

hasil penelitian

PENENTUAN STRUKTUR HIDROKSIPROPIL GLUKOSA DENGAN CARA $^1\text{H-NMR}$

Oleh :

Haryadi *

Abstrak

Hasil hidrolisis pati hidroksipropil dengan asam dilakukan fraksinasi dengan HPLC menggunakan kolom μ Poracil semi-preparatif. Dua komponen utama yang diperoleh diuji dengan spektrometri $^1\text{H-NMR}$ dalam bentuk turunan perasetat. Penentuan struktur dipertegas dengan menggunakan pembandingan senyawa model hidroksipropil glukosa.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa turunan perasetat dari komponen hidroksipropil glukosa yang pertama adalah campuran diastereoisomer-anomer 2-O-(2-hidroksipropil)-D-glukopiranosida tercampur sedikit dengan 3-O-(2-hidroksipropil)-D-glukopiranosida perasetat dan yang kedua adalah campuran diastereoisomer-anomer 2-O-(2-hidroksipropil)-D-glukopiranosida perasetat.

I. Pendahuluan

Pati banyak digunakan dalam industri pangan, kertas dan tekstil. Dalam industri pangan digunakan terutama untuk pengendalian tekstur dan reologi beberapa produk. Fungsi utamanya ialah sebagai pengental, pengisi, pengikat dan

stabiliser. Industri pangan makin banyak melakukan cara-cara pengolahan dengan suhu dan keasaman yang tinggi menggunakan mesin dengan kecepatan tinggi dan penyimpanan produk berpati yang lama, pendinginan dan pembekuan dan lain sebagainya. Pada keadaan-keadaan tersebut pati alami mengalami perubahan sifat fungsionalnya sehingga penggunaannya makin dibatasi.

Modifikasi pati secara kimiawi telah dikembangkan untuk memenuhi sifat-sifat yang dituntut oleh beragam industri yang terus meningkat. Pati hidroksipropil adalah salah satu hasil modifikasi yang penting, dibuat dari reaksi antara pati dengan propilen oksida dalam suasana basa.

Gugus hidroksipropil pada pati eter menyebabkan pengurangan kecenderungan pati mengalami retrogradasi yang berpengaruh terhadap sifat-sifat pastanya. Pastanya jatuh lebih jernih, lebih lekat, mampu mengikat air lebih banyak dan mengurangi kecenderungan memburam pada pendinginan.

* Staf Pengajar Fak. Teknologi Pertanian UGM Yogyakarta.

Sifat fungsional pati eter sangat ditentukan oleh tingkat substitusinya (Molar Substitution = MS). Penggunaan pati hidroksipropil yang makin meningkat dalam industri pangan sebagai bahan tambahan menuntut cara analisis yang cepat, peka dan sederhana untuk mengetahui jumlah gugus hidroksipropil. Cara spektrofotometrik menurut Johnson (1969) adalah paling umum digunakan. Meskipun demikian, cara-cara ini tidak bisa menunjukkan pola substitusi yang mana kemungkinan berpengaruh terhadap sifat-sifat turunan pati.

Cara analisis yang umum dilakukan adalah dilakukan terhadap hasil hidrolisis pati menggunakan asam. TLC telah digunakan oleh Leegwater (1973) untuk melakukan fraksinasi terhadap komponen-komponen hidrolisat pati hidroksipropil dan cara NMR digunakan untuk penentuan strukturnya dalam bentuk perasetat. HPLC dapat digunakan untuk penentuan jenis komponen pati hidroksipropil berdasar reaktivitas masing-masing komponen (Haryadi, 1988). Fraksinasi dengan HPLC menggunakan kolom semi-preparatif memungkinkan dapat diperoleh masing-masing komponen dengan lebih murni dan dalam waktu yang singkat. Kemajuan dalam spektrometri NMR memungkinkan kajian struktur dapat dilakukan lebih mendalam.

Pada makalah ini disajikan hasil penelitian mengenai penentuan struktur dua komponen utama dari hidrolisat pati hidroksipropil hasil fraksinasi menggunakan HPLC, dengan spektrometri $^1\text{H-NMR}$.

II. Bahan dan Cara Penelitian

1. Hidrolisis Pati Hidroksipropil

10 g pati dilakukan hidrolisis dengan

100 mL asam sulfat (0,75 M) selama 4 jam dalam bak air mendidih. Setelah didinginkan hidrolisat dinetralkan dengan bubuk $\text{Ba}(\text{OH})_2$, disaring dengan membran YM5 dan kemudian dikeringkan dengan freeze drier.

