

ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNGEN VON HEXOSAMIN- UND HEXURONSÄUREDERIVATEN ALS MOLYBDATKOMPLEXE

H. MAYER UND O. WESTPHAL

Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg im Br. (Deutschland)

(Eingegangen den 13. Oktober 1967)

SUMMARY

Electrophoretic separations of hexosamine and hexuronic acid derivatives as molybdate complexes

Representatives of natural hexosamines and hexuronic acids were examined for their separability in complex-forming molybdate buffers. The amino sugar alcohols of the classes 2-amino-2-deoxyhexitols, 2-amino-2,6-dideoxyhexitols and 3-amino-3,6-dideoxyhexitols, which can be easily obtained by reduction of the parent compounds with NaBH_4 , can be separated by electrophoresis of their negatively charged molybdate complexes at pH 5.0 within a fairly short time. The possible importance of this method for the characterisation of the reducing components of oligosaccharides is discussed, and its usefulness for the identification of amino sugars in hydrolysates was demonstrated for the lipopolysaccharide from *E. coli* O7:K7:H4 as an example. Amphoteric amino sugars—hexosaminuronic acids and muramic acid—can also be separated electrophoretically in a few hours without previous reduction. On the other hand, results obtained with unsubstituted hexuronic acids were, with a few exceptions, disappointing.

Die elektrophoretische Trennung von Polyhydroxy-Verbindungen in komplexbildenden Elektrolyten hat als Ergänzung zu den papierchromatographischen Verfahren in den letzten Jahren als analytische Methode zunehmend an Bedeutung gewonnen^{1,2}. Die Anwendung von saurem Molybdattpuffer als komplex-formendem Agens ist zuerst von FRAHN UND MILLS³ beschrieben worden. Umfangreiche Untersuchungen an Zuckern, Zuckeralkoholen und Cycliten sind in der Folge von BOURNE, HUTSON UND WEIGEL^{4,5} durchgeführt worden.

Aus bakteriellen Inhaltsstoffen (Kapsel-Substanzen, Lipopolysacchariden, Zucker-Nukleotiden, Antibiotica etc.) sind in den letzten Jahren eine ganze Reihe bisher unbekannter oder in Naturstoffen bisher nicht nachgewiesener Zucker isoliert und charakterisiert worden. Besonders weit verbreitet haben sich Aminozucker und unter diesen, Vertreter der Klasse der 6-Desoxyaminohexosen gefunden. Neben den ubiquitären Aminozuckern: Glucosamin, Galaktosamin und Muraminsäure, konnten Mannosamin⁶ und Vertreter der Klassen der 2-Amino-2,6-dideoxy-hexosen^{7,8}, der

3-Amino-3,6-didesoxy-hexosen⁹, der 4-Amino-4,6-didesoxy-hexosen¹⁰ und der 2-Amino-2-desoxy-hexuronsäuren¹¹ nachgewiesen werden. (Für zusammenfassende Übersichten sei auf Ref. 12, 13 und 8 verwiesen). Die Lipopolysaccharide der gram-negativen Bakterien und die Kapselpolysaccharide gram-negativer und gram-positiver Keime sind Teile der Antigenausstattung dieser Organismen (somatische (O)- und Kapsel (K)-Antigene): ihre polysaccharidischen Komponenten wiederum sind als Träger der serologischen Spezifität erkannt worden^{13,8}. Die chemische Erforschung der spezifitätsbestimmenden Strukturen wird durch ihren komplexen Aufbau erschwert (Heteropolysaccharide mit bis zu 8 Zuckerkomponenten sind bekannt)⁸. Zur Kenntnis der Feinstruktur werden aus Partialhydrolysaten Oligosaccharide isoliert, deren reduzierendes Ende durch NaBH₄-Reduktion erfasst werden kann. Eine papierchromatographische Abtrennung der auf diese Weise erhaltenen Zuckeralkohol-Komponenten von den korrespondierenden Zuckern ist in vielen Fällen schwierig oder langwierig. Durch Elektrophorese in Molybdatpuffer können solche Trennungen dagegen in wenigen Stunden erreicht werden. Bisher sind aber nur Derivate der Neutralzucker auf ihr Verhalten in Molybdatpuffer untersucht worden⁵. Die vorliegende Arbeit soll zeigen, dass auch bei Zuckerderivaten mit geladenen Gruppen (reduzierte Aminozucker, amphotere Aminozucker und Hexuronsäure-Derivate) gute Auftrennungen bei kleinem Substanzbedarf möglich sind.

