

128. Gas-chromatographische Untersuchungen an Uronsäuren und Uronsäurederivaten

von O. Raunhardt, H. W. H. Schmidt und H. Neukom

(22. II. 67)

Die Persilylierung der Kohlenhydrate mit Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorosilan in Pyridin stellt wegen des schnellen und quantitativen Umsatzes wohl die einfachste Methode zur Herstellung von genügend stabilen und genügend flüchtigen Derivaten zur gas-chromatographischen Analyse dieser Verbindungsklasse dar [1]. Während beim heterogenen Umsatz von kristallisierten reduzierenden Zuckern mit dem Reagenziengemisch im Gas-Chromatogramm nur je ein Pik für die im Kristall vorliegende Halbacetalform auftritt, erhält man aus Lösungen eines mutarotierenden Zuckers in der Regel mehrere Pike [2], was die Analyse eines Mehrkomponentengemisches erschwert oder sogar verunmöglicht. Bei den Aldosen lässt sich die Schwierigkeit durch Reduktion [1] [3] oder Oxydation [4] der Aldehydgruppe umgehen. Dieses Vorgehen kann aber wegen der Aufhebung der Unterschiede zwischen den beiden endständigen Gruppen (Reduktion von Aldosen zu den Zuckeralkoholen oder Oxydation von Alduronsäuren zu Glycarsäuren) mit einem Verlust an Information über die Ausgangsmischung verbunden sein. Darüber hinaus lassen sich Zuckeralkohole als Silylderivate nur unvollständig auftrennen [1]. Glycarsäuren sind unseres Wissens bisher noch nicht gas-chromatographisch untersucht worden. Für die Identifizierung der fünf natürlich vorkommenden Uronsäuren in Polysacchariden und die Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung von Uronsäuregemischen ist von PERRY & HULYALKAR [5] eine gas-chromatographische Methode ausgearbeitet worden. Sie besteht in der NaBH_4 -Reduktion der Ba-Salze der Uronsäuren zu den entsprechenden Onsäure-Salzen, die nach Ionenaustauscher- und Säurebehandlung in die γ -Lactone übergeführt werden. Diese werden als Tetra-O-trimethylsilylderivate analysiert. Wegen der geringen und unterschiedlichen Stabilität der Uronsäuren unter den Hydrolysebedingungen [6] sind jedoch der quantitativen Analyse von uronsäurehaltigen Polysacchariden vorläufig noch Grenzen gesetzt [5].

Mit dem Ziel des direkten Nachweises von Uronsäuren in Hydrolysaten von Polysacchariden (z. B. Pektine und Alginsäuren) haben wir das gas-chromatographische Verhalten einiger Uronsäuren und Uronsäurelactone, ihrer Neutralisations-, Reduktions- und Oxydationsprodukte sowie einiger Methylglycoside und Methylstermethylglycoside als persilylierte Derivate auf SE-52- und SE-30-Kolonnen untersucht. Die Retentionszeiten sind in dieser Arbeit auf *meso*-Erythrit ($R_E = 1,0$) als internen Standard bezogen, weil sein Trimethylsilylderivat in den Gas-Chromatogrammen einen auch von den Piken der entsprechenden Pentosederivate noch gut abgetrennten Pik ergibt.

Nach der Hydrolyse von uronsäurehaltigen Polysacchariden mit flüchtigen Säuren (HCl, Ameisensäure) sollten die Uronsäuren in den durch Eindampfen gewonnenen

