

ÜBER DIE QUANTITATIVE ZUCKERBESTIMMUNG IN GLYKOSIDEN UND OLIGOSACCHARIDEN MIT HILFE DER GASCHROMATOGRAPHIE

G. WULFF

Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn (Deutschland)

(Eingegangen den 23. Dezember 1964)

(Meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. RUDOLF TSCHESCHE in Dankbarkeit zum 60. Geburtstag gewidmet)

EINLEITUNG

Bei Untersuchungen über den Aufbau von Saponinen¹ trat häufig das Problem auf, die Zuckerbausteine quantitativ genau zu bestimmen. Ganz allgemein führt man solche Bestimmungen an Glykosiden, Oligo- und Polysacchariden derart durch, dass ein durch saure Hydrolyse erhaltenes Monosaccharidgemisch zunächst papierchromatographisch aufgetrennt wird. Nach Lokalisieren der Zucker durch Anfärben von Randstreifen auf dem Chromatogramm werden diese dann eluiert und titrimetrisch oder colorimetrisch bestimmt. Man kann die Zucker auch direkt auf dem Chromatogramm anfärben und die Konzentration aus der Fleckengröße densitometrisch oder nach Elution ermitteln².

Der Fehler dieser Methoden liegt im allgemeinen über 5%; für Zuckerbestimmungen in Glykosiden ist er oft beträchtlich grösser. Bei jeder Bestimmung müssen Vergleichszucker mithydrolysiert und mitchromatographiert werden, da die Trennung, die Elution und die Farbstoffausbeute nicht streng reproduzierbar sind. Ferner müssen die Blindwerte des Papiers sorgfältig berücksichtigt werden.

In Anbetracht der Häufigkeit und Wichtigkeit solcher Bestimmungen erschien es angebracht, eine weniger umständliche und genauere Methode auszuarbeiten. Hierfür bot sich die Gaschromatographie der silylierten Zucker an. Während in früheren Versuchen in begrenztem Umfange die Gaschromatographie der acetylierten und methylierten Zucker untersucht wurde³, konnte durch die Verwendung der leicht quantitativ herstellbaren und gut flüchtigen Persilylverbindungen die Anwendungsbreite der Gaschromatographie bei Zuckern wesentlich erweitert werden.

SWEELEY, BENTLEY, MAKITA UND WELLS⁴ haben in einer grundlegenden, umfangreichen Untersuchung an über 100 Kohlenhydraten die Leistungsfähigkeit dieser Methode zur analytischen Identifizierung von Zuckern demonstriert. Sie trennten persilylierte Mono-, Di- und Trisaccharide, die entsprechenden Methylglykoside und andere Derivate an SE 52- und Polyäthylenglykolsuccinat-Säulen. Sie studierten die Silylierungsreaktion genauer und fanden, dass Kohlenhydrate in Pyridin mit Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan in wenigen Minuten quantitativ reagierten.

Bei eigenen Untersuchungen stellte sich heraus, dass für die quantitative Auswertung dieses Verfahrens eine Reihe von Bedingungen variiert werden mussten.

Ferner hatte man den Einfluss der Säure bei der Hydrolyse zuvor sorgfältig zu studieren. Die quantitative Bestimmung wurde zunächst auf Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, Xylose und Arabinose beschränkt, die in erster Linie als Zucker in Glykosiden*, Oligo- und Polysacchariden vorkommen. Die Hydrolyse wurde nach zwei verschiedenen, standardisierten Verfahren vorgenommen. Nach der Silylierung und gaschromatographischen Trennung der Silylzucker an Silikonfett DC konnten mit Hilfe allgemein verwendbarer Korrekturfaktoren die molaren Verhältnisse der Zucker aus den Peakflächen auf 3–5 % genau ermittelt werden.

Während dieser Untersuchungen erschien eine Arbeit von SWEeley und WALKER⁵, die sich mit der quantitativen Bestimmung von Glucose, Galaktose, Galaktosamin und Neuraminsäure in Glykolipiden und Gangliosiden beschäftigt. Die Verfasser bestimmten diese Substanzen nach Methanolyse und Silylierung quantitativ gaschromatographisch nach Trennung an einer SE 30-Säule.

EXPERIMENTELLER TEIL

Substanzen

Die für diese Untersuchung benutzten Zucker D-Glucose (Gluc), D-Galaktose (Gal), D-Xylose (Xyl), D-Mannose (Mann), L-Arabinose (Arab), L-Rhamnose (Rham) und Lactose stammten von der Fa. E. Merck, Darmstadt.

Von den Glykosiden wurde Tomatin⁶ von der Fa. C. Roth, Karlsruhe bezogen. Die übrigen Glykoside waren isolierte Reinsubstanzen aus *Digitalis purpurea* Samen (Digitonin)⁷, aus Knollen von *Cyclamen europäum* (Cyclamin)⁸, aus *Radix sarsaparillae* (Parillin)⁹ sowie aus Blättern von *Hedera helix* (α -Hederin und Hederasaponin C)¹⁰.

Alle Substanzen wurden vor der Einwaage sorgfältig im Hochvakuum getrocknet. Die Wägungen wurden auf einer Bunge-Halbmikrowaage durchgeführt (± 0.03 mg).

