

Untersuchungen der sauren funktionellen Gruppen verschiedener 4-O-Methylglukuronoxylanpräparate

A. EBRINGEROVÁ und A. KRAMÁR

*Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften,
809 33 Bratislava*

Eingegangen am 12. Februar 1974

Zur Publikation angenommen am 24. Mai 1974

Das aus dem alkalischen Extrakt der Hagebuchenholocellulose isolierte 4-O-Methylglukuronoxylan wurde verschiedenen Behandlungen unterworfen. Es wurden unterschiedliche Entsalzungsmethoden, Umfällung mit Cetyltrimethylammoniumbromid, thermische Degradation in Stickstoffatmosphäre und Oxidation mit Natriumchlorit bei pH 3,5 angewendet. An den behandelten Xylanproben wurden Änderungen im Gehalt einestells der Carboxylgruppen und deren verschiedenen Formen (COOH, COO⁻, Laktone, Ester), anderteils anderer funktionellen Gruppen, welche unter bestimmten Bedingungen sauren Charakter aufweisen, untersucht. Zu diesem Zweck wurde die jodometrische Carboxylgruppenbestimmungsmethode samt deren kinetischen Auswertung in Kombination mit Reduktion mittels Natriumborhydrid benützt.

4-O-Methylglukuronoxylan isolated from the wood holocellulose of hornbeam (*Carpinus betulus* L.) by alkali extract was modified in different manners. It was desalted in different ways, precipitated with cetyltrimethylammonium bromide, thermally degraded in a nitrogen atmosphere, and oxidized with sodium chlorite at pH 3.5. Thus obtained samples were investigated regarding the changes in the content of carboxyl groups and their various forms (COOH, COO⁻, lactones, and esters) as well as other functional groups, which, under certain conditions, show acidic nature. The analytical procedure used for this purpose comprised kinetic evaluation of the determination of carboxyl groups by iodometry combined with the reduction of the functional groups with sodium borohydride.

Die sauren Xylane sind aus D-Xylose- und 4-O-Methyl-D-glukuronsäureresten aufgebaut, welche mit verschiedenen Mengen von D-Glukuronsäure und gegebenenfalls auch D-Galakturonsäure begleitet werden. Je nach den Vorbereitungsbedingungen der Xylanproben können auch Aldonsäurereste, die durch Oxidation der endständigen Aldehydgruppen entstehen (z. B. bei Einwirkung von Natriumchlorit in saurem Medium [1]) und Metasaccharinsäurereste als Folge alkalischer Behandlung [2], anwesend sein. Die Carboxylgruppen dieser Zucker können in verschiedener Form existieren (als freie Säure, ionisiert, als Laktone oder Ester). Die Uronsäuren bilden δ -Laktone (C₂-O-C₆) und γ -Laktone (C₃-O-C₆). Die D-Xylonsäure, da sie mittels der Hydroxylgruppe des C₄-Kohlenstoffatoms glykosidisch an die Xylose der Makromolekülkette gebunden ist,

kann nur das δ -Lakton bilden, ähnlich wie die Metasaccharinsäurereste. Durch Wärmebehandlung in Stickstoffatmosphäre ändert sich der Carboxylgruppengehalt und es entstehen u. a. Ketogruppen [3], die in ihrer tautomeren Enol- oder Endiolform sauren Charakter aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht mittels der jodometrischen Methode die sauren funktionellen Gruppen und die verschiedenen Formen der Carboxylgruppen in den Xylanpräparaten in Abhängigkeit von deren Vorbereitungsweisen zu bestimmen und zu unterscheiden.

Experimenteller Teil

Zu den Versuchen verwendeten wir eine 4-O-Methylglukuronoxylanfraktion, die aus dem Extrakt der zweiten Extraktionsstufe [4] aus der Klauwitzschen Hagebuchenholocellulose isoliert worden war, und zwar mit Hilfe von angesäuertem Äthanol. Dieses durch Fällung erhaltene Polysaccharid wurde weiter auf verschiedene Weise nachbehandelt, woraus sich acht Xylanpräparate ergaben.

