

CHROM. 4590

## DIE GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE VON ZUCKERN UND ZUCKERDERIVATEN AUS NICHT DIALYSIERBAREN SUBSTANZEN BIOLOGISCHER FLÜSSIGKEITEN

TH. GHEORGHIU\* UND K. OETTE

*Medizinische Universitätsklinik Köln\*\**, Köln (B.R.D.)

(Eingegangen am 14. August 1969; geänderte Fassung am 6. Januar 1970)

---

### SUMMARY

*Gas chromatographic analysis of sugars and sugar derivatives from non-dialysable components of biological fluids*

For the analysis of the sugar moiety of biological substances gas chromatography of the per-O-trimethylsilyl derivatives was found to be an easily standardizable, time-saving and precise method with excellent sensitivity and resolution. The method even allows the separate determination of sugars of great structural similarity such as anomers. Ethylene glycol succinate or butane-1,4-diol succinate were used as stationary phases at constant or programmed temperatures. The other stationary phases tested afforded no better separation. L-Fucose or deoxyribose served as internal standards for the absolute quantitative determination. Comparison of the results obtained by the gas chromatographic method with those obtained by photometric procedures showed good agreement. The hydrolysis conditions were studied in more detail and hydrolysis correction factors were used to obtain the carbohydrate composition of the original specimen. The relationship between retention time and structure of the different trimethylsilyl derivatives tested was pointed out. By the method described the following biological fluids were studied: saliva, gastric juice, pancreatic juice, bile, lymph, and urine.

---

### EINLEITUNG

Klinisch-experimentelle Untersuchungen über pathologische Veränderungen des Magensaftschleimes ergaben die Notwendigkeit einer empfindlichen, spezifischen und nicht zu aufwendigen Methode zur Analyse der nicht-dialysierbaren Zuckerkomponente. Die Gaschromatographie (GLC) erwies sich in dieser Hinsicht geeigneter als photometrische oder dünnschichtchromatographische Methoden. Unter den für die GLC verwendeten flüchtigen Zuckerverbindungen weisen die Polyacetyl-<sup>1-3</sup> und Poly-

---

\* Dozentenstipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung an der Medizinischen Universitätsklinik Köln, B.R.D.

\*\* Direktor: Prof. Dr. R. GROSS.

methylderivate<sup>2-6</sup> wesentliche Nachteile auf. Gute Ergebnisse ermöglichen hingegen die Trimethylsilyläther (TMS), die für GLC-Bestimmungen von Phenolen und Alkoholen<sup>7,8</sup>, Steroiden<sup>9</sup>, Gallensäuren<sup>10</sup> und Zuckern<sup>3,11-13</sup> eingesetzt wurden und in den letzten Jahren auch für die Analyse einiger kohlehydrathaltiger biologischer Stoffe eine erfolgreiche Anwendung fanden<sup>14-16</sup>. Die Persilylierung führt zu einer rapiden Umsetzung sämtlicher OH-Gruppen des Zuckers mit einheitlichen Reaktionsprodukten und Auftrennung der Anomeren. Trotz einigen Überlappungen gelingt es durch angepasste Veränderungen der methodischen Bedingungen selbst bei komplexen Hydrolysatgemischen eine quantitative Bestimmung der Komponente zu erzielen.

## MATERIAL

### Reagenzien

Hexamethyldisilazan wurde von der Fa. Fluka/Buchs, Schweiz bezogen, Trimethylchlorsilan und Testzucker\* von der Fa. Serva, Heidelberg und enzymatische UV-Teste für Glucose und Galactose von der Fa. Boehringer, Mannheim. Die übrigen Reagenzien stammten von der Fa. Merck, Darmstadt. Nitrosomethylharnstoff\*\* diente zur Herstellung von Diazomethan. Sämtliche Reagenzien waren reinst oder p.A. Die Lösungsmittel wurden redestilliert, das Pyridin zur Entwässerung unter Zusatz von Bariumoxyd. Die Pyridinlagerung erfolgte über Bariumoxyd.

### Gaschromatographie-Phasen

Die Firmenbezeichnung lautet: A = Applied Science Laboratories, Pa., U.S.A., zu beziehen über Fa. Serva, Heidelberg; B = James G. Biddle Co., Pa., U.S.A., zu beziehen über Fa. Serva, Heidelberg; P = Perkin-Elmer, Überlingen-Bodensee; S = Serva, Heidelberg; (F) = kommerziell hergestellte Säulenfüllungen.

Die Bezeichnung der Trägermaterialien lautet: a = acid washed, b = base washed und s = silyliert mit Dimethylchlorsilan.

*Unpolare stationäre Phasen.* Es wurden folgende Phasen verwendet: Apiezon<sup>B</sup> 15 % auf Gas-Chrom Q (a, b, s; 100-120 mesh)<sup>A</sup> und SE-30 (Methyltyp)<sup>S</sup> 1.5 % auf Chromosorb G (a, s; 80-100 mesh)<sup>P</sup> getestet.

*Polare Polyester-Phasen.* Folgende Phasen wurden verwendet: Butan-1,4-diol-succinat (BDS)<sup>A</sup> 20 % auf Gas-Chrom P (a, b; 60-80 mesh)<sup>A</sup> und auf Gas-Chrom Q (a, b, s; 100-120 mesh)<sup>A</sup>; Äthylenglycolsuccinat (EGS) 2.5 % auf Chromosorb G (a, s; 80-100 mesh)<sup>P(F)</sup>, 12 % auf Gas-Chrom P (a, b; 80-100 mesh)<sup>A(F)</sup> und 18 % auf Chromosorb W (a, s; 80-100 mesh)<sup>A(F)</sup>; Diäthylenglycolsuccinat (DEGS)<sup>A</sup> 15 % auf Gas-Chrom Q (a, b, s; 100-120 mesh)<sup>A</sup>; Äthylenglycoladipat (EGA)<sup>A</sup> 15 % auf Chromosorb G (a, s; 80-100 mesh)<sup>P</sup>; Neopentylglycolsuccinat (NPGS) 1 % auf Chromosorb W (a, s; 80-100 mesh)<sup>P(F)</sup>; Neopentylglycolsebacat (NPGSE) 1 % auf Chromosorb W (a, s; 80-100 mesh)<sup>P(F)</sup>; Neopentylglycoladipat (NPGA)<sup>A</sup> 15 % auf Gas-Chrom Q (a, b, s; 100-120 mesh)<sup>A</sup>.

\* Freundlicherweise stellten uns Herr Prof. STOFFEL, Direktor des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Köln und Herr Priv.-Doz. Dr. GIELEN vom Pharmakologischen Institut der Universität Köln Versuchsmengen von N-Acetylneuraminsäure zur Verfügung.

\*\* Freundlicherweise von Herrn Dr. TSCHÖPE vom Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln zur Verfügung gestellt.

### *Trägergas*

Als Trägergas diente Argon 99.99 % (Fa. Messer-Griesheim, Köln). Für den Flammenionisationsdetektor benutzten wir zusätzlich gereinigten Wasserstoff und synthetische Luft (Fa. Linde, München).

