

- [19] M. T. KRAUSS, HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *J. Chromatogr.* **3**, 63 (1960).
 [20] H. KAUFMANN, *Helv.* **48**, 769 (1965).
 [21] S. M. PARTRIDGE, *Nature* **164**, 443 (1949).
 [22] A. P. MACLENNAN, H. M. RANDALL & D. W. SMITH, *Analyt. Chemistry* **31**, 2020 (1959).
 [23] S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).
 [24] R. MOZINGO, D. E. WOLF, S. A. HARRIS & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **65**, 1013 (1943).
 [25] a) G. BERTRAND, *Compt. rend. Acad. Sci.* **126**, 762 (1898); b) B. ISELIN, *J. biol. Chemistry* **175**, 996 (1948); c) B. MAGASANIK & E. CHARGAFF, *ibid.* **174**, 173 (1948); d) G. N. BOLLENBACK & L. A. UNDERKOFER, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 741 (1950).
 [26] P. J. BEYNON, P. M. COLLINS & W. G. OVEREND, *Proc. chem. Soc.* **1964**, 342.
 [27] K. ONODERA, S. HIRANO & N. KASHIMORA, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 4651 (1965); W. SOWA & G. H. S. THOMAS, *Canad. J. Chemistry* **44**, 836 (1966).
 [28] TOLLENS-ELSNER, *Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate*, 4. Aufl., S. 92, J. A. Barth, Leipzig 1935.
 [29] *Org. Synth.*, Coll. Vol. **3**, 176 (1955), Wiley, New York.
 [30] D. WALDI in E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, S. 496, Springer-Verlag 1962.
 [31] G. ZEMPLÉN & A. KUNZ, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **56**, 1705 (1923); G. ZEMPLÉN & E. PACSU *ibid.* **62**, 1613 (1929).

240. Differenzierung sämtlicher raumisomerer 6-Desoxyhexosen, 3-O-Methyl-6-desoxyhexosen und 6-Desoxyhexulosen

Desoxyzucker, 42. Mitt. [1]

von Heinz Kaufmann, P. Mühlradt und T. Reichstein

(6. X. 67)

1. *Einleitung.* 6-Desoxyhexosen und ihre 3-O-Methyl-derivate sind in der Natur weit verbreitet. In den höheren Pflanzen finden sich solche Zucker vor allem in Cardenolidglykosiden [2] [3] [4], sowie in Glykosiden, die sich von Pregnanderivaten ableiten [2b] [5]; sie werden aber auch in Mikroorganismen angetroffen [6].

Aus diesen Naturprodukten können die Zucker durch hydrolytische Spaltung oft nur in sehr geringen Mengen erhalten werden. Für die Identifizierung kommt in solchen Fällen die präparative Isolierung meistens nicht in Frage, man ist dann auf chromatographische Vergleiche angewiesen. Um geeignete Systeme aufzusuchen, die es gestatten, alle solchen Zucker eindeutig zu identifizieren¹⁾, ist es nötig, sämtliche theoretisch mögliche Isomeren zur Verfügung zu haben.

Von den acht theoretisch möglichen Paaren von 6-Desoxyhexosen ist schon längere Zeit jeweils wenigstens ein Vertreter bekannt [2] [3] [4] (vgl. die Formeln 1–8). Mit Ausnahme der 6-Desoxyidose, von der nur die synthetisch bereitete L-Form [7] bekannt ist²⁾, sind alle anderen Konfigurationen auch in der Natur gefunden worden [3].

Von den 3-O-Methyl-6-desoxyhexosen (vgl. die Formeln 9–16) sind die D-Form mit Allo-Konfiguration (9) sowie die L-Formen mit L-Altro- (10), Gluco- (beide Antipoden) (11), Manno- (13), Galakto- (beide Antipoden) (14) und Talo-Konfiguration

¹⁾ Vorläufig kann mit den üblichen chromatographischen Methoden allein zwischen Antipoden nicht unterschieden werden.

(16) bereits aus Naturprodukten isoliert [3] [9] [10], und die meisten auch synthetisiert worden [3]. Über die Synthese der 3-O-Methyl-6-desoxy-D-idose (15) wurde schon früher [11], über diejenige der noch fehlenden 3-O-Methyl-6-desoxy-D-gulose (12) [12] und 3-O-Methyl-6-desoxy-D-allose (9) [13] kürzlich berichtet. Damit stand für die geplanten Untersuchungen ebenfalls je ein Vertreter aller acht theoretisch möglichen Isomerenpaare zur Verfügung.

Zur Vervollständigung der Resultate schien es uns ferner nötig, auch die 6-Desoxyhexulosen (vgl. die Formeln 17–20) mit in die Untersuchung einzubeziehen. Dies war auf Grund der erwähnten Angaben von WOLFROM und HANESSIAN [8]²⁾ besonders erwünscht, um bei den Aldosen 1–8 sicher zu sein, dass wir wirklich die Zucker mit der angegebenen Struktur und nicht die isomeren Hexulosen 17–20 in Händen hatten. Von den vier theoretisch möglichen Isomerenpaaren der 6-Desoxyhexulosen war bei drei Paaren jeweils wenigstens ein Vertreter (18, 19 und 20) bekannt. Über die Synthese der noch fehlenden 6-Desoxy-L-psicose (L-Ribo-Konfiguration) (17) wird in vorstehender Mitteilung berichtet [1], so dass auch hier von sämtlichen Isomerenpaaren ein Vertreter zur Verfügung stand.