2. Fraksinasi Hidrolisat Pati Hidroksipropil

Hidrolisat pati hidroksipropil dilarutkan ke dalam air sehingga terbentuk larutan 5%. Komponen hidrolisat dipisahkan dengan HPLC menggunakan kolom μ Poracil yang sudah diperlakukan dengan SAM I (Silica Amine modifier I Waters Associates). Fase bergerak yang digunakan terdiri atas asetronitril/air 80:20 dengan tambahan SAM I 0,1%. Instrumen yang digunakan berupa Model 201 Liquid Chromatography dilengkapi dengan detektor indeks bias Model 401.

Dua larutan fraksi yang diperoleh (selanjutnya disebut fraksi E dan F) dipekatkan dengan Rotaevaporator hampa dan kemudian dikeringkan dengan freeze drier.

3. Penylapan Senyawa Model

6-0-, 3-0- dan 2-0-hidroksipropil-D-glukosa masing-masing dibuat dari reaksi antara 1,2:3,5-di-0-metilin-D-glukosa, 1,2:5,6-di-0-isopropilidin-D-glukosa dan metil 4,6-0-benzilidin-alpa-D-glukosida dengan propilin oksida dalam keadaan basa. Hasil sintesis difraksinasi dengan HPLC menggunakan kolom μ Poracil dengan cara seperti tersebut di muka.

Senyawa pembanding lainnya yang digunakan ialah α - dan β -D-glukosa.

4. Asetilasi Komponen

Kurang lebih 20 mg fraksi-fraksi hidrolisat dan juga senyawa-senyawa model pembanding masing-masing

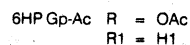
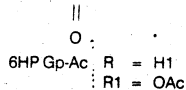
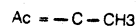
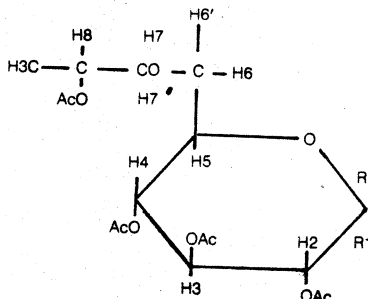
dilarutkan ke dalam 1 ml asam asetat anhidrida/piridin (1:1) dan dibiarkan pada suhu kamar selama 24 jam. Etanol (2 ml) ditambahkan dan campuran reaksi dibiarkan semalam. Kemudian ke dalam campuran tersebut ditambahkan 5 ml kloroform dan 5 ml asam sulfat 2M dan digojog kuat-kuat. Lapisan cairan di bagian bawah dipisahkan dan dicuci dengan 5% natrium bikarbonat. Ekstrak dicuci dengan melewati pada kolom gel silika. Kloroform diuapkan dalam oven pada suhu 45°C untuk mendapatkan hidroksiopropil glukosa perasetat.

5. Analisis ¹H-NMR

Instrumen yang digunakan ialah spektrometer Bruker CXP-300 dengan kondisi sebagai berikut :

Pelarut : deuterochloroform
 Diameter tabung sampel : 5 mm
 Kepekatan sampel : 100—200 mg/ml
 Standar internal : tetrametilsilan
 Frekuensi : 300 MHz
 Luas pulsa : 6 μ s (90°C)
 Waktu pelepasan : 0,2 jam
 Suhu sampel : 27°C

Untuk menentukan jenis proton yang saling melakukan kopling untuk mengukur *chemical shift* suatu sinyal proton yang tertutup oleh resonansi lain, spektrum disederhanakan dengan cara spin-spin decoupling.



III. Hasil dan Pembahasan

Interpretasi spektra ¹H-NMR menyangkut tiga pertimbangan. Yang pertama adalah menyangkut *chemical shift* sinyal resonansi proton. Yang lainnya adalah kegandaan dan *coupling constant* resonansi proton yang menunjukkan jumlah proton tetangganya dan posisi stereokimianya.

Spektra ¹H-NMR dari α dan β -D-glukopiranosapenta-asetat (α Gp — Ac dan β Gp-Ac) adalah seperti nampak pada Gambar 1. Letak sinyal-sinyal hidrogen ditafsirkan menurut cara yang telah dilaporkan sebelumnya (Abraham, dkk., 1962). ditambah data yang diperoleh pada kajian ini.