Die Tatsache, dass sich viele Polyhydroxy-Verbindungen in schwach saurer Lösung mit Molybdat zu negativ geladenen Komplexen vereinigen, ist schon lange bekannt^{14,15}. Der chemische Aufbau der Komplexe ist aber bis heute nicht völlig geklärt und auch die strukturellen Voraussetzungen, denen Polyhydroxy-Verbindungen genügen müssen, um als Komplexpartner zu fungieren, sind unterschiedlich interpretiert worden. Aus dem Wanderungsverhalten ausgewählter Testverbindungen in Molybdat-Puffer von pH 5.0 haben BOURNE *et al.*⁴ für sechsgliedrige Ringsysteme drei benachbarte *cis*-ständige Hydroxylgruppen in der Reihenfolge: axial, äquatorial, axial, als bedingend für eine Komplexbildung gefordert. BAYER UND VOELTER¹⁶ wiesen aber darauf hin, dass für Pyranosen solche "dreizähligen" Komplexe aus sterischen Gründen unwahrscheinlich seien. Durch Messung der Drehwertsänderung von Pyranosen bei Zugabe von Molybdat bei verschiedenen pH-Werten, konnten sie auch bei Zuckern, die die von BOURNE *et al.* geforderten Strukturen nicht haben, Drehwertsänderungen und damit Komplexbildung nachweisen. BAYER UND VOELTER interpretieren ihre Beobachtungen auf folgende Weise: Ist für eine Pyranose in einer ihrer möglichen Konformationen die Ausbildung von zwei axialen Hydroxylgruppen in 1,3-Stellung möglich, dann wird diese zur Komplexbildung günstige Konformation abgefangen und dadurch das Gleichgewicht verschoben, was sich in der beobachteten Drehwertsänderung äussert. Diese Versuche zeigten auch, dass Pyranosen nur in dem engen pH-Bereich von 5.7–7.8 Komplexe bilden können, deren Stabilitätsmaxima bei pH 5.7–6.0 liegen¹⁶. Bei Zuckeralkoholen werden dagegen über einen weiten pH-Bereich (pH 1–8) Komplexe gebildet. In stark saurer Lösung liegen Dimolybdatkomplexe vor, während in schwach saurer Lösung—wie bei Sechsrings-Systemen—1:1-Komplexe diskutiert werden. Wir haben unsere Trennungen in Anlehnung an BOURNE *et al.*^{4,5} bei pH 5 durchgeführt, da hier der überwiegende Teil der untersuchten Zucker keine oder eine nur sehr begrenzte elektrophoretische Wanderung zeigt, die zugehörigen Zuckeralkohole jedoch, in fast allen Fällen, gute Wanderung und Ausbildung scharf begrenzter Zonen lieferten.

MATERIAL UND METHODEN

Substanzen: D-Glucosamin·HCl, D-Galaktosamin·HCl, D-Glucuronsäure, D-Glucuron und D-Galakturonsäure wurden von Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg, Deutschland; D-Mannosamin·HCl und N-Acetyl-neuraminsäure von Sigma, Chemical Company, St. Louis, Mo., U.S.A. bezogen. Methyl-4-acetamido-1,2,3-tri-O-acetyl-4,6-didesoxy- α -D-galaktopyranosid und Methyl-4-acetamido-4,6-didesoxy- α -D-glucopyranosid sind käufliche Produkte der Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., U.S.A. Die freien Zucker wurden nach der Vorschrift von STEVENS *et al.*¹⁷ aus den Derivaten erhalten. D-Galaktosaminuronsäure wurde aus Vi-Antigen¹¹, D-Mannosaminuronsäure aus dem K 7-Antigen von *E. coli* O14:K 7:H⁻ (Lit. 18) und der löslichen Polysaccharid-Fraktion (sPF) der *E. coli* K 12-Mutanten Gal 23 K⁻ (Lit. 19) isoliert. Für die Überlassung authentischer Substanzproben sind wir zu grossem Dank verpflichtet:

Dr. G. ASHWELL, Bethesda, Md. (3-Acetamido-3,6-didesoxy-D-galaktose),

Dr. R. BROSSMER, Heidelberg (2-Amino-2,6-didesoxy-D-glucose),

Dr. J. D. DUTCHER, New Brunswick, N.J. (3-Amino-3,6-didesoxy-D-mannose),

Prof. Dr. K. HEYNS, Hamburg (D-Glucosaminuronsäure),

Drs. B. UND K. JANN, Freiburg (Rhamnosamin und D-Mannuron),

Prof. Dr. R. W. JEANLOZ, Boston, Mass. (Muraminsäure),

Dr. R. C. RICHARDSON, Reading (Methyl-3-amino-3,6-didesoxy-L-glucosid und Methyl-3-acetamido-3,6-didesoxy-L-talosid),

Dr. N. SHARON, Rehovoth (D-Fucosamin) und

Dipl.-Chem. L. TARCSAY, Freiburg (L-Fucosamin).

Die freien Zucker wurden aus den N-Acetyl- und Methylglycosid-Derivaten durch Säurehydrolyse (4 N HCl, 2 Stunden bei 100° in zugeschmolzenen Ampullen) und nachfolgende Neutralisation im Vakuum über KOH/P₂O₅ erhalten. Zur Reduktion der Zuckerkomponenten wurden 1%ige Zuckerlösungen mit einem mindestens 15-fachen molaren Überschuss an NaBH₄ (2.5% in N/100 NaOH) versetzt. Nach Zugabe der Hälfte an NaBH₄-Lösung, wurden die Proben 6 Stunden bei Raumtemperatur gehalten, dann die zweite Hälfte zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht im Kühlraum bei 4° belassen. Nach Ansäuern mit Eisessig wurde Borsäure durch wiederholtes Einengen in Anwesenheit von Methanol als flüchtiger Methyl-ester entfernt. Auf eine Abtrennung von Natriumacetat wurde in den meisten Fällen verzichtet, da es die elektrophoretischen Trennungen nicht stört. In einigen Fällen wurde elektrophoretisch entsalzt (Pyridin-Eisessig-Puffer von pH 5.3)²⁰. Durch Anfärben von Leitstreifen konnten die Zuckerderivate auf dem Elektropherogramm lokalisiert werden. Nach Elution mit N/100 HCl wurden die Eluate im Vakuum über KOH/P₂O₅ zur Trockne gebracht.