2. *Verwendetes Material.* Über die verwendeten Präparate orientiert Tabelle 1 (vgl. auch Formelschema). Bei den kristallisierten Zuckern konnten die teilweise recht alten Originalpräparate benützt werden; sie erwiesen sich in fast allen Fällen nach Papierchromatogramm (PC), Dünnschichtchromatogramm (DC) und Papierelektrophorese (PE) als einheitlich. Amorphe Zucker sind in der Regel nicht haltbar; wir haben das Material in solchen Fällen soweit als möglich frisch aus einem geeigneten kristallisierten Derivat bereitet.

Tabelle 1. *Die verwendeten Präparate*

6-Desoxy-D-allose (1), Smp. 140–143°, synthetisch [14]
6-Desoxy-D-altrose (2), amorph, synthetisch, frisch aus dem krist. <i>p</i> -Bromphenylhydrazon bereitet [15]
6-Desoxy-D-glucose (3) (= D-Chinovose), Smp. 139–140°, synthetisch [16]
6-Desoxy-D-gulose (4) (= D-Antiarose), Smp. 130°, synthetisch [17]
6-Desoxy-L-mannose (5) (= L-Rhamnose), Smp. 74–78° (Hydrat), Naturprodukt
6-Desoxy-L-galaktose (6) (= L-Fucose), Smp. 140–145°, Naturprodukt
6-Desoxy-L-idose (7), Smp. 107–108°, synthetisch [7] [1]
6-Desoxy-L-talose (8), Smp. 116–118°, synthetisch [18]
3-O-Methyl-6-desoxy-D-allose (9), Smp. 119–121°, synthetisch [13]
3-O-Methyl-6-desoxy-L-altrose (10) (= L-Vallarose), Smp. 106–110°, Naturprodukt [10]
3-O-Methyl-6-desoxy-L-glucose (11) (= L-Thevetose), Smp. 126,5–129°, Naturprodukt [19]
3-O-Methyl-6-desoxy-D-gulose (12), amorph, synthetisch [12], frisch aus dem reinen β -Methylglykosid bereitet
3-O-Methyl-6-desoxy-L-mannose (13) (= L-Acofriose), Smp. 111–114°, Naturprodukt [20]
3-O-Methyl-6-desoxy-D-galaktose (14) (= D-Digitalose), Smp. 115°, Naturprodukt [21]

²⁾ WOLFROM und HANESSIAN [8] erwähnten kürzlich, dass sie den freien Zucker durch milde saure Hydrolyse von 1,2-Mono-O-isopropyliden-6-desoxy-L-idose nicht erhalten konnten; unter den genannten Bedingungen sollen mehrere Stoffe, vorwiegend aber 6-Desoxy-L-sorbose (20) entstanden sein. Falls dies zutrifft, wäre die Struktur der von MEYER und REICHSTEIN [7] als L-Idomethylose (= 6-Desoxy-L-idose) bezeichneten Kristalle fraglich geworden. Eine kürzlich erfolgte Kontrolle [1] zeigte aber, dass diese Kristalle einheitlich und von 6-Desoxy-L-sorbose eindeutig verschieden waren.

3-O-Methyl-6-desoxy-D-idose (**15**), amorph, synthetisch [11], frisch aus dem kristallinen β -Methylglykosid bereitet⁴⁾

3-O-Methyl-6-desoxy-L-talose (**16**) (= L-Acovenose), amorph, Naturprodukt [22a]⁶⁾

6-Desoxy-L-psicose (**17**) (= L-Ribo-6-desoxyhexulose), amorph, synthetisch [1]

6-Desoxy-D-fructose (**18**) (= D-Arabino-6-desoxyhexulose), amorph, synthetisch [23], frisch aus dem kristallinen 2,3-O-Isopropylidenderivat bereitet

6-Desoxy-L-tagatose (**19**) (= L-Lyx-6-desoxyhexulose), amorph⁶⁾, synthetisch [24], frisch aus dem kristallinen O-Nitrophenylhydrazon bereitet

6-Desoxy-L-sorbose (**20**) (= L-Xylo-6-desoxyhexulose), Smp. 86–88°, synthetisch [25]

3. *Methodik*. Ein einziges System, das es gestatten würde, alle 20 oben genannten Zucker in einem PC, DC oder PE eindeutig voneinander zu unterscheiden, liess sich bisher nicht auffinden. Im folgenden beschreiben wir aber eine Kombination von vier einfachen Manipulationen, die es gestattet, dieses Ziel sicher zu erreichen. Es handelt sich um eine Farbreaktion in Verbindung mit DC, PC und PE in je einem System.

4. *Farbreaktion mit Vanillin-Perchlorsäure* [26]. Dieses Reagens gibt mit 6-Desoxyhexulosen intensiv violett gefärbte Flecke⁷⁾. Die 6-Desoxy-aldohexosen und ihre 3-O-Methyl-derivate geben fast alle nur schwach braunrosa gefärbte Flecke, einzig die Vertreter mit Ido-Konfiguration zeigen Flecke von einer ähnlichen Farbe wie sie die 6-Desoxyhexulosen liefern; die Intensität ist jedoch bedeutend geringer. Diese Farbreaktion kann daher dazu dienen, die 6-Desoxyhexulosen von den Aldo-hexose-Derivaten zu unterscheiden.