Silylierung

Das nach verschiedenen Verfahren erhaltene Zuckergemisch wurde durch dreimaliges Abdampfen im Rotationsverdampfer mit trockenem Benzol vollkommen wasserfrei erhalten. Man löste es in 0.8 ml Pyridin und setzte 0.4 ml Hexamethyldisilazan und 0.4 ml Trimethylchlorsilan zu. SWEeley und Mitarb.⁴ benutzten diese Lösung nach 5 Min. direkt zur Gaschromatographie. Für die quantitative Bestimmung der Zucker erwies es sich als günstiger, den Silylierungsansatz noch 1 St. auf 95° zu erhitzen, da das meist sirupöse Zuckergemisch sich im Pyridin dann besser umsetzte und der Niederschlag von NH₄Cl bei der weiteren Aufarbeitung sich besser filtrieren liess. Die Lösung wurde darauf bei 60° im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, zweimal mit wasserfreiem Benzol abgedampft und der Rückstand in 2 ml wasserfreiem Benzol aufgenommen. Nach Filtration und Waschen mit weiteren 2 ml Benzol wurde wieder bei 60° eingeeengt, so dass nur noch Spuren von Benzol und wenig Pyridin (10 % des Rückstandes) vorhanden waren. Dieses sirupöse Gemisch wurde je nach eingesetzter Menge mit wenig Benzol (10–100 μ l) verdünnt, und es wurden 0.5 μ l dieser Lösung mit einer 10 μ l Hamilton-Pipette eingespritzt. Pro Monosaccharid etwa 100–200 γ .

* Ausgenommen sind hier vor allem die Herzgift- und C-2i-Glykoside, die nicht ubiquitäre Zucker enthalten.

Äquilibrierung der Zucker

Etwa je 60 mg Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, Xylose und Arabinose wurden in je 3 ml H₂O gelöst und 20 Std. stehengelassen. Danach wurden die Zucker bei 60° im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und silyliert.

Hydrolyse (Methode 1)

Etwa je 60 mg Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, Xylose und Arabinose, sowie genau eingewogene Mischungen zweier Zucker (im molaren Verhältnis), nämlich: Gluc-Arab, Gluc-Xyl, Gluc-Rham, Gluc-Mann, Gluc-Gal, Gal-Xyl, Gal-Rham, Mann-Arab, Rham-Arab, Rham-Xyl (zumeist in doppelter Ausführung) wurden in 3 ml 3 N HCl 2 Std. auf 95° erhitzt. Anschliessend wurde die wässrige Lösung mit Dow 3 neutralisiert und die Lösung zur Äquilibrierung 20 Std. stehengelassen. Darauf wurde eingengt und wie beschrieben silyliert.

Je 5–50 mg der Glykoside Cyclamin, Digitonin, Parillin und Tomatin wurden in 3 ml 3 N HCl, 1 ml Dioxan und 3 ml Benzol 4 Std. auf dem Wasserbad auf 95° erhitzt. Nach dem Abkühlen trennte man die Benzolschicht ab, schüttelte die wässrige Phase noch zweimal mit Chloroform aus und wusch die organischen Phasen mit wenig Wasser einmal aus. Die wässrige Phase neutralisierte man mit Dow 3. Im Falle des Tomatins wurde nach der Neutralisierung noch einmal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen wurden wie beschrieben eingengt und silyliert.

Falls die Glykoside in Wasser nicht genügend löslich sind, kann auch ein grösserer Anteil Dioxan (unter Verzicht auf das Übersichten mit Benzol) zugesetzt werden. Es darf möglichst kein Methanol oder Äthanol hinzugefügt werden, da unter diesen Bedingungen ein beträchtlicher Teil der Zucker (bis 60%) in Methyl bzw. Äthylglykoside übergeht. In einem solchen Fall müssen dann hinterher in rein wässriger HCl die Zucker nachhydrolysiert werden. In dieser Weise wurde in einem Fall beim Cyclamin verfahren, wobei eine entsprechende Mischung von Vergleichszuckern analog behandelt wurde. Auch dann sind genaue quantitative Ergebnisse möglich (siehe Tabelle V).

Hydrolyse (Methode 2)

Etwa je 60 mg Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, Xylose, Arabinose, Lactose und β -Methylgalaktosid, sowie genau eingewogene Mischungen zweier Zucker (im molaren Verhältnis, zusammen ca. 60 mg) nämlich: Gluc-Arab, Gluc-Xyl, Gluc-Rham, Gluc-Mann, Gal-Xyl, Gal-Rham, Gal-Mann, Mann-Rham, Rham-Arab wurden je in 5 ml 5% wasserfreier methanolischer HCl unter Feuchtigkeitsausschluss 4 Std. zum Sieden erhitzt. Nach 2 Std. war in jedem Falle der gesamte Zucker in Lösung gegangen. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit dem doppelten Volumen H₂O und neutralisierte mit Dow 3. Nach dem Eindampfen wurde durch Abdampfen mit wasserfreiem Benzol getrocknet und anschliessend silyliert.

Die einfache in der Literatur beschriebene Methode des direkten Eindampfens der methanolischen Reaktionsmischung im Stickstoffstrom ergab Veränderungen im Verhältnis der Peakflächen eines Zuckers. Ausserdem traten Nebenpeaks auf, die auf eine teilweise Hydrolyse der Methylglykoside hindeuteten.

Je etwa 5–50 mg Tomatin, Cyclamin, α -Hederin und Hederasaponin C wurden in 5% methanolischer HCl 5 Std. unter Rückfluss wie vorher beschrieben erhitzt und nach dem Abkühlen mit dem doppelten Volumen Wasser versetzt. Das ausge-

fallene Genin wurde durch dreimaliges Extrahieren mit Chloroform entfernt. Darauf wurde wie üblich mit Dow 3 neutralisiert, die Lösung anschliessend eingedampft, der Rückstand getrocknet und silyliert.