Probe 1. Das Ausgangspräparat wurde nach der Fällung mit 75–96%igem Äthanol, danach mit Aceton gewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Probe 2. Das Ausgangspräparat wurde mittels Elektrodialyse entsalzt, danach mit Aceton im Vakuum abgedampft und über P_2O_5 getrocknet.

Probe 3. Das Ausgangspräparat wurde mit Cetyltrimethylammoniumbromid [5] umgefällt und nach der Elektrodialyse lyophilisiert.

Probe 4. Die Probe 3 wurde thermisch bei 150°C in trockener Stickstoffatmosphäre 24 Stunden lang behandelt.

Probe 5. Die Probe 4 wurde delaktonisiert.

Probe 6. Die Probe 3 wurde thermisch bei 190°C in trockener Stickstoffatmosphäre 24 Stunden lang behandelt.

Probe 7. Die Probe 6 wurde delaktonisiert.

Probe 8. Die Probe 3 wurde mit 0,2 M-NaClO₂ in 1 M-CH₃COOH [6] 40 Stunden lang bei 18°C im Dunkel bei dem Hydromodul 1 : 50 oxidiert.

Tabelle 1

Gehalt der sauren funktionellen Gruppen der 4-O-Methylglukuronoxylanpräparate (in %)

Probe	OCH ₃	COOH (aus % OCH ₃)	COOH (jodometrisch)		
			a	b	c
1 ^d	2,23	3,24	1,66	3,26	—
2	2,21	3,20	3,22	—	3,24
3	1,83	2,65	2,58	2,66	2,63
4	1,91	2,77	1,70	3,15	3,05
5	1,94	2,81	—	3,15	3,05
6	2,05	2,98	1,49	3,73	3,10
7	2,06	2,99	—	3,73	3,10
8	1,83	2,65	1,65	3,25	3,24

a) nichtbehandelt,

b) nach Delaktonisierung,

c) nach Reduktion der delaktonisierten Probe,

d) Aschegehalt 1,08%.

An den Proben wurde der Methoxylgehalt [7], der Carboxylgehalt jodometrisch [8] vor und nach der Reduktion der delaktionierten Proben bestimmt (Tabelle 1).

Delaktonisierung der Laktone wurde mit 0,01 N-NaOH bei 20°C nach 30 Minuten beim Hydromodul 1 : 50 in Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Nach Zugabe von Äthanol wurde die Probe mit 75%igem Äthanol, mit HCl-angesäuertem Äthanol, mit 75–96%igem Äthanol, Aceton gewaschen und über P₂O₅ getrocknet.

Reduktion der delaktionierten Probe wurde mit 0,1 M-NaBH₄ bei pH 9,5 in 50%igem Methanol bei 20°C 24 Stunden lang durchgeführt. Nach Ansäuern mit Essigsäure wurde die Probe im Vakuum mit Methanol mehrmals abgedampft und danach mit HCl-angesäuertem Äthanol, 75–96%igem Äthanol und Aceton gewaschen und über P₂O₅ getrocknet.

Carboxylgruppenbestimmung. Zur Bestimmung benützten wir 60–100 mg der Proben und 10 ml 0,25 N-Jodlösung (5KI + KIO₃). Das durch saure funktionelle Gruppen freigemachte Jod wurde mit 0,01 N-Na₂S₂O₃ titriert, wobei parallel ein Blankversuch mitlief. Vor und nach jeder Titration wurde durch die Lösung Stickstoff 1 Minute lang durchgeblasen. Der Zeitverlauf der Jodentwicklung wurde mittels einer kinetischen Methode, die auf Grund der kinetischen Gleichungen nach *Sihvola* u. Mitarbeiter [9] von *Slávik* u. Mitarbeiter [8] ausgearbeitet worden war, ausgewertet.