Trockenrückständen frei oder als Lactone vorliegen. Nach Silylierung eines solcherart erhaltenen Mucopolysaccharid-Hydrolysates haben LEHTONEN *et al.* kürzlich D-Glucuron- und L-Iduronsäure als Lactone gas-chromatographisch nachweisen können [7]. Nicht nur freie Carboxyl-, sondern auch Carboxylatgruppen setzen sich mit Trimethylchlorsilan zu Trimethylsilylestern um [8]. In Polysaccharidhydrolysaten sollten die Uronsäuren also auch nach dem Neutralisieren, Eindampfen und Silylieren gas-chromatographisch analysierbar sein. In Tabelle I sind die Ergebnisse zusammengestellt, die für die Uronsäurekomponenten bei diesen beiden Hydrolysat-Aufbereitungsverfahren zu erwarten sind. Die ersten drei Kolonnen geben die Retentionswerte und die relativen Intensitäten der Pike wieder, die die einzelnen Urone und Uronsäuren nach dem Eindampfen einer wässrigen, während 15 Std. bei Zimmertemperatur geschüttelten bzw. mit Natronlauge neutralisierten Probe nach Zugabe der Silylierungsmischung (Pyridin:Hexamethyldisilazan:Trimethylchlorsilan = 10:2:1) ergeben haben. Daneben sind zum Vergleich die Werte aufgeführt, die bei der Silylierung der entsprechenden kristallinen Substanzen erhalten wurden und mit dem vorherrschenden Pik die im Kristall vorliegende Form angeben. Da die Silylierung der Substanzen mit freien Carboxyl- oder mit Carboxylatgruppen bei Zimmertemperatur eine längere Reaktionszeit benötigte, wurden die Proben über Nacht auf einer Schüttelmaschine geschüttelt.

Tabelle I. Gas-chromatographische Daten von trimethylsilylierten Hexuronsäuren, Hexuronolactonen und Hexuronaten

Ausgangs-Substanz	aus wässriger Lösung R _E -Werte ¹⁾ auf		relatives Verhältnis in %	aus Kristallen R _E -Werte ¹⁾	
	SE-52	SE-30		SE-52	relatives Verhältnis in %
D-Galakturonsäure	4,1/5,5/6,0/7,7	4,5/5,9/6,4/8,3	5/4/35/56	6,0/7,7	97/3
D-Galakturonat	4,1/5,5/6,0/7,7	4,5/5,9/6,4/8,3	2/1/31/66	6,0/7,7	98/2 ²⁾
D-Glucuronolacton	3,6	3,0/3,2	—	6,6/7,3 ³⁾	10/90
D-Glucuronat	4,9/6,3/7,8	5,3/6,8/9,2	1/43/56	7,8	100
D-Mannuronolacton	3,6/4,7	3,1/4,1	7/93	3,6/4,7	4/96
D-Mannuronat	4,1/6,1	4,4/6,7	59/41	4,1/6,1	19/81
L-Guluronolacton	2,4/3,2/(4,4)	2,2/2,8/(4,8)	33/37/(30)	—	—
L-Guluronat	4,4	4,8	100	—	—

¹⁾ R_E-Wert = Gesamtretentionszeit des Silylderivates/Gesamtretentionszeit von silyliertem meso-Erythrit (SE-52:3,05 Min./SE-30:2,75 Min.)

²⁾ Bestimmt an kristallinen Na-Ca- und Na-Sr-Salzen

³⁾ Gesamtretentionszeiten auf XE-60 in Min., N₂ = 31 ml/Min.; 180°

D-Galakturonsäure-Monohydrat kristallisiert als α -Pyranosid (R_E = 6,0 bzw. 6,4)¹⁾ [9]. Durch Umkristallisation aus absolutem Alkohol oder durch Trocknung bei 60° über P₂O₅ im Hochvakuum [10] konnte diese Verbindung in das β -Pyranosid (R_E-Wert = 7,7 bzw. 8,3) übergeführt werden. Die beiden anderen Pike mit den R_E-Wer-

¹⁾ R_E-Werte auf der SE-52- (erste Zahl) bzw. SE-30-Kolonne (zweite Zahl).