Gaschromatographie

Die gaschromatographischen Analysen wurden auf dem Gerät von Perkin-Elmer F 6/4 H F mit dem elektronischen Integrator D 2 und dem Kienzle-Digitaldrucker durchgeführt. Als Säulen dienten Stahlsäulen von 3 mm Innendurchmesser und 2 m Länge, die mit 15 % Silikonfett DC auf Celite 545 (60–100 mesh) gefüllt waren. Die Arbeitstemperatur betrug im allgemeinen 190°. Bei einem Eingangsdruck von 1.8 kp/cm² ergab sich eine Durchflussgeschwindigkeit für Helium von 34 ml/Min. Als Detektor diente eine Wärmeleitfähigkeitszelle mit einem Brückenstrom von 124 mA. Detektor und Einspritzblock waren auf 250° geheizt. Der Papiervorschub des Schreibers betrug 0.5 cm/Min. Die von der Wärmeleitfähigkeitszelle kommende Gleichspannung wurde auf den Perkin-Elmer Integrator D2 gegeben, der die Spannung in eine ihr proportionale Impulsfrequenz umwandelte. Diese wurde gespeichert und konnte bei Bedarf z.B. am Anfang und am Ende eines Peaks abgefragt werden. Die Summe wurde dann auf dem Kienzle-Digitaldrucker ausgedruckt. Die Anzahl der Impulse ist den Peakflächen und damit der Substanzmenge proportional. Unter den angegebenen Bedingungen betrug sie für 1 cm² Peakfläche etwa 6400 Impulse.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Vorversuchen sollten zunächst die günstigsten Bedingungen für eine quantitativ auswertbare Gaschromatographie von Silylzuckern ermittelt werden. Hierfür wurden alle verfügbaren Säulenfüllungen, vor allem die in der Literatur bereits für die Gaschromatographie von Silylzuckern beschriebenen, wie Apiezon M¹¹, Apiezon L¹², SE 30⁵, SE 52⁴ und Polyäthylenglykolsuccinat⁴ auf verschiedenen Trägern, in ihrer Brauchbarkeit überprüft. Silikonfett DC auf Kieselgur erbrachte dabei die günstigsten Ergebnisse. Die Trennungen waren denen vergleichbar, die SWEELEY *et al.* auf SE 52 und SE 30 erhielten. Die Säule zeigte jedoch eine bessere Konstanz der Nulllinie, und nach dem Lösungsmittelpeak wurde die Nulllinie rasch und ohne Nachstellen wieder erreicht. Möglicherweise war dieses Verhalten teilweise darauf zurückzuführen, dass die Trennung bei einer vergleichsweise höheren Temperatur durchgeführt werden musste (190° statt 140° bei SWEELEY).

Nach Modifizierung der Aufarbeitung des Silylierungsansatzes wurde insgesamt eine störungsfreie und konstante Nulllinie bei der Gaschromatographie erhalten, so dass die quantitative Auswertung mit einem elektronischen Integrator erfolgen konnte. Auf diese Weise liessen sich die auftretenden Peakflächen besonders leicht und genau erfassen. Selbstverständlich kann auch jede andere genau arbeitende Methode der quantitativen Auswertung benutzt werden (z.B. Berechnung aus Chromatogrammdaten, graphische Auswertung oder einfach durch Zerschneiden des Chromatogramms und Auswägen der Peakflächen).

Eine Besonderheit bei der Gaschromatographie von Zuckerderivaten tritt dadurch auf, dass von einem einheitlichen Zucker nach Aufarbeitung aus Lösung mehrere Peaks gegeben werden. Die auftretenden Peaks entsprechen den in der Lösung im Gleichgewicht vorhandenen Formen des Zuckers. Solche Peaks können

den α - und β -Glykosiden der pyranoiden, der furanoiden und septanoiden Form der Zucker entsprechen^{4, 12, 13}. Ausserdem kann auch noch die Ketoform vorhanden sein¹³. Im allgemeinen hat man allerdings nach wässriger Äquilibriumierung (Mutarotationsgleichgewicht) nur mit 2 bis 3 Hauptpeaks zu rechnen, während die anderen Verbindungen unter 1% liegen. Diese Trennmöglichkeit ist zwar zur Untersuchung der Gleichgewichte der Zucker in Lösung von grossem Wert, sie erschwert aber die qualitative Identifizierung und noch mehr die quantitative Bestimmung der Zucker. SWEELEY *et al.*⁴ haben daher versucht, durch Überführung in geeignete Derivate nur noch einen Peak zu erhalten. Durch Reduktion oder Oximierung der Aldehydgruppe konnten sie zwar dieses Ziel erreichen, es liessen sich dann aber die Peaks der verschiedenen Zucker nicht mehr gut trennen.

In der Tabelle I, Spalte a sind die relativen Retentionszeiten (bezogen auf persilylierte α -Glucose) der nach wässriger Äquilibriumierung auftretenden Peaks angegeben. In der Spalte b findet man das prozentuale Verhältnis der zugehörigen Peakflächen. Dieses Verhältnis wies infolge der leichten Umwandelbarkeit während der Aufarbeitung Schwankungen auf.

