

CHROM. 3374

ZUR IDENTIFIZIERUNG VON POLYSACCHARIDEN

NACHWEIS DER ZUCKERBAUSTEINE DURCH DÜNNSCICHT-
CHROMATOGRAPHIE UND INFRAROTSPEKTROSKOPIE

HERBERT GÜNTHER* UND ANTON SCHWEIGER**

Institut für Chemie und Physik, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach/Ofr. (Deutschland)
(Eingegangen den 8. Januar 1968)

SUMMARY

Identification of polysaccharides. Detection of sugar components by thin-layer chromatography and infrared spectroscopy

A method for the identification of sugars and uronic acids as components of polysaccharides of various origin was developed. The sample (e.g. pure substances, mucopolysaccharides of muscle or additives to food) was hydrolyzed by a cation exchange resin. The resulting mixture of compounds was separated on cellulose thin layer plates. Isolated bands of sugars were pressed into KBr disks after elution and identified by their infrared spectra. The separated uronic acids were converted into their cinchonic salts, whose infrared spectra allowed a differentiation of D-glucuronic, D-galacturonic and D-mannuronic acid.

EINLEITUNG

Der Nachweis endogener und zugesetzter Polysaccharide (Quellstoffe) in biologischem Material und Lebensmitteln ist infolge eines grossen Überschusses an störenden anderen Stoffen erschwert. Da die Quellstoffe infolge ihrer geringen Konzentration von 0.5 bis 1.0 % als solche kaum identifiziert werden können^{1,2}, haben GRAU UND SCHWEIGER^{3,4} ein Verfahren entwickelt, bei dem ein Säurehydrolysat dieser Substanzen auf Celluloseschichten getrennt wird. Bei der sauren Hydrolyse können allerdings gewisse Schwierigkeiten auftreten:

(1) Es kommt zu Reaktionen der freiwerdenden Zucker mit den aus Proteinen in Freiheit gesetzten Aminosäuren. Die dabei gebildeten braun gefärbten Produkte wirken sich störend auf weitere Identifizierungsreaktionen aus.

(2) Uronsäuren können während der Hydrolyse abgebaut werden^{5,6}.

(3) Die Hydrolyseprodukte vereinigen sich in manchen Fällen sekundär zu Disacchariden⁷.

* Jetzige Anschrift Staatl. Chem. Untersuchungsanstalt, 89 Augsburg, Annastr. 16, Deutschland.

** Jetzige Anschrift Max Planck Institut für Eiweiss- und Lederforschung, 8 München, Schillerstr. 46, Deutschland.

Um diese Schwierigkeiten zu vermeiden, wandten wir die Hydrolyse an Ionenaustauschern nach HAAB, ANASTASSIADIS UND COMMON^{5,6} an. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass es möglich ist, Quellstoffe in reiner Form und als Zusatz, sowie Polysaccharide des Muskelgewebes mit Hilfe einer Kombination von Dünnschichtchromatographie und Infrarotspektroskopie zu identifizieren.

MATERIAL UND METHODEN

Die Ausrüstung zur Dünnschichtchromatographie stammte von der Firma Desaga, Heidelberg. Zur Aufnahme der Infrarotspektren mit Hilfe der KBr-Press-technik wurde ein Gerät der Firma Perkin-Elmer, Überlingen "Infracord 137" und ein Gerät der Firma Beckmann, München "IR 10" verwendet.

Alle Reagentien waren p.A. und stammten von der Firma Merck, Darmstadt. Als Trägermaterial für die Dünnschichtchromatographie wurde das Pulver MN 300 HR der Firma Macherey und Nagel, Düren verwendet. Als Kaliumbromid wurde KBr für Spektroskopie benutzt, Pectinase stammte von der Firma Serva, Heidelberg und Cinchonin (rein) von der Firma Schuchardt, München. Der Enzymtest auf Galactose stammte von der Firma Worthington-Biochemical Corp. Freehold/N.J., U.S.A.

