

## Rozdeľovanie *O*-trimetylsilylderivátov a *O*-metylderivátov monosacharidov chromatografiou plyn—kvapalina

V. BÍLIK, Š. BAUER, I. JEŽO, M. FURDÍK

*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Oddelenie monosacharidov,  
Bratislava*

*Katedra organickej chémie a biochémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského,  
Bratislava*

Opisujú sa podmienky rozdeľovania *O*-trimetylsilylderivátov a *O*-metylderivátov monosacharidov na polyestere 1,4-butándiolsukeinátu ako zakotvenej fázy plynovou chromatografiou. Zistilo sa, že elučné časy metyléterov analogické trimetylsilyléterom závisia od zakotvenej fázy a od nosiča (kremeliny).

Plynová chromatografia je doplňujúcou metódou identifikácie a stanovenia *O*-trimetylsilylderivátov, ako aj *O*-metylderivátov monosacharidov. Metóda je taká účinná, že ňou možno rozdeliť i anoméry cukrov. Známe sú práce o rozdeľovaní *per*-metyléterov sacharidov, ako aj derivátov s niektorými voľnými hydroxylovými skupinami, s výnimkou voľnej hydroxylovej skupiny na C<sub>1</sub>. Po substitúcii vodíka v skupinách OH, NH<sub>2</sub> a COOH trimetylsilylovou skupinou zvýši sa prchavosť a termická stabilita pôvodnej látky. Túto vlastnosť trimetylsilyléterov sacharidov využili E. J. Hedgley a W. G. Overend [1] na ich rozdeľovanie plynovou chromatografiou. Ďalšie práce o rozdeľovaní trimetylsilyléterov monosacharidov dokazujú výhodné využitie chromatografie plyn—kvapalina na identifikáciu [2—5], stanovenie [2, 5] a preparatívne rozdeľovanie [3] týchto látok.

Elučný čas závisí od štruktúry látky. C. T. Bishop [6] vyslovil predpoklad: „Každý anomér metylglykopyranozidu, v ktorom metoxykupina na C<sub>1</sub> je v polohe *trans* k C<sub>2</sub> substituentu, má menší elučný objem s výnimkou, keď vodík hydroxylovej skupiny na C<sub>2</sub> je nesubstituovaný, vtedy elučný objem je väčší.“ Podľa C. C. Sweeleya a spolupracovníkov [2] toto zovšeobecnenie nie je možné vzťahovať na tetra-trimetylsilylétery pentóz ani na penta-trimetylsilylétery hexóz. Pre elučný čas *per*-trimetylsilylmonosacharidov vyvodzujú takéto zovšeobecnenie: „Ak normálna konformácia sacharidu je stoličkovej formy C<sub>1</sub> alebo I C a ak sa nepredpokladá konformačná nestabilita, ten anomér, v ktorom je anomerická skupina OH ekvatoriálna, má dlhší elučný čas.“ V súhlase s tým *per*-trimetylsilyl- $\beta$ -anomér glukózy, galaktózy, manózy, talózy, xylózy, lyxózy, ako aj metylglykopyranozidy s metoxykupinou v ekvatoriálnej polohe majú dlhšie elučné časy.

V predloženej práci sa sleduje závislosť elučných časov od rôzneho obsahu zakotvenej fázy a od teploty, ako aj využitie trimetylsilylácie parciálnych metyléterov monosacharidov. Vytvorenie zmiešaných *O*-trimetylsilyl-*O*-metylsacharidov umožňuje rozdeľovať i také metylétery sacharidov, ktoré samotné

nemožno rozdeľovať, prípadne umožňuje podstatne skrátiť ich elučný čas. Ďalej sme skúšali trimetylsilyláciu čistých anomérov trimetylchlórsilánom.

### Experimentálna časť

Chromatografické pokusy sme robili na chromatografe Chrom I (Laboratorní přístroje, n. p.) s vodíkovým mikroplameňovým ionizačným detektorom na ocelových kolónach tvaru U o dĺžke 170 cm a vnútornom priemere 6 mm.

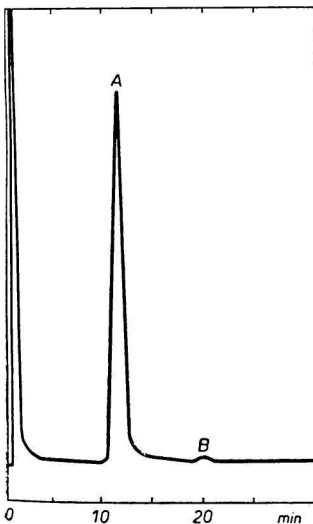
Náplň chromatografických kolón sa pripravila zaliatím kremeliny (Kieselgur, fy E. Merck, AG Darmstadt) o zrnitosti 0,1—0,2 mm chloroformovým roztokom polyesteru 1,4-butándiolsukcinátu (pripraveného podľa [7]) na 5, 10 a 15 % zakotvenej fázy. Po oddestilovaní chloroformu sa náplň vákuovo dosušila pri 100 °C.