Ergebnisse und Diskussion

Bei der Bestimmung der sauren funktionellen Gruppen des 4-O-Methylglukuronoxylans ergeben sich viele Probleme, die besonders bei Präparaten, die außer der 4-O-Methyl-D-glukuronsäure noch andere saure Zucker, resp. saure funktionelle Gruppen enthalten. Von diesem Gesichtspunkt aus sind die bisher bekannten Methoden der Carboxylgruppenbestimmung nur begrenzt anwendbar, ganz gleich ob es sich um Dekarboxylierungsmethoden [10–12] oder um Methoden die aus Hydrolyse mit nachfolgender Trennung und Bestimmung der sauren Zucker bestehen [13–18], handelt.

Die direkte Bestimmung der Carboxylgruppen ist außer der alkalimetrischen Titration [19, 20] auch mittels jodometrischer Methode möglich, wobei sich diese bei der Carboxylgruppenbestimmung in Zellstoffen [20–22], sowie auch bei den Äquivalenzgewichtbestimmungen der sauren Xylane [23] bewährt hat. Die Arbeiten von *Slávik* u. Mitarbeiter [8, 21, 24] ergaben, daß es außerdem möglich ist mit dieser Methode auch den Anteil verschiedener Formen der Carboxylgruppen mittels einer kinetischen Auswertung des Zeitverlaufs der Jodentwicklung zu bestimmen, da jene mit unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeit mit der Jodlösung reagieren. Dies wurde auch mittels Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von Modelproben verschiedener Laktontypen bestätigt [25].

Es ist bekannt, daß die jodometrische Methode außer den Carboxylgruppen auch andere saure funktionelle Gruppen, die unter diesen Bedingungen sauren Charakter aufweisen, wie z. B. Enole, Endiole, mitbestimmt. Daher ist es notwendig diese Gruppen vor der jodometrischen Bestimmung zu eliminieren, was durch Reduktion der delaktionierten Proben mit NaBH₄ möglich ist [6, 20].

Wir haben in der vorliegenden Arbeit einerseits den Gehalt verschiedener saurer funktioneller Gruppen, andererseits den Anteil der Formen der Carboxylgruppen in einer Reihe von Xylanpräparaten untersucht, wobei der Einfluß von Entsalzungsweisen, Umfällung mit Cetyltrimethylammoniumbromid, thermische Degradation und Oxidation mit Natriumchlorit in saurem Medium verfolgt wurde.

Wie aus der Tabelle 1 (Probe 1 und 2) hervorgeht, ist der jodometrisch bestimmte

Carboxylgruppengehalt erst nach völligem Entsalzen mit dem Gehalt der 4-O-Methyl-D-glukuronsäure (aus dem Methoxylgehalt berechnet) in guter Übereinstimmung, wobei sich dieser Wert auch nach Reduktion der delaktionierten Probe nicht verändert. Es ist somit möglich die Anwesenheit anderer saurer Zucker als die 4-O-Methyl-D-glukuronsäure auszuschließen. Die Umfällung des Xylans mit Cetyltrimethylammoniumbromid [5] (Probe 3) bewirkt zwar eine gewisse Fraktionierung, ohne daß dabei jedoch neue saure funktionelle Gruppen entstehen.

Anders ist jedoch die Situation nach der thermischen Behandlung des 4-O-Methylglukuronoxylans (Proben 4–7). Hier fällt scheinbar der Carboxylgruppengehalt mit zunehmender Degradationstemperatur (im Vergleich zur Probe 3). Wenn man die thermisch behandelten Proben delaktioniert, steigt der Carboxylgehalt, wobei ein Teil dieser Gruppen mit NaBH_4 reduziert werden kann. Bei diesem Anteil handelt es sich nicht um Carboxyle, sondern um Ketogruppen, welche bei der Wärmebehandlung entstehen, an C_2 - oder C_3 -Kohlenstoffatome der Zuckerreste plaziert sind und in ihrer tautomeren Enol- resp. Endiolform sauren Charakter aufweisen. Die Entstehung der Ketogruppen durch thermische Behandlung des Xylans wurde auch spektrophotometrisch nachgewiesen [3].

Durch Oxidation des Xylans mit Natriumchlorit in saurem Medium (Probe 8) erhöht sich der Carboxylgruppengehalt, was jedoch erst nach Delaktionierung der oxidierten Probe festzustellen ist.