1. Penentuan Struktur Turunan Asetat Traksi F

Spektrum ¹H-NMR turunan asetat Fraksi F disingkat F-Ac menunjukkan sinyal-sinyal hidrogen-hidrogen metil propilen pada 1,2 ppm. *Decoupling* sinyal ini menghasilkan perubahan multiplet pada 5,05 ppm. Maka dengan demikian multiplet tersebut pasti menunjukkan penyerapan pada H8, yang mana adalah hidrogen metin pada bagian propilen. Spektrum F-Ac sangat mirip dengan spektrum 6-O-hidroksiopropil-D-glukosa penta-asetat (disingkat 6HP Gp-Ac) hasil sintesis seperti nampak pada Gambar 2.

Chemical shift dan *coupling constant* (J) sinyal-sinyal pada daerah 5,20 — 6,35 ppm adalah sangat mirip dengan *chemical shift* dan *coupling constant* yang bersangkutan pada α - dan β -D-glukosa penta-asetat seperti nampak pada Tabel 1. Dengan demikian doublet pada 6,34 ppm dengan celah sebesar 3,6 Hz dipastikan sebagai sinyal hidrogen -anomer. Multiplet pada

5,70 ppm dengan celah 8,0 Hz adalah disebabkan oleh resonansi H1, β . Puncak-puncak pada 5,46 ppm dan pada 5,3 ppm masing-masing pasti sinyal-sinyal dari H3, α dan H3, β .

Spin decoupling H3, α merubah multiplet yang pusatnya pada 5,12 ppm, yang dengan demikian dipastikan sebagai H2, α dan H4, α .

Tabel 1. ¹H-*chemical shift* dan *coupling constant* α dan β glukopiranos penta-asetat dan turunan asetat Fraksi F (atau F-Ac)

	α Gp-Ac	β -Gp-Ac	F - Ac	
<i>Chemical shift</i> (ppm)				
Bagian glukosa				
H1	6,34	5,74	6,34	5,74
H2	5,08	5,17	5,12	tdt.*
H3	5,49	5,27	5,46	5,17
H4	5,13	5,15	5,12	
Bagian propilen				
H8			5,05	5,05
CH ₃			1,2	1,2
<i>Coupling constant</i> (Hz)				
Bagian glukosa				
J1,2	4,0	8,0	4,0	8,0
J3,4	10,0	9,4	10,0	9,2

*tdt. = tidak ditentukan

Dengan pengikatan gugus hidroksipropil, sinyal H6 pasti tergeser ke bawah. Ini ditunjukkan oleh kehilangan sinyal-sinyal pada daerah 4,10 — 4,34 ppm bila dibandingkan terhadap α dan β -D-glukopiranos penta-asetat. Jadi F-A adalah campuran anomer (α - dan β -) 6-O-hidroksipropil.

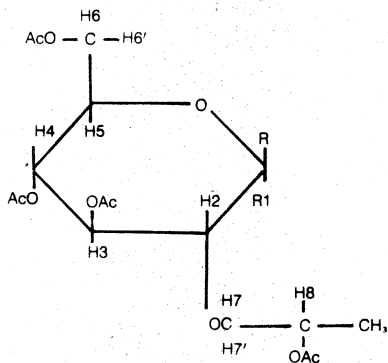
Pada spektra F-Ac dan D-0-hidroksipropil-D-glukosa penta asetat hasil

sintesis (Gambar 2) sinyal-sinyal dari H1, β , H3, α , H3, β dan CH₃ nampak jumlahnya dua kali lipat daripada sinyal-sinyal yang bersangkutan pada hidrogen-hidrogen dari α - dan β -D-glukopiranos penta-asetat. Gugus hidroksipropil mengandung 3 atom C dengan satu atom di tengah yang asimetrik sehingga kemungkinan dapat terjadi 2 bentuk diastereoisomer R dan S. Sudah diketahui bahwa diastereoisomer R

dan S pada dasarnya menghasilkan spektra NMR yang berbeda (Raban dan Mislow, 1967). Sehingga dengan demikian F-Ac dipastikan sebagai campuran diastereoisomer R dan S dari dan 6-O-hidroksipropil-D-glucopiranosida pentaasetat.

