

CHROM. 14,889

## Note

---

### Gelchromatographie von Cellodextrinen an Sephadex LH-20

THEODOR PREY

*Institut für Angewandte Botanik, Technische Mikroskopie und Organische Rohstofflehre, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9, A-1060 Wien (Österreich)*

(Eingegangen am 11. März 1982)

Für die Trennung von Oligosacchariden werden in erster Linie chromatographische Verfahren angewendet, wobei für die Isolierung von einzelnen Komponenten wohl nur säulenchromatographische Verfahren in Frage kommen. Die Trennung von Cellodextrinen, das sind Oligomere von  $\beta$ -Glukose, gelingt an Aktivkohle-Celit Säulen<sup>1</sup>. Analog zur Papierchromatographie ist die Trennung an Zellulosesäulen selbst möglich<sup>2-3</sup>, doch wegen der Auswaschbarkeit von löslichen Cellodextrinen aus der Säule scheint dieses Material für die Untersuchung von Zelluloseabbauprodukten eher ungeeignet. Die Entwicklung der Gelchromatographie brachte nun die Möglichkeit die Oligomeren nach dem Molekulargewicht zu fraktionieren<sup>4-5</sup>. Bei der Verwendung von Dextrangelen<sup>6-9</sup>, die durchaus zufriedenstellende Ergebnisse zeigen, kann es neben einer ebenfalls möglichen Auswaschung von löslichen Kohlehydratbestandteilen aus dem Gel, zu einer Wechselwirkung zwischen den freien OH-Gruppen des Gels und den OH-Gruppen der zu trennenden Kohlehydrate kommen<sup>7</sup>. Polyacrylamidgele zeigen neben besseren physikalischen Eigenschaften auch eine geringere Tendenz zu Wechselwirkungen<sup>10</sup>. So konnten Stärkedextrine bis zu einer Grösse von 13 Glukoseeinheiten getrennt werden<sup>11</sup>.

In Verbindung mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) konnten Trennungen von Oligosacchariden unter grosser Zeitersparnis durchgeführt werden; so konnten auf Säulenfüllmaterialien mit entzündigen  $\text{NH}_2$ -Gruppen oder druckresistenten Gelen rasche Trennungen nach der Molekülgrösse durchgeführt werden<sup>12,13</sup>. Eine weitere Möglichkeit zur Trennung von Zelluloseabbauprodukten ist über die entsprechenden Salpetersäureester an Styragelen mit Tetrahydrofuran als Eluens möglich<sup>14</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht die gute Löslichkeit der Kohlehydrate in Dimethylformamid (DMF) dazu auszunützen, eine Fraktionierung von Cellodextrinen an einem hydrophoben Gel wie z.B. Sephadex LH-20, durchzuführen. Durch Vergleich mit zwei bekannten Systemen Sephadex G-25 und Bio-Gel P-2 sollte untersucht werden, inwieweit Wechselwirkungen zwischen dem Gel und den zu trennenden Kohlehydraten an Sephadex LH-20/DMF die Fraktionierung nach dem Molekulargewicht (MG) beeinflussen.

## EXPERIMENTELLER TEIL

*Material*

Glukose, Cellobiose und Raffinose standen als p.A. Reinsubstanzen zur Verfügung. Das Gemisch der Cellodextrine wurde durch Acetolyse von Cellulosepulver (Merck) nach Vorschrift<sup>1</sup> hergestellt, wobei die freien Zucker mit Natriummethylat aus den Zuckeracetaten freigesetzt wurden. Das Endprodukt wurde dünn-schicht-chromatographisch auf Hochleistungsdünn-schicht-chromatographie (HPTLC)-Platten (Merck) analysiert<sup>15</sup>. Die Trennung erfolgte im Laufmittel Äthylacetat–Essigsäure–Methanol–Wasser (60:15:15:10) und gelingt bis zur Cellotetraose; Cello-pentaose und Cellohexaose bleiben am Start sitzen. Die Methode hat allerdings den grossen Vorteil sehr rasch Ergebnisse zu liefern (Laufzeit *ca.* 15–20 min) und es sind nur kleine Probenmengen notwendig, da noch 0.1 µg Zucker detektiert werden können. Die Detektion erfolgt durch Sprühen oder Tauchen in Diphenylamin–Anilin–Phosphorsäure-Reagens<sup>16</sup>. Durch *in situ* Messen der Transmission bei 610 nm mit einem Dünn-schicht-scanner ist auch eine quantitative Auswertung möglich.