Zur quantitativen Bestimmung der Zucker in Glykosiden, Oligo- und Polysacchariden muss vor der eigentlichen Bestimmung eine saure Hydrolyse erfolgen. Es ist bekannt, dass während dieser Hydrolyse die Zucker sich teilweise zersetzen,

TABELLE I

RELATIVE RETENTIONSZEITEN DER PERSILYLIERTEN VERBINDUNGEN AUS WÄSSRIGEN ZUCKERGLEICHGEWICHTSMISCHUNGEN UND DIE PROZENTUALE ZUSAMMENSETZUNG DER MISCHUNGEN

Glucose	a	0.73	0.81	1.00	1.50	
	b	—	1.0 %	43.0 %	56.0 %	
	c	2.0 %	1.5 %	41.5 %	55.0 %	
Galaktose	a	0.74	0.88	0.97	1.07	
	b	12.0 %	34.0 %	—	54.0 %	
	c	11.5 %	33.5 %	2.0 %	53.0 %	
Mannose	a	0.74		1.07		
	b	80.0 %		20.0 %		
	c	80.0 %		20.0 %		
Rhamnose	a	0.29	0.32	0.38	0.44	0.52
	b	—	72.0 %	—	27.0 %	1.0 %
	c	4.0 %	69.0 %	1.0 %	25.0 %	1.0 %
Xylose	a	0.25-0.41	0.31 0.32	0.45	0.55	
	b	—	3.0 %	46.0 %	51.0 %	
	c	20 %	—	37.0 %	43.0 %	
Arabinose	a	0.31	0.35	0.39		
	b	48.0 %	41.0 %	11.0 %		
	c	48.0 %	41.0 %	11.0 %		

- (a) Relative Retentionszeiten bezogen auf persilylierte α -Glucose = 1.00; absolute Retentionszeit für Persilyl- α -glucose = 55 Min; Trennung bei 190°, 34 ml He/Min, an Silikonfett DC.
 (b) Prozentualer Anteil der auftretenden Peakflächen nach wässriger Äquilibriumierung der Zucker (siehe Experimenteller Teil).
 (c) Prozentualer Anteil der nach Erhitzen mit wässriger HCl und nachfolgender Äquilibriumierung erhaltenen Peakflächen (siehe Experimenteller Teil).

und es muss bei jeder quantitativen Bestimmung diese Tatsache berücksichtigt werden. Dabei interessiert vor allem, wieviel des Zuckers unter bestimmten Hydrolysebedingungen nicht wiedergefunden wird. In der Gaschromatographie ist auch damit zu rechnen, dass gewisse Zersetzungsprodukte im Gaschromatogramm neue Peaks ergeben, die möglicherweise die Trennung von anderen Zuckern erschweren. Zur Untersuchung dieser letzten Frage wurden zunächst Monosaccharide den Hydrolysebedingungen ausgesetzt, die für die Hydrolyse der Glykoside und Oligosaccharide sich als gut geeignet erwiesen hatten. Dabei kamen zwei standardisierte Hydrolysemethoden zur Anwendung. Bei der ersten Methode benutzte man 3 *N* wässrige HCl (gegebenenfalls mit Dioxanzusatz) und bei der zweiten 5 % wasserfreie methanolische HCl zur Hydrolyse bzw. Methanolyse. Über den prozentualen Anteil an neu auftretenden Peaks bei der wässrigen Hydrolyse und ihre relativen Retentionszeiten unterrichtet Tabelle I, Spalte c. Dieser prozentuale Anteil lag bei den meisten Zuckern zwischen 1 und 5 % und war bei gleichen Hydrolysebedingungen weitgehend konstant. Auffallend war der hohe Prozentsatz von Nebenpeaks bei der Xylose. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass bei weiterer Verschärfung der Hydrolysebedingungen auch bei den anderen Zuckern z.T. sehr beträchtliche Nebenpeaks entstehen, so aus Glucose (bei 0.73), aus Galaktose (bei 0.97) und aus Arabinose (bei 0.36).

Bei der Methanolyse zeigte sich ein anderes Bild (Tabelle II). Da direkt die stabileren Methylglykoside gebildet wurden, war der Anteil an Zersetzungsprodukten geringer. Die persilylierten Methylglykoside zeigten gegenüber den persilylierten Zuckern erheblich verschiedene relative Retentionszeiten, wobei besonders der

TABELLE II

RELATIVE RETENTIONSZEITEN DER PERSILYLIERTEN METHYLGLYKOSIDE AUS DER SAUREN METHANOLYSE VON MONOSACCHARIDEN UND DIE PROZENTUALE ZUSAMMENSETZUNG DER REAKTIONSMISCHUNG

Glucose	a	<u>0.63 0.72</u>	0.93	1.02	
	b	2.0 %	71.0 %	27.0 %	
Galaktose	a	0.63	0.73	0.83	0.91
	b	18.0 %	59.0 %	21.0 %	2.0 %
Mannose	a	0.65	0.73	0.84	
	b	90.5 %	9.0 %	0.5 %	
Rhamnose	a	0.23	0.27	0.29	0.34
	b	1.5 %	87.0 %	9.5 %	2.0 %
Xylose	a	0.20-0.27	0.36	0.39	
	b	10.0 %	60.5 %	29.5 %	
Arabinose	a	<u>0.23 0.24</u>	0.28	0.36	
	b	90.5 %	8.5 %	1.0 %	

(a) Relative Retentionszeiten bezogen auf persilylierte α -Glucose = 1.00; Trennung bei 190°, 34 ml He/Min, an Silikonfett DC.

(b) Prozentualer Anteil der durch Methanolyse von Monosacchariden erhaltenen Peakflächen (siehe Experimenteller Teil, Methode 2).

geringere Unterschied zwischen α - und β -Anomeren auffiel. Auch das Verhältnis der Peakflächen zueinander hatte sich beträchtlich verschoben. Im Gegensatz zur wässrigen Hydrolyse war aber der prozentuale Anteil der Peakflächen gut reproduzierbar (auf $\sim 1\%$). Offenbar bildete sich in der methanolischen HCl ein konstantes Gleichgewicht der Anomeren aus; denn auch Maltose und Cellobiose ergaben das übliche Glucoseverhältnis, und selbst eingesetztes β -Methylgalaktosid zeigte nach der Methanolyse keinen Unterschied gegenüber eingesetzter Galaktose.