1. Aufarbeitung der Probe und Chromatographie des Hydrolysates

Die Probe wird nach einer evtl. notwendigen Entfettung mit Petroläther und Entzuckerung mit 50 %igem Äthanol (vergl. 3) mit deionisiertem Wasser kurz aufgekocht. Man zentrifugiert die ausgefallenen Proteine und andere unlösliche Stoffe ab und versetzt den Überstand, der die gelösten Polysaccharide enthält mit 1 vol 96 % Äthanol. Die Polysaccharide werden nach einigen Stunden abzentrifugiert. Das Material wird in 5 bis 10 ml deionisiertem Wasser aufgenommen und mit 1 bis 3 g Kationenaustauscher Merck I in der H⁺-Form pro 20 bis 50 mg Polysaccharid bei 105° im Trockenschrank unter mehrfachem Umschütteln 12 Std. stehen gelassen. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen des Austauschers kann man durch Filtration über eine Säule mit Kieselguhr-Kohle im Verhältnis 1:1 die Huminstoffe entfernen. Das klare, helle Filtrat wird auf eine Celluloseschicht vom 0.5 mm Dicke, die einmal mit dem Laufmittel vorgewaschen wurde, in Form eines Striches aufgetragen. Als Laufmittel wurden verwendet: (1) Isopropanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (8:8:1:4) und (2) Äthylacetat-Pyridin-Wasser (2:1:2). Die Plattenränder werden nach dem Lauf zur Lokalisierung der Banden in einer Breite von 0.5 bis 1.0 cm mit Anisidin-Phthalat⁸ angefärbt und etwa 20 bis 30 min auf 50° erwärmt. Die Banden werden abgeschabt und das Pulver wird mit Äthanol-Wasser (1:1) eluiert. Das Eluat wird nach Filtration durch einen Glasfiliertiegel auf ein kleines Volumen eingengt. Bei Anfärbung auf Uronsäuren mit Naphthoresorcin in 2 %iger Trichloressigsäure^{9,10} muss mindestens 30 min lang auf 105° erhitzt werden. Die Uronsäuren treten dann als blaue Banden nach einigen Stunden hervor.

Beim Nachweis von Pectin versetzt man 5 g der nicht vorbehandelten Probe mit 100 mg Pectinase und einigen ml deionisiertem Wasser, lässt 15 min bei 30° und pH 5.5 stehen¹¹, zentrifugiert den Rückstand ab und lässt die Lösung durch einen Kationenaustauscher Merck I in der H⁺-Form laufen. Das Filtrat wird auf die Celluloseschicht aufgetragen.

2. Darstellung der Cinchonin-Derivate und Infrarotspektroskopie

Zur Darstellung der Cinchoninsalze der Uronsäuren wurden 10 ml des alkoholischen Eluates (5 bis 10 mg Substanz aus der Celluloseschicht) mit 5 bis 10 mg Cinchonin versetzt und über Nacht stehen gelassen¹². Bei den Lactonen muss vorher der Ring bei pH 8.0 (30 min) geöffnet werden; das Reagenz wird nach Ansäuern mit Essigsäure zugegeben¹³. Durch Reiben mit einem Glasstab fällt das farblose Salz aus. Nach dem Einengen wird das überschüssige Reagenz mit 1.0 ml Chloroform entfernt. Der Rückstand wird in Wasser gelöst und eingeengt.

Man überführt 0.5 bis 1.0 ml des eingeengten Eluates oder des gelösten Cinchonin-Derivates in kleine Glasschälchen, in die man vorher etwa 200 bis 220 mg KBr eingewogen hat. Die Schalen werden in einen Exsiccator gesetzt und über Nacht unter Vakuum stehen gelassen. Der trockene Rückstand wird herausgekratzt, im Achatmörser gut verrieben und nach dem Wägen zu einer durchsichtigen Scheibe gepresst. Die Einwaage an Substanz soll 1.0 bis 1.5 mg nicht überschreiten, andernfalls muss mit KBr "verdünnt" werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

(1) Bei der Hydrolyse von pflanzlichen Polysacchariden können die Pentosen Arabinose, Xylose, Ribose, die Hexosen Galactose, Glucose, Mannose, die Methylpentose Rhamnose und die Uronsäuren Galacturonsäure, Glucuronsäure, Mannuronsäure, Guluronsäure in verschiedenen Konzentrationen frei werden. Dazu kommen bei tierischen Polysacchariden Iduronsäure (aus dem Chondroitinsulfat B) und Glucuronsäure.

Bei mineralsaurer Hydrolyse entstehen aus den Monosen und Uronsäuren durch Sekundärreaktionen Oligomere, vor allem Dimere in geringer Konzentration⁷. Diese Beobachtung konnte durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Die Laufwerte dieser Produkte bei der Chromatographie liegen in gleicher Höhe wie die von natürlich vorkommenden Disacchariden und Uronsäuren (vergl. Tabelle I); eine Interferenz lässt sich nicht vermeiden. Neu gebildete Oligosaccharide konnten durch eine zweite saure Hydrolyse in einfache Zucker gespalten werden.

(2) Eine Anzahl von pflanzlichen Polysacchariden (Agar, Johannisbrotkern-

TABELLE I

R_G -WERTE EINIGER ZUCKER

Bezogen auf R_F -Wert Glucose = 1.0 nach zweimaliger Chromatographie im System 2 (Äthylacetat-Pyridin-Wasser, 2:1:2, beide Phasen).

