

STANOVENIE KYSELINY GALAKTURÓNOVEJ

V. ZITKO, J. ROSÍK, J. VAŠÁTKO

ČSAV, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Na kolorimetrické stanovenie kyseliny galakturónovej, resp. príslušného polysacharidu — pektínu — používajú sa tri typy reakcií: reakcia s nafto-rezorcinolom v prostredí kyseliny soľnej, reakcia s karbazolom v prostredí kyseliny sírovej a reakcia s niektorými zlúčeninami, obsahujúcimi sulfhydrylové skupiny, takisto v prostredí kyseliny sírovej [1—2]. J. R. Helbert a K. D. Brown opisujú reakciu hexurónových kyselín s antrónom [3].

Všetky tieto reakcie vyžadujú prípravu špeciálnych a väčšinou málo stálych činidiel. Okrem toho nie sú špecifické a k farebnej reakcii dochádza i s niektorými pentózami a hexózami. M. Ikawa, C. Niemann [4], I. H. Bath [5] opisali spektrofotometrické stanovenie cukrov na základe ultrafialovej absorpcie produktov, ktoré vznikajú z cukrov pri zahrievaní v prostredí kyseliny sírovej. Na tomto princípe sme vypracovali spektrofotometrickú metódu analýzy zmesí arabanu, galaktanu a pektínu, ako aj príslušných monosacharidov [6]. Pritom sa ukázalo, že pri zahrievaní roztoku kyseliny galakturónovej v koncentrovanej kyseline sírovej dochádza k tvorbe červeného sfarbenia, kým v prípade arabinózy a galaktózy sa toto sfarbenie netvorí.

V predloženej práci sme na základe uvedenej farebnej reakcie vypracovali metódu kvantitatívneho stanovenia kyseliny galakturónovej.

Experimentálna časť

Kyselinu galakturónovú sme pripravili z *D*-galaktózy cez 1,2,3,4-diizopropylidén-*D*-galaktózu oxydáciou manganistanom draselným [7, 8]. Podľa údajov literatúry sa získa zmes α -*D*-galakturónovej kyseliny a β -*D*-galakturónovej kyseliny, ktorá obsahuje 0,5 mólu kryštálovej vody. Teoreticky tento preparát teda obsahuje 86,7 % anhydrogalakturónovej kyseliny. Potenciometrickou titráciou sme stanovili hodnotu 87,2 %. Ultrafialové spektrum produktu získaného z pripravenej kyseliny galakturónovej zahriatím v koncentrovanej kyseline sírovej sa zhoduje s údajmi [5, 6]. Ďalej sa v práci použili preparáty arabinózy a galaktózy o čistote pro analysi, výrobky n. p. Lachema a preparát kyseliny glukurónovej „C-grade“, výrobok firmy Dade Reagents, Miami USA.

Pri stanoveniach sa používala kyselina sírová pro analysi, označená ako 96 %. Jej koncentrácia sa kontrolovala ponorným refraktometrom Zeiss po desaťnásobnom zriedení. V danom prípade presná koncentrácia bola 94,6 % váh.

Absorpčné spektrum a závislosti extinkcie od koncentrácie kyseliny galakturónovej sa stanovili spektrálnym fotometrom UVISPEC Hilger. Jedna séria meraní sa uskutočnila i Pulfrichovým fotometrom s filtrom S 53.

Pracovný postup bol rovnaký ako v práci [6]. Dobu zahrievania sme volili 5 minút v súhlase s prácami [5, 6]; s rastúcou dobou zahrievania (sledovali sa rôzne doby zahrievania až do 20 minút) extinkcia nepatrne klesá. Výsledná koncentrácia kyseliny sírovej sa menila pipetovaním 1 ml vodného roztoku kyseliny galakturónovej do rôzneho množ-

stva kyseliny sírovej. Koncentrácia kyseliny galakturónovej je počítaná na kyselinu anhydrogalakturónovú a vyjadruje sa v mg/ml vodného roztoku.