Betrachtete man jetzt die Trennmöglichkeiten zwischen den Zuckern, so liessen sich folgende Paare nach wässriger Hydrolyse als persilylierte Verbindungen gut trennen: Glucose von Rhamnose; Galaktose von Rhamnose; Mannose von Rhamnose; Glucose von Xylose; Galaktose von Xylose; Mannose von Xylose; Glucose von Arabinose; Galaktose von Arabinose; Mannose von Arabinose.

Bei der Trennung Glucose von Mannose und Glucose von Galaktose trat eine gewisse Überlappung der Peaks auf, bei der aber eine quantitative Bestimmung noch möglich war. Berücksichtigte man bei den Trennungen Xylose von Rhamnose und Xylose von Arabinose rechnerisch die 20% Zersetzungsprodukte zwischen 0.25–0.41 der Xylose, so liessen sich auch diese Paare nebeneinander bestimmen. Trennungen der Paare Arabinose von Rhamnose sowie Mannose von Galaktose waren nicht möglich.

Günstiger noch waren die Trennmöglichkeiten nach der Methanolyse. Es liessen sich alle sechs Zucker gut nebeneinander bestimmen. Ohne weiteres trennbar waren: Glucose von Galaktose; Glucose von Mannose; Glucose von Rhamnose; Glucose von Xylose; Glucose von Arabinose; Galaktose von Rhamnose; Galaktose von Xylose; Galaktose von Arabinose; Mannose von Rhamnose; Mannose von Xylose; Mannose von Arabinose.

Bei rechnerischer Berücksichtigung kleinerer Nebenpeaks (die in der Menge weitgehend konstant anfielen), konnten auch Rhamnose–Xylose, Rhamnose–Arabinose und Xylose–Arabinose gut nebeneinander bestimmt werden. Lagen Galaktose und Mannose nebeneinander vor, fielen die einzelnen Peaks der beiden Zucker fast direkt aufeinander. Da aber das Verhältnis der Peakflächen zueinander bei einem Zucker weitgehend konstant war und sich dieses Verhältnis bei Galaktose und Mannose stark unterschied, konnte aus dem Verhältnis der resultierenden Peakflächen rechnerisch mit genügender Genauigkeit auf die zur Galaktose und Mannose gehörenden Peakflächen geschlossen werden. Man konnte auch eingewogene Mischungen von Galaktose und Mannose chromatographieren und daraus das Verhältnis ermitteln.

Zur Bestimmung der vorhandenen Mengen Zucker in einem Hydrolysat mussten die ermittelten Peakflächen noch mit zwei Korrekturfaktoren multipliziert werden, die einmal den molaren Respons des betreffenden Silylzuckers für die Wärmeleitfähigkeitszelle enthielten, zum anderen die unterschiedliche Zersetzung der Zucker bei der Säureeinwirkung berücksichtigten. Wenn man dabei auf die Ermittlung von Absolutwerten der Zuckerkonzentration verzichtete und das meist nur interessierende molare Verhältnis bestimmte, so konnte man beide Korrekturfaktoren zu einem einzigen zusammenziehen und diesen Faktor auf Glucose beziehen, für die er unter standardisierten Hydrolysebedingungen gleich 1 gesetzt wurde.

Für die übrigen Zucker wurden dann die Faktoren bestimmt, indem man Mischungen zweier Zucker, von denen einer meist Glucose war, im molaren Verhältnis

den standardisierten Hydrolysebedingungen aussetzte, aufarbeitete, silylierte und nach Gaschromatographie die Peakflächen für beide Zucker bestimmte. Wenn einer der Zucker Glucose war, erhielt man bei molarem Verhältnis den Faktor aus der Division der beiden Peakflächensummen. In der Tabelle III sind diese Faktoren für die wässrige Hydrolyse und in der Tabelle IV für die Methanolyse aufgeführt.

TABELLE III

AUF GLUCOSE BEZOGENE KORREKTURFAKTOREN BEI DER GASCHROMATOGRAPHIE DER SILYLZUCKER NACH SAURER WÄSSRIGER HYDROLYSE

Glucose	1.00	Rhamnose	1.16
Galaktose	1.06	Xylose	1.27
Mannose	1.15	Arabinose	1.24

TABELLE IV

AUF GLUCOSE BEZOGENE KORREKTURFAKTOREN BEI DER GASCHROMATOGRAPHIE DER SILYLIERTEN METHYLGLYKOSIDE NACH SAURER METHANOLYSE

Glucose	1.00	Rhamnose	1.16
Galaktose	1.04	Xylose	1.17
Mannose	1.08	Arabinose	1.20

TABELLE V

QUANTITATIVE ZUCKERBESTIMMUNG NACH HYDROLYSE DER METHODE I

Substanz	Molares Verhältnis					Gefundene Zucker
	Vorhandene Zucker					
	Gluc	Gal	Xyl	Arab	Rham	
Tomatin	2	1	1			2.00:1.03:1.02
Digitonin	2	2	1			2.00:1.93:0.98
Cyclamin	3		1	1		3.00:0.95:0.95
Cyclamin*	3		1	1		3.00:1.00:1.05
Parillin	3				1	3.00:1.04

* Nicht unter Standardbedingungen (siehe Experimenteller Teil).