Zo skúšaných látok metyl-2,4,6-tri-O-metyl- $\beta$ -D-galaktózid, metyl-2,3,5-tri-O-metyl- $\alpha,\beta$ -L-arabinozid, metyl-3,4-di-O-metyl- $\beta$ -L-arabinozid, metyl-2,3-di-O-metyl- $\alpha,\beta$ -L-arabofuranozid a metyl-2,3,4-tri-O-metyl- $\beta$ -L-arabinozid poskytol Ústav prírodných látok Akadémie vied SSSR v Moskve.

#### Príprava O-trimetylsilylderivátov monosacharidov

5—8 mg sacharidu sa rozpustí v 0,5 ml formamidu, pridá sa 0,5 ml trimetylchlórsilánu a reakčná zmes sa za stáleho trepania zahrieva 30 minút pri 70—75 °C. Po skončení zahrievania sa do reakčnej zmesi pridá 1 ml hexánu a po oddelení sa hexánový roztok trimetylsilylovanej látky použije na chromatografické rozdeľovanie.

Pri príprave určitého anoméru je potrebné najprv látku nadvrstviť formamidom a schladiť suchým ľadom na —40 °C. Potom sa do stuhnutej reakčnej zmesi pridá potrebné množstvo trimetylchlórsilánu a teplota reakčnej zmesi sa nechá za stáleho trepania samovoľne vystúpiť na laboratórnu teplotu. Po dosiahnutí tejto teploty sa reakčná zmes spracuje vyššie uvedeným spôsobom.



#### Výsledky a diskusia

Trimetylsilylovaný metyl- $\alpha$ -D-glukopyranozid, metyl- $\beta$ -D-glukopyranozid a metyl- $\alpha$ -D-galaktopyranozid dávali vždy jednu chromatografickú vlnu.

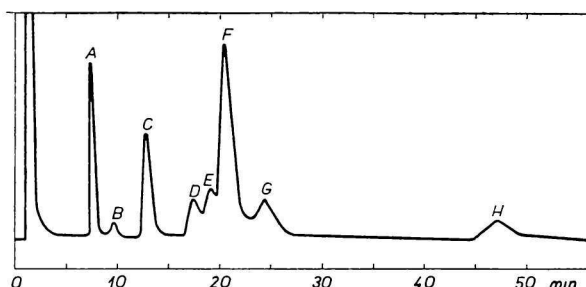
Obr. 1. Chromatogram *per*-trimetylsilylovanej  $\alpha$ -D-glukopyranózy (160 °C, 30 ml N<sub>2</sub>/min.).

A. trimetylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozid; B. trimetylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozid.

To dokazuje, že trimetylsilylácia prebieha spôsobom uvedeným v experimentálnej časti kvantitatívne na všetkých hydroxylových skupinách.

Čisté anoméry trimetylsilyléterov sacharidov možno podľa očakávania pripraviť pôsobením trimetylchlórsilánu za chladenia reakčnej zmesi. Napríklad  $\alpha$ -D-glukopyranóza po trimetylsilylácií dáva jednu chromatografickú vlnu so stopou druhého anoméru (obr. 1).

Ďalej sme preskúšali chromatografické oddelovanie metyléterov a trimetylsilyléterov monosacharidov na 5, 10 a 15 % polyesteru 1,4-butándiolsukcinátu ako zakotvenej fáze na kremeline. Metylétery sacharidov možno na 10 % zakotvenej fáze za prietoku dusíka 30 ml/min. najvýhodnejšie oddeliť pri 170 až 180 °C (obr. 2), kým trimetylsilylétery sacharidov pri 155—165 °C (obr. 3).



Obr. 2. Rozdeľovanie metyléterov sacharidov (175 °C, 30 ml N<sub>2</sub>/min.).

*A, B.* metyl-2,3,5-tri-*O*-metyl- $\alpha,\beta$ -L-arabinozid; *C.* metyl-2,3,4-tri-*O*-metyl- $\beta$ -L-arabinozid; *D.* metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl- $\alpha$ -D-glukozid; *E.* metyl-2,3-di-*O*-metyl- $\alpha,\beta$ -L-arabofuranozid; *F.* metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl- $\beta$ -D-galaktozid; *G.* metyl-3,4-di-*O*-metyl- $\beta$ -L-arabinozid; *H.* metyl-2,4,6-tri-*O*-metyl- $\beta$ -D-galaktozid.