Elektrophorese-Apparatur und Versuchsbedingungen

Alle elektrophoretischen Trennungen wurden in der von KICKHÖFEN UND WARTH²¹ beschriebenen vertikalen Trennkammer durchgeführt, bei der die im Papierstreifen entstehende Joule'sche Wärme durch ein inertes Lösungsmittel abgeleitet wird. Für die Trennung analytischer Substanzmengen hat sich die im Format 15 × 70 cm erhältliche Papiersorte 2043 b Mg1 (Fa. Schleicher u. Schüll, Düren, Deutschland) gut bewährt, die eine effektive Trennlänge von etwa 65 cm ergibt. Die Trennungen wurden bei 3000 Volt, entsprechend Feldstärken von 45–47 V/cm, in auf 5–10°

vorgekühlten Kammern durchgeführt. Die Substanzen wurden strichförmig, senkrecht zur Laufrichtung, als 1%ige wässrige Lösungen mit Mikrokonstruktions-Pipetten (1–3 μ l) aufgetragen. Als Bezugssubstanzen wurden bei allen Versuchen Glycerin und Mannitol (oder bei längeren Laufzeiten Glycerin und Glucosaminitol) seitlich mitaufgetragen. Glycerin, das mit Molybdat keinen Komplex bildet^{5,10} zeigt das Ausmass der kathodisch gerichteten Endosmose an. Auf Mannitol oder Glucosaminitol wurden die gefundenen Laufstrecken bezogen (M_{Mannitol} - und $M_{\text{Glucosaminitol}}$ -Werte). Mannitol wandert unter den beschriebenen Versuchsbedingungen etwa 20 cm/h, Glucosaminitol etwa 10.5 cm/h.

Puffer-Systeme

Die meisten Trennungen wurden in dem von BOURNE *et al.*⁴ beschriebenen Molybdatpuffer vom pH 5.0 durchgeführt. (25 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1 l H_2O werden mit conc. H_2SO_4 (3.4–3.5 ml) auf pH 5.0 eingestellt). Gelegentlich wurde auch der von KENNEDY²² beschriebene Puffer benutzt, der aber nur wenige Tage beständig war, dann bildete sich ein umfangreiches Sediment. Nach Aufbringen der Substanzen auf das Elektropherogramm wurde der Puffer beidseitig der Startlinie mit einem weichen Pinsel so aufgetragen, dass die gegeneinanderlaufenden Pufferzonen an der Startlinie zusammentrafen. Die Anode befand sich im oberen Gefäss, so dass die Molybdatkomplexe aufsteigend getrennt wurden. Die Verwendung von V2A-Elektroden²¹ erfordert ein häufigeres Erneuern des Puffers, da Anodenmaterial in Lösung geht und sich nach etwa 10-stündigem Betrieb im Anodengefäss ein gelber Niederschlag bildet. Durch diese elektrochemischen Vorgänge ändert sich der pH-Wert des Puffers und bewirkt eine Verschiebung der Wanderungsgeschwindigkeiten (M_{Mannitol} -Werte). Die Trennungen werden dadurch nicht wesentlich beeinträchtigt, doch müssen Vergleichsproben mitaufgetragen werden. Die in Tabellen I und II aufgeführten M -Werte sind mit frischen Pufferfüllungen erhalten worden.

Anfärbung der Elektropherogramme

Die Elektropherogramme wurden bei Raumtemperatur oder im Trockenschrank bei 100° getrocknet. Die Substanzen wurden im Durchziehverfahren mit $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ nach TREVELYAN²³ lokalisiert. Nach Durchziehen durch die äthanolische NaOH -Lösung wurden die Elektropherogramme für kurze Zeit in einen Trockenschrank (100°) bei offener Tür eingehängt, um die Empfindlichkeit des Nachweises für Zuckeralkohole zu erhöhen. 1–2 μ g Galactosaminitol, als 1 cm langer Strich am Startpunkt aufgetragen, konnten auf diese Weise nach 1-stündiger Laufzeit noch gut nachgewiesen werden. Dagegen ist ein Nachweis der Aminozucker-Derivate mit Ninhydrin (0.25 %ig in Aceton) durch die Anwesenheit des Molybdatpuffers erheblich beeinträchtigt.

Zur Identifizierung der Aminozucker des Lipopolysaccharids aus E. coli O7:K7:H4:

Lipopolysaccharid wurde nach der Phenol/Wasser-Extraktionsmethode²⁴ aus den Bakterien erhalten und mittels Ultrazentrifugation gereinigt. 2 mg Lipopolysaccharid wurden in 200 μ l 4 N HCl in zugeschmolzenen Ampullen 2 Stunden bei 100° hydrolysiert. Nach Neutralisation und Einengen des Hydrolysats im Vakuum über $\text{KOH}/\text{P}_2\text{O}_5$ wurden die basischen Komponenten aus dem Gesamthydrolysat durch Elektrophorese in Pyridin-Acetatpuffer, pH 5.3 (Pyridin–Eisessig– H_2O = 10:4:86; v/v), abgetrennt.