Substanz	R_G	Nachweisgrenze mit Aminoanilin (μg)	Nachweisgrenze mit Anisidin- Phthalat (μg)
Raffinose	0.42	1-2	
Lactose	0.53	0.5	
Trehalose	0.62	5	
Maltose	0.71	0.5	
Saccharose	0.84	0.5	
Glucuronsäure	0.50	—	0.5
Galacturonsäure	0.44	—	0.5

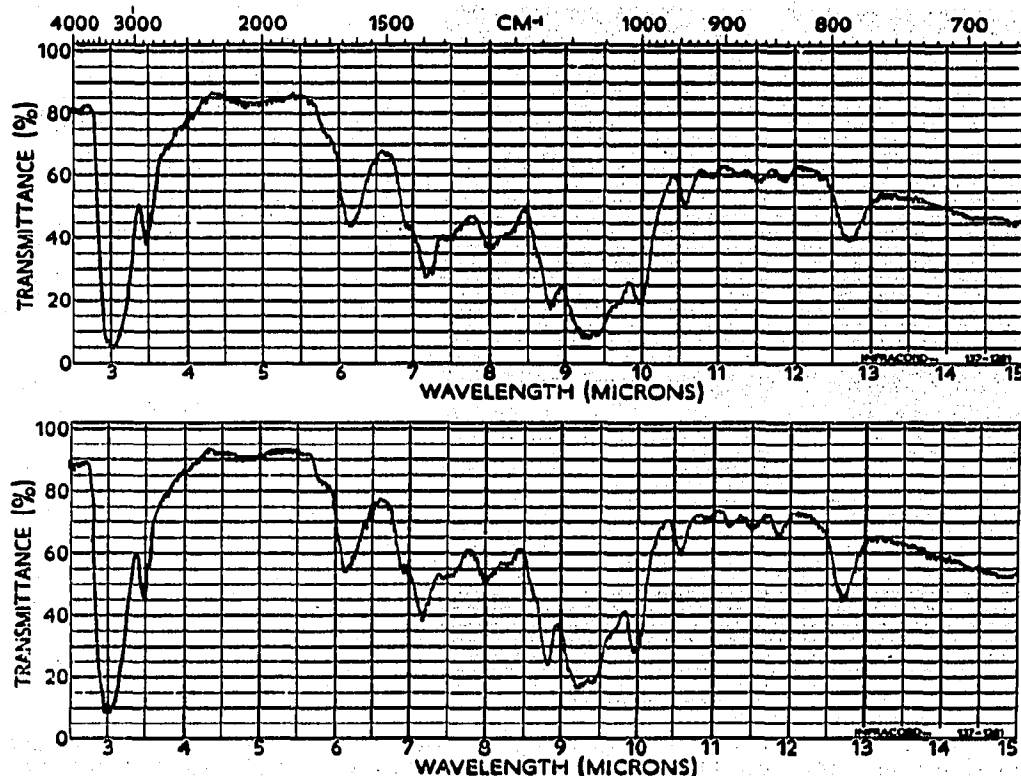


Fig. 1. Infrarotspektrum von Arabinose. Oben: Reinsubstanz nach Chromatographie; unten: aus Lebensmittel als 1%iger Zusatz isoliert (Austauscherhydrolyse).

mehl) wurde nach der Austauscher-Hydrolyse analysiert. Als Beispiel eines neutralen Zuckers wurde das Verhalten der Arabinose genommen. Sie wurde aus der Celluloseschicht nach der Chromatographie eluiert. Das Infrarotspektrum wurde aufgenommen; es stimmte mit dem von TIPSON UND ISBELL¹⁴ angegebenen überein (Fig. 1). Ebenso lässt sich Xylose aus pflanzlichen Polysacchariden nachweisen. Ribose kann als *p*-Phenylhydrazon durch das Infrarotspektrum eindeutig nachgewiesen werden¹⁵. Dagegen war das Spektrum anderer Zucker wie z.B. der Galactose weniger gut zur Identifizierung geeignet, da es erst im Bereich über 15 μ ausgeprägte Banden aufweist. Dieser Zucker konnte schneller und sicherer mit einem enzymatischen Test, z.B. mit Galactostat, auf den Celluloseschichten nachgewiesen werden.

Das Verhalten von Polymeren, welche Uronsäuren enthalten wurde eingehend untersucht.

Fig. 2 zeigt die Auftrennung eines schwefelsauren Hydrolysates von Pectin auf einer Celluloseschicht. In der mit (a) bezeichneten Zone befindet sich die Galacturonsäure zusammen mit sekundär gebildeten Produkten und Resten von Polygalacturonsäure. Die Fig. 3 bringt zum Vergleich die Auftrennung eines Hydrolysates, das durch enzymatische Hydrolyse oder durch Hydrolyse am Ionenaustauscher aus Pectin gewonnen wurde. Hierbei waren die Bedingungen des Nachweises bewusst ungünstig gewählt, da das Pectin zu einer Fleischkonserve zugesetzt war, also neben einem grossen Überschuss an Proteinen und Fett vorlag. Dennoch ist die Galacturonsäure als Hauptbestandteil des Hydrolysates (b in Fig. 3) deutlich zu erkennen. Sie konnte auch als Cinchonin-Derivat durch das Infrarotspektrum nachgewiesen werden (Fig. 4).