5. *Dünnschichtchromatographie* [27]. Zur vollständigen Differenzierung der Isomeren einer Zuckerreihe ist die Dünnschichtchromatographie zu wenig leistungsfähig. Immerhin gestattet sie eine grobe Unterteilung, indem alle 3-O-Methyl-6-desoxyhexosen mit Ausnahme der Acovenose (**16**) gleich rasch oder rascher laufen als Rhamnose (**5**), die meisten 6-Desoxyhexosen jedoch gleich rasch oder langsamer (Ausnahmen: 6-Desoxyidose (**7**) und 6-Desoxyaltrose (**2**), vgl. auch Tab. 2). Besonders geeignet ist die Dünnschichtchromatographie jedoch zur Unterscheidung von Thevetose (**11**), 3-O-Methyl-6-desoxyallose (**9**) und 3-O-Methyl-6-desoxygulose (**12**). Diese drei Zucker sind im PC im verwendeten System⁸⁾ nicht voneinander zu unterscheiden, die zwei

4) Im Unterschied zu 6-Desoxy-L-idose (**7**) ist dieser Zucker bisher nicht in Kristallen isoliert worden. Zu seiner Freisetzung aus dem krist. Methylglykosid sind zudem vielen ergischere Bedingungen nötig als zur Freisetzung von **7** aus seiner Aceton-Verbindung. Es ist daher nicht völlig sicher, dass der Zucker die angegebene Struktur **15** besitzt. Der entsprechende Keto-zucker (die 3-O-Methyl-6-desoxy-D-sorbose) ist auch nicht bekannt und konnte daher zum Vergleich nicht herangezogen werden. Die Farbreaktionen sprechen allerdings dafür, dass es sich bei dem als 3-O-Methyl-6-desoxy-D-Idose bezeichneten Zucker tatsächlich um eine 6-Desoxy-aldohexose handelt.

5) Hier wurde das alte Präparat verwendet, es zeigte in sämtlichen Chromatogrammen nur *einen* Fleck.

6) Der Zucker ist früher in Kristallen erhalten worden. Das Originalpräparat ging leider verloren und es gelang nicht mehr, neue Präparate zu kristallisieren.

7) Das Reagens wird normalerweise zum Nachweis von 2-Desoxyzuckern verwendet [26], es gibt mit diesen blauviolette Flecke.

8) Im System Toluol-Butanon-(1:4)/W (ca. 30 Std.) lassen sich auch diese drei Zucker im PC voneinander unterscheiden. Auf Thevetose (Laufstrecke ca. 13 cm) bezogen, zeigen die zwei anderen folgende relative Laufstrecken: **9**, $R_{\text{Thev}} = 1,28$; **12**, $R_{\text{Thev}} = 0,80$. Wir danken Herrn Dr. Ek. WEISS für diese Angaben.

erstgenannten zeigen auch bei der Elektrophorese gleiche Laufstrecken (vgl. Tab. 2). Gleiches gilt für die zwei Ketosen 6-Desoxysorbose (**20**) und 6-Desoxypsicose (**17**).

Wir arbeiten nach der Methode von GAMP *et al.* [28] auf Linienglas unter genau festgelegten Bedingungen⁹⁾. Die Reproduzierbarkeit ist hier weniger gut als bei den anderen Methoden (vgl. Abschnitt 8). Der Grund dafür dürfte sein, dass es sehr schwierig ist, immer wieder Dünnschichtplatten genau gleicher Qualität herzustellen. Innerhalb einer Charge Platten ist die Reproduzierbarkeit jedoch ausgesprochen gut. Fig. 1 zeigt ein Beispiel eines DC. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

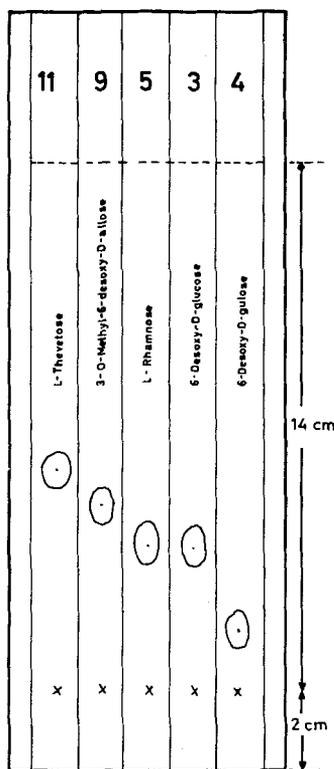


Fig. 1. Essigester-Isopropanol-Methanol-
(70:15:15), 55 Min.

*Beispiel für die Dünnschichtchromatographie,
schematisiert aber massgetreu*

Ausführung aufsteigend auf Linienglas nach früheren Angaben [28]. Sichtbar gemacht durch Besprühen mit einer 20-proz. Lösung von *p*-Toluolsulfonsäure in Alkohol und anschließendes Erhitzen auf 120°.

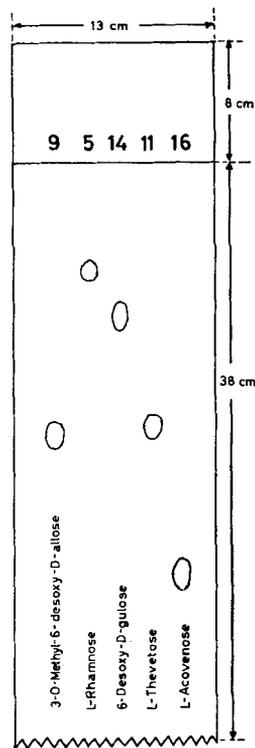


Fig. 2. Toluol-*n*-Butanol-(1:2)/Wasser 24
Std. (Front abgetropft)

*Beispiel für die Papierchromatographie, sche-
matisiert aber massgetreu*

Ausführung auf WHATMAN-Nr. 1-Papier absteigend nach früheren Angaben [5] [29], entwickelt mit PARTRIDGE-Reagens [30]. Um eine gerade Front zu erreichen muss das Abtropfen des Lösungsmittels an einer Ecke des Papiers vermieden werden. Dies wird am einfachsten durch Abschneiden des unteren Papierrands mit einer Zackenschere erreicht.