Výsledky a diskusia

Pri zahrievaní roztoku kyseliny galakturónovej v koncentrovanej kyseline sírovej vzniká červené sfarbenie s maximom absorpcie pri $510\text{ m}\mu$. Za týchto podmienok nedáva nijakú farebnú reakciu arabinóza, v prípade galaktózy vzniká veľmi slabé žlté sfarbenie s maximom absorpcie pri $460\text{ m}\mu$ (diagram 1).

Závislosť extinkcie od výslednej koncentrácie kyseliny sírovej znázorňuje diagram 2. Sfarbenie o maximálnej extinkcii sa tvorí pri výslednej koncentrácii kyseliny sírovej 85,3 % váh. (1 ml roztoku kyseliny galakturónovej + 5 ml kyseliny sírovej o koncentrácii 94,6 % váh.).

Ako naznačuje diagram 2, tvar kalibračnej krivky pre kyselinu galakturónovú bude závisieť od výslednej koncentrácie kyseliny sírovej. Kalibračné krivky pre tri rozličné výsledné koncentrácie kyseliny sírovej sú znázornené na diagrame 3. V intervale koncentrácií kyseliny galakturónovej 0,1–0,8 mg/ml

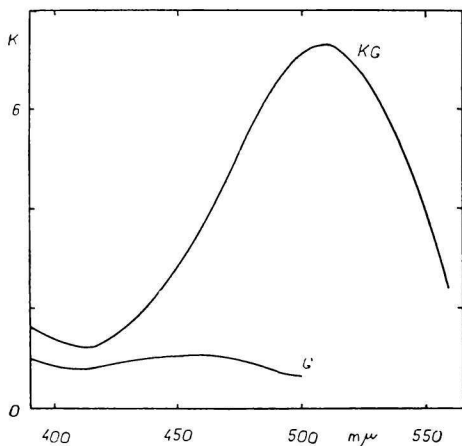


Diagram 1. Absorpčné spektrum produktov vznikajúcich pri zahrievaní roztokov kyseliny galakturónovej a galaktózy v koncentrovanej kyseline sírovej.

na úsečke: vlnová dĺžka v $\text{m}\mu$
na poradnici: $k \cdot 10^2$ extinkčný koeficient počítaný na 0,1 mg/ml látky

KG — kyselina galakturónová
G — galaktóza

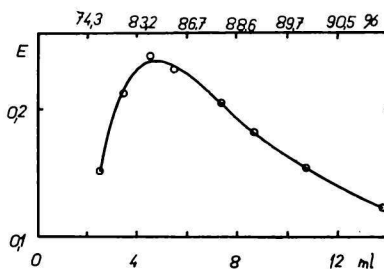


Diagram 2. Závislosť intenzity sfarbenia od výslednej koncentrácie kyseliny sírovej. na úsečke:

hore výsledná koncentrácia kyseliny sírovej, váh. %, dolu ml kyseliny sírovej zmiešané s 1 ml vodného roztoku kyseliny galakturónovej

na poradnici: modul extinkcie pri vlnovej dĺžke $510\text{ m}\mu$

Koncentrácia kyseliny galakturónovej 0,262 mg/ml (ako kyselina anhydrogalakturónová)

platí Lambert—Beerov zákon iba pri výslednej koncentrácii kyseliny sírovej 90 %. Pri nižších koncentráciách kyseliny sírovej extinkcia v závislosti od koncentrácie kyseliny galakturónovej vzrastá viac než lineárne.

Napriek tomu, že ani arabinóza ani galaktóza nedávajú pri zahrievaní v prostredí kyseliny sírovej červené sfarbenie, v ich prítomnosti vzrastá intenzita sfarbenia vytváraného kyselinou galakturónovou. Na diagrame 4 je znázornené relatívne zvýšenie extinkcie v závislosti od množstva arabinózy, resp. galaktózy. Z týchto údajov vyplýva, že arabinóza neruší stanovenie kyseliny galakturónovej, ak množstvo arabinózy v zmesi s kyselinou galakturónovou neprekročí 30 %, resp. množstvo galaktózy 10 %.