### *Sekretionsstimulantien*

Pentagastrin\*, Betazol (Fa. Lilly, Giessen) und Secretin (Fa. Boots, Nottingham, Great Britain), wurden verwendet.

### *Glasgeräte*

Die Hydrolyse wurde in dickwandigen Glasampullen durchgeführt. Die Silylierung und die Eindampfung der silylierten Proben im Rotationsverdampfer erfolgte in 25-ml Spitzkolben oder Schliffzentrifugengläschen. Die TMS wurden in Röhrchen mit angesetzter Spitze (OETTE UND DOSS<sup>17</sup>) überführt, aus denen selbst kleinste Mengen mit einer Hamilton-Spritze (5 oder 10  $\mu$ l) für die GLC-Analyse entnommen werden können.

### *Apparaturen*

Zur Gefriertrocknung der in Cellophanschläuchen (Union Carbide Corp., Chicago Ill., U.S.A.) dialysierten Proben wurde ein Gerät der Fa. Colora, Lorch, benutzt. Für die GLC fand ein Apparat der Fa. Packard, Frankfurt, mit Glas-Spiralsäulen (185 cm Länge und 5 mm Durchmesser), Temperaturprogrammierung, Flammenionisations (FID)- und <sup>3</sup>H-Argonionisations (AID)-Detektor (wahlweise) Verwendung. Die photometrischen Messungen wurden mit dem Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss, Oberkochen, durchgeführt.

## METHODIK

### *Gewinnung und Vorbereitung der Proben*

Die Gewinnung von biologischen Flüssigkeiten erfolgte in der in Fig. 1 angegebenen Weise (für Einzelheiten, s. GHEORGHIU und Mitarbeiter<sup>18,19</sup>) nach Stimulierung mit 500  $\mu$ g Pentagastrin bzw. 50 mg Betazol (Magensaft) oder mit 100 E. Sekretin (Pankreassaft) oder durch Absaugen (Speichel). Dabei müssen Verunreinigungen vermieden und kontaminierte Proben verworfen werden. Die bei 2000 r.p.m., 15–20 min zentrifugierten Proben wurden ca. 36 h gegen Leitungswasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Eine eingewogene Menge des Lyophilisats wurde zur Analyse eingesetzt (25–30 mg Trockensubstanz entsprechen etwa 10 ml Speichel, Galle, Magen- oder Pankreassaft beziehungsweise etwa 20 ml Harn).

### *Testmischungen*

Zucker und Zuckerderivate unterschiedlicher Mischung wurden 1–24 h zur Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts in Wasser gelöst stehengelassen. Nach Eindampfung im Vakuum wurden die Proben verschiedenen Hydrolysebedingungen unterworfen oder direkt silyliert.

\* Freundlicherweise von der Fa. Merck, Darmstadt zur Verfügung gestellt.

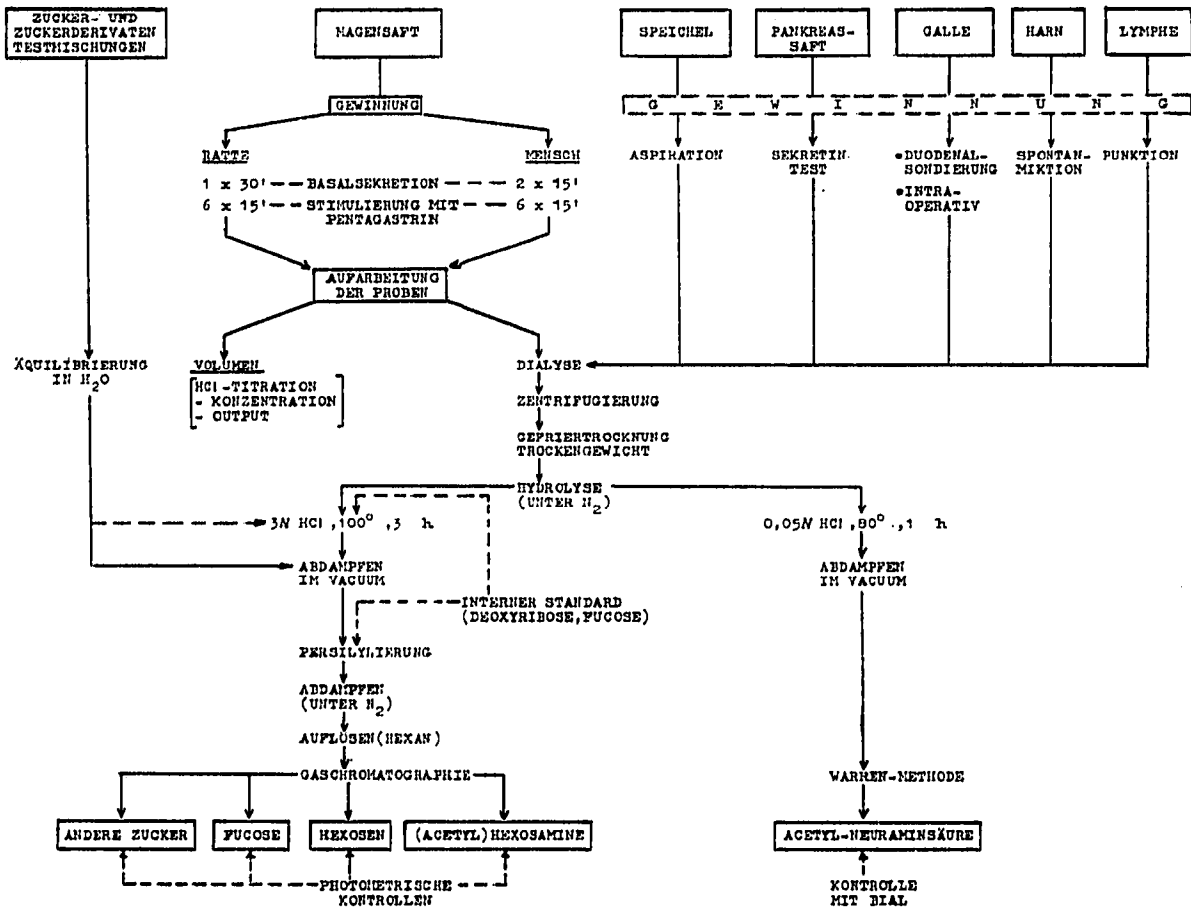


Fig. 1. Aufarbeitungsschema.

### Hydrolyse

In Anlehnung an die für die Glykoprotein-Hydrolyse gebräuchlichen Bedingungen (Literatur bei Lit. 20) und auf Grund eigener Untersuchungen GHEORGHIU *et al.*<sup>20</sup> wählten zwei Standardverfahren aus:

Für die Neuraminsäure-Bestimmung nach WARREN<sup>21</sup>: 0.05 N HCl, 80° und 1 h. Das Reagenz der BIAL-Methode<sup>22</sup> enthält HCl; eine separate Hydrolyse wird dadurch unnötig.

Für die Analyse der anderen Zucker und Zuckerderivate: 3 N HCl, 100° und 3 h. Die Spaltung erfolgt in versiegelten Glasampullen unter Stickstoff.