ten 4,1 (4,5) und 5,5 (5,9) gehören offenbar zu den β - bzw. α -Furanosidformen, denn die gleiche Reihenfolge wurde bei den Derivaten der vier isomeren Methyl-galakturonoside und der Methylestermethylglycoside (vgl. Tabelle IV) gefunden. Ein früher bei der Bestimmung des Gleichgewichtes der vier Galakturonsäureformen in Pyridinlösungen beobachteter weiterer Pik (R_E -Wert auf der SE-52-Kolonne 9,8; $\sim 1\%$) [11] trat hier nicht auf. Die Salze der Galakturonsäure (Na-Ca- bzw. Na-Sr-Galakturonat) liegen im Kristall ebenfalls in der α -Pyranosidform vor. Die beiden anomeren Formen von D-Glucuronofuranosid- γ -lacton lassen sich auf der SE-52-Kolonne nicht, auf der SE-30-Kolonne nur unvollständig trennen. Die Auftrennung gelingt mit einer XE-60-Kolonne, wobei die Form mit der grösseren Gesamtretentionszeit (7,3 Min.) die im Kristall vorliegende ist. Sofern die bei den Methylglycosiden erhaltenen Ergebnisse (vgl. Tabelle IV) auf die freie Form übertragbar sind, sollte es sich dabei um das β -Anomere handeln. Die Salze der Glucuronsäure kristallisieren als β -Pyranoside ($R_E = 7,8$ bzw. 9,2) [12]. Die daraus in wässriger Lösung entstehende Form mit R_E -Wert 6,3 (6,8) ist vermutlich das α -Anomere. Dem Mannuronolacton (Smp. 191–192°) wird heute eine Furanosid- γ -lacton-Struktur zugeschrieben [13]. Von den beiden nach dem Eindampfen aus wässriger Lösung erhaltenen anomeren Formen liegt im Kristall diejenige mit dem grösseren R_E -Wert vor. Unter Berücksichtigung der für die beiden Methylmannuronosid-lactone gefundenen Retentionswerte (vgl. Tabelle IV) und der beobachteten anfänglichen schnellen Mutarotation des Mannuronolactons zu positiveren Werten [14] sollte es sich bei den beiden Mannuronformen um die α - ($R_E = 3,6$ bzw. 3,1) bzw. β -Furanosid- γ -lactone ($R_E = 4,7$ bzw. 4,1) handeln. Natriummannuronat zeigt beim Lösen in Wasser eine schnelle Mutarotation von $-14,3^\circ \rightarrow -6,6^\circ$ [15]. Im Kristall liegt somit eine β -Form, vermutlich das β -Pyranosid ($R_E = 6,1$ bzw. 6,7) vor, die in wässriger Lösung teilweise zur α -Form ($R_E = 4,1$ bzw. 4,4) anomerisiert wird. Die L-Guluronsäureprobe lag in wässriger Lösung vor und befand sich im Gleichgewicht mit ihren anomeren Lactonformen, denen die R_E -Werte 2,4 (2,2) und 3,2 (2,8) zugeordnet werden können, da sie beim Neutralisieren zugunsten des einzigen Guluronatpiks verschwinden.

Aus den R_E -Werten der persilylierten Uronsäuren und - γ -lactone geht hervor, dass in Gemischen der drei Uronolactone mit Galakturonsäure nur Glucuron wegen der mit α -Mannuron zusammenfallenden Pike gas-chromatographisch nicht identifiziert werden kann. Die Glucuronsäure lässt sich jedoch nach der Neutralisierung im Gemisch der silylierten Natriumsalze anhand des Piks mit R_E -Wert 9,2 (SE-30-Kolonne) erkennen. Dem gegenüber lässt sich die Mannuronsäure im silylierten Uronatgemisch nicht bestimmen, wohl aber als Lacton. Neutralisierte Hydrolysate von Alginaten ergeben nach der Silylierung praktisch nur drei Pike, so dass die Identifizierung der L-Guluronsäure keine Schwierigkeiten bereitet. Bei der Auftrennung der Silylderivate mit Hilfe einer SE-30-Kolonne ist die Galakturonsäure im Gemisch mit den in Pektinstoffen vorkommenden Zuckern Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose und Galaktose [16] an ihren Pyranosid-Piken ($R_E = 6,4$ und 8,3) zu erkennen. In dem aus 15 Piken bestehenden Chromatogramm lässt sich wegen Überlagerung einzig die ohnehin nur in Spuren vorkommende Rhamnose nicht mit Sicherheit identifizieren.