Die Ergebnisse der kinetischen Auswertung der jodometrischen Carboxylgruppenbestimmung der einzelnen Xylanproben sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Aus dieser geht hervor, daß die nur ungenügende Entsalzung des Xylans (Probe 1), sich durch Entstehung eines nichtreagierenden Anteils der sauren funktionellen Gruppen bemerkbar macht, welcher die ionisierte Form der Carboxyle darstellt. Diese Form reagiert nicht mit der Jodlösung und wird durch Dekationisierung freigemacht (Probe 2). Dabei kommt es nicht nur zum Anstieg des Anteiles der freien Form sondern auch der beiden Laktonformen, ohne Änderung ihres Verhältnisses. Auch die Umfällung des Xylans mit Cetyltrimethylammoniumbromid und die damit verbundene unterschiedliche Trocknungsweise verändert das Verhältnis der freien und der beiden Laktonformen der Carboxylgruppen nicht wesentlich (Probe 3).

Tabelle 2

Prozentuelle Vertretung verschiedener Formen der Carboxylgruppen und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten in 4-O-Methylglukuronoxylanpräparaten

Probe	Einwaage [mg]	COOH* [%]	schnell- reagierender Anteil der COOH**	nichtreagierender Anteil der Carboxyle		δ -Lakton		γ -Lakton	
				COO ⁻	CO—O—	$K \cdot 10^4$ [%]	$K \cdot 10^4$ [%]	$K \cdot 10^4$ [%]	$K \cdot 10^4$ [%]
1	110,6	3,26	29,5	51,4	0	14,4	10,1	0,48	9,0
2	50,3	3,22	63,6	0	0	10,8	17,8	0,32	18,6
3	92,3	2,66	54,6	0	0	24,4	26,0	0,38	19,4
4	99,1	3,15	23,6	0	46,0	19,5	6,8	0,83	23,6
5	85,7	3,15	83,9	0	0	—	0	0,71	16,1
6	80,2	3,73	13,8	0	60,2	—	0	0,70	26,0
7	57,5	3,73	91,6	0	0	—	0	0,82	8,4
8	96,7	3,25	28,4	0	0	15,6	33,7	0,42	37,9

* Jodometrisch bestimmt nach alkalischer Behandlung (Tabelle 1, b).

** $K \cdot 10^4 > 200$.

Bei den thermisch behandelten Xylanproben (Probe 4 und 6) können wir einen Abfall des schnellreagierenden Anteiles der sauren funktionellen Gruppen, sowie des Anteiles der δ -Laktonform und einen Anstieg der γ -Laktonform, die die stabilere Form der 4-O-Methyl-D-glukuronsäure darstellt, beobachten. Mit zunehmender Temperatur der Wärmebehandlung entsteht und erhöht sich der Anteil an nichtreagierenden funktionellen Gruppen, welcher durch alkalische Behandlung freigemacht werden kann (Probe 5 und 7). Da das nichtbehandelte Xylan (Probe 3) völlig entsalzt war, können wir die Anwesenheit dieses nichtreagierenden Anteiles nur durch die Entstehung von Esterbindungen zwischen den Carboxylgruppen und den Hydroxylgruppen benachbarter Makromoleküle erklären. Der Anteil der schnellreagierenden sauren funktionellen Gruppen in der Probe 6: 0,52% ($13,8 \cdot 3,73 \cdot 10^{-2}$) entspricht ungefähr dem Gehalt an Ketogruppen (die Enol- resp. Endiolform), welcher durch Reduktion der delaktonisierten Probe (Probe 7) bestimmt worden war: 0,63% (3,73—3,10), in Tabelle 1. Daraus schließen wir, daß bei der Wärmebehandlung des Xylans bei 190°C alle vorhandenen Carboxylgruppen in die γ -Laktonform und hauptsächlich in intermolekulare Esterbindungen übergegangen sind. Der verbleibende schnellreagierende Anteil in Probe 6 entspricht daher der Enol- resp. Endiolform der Ketogruppen, welche bei thermischer Behandlung durch intramolekulare Dehydratationsreaktionen entstehen. Intermolekulare Esterbindungen wurden auch bei verschiedenen Trocknungsprozessen von Zellstoffen festgestellt [26, 27], hauptsächlich bei Zellstoffen mit hohem Hemicellulosegehalt [27].