### Silylierung

Die in Spitzkölbcchen überführten Proben wurden im Vakuum bei 40–50° abgedampft und Feuchtigkeitsreste durch mehrstündiges Lagern in einem Exsikkator entfernt (die Silylierung wird durch Wasserspuren empfindlich gestört). Nach den Ergebnissen von SWEELEY *et al.*<sup>13</sup> und eigenen Versuchen erschien uns ein Gemisch (= Silanreagenz) von 10 ml wasserfreiem Pyridin, 3 ml Hexamethyldisilazan und 2 ml Trimethylchlorsilan als optimal. Die Substanzen wurden in der angegebenen Reihenfolge nacheinander schnell in ein mit Stickstoff gefülltes Röhrchen überführt.

Das Silanreagenz kann 12–24 h im Kühlschrank ohne wesentliche Zersetzung aufbewahrt werden.

Etwa 10 mg Zuckergemisch oder Hydrolysatrückstand wurden unter  $N_2$  in ein Röhrchen mit ca. 0.5 ml Silanreagenz versetzt und 30 min unter wiederholtem Schütteln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Obwohl die Reaktion sehr schnell abläuft, ist eine quantitative Umsetzung nur dann gewährleistet, wenn eine vollständige Lösung stattgefunden hat. Anschliessend werden die flüchtigen Anteile sorgfältig mit Stickstoff abgeblasen und die in Pentan oder Hexan gelösten TMS nach Sedimentierung oder Abzentrifugation der unlöslichen Anteile (u.a. Ammoniumchlorid) in ein Spezialröhrchen (s.o.) überführt.

Die Hexuronsäuren wurden vor der Silylierung mit einer ätherischen Lösung von destilliertem Diazomethan verestert. Das Diazomethan wurde aus Nitrosomethylharnstoff mit 20 % KOH freigesetzt und vor der Destillation in Äther aufgefangen.

### Gaschromatographie

**Säulentemperatur.** Die Säulentemperaturen lagen zwischen 80 und 200°. In Abhängigkeit vom Gemisch und der Fragestellung wurde entweder bei konstanter Temperatur oder mit Temperaturprogrammierung gearbeitet. Bei EGS-Säulen wurden für Pentosen und Hexosen 100°, für Hexosen und Acetylhexosamine 140° und für Disaccharide bei BDS-Säulen 180–200° angewendet. Für biologische Gemische ist entweder eine Temperaturprogrammierung von 100–110° bis 140–160° bei einem Anstieg von 1–2°/min oder eine Temperierung bei 120° bis zur Eluierung von  $\beta$ -Fucose mit anschliessender Erhöhung um 2°/min bis 160° am geeignetsten. Die Temperatur des Inlets betrug 250°, die des Outlets 220° und die des Detektors 210°.

**Trägergasdurchfluss.** Der Trägergasdurchfluss wurde konstant zwischen 60 und 160 ml/min gehalten. Der Gasdruck lag zwischen 15–20 p.s.i.g. Bei einer Spannung von 500 V ergab sich eine lineare Detektor-Ansprechbarkeit. Die Empfindlichkeit wurde nach Bedarf zwischen  $10^{-8} \times 3$  und  $10^{-10} \times 3$  variiert. Es wurden 0.5–5  $\mu$ l (0.1–1  $\mu$ g) der in Hexan oder Pentan gelösten TMS in die Säule injiziert.

**Quantitative Analyse.** Die relative quantitative Analyse wurde durch Ausmessung verschiedener Peak-Grössen vorgenommen (Höhe  $\times$  Mittelwert zwischen halber Basisbreite und Breite in halber Höhe), bei Bedarf mit den üblichen geometrischen Korrekturen (KAISER<sup>23</sup>). Zur absoluten quantitativen Bestimmung diente als interner Standard Fucose oder Deoxyribose. Diese wurden in Bezug zur eingewogenen Probenmenge entweder vor der Hydrolyse (Fucose: ca. 10 mg/100 mg Trockensubstanz) oder unmittelbar danach (Deoxyribose: ca. 15 mg/100 mg) zugegeben.

### Photometrische Bestimmungen

Die Neuraminsäure wurde mit Thiobarbitursäure nach WARREN<sup>21</sup> und zu Kontrollzwecken mit den Methoden von BIAL<sup>22</sup> und SVENNERHOLM<sup>24</sup> bestimmt. Zum Vergleich mit den GLC-Analyseergebnissen dienten folgende photometrische Methoden:

Glucose und Galactose — Enzymatische UV-Tests der Fa. Boehringer, Mannheim;

Fucose nach DISCHE UND SHETTLES<sup>25</sup>, modifiziert nach EVANS<sup>26</sup>;

Hexosamine nach ELSON UND MORGAN<sup>27</sup>, modifiziert nach DISCHE UND BOHRENFREUND<sup>28</sup>. (Umständlicher sind die Varianten von BOAS<sup>29</sup> und KRAAN UND MUIR<sup>30</sup>);

Acetylhexosamine nach REISSIG<sup>31</sup>, modifiziert nach ELSON UND MORGAN<sup>27</sup>;  
neutrale reduzierende Hexosen (global) nach WINZLER, modifiziert nach  
FRANÇOIS *et al.*<sup>32</sup>.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### *Hydrolyse*

Bei der Zuckeranalyse erfordert die Hydrolyse besondere Beachtung, da (1) die Spaltung infolge unterschiedlicher Bindungen mit verschiedener Geschwindigkeit erfolgt und (2) die Zucker und Zuckerderivate im sauren Milieu unterschiedliche Stabilitäten aufweisen — ungefähr in der Reihenfolge: Neuraminsäure < (Deoxypentosen < Pentosen  $\approx$  Deoxyhexosen) < (Mannose < Galactose < Glucose) < Hexosamine.

Nach eingehenden Vorversuchen bevorzugten wir deshalb für Neuraminsäure eine getrennte Aufarbeitung unter wesentlich milderer Hydrolysebedingungen als für die anderen Zucker.

Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich für die Zuverlässigkeit der Analyseergebnisse folgende wichtige Feststellung: Die nach der Hydrolyse bestimmten Zuckerwerte entsprechen nicht mehr den Verhältnissen im Ausgangsgemisch. Dadurch können besonders bei Strukturuntersuchungen grosse Fehler entstehen. An anderer Stelle<sup>20</sup> verweisen wir auf die Möglichkeit, zuverlässige Hydrolyse-Korrekturfaktoren unter den gewählten Standardbedingungen aus der Zersetzungsrate des freien Zuckers und der zeitabhängigen Veränderung der betreffenden Zuckerwerte im Hydrolysat biologischer Proben graphisch und rechnerisch ermitteln zu können. Die im Rahmen unserer Methodik so kalkulierten Faktoren sind in die Tabelle VI aufgenommen worden.

Auf eine Abspaltung des Zuckeranteils durch saure wasserfreie Methanolyse wurde verzichtet, da die Trennung von Methylglykosidsilylderivaten der Hexosamine unbefriedigend ist und sich bei höheren HCl-Konzentrationen, die eine bessere Ausbeute ermöglichen, das Galactose/Glucose-Verhältnis durch das Auftreten zusätzlicher Peaks (SWEETLEY UND WALKER<sup>14</sup>) wesentlich verändert. Besonders bei der Untersuchung des Magensaftes, der normalerweise nur geringe Mengen gebundener Glucose enthält, wirken sich diese Umstände ungünstig aus.