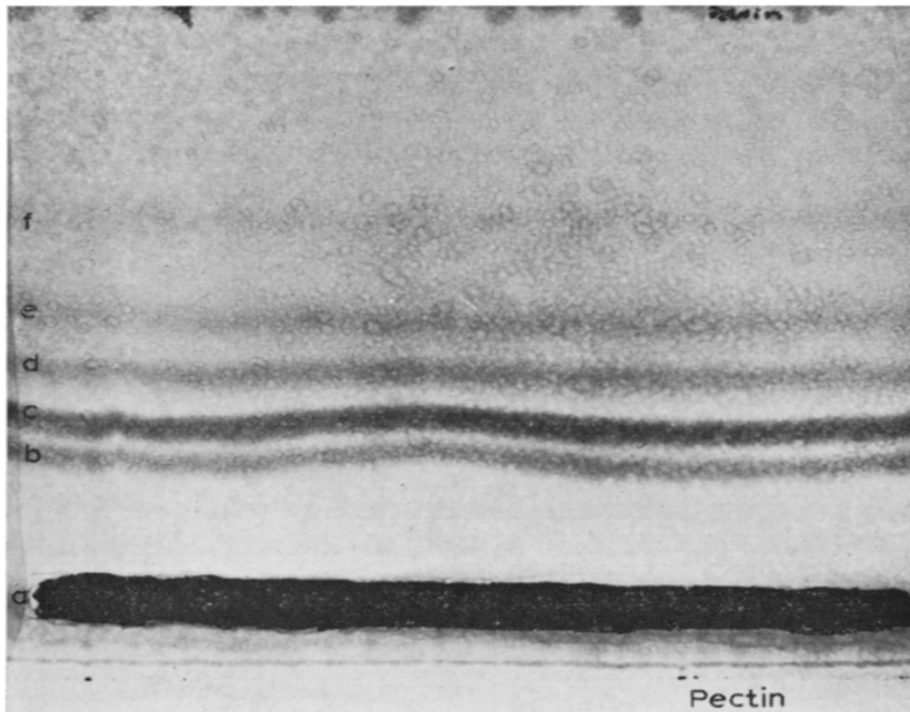


Fig. 2. Dünnschichtchromatogramm eines Pectinhydrolysates nach Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure auf Cellulosepulver MN 300 HR, System 2. Anfärbung mit Anisidin-Phthalat. Banden von unten nach oben: a = Uronsäure bzw. abgeschabte Oligosaccharide; b = Galactose; c = Glucose; d = Arabinose; e = Xylose; f = Rhamnose.