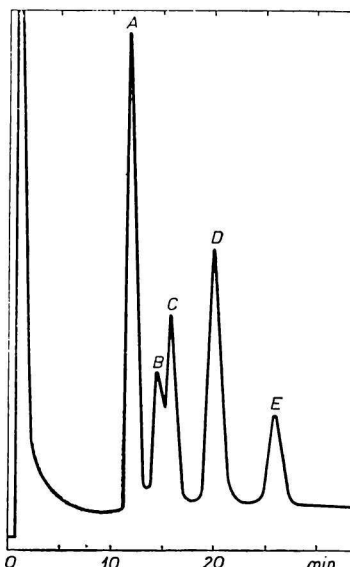
Metylétery sacharidov obdobné trimetylsilyléterom sacharidov pri teplote 175 °C na 10 % zakotvenej fáze majú dlhší elučný čas, ktorý voľné hydroxylové skupiny ešte viac predlžujú. Za týchto podmienok pomerný elučný čas vzťahovaný na metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl- $\alpha$ -D-glukozid je pre:

metyl-3,4-di- <i>O</i> -metyl-2-trimetylsilyl- $\beta$ -L-arabinozid	0,43
metyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -metyl- $\beta$ -L-arabinozid	0,73
metyl-3,4-di- <i>O</i> -metyl- $\beta$ -L-arabinozid	1,41
metyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -metyl-3- <i>O</i> -trimetylsilyl- $\beta$ -D-galaktozid	1,06
metyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -trimetylsilyl- $\beta$ -D-galaktozid	1,18
metyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -metyl- $\beta$ -D-galaktozid	2,80

Pri sledovaní optimálnych množstiev zakotvenej fázy sme zistili, že elučné časy metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozidu a metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozidu, najmä však metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl- $\alpha$ -D-

Obr. 3. Rozdelovanie derivátov D-glukopyranózy (165 °C, 30 ml N<sub>2</sub>/min.).

A. trimetylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozid; B. metyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozid; C. metyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozid; D. trimetylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozid; E. metyl-2,3,4,6-tetra-O-metyl- $\alpha$ -D-glukozid.



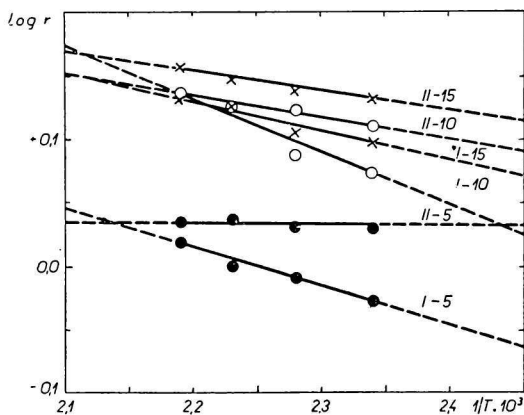
-glukozidu, vzťahované na trimetylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozid, sa menia, zatiaľ čo elučný čas trimetylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozidu sa nemení (tab. 1).

Tabuľka 1

Zakotvená fáza %	Teplota °C	Pomerný elučný čas vzťahovaný na trimetylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozid			
		metyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozid	metyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozid	trimetylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozid	metyl-2,3,4,6-tetra-O-metyl- $\alpha$ -D-glukozid
	155	0,94	1,07	1,76	0,64
	165	0,98	1,07	1,63	0,82
	175	1,00	1,08	1,54	0,94
	185	1,04	1,08	1,44	1,08
10	155	1,18	1,28	1,74	1,96
	165	1,22	1,32	1,69	2,17
	175	1,33	1,33	1,56	2,37
	185	1,36	1,36	1,52	2,59
15	155	1,25	1,35	1,69	2,28
	165	1,27	1,37	1,63	2,62
	175	1,33	1,40	1,60	2,81
	185	1,35	1,43	1,53	3,10

Oddeľovanie jednotlivých cukrov prebieha podľa ich schopnosti tvoriť vodíkové väzby so zakotvenou fázou (keď táto má voľné skupiny OH, ako je to v prípade 1,4-butándiolsukcinátu). Preto pri nadbytku zakotvenej fázy prebieha eluovanie v tomto poradí: metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozid, metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozid a metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl- $\alpha$ -D-glukozid. Zníženie elučného času metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-metyl- $\alpha$ -D-glukozidu, čiastočne metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozidu a metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozidu je pravdepodobne zapríčinené nedostatkom voľných OH skupín pri nízkej koncentrácii zakotvenej fázy (5 %), ktoré môžu byť blokované aktívnymi skupinami polárneho nosiča.