In den GLC-Kurven der unter unseren Standard-Bedingungen hydrolysierten und persilylierten biologischen Proben waren keine signifikanten zusätzlichen Peaks nachweisbar, die auf Abbauprodukte, Isomerisierungen oder Bildung von höhermolekularen Verbindungen ("acid reversion") hingewiesen hätten. Unter den untersuchten Zuckern stellt lediglich Xylose eine Ausnahme dar. Hierin stimmen unsere Ergebnisse mit denen von WULFF<sup>15</sup> überein, jedoch betrug der zusätzlich bei der Xylose auftauchende Peak statt 20 % nur 12,3 %.

### *Anomerenverhältnis*

Die GLC bewirkt eine weitgehende Trennung der Stereoisomeren (wie die Fig. 2A am Beispiel des Inositols zeigt) und der verschiedenen Ringformen (z.B. die " $\gamma$ "-Peaks der Galactose-Reihe). Dadurch entstehen bei quantitativen Bestimmungen von Zuckergemischen Schwierigkeiten, besonders wegen der Anomerenauflösung<sup>13, 33</sup>. Die so zustande gekommenen Überlappungen können trotzdem ausgewertet werden, weil die Anomeren-Verhältnisse unter Standardbedingungen genügend konstant sind. Eigene Untersuchungen (Tabelle I) zeigten, dass das Gleichgewicht in wässrigen

TABELLE I

DAS ANOMERENVERHÄLTNIS IM MUTAROTATIONSGLEICHGEWICHT BEI EINIGEN ZUCKERN UND ZUCKERDERIVATEN

Zucker	Literaturangaben						Eigene GLC-Bestimmungen					
	Optische Rotation, Oxidation <sup>a</sup>		GLC von TMS-Derivaten <sup>b</sup>		H <sub>2</sub> O-Äquilibrierung		Nach HCl-Einwirkung <sup>d</sup>		H <sub>2</sub> O-Äquilibrierung		Nach HCl-Einwirkung <sup>d</sup>	
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$
D-Arabinose	67.5-73.5	26.5-32.4	5.4	50.8	43.8	2.3	55.2	42.5	2.5	55.0	42.5	2.5
D-Xylose	32.1-34.8	65.2-67.9	3.4	41.3	55.2	—	44.8	55.2	12.3	40.2	47.5	12.3
D-Deoxyribose						5.7	54.4	39.9	6.8	53.6	39.6	6.8
D-Glucose	35.2-37.4	62.6-64.8	—	39.8	60.2	—	37.3	62.7	—	38.2	61.8	—
D-Galactose	27.2-31.4	68.6-72.8	5.4	31.9	62.6	2.2	30.1	67.7	2.9	29.6	67.5	2.9
D-Mannose	61.2-69.8	31.1-38.8	—	72.0	28.0	—	67.5	32.5	—	68.4	31.6	—
D-Fucose						2.6	36.0	61.4	2.9	37.3	60.8	2.9
D-Glucosamin	63.4 <sup>e</sup>	36.6 <sup>e</sup>				—	68.0	32.0	—	69.2	30.8	—
D-Galactosamin	46.5 <sup>e</sup>	53.5 <sup>e</sup>				1.9	53.0	45.1	2.2	57.3	49.5	2.2
D-Acetylglucosamin						—	64.6	35.4	—			—
D-Acetylgalactosamin						2.3	59.9	37.8	2.3	59.9	37.8	2.3
Maltose	36.0-37.7	62.3-64.6	—	44.9	55.1	—	39.3	60.7	—	39.3	60.7	—
Lactose	41.0	59.0				—	40.1	59.9	—	40.1	59.9	—

<sup>a</sup>Extremwerte nach Lit. 14 und 38-41.<sup>b</sup>Nach SWEeley und WALKER<sup>14</sup>.<sup>c</sup>Nach 60 min wässriger Äquilibrierung.<sup>d</sup>Standard-Hydrolysebedingungen (3 N HCl, 100°, 3 h).<sup>e</sup>Chlorhydrat.

Zuckerlösungen nach 60 min völlig eingestellt ist und auch nach Säureeinwirkung erhalten bleibt. Mässige Schwankungen weist zwar die L-Fucose in biologischen Hydrolysaten auf, ohne aber dadurch das Bestimmungsergebnis zu beeinträchtigen, da ihre Anomeren-Peaks von den anderen isoliert auftreten.

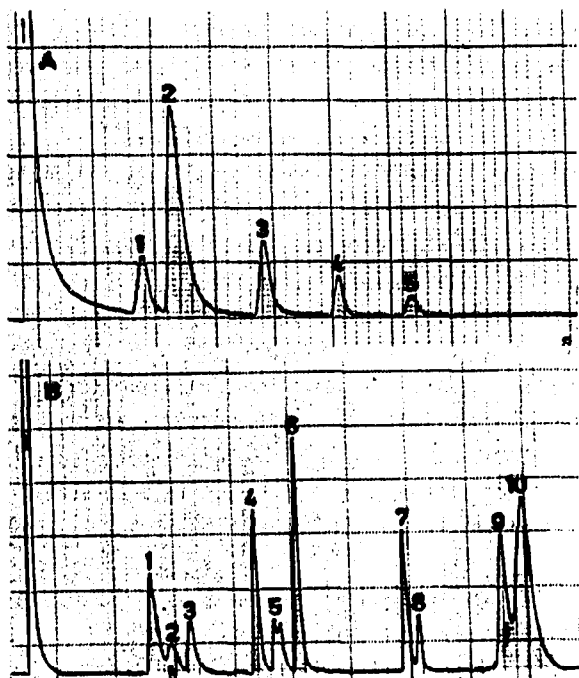


Fig. 2. (A) Trennung von Inositol-Stereoisomeren. Bedingungen: EGS 12%; 100–140°, 2°/min;  $E = 1 \times 10^{-9}$ ; 0.5 cm/min. Bei einer konstanten Temperatur von 120° weisen die trennbaren Isomeren-Peaks folgende relative Retentionszeiten auf: 1.00 (= 64 min), 13.5%; 1.19, 57.0%; 1.71, 17.3%; 3.44, 7.8%; 5.35, 4.4%. (B) Trennung beim Zucker-Testgemisch. Bedingungen: EGS 18%; 60–140°, 1.5°/min und 140–180°, 5°/min;  $E = 3 \times 10^{-9}$ ; 0.25 cm/min. 1 = D-Ribose; 2 =  $\alpha$ -D-Fucose; 3 =  $\beta$ -D-Fucose; 4 =  $\alpha$ -D-Glucose; 5 =  $\alpha,\beta$ -D-Galactosamin; 6 =  $\beta$ -D-Glucose; 7 =  $\alpha$ -D-Acetylglucosamin; 8 =  $\beta$ -D-Acetylglucosamin; 9 =  $\alpha$ -Maltose; 10 =  $\beta$ -Maltose.