Zo získaných výsledkov je zrejmé, že červené sfarbenie, ktoré sa tvorí pri zahrievaní roztokov kyseliny galakturónovej v koncentrovanej kyseline sírovej.

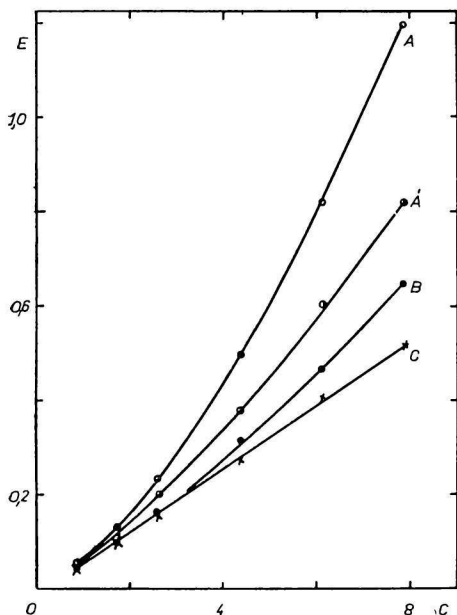


Diagram 3. Závislosť extinkcie od koncentrácie kyseliny galakturónovej.

na úsečke: koncentrácia kyseliny anhydrogalakturónovej v 0,1 mg/ml

na poradnici: modul extinkcie

Krivka A — výsledná koncentrácia kyseliny sírovej 85 % váh., krivka B — 88 % váh., krivka C — 90 % váh., krivka A' — 85 % váh. Extinkcie merané Pulfrichovým fotometrom s filtrom S 53.

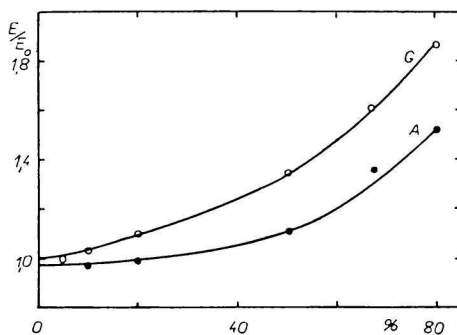


Diagram 4. Relatívne zvýšenie extinkcie za prítomnosti arabinózy a galaktózy.

na úsečke: % galaktózy, resp. arabinózy vo vzorke

na poradnici: E/E_0 — pomer extinkcie zmesi k extinkcii čistej kyseliny galakturónovej (0,262 mg/ml)

možno využiť na kvantitatívne stanovenie kyseliny galakturónovej, a to aj v zmesi s arabinózou a galaktózou, ak sa zloženie zmesi pohybuje v uvedených hraniciach. Pretože intenzita sfarbenia značne závisí od koncentrácie kyseliny sírovej, treba túto presne stanoviť a kontrolovať. Reakcia je výhodná pri analýzach pektínových preparátov, v ktorých množstvo arabanu a galaktanu neprevyšuje stanovené hranice, čo možno dosiahnuť izoláciou pektínu zrážaním soľami ťažkých kovov [9, 10]. Reakciu možno použiť i pri stanovení koncentrácie roztokov pektínových látok s vyšším obsahom arabanu a galaktanu, v tomto prípade však treba pre daný preparát stanoviť kalibračnú krivku.

Výhodou vypracovanej metódy oproti iným metódam stanovenia kyseliny galakturónovej je používanie koncentrovanej kyseliny sírovej bez ďalších špeciálnych činidiel. Okrem toho sa pracuje vo viditeľnej oblasti, takže možno použiť bežné fotokolorimetre (napríklad Pulfrichov fotokolorimeter).

Podobne ako kyselina galakturónová reaguje i kyselina glukurónová. Absorpčné maximum v tomto prípade leží pri $497\text{ m}\mu$ a Lambert—Beerov zákon pri výslednej koncentrácii kyseliny sírovej 85,3 % váh. platí v intervale koncentrácií 0,1—1 mg/ml. Možno predpokladať, že ide o všeobecnú reakciu hexurónových kyselín. Pretože v pektínových preparátoch a v polysacharidoch ovocných štiav sa z hexurónových kyselín vyskytuje len kyselina galakturónová, je v tomto prípade opísaná reakcia jej špecifickým dôkazom.