TABELLE I

ELEKTROPHORETISCHE WANDERUNG REDUZIERTER HEXOSEN, 2-AMINOHEXOSEN UND AMINO-6-DESOXYHEXOSEN IN MOLYBDAT-PUFFER VON pH 5.0 IN DER HOCHSPANNUNGSELEKTROPHORESE

Positive *M*-Werte zeigen anodische, negative kathodische Wanderung an.

Substanzklasse	Konfiguration	Trivialname	<i>M</i> Mannitol	<i>M</i> Glucosaminitol
Hexitole	D-manno-	D-Mannitol	+ 1.00 (Def.)	+ 1.68
	D-gluc-	Sorbit (D-Glucitol)	+ 1.08	+ 1.80
	D-galakt-	Dulcit (Galaktitol)	+ 1.11	+ 1.86
2-Amino-2,6-didesoxyhexitole	D-manno-	D-Mannosaminitol	+ 0.64	
	D-gluc-	D-Glucosaminitol	+ 0.60	+ 1.00 (Def.)
	D-galakt-	D-Galaktosaminitol	+ 0.54	
2-Amino-2,6-didesoxyhexitole	manno-	Rhamnosaminitol		+ 0.50
	D-gluc-	D-Quinovosaminitol		+ 0.20
	D-galakt-	D-Fucosaminitol		- 0.04
	L-galakt-	L-Fucosaminitol		- 0.04
3-Amino-3,6-didesoxyhexitole	L-talo-	3-Amino-3,6-didesoxy-L-talitol		+ 0.94
	D-manno-	Mycosaminitol		- 0.05
	L-gluc-	3-Amino-3-desoxy-L-quinovitol		- 0.31
	D-galakt-	3-Amino-3-desoxy-D-fucitol		+ 0.43
4-Amino-4,6-didesoxyhexitole	D-gluc-	Viosaminitol		+ 0.52
	D-galakt-	Thomosaminitol		+ 0.39

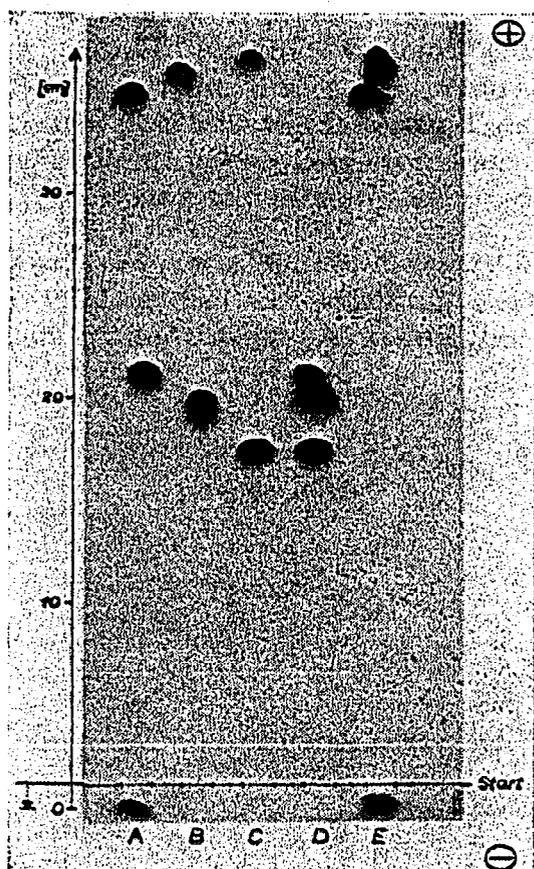


Fig. 1. Auftrennung von Hexitolen und 2-Amino-2-desoxy-hexitolen bei Elektrophorese in Molybdätpuffer (pH 5.0, 3000 V, 45 V/cm, 2 Stunden). —→ gibt die tatsächliche Wanderung an. - - - - - → gibt das Ausmass der Endosmose an. Aufgetragen wurden (von unten nach oben): (A) Glycerin, D-Mannosaminitol, D-Mannitol; (B) D-Glucosaminitol, Sorbit (D-Glucitol); (C) D-Galaktosaminitol, Dulcitol (Galaktitol); (D) D-Galaktosaminitol, D-Glucosaminitol, D-Mannosaminitol; (E) Glycerin, D-Mannitol, D-Glucitol und Galaktitol. Von Glycerin wurden 30 μg , von den anderen Komponenten je 10 μg aufgetragen.

Nach Lokalisation der Aminozucker anhand von angefärbten Leitstreifen und ihrer Elution mit $N/100$ HCl wurde das Gesamteluat im Vakuum zur Trockne gebracht, dann in wenig Wasser aufgenommen und die Lösung halbiert. Eine Hälfte diente als Vergleichsprobe, die andere wurde mit NaBH_4 reduziert und nach Ansäuern von Borsäure befreit (siehe oben!). Mit entsprechenden Vergleichssubstanzen wurden die beiden Proben nun durch Molybdätpuffer-Elektrophorese bei 3000 V in 2 Stunden aufgetrennt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die durch Hochspannungselektrophorese im Molybdätpuffer von pH 5.0 bei Feldstärken von 45–47 V/cm erzielten Trennungen sind in Tabellen I und II zusammengefasst. Die untersuchten Verbindungen sind nach Substanzklassen und sterischer Konfiguration geordnet. Soweit erreichbar, haben wir von den aufgeführten Substanzklassen jeweils die Vertreter der *manno*-, der *gluco*- und der *galakto*-Konfiguration untersucht. Sie sind auch die in Naturstoffen überwiegend angetroffenen Komponenten.