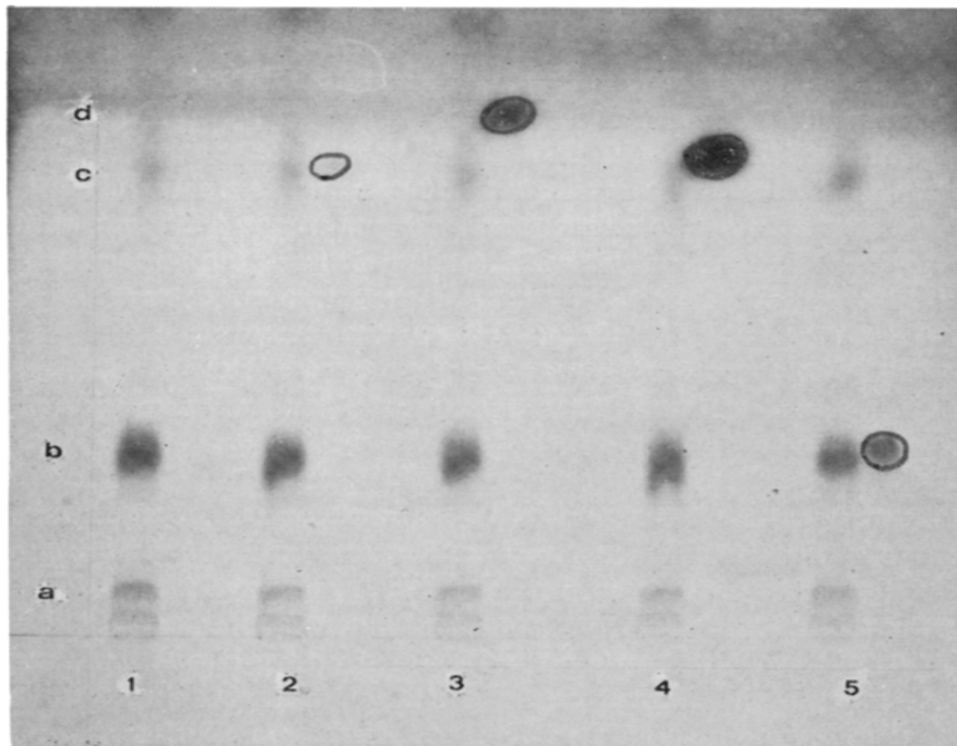


Fig. 3. Dünnschichtchromatogramm eines Pectinhydrolysates nach Hydrolyse mit Pectinase, System 1. Anfärbung mit Anisidin-Phthalat. a = Nicht gespaltener Anteil Polygalacturonsäure; b = Galacturonsäure; c = Glucose; d = Xylose. Referenzsubstanzen rechts vom Startpunkt zugegeben: 2 = Glucose; 3 = Xylose; 4 = Arabinose; 5 = Galacturonsäure.

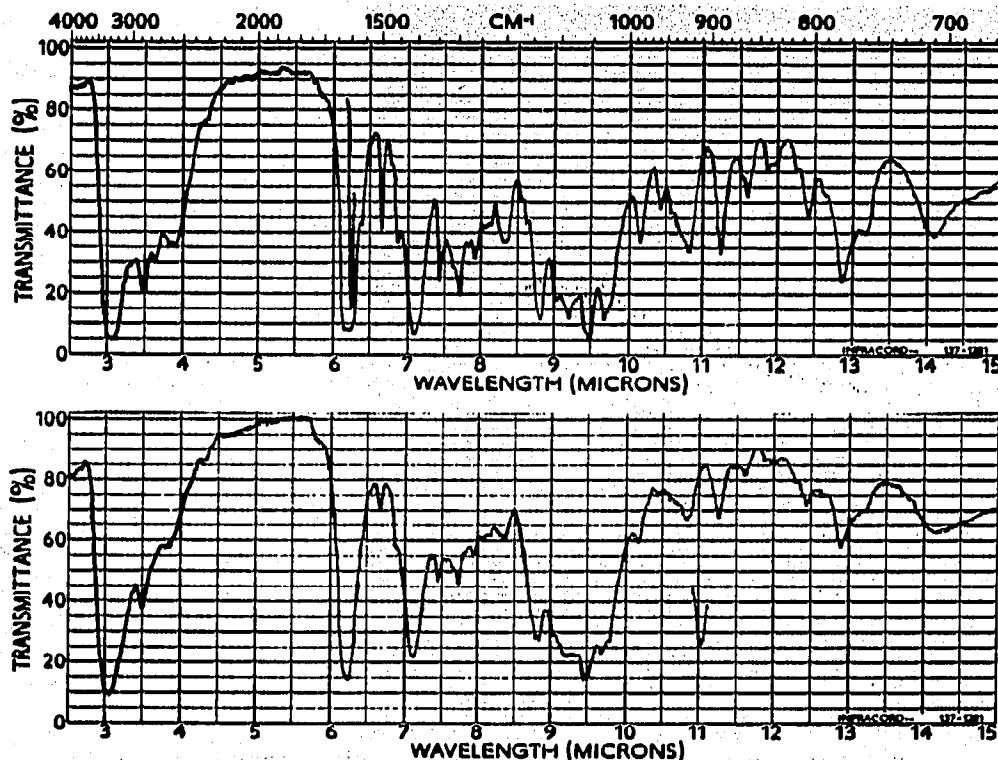


Fig. 4. Infrarotspektrum von Galacturonsäure-Cinchoninsalz. Oben: Reinsubstanz nach Chromatographie aus Cellulosepulver isoliert; unten: aus mit Pectin versetztem Material isoliert (Pectinase-Hydrolyse).

(3) Eine weitere Polyuronverbindung, die durch mineralische Hydrolyse weitgehend zerstört wird, ist das Alginat, welches vor allem aus verschiedenen Meeresalgen isoliert wird. Alginat enthält nach FISCHER UND DÖRFEL¹⁶ neben Mannuronsäure grössere Mengen Guluronsäure; dies wurde durch HAUG *et al.* bestätigt^{13,17,18}. Unsere Vorversuche mit Reinsubstanzen zeigten, dass die Guluronsäure im System 1 (vergl. Methoden) zu etwa gleichen Teilen als Lacton und als freie Säure läuft. Die Mannuronsäure dagegen liegt unter den Bedingungen der Hydrolyse und der Chromatographie überwiegend als Lacton vor, das sich gut von anderen Substanzen des Hydrolysates abtrennen lässt (Substanz (f) in Fig. 5). Das Mannuronsäure-Lacton ist nach Hydrolyse von Alginaten mit Ionenaustauscher im Dünnschichtchromatogramm sichtbar (Fig. 5). Es konnte aus dem Chromatogramm eluiert werden; nach Ringöffnung