⁹⁾ Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

6. *Papierchromatographie* [29]. Für die meisten 6-Desoxyhexosen und ihre 3-O-Methyl-derivate haben bereits KRAUSS *et al.* [5] brauchbare Fließmittel angegeben. Da jedoch damals noch nicht alle Isomeren zur Verfügung standen und sich zudem seither verschiedene Unstimmigkeiten bei den Zahlenwerten ergeben haben, schien uns eine erneute Kontrolle nützlich. Wir verwendeten wieder die absteigende Methode, jedoch mit wassergesättigtem Toluol-Butanol-(1:2)-Gemisch als Fließmittel auf WHATMAN-Nr. 1-Papier, das mit 35% seines Trockengewichts Wasser beladen war. Fig. 2 zeigt ein Beispiel eines Papierchromatogramms.

Die Reproduzierbarkeit war bei dieser Methode ausgezeichnet. Entscheidend für gute Resultate sind: konstante Temperatur im Chromatographieraum, gute Kammer-sättigung, genaue Kontrolle des Wassergehalts der Papiere beim Einhängen in den Trog und das Auftragen von immer gleichen Mengen der durchwegs 1-proz. Zuckerlösungen⁹⁾. Zur Entwicklung der Papierchromatogramme wurde zunächst Anilin-Hydrogenphthalat nach PARTRIDGE [30] verwendet, später das ebenfalls auf reduzierende Zucker spezifische Reagens *p*-Aminohippursäure-Phtalsäure nach SCHEFFER und KIKUTH [31]. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Um die Sicherheit der Methode zu erhöhen, haben wir für alle Berechnungen von relativen Laufstrecken zwei Bezugssubstanzen, nämlich L-Rhamnose (**5**) und L-Thevetose (**11**), verwendet. Das jedesmal bestimmte Verhältnis der Laufstrecken dieser beiden Bezugssubstanzen diente gleichzeitig als Kontrolle für die Qualität des betreffenden Versuchs.

7. *Papiererelektrophorese* [32]. Da die Auftrennung der Zucker hier auf Grund von ganz anderen Eigenschaften erfolgt als bei der Papier- und Dünnschicht-Chromatographie, hat sich die Papiererelektrophorese als ergänzende Methode sehr gut bewährt. Von grossem Vorteil sind auch die ziemlich kurzen Laufzeiten und der relativ geringe Arbeitsaufwand. Wir verwendeten einen Apparat, der im wesentlichen nach der von FOSTER [32b] beschriebenen «enclosed-strip»-Methode arbeitet⁹⁾. Fig. 4 zeigt eine Ansicht der Apparatur, Fig. 5 ein schematisiertes Schnittbild.

Die Methode hat sich als sehr leistungsfähig erwiesen. Die Reproduzierbarkeit ist sehr gut, hängt aber stark von der peinlich genauen Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen ab. Folgende Punkte sind dabei von Bedeutung⁹⁾:

- Das Papier muss jedesmal mit möglichst gleich viel Pufferlösung beladen werden.
- Es ist wichtig, dass immer gleiche Volumina der 1-proz. Zuckerlösungen aufgetragen werden (am besten 0,005 ml entsprechend 0,05 mg Zucker.)
- Auf jeden Auftragspunkt soll anschliessend eine gleiche Menge (0,005 ml) der Pufferlösung aufgetragen werden. So wird die durch das Auftragen der methanolischen Zuckerlösung weg-gewaschene Pufferlösung ersetzt.
- Die Pufferlösung sollte nach ca. 10 Versuchen erneuert werden, evtl. schon früher, wenn der Anfangs-pH-Wert von $10,4 \pm 0,1$ unter 10,0 absinkt.
- Besondere Beachtung ist dem Zustand der Manschetten zu widmen. Neue Manschetten müssen vor dem ersten Gebrauch wenigstens 16 Std. in Wasser eingeweicht und dann zwei- bis dreimal in die Pufferlösung getaucht und wieder abgepresst werden. Meist ist es nötig, die Manschetten nach 6-8 Versuchen zu erneuern, da das als Füllmaterial verwendete WHATMAN-Nr. 3-Papier stark angegriffen wird und zu zerfallen beginnt. Die Manschetten dürfen nie austrocknen und sind stets unter Wasser aufzubewahren. Vor jedem Gebrauch ist das Wasser abzupressen und die Manschette kurz in die Pufferlösung einzulegen⁹⁾.
- Wichtig ist auch eine gute Kühlung der Apparatur (kräftig strömendes Leitungswasser genügt).

Die Anordnung der Auftragspunkte ist aus Fig. 3 zu ersehen. Substanzen, die nicht zur Komplexbildung befähigt sind, wandern unter dem Einfluss der Elektroosmose gegen die Kathode. Um das sichtbar zu machen, liessen wir nach einem Vorschlag von FOSTER [32b] bei allen Versuchen 2, 3, 4, 6-Tetra-O-methyl-D-glucose mitlaufen (T in Fig. 3). Da sich die Elektroosmose auch auf die als Borsäurekomplexe wandernden Zucker auswirkt und die Wanderung gegen die Anode bremst, misst man die Laufstrecken nicht von der Startlinie (scheinbare Laufstrecken), sondern von der durch die Zentren der T-Flecke gezogenen Linie (in Fig. 3 gestrichelt angegeben) aus (wahre Laufstrecken). So erhält man nach

$$M_{\text{Glu}} = \frac{\text{wahre Laufstrecke von X}}{\text{wahre Laufstrecke von Glucose}}$$

die auf Glucose bezogenen relativen Mobilitätswerte [32b]. Durch diese Berechnungsmethode wird die Elektroosmose berücksichtigt. Da diese nicht von der Spannung und der Stromstärke abhängt, dafür aber vom Puffergehalt des Papiers, vom Druck mit dem die verschiedenen Schichten zusammengepresst werden und vom Zustand von Manschetten und Pufferlösung, lassen sich auf diese Weise kleine Unregelmässigkeiten