*Methodik*

Sephadex G-25F (Pharmacia) und Bio-Gel P-2 (200–400 mesh, Bio-Rad Labs.) wurden über Nacht in destilliertem Wasser gequollen, Sephadex LH-20 (Pharmacia) in DMF. Die Säulen wurden nach Vorschrift<sup>17</sup> gefüllt und über Nacht mit dem entsprechenden Eluens equilibriert. Die Qualität der Säulenfüllung und das Abschlussvolumen wurden mit Blue-Dextran (Pharmacia) bestimmt.

Die Säulen, Flow Adaptoren, Schlauchverbindungen und Ventile waren alles Pharmacia Produkte in SR-Ausführung (solvent resistant). Die jeweiligen Säulendimensionen werden bei den einzelnen Versuchen gesondert angegeben. Die Probenaufgabe erfolgte mit einer Probenschleife (Inhalt = 0.72 ml oder 1.2 ml), die mit Hilfe von 2 Vierwegventilen in den Lösungsmittelfluss geschaltet werden konnte. Das Eluens wurde mit einer Dosierpumpe (P 1, Pharmacia) gefördert, über die auch die Durchflussgeschwindigkeit eingestellt wurde. Die Detektion der chromatographierten Substanzen erfolgte kontinuierlich mit einem Differentialrefraktometer (Siemens). Das Eluat wurde noch mit einem Fraktionssammler fraktioniert, um die Fraktionen mit HPTLC noch zusätzlich identifizieren zu können (Apparatur siehe auch Fig. 1).

## ERGEBNISSE

*Gemisch der Cellodextrine*

Das Gemisch der Cellodextrine, das nach Acetolyse von Cellulosepulver<sup>1</sup> hergestellt wurde zeigte folgende relative Zusammensetzung (HPTLC):

Glukose	= 22%
Cellobiose	= 25%
Cellotriose	= 29%
Cellotetraose	= 15%
Cello-pentaose	= 7%
Cellohexaose	= 2%

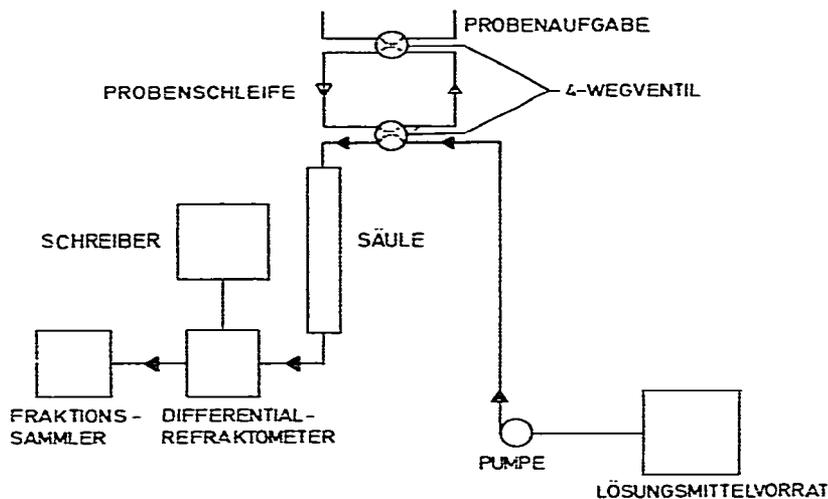


Fig. 1. Fließschema und Apparatur.