TABELLE II

R_G -WERTE* VON URONSÄUREN UND TYPISCHEN I.R.-BANDEN IHRER CINCHONINSALZE**

Substanz	Freie Säure	Lacton	Wellenlänge (μ)
Galacturonsäure	0.40		9.50-10.80-14.20
Glucuronsäure	0.46		8.60-10.55-13.50-14.80
Guluronsäure	0.53	1.50	
Mannuronsäure	0.56	1.28	7.15-12.05-13.25

* Einmalige Chromatographie im System 1.

** Wellenlänge in Micron.

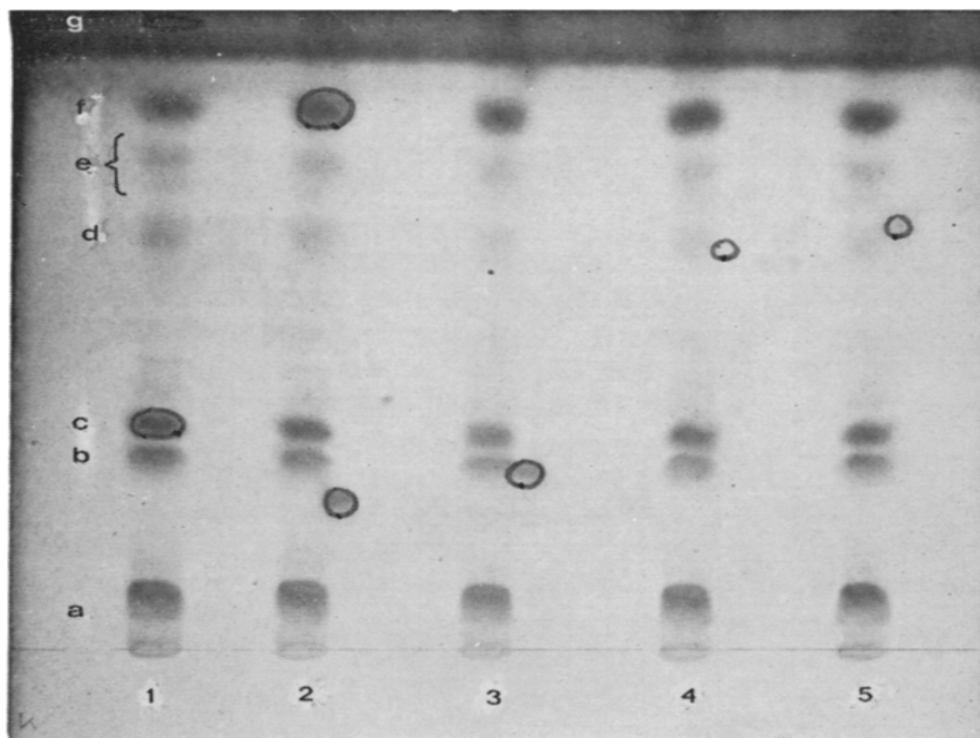


Fig. 5. Dünnschichtchromatogramm eines Alginat-Hydrolysates mit Ionenaustauscher (auf Cellulosepulver MN 300 HR nach zweimaligem Lauf). a = Polyuronsäuren; b = fraglich (Glucuronsäure); c = Guluronsäure; d = Glucose; e = Pentosen; f = Mannuronsäurelacton; g = Guluronsäurelacton. Zusätze zum Hydrolysat: 1 = Guluronsäure; 2 = Galacturonsäure (unten); 2 = Mannuronsäure (oben); 3 = Glucuronsäure; 4 = Glucose; 5 = Arabinose. Zusätze 2 (unten) 3-5 rechts neben der Auftragstelle.

wurde es in das Cinchonin-Derivat übergeführt. Das Infrarotspektrum des Derivates ist in Fig. 6 wiedergegeben. Es ist wichtig, dass sich dieses Spektrum eindeutig von den Spektren der Cinchoninsalze von Galacturonsäure (Fig. 4) und Glucuronsäure (Fig. 7) unterscheidet. Aus diesem Grund wurde die Mannuronsäure und nicht die Guluronsäure zur Identifizierung von Alginaten herangezogen. In der Tabelle II sind nochmals die R_G -Werte im System I und die typischen IR-Absorptionsbanden der Cinchoninsalze der verschiedenen Uronsäuren zusammengefasst.