Um die so gewonnenen Korrekturfaktoren zu prüfen, wurden jetzt Glykoside und Oligosaccharide unter Standardbedingungen (Methode 1 und 2) hydrolysiert und die Zucker silyliert und gaschromatographiert. Zur Ermittlung der Korrekturfaktoren waren die freien Zucker etwas kürzer hydrolysiert worden als jetzt die Glykoside und Oligosaccharide, da sie der Säure von Anfang an ausgesetzt waren, während die Zucker der Glykoside erst allmählich in Freiheit gesetzt wurden. Es entstand auch hierbei eine Fehlermöglichkeit, da einzelne Zucker sehr viel schneller als andere abhydrolysiert wurden und daher auch länger der Säure ausgesetzt waren.

Das Ergebnis einiger quantitativer Zuckerbestimmungen zeigen die Tabellen V und VI sowie die Figuren 1-4. In Fig. 2 ist ein Beispiel für eine Berechnung bei teilweisem Überlappen der Peaks gegeben.

TABELLE VI

QUANTITATIVE ZUCKERBESTIMMUNG NACH HYDROLYSE DER METHODE 2

Substanz	Molares Verhältnis					Gefundene Zucker
	Vorhandene Zucker					
	Gluc	Gal	Xyl	Arab	Rham	
Tomatin	2	1	1			2.00:0.98:1.03
Cyclamin	3		1	1		3.00:1.02:1.03
Eingewogene Zuckermischung	3			2	3	3.00:2.06:2.96
α -Hederin				1	1	1.00:0.98
Hederasaponin C	2			1	2	2.00:1.02:1.98
Lactose	1	1				1.00:0.99:1.94*
						1.00:1.03*

* Doppelbestimmung.

Aus den Tabellen V und VI sowie den Figuren 1-4 ist ersichtlich, dass die angegebene Methode sehr gut geeignet ist, die Zucker in Glykosiden und Oligosacchariden quantitativ zu bestimmen. Der Fehler liegt bei der Bestimmung nach Methode 1 bei 5 % während er bei der zweiten Methode 3 % nicht überschreitet. Damit ist eine Genauigkeit erreicht, die mit anderen Methoden nicht zu erzielen ist. Ausserdem ist dieses Verfahren der Zuckerbestimmung, sofern man einen Gaschromatographen besitzt, einfacher und weniger zeitraubend als die früheren Bestimmungen.

Der grössere Teil des Fehlers geht hierbei auf die Hydrolyse zurück, da entsprechende Zuckerbestimmungen ohne vorhergehende Säurebehandlung auf 1-2 % genau zu machen sind. Die Ermittlung von Absolutwerten ist grundsätzlich auch möglich. Sie ist jedoch recht umständlich und in den meisten Fällen auch nicht erforderlich.

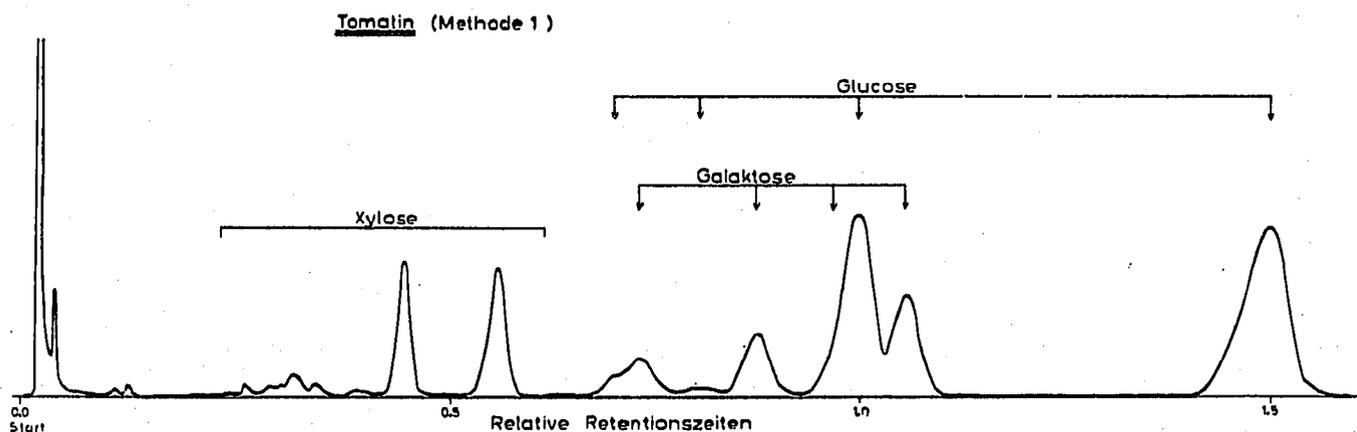


Fig. 1. Gaschromatogramm der silylierten Zucker aus Tomatin (Hydrolyse nach Methode 1). Trennung bei 190° an Silikonfett DC auf Kieselgur, Strömungsgeschwindigkeit 34 ml He/Min; Retentionszeiten bezogen auf Persilyl- α -glucose \equiv 1; absolute Retentionszeit für Persilyl- α -glucose = 55 Min.