2. Penentuan Struktur Turunan Asetat Fraksi E

Spektrum ¹H-NMR dari fraksi E dalam bentuk perasetat (E-Ac) adalah seperti nampak pada Gambar 3. Decoupling sinyal-sinyal hidrogen pada metil pada propilen pada 1,2 ppm menghasilkan perubahan pada multiplet at 5.05 ppm. Sehingga dengan demikian multiplet tersebut pasti menunjukkan penyerapan H8.



Sinyal-sinyal pada 6,36 ppm pasti dari H1, α dengan celah 4,0 Hz dan H1, β dan 5,60 ppm dengan celah 8,0 Hz. *Spin decoupling* pada 5,60 ppm menyebabkan perubahan multiplet yang memusat pada 3,50 ppm yang mana pasti berasal dari penyerapan oleh H2, β . Sinyal H2 ini nampak pada bidang yang lebih tinggi (nilai chemical shift lebih rendah) daripada sinyal hidrogen yang relevan pada spektrum β -D-

Oktet yang memusat pada 3,78 ppm dengan celah 2,2, 4,4 dan 10 Hz (Tabel 2) pasti timbul dari penyerapan H5, β yang mana bertepatan dengan sinyal-sinyal hidrogen pada spektrum β -D-glucopiranosida pentaasetat (Gambar 1). Lebih lanjut berdasar kesesuaian dengan spektrum senyawa acuan sehubungan dengan *chemical shift* dan *coupling constant* sinyal-sinyal hidrogen yang bersesuaian, dan juga spacing (coupling) pada sinyal-sinyal H5, β , sinyal H4, β pasti terletak pada 5,0 ppm dengan celah of 10 Hz ($J_{4,5}$). Dengan demikian, sinyal H6', β pasti pada 4,05 ppm dengan $J_{5,6'} = 2,2$ Hz dan $J_{6,6'} = 12,4$ Hz, dan sinyal H6, β pada 4,33 ppm dengan $J_{6,6'} = 12,4$ Hz.

glucopiranosida pentaasetat seperti disajikan pada Tabel 2. Kenyataan ini menunjukkan bahwa gugus asetil pada C2 digantikan oleh gugus 2-asetoksipropil. Jadi, E-Ac adalah campuran anomer (α dan β) 2-O-hidroksipropil-D-glucopiranosida pentaasetat (2HP α Gp-Ac dan 2H β Gp-Ac). Kenyataan ini dipertegas dengan bukti bahwa spektrum E-Ac adalah kualitatif sama dengan spektrum senyawa model 2-O-hidroksipropil-D-glucopiranosida pentaasetat.

Beberapa sinyal-sinyal pada spektrum E-Ac nampak dua kali lipat jumlahnya. Ini sangat mungkin disebabkan E-Ac terdiri atas campuran diastereoisomer R dan S, karena gugus

asetoksiopropil mengandung pusat asimetrik. Sudah dilaporkan sebelumnya bahwa diastereoisomer R dan S menghasilkan spektra NMR yang berbeda (Raban dan Misiow, 1967).

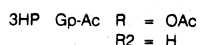
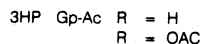
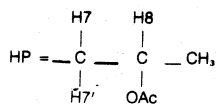
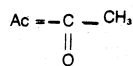
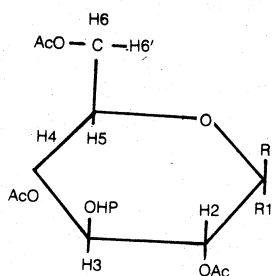
Tabel 2. ¹H-chemical shift dan coupling constant α -dan β -D-glukopiranosida penta-asetat, E-Ac dan 3-O-hidroksiopropil glukosa penta asetat

	α -Gp-Ac	β -Gp-Ac	E-Ac		3-O-HPG	
			a	b		
<i>Chemical shift (ppm)</i>						
Bagian glukosa						
H1	6,34	5,74	6,36	5,68	6,30	5,65
H2	5,08	5,17	*tdt.	3,50	5,00	5,51
H4	5,13	5,15		5,00		
H5	4,12	3,86		3,78		
H6	4,28	4,30		4,33		
H6	4,15	4,12		4,05		
Bagian propilin						
H8			4,9	4,9	4,9	4,9
CH ₃			1,2	1,2	1,2	1,2
<i>Coupling constant (Hz)</i>						
Bagian glukosa						
J1,2	4,0	8,0	4,0	8,0		8,0
J3,4	10,0	9,4	10,0	9,2		
J4,5	9,0	10,0		10,0		
J5,6	4,0	4,4		4,4		
J5,6	2,2	2,3		2,2		
J6,6	12,0	12,0		12,4		