Nach den angeführten Ergebnissen ist es möglich, die in Hydrolysaten von pflanzlichen Polysacchariden enthaltenen Hexuronsäuren durch ihre Infrarotspektren zu unterscheiden.

DANK

Wir sind Herrn Dr. ARNE HAUG vom Norwegischen Institut für Seetangforschung in Trondheim für die freundliche Überlassung von Reinsubstanzen von Mannuronsäure und Guluronsäure zu Dank verpflichtet. Ferner danken wir Herrn Prof. Dr. E. FAHR, Organisch-Chemisches Institut der Universität Würzburg, für die Anfertigung der Infrarotspektren der Cinchoninsalze der Mannuronsäure, Dr. H. ISBELL vom National Bureau of Standards in Washington für die freundliche Überlassung des Infrarotspektrums der Mannuronsäure und Frl. A. BADERSCHNEIDER für ihre wertvolle technische Mitarbeit.

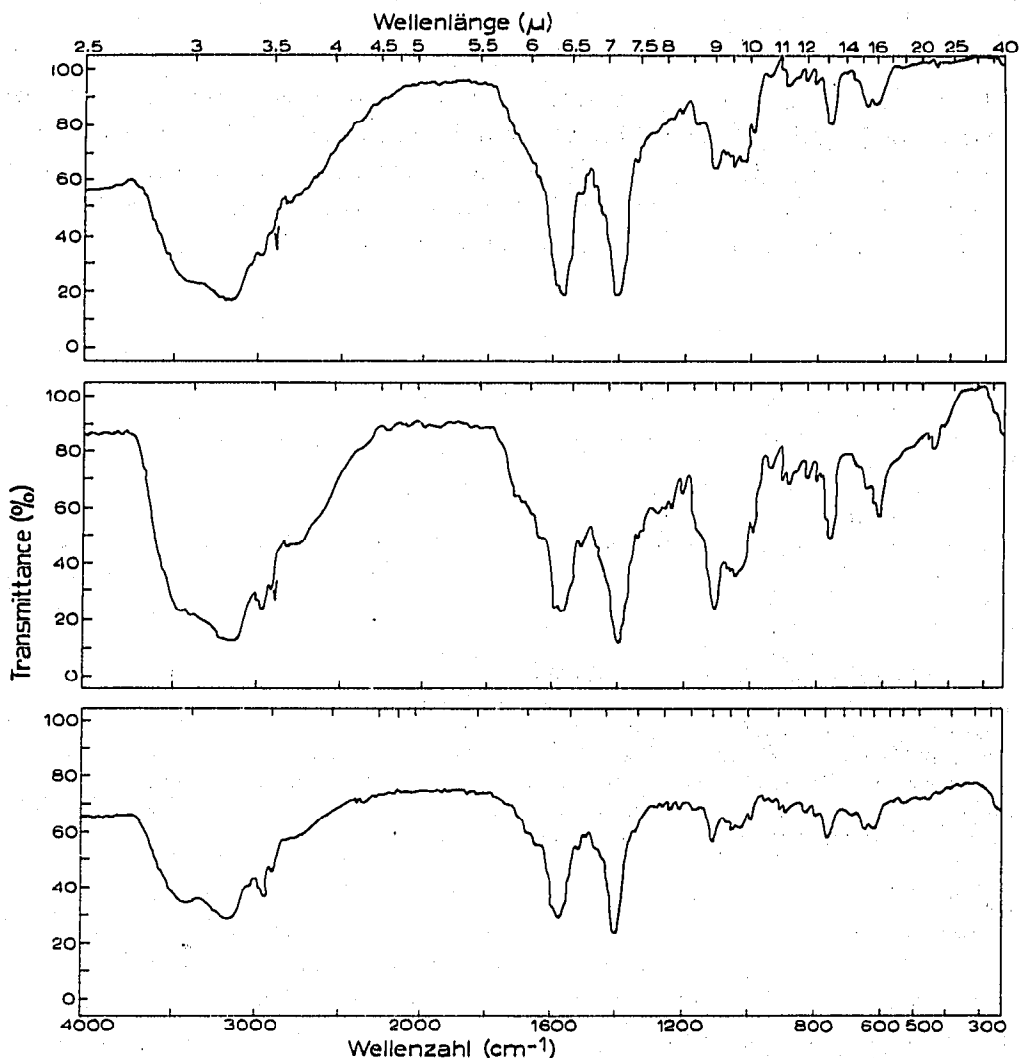


Fig. 6. Infrarotspektren von Cinchoninsalzen der Mannuronsäure nach Dünnschichtchromatographie. Oben: Reinsubstanz; Mitte: aus Alginatprobe 1 (Substanz von Fig. 5); unten: aus Alginatprobe 2.