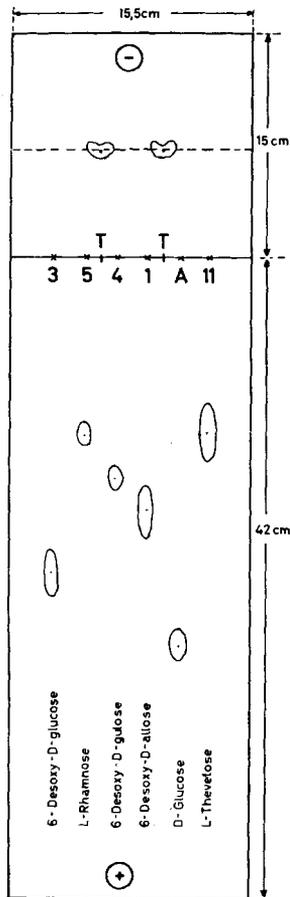


Fig. 3. Beispiel für die Papierelektrophorese schematisiert, aber massgetreu

Papier WHATMAN Nr. 3. Boratpuffer vom pH 10,4, Laufzeit $4\frac{1}{4}$ Std. bei 1500 V und ca. 50 bis 60 mAmp. Entwickelt mit dem Reagens nach SCHEFFER und KIKUTH [31]

A = D-Glucose, T = 2, 3, 4, 6-Tetra-O-methyl-D-glucose zur Bestimmung der wahren Laufstrecken

keiten in den Versuchsbedingungen ausgleichen. Tatsächlich erhält man auf diese Weise viel besser reproduzierbare M-Werte als wenn man zur Berechnung nur die scheinbaren Laufstrecken verwendet.

Zur Erhöhung der Genauigkeit und Sicherheit haben wir zwei Bezugssubstanzen, D-Glucose und L-Rhamnose, verwendet. Das Verhältnis der wahren Laufstrecken dieser beiden Zucker diente dabei gleichzeitig als Mass für die Qualität des betreffenden Versuchs.

Entwickelt wurde auch hier mit dem Reagens nach SCHEFFER und KIKUTH [31]. Sollen Elektropherogramme zum Nachweis von 6-Desoxyhexulosen mit Vanillin-Perchlorsäure-Reagens [26] entwickelt werden, so ist es nötig, das Papier zuerst kräftig mit Perchlorsäurelösung allein und erst anschliessend mit dem Reagens zu besprühen, da sonst die Farbreaktion auf dem stark alkalischen Papier ausbleibt.



Fig. 4. Ansicht der für die Papierelektrophorese verwendeten Apparatur¹⁰⁾

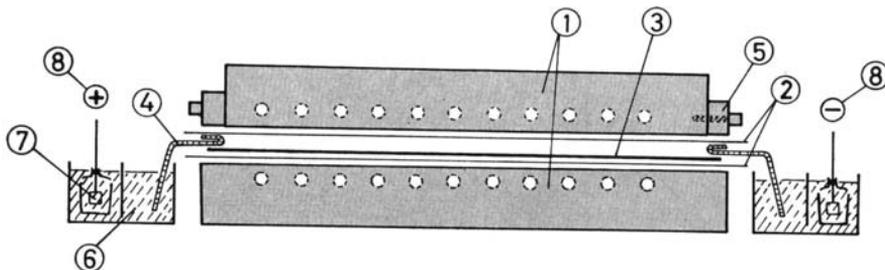


Fig. 5. Schematisches Schnittbild der Apparatur für Papierelektrophorese¹⁰⁾ (die Bestandteile sind in vertikaler Richtung leicht auseinandergezogen).

(1) Aluminiumblöcke mit eingegossener Kühlschlange aus Stahlrohr. (2) Polyäthylenfolie⁹⁾. (3) Papierelektropherogramm, Papier WHATMAN Nr. 3, 15,5×57 cm. (4) Manschette aus Dialysierschlauch, gefüllt mit WHATMAN Nr. 3 Papier⁹⁾. (5) Kleine Aluminiumblöcke, die dazu dienen, die Polyäthylenfolien (2), das Elektropherogramm (3) und die Manschetten (4) fest aufeinander zu pressen. Sie werden mit 2 Schrauben befestigt. (6) Behälter aus Kunststoff für Pufferlösung, Zwischenwand am Grunde perforiert. (7) Pt-Elektrode, in perforierter Glasflasche montiert. (8) Anschlüsse für 1500 V Gleichstrom.

¹⁰⁾ Der Apparat wurde in der Werkstatt unseres Instituts unter der Leitung von Herrn W. ARNOLD entworfen und gebaut. Herrn Prof. M. BRENNER möchten wir für die zeitweilige Überlassung der Apparatur auch hier bestens danken.

Die Resultate dieser Messungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Interessant ist noch, dass gewisse Zucker immer runde, andere aber immer langgestreckte Flecke ergeben. Nach FOSTER [32b] ist das darauf zurückzuführen, dass auch beim relativ hohen pH-Wert von ca. 10,4 das pH-abhängige Gleichgewicht zwischen den Zucker-Borsäure-(1:1)- und (2:1)-Komplexen nicht bei allen Zuckern ganz auf der Seite des (2:1)-Komplexes liegt. Das gleichzeitige Vorliegen der beiden Komplexe, die natürlich verschiedene Laufstrecken aufweisen, führt dann bei diesen (in Tab. 2 mit * bezeichneten Zuckern) zu länglichen, oft etwas verschmierten Flecken (vgl. z. B. 1, 3 und 11 in Fig. 3).