* tdt. = tidak ditentukan

Spektrum 3-O-hidroksiopropil glukosa penta-asetat (Gambar 3) menunjukkan bahwa sinyal-sinyal H1, pada 6,30 ppm dan H1, α pada 5,65 ppm dengan celah 8,0 Hz. *Decoupling* sinyal H1, α merun-

tuhkan multiplet pada 5,0 ppm yang mana dipastikan sebagai sinyal H2, α . *Decoupling* sinyal H1, β menyebabkan runtuhnya multiplet pada 5,51 ppm yang mana pasti mencerminkan H2, β .



Irradiasi multiplet pada 1,2 ppm menyebabkan perubahan multiplet pada 4,90 ppm. Penghilangan gugus asetil pada C3 pada glukopiranosida pentaasetat oleh suatu gugus eter menyebabkan letaknya menggeser pada bidang yang lebih tinggi (nilai chemical shift lebih rendah) seperti yang diduga pada sinyal H3. Hal ini ditunjukkan oleh hilangnya sinyal-sinyal H3 pada 5,27 — 5,46 ppm dibandingkan terhadap sinyal-sinyal pada glukopiranosida pentaasetat (Gambar 3 dan Gambar 1). Sinyal-sinyal pada 1,2 ppm dan 4,90 ppm pasti timbul masing-masing dari absorpsi oleh gugus metil dan H8. Spektrum tersebut juga menunjukkan keberadaan sinyal-sinyal ganda yang disebabkan oleh adanya campuran diastereoisomer (RS).

Dengan membandingkan spektrum E-Ac dengan spektrum 3-O-hidroksi-propil-D-glukosa pentaasetat hasil sintesis, nampak bahwa E-Ac mengandung sedikit 3-O-hidroksi-propil-D-glukosa pentaasetat. Hal ini ditunjukkan oleh adanya multiplet kecil pada 6,30 ppm dan 5,65 ppm yang mana pasti sinyal-sinyal H1, α dan H1, β dari α dan β -3-O-hidroksi-propil-D-glukosa pentaasetat (3HP α Gp-Ac dan 3HP β Gp-Ac).

Hasil penentuan struktur F-Ac dan E-Ac cocok dengan yang dilaporkan oleh Leegwater *dkk.* (1973) sebelumnya yang melakukan analisis fraksi-fraksi hidrolisat pati hidroksi-propil perasetat sebagai 6-O- dan 2-O-[2-(RS)-hidroksi-propil]- α -D-glukopiranosida pentaasetat, keduanya mengandung *impurity* yang diduga bentuk β -anomer, yang mana ditunjukkan oleh adanya doublet pada 6,30 — 6,40 ppm dengan celah of 3,6 — 4,0 Hz.

Dibanding penentuan oleh Leegwater *dkk.* (1973), pada penentuan ini mampu menunjukkan keberadaan campuran anomer dan diastereoisomer 6-O- dan 2-O-hidroksi-propil-D-glukosa dengan jelas serta mampu menunjukkan keberadaan campuran anomer 3-O-hidroksi-propil-D-glukosa pada hidrolisat pati hidroksi-propil.

Melihat kejelasan spektra, kemungkinan analisis $^1\text{H-NMR}$ dapat dilakukan terhadap pati hidroksi-propil dalam bentuk perasetat untuk menentukan nilai MS dan pola substitusi.

IV. Kesimpulan

Komponen utama hasil hidrolisis pati hidroksi-propil dengan asam adalah cam-

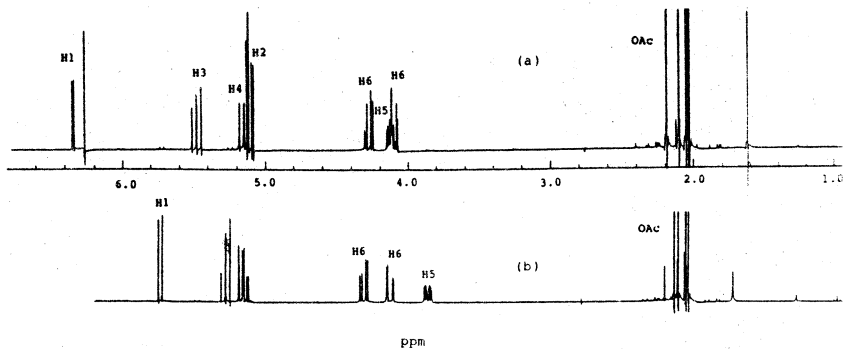
puran diastereoisomer (R,S) dan anomer (α,β) 6-O-(2-hidroksipropil)-D-glukopiranososa, campuran (R, S, α, β) 2-O-(2-hidroksipropil)-D-glukopiranososa dengan sedikit campuran 3-O-(2-hidroksipropil)-D-glukopiranososa berdasar analisis $^1\text{H-NMR}$ terhadap turunan asetatnya.