### Gelchromatographie

Wenn man die in Tabelle II angeführten Werte für  $K_d$  gegen  $\log MG$  in ein Diagramm einträgt (Fig. 3), so ergibt sich für die Systeme Sephadex G-25 und Bio-Gel P-2 jeweils mit Wasser als Eluens eine Kurve, wobei aber die  $K_d$  Werte der Einzelsubstanzen mit den entsprechenden des Cellodextringemischs sehr gut übereinstimmen. Diese Abweichung vom theoretischen linearen Verlauf, die in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen<sup>6,10,11</sup> steht, tritt beim System Sephadex LH-20/DMF nicht sichtbar auf. Die  $K_d$  Werte für Raffinose und Saccharose dagegen lassen keinen linearen Zusammenhang mit dem  $\log (MG)$  erkennen. Bei einem Bettvolumen von 356 ml ist die Trennung der Cellodextrine sehr gut (siehe Fig. 2).

### DISKUSSION

Bei der Verwendung von hydrophilen Gelen wie Sephadex G-25 oder Bio-Gel P-2 zur Trennung von Oligosacchariden ist der Zusammenhang zwischen  $K_d$  und  $\log MG$  aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Gel und chromatographierter Sub-

TABELLE I

KENNZAHLEN FÜR SÄULEN UND GELPACKUNGEN

	<i>Sephadex G-25</i>	<i>Bio-Gel P-2</i>	<i>Sephadex LH-20</i>	
Säule (mm)	700 × 16	700 × 16	500 × 10	1000 × 25
Bettvolumen, $V_t$ (ml)	115.6	121.5	36.9	356
Ausschlussvolumen:				
$V_o$ (ml), Blue Dextran	46.0	43.5	18.0	124.0
Durchfluss (ml/h)	17.2	17.2	10.9	80.0
Probekonz. (mg/ml)	ca. 5	ca. 5	ca. 5	ca. 15
Eluens	Wasser	Wasser	DMF	DMF

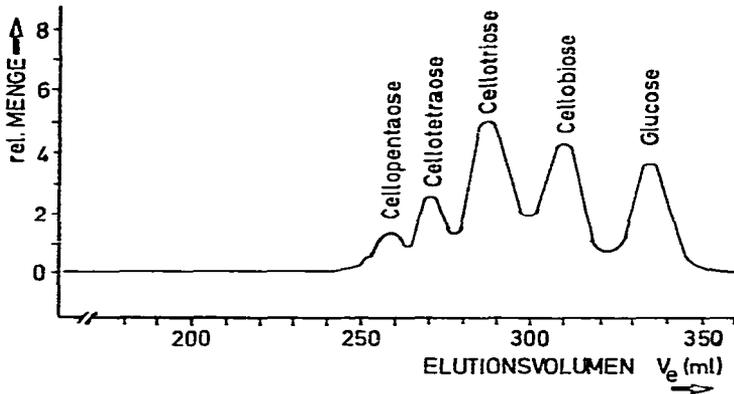


Fig. 2. Trennung der Cellodextrine an Sephadex LH-20 mit DMF als Eluens.

stanz nicht über den gesamten Bereich linear. Polyacrylamidgele (Bio-Gel) liefern neben einer leichteren Handhabung beim Füllen der Säulen, wie schon in früheren Arbeiten<sup>7,10</sup> erwähnt, etwas bessere Ergebnisse. Die Trennung der Cellodextrine gelingt mit dem System Sephadex LH-20/DMF ganz ausgezeichnet; hierbei zeigen die einzelnen Peaks keinerlei wesentliche Verbreiterungen und auch bei einem raschen Durchfluss ( $16.3 \text{ ml h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ) wird eine klare Trennung der Oligomeren erreicht. Innerhalb der Reihe der Oligosaccharide, die nur aus Glukoseeinheiten aufgebaut sind, ist die Beziehung zwischen  $\log MG$  und dem  $K_d$ -Wert weitgehend linear (siehe Fig. 3); somit also ist die Bestimmung von Molekulargewichten höherer Cellodextrine (oder Stärkedextrine), auch bei einer Eichung des Systems mit Substanzen mit nur kleinem Molekulargewicht, hinreichend genau.