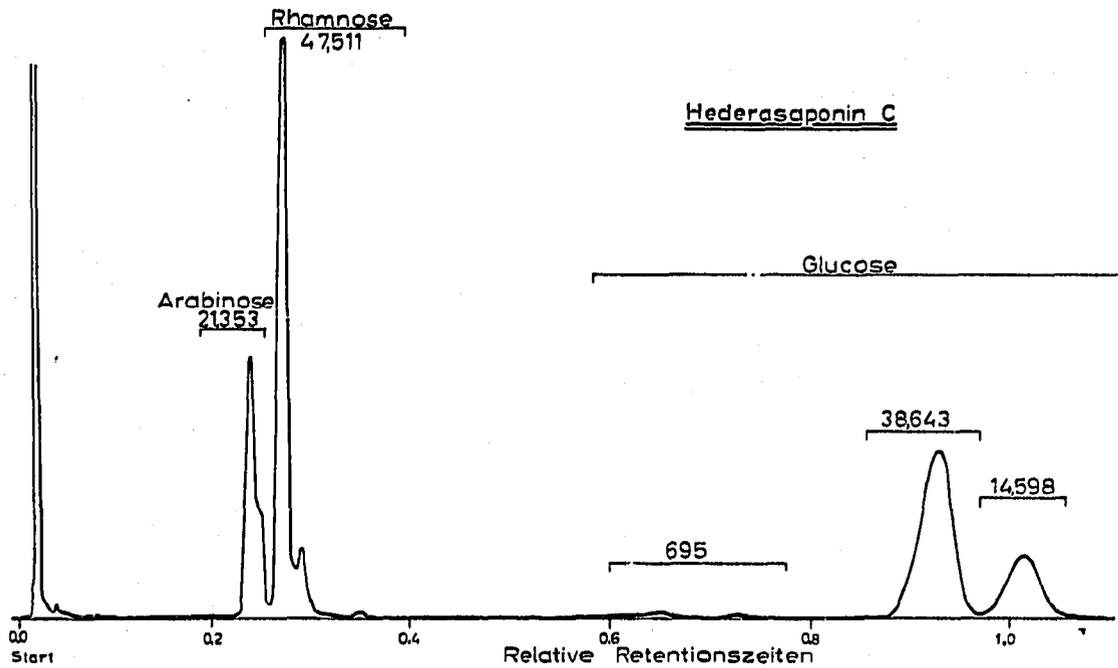


Fig. 2. Gaschromatogramm der silylierten Methylglykoside aus Hederasaponin C (Hydrolyse nach Methode 2). Trennungsbedingungen wie in Fig. 1. Quantitative Auswertung dieses Chromatogramms: Durch elektronische Integration wurden für die Peakflächen folgende Impulse erhalten: Arabinose 21,353 Imp., Rhamnose 47,511 Imp. und Glucose 53,936 Imp.; 9.5% der Fläche für die Arabinose (2,240) liegt unter den Rhamnose-Peaks (siehe Tabelle II) und muss daher der Arabinose zugezählt (23,593) und von der Rhamnose abgezogen (45,271) werden. Entsprechend müssen die 1.5% (690) des Rhamnose-Vorpeak berücksichtigt werden (22,903 bzw. 45,961). Nach Multiplikation mit den Korrekturfaktoren (1.20 bzw. 1.16) lässt sich das molare Verhältnis berechnen: 27,484 (1.02):53,315 (1.98):53,936 (2.00).

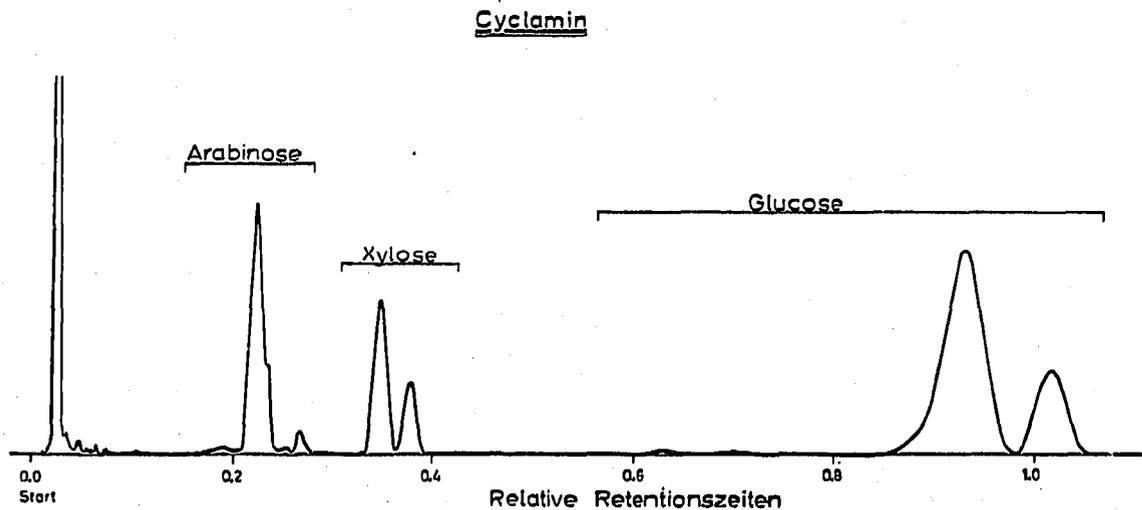


Fig. 3. Gaschromatogramm der silylierten Methylglykoside aus Cyclamin (Hydrolyse nach Methode 2). Trennungsbedingungen wie in Fig. 1.

Für eine Bestimmung benötigt man mindestens 5 mg, es werden am besten 5–50 mg für die Hydrolyse eingesetzt. Pro Zucker sollen optimal 100–200 γ eingespritzt werden. Bei Verwendung eines FID könnte diese Menge wesentlich verringert werden, doch müssten dann andere Korrekturfaktoren eingesetzt werden. Im allgemeinen werden jedoch 5 mg für eine quantitative Bestimmung zur Verfügung stehen.