Ucapan Terima Kasih

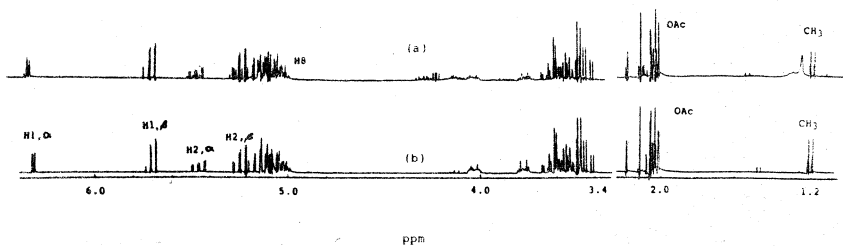
Kepada Prof. J.D. Steven dan Prof. M. Wootton the University of New South Wales, Australia, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas bimbingan dan dorongan selama melaksanakan penelitian ini.

Daftar Pustaka

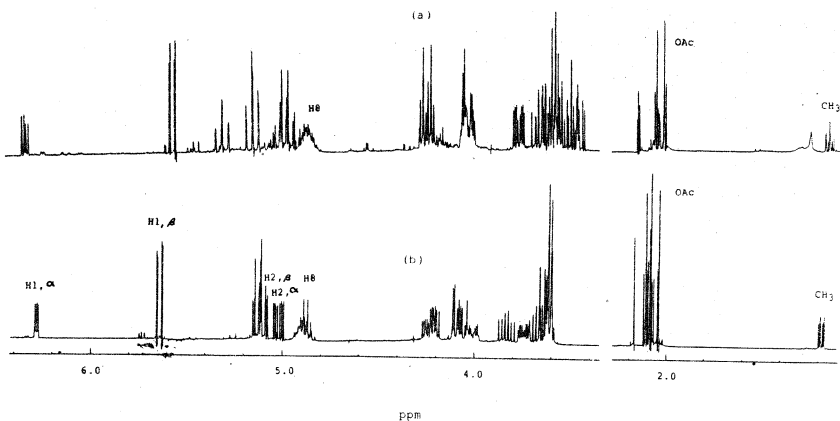
- Abraham, R.J., Hall, L.D., Hough, L. & McLauchlan, K.A. A proton resonance study of the conformations of carbohydrates in Solution. Part I. Derivatives of 1,2-O-Isopropylidene- α -D-xylo-hexofuranose. *J. Chem. Soc. [London]* 1962: 3699-705.
- Haryadi. Identifikasi hidrolisat asam dari pati hidroksipropil dengan HPLC. *Agritech* 8(3): 4—14; 1988.
- Johnson, D.P. Spectrophotometric determination of hydroxypropyl group in starch ethers. *Anal. Chem.* 41(6): 859-60; 1969.
- Leegwater, D.C., Marsman, J.W. & Mackor, A. Analysis of an acid hydrolysate of low substituted hydroxypropyl starch. *Starch* 25(4): 142-5; 1973.
- Raban, M. & Mislow, K. Modern methods for determination of optical purity. Allinger, N.L. & Eliel, E.L., eds. *Topics in stereochemistry*. Vol. 2. New York: Interscience; 1967: 199.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. & Morill, T.C. *Spectrometric identification of organic compounds*. New York: John Wiley and Sons; 1981.



Gambar 1. Spektra (a) α -D-glukopiranos a penta-asetat dan (b) β -D-glukopiranos a penta-asetat



Gambar 2. Spektra (a) turunan asetat dari Fraksi F dan (b) 6-O-hidroksi propil-D-glukosa penta-asetat dari hasil sintesis



Gambar 3. Spektra (a) turunan asetat dari fraksi E dan (b) 3-O-hidroksi propil-D-glukosa penta-asetat dari hasil sintesis