Tabelle 2. Vergleich der Laufstrecken, bezogen auf Rhamnose, Thevetose oder Glucose

Zucker [4] [5]	Dünnschichtchromatographie ⁹⁾ R _{Rhamnose}	Papierchromatographie ⁹⁾		Papierelktrophorese ⁹⁾	
		R _{Rhamnose}	R _{Thevetose}	M _{Rhamnose}	M _{Glucose}
6-Desoxy-D-allose *)	0,44	1,05	0,44	1,27	0,73
6-Desoxy-D-altrose *)	1,28	1,41	0,56	1,64	0,94
6-Desoxy-D-glucose *)	0,99	0,96	0,38	1,48	0,86
6-Desoxy-L-mannose (= L-Rhamnose)	1,00	1,00	0,41	1,00	0,57
6-Desoxy-D-gulose	0,43	1,06	0,42	1,15	0,66
6-Desoxy-D-idose *) [7]	1,29	1,71	0,70	1,64	0,95
6-Desoxy-D-galaktose (= D-Fucose)	0,70	0,69	0,28	1,65	0,95
6-Desoxy-L-talose	0,49	1,89	0,76	1,13	0,64
3-O-Methyl-6-desoxy-D-allose [10]	1,29	2,56	1,02	1,03	0,60
3-O-Methyl-6-desoxy-L-altrose (= L-Vallarose) [10]	1,54	3,35	1,36	1,16	0,66
3-O-Methyl-6-desoxy-L-glucose (= L-Thevetose *)	1,53	2,47	1,00	0,99	0,56
3-O-Methyl-6-desoxy-L-mannose (= L-Acofriose)	1,35	2,12	0,85	0,72	0,41
3-O-Methyl-6-desoxy-D-gulose *) [12]	1,03	2,48	1,01	0,89	0,52
3-O-Methyl-6-desoxy-D-idose [11]	1,54	4,45	1,78	1,08	0,63
3-O-Methyl-6-desoxy-D-galaktose (= D-Digitalose *)	1,04	1,42	0,57	0,99	0,56
3-O-Methyl-6-desoxy-L-talose (= L-Acovenose) [22]	0,94	3,85	1,55	1,03	0,59
6-Desoxy-L-psicose [1]	0,55	1,72	0,67	1,20	0,69
6-Desoxy-D-fructose [23]	1,17	1,33	0,52	1,15	0,67
6-Desoxy-L-sorbose [25]	1,26	1,83	0,72	1,16	0,67
6-Desoxy-D-tagatose [24]	0,48	1,54	0,60	1,64	0,95

*) Diese Zucker geben im Elektropherogramm langgestreckte Flecke.

8. *Diskussion der Resultate.* Alle in der Tabelle enthaltenen Werte sind Mittelwerte von wenigstens 6–8 Messungen. Die Abweichungen der Messwerte vom angegebenen Mittelwert betragen dabei bei der Dünnschichtchromatographie bis zu $\pm 0,08^{11)}$, bei

¹¹⁾ Innerhalb einer Serie gleichzeitig hergestellter Dünnschichtplatten betragen die Abweichungen oft nur $\pm 0,02$.

den Papierchromatogrammen bis zu $\pm 0,04$ (mit Ausnahme der grossen R_{Rhamnose} -Werte von über 3, wo die Abweichungen grösser sind) und bei den Papierelektrophogrammen bis zu $\pm 0,03$ (bei den Zuckern, welche runde Flecke liefern, sind die Abweichungen zum Teil noch geringer). Ausgemessen wurden in allen Fällen die Mittelpunkte der Flecke.

Ein Vergleich der für die Papierchromatographie und die Papierelektrophorese angegebenen Werte zeigt, dass fast immer Zucker, die beim einen Verfahren gleiches Verhalten zeigen, mit der andern Methode gut getrennt werden können. Einzig zur Differenzierung von Thevetose und 3-O-Methyl-6-desoxyallose sowie von 6-Desoxypsicose und 6-Desoxysorbose, die sich auf diese Weise nicht unterscheiden lassen, muss noch die Dünnschichtchromatographie (z. B. **9** und **11** in Fig. 1) zugezogen werden.

Die genannte Kombination der drei Systeme ist die bisher einfachste Methode, um alle 20 genannten Zucker eindeutig zu unterscheiden, sie benötigt aber eine geeignete Apparatur für die Elektrophorese. Es dürfte zwar wohl gelingen, auch noch eine genügende Anzahl verschiedener Systeme zu finden, die es gestatten würden, das genannte Ziel auch ohne Elektrophorese, durch Papierchromatographie allein zu erreichen. Dabei wäre auf jeden Fall mit einem erheblich grösseren Zeitaufwand zu rechnen. Als Ergänzung käme vor allem auch die Komplexbildung durch Imprägnierung des Papiers mit Boratpuffer [5] oder Na-Molybdat [33] in Frage. In gewissen Spezialfällen, so zur Differenzierung der 6-Desoxyhexosen mit *allo*-, *gluco*- und *gulo*-Konfiguration, ist das Molybdatssystem besonders bequem [33]. Aber auch mit diesem System arbeitet die Papierelektrophorese rascher [34].