Zur Beziehung zwischen Struktur und Anomerenbildung kann man im Allgemeinen annehmen, dass im Gleichgewicht die thermodynamisch bevorzugte Form überwiegt. Diese entsteht bei dem anomeren Molekül mit der kleineren Zahl von nebeneinander gelagerten OH-Gruppen, mit anderen Worten dann, wenn das glykosidische Hydroxyl in *trans*-Stellung steht. So überwiegt z.B. bei der Mannose die  $\alpha$ -Form im Gegensatz zur Glucose und Galactose.

#### Silylierungsreaktion

Bei gleich guter Umsetzung liess sich die Silanreagenzmenge auf 0.5 ml/ca. 10 mg Zucker verringern. Zur besseren Auflösung der Zucker bevorzugten wir ein relativ grosses Pyridinvolumen. Die TMS-Bildung läuft, wie SWEELEY *et al.*<sup>13</sup> zeigten, schon innerhalb von 5 min ab. Die Voraussetzung hierfür ist jedoch die Auflösung der Zucker im Reaktionsgemisch. Da diese bei kürzeren Zeiten häufig nicht vollständig ist, verlängerten wir unter wiederholtem Schütteln und eventueller Erwärmung bis auf 40° die Reaktionszeit auf 60 min. Eine intensivere Temperierung kann das Anomerenverhältnis beträchtlich verändern.



TABELLE II

RELATIVE RETENTIONSZEITEN VON PERSILYLIERTEN ZUCKERN UND ZUCKERDERIVATEN

Säule: EGS 12% auf Gas-Chrom P.

Zucker	80°			100°			120°			140°			200°		
	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$
D-Deoxyribose	0.32	0.39	0.54	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Arabinose	—	1.10	0.86	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Ribose	—	1.00 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Xylose	—	1.35	1.93	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Fucose	—	—	—	0.41	0.43	0.59	0.42	0.48	0.63	0.61	0.62	0.78	—	—	—
D-Mannose	—	—	—	—	1.00 <sup>b</sup>	1.74	—	1.00 <sup>c</sup>	1.69	—	1.00 <sup>d</sup>	1.59	—	—	—
D-Galactose	—	—	—	—	—	—	1.23	1.40	1.83	1.13	1.37	1.80	—	—	—
D-Glucose	—	—	—	—	—	—	—	1.42	2.78	—	1.39	2.48	—	—	—
D-Fructose	—	—	—	—	1.03	1.78	—	—	—	1.85	1.86	2.08	—	—	—
D-Galactosamin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.88	2.12	—	—	—
D-Glucosamin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Galacturonsäure-methylester	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	4.14	?	—	—	—
D-Glucuronsäure-methylester	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	4.17	?	—	—	—
D-Glucuronsäurelacton	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13.50	—	—	—	—
D-Acetylgalactosamin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10.55	12.60	27.50	0.86	1.00 <sup>e</sup>	1.86
D-Acetylglucosamin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15.05	25.30	—	1.14	1.63
Saccharose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.83	—
Lactose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.89	2.92
Maltose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.23	2.51

a-e Absolute Retentionszeiten: (a) 17.5 min; (b) 15.9 min; (c) 7.75 min; (d) 2.35 min; (e) 2.22 min.

TABELLE III

DETEKTORANSPRECHBARKEIT BEI WECHSELNDEM QUANTITATIVEN VERHÄLTNIS IM AUSGANGSGEMISCH

Säule: EGS 2.5% auf Chromosorb G bei 90°; AID.

Zuckergemisch	D-Deoxyribose			D-Galactose		
	Eingewogene Menge (%)	Bestimmte Menge (%)	Differenz	Eingewogene Menge (%)	Bestimmte Menge (%)	Differenz
1	78.4	78.9	+0.5	21.6	21.1	-0.5
2	51.0	52.1	+1.1	49.0	47.9	-1.1
3	39.2	38.3	-0.9	60.8	61.7	+0.9
4	17.5	16.9	-0.6	82.5	83.1	+0.6
			% Eingewogen			% Eingewogen
			+0.6			-2.3
			+2.2			-2.0
			-2.3			+1.5
			-3.4			+0.7

### GLC der Zucker und Zuckerderivate

Die besten Ergebnisse haben wir mit polaren EGS-Säulen (15 % oder 18 %) und BDS-Säulen (15 % oder 20 %) erzielt. Bei Verringerung der stationären Phase auf 2.5 % trat ein grösseres Tailing auf. Während DEGS-Säulen bei einigen vor allem hexosaminfreien Zuckergemischen verwendbare Ergebnisse lieferten, sind EGA, NPGA und NPGS nicht zu empfehlen. Unter den getesteten unpolaren Säulen, die sich für unsere Zwecke weniger eigneten, erwies sich SE-30 am brauchbarsten. Systematische Untersuchungen zum Trägermaterial wurden nicht durchgeführt.

Wie aus den  $R_t$ -Werten der Tabelle II und aus Fig. 2B ersichtlich, liessen sich unter günstigen GLC-Bedingungen die meisten Anomeren-Paare oder -Triplette so gut voneinander trennen, dass eine Berechnung trotz einzelner Überlappungen möglich war. Lediglich die Anomeren der Ribose zeigten in den verwendeten Systemen keinerlei  $R_t$ -Unterschiede. Kritische Auflösungen ergaben sich zwischen:  $\alpha$ -Glucose und  $\alpha$ -Galactose,  $\beta$ -Galactose und  $\alpha$ -Hexosaminen, Saccharose und  $\alpha$ -Lactose. Eine Umwandlung in Acetylhexosamine zur besseren Trennung (PERRY<sup>34</sup>) war nicht notwendig. Von geringerer Bedeutung für die untersuchten biologischen Flüssigkeiten waren die Überlappungen zwischen Ribose und  $\alpha$ -Fucose sowie zwischen  $\beta$ -Fucose und  $\alpha$ -Xylose. Eine ausreichende Quantifizierung konnte aber auch in diesen Fällen erreicht werden, wenn man das unter standardisierten Bedingungen konstant bleibende Anomerenverhältnis in die Berechnung einbezog.

### Retentionszeiten und Struktur der Zucker

Die  $R_t$ -Werte der TMS der Zucker und Zuckerderivate sind in Tabelle II zusammengestellt. Es lässt sich sowohl der Einfluss der Molekülgrösse (Anzahl der C-Atome) und der Stereoisomeren als auch der Oxydation (Uronsäuren), Reduktion (Deoxyzucker) und Aminierung (Aminozucker) erkennen. Die entgegengesetzte Temperaturabhängigkeit der relativen  $R_t$ -Werte von Komponenten, die vor bzw. nach dem  $R_t$ -Bezugspeak erscheinen, ergibt sich aus Fig. 3.

Bei den Zuckern existierten infolge der komplexen Stereochemie nur eine begrenzte Zahl von Verbindungen, die sich in eine homologe Reihe einordnen lassen. Die  $R_t$ -Werte der Stereoisomeren innerhalb einer Molekulargewichts-Stufe überschneiden sich nicht mit den  $R_t$ -Spannen der benachbarten Stufen (z.B. Pentosen nicht mit Hexosen).