Die Oxidation des 4-O-Methylglukuronoxylans mit Natriumchlorit in saurem Medium, das oft zur Delignifizierung von Holzmaterialien benützt wird, bewirkt einen Anstieg des Carboxylgruppengehaltes. Die kinetische Auswertung ermöglichte es jedoch nicht die Säureform und δ -Laktonform der Uronsäure und entstandenen Aldonsäure zu unterscheiden.

Abschließend möchten wir zusammenfassen, daß sich die jodometrische Carboxylbestimmungsmethode und ihre kinetische Auswertung in Kombination mit der Reduktion mit NaBH_4 zu Untersuchungen der Änderungen im Gehalt von sauren funktionellen Gruppen in 4-O-Methylglukuronoxylanpräparaten, durch thermische Behandlung hervorgerufen, gut bewährt hat und für ähnliche Studien geeignet ist.

Literatur

1. Stewart, C. M. und Smelstorius, J. A., *Chem. Ind.* (London) **1968**, 618.
2. Timell, T. E., *Advan. Carbohydr. Chem.* **19**, 257 (1964).
3. Ebringerová, A., unveröffentlichte Ergebnisse.
4. Ebringerová, A., Kramár, A., Rendoš, F. und Domanský, R., *Holzforsch.* **21**, 74 (1967).
5. Scott, J. E., *Methods Biochem. Anal.* **8**, 145 (1960).
6. Shenai, V. A. und Sudan, R. K., *J. Appl. Polym. Sci.* **16**, 545 (1972).
7. Viebeck, F. und Brecher, C., *Ber.* **63**, 3207 (1930).
8. Slávik, I., Pašteka, M. und Kučerová, M., *Svensk Papperstidn.* **70**, 229 (1967).
9. Sihtola, H., Neimo, L. und Sumiala, R., *J. Polym. Sci., C*, **2**, 289 (1963).
10. Johansson, A., Lindberg, B. und Theander, O., *Svensk Papperstidn.* **57**, 2, 41 (1954).
11. Vollmert, B., *Makromol. Chem.* **3**, 140 (1949).
12. Bylund, M. und Donetzhuber, A., *Svensk Papperstidn.* **71**, 505 (1968).
13. Anderson, D. M. W., *Talanta* **2**, 73 (1959).
14. Norstedt, I. und Samuelson, O., *Svensk Papperstidn.* **69**, 417 (1967).
15. Goel, K. und Samuelson, O., *Svensk Papperstidn.* **70**, 729 (1967).

16. Perry, M. B. und Hulyalkar, R. K., *Can. J. Biochem.* **43**, 573 (1965).
17. Enström, B. und Janson, J., *Svensk Papperstidn.* **73**, 371 (1970).
18. Buchala, A. J. und Wilkie, C. B., *Phytochemistry* **12**, 655 (1973).
19. Neale, S. M. und Stringfellow, W. A., *Trans. Faraday Soc.* **33**, 881 (1937).
20. Nabar, G. M. und Shenai, V. A., *J. Appl. Polym. Sci.* **14**, 1215 (1970).
21. Slávik, I. und Kučerová, M., *Faserforsch. Textiltech.* **17**, 26 (1966).
22. Nabar, G. M. und Padmanabhan, C. V., *Proc. Indian Acad. Sci.* **31A**, 371 (1950).
23. Timell, T. E., *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 5211 (1960).
24. Slávik, I., Paštka, M. und Kučerová, M., *Svensk Papperstidn.* **70**, 365 (1967).
25. Paštka, M., Slávik, I. und Karácsonyi, Š., *Svensk Papperstidn.* **76**, 24 (1973).
26. Kaverzneva, E. D. und Salova, A. S., *Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Chim. Nauk* **1951**, 782.
27. Slávik, I., Paštka, M. und Kučerová, M., *Faserforsch. Textiltech.* **18**, 39 (1967).

Übersetzt von A. Ebringerová