Die Salze der Uronsäuren können mit NaBH_4 glatt zu den entsprechenden Onsäuresalzen reduziert werden [5]. Diese lassen sich mit der üblichen Silylierungsmethode [1] in die flüchtigen Silyläther-Silylester überführen und dann gas-chromatogra-

phisch analysieren. Die in Tabelle II zusammengestellten R_E -Werte zeigen, dass die Onensäuren auf den beiden verwendeten Kolonnen weder als silylierte γ -Lactone [5] noch als Silyläther-Silylester vollständig trennbar sind. Sofern nicht Galakturonsäure (bzw. Galakturonsäure) und Gluconsäure (bzw. Guluronsäure) nebeneinander bestimmt werden müssen, können die übrigen drei Hexonsäuren in Mischung mit einem der beiden erwähnten Isomeren als Silyläther-Silylester auf der SE-30-Kolonne identifiziert werden.

Oxydation der Aldehydgruppe der Uronsäuren führt zu Glycarsäuren. Auch sie lassen sich als freie Dicarbonsäuren sowie als Salze und Lactone nach der Standardmethode [1] silylieren und dann gas-chromatographisch auftrennen (vgl. Tabelle III).

Neben der Hydrolyse mit verdünnten Säuren ist beim Abbau von Polysacchariden auch die Methanolyse eingesetzt worden. Obwohl sich Polyuronsäuren nur schwer mit methanolischer Salzsäure spalten lassen, besitzt die Methode den Vorteil, dass die entstehenden Methylester-methylglycoside (bzw. Uronosid-lactone) erst bei Temperaturen von 165° merklich decarboxyliert werden [17].

Tabelle II. R_E -Werte¹⁾ von einigen trimethylsilylierten Hexonsäure- γ -lactonen und Hexonsäure-Salzen

Onsäure	γ -Lacton		Salze	
	SE-52	SE-30	SE-52	SE-30
Galaktonsäure	4,3	4,5	6,8	8,2
Gluconsäure	4,5 (4,4) ²⁾	4,6 (4,4) ²⁾	6,9	8,1
Idonsäure	4,9	5,2	7,4	8,6
Gulonsäure	5,0	5,0	6,1	6,9
Mannonsäure	6,3	6,5	6,1	7,2

¹⁾ Vgl. Tabelle I

²⁾ In Klammern die R_E -Werte für das δ -Lacton

Tabelle III. R_E -Werte¹⁾ von einigen trimethylsilylierten Glycar-Säuren, -Salzen und -Lactonen

	SE-52	SE-30
K-Glucarät	7,4	8,3
Glucarsäure	7,4	8,3
Glucarsäure-1,4;3,6-dilacton	2,8	2,2
Glucarsäure-1,4-lacton	5,5	5,6
Glucarsäure-3,6-lacton	6,1	6,3
K-Mannarat	6,2	6,5
Mannarsäure-1,4;3,6-dilacton	5,3	4,0
Galaktarsäure	8,4	9,5

¹⁾ Vgl. Tabelle I

Wir haben das gas-chromatographische Verhalten einiger Reaktionsprodukte von D-Galakturonsäure, D-Glucuronsäure und D-Mannuronsäure mit Methanol, die bei der Methanolyse von uronsäurehaltigen Polysacchariden entstehen können, als Silyl-

derivate untersucht (s. Tabelle IV). Die Zuordnung der Galakturonsäure-methylester-Pike wurde in Analogie zur Reihenfolge der entsprechenden Pike bei den Methylglycosiden bzw. Methylester-methylglycosiden vorgenommen. Galakturonsäure-methylester kristallisiert in der Form, der der Pik mit R_E -Wert 4,7 (4,8) entspricht.