TABELLE II

ELEKTROPHORETISCHE WANDERUNG VON HEXURONSÄUREN UND HEXURONSÄURE-DERIVATEN, SOWIE AMPHOTERER HEXOSAMIN-DERIVATE IN MOLYBDAT-PUFFER VON pH 5,0 IN DER HOCHSPANNUNGSELEKTROPHORESE

Substanzklasse	Kon- figuration	Trivialname	Mannitol	Mucosaminitol	Bemerkung*
Hexuronsäuren	D-manno-	D-Mannuronsäure	+ 1.08		l
	D-gluco-	D-Glucuronsäure	+ 0.98		l
	D-galacto-	D-Galakturonsäure	+ 1.1-1.3		l
Hexurone	D-manno-	D-Mannuron	+ 0.17	+ (1.1-1.9)	l
	D-gluco-	D-Glucuron		+ 0.29	s
2-Amino-2-desoxy-hexuronsäuren	D-manno-	D-Mannosaminuronsäure	+ 0.78	+ 1.30	l
	D-gluco-	D-Glucosaminuronsäure	+ 0.65	+ 1.10	l
	D-galacto-	D-Galaktosaminuronsäure	+ 0.44	+ 0.72	s
Reduzierte 2-Amino-2-desoxy-hexuronsäuren	D-gluco-	D-Glucosaminitol-uronsäure		+ 1.00	s
	D-galacto-	D-Galaktosaminitol-uronsäure		+ 1.11	l
Hexosamin-Derivate	D-gluco-	Muraminsäure		+ 0.16	s
	D-manno-	N-Acetyl-neuraminsäure	+ 0.60	+ 1.13	l

* Bemerkung: l = langgezogener Fleck; s = scharfbegrenzte Zone.

Trennung der Hexitole

D-Mannitol, D-Glucitol (Sorbit) und Galaktitol (Dulcit) wandern sehr rasch, etwa 20 cm/h, und geben scharf-konturierte Zonen. Die Auftrennung ist aber recht gering und nur nach 2-stündigem Lauf signifikant (siehe Fig. 1). Im Gegensatz zu fast allen anderen Substanzklassen wandert der Vertreter mit *galakto*-Konfiguration (Dulcit) am schnellsten, während D-Mannitol die kleinste Wanderung zeigt.

Trennung der 2-Amino-2-desoxy-hexitole

Die drei untersuchten Vertreter dieser Substanzklasse haben etwa die Hälfte der Wanderungsgeschwindigkeit der Hexitole. Eine gute Auftrennung ist durch 2-