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Für alle Untersuchungen wurden 1-proz. Lösungen der Zucker in Methanol verwendet. Im Gegensatz zu den 6-Desoxyhexosen und ihren 3-O-Methylderivaten, die in diesen Lösungen während langer Zeit unverändert bleiben, beobachtete man bei den 6-Desoxyhexulosen meist schon nach wenigen Tagen zwei oder mehr Flecke. Es empfiehlt sich deshalb, diese Zucker nicht während längerer Zeit in methanolischer Lösung aufzubewahren.

1. *Dünnschichtchromatographie*. Das Linienglas wurde mit Kieselgel G «MERCK» wie folgt beschichtet: Für 12 Platten (Grösse wie in Fig. 1) wurden 60 g Kieselgel mit einer Mischung von 60 ml Wasser und 60 ml Methanol kurz geschüttelt. Der dünnflüssige Brei wird mit einem Spachtel rasch auf die Platten aufgetragen. Die ca. $\frac{1}{2}$ Std. luftgetrockneten Platten werden im Heizschrank bei 120° während 1 Std. aktiviert und dann unter Feuchtigkeitsausschluss aufbewahrt.

Die Substanzen wurden 2 cm vom unteren Rand aufgetragen und zwar 0,05 mg pro Zucker. Als Chromatographieträge dienten Sterilisiergläser. Es erwies sich als praktisch, die Versuche dann abzubrechen, wenn die Lösungsmittelfront 14 cm zurückgelegt hatte. Dabei ergaben sich Laufzeiten von 55 ± 5 Min. Zum Entwickeln wurden die getrockneten Platten mit einer 20-proz. Lösung von *p*-Toluolsulfonsäure in Alkohol besprüht und kurze Zeit auf 120° erhitzt.

2. *Papierchromatographie*. Es wurde nach der absteigenden Methode mit WHATMAN-Nr. 1-Papier und Toluol-*n*-Butanol-(1:2)/Wasser als Fließmittel gearbeitet. Zum Imprägnieren wurden die gewogenen Papiere kurz durch ein Aceton-Wasser-(2:1)-Gemisch gezogen. Sobald das Aceton verdampft war, wurde von jedem Zucker 0,03 mg als 1-proz. methanolische Lösung aufgetragen. Auf einem breiten Papier konnten gut 5 Zucker nebeneinander aufgebracht werden (vgl. Fig. 2). Diese Papiere wurden an der Luft solange (ca. 10–20 Min.) liegen oder hängen gelassen, bis ihr Wassergehalt möglichst genau 35% des Papiertrockengewichts entsprach, und dann sofort in den Trog eingehängt.

Zum Entwickeln diente das Reagens nach SCHEFFER und KIKUTH [31]¹²⁾. Die getrockneten Papiere wurden rasch durch die Lösung gezogen und dann kurze Zeit auf 120° erwärmt. Die Flecke sind bei allen 6-Desoxyhexosen und ihren 3-O-Methylderivaten braun, bei der Glucose rotbraun und bei den 6-Desoxyhexulosen ocker bis orange-braun.

3. *Papiererelektrophorese*. – *Pufferlösung* aus 95,3 g Borax und 20,2 g NaOH auf 5 l Lösung, ergibt ein pH von $10,4 \pm 0,1$.

Die verwendete *Polyäthylenfolie*¹³⁾ ((2) in Fig. 5) war 0,2 mm dick und etwas grösser als die Aluminiumblöcke geschnitten.

Die *Manschetten* bestanden aus einem 16 cm langen Stück Dialysierschlauch¹⁴⁾, das mit einem Stück WHATMAN-Nr. 3-Papier (15,5×15,5 cm) gefüllt war. Das eine offene Ende wird ca. 2–3 cm breit umgelegt (vgl. (4) in Fig. 5).

Beim Zusammenfügen der Apparatur ist darauf zu achten, dass die Befestigungsblöcke ((5) in Fig. 5) beim Anschrauben gut nach unten gedrückt werden.

Die Spannung wurde auf 1500 V eingestellt. Dabei ergaben sich Anfangsstromstärken von 60–70 mAmp. Innerhalb von $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$ Std. sank die Stromstärke jeweils auf ca. 55–50 mAmp. ab und blieb während der restlichen Versuchszeit konstant.

Als Laufzeit wählten wir $4\frac{1}{4}$ Std. Die Glucose erreicht dabei eine wahre Laufstrecke von 32 bis 34 cm. Damit die in der Tabelle angegebenen M-Werte reproduziert werden können, empfiehlt es sich, bei anders gebauten Apparaturen oder anderen Spannungen die Laufzeit so zu wählen, dass die Glucose wieder ca. 30–35 cm zurücklegt.

Die aus WHATMAN-Nr. 3-Papier geschnittenen Papierstreifen wurden zuerst durch die Pufferlösung gezogen und dann zwischen zwei Gummiwalzen (Mange von einer Waschmaschine) abgepresst. Dabei wird das Papier mit ca. 150% seines Trockengewichts Pufferlösung beladen. Nun wurde von jedem Zucker 0,05 mg als 1-proz. Lösung (0,005 ml) aufgetragen. Auf jede Auftragsstelle brachte man anschliessend noch 0,005 ml der Pufferlösung.

Die in Wasser gelagerten Manschetten werden vor dem Einbau in die Apparatur zuerst abgepresst, in die Pufferlösung eingelegt und nochmals zwischen den Gummiwalzen abgepresst.

Nach dem Trocknen wurden die Papiererelektropherogramme wie die Papierchromatogramme mit dem Reagens nach SCHEFFER & KIKUTH [31] entwickelt.