Tabelle IV. R_E -Werte¹⁾ einiger trimethylsilylierter Reaktionsprodukte von D-Galakturon-, D-Glucuron- und D-Mannuronsäure mit Methanol

	SE-52				SE-30			
	α -F ²⁾	β -F	α -P	β -P ²⁾	α -F	β -F	α -P	β -P
<i>Galakturonsäure</i>								
Methylester	4,2	3,1	4,7	5,0	4,3	3,2	4,8	5,0
Methylglycoside	3,7	3,4	5,4	5,8	3,7	3,4	5,4	6,0
Methylester-methylglycoside ³⁾	3,1	2,6	4,1	4,3	3,0	2,5	3,9	4,0
<i>Glucuronsäure</i>								
Methylglycosid- γ -lactone	2,5	2,7	–	–	2,1	2,4	–	–
Methylglycoside	(4,1) ⁴⁾	(4,0)	5,9	(5,9)	(4,0)	(4,0)	6,1	(6,1)
Methylester-methylglycoside	(3,1)	(2,9)	4,9	(4,7)	(3,0)	(3,0)	4,8	(4,8)
<i>Mannuronsäure</i>								
Methylglycosid- γ -lactone	2,6	3,7	–	–	2,1	3,0	–	–
Methylglycoside	4,7	–	3,7	4,2	4,9	–	3,7	4,2
Methylester-methylglycoside	2,9	(3,5)	2,7	3,2	3,0	(3,5)	2,6	3,0

1) Vgl. Tabelle I

2) F = Furanosid; P = Pyranosid

3) Retentionszeiten auf einer XE-60-Kolonnen ($N_2 = 28$ ml/Min.; 170° Ofentemperatur) in Min.; α -F 3,9; β -F 3,2; α -P 6,8; β -P 8,6.

4) Die R_E -Werte in Klammern wurden aus den Resultaten der Tabelle V bzw. nach Verseifung der entsprechenden Methylester-methylglycoside ermittelt.

Tabelle V. Gleichgewichtsverteilung der Methylester-methylglycoside und Methylglycosid- γ -lactone einiger Uronsäuren nach Behandlung mit 2proz. methanolischer Salzsäure unter Rückfluss

		SE-52				SE-30			
		R_E ¹⁾							
Galakturonsäure	R_E ¹⁾	2,6	3,1	4,1	4,3	2,5	3,0	3,9	4,0
	%	36	11	36	1,7	36	11	36	17 _i
Glucuronsäure	R_E	2,5	2,7	2,9	3,1	4,7	4,9	2,1	2,4
	%	3	32		(15)	65	(50)	3	19
Mannuronsäure	R_E	2,6	2,7	2,9	3,2	3,5	3,7	2,1	2,6
	%		84	(6)	4	(6)	12	(6)	5
Guluronsäure	R_E	1,8	2,6	2,9		1,5	2,1	2,7	3,0
	%	17	10	73		16	9	67	7

1) Vgl. Tabelle I

Um abzuklären, wieviele Glycosidformen bei der Methanolyse von Polyuronsäuren zu erwarten sind, haben wir D-Glucuronolacton, D-Mannuronolacton und L-Guluron-säure (bzw. L-Guluronolacton) mit 2proz. methanolischer Salzsäure bis zur Einstellung des Gleichgewichts (zwischen 15 und 21 Std.) unter Rückfluss gekocht. Die Gleichgewichtsverteilung der Galakturonoside war bereits früher ermittelt worden [11]. Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengefasst. Während das Glycosidgemisch der Galakturonsäure aus den beiden Paaren der anomeren Furanosid- und Pyranosid-methylester besteht, kommen bei den lactonbildenden Uronsäuren die α - und β -Methyluronofuranosid- γ -lactone hinzu, so dass in den Chromatogrammen der Silyl-derivate bis zu sechs Pike zu einer einzigen Uronsäure gehören können. Eine Identifizierung oder gar quantitative Bestimmung der Uronsäuren in Polyuronsäuren an Hand ihrer Methanolyseprodukte erscheint daher auf den ersten Blick unmöglich [5]. Das trifft für die Auftrennung mit Hilfe der SE-30-Kolonne tatsächlich zu. Dagegen gibt die Mehrzahl der silylierten Glycosidformen der vier untersuchten Uronsäuren bei der Trennung auf einer SE-52-Kolonne zwar einen unaufgelösten Pikhaufen im R_E -Bereich von 2,5 bis 3,2, daneben aber sauber getrennte Pike, die sich nur auf eine der Uronsäuren beziehen. So gehört der Pik mit R_E -Wert 1,8 zum Derivat der Guluronsäure, der Doppelpik mit den R_E -Werten 3,5 und 3,7 zur Mannuronsäure, der Doppelpik mit den R_E -Werten 4,1 und 4,3 zur Galakturonsäure und der Doppelpik mit den R_E -Werten 4,7 und 4,9 zur Glucuronsäure. Mit Hilfe dieser Leitpike sollte nicht nur eine Identifizierung, sondern auch eine quantitative Bestimmung der einzelnen Uronsäuren möglich sein, sofern ermittelt wurde, wieviele Prozent der betreffenden Uronsäure der Leitpike unter standardisierten Methanolysebedingungen darstellt. Es sind Versuche im Gang, um die Anwendbarkeit dieses Verfahrens bei Polyuronsäuren zu prüfen.