Bei biologisch vorkommenden Hexose-Derivaten, die unterschiedliche funktionelle Gruppen tragen, ergibt sich z.B. für die TMS-Galactose-Verbindungen folgende Reihe der relativen  $R_t$ -Werte (s. Tabelle II): Deoxygalactose (Fucose) < Galactose < Galactosamin < Galacturonsäuremethylester < Galacturonsäurelacton < N-Acetylgalactosamin.

Bei den Stereoisomeren der untersuchten TMS-Zucker sind folgende Beziehungen zwischen  $R_t$ -Wert und Struktur festzustellen:

(1) Ketosen weisen wesentlich kürzere  $R_t$ -Werte auf als die betreffenden Aldosen (z.B. Fructose < Glucose).

(2) Die Furanose-Formen zeigen vermutlich eine geringere Retentionszeit als die Pyranose-Formen. Ein Hinweis darauf könnte das Vorkommen kleiner Mengen  $\gamma$ -Isomeren, vor allem in der Galactosereihe, sein.

(3) Bei  $C_1$ -Stereoisomeren (Anomeren) weist dasjenige mit äquatorialer OH-Gruppe einen längeren  $R_t$ -Wert auf (SWEeley *et al.*<sup>13</sup>).

(4) Für die übrigen Isomeren ( $C_2-C_6$ ) der getesteten TMS-Zucker zeigte sich, dass die Retentionszeiten nicht nur mit der Zahl der äquatorialen OH-Gruppen, sondern auch mit deren Nähe zum  $C_1$ -Atom in einem bestimmten Verhältnis zunehmen (GHEORGHIU UND OETTE<sup>35</sup>).

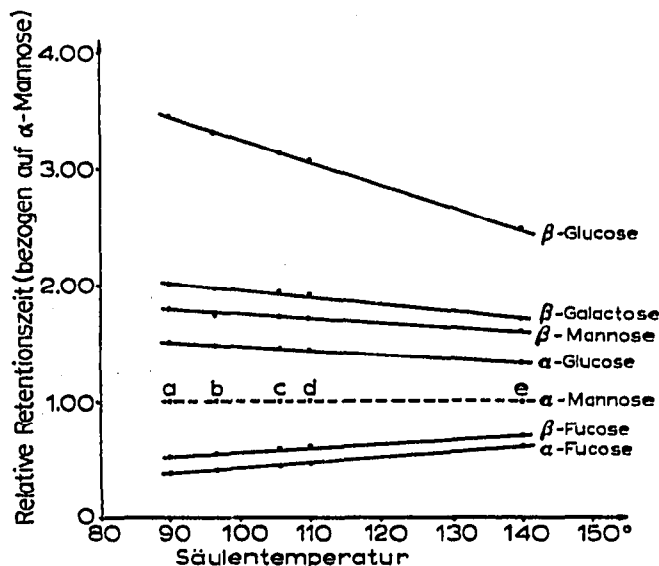


Fig. 3. Die Beziehung zwischen den Retentionszeiten einiger Zuckernomere und der Säulentemperatur. Absolute  $R_t$ -Werte für  $\alpha$ -Mannose: (a) 28.2 min; (b) 20.2 min; (c) 14.0 min; (d) 8.45 min; (e) 2.35 min.

#### Detektoransprechbarkeit und Präzision

Mit dem AID konnten bis ca.  $0.05 \mu\text{g}$  mit dem FID bis  $0.01 \mu\text{g}$  Zucker erfasst werden. Die Linearität der Ansprechbarkeit beider Detektortypen konnte bei der benutzten Spannung für die untersuchten TMS-Zucker nachgewiesen werden. Binäre komplexe Mischungen von Zuckern (Beispiele in den Tabellen III und IV) ergaben eine gute quantitative Übereinstimmung zwischen theoretischer und gefundener Zusammensetzung. Aus der Tabelle V wird auch die gute Reproduzierbarkeit der Untersuchungsmethode ersichtlich.

#### Korrekturfaktoren

Die Peakflächen entsprechen beim AID dem Gewicht des betreffenden TMS-Zuckers, beim FID dem Gewicht der detektoransprechenden C- und Si-Atome im Molekül. In beiden Fällen erfordert die Umrechnung auf den ursprünglichen Zucker eine Korrektur. Die Faktoren können anhand folgender Formeln berechnet werden:

$$F_{\text{AID}} = \frac{\text{Mol.-Gew. Zucker}}{\text{Mol.-Gew. Zucker} + 72 N_{\text{OH}}}$$

$$F_{\text{FID}} = \frac{\text{Mol.-Gew. Zucker}}{12(N_{\text{C}} + 3 N_{\text{OH}}) + 28 N_{\text{OH}}}$$

TABELLE IV

DETEKTORANSPRECHBARKEIT

Säule: EGS 18%.

Zucker	Eingewogene Menge (%)	Bestimmte Menge (%)	Differenz		Eingewogene Menge (%)	Bestimmte Menge (%)	Differenz	
			Absolut	% Eingewogen			Absolut	% Eingewogen
D-Ribose	22.5	23.2	+0.7	+3.1				
D-Xylose	16.0	15.8	-0.2	-1.3				
D-Fucose					21.0	22.3	+1.3	+6.2
D-Glucose					3.5	3.9	+0.4	+11.4
D-Galactose					32.4	30.9	-1.5	-4.6
D-Mannose	15.5	15.8	+0.3	+1.9	6.2	6.7	+0.5	+8.1
D-Glucosamin					25.3	23.7	-1.6	-6.4
D-Galactosamin	46.0	45.2	-0.8	-1.7				
D-Acetylglucosamin					11.6	12.5	+0.9	+7.8
Detektortyp	<sup>3</sup> H-Ionisationsdetektor				Flammenionisationsdetektor			
Säulentemperatur	80°				100-150°, 2°/min			

TABELLE V

REPRODUZIERBARKEIT DER GASCHROMATOGRAPHISCHEN ZUCKERANALYSE

Säule: BDS 20% auf Gas-Chrom Q bei 100°; FID.

Zucker	Eingewogene Menge (%)	Berechnete Werte				Differenz (%)	
		Bestimmungen					Mittelwert ± S.D.
		1	2	3	4		
D-Fucose	23.3	21.8	25.0	23.4	21.8	23.1 ± 1.53	-1.3
D-Glucose	29.0	30.5	27.9	28.2	30.6	29.3 ± 1.69	+0.7
D-Galactose	21.3	22.5	20.5	20.5	22.4	21.4 ± 1.24	+0.4
D-Mannose	26.4	25.2	26.6	27.9	25.2	26.2 ± 1.30	-0.8

wobei  $N_C$  die Zahl der C-Atome und  $N_{OH}$  die Zahl der reagierenden OH-Gruppen des ursprünglichen Zuckers oder Zuckerderivates ist.

In der Tabelle VI sind die Faktoren für die in den untersuchten biologischen Proben auftretenden Zucker angegeben. Bei Hydrolysatanalysen wird zusätzlich ein von den Standardbedingungen abhängiger Hydrolyse-Korrekturfaktor einbezogen, der nach der von uns beschriebenen Methode<sup>20</sup> berechnet werden kann. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle VI angegeben.