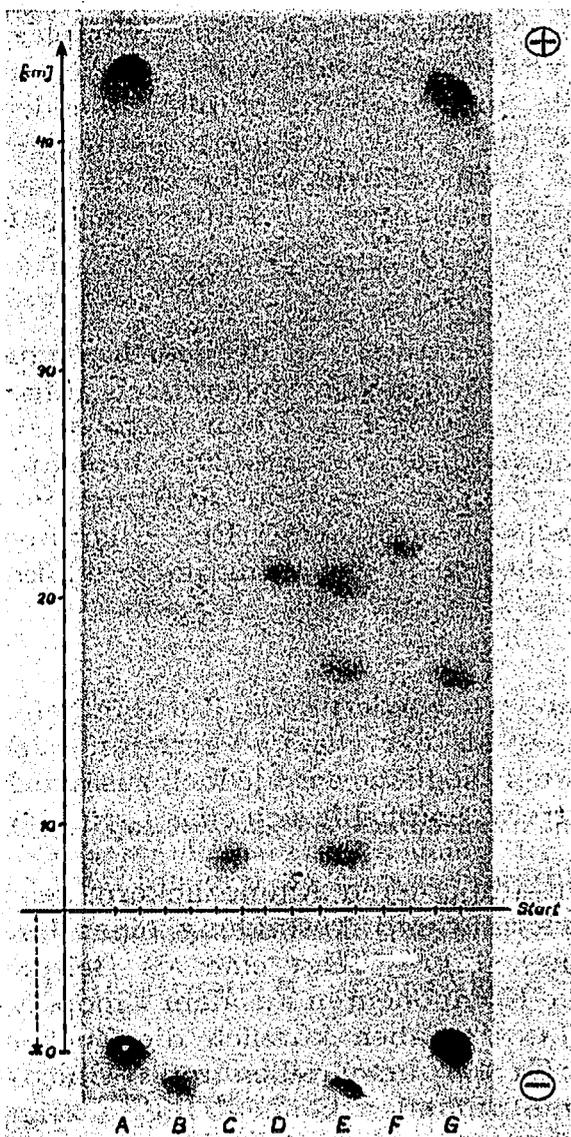


Fig. 2. Auftrennung von 2-Amino-2,6-dideoxy-hexitolen und 4-Amino-4,6-dideoxy-hexitolen bei Elektrophorese in Molybdätpuffer (pH 5.0, 3000 V, 45 V/cm, 4 Stunden). Zeichenerklärung siehe Fig. 1. Aufgetragen wurden (von unten nach oben): (A) Glycerin, Glucosaminitol; (B) D-Fucosaminitol; (C) D-Quinovosaminitol; (D) Rhamnosaminitol; (E) D-Fucosaminitol, D-Quinovosaminitol, Rhamnosaminitol, 4-Amino-4,6-dideoxy-D-glucitol und 4-Amino-4,6-dideoxy-D-galaktitol; (F) 4-Amino-4,6-dideoxy-D-glucitol; (G) Glycerin, 4-Amino-4,6-dideoxy-D-galaktitol. Von Glycerin wurden 30 μg , von den anderen Komponenten 10 μg aufgetragen.

oder 3-stündige Elektrophorese zu erzielen (siehe Fig. 1). Die nicht reduzierten Aminozucker geben unscharfe, langgezogene Streifen in Nähe der Startlinie und können leicht abgetrennt werden (vgl. Fig. 3). Auffallend ist die Vertauschung der relativen Wanderungsgeschwindigkeiten im Vergleich zu den unsubstituierten Hexitolen (siehe Fig. 1).

Trennung der 2-Amino-2,6-didesoxy-hexitole

Die Desoxy-Gruppierung an C₆ bewirkt eine sehr starke Herabsetzung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit bei den Substanzen mit *gluco*- und *galakto*-Konfiguration, während Rhamnosaminitol (*manno*-Konfiguration) im Vergleich zu Mannosaminitol nur wenig langsamer wandert. Fucosaminitol—in D- und L-Konfiguration—zeigt praktisch keine Wanderung; dennoch muss eine Komplexbildung eingetreten sein, da sonst—infolge der positiven Ladung—eine starke kathodische Wanderung zu erwarten wäre, wie sie auch in nichtkomplexbildenden Puffern von gleichem pH-Wert zu beobachten ist. Fig. 2 zeigt eine nach 4-stündiger Elektrophorese erhaltene Trennung. Die grossen Unterschiede in der elektrophoretischen Wanderung gestatten aber schon eindeutige Trennungen bei kürzeren Laufzeiten.

Trennung der 3-Amino-3,6-didesoxy-hexitole

Bei dieser Substanzklasse stand uns auch der Vertreter mit der *talo*-Konfiguration zur Verfügung. Die 4 Isomeren sind in 1–2 Stunden elektrophoretisch getrennt. Mycosaminitol und 3-Amino-3,6-didesoxy-L-glucitol wandern kathodisch, während die beiden anderen Vertreter dieser Klasse anodisch wandern. Die chromatographische Analyse von 3-Amino-3,6-didesoxy-hexosen ist durch das Auftreten von Doppelflecken in vielen Chromatographiegemischen sehr erschwert²⁵. Eine Charakterisierung dieser Zucker durch Molybdat-Elektrophorese ihrer Reduktionsprodukte bietet sich an.

Trennung der 4-Amino-4,6-didesoxy-hexitole

Von den beiden getesteten Verbindungen wanderte wiederum der Zuckeralkohol mit der *gluco*-Konfiguration (Viosaminitol) rascher als der *galakto*-Vertreter. Eine Trennung ist durch 1–2 stündige Elektrophoresedauer möglich: wird jedoch zusätzlich eine Differenzierung von Rhamnosaminitol angestrebt, empfiehlt sich eine 4-stündige Laufzeit (siehe Fig. 2).

Im Gegensatz zu fast allen getesteten nicht-amphoteren Aminozuckern, zeigt auch Viosamin eine ausgeprägte anodische Wanderung und Ausbildung einer hinlänglich begrenzten Hauptzone (Schwanzbildung). Fig. 3 zeigt eine als Beispiel durchgeführte Charakterisierung der Aminozucker-Komponenten aus dem Lipopolysaccharid von *E. coli* O7:K7:H4. JANN UND JANN¹⁰ haben kürzlich die Zuckerbausteine des O7-Lipopolysaccharids (*E. coli* O7:K1:H⁻) beschrieben und D-Glucosamin und D-Viosamin als basische Komponenten auffinden können. Fig. 3 zeigt, dass auch das Lipopolysaccharid von *E. coli* O7:K7:H4, wie zu erwarten, die gleichen Aminozucker-Komponenten aufweist.

Trennung der Hexuronsäuren

Die freien Hexuronsäuren wandern sehr rasch (20–25 cm/h), doch sind die Zonen verwaschen. Besonders D-Galakturonsäure zeigt starke Schwanzbildung.

D-Glucuronsäure und D-Glucuron sind jedoch sehr gut trennbar (M_{Mannitol} -Werte: +0.98 und +0.17).