Závislosti logaritmu relatívneho elučného času od recipročnej hodnoty teploty (obr. 4) sú lineárne, ako to vyplýva z teoretického odvedenia [8]. Z týchto



Obr. 4. Závislosti logaritmu pomerných elučných časov vzťahovaných na trimetylsilyl-2,3,4,6-tetra-*O*-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozid od recipročnej hodnoty teploty.

I. metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-trimetylsilyl- $\alpha$ -D-glukozid; II. metyl-2,3,4,6-tetra-*O*-trimetylsilyl- $\beta$ -D-glukozid; 5, 10, 15 % zakotvenej fázy;  $r$  = relatívny elučný čas.

závislosti sa ukazuje, že pri určitých teplotách sa môže očakávať i opačný sled jednotlivých anomérov. Vo všeobecnosti však teplota znižuje vplyv väzbových síl polárnej zakotvenej fázy a tým sa zrejme stierajú rozdiely prejavujúce sa pri nižších teplotách.

Na príprave ďalších zmesových *O*-trimetylsilyl-*O*-metylmonosacharidov a ich oddeľovaní plynovou chromatografiou sa pracuje.

Na prácach pri rozdeľovaní plynovou chromatografiou spolupracovali inž. A. Kardošová a P. Suchanský.

РАЗДЕЛЕНИЕ *O*-ТРИМЕТИЛСИЛИЛ-ПРОИЗВОДНЫХ  
И *O*-МЕТИЛ-ПРОИЗВОДНЫХ МОНОСАХАРИДОВ  
ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

В. Билик, Ш. Бауэр, И. Ежо, М. Фурдик

Химический институт Словацкой академии наук, Отдел моносахаридов,  
Братислава

В работе описываются условия разделения с помощью газовой хроматографии *O*-триметилсилил-производных и *O*-метил-производных моносахаридов на неподвижной фазе 1,4-бутандиол сукцината полиэфира. Нашли, что время элюирования метилэфиров аналогичных с триметилсилилэфиром и зависят от содержания неподвижной фазы и носителя, и диффузорной земли.

*Preložila T. Dillingeroová*

TRENNUNG VON *O*-TRIMETHYLSILYL- UND *O*-METHYLDERIVATEN  
DER MONOSACCHARIDE DURCH GAS—FLÜSSIGKEIT-  
-CHROMATOGRAPHIE

V Bílik, Š. Bauer, I. Ježo, M. Furdík

Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften,  
Abteilung der Monosaccharide, Bratislava

Es wird über die Bedingungen der gaschromatographischen Trennung von *O*-Trimethylsilyl- und *O*-Methylderivaten der Monosaccharide an der stationären Phase des Polyesters von 1,4-Butandiolsuccinat berichtet. Es konnte festgestellt werden, daß die Elutionszeiten von Methyläthern, die jenen der Trimethylsilyläther analog sind, vom Gehalt der stationären Phase und der Kieselgur als Trägersubstanz abhängen.

*Preložil M. Liška*

LITERATÚRA

1. Hedgley E. J., Overend W. G., *Chem. Ind.* **1960**, 378.
2. Sweeley C. C., Bentley R., Makita M., Wells W. W., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).
3. Ferrier R. J., Singleton M. F., *Tetrahedron* **18**, 1143 (1962).
4. Ferrier R. J., *Tetrahedron* **18**, 1149 (1962).
5. Perry M. B., *Can. J. Chem.* **42**, 451 (1964).
6. Bishop C. T. v knihe D. Glick, *Metod of Biochemical Analysis*, Vol. 10, str. 20. Interscience Publishers, New York 1962.
7. Bishop C. T., Cooper F. P., *Can. J. Chem.* **38**, 388 (1960).
8. Purnell H., *Gas-Chromatography*, 218. J. Wiley, New York—London 1962.

Do redakcie došlo 20. 7. 1964

*Adresa autorov:*

*Prom. chemik Vojtech Bílik, dr. inž. Štefan Bauer, CSc., dr. inž. Ivan Ježo, CSc.,  
Chemický ústav SAV, Oddelenie monosacharidov, Bratislava, Dúbravská cesta.  
Prof. inž. Mikuláš Furdík, Katedra organickej chémie a biochémie PFUK, Bratislava,  
Šmeralova 2.*