Anzuwenden ist die Methode grundsätzlich für alle Glykoside, Oligo- und Polysaccharide, die mehr als eine Zuckerart und nicht andere Zucker als die angegebenen enthalten. Für Uronsäuren enthaltende Glykoside empfiehlt sich eine Doppel-

Tomatin (Methode 2)

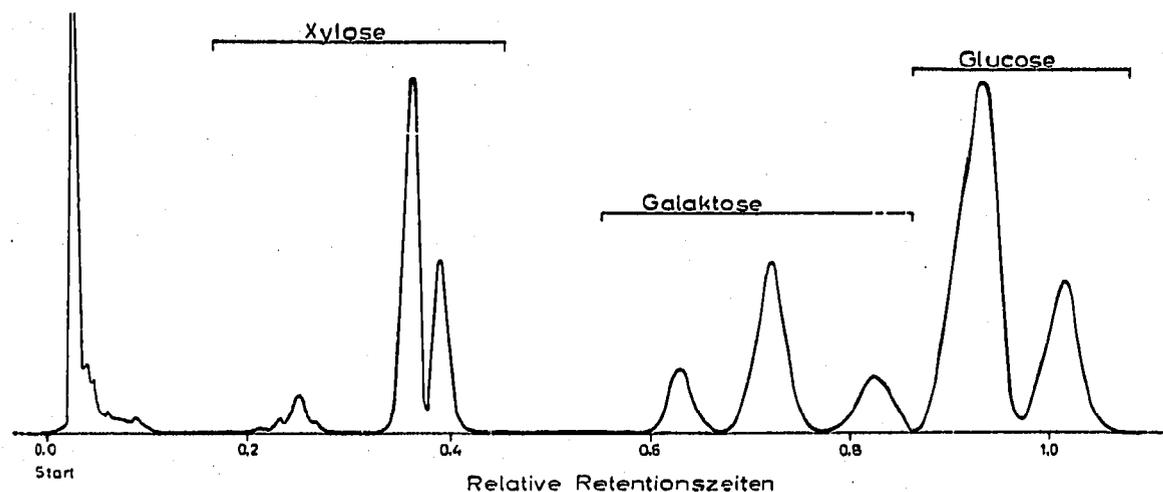


Fig. 4. Gaschromatogramm der silylierten Methylglykoside aus Tomatin (Hydrolyse nach Methode 2). Trennungsbedingungen wie in Fig. 1.

bestimmung, wobei in einem Falle nach der Hydrolyse die Uronsäure mit Dow 1 entfernt wird, im anderen Fall vor der Hydrolyse der mit Diazomethan hergestellte Methylester mit NaBH_4 zur Aldose reduziert wird. Aus der Differenz der beiden Bestimmungen lässt sich dann neben den Aldosen auch die Uronsäure bestimmen.

Müssen wegen der Natur des vorhandenen Glykosids andere Hydrolysebedingungen gewählt werden, so müssen auch die entsprechenden Korrekturfaktoren neu bestimmt werden. Am besten benutzt man dazu eine gleich oder ähnlich zusammengesetzte Mischung von Zuckern, wie man sie aus dem Glykosid erwartet. In den meisten Fällen wird man jedoch eine der beiden angegebenen Methoden zur Hydrolyse benutzen können, wobei häufig die Methanolyse vorzuziehen sein dürfte.

DANK

Herrn Prof. R. TSCHESCHE danke ich für die grosszügige Förderung meiner Arbeit, Herrn Prof. F. KORTE und Herrn Dr. U. CLAUSSEN für die Erlaubnis zur Benutzung ihres Gaschromatographen und Frl. L. WINTERFELD für die fleissige und geschickte Mitarbeit bei der Durchführung dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des molaren Verhältnisses von Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, Xylose und Arabinose in Glykosiden und Oligosacchariden ausgearbeitet. Dazu hydrolysierte man die Substanz unter standardisierten Bedingungen entweder mit wässriger oder methanolischer HCl. Die entstandenen Zucker bzw. deren Methylglykoside wurden silyliert und gaschromatographisch an einer Silikonfett DC-Säule getrennt. Mit Hilfe allgemein verwendbarer Korrekturfaktoren konnte aus den Peakflächen das molare Verhältnis der vorhandenen Zucker auf 3–5 % genau bestimmt werden.

SUMMARY

A new method was developed for the quantitative determination of the molar ratios of glucose, galactose, mannose, rhamnose, xylose and arabinose in glycosides and oligosaccharides. The substances were hydrolyzed under standard conditions, either with aqueous or with methanolic HCl. The sugars or methylglycosides formed were converted to trimethylsilyl derivatives and were separated by gas chromatography on a silicon grease DC column. By use of generally applicable correction factors the molar ratio of the existing sugars could be determined with an error of 3–5 %.

LITERATUR

- 1 R. TSCHESCHE UND G. WULFF, *Planta Med.*, 12 (1964) 272.
- 2 K. MACEK, in I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1963, S. 332 ff.
- 3 C. T. BISHOP, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Band 10, Interscience, New York, 1962, S. 1.
- 4 C. C. SWEELEY, R. BENTLEY, M. MAKITA UND W. W. WELLS, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2497.
- 5 C. C. SWEELEY UND B. WALKER, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1461.
- 6 R. KUHN, I. LÖW UND H. TRISCHMANN, *Chem. Ber.*, 90 (1957) 203.
- 7 R. TSCHESCHE UND G. WULFF, *Tetrahedron*, 19 (1963) 621.
- 8 R. TSCHESCHE, F. INCHAURRONDO UND G. WULFF, *Ann.*, 680 (1964) 107.
- 9 R. TSCHESCHE, R. KOTTLER UND G. WULFF, unveröffentlicht.
- 10 R. TSCHESCHE, W. SCHMIDT UND G. WULFF, unveröffentlicht.
- 11 E. J. HEDGLEY UND W. G. OVEREND, *Chem. Ind. (London)*, (1960) 378.
- 12 R. J. FERRIER, *Tetrahedron*, 18 (1962) 1149.
- 13 E. BAYER UND R. WIDDER, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1452.

J. Chromatog., 18 (1965) 285–296