Trennung der Hexosaminosäuren

Im Gegensatz zu den unsubstituierten Hexuronsäuren wurden mit 2-Amino-2-desoxy-hexuronsäuren gute Trennergebnisse erzielt. Galaktosaminuronsäure ergibt einen scharf-konturierten Fleck, die Glucosamin- und Mannosaminuronsäure-Zonen

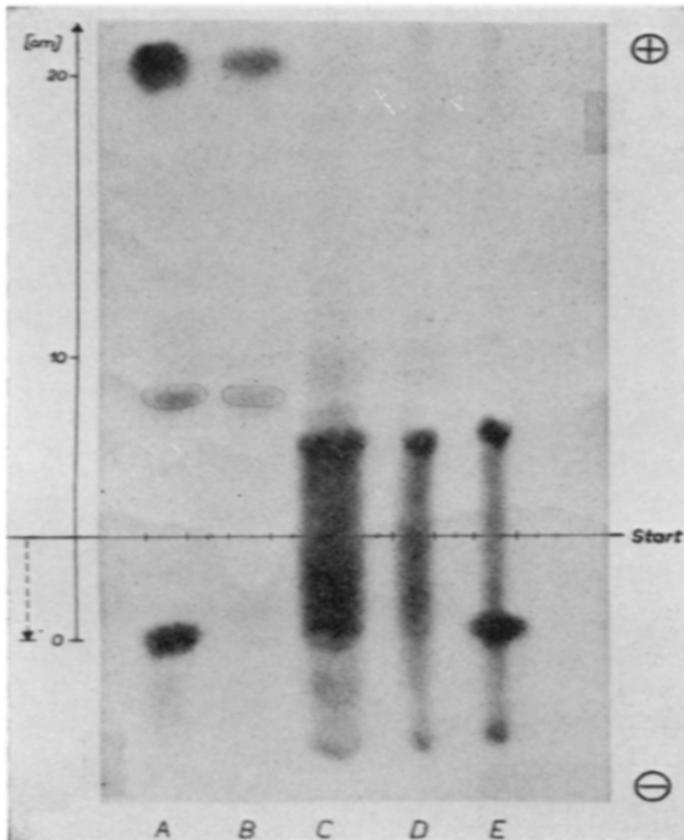


Fig. 3. Identifizierung der Aminozucker im Lipopolysaccharid-Hydrolysat aus *E. coli* O7:K7:H4 durch elektrophoretische Trennung der NaBH_4 -reduzierten Aminozucker (pH 5.0, 3000 V, 45 V/cm, 2 Stunden). Aufgetragen wurden (von unten nach oben): (A) Glycerin (30 μg), 4-Amino-4,6-dideoxy-D-glucitol (Viosaminitol), D-Glucosaminitol (je 10 μg); (B) Aminozucker-Fraktion aus 500 μg Lipopolysaccharid, NaBH_4 -reduziert; (C) Aminozucker-Fraktion aus 500 μg Lipopolysaccharid, unreduziert; (D) D-Glucosamin und 4-Amino-4,6-dideoxy-D-glucose (Viosamin) (je 10 μg); (E) Glycerin (30 μg) und Viosamin (10 μg).

sind etwas in die Länge gezogen, doch noch gut auswertbar. Durch Papierchromatographie sind die beiden letztgenannten Verbindungen nur schlecht zu trennen²⁶. Ihre unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten als Molybdatkomplexe sollte ihre Identifizierung wesentlich erleichtern. Reduktion der Aminohexuronsäuren verändert die Wanderungsgeschwindigkeiten nur wenig. (Verminderung bei D-Glucosaminuronsäure, Steigerung bei D-Galaktosaminuronsäure). Inwieweit die *al*-Formen²⁷ der Hexosaminuronsäuren bei der Komplexbildung beteiligt sind, soll hier nicht diskutiert werden.

Verhalten von Muraminsäure und N-Acetyl-neuraminsäure bei Molybdätpuffer-Elektrophorese

Der Vollständigkeit halber wurden auch Muraminsäure und N-Acetyl-neuraminsäure mit in die Untersuchung einbezogen. Muraminsäure gibt bei kleiner Wanderungsgeschwindigkeit ($M_{\text{Glucosaminitol}} = +0.18$) eine scharfbegrenzte Zone; N-Acetyl-neuraminsäure wandert wesentlich rascher ($M_{\text{Glucosaminitol}} = +1.13$), aber die sich ausbildende Zone ist verwaschen.

DANK

Für ausgezeichnete technische Assistenz danken wir Frau URSULA KULKE und Fräulein BRIGITTE EGER. Der Fraunhofer-Gesellschaft, München, danken wir für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Repräsentative Vertreter natürlicher Hexosamine und Hexuronsäuren wurden auf ihre Trennbarkeit in komplex-bildendem Molybdätpuffer untersucht. Die durch NaBH_4 -Reduktion aus den Muttersubstanzen leicht zugänglichen Aminozuckeralkohole der Substanzklassen der 2-Amino-2-desoxy-hexitole, der 2-Amino-2,6-didesoxyhexitole, der 3-Amino-3,6-didesoxy-hexitole können durch Elektrophorese ihrer negativ geladenen Molybdät-Komplexe bei pH 5.0 mit geringem Zeitaufwand getrennt werden. Die mögliche Bedeutung dieser Methodik zur Charakterisierung der reduzierenden Komponenten in Oligosacchariden wird diskutiert und die Anwendbarkeit für die Identifizierung von Aminozuckern in Hydrolysaten an dem Beispiel des Lipopolysaccharids aus *E. coli* O7:K7:H4 aufgezeigt. Amphotere Aminozucker—Hexosaminuronsäuren und Muraminsäure—können auch ohne vorherige Reduktion in wenigen Stunden elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dagegen waren die mit unsubstituierten Hexuronsäuren erzielten Ergebnisse, mit wenigen Ausnahmen, unbefriedigend.