SUMMARY

The separation of isomeric sugars with the aid of thin-layer and paper chromatography, as well as paper electrophoresis, has been reported. Under certain fixed experimental conditions and by a combination of the above mentioned methods, it has been possible to differentiate with certainty between all theoretically possible 6-deoxyhexoses, 3-O-methyl-6-deoxyhexoses and 6-deoxyhexuloses.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 41. Mitt.: HEINZ KAUFMANN & T. REICHSTEIN, *Helv.* 50, 2280 (1967).
 [2] a) CH. TAMM, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 13, 137 (1956); 14, 71 (1957); b) T. REICHSTEIN: Cardenolid- und Pregnanglykoside, *Naturwissenschaften* 54, 53 (1967).
 [3] T. REICHSTEIN & EK. WEISS: The Sugars of the Cardiac Glycosides, *Adv. Carbohydrate Chem.* 17, 65 (1962).

¹²⁾ Das Reagens besteht aus 6 g Phtalsäure und 0,6 g *p*-Aminohippursäure, gelöst in 200 ml Alkohol. Die Empfindlichkeit beim Nachweis reduzierender Zucker ist mindestens so gut wie beim PARTRIDGE-Reagens [30], Herstellung und Anwendung sind jedoch einfacher.

¹³⁾ Bezogen von der Firma CONTRAVES, Elektrodenfabrik, Abt. Plastic, Zürich.

¹⁴⁾ Dialysierschlauch \varnothing 12 cm von der Firma KALLE & Co., Wiesbaden.

- [4] R. TSCHESCHE: C₂₁-Steroide des Pflanzenreichs, *Angew. Chem.* **73**, 727 (1961); Les stéroïdes en C₂₁ d'origine végétale, *Bull. Soc. chim. France* **1965**, 1219; *Pflanzl. Steroide mit 21 C-Atomen*, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* **24**, 9 (1966).
- [5] M. T. KRAUSS, HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *J. Chromatogr.* **3**, 63 (1960).
- [6] L. GLASER, *Physiol. Rev.* **43**, 215 (1963).
- [7] A. S. MEYER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **29**, 139 (1946).
- [8] M. L. WOLFROM & S. HANESSIAN, *J. org. Chemistry* **27**, 1800 (1962).
- [9] L. SAWLEWICZ, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **50**, 504 (1967); K. A. JAEGLI, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **50**, 1201 (1967).
- [10] HEINZ KAUFMANN, W. WEHRLI & T. REICHSTEIN, *Helv.* **48**, 65 (1965); HEINZ KAUFMANN, *Helv.* **48**, 83 (1965).
- [11] R. FISCHER, H. R. BOLLIGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **37**, 6 (1954).
- [12] HEINZ KAUFMANN, *Helv.* **48**, 769 (1965).
- [13] A. F. KRASSO & EK. WEISS, *Helv.* **49**, 1113 (1966); J. S. BRIMACOMBE & D. PORTSMOUTH, *J. chem. Soc.* **1966**, 499.
- [14] F. MICHEEL, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **63**, 347 (1930); P. A. LEVENE & J. COMPTON, *J. biol. Chemistry* **116**, 169 (1936).
- [15] C. A. GROB & D. A. PRINS, *Helv.* **28**, 840 (1945); M. GUT & D. A. PRINS, *Helv.* **29**, 1555 (1946).
- [16] E. FISCHER & K. ZACH, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **45**, 3761 (1912).
- [17] P. A. LEVENE & J. COMPTON, *J. biol. Chemistry* **111**, 335 (1935); J. A. MOORE, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **37**, 755 (1954).
- [18] J. SCHMUTZ, *Helv.* **37**, 1719 (1948).
- [19] M. FRÈREJACQUE & V. HASENFRATZ, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* **222**, 815 (1946); F. BLINDENBACHER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **37**, 1669 (1948).
- [20] H. MUHR, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **37**, 403 (1954); **38**, 499 (1955).
- [21] F. REBER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **29**, 343 (1946).
- [22] a) J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* **33**, 485 (1950); b) B. M. KAPUR & ALLGEIER, *Helv.* **57** (1968), in Vorbereitung.
- [23] W. TH. J. MORGAN & T. REICHSTEIN, *Helv.* **27**, 1023 (1938).
- [24] J. BARNETT & T. REICHSTEIN, *Helv.* **20**, 1529 (1937).
- [25] H. MÜLLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **27**, 263 (1938).
- [26] A. P. MACLENNAN, H. M. RANDALL & D. W. SMITH, *Analyt. Chemistry* **37**, 2020 (1959).
- [27] E. STAHL & U. KALTENBACH, *J. Chromatogr.* **5**, 458 (1961); weitere Lit. siehe bei [3].
- [28] A. GAMP, P. STUDER, H. LINDE & K. MEYER, *Experientia* **18**, 292 (1962).
- [29] A. B. SVENSEN & K. B. JENSEN, *Acta pharmac. Helv.* **25**, 241 (1950); O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 108 (1951); weitere Lit. vgl. [3].
- [30] S. M. PARTRIDGE, *Nature* **164**, 443 (1949).
- [31] F. SCHEFFER & R. KIKUTH, *Z. analyt. Chem.* **191**, 116 (1962).
- [32] a) R. CONSDEN & W. M. STANIER, *Nature* **169**, 783 (1952); b) A. B. FOSTER, *Adv. Carbohydrate Chem.* **12**, 81 (1957).
- [33] A. R. MANZETTI & T. REICHSTEIN, *Helv.* **47**, 2320 (1964).
- [34] E. J. BOURNE, D. H. HUTSON & H. WEIGEL, *J. chem. Soc.* **1960**, 4252; **1967**, 35.
-