Experimentelles. – *Materialien:* Meso-Erythrit, D-Mannose, D-Glucose, α -Methyl-D-glucopyranosid, D-Gluconsäure- δ -lacton, L-Gulonsäure- γ -lacton, Ca-L-Idonat, D-Galaktarsäure, Trimethylchlorasilan (*puriss.*) und Hexamethyldisilazan (*purum*) waren Produkte der Firma FLUKA AG (Buchs, Schweiz). D-Glucuronolacton und D-Galaktonsäure- γ -lacton waren Präparate der HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG (Basel, Schweiz). D-Galakturonsäure und Na-Ca-D-Galakturonat wurden uns von der MOSTEREI MÄRWIL (Märwil, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Wässrige Lösungen von L-Guluronsäure erhielten wir von Herrn Dr. A. HAUG, Institute of Seaweed Research (Trondheim, Norwegen). D-Mannuronolacton wurde aus Alginsäure nach [18], das Na-D-Mannuronat aus dem Lacton nach [15] hergestellt. Na-D-Glucuronat wurde nach [19] aus dem Lacton gewonnen. Die γ -Lactone der übrigen Uronsäuren wurden im Falle der D-Mannonsäure aus Mannuron, im Falle der D-Gluconsäure aus dem δ -Lacton über das Natriumsalz und im Falle der L-Idonsäure aus dem Ca-Salz nach dem Verfahren von PERRY & HULYALKAR [5] bereit. Die Onsäuresalze wurden aus den entsprechenden Lactonen durch Einwirkung von Natronlauge erhalten (s. unten). Proben der freien Glucarsäure, ihrer Lactone und von Mannarsäure-dilacton wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Y. HIRASAKA (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO. LTD., Tokyo) zur Verfügung gestellt. Kaliumhydrogenglucarate wurde nach [20] und K-Mannarate nach [21] aus den entsprechenden Hexosen durch Oxydation mit HNO_3 hergestellt. D-Galakturonsäure-methylester erhielten wir durch den Umsatz von D-Galakturonsäure mit Diazomethan nach [22]. Die Methylglycoside der Galakturonsäure wurden durch Verseifung der entsprechenden Ester [23] gewonnen (s. unten). Die α - und β -Methyl-D-glucuronofuranosid- γ -lactone wurden nach [24] dargestellt. Durch katalytische Oxydation von α -Methyl-D-glucopyranosid nach [25] synthetisierten wir das α -Methyl-D-glucuronopyranosid und daraus den entsprechenden Methylester nach Ionentaucherbehandlung durch anschließenden Umsatz mit Diazomethan. Die α - und β -Methyl-D-mannuronofuranosid- γ -lactone und der α -Methyl-D-mannuronopyranosid-methylester wurden aus den Gemischen der Glycoside isoliert, die nach Umsatz von Mannuronolacton mit Methanol und sauren