#### Absolute quantitative Bestimmung

Die interne Standardisierung der Proben durch Zusatz von gemischeigener L-Fucose oder durch Markierung mit Deoxyribose führte zu Ergebnissen, die eine gute Übereinstimmung mit geeigneten photometrischen Untersuchungsmethoden zeigten (Tabelle VII).

TABELLE VI

KORREKTURFAKTOREN ZUR GASCHROMATOGRAPHISCHEN ANALYSE EINIGER PERSILYLIERTER ZUCKER UND ZUCKERDERIVATEN<sup>a</sup>

In der 2., 4. und 5.-7. Spalte sind die auf Deoxyhexosen bzw. L-Fucose bezogenen Faktoren angegeben.

Zuckergruppe	GLC-Korrekturfaktoren		Hydrolyse-Korrekturfaktor	Gesamtfaktor	
	<sup>3</sup> H-Ionisations-detektor	Flammenionisations-detektor		AID	FID
Deoxypentosen	0.38	1.06	0.53	1.06	
Pentosen	0.34	0.94	0.48	0.96	
Deoxyhexosen L-Fucose	0.36	1.00	0.50	1.00	1.00
Hexosen	0.33	0.92	0.46	0.92	
D-Mannose				0.96	0.88
D-Galactose				0.96	0.88
D-Glucose				0.94	0.86
Hexosamine	0.38	1.06	0.55	1.10	
D-Galactosamin				0.87	0.92
D-Glucosamin				0.83	0.88
Acetylhexosamine	0.44	1.20	0.63	1.26	
Disaccharide	0.37	1.03	0.52	1.04	

<sup>a</sup>Siehe Formeln im Text.

TABELLE VII

ZUSAMMENSETZUNG DES NICHT DIALYSIERBAREN ZUCKERANTEILS EINIGER BIOLOGISCHER FLÜSSIGKEITEN<sup>a</sup>

Zucker	Magensaft (normale Person)	Ratten- magensaft	Speichel	Galle	Pankreas- saft	Harn (Säugling mit Gar- goylismus)
L-Fucose	6.2	6.6 <sup>b</sup>	3.3	9.6	9.5	4.1
D-Mannose	1.1	—	—	3.2	1.8	0.3
D-Glucose	0.3	0.4 <sup>b</sup>	0.3	—	1.8	0.3
D-Galactose	13.2	14.0 <sup>b</sup>	12.9	10.4	14.7	10.6
D-Hexosamine	7.4	7.0 <sup>b</sup>	11.9	9.9	13.3	9.1
N-Acetylneuramin- säure	1.6	—	1.4	7.7	6.5	3.7
Gesamter Zuckerinhalt	29.8	—	29.8	40.8	47.6	28.1
Trockengewicht (mg/ml)	2.04	2.04	2.52	2.40	2.94	2.05

<sup>a</sup>GLC-Bestimmungen in mg/100 mg dialysiertes Lyophilisat.

<sup>b</sup>Photometrische Kontrollen (Methoden s. Text).

*Analyse biologischer Flüssigkeiten*

In den Fig. 4 und 5 und der Tabelle VII wird die Anwendung der GLC für die Bestimmung des Zuckermusters verschiedener Körperflüssigkeiten illustriert. In klinisch- und tierexperimentellen Untersuchungen des normalen Magensaftes und dessen pathologische Veränderungen hat sich die Methode bereits vielfach bewährt (GHEORGHIU *et al.*<sup>36, 37</sup>).

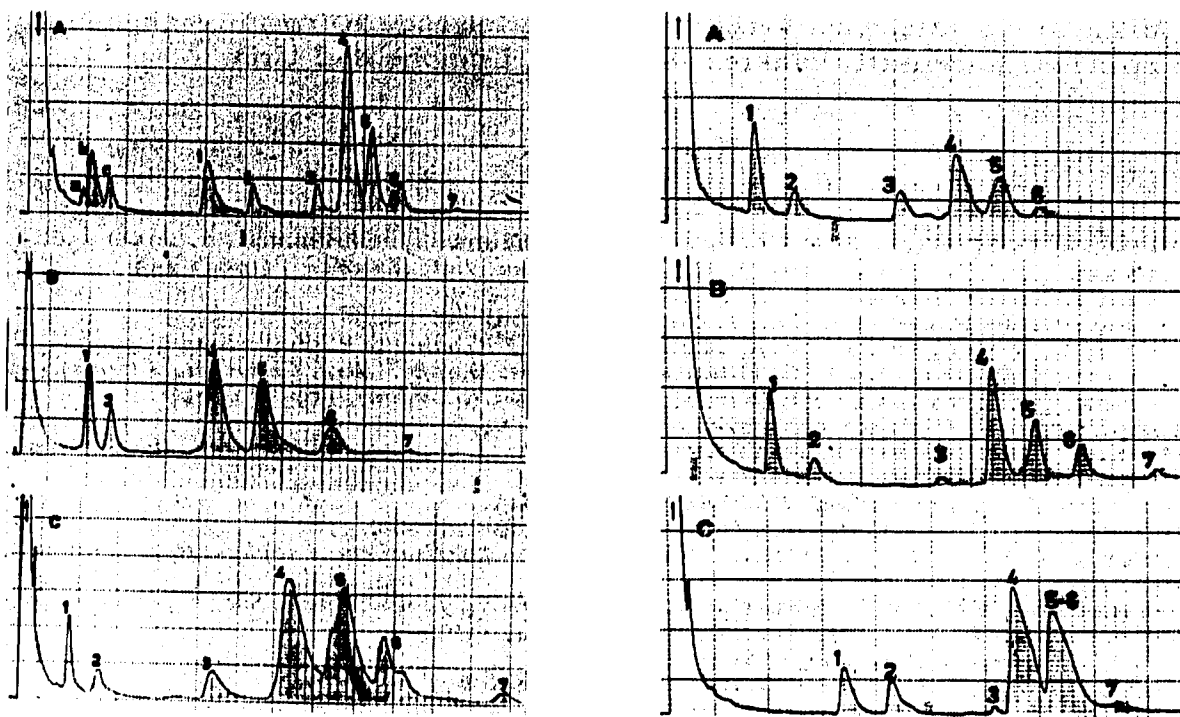


Fig. 4. Bestimmung des Zuckermusters verschiedener Körperflüssigkeiten. (A) Normaler menschlicher Magensaft mit internem Standard (a-c = D-Deoxyribose). Bedingungen: EGS 2.5%; 80-160°, 5°/min;  $E = 1 \times 10^{-9}$ ; 1.25 cm/min. 1 und 2 = L-Fucose; 3 =  $\alpha$ -D-Mannose; 4 = D-Galactose +  $\beta$ -D-Mannose +  $\alpha$ -D-Glucose; 5 =  $\alpha$ -D-Galactosamin + -Glucosamin; 6 =  $\beta$ -D-Galactosamin + -Glucosamin; 7 =  $\beta$ -D-Glucose. (B) Rattenmagensaft (Bestimmung mit Fucose als interner Standard). Bedingungen: EGS 2.5%, 90-150°, 2°/min;  $E = 3 \times 10^{-9}$ ; 1 cm/min. 1, 2 und 4-7, s. oben. (C) Säuglingharn (Gargoylismus). Bedingungen: EGS 2.5%; 100-150°, 4°/min;  $E = 1 \times 10^{-9}$ ; 1.25 cm/min. 1-7, s. oben.