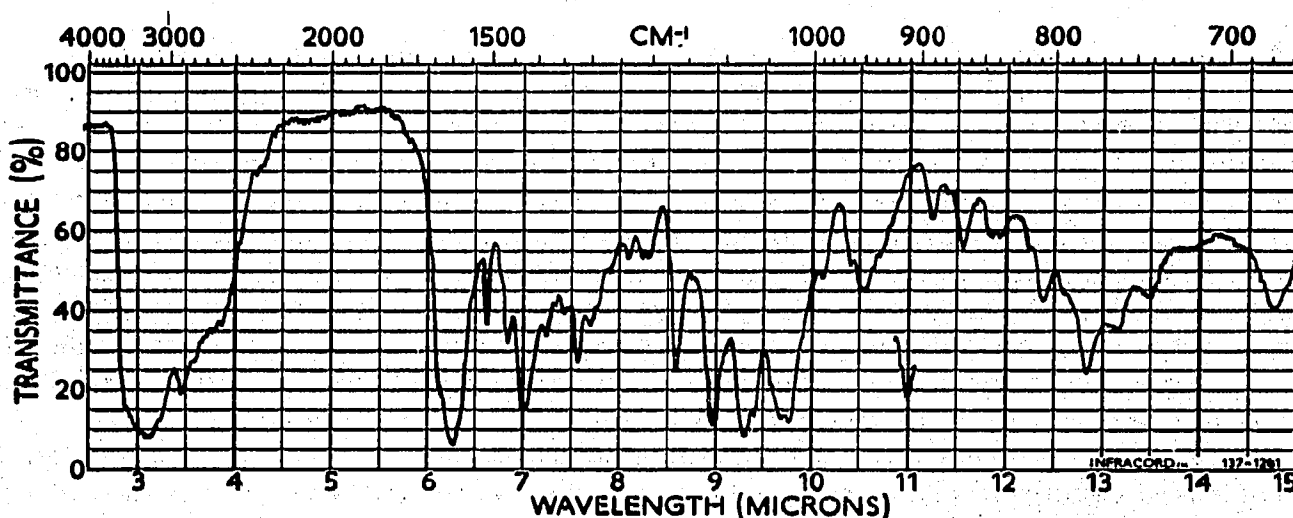


Fig. 7. Infrarotspektrum von Cinchoninsalz der Glucuronsäure nach Dünnschichtchromatographie.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode angegeben mit der Zuckerbausteine und vor allem Uronsäuren aus pflanzlichen Quellstoffen in Reinsubstanz als auch aus biologischem Material sowie Lebensmitteln mit Hilfe von Ionenaustauschern schonend isoliert werden können. Sie werden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie an Celluloseschichten aufgetrennt und durch Infrarotspektren identifiziert.

LITERATUR

- 1 E. LETZIG, *Z. Lebensm.-Untersuch. Forsch.*, 96 (1953) 178.
- 2 E. LETZIG, *Deut. Lebensm.-Rundschau*, 51 (1955) 41.
- 3 R. GRAU UND A. SCHWEIGER, *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 119 (1963) 210.
- 4 A. SCHWEIGER, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 374.
- 5 V. HAAB UND P. ANASTASSIADIS, *Can. J. Biochem.*, 39 (1961) 671.
- 6 P. ANASTASSIADIS UND R. COMMON, *Can. J. Biochem.*, 36 (1958) 413.
- 7 A. CLOTTEN UND R. CLOTTEN, *Hochspannungselektrophorese*, Thieme, Stuttgart, 1962, p. 106.
- 8 B. PRIDHAM, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1967.
- 9 F. ISHERWOOD UND N. JERMYN, *Biochem. J.*, 48 (1951) 515.
- 10 S. PARTRIDGE, *Nature*, 158 (1956) 270.
- 11 W. BOCK, *Ernährungsforschung*, 7 (1963) 561.
- 12 F. EHRLICH UND FR. SCHUBERT, *Chem. Ber.*, 62 (1929) 2012.
- 13 A. HAUG UND B. LARSEN, *Acta Chem. Scand.*, 16 (1962) 1908.
- 14 ST. TIPSON UND H. ISBELL, *J. Res. Natl. Bur. Std.*, 66A (1962) 31.
- 15 H. GÜNTHER UND A. SCHWEIGER, *J. Food Sci.*, 31 (1966) 300.
- 16 F. FISCHER UND H. DÖRFEL, *Z. Physiol. Chem.*, 301 (1955) 224 und 302 (1955) 186.
- 17 A. HAUG UND B. LARSEN, *Proc. 4th Intern. Seaweed Symp.*, Pergamon, Oxford, New York, 1963.
- 18 A. HAUG, B. LARSEN UND O. SMIDRØD, *Acta Chem. Scand.*, 20 (1966) 183.

J. Chromatog., 34 (1968) 498-506