy}) má hodnotu $6,62 \cdot 10^{-3}$.

Tabuľka 3

Časová závislosť prevedenia esteru
na kyselinu hydroxámovú

Čas min.	Absorbancia
1	0,604
2	0,698
3	0,732
4	0,766
5	0,772
7	0,775
10	0,773

Tabuľka 2

Hodnoty kalibračnej krivky

mg CH ₃ CO	Absorbancia
0,24	0,079
0,48	0,177
0,96	0,373
1,44	0,550
1,92	0,755
2,40	0,930
2,88	1,116
3,36	1,302

Výsledky a diskusia

Pri stanovení acetyl skupín v *O*-acetylderivátoch sacharidov reakciou hydroxylamínu v alkalickom prostredí vzniká kyselina acethydroxámová a východiskový sacharid. Použité alkalické prostredie v priebehu 10 minút pri teplote miestnosti neovplyvňuje výsledok stanovenia. Pri sledovaní vzniku kyseliny acethydroxámovej v závislosti od času v prípade metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glukozidu sa zistilo, že reakcia je ukončená za 5 až 7 minút (tab. 3). Na vytvorenie kyslého prostredia sa ukázal vhodným prídavok 10 ml 1 M kyseliny trichlóroctovej a po pridaní 10 ml roztoku chloridu železitého sa dosahuje hodnota pH roztoku $1,15 \pm 0,05$. Väčšie množstvá kyseliny trichlóroctovej významnejšie neovplyvňujú hodnotu absorbcancie ferihydroxámového komplexu, zatiaľ čo menšie množstvá tejto kyseliny zvyšujú hodnotu pH a tým znižujú absorbcanciu. V niektorých prácach sa odporúča hodnota pH roztoku $1,2 \pm 0,2$ [6], $1,7 \pm 0,2$ [10] a $1,8-2,0$ [14]. V rozmedzí 390–650 nm vykazuje absorpčná krivka maximum pri 495–505 nm.

Pravdepodobná chyba stanovenia 3,0 mg acetyl skupín je $\pm 0,61\%$ a maximálna náhodná chyba je $\pm 2,07\%$. Pri určení menších množstiev acetyl skupín sa chyby zväčšujú a výsledky namerané na Pulfrichovom fotokolorimetri (filter S 50) dosahujú až trojnásobné hodnoty chýb. Pri analyzovaných *O*-acetylderivátoch sacharidov

(tab. 1) stanovený obsah acetylskupín je priemerom dvoch stanovení a absolútne chyby stanovenia (pri návažkách 2—3 mg acetylskupiny) nepresahujú hodnoty pravdepodobnej chyby ($\pm 1,21-0,61\%$) s výnimkou penta-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranózy a metyl-tetra-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranozidu.

Vypracovaná metóda stanovenia acetylskupín v *O*-acetylderivátoch sacharidov je dostatočne citlivá, jednoduchá a výsledky sú dobre reprodukovateľné. *N*-Acetylskupiny (tab. 1, zlúčenina *XVIII*) sa týmto spôsobom nestanovia.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЦЕТИЛЬНЫХ ГРУПП В *O*-АЦЕТИЛПРОИЗВОДНЫХ САХАРИДОВ

В. Билик, Ш. Кучар

Отдел химии моносахаридов и олигосахаридов Химического института
Словацкой академии наук,
Братислава

Метод определения ацетильных групп основан на реакции гидроксилamina с *O*-ацетилпроизводными сахаридов, причем количество получившейся ацетгидроксамовой кислоты определяется спектрофотометрически в виде окрашенного комплекса трехвалентного железа. Метод является простым, достаточно чувствительным и для определения требуется количество сахара, содержащего 1—3 мг ацетилгруппы. При определении 3 мг ацетильной группы вероятная ошибка определения 0,6 %, или же максимальная случайная ошибка 2,1 %.

Перевела Т. Диллингерова

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ACETYL GROUPS IN *O*-ACETYL DERIVATIVES OF SACCHARIDES

V. Bílik, Š. Kučár

Department of Chemistry of Monosaccharides and Oligosaccharides,
Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences,
Bratislava

The method of determination of acetyl groups is based upon the reaction of hydroxylamine with *O*-acetyl derivatives of saccharides and the spectrophotometric estimation of the coloured iron(III) complex of acetylhydroxamic acid thus formed. This method is quite simple, sufficiently sensitive and the amount of saccharide needed for this determination corresponds to 1—3 mg of acetyl group. When determining 3 mg of the acetyl group, the probable error is 0.6 %, eventually the maximum random error 2.1 %.

Translated by Z. Votický

LITERATÚRA

1. Kuhn R., Roth H., *Ber.* **66**, 1274 (1933).
2. Stroh H. H., Arnold A., Scharnov H. G., *Chem. Ber.* **98**, 1404 (1965).

3. Stroh H. H., Liehr H., *J. prakt. Chem.* **29**, 8 (1965).
4. Buckles R. E., Thelen C. J., *Anal. Chem.* **22**, 676 (1950).
5. Hill U. T., *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **18**, 317 (1946).
6. Hestrin S., *J. Biol. Chem.* **180**, 249 (1949).
7. Goddu R. F., Le Blanck N. F., Wright C. M., *Anal. Chem.* **27**, 1251 (1955).
8. Bayer E., Reuther K. H., *Chem. Ber.* **89**, 2541 (1956).
9. McComb E. A., McCreedy R. M., *Anal. Chem.* **29**, 819 (1957).
10. Pilz W., *Z. anal. Chem.* **162**, 81 (1958).
11. Goldenberg V., Spoerri P. E., *Anal. Chem.* **30**, 1327 (1958).
12. Goldenberg V., Spoerri P. E., *Anal. Chem.* **31**, 1735 (1959).
13. Montgomery H. A. C., Dymock J. F., Thom N. S., *Analyst* **87**, 949 (1962).
14. Sedláček M., *Vodní hospodářství* **14**, 415 (1964).
15. Thompson A. R., *Austral. J. Sci.* **4B**, 180 (1951).
16. Perilä O., *Acta Chem. Scand.* **10**, 143 (1956).
17. Bayer E., Reuther K. H., *Angew. Chem.* **68**, 698 (1956).
18. Whistler R. L., Wolfrom M. L., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. II. Academic Press, New York—London 1963.
19. Helferich B., Klein W., Schäfer W., *Ber.* **59**, 79 (1926).
20. Staněk J., Tajmr L., *Chem. listy* **52**, 551 (1958).
21. Inouye Y., Onodera K., Kitaoka S., Hirano S., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4722 (1956).

Do redakcie došlo 26. 10. 1967

Adresa autorov:

RNDr. Vojtech Bilík, CSc., prom. chem. Štefan Kučár, Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta 5.