Mechanizmus uvedenej reakcie bude predmetom ďalšieho štúdia.

Ďakujeme firme Dade Reagents Miami Florida, USA za poskytnutie kyseliny glukurónovej.

Súhrn

Opisuje sa nová metóda kvantitatívneho stanovenia kyseliny galakturónovej, založená na meraní červeného sfarbenia s maximom absorpcie pri $510\text{ m}\mu$, ktoré vzniká pri zahrievaní roztoku kyseliny galakturónovej v koncentrovanej kyseline sírovej. Podobne reaguje i kyselina glukurónová, v prípade arabinózy a galaktózy červené sfarbenie nevzniká. Kyselinu galakturónovú možno stanoviť i v zmesi s arabinózou a galaktózou, ak ich množstvo neprekročí pri arabinóze 30 %, pri galaktóze 10 % množstva kyseliny galakturónovej.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГАЛАКТУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

В. ЗИТКО, Й. РОСИК, Й. ВАШАТКО

ЧСАН, Химический институт Словацкой академии наук в Братиславе

Выводы

Описывается новый метод количественного определения галактуроновой кислоты, основанный на измерении красной окраски с максимумом абсорбции при $510\text{ m}\mu$, которая получается при нагревании раствора галактуроновой кислоты в концентри-

рованной серной кислоте. Подобно реагирует глюкуроновая кислота, в случае арабинозы и галактозы красной окраски не получается. Галактуроновую кислоту можно определять и в смеси с арабинозой и галактозой, если их количество не превышает у арабинозы 30 %, у галактозы 10 % количества галактуроновой кислоты.

Поступило в редакцию 23. 5. 1961 г.

BESTIMMUNG DER GALAKTURONSÄURE

V. ZITKO, J. ROSÍK, J. VAŠÁTKO

ČSAV, Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften
in Bratislava

Zusammenfassung

Die Autoren beschreiben eine neue Methode der quantitativen Bestimmung der Galakturonsäure, die auf der Messung der roten Färbung mit einem Absorptionsmaximum bei 510 m μ begründet ist. Diese Färbung entsteht beim Erhitzen der Lösung der Galakturonsäure in konzentrierter Schwefelsäure. Ähnlich reagiert auch die Glukuronsäure, im Falle der Arabinose und Galaktose entsteht keine derartige rote Färbung. Galakturonsäure kann man auch im Gemisch mit Arabinose und Galaktose bestimmen, wenn deren Menge bei Arabinose nicht 30 %, und bei Galaktose nicht 10 % der Menge der Galakturonsäure überschreitet.

In die Redaktion eingelangt den 23. 5. 1961

LITERATÚRA

1. Dische Z., *New Color Reactions for Determination of Sugars in Polysaccharides, Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 2 New York 1955, 313—358. — 2. Kertesz Z. I., *The Pectic Substances*, New York 1951. — 3. Helbert J. R., Brown K. D., *Anal. Chem.* 28, 1098—1100 (1956). — 4. Ikawa M., Niemann C., *J. Biol. Chem.* 180, 923—931 (1949). — 5. Bath I. H., *Analyst* 83, 451—455 (1958). — 6. Zitko V., Rosík J., *Die Nahrung* 5, 491, (1961). — 7. *Biochemical Preparations* 3, 74—78 (1953). — 8. Täufel K., Bock W., *Die Nahrung* 4, 25—30 (1960). — 9. Wunsch G., *Makromol. Chem.* 8, 124—133 (1952). — 10. Rosík J., Zitko V., neuvěřené výsledky.

Do redakcie došlo 23. 5. 1961

Adresa autorov:

Inž. Vladimír Zitko, inž. Jozef Rosík, akademik Jozef Vašátko, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón SVŠT.