Fig. 5. Bestimmung des Zuckermusters verschiedener Körperflüssigkeiten. (A) Speichel. Bedingungen: BDS 20%; 100-160°, 5°/min;  $E = 3 \times 10^{-9}$ ; 1.25 cm/min. 1-6, s. Fig. 4A. (B) Galle. Bedingungen: EGS 12%; 100-160°, 5°/min;  $E = 1 \times 10^{-9}$ ; 1.25 cm/min. 1-7, s. Fig. 4A. (C) Pankreassaft. Bedingungen: DEGS 15%; 95-160°, 5.5°/min;  $E = 1 \times 10^{-9}$ ; 1.25 cm/min. 1-7, s. Fig. 4A.

## ZUSAMMENFASSUNG

Für die Untersuchung des Zuckeranteils biologischer Substanzgemische ist die Gaschromatographie der Per-O-trimethylsilylderivate eine leicht standardisierbare, zeitsparende und präzise Methode von hoher Empfindlichkeit und ausgezeichnetem Auflösungsvermögen. Sie gestattet selbst bei den komplizierteren Zuckergemischen

eine quantitative Bestimmung der Einzelkomponenten. Dabei werden auch Anomerenpaare teilweise oder vollständig getrennt. Das vorliegende Verfahren arbeitet bei konstanter oder programmierter Temperatur mit Äthylenglykolsuccinat oder Butan-1,4-diolsuccinat als stationäre Phase. Zur absoluten quantitativen Bestimmung wurden L-Fucose und Deoxyribose als innerer Standard verwendet. Der Vergleich des Verfahrens mit photometrischen Methoden ergab eine gute Übereinstimmung. Besonderer Wert wurde auf die Korrektur der durch die Hydrolyse veränderten Zuckerszusammensetzung gelegt. Korrekturfaktoren unter Standardbedingungen werden angegeben. Mit dem beschriebenen Verfahren wurden folgende Körperflüssigkeiten untersucht: Speichel, Magensaft, Pankreassaft, Galle, Lymphe und Urin.

## LITERATUR

- 1 A. G. McINNES, D. H. BALL, F. P. COOPER UND C. T. BISHOP, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 556.
- 2 S. W. GUNNER, J. K. N. JONES UND M. B. PERRY, *Chem. Ind. (London)*, (1961) 255.
- 3 C. T. BISHOP, *Methods Biochem. Anal.*, 10 (1962) 1.
- 4 C. T. BISHOP UND F. P. COOPER, *Can. J. Chem.*, 38 (1960) 338.
- 5 C. T. BISHOP, F. P. COOPER UND R. K. MURRAY, *Can. J. Chem.*, 41 (1963) 2245.
- 6 W. J. A. VANDENHEUVEL UND E. C. HORNING, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 4 (1961) 399.
- 7 S. H. LANGER, P. PANTAGES UND I. WENDER, *Chem. Ind. (London)*, (1958) 1664.
- 8 S. H. LANGER UND P. PANTAGES, *Nature*, 191 (1961) 141.
- 9 E. C. HORNING, K. C. MADDOCK, K. V. ANTONY UND W. J. A. VANDENHEUVEL, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 526.
- 10 M. MAKITA UND W. WELLS, *Anal. Biochem.*, 5 (1963) 523.
- 11 E. J. HEDGLEY UND W. G. OVEREND, *Chem. Ind. (London)*, (1960) 378.
- 12 R. BENTLEY, C. C. SWEeley, M. MAKITA UND W. W. WELLS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 11 (1963) 14.
- 13 C. C. SWEeley, R. BENTLEY, M. MAKITA UND W. W. WELLS, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2497.
- 14 C. C. SWEeley UND B. WALKER, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1461.
- 15 G. WULFF, *J. Chromatog.*, 18 (1965) 285.
- 16 M. D. G. OATES UND J. SCHRAGER, *Biochem. J.*, 97 (1965) 697.
- 17 K. OETTE UND M. DOSS, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 439.
- 18 TH. GHEORGHIU, H. J. KLEIN, H. FROTZ, V. W. JIRMANN UND M. EDER, *Klin. Wochschr.*, 47 (1969) 1206.
- 19 TH. GHEORGHIU, H. FROTZ, K. OETTE, R. PHILIPPEN, H. J. KLEIN UND M. WINTERFELD, *Verhandl. Deut. Ges. Inn. Med.*, 75 (1969) 619.
- 20 TH. GHEORGHIU, K. OETTE UND V. BAUMANN, *Europ. J. Biochem.*, im Druck.
- 21 L. WARREN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1971.
- 22 L. SVENNERHOLM, *Arkiv Kemi*, 10 (1957) 577.
- 23 R. KAISER, *Chromatographie in der Gasphase*, Bd. 4, Bibliographisches Institut, Mannheim, 1965, S. 106.
- 24 L. SVENNERHOLM, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 604.
- 25 Z. DISCHE UND L. B. SHETTLES, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 595.
- 26 D. A. P. EVANS, *J. Lab. Clin. Med.*, 61 (1963) 687.
- 27 L. A. ELSON UND W. T. J. MORGAN, *Biochem. Z.*, 27 (1933) 1824.
- 28 Z. DISCHE UND E. BORENFREUND, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 517.
- 29 N. F. BOAS, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 553.
- 30 J. G. KRAAN UND H. MUIR, *Biochem. J.*, 66 (1957) 55.
- 31 J. L. REISSIG, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 959.
- 32 C. FRANÇOIS, R. D. MARSHALL UND A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 83 (1962) 335.
- 33 J. M. RICHEY, *Anal. Biochem.*, 9 (1964) 272.
- 34 M. B. PERRY, *Can. J. Biochem.*, 42 (1964) 451.
- 35 TH. GHEORGHIU UND K. OETTE, *Experientia*, im Druck.
- 36 TH. GHEORGHIU, H. J. KLEIN, H. FROTZ UND K. OETTE, *Digestion*, im Druck.
- 37 TH. GHEORGHIU, H. FROTZ, H. J. KLEIN UND R. PHILIPPEN, *Verhandl. Deut. Ges. Verdauungs- u. Stoffw. Krankh.*, im Druck.
- 38 F. MICHEEL, *Chemie der Zucker und Polysaccharide*, 2. Aufl., Geest und Portig, Leipzig, 1956, S. 399ff

- 39 K. HEYNS, in H. BARTELHEIMER, W. HEYDE UND W. THORN (Herausgeber), *D-Glucose und verwandte Verbindungen in Medizin und Biologie*, Encke, Stuttgart, 1966, S. 10.
- 40 A. NEUBERGER, R. D. MARSHALL UND A. GOTTSCHALK, in A. GOTTSCHALK (Herausgeber), *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam, 1966, S. 190.
- 41 C. D. HODGMAN, *Handbook of Chemistry and Physics*, 44. Aufl., Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, 1962, S. 1783.

*J. Chromatog.*, 48 (1970) 430-445