LITERATUR

- 1 A. B. FOSTER, *Advan. Carbohydrate Chem.*, 12 (1957) 81.
- 2 A. B. FOSTER, in R. L. WHISTLER UND M. L. WOLFROM (Herausgeber), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 1, Academic Press, New York und London, 1962, p. 51, et seq.
- 3 J. L. FRAHN UND J. A. MILLS, *Australian J. Chem.*, 12 (1959) 65.
- 4 E. J. BOURNE, D. H. HUTSON UND H. WEIGEL, *J. Chem. Soc.*, (1960) 4252.
- 5 E. J. BOURNE, D. H. HUTSON UND H. WEIGEL, *J. Chem. Soc.*, (1961) 35.
- 6 E. RÜDE UND W. F. GOEBEL, *J. Exptl. Med.*, 116 (1962) 73.
- 7 M. J. CRUMPTON UND D. A. L. DAVIES, *Biochem. J.*, 70 (1958) 729;
E. J. SMITH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15 (1964) 593;
S. A. BARKER, J. S. BRIMACOMBE, J. J. HOW UND M. STACEY, *Nature*, 189 (1961) 303.
- 8 F. ØRSKOV, I. ØRSKOV, B. JANN, K. JANN, E. MÜLLER-SEITZ UND O. WESTPHAL, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 71 (1967) 339.
- 9 G. ASHWELL UND W. A. VOLK, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 4549;
R. A. RAFF UND R. W. WHEAT, *Biochim. Biophys. Acta*, 127 (1966) 271;
B. JANN, K. JANN UND E. MÜLLER-SEITZ, *Nature*, 215 (1967) 170;
O. LÜDERITZ, E. RUSCHMANN, O. WESTPHAL, R. RAFF UND R. WHEAT, *J. Bacteriol.*, 93 (1967) 1681.

- 10 J. L. STROMINGER UND S. S. SCOTT, *Biochim. Biophys. Acta*, 35 (1959) 552;
C. L. STEVENS, P. BLUMBERGS, D. H. OTTERBACH, J. L. STROMINGER, M. MATSUHASHI UND
D. N. DIETZLER, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 2937;
C. L. STEVENS, P. BLUMBERGS, F. A. DANIHAR, J. L. STROMINGER, M. MATSUHASHI, D. N.
DIETZLER, S. SUZUKI, T. OKAZAKI, K. SUGIMOTO UND R. OKAZAKI, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964)
2939;
R. W. WHEAT, E. L. ROLLINS UND J. M. LEATHERWOOD, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9
(1962) 120;
B. JANN UND K. JANN, *European J. Biochem.*, 2 (1967) 26.
- 11 W. R. CLARK, J. McLAUGHLIN UND M. E. WEBSTER, *J. Biol. Chem.*, 230 (1958) 81.
K. HEYNS, G. KIESSLING, W. LINDENBERG, H. PAULSEN UND M. E. WEBSTER, *Chem. Ber.*, 92
(1959) 2435;
A. R. WILLIAMSON UND S. ZAMENHOF, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2255;
S. HANESSIAN UND T. H. HASKELL, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2758;
H. R. PERKINS, *Biochem. J.*, 86 (1963) 475.
- 12 N. SHARON, in E. A. BALAZS UND R. W. JEANLOZ (Herausgeber), *The Amino Sugars*, Vol. IIa,
Academic Press, New York und London, 1965, p. 2, et seq.
- 13 O. LÜDERITZ, A. M. STAUB UND O. WESTPHAL, *Bacteriol. Rev.*, 30 (1966) 192.
- 14 D. GERNEZ, *Compt. Rend.*, 112 (1891) 1360.
- 15 A. HONNOLAITRE, *Ann. Chim. (Paris)*, 3 (1925) 5.
- 16 E. BAYER UND W. VOELTER, *Ann. Chem.*, 696 (1966) 194.
- 17 C. L. STEVENS, P. BLUMBERGS UND D. H. OTTERBACH, *J. Org. Chem.*, 31 (1966) 2817;
C. L. STEVENS, P. BLUMBERGS, F. A. DANIHAR, D. H. OTTERBACH UND K. G. TAYLOR, *J. Org.
Chem.*, 31 (1966) 2822.
- 18 H. MAYER UND O. WESTPHAL, in Vorbereitung.
- 19 H. MAYER, A. M. C. RAPIN UND H. M. KALCKAR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53 (1965) 459.
- 20 D. A. R. SIMMONS, O. LÜDERITZ UND O. WESTPHAL, *Biochem. J.*, 97 (1965) 807.
- 21 B. KICKHÖFEN UND R. WARTH, in Vorbereitung.
- 22 D. A. KENNEDY, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 180.
- 23 W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER UND J. S. HARRISON, *Nature*, 166 (1950) 444.
- 24 O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ UND F. BISTER, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 148.
- 25 E. MÜLLER-SEITZ, *Doktorarbeit*, Universität Freiburg, 1967.
- 26 H. R. PERKINS, *Biochem. J.*, 86 (1963) 475.
- 27 E. BAYER UND R. WIDDER, *Ann. Chem.*, 686 (1965) 197.