Katalysatoren erhalten worden waren [26]. Proben der Kaliumsalze von α -Methyl-D-mannuronofuranosid und den α - und β -Methyl-D-mannuronopyranosiden verdanken wir Herrn Dr. J.H. SLONEKER (NORTHERN RESEARCH LABORATORY, Peoria, Ill., USA). Der α -Methyl-D-mannuronofuranosid-methylester und der β -Methyl-D-mannuronopyranosid-methylester wurden aus den entsprechenden Kaliumsalzen (ca. 2 mg) durch Behandlung mit 2proz. methanolischer Salzsäure (0,5 ml) bei Zimmertemperatur während 15 Min. und durch Eindampfen der mit Pyridin (1 ml) versetzten Proben im Hochvakuum hergestellt. In den Gas-Chromatogrammen der unmittelbar anschliessend silylierten Proben trat beim β -Pyranosid praktisch nur 1 Pik mit R_E -Wert 3,2 (3,0) auf, während beim α -Furanosid zwei vorherrschende Pike mit den R_E -Werten 2,6 (2,1) und 2,9 (3,0) gefunden wurden, von denen der Pik mit der grösseren Retentionszeit dem α -Furanosidester zugeordnet wurde.

Neutralisationen und Verseifungen: 1proz. wässrige Lösungen der Zuckercarbonsäuren bzw. der entsprechenden Lactone wurden 15 Std. bei Zimmertemperatur geschüttelt. Dann wurde unter ständigem Rühren (Magnetrührer) tropfenweise etwas weniger als die äquivalente Menge 0,01 N Natronlauge zugesetzt, wobei das pH unter 8 (pH-Meter) gehalten wurde. Es wurde eine Stunde geschüttelt, der pH-Wert mit 0,01 N Natronlauge auf 7 gebracht, wieder eine Stunde geschüttelt und der Vorgang solange wiederholt, bis der pH-Wert konstant blieb.

Die Methylglycosid-methylester bzw. -lactone (10 mg) wurden mit 1 N Ammoniak (2 ml) 2 Std. auf 60–65° (Badtemperatur) erwärmt, dann unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft und vor dem Silylieren 1 Std. bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet.

Umsätze mit methanolischer Salzsäure: Die während 15 Std. bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrockneten Uronsäuren bzw. Uronsäurelactone (10–20 mg) wurden mit 2proz. methanolischer Salzsäure (3–5 ml) im Glycerinbad unter Rückfluss gekocht. Nach 15, 21 und 39 Std. wurden mit einer Injektionsspritze Proben (1 ml) entnommen, mit Ag_2CO_3 versetzt und unter vermindertem Druck eingedampft. Die Proben wurden mit absolutem Methanol (1–2 ml) extrahiert, die Extrakte unter Zusatz von einigen Tropfen Pyridin unter vermindertem Druck zur Trockne gebracht und mit der Silylierungsmischung (s. S. 1268) versetzt.

Gas-Chromatographie: Die Gas-Chromatogramme wurden mit einem PERKIN-ELMER-Fraktometer Typ F 7 aufgenommen. Trägergas: N_2 ; 29–32 ml/Min. Flammenionisationsdetektor. Die Silikongummi-Kolonnen waren konfektionierte Säulen von 2 m Länge und 3 mm Innendurchmesser.

SE-52: PERKIN-ELMER Typ 42 S 5,57; 2,5 Gew.-%. Silikongummi SE-52 auf Chromosorb G, AW-DMCS, 80–100 mesh. Ofentemperatur: 190°.

SE-30: PERKIN-ELMER Typ 42 S 20,58; 1 Gew.-%. Silikongummi SE-30 auf Chromosorb G, AW-DMCS, 80–100 mesh. Ofentemperatur: 170°.

Die XE-60-Kolonne hatte die gleichen Dimensionen und war mit 2,5 Gew.-% XE-60 Nitril-Silikon-Polymer auf Anakrom ABS (90–100 mesh) gefüllt.

Vor dem Chromatographieren wurde den Proben *meso*-Erythrit (ca. 2 mg) als interner Standard zugesetzt. Damit liess sich gleichzeitig feststellen, ob die Probe noch Silylierungsgemisch im Überschuss enthielt.

ZUSAMMENFASSUNG

Das gas-chromatographische Verhalten der Per-trimethylsilyl-Derivate einiger natürlich vorkommender Uronsäuren bzw. Uronolactone, ihrer Salze, ihrer Reduktions-(Onsäuresalze und γ -lactone) und Oxydationsprodukte (Glycarsäuren bzw. ihre Salze und Lactone) sowie ihrer Reaktionsprodukte mit Methanol wurde auf den Silikongummi-Kolonnen SE-52 und SE-30 untersucht. Die beim Kochen von D-Mannuron, D-Glucuron und L-Guluronsäure mit 2proz. methanolischer Salzsäure entstehenden Glycosidgemische wurden nach der Silylierung gas-chromatographisch analysiert und die prozentuale Verteilung der auftretenden Pike nach Erreichen des

Gleichgewichtes bestimmt. Anhand der gefundenen, auf *meso*-Erythrit als internen Standard bezogenen Retentionszeiten wird die Trennbarkeit der Uronsäuren diskutiert.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. C. SWEeley, R. BENTLEY, M. MAKITA & W. W. WELLS, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).
 - [2] M. D. G. OATES & J. SCHRAGER, *Biochem. J.* **97**, 697 (1965).
 - [3] J. S. SAWARDEKER, J. H. SLONEKER & A. JEANES, *Analyt. Chemistry* **37**, 1602 (1965).
 - [4] J. M. MORRISON & M. B. PERRY, *Canad. J. Biochemistry* **44**, 1115 (1966).
 - [5] M. B. PERRY & R. K. HULYALKAR, *Canad. J. Biochemistry* **43**, 573 (1965).
 - [6] E. STUTZ & H. DEUEL, *Helv.* **41**, 1722 (1958).
 - [7] A. A. LEHTONEN, J. E. KAERKKAINEN & E. O. HAAHTI, *J. Chromatogr.* **24**, 179 (1966); *Analyt. Chemistry* **38**, 1316 (1966); *Analyt. Biochemistry* **16**, 526 (1966).
 - [8] F. A. HENGLEIN & B. KOESTERS, *Chem. Ber.* **92**, 1638 (1959).
 - [9] H. S. ISBELL & H. L. FRUSH, *J. Res. Nat. Bur. Standards* **37**, 33 (1943).
 - [10] F. EHRLICH & F. SCHUBERT, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **62**, 1974 (1929).
 - [11] H. W. H. SCHMIDT & H. NEUKOM, *Helv.* **49**, 510 (1966).
 - [12] G. E. GURR, *Acta cryst.* **16**, 690 (1963).
 - [13] C. A. MARSH, in G. DUTTON, «Glucuronic Acid», S. 20, 23, Academic Press, New York, London 1966.
 - [14] H. S. ISBELL & H. L. FRUSH, *J. Res. Nat. Bur. Standards* **37**, 43 (1946).
 - [15] H. S. ISBELL & H. L. FRUSH, *J. Res. Nat. Bur. Standards* **37**, 321 (1946).
 - [16] M. A. JERMYN & F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.* **64**, 123 (1956).
 - [17] O. SCHIER & E. WALDMANN, *Mh. Chem.* **88**, 847 (1957).
 - [18] F. G. FISCHER & H. DOERFEL, *Z. physiol. Chem.* **302**, 186 (1955).
 - [19] W. HACH & D. G. BENJAMIN, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 917 (1954).
 - [20] W. N. HAWORTH & W. G. M. JONES, *J. chem. Soc.* **1944**, 65.
 - [21] W. N. HAWORTH, W. G. M. JONES, M. STACEY & L. F. WIGGINS, *J. chem. Soc.* **1944**, 61.
 - [22] S. MORELL & K. P. LINK, *J. biol. Chemistry* **108**, 763 (1935).
 - [23] H. W. H. SCHMIDT & H. NEUKOM, *Helv.* **47**, 865 (1964).
 - [24] J. E. CADOTTE, F. SMITH & D. SPRIESTERSBACH, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 1501 (1952).
 - [25] C. A. MARSH, *J. chem. Soc.* **1952**, 1578.
 - [26] H. W. H. SCHMIDT, *Tetrahedron Letters* **1967**, 235.
-