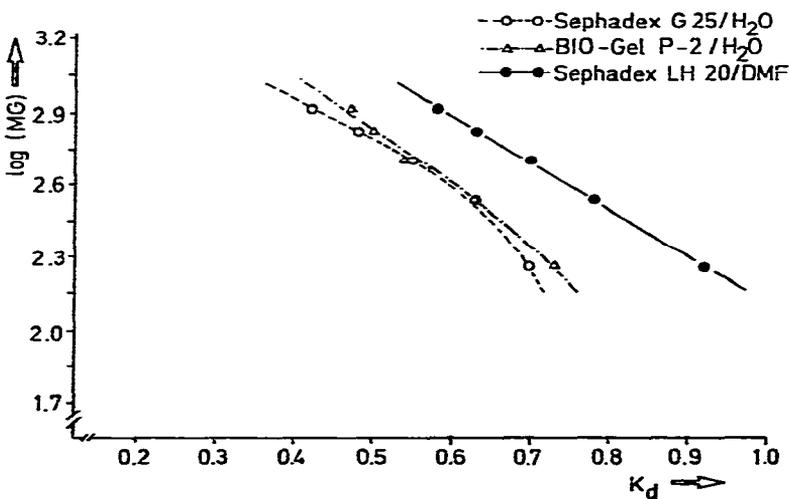


Fig. 3. Beziehung zwischen  $K_d$  und  $\log MG$ .  $\circ$ — $\circ$ , Sephadex G-25/Wasser;  $\triangle$ — $\triangle$ , Bio-Gel P-2/Wasser;  $\bullet$ — $\bullet$ , Sephadex LH-20/DMF.

TABELLE II

ZUSAMMENSTELLUNG VON  $V_e$  (ELUTIONSVOLUMEN),  $K_d$  ( $= \frac{V_e - V_0}{V_1 - V_0}$ ) UND MOLEKULARGEWICHTEN DER IN DEN VERSCHIEDENEN SYSTEMEN UNTERSUCHTEN OLIGOSACCHARIDE

Oligosaccharide (Testsubstanzen)	MG	log MG	Sephadex G-25/Wasser ( $V_1 = 115.6$ ml)		Bio-Gel P-2/Wasser ( $V_1 = 121.5$ ml)		Sephadex LH-20/DMF ( $V_1 = 36.9$ ml)		Sephadex LH-20/DMF ( $V_1 = 356.0$ ml)	
			$V_e$ (ml)	$K_d$	$V_e$ (ml)	$K_d$	$V_e$ (ml)	$K_d$	$V_e$ (ml)	$K_d$
Glukose	180	2.2553	95.0	0.70	100.2	0.73	35.1	0.90	355.0	0.92
Cellobiose (pur)	342	2.5340	89.6	0.63	92.8	0.63	32.6	0.77	309.0	0.78
Raffinose	504	2.7024	84.0	0.54	85.0	0.53	24.7	0.31	198.0	0.32
Saccharose	342	2.5340	—	—	—	—	25.6	0.40	218.5	0.42
(Cellodextrin- gemischt)										
Glukose	180	2.2553	95.0	0.70	100.2	0.73	—	—	335.0	0.92
Cellobiose	342	2.5340	89.6	0.63	92.8	0.63	—	—	309.0	0.78
Cellotriose	504	2.7024	84.3	0.55	85.3	0.54	—	—	286.0	0.70
Cellotetraose	667	2.8241	79.4	0.48	82.3	0.50	—	—	270.0	0.63
Celpentose	829	2.9186	75.2	0.42	79.9	0.47	—	—	258.0	0.58

## LITERATUR

- 1 G. L. Miller, J. Dean und R. Blum, *Arch. Biochem. Biophys.*, 91 (1960) 21.
- 2 L. Hough, J. K. N. Joros und W. H. Wadman, *Nature (London)*, 162 (1948) 448.
- 3 L. Hough, L. K. N. Joros und W. H. Wadman, *J. Chem. Soc.*, (1949) 2511.
- 4 S. C. Churms, *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 25 (1970) 13.
- 5 R. L. Whistler und A. K. M. Anisuzzaman, *Methods Carbohydr. Chem.*, 8 (1980) 45.
- 6 P. Flodin und K. Aspberg, *Biological Structure and Function*, New York, 1961, p. 345.
- 7 L. F. Martin, N. R. Bertoniere und S. P. Rowland, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 263.
- 8 K. A. Granath und P. Flodin, *Makromol. Chem.*, 48 (1961) 160.
- 9 H. H. Schulbach und M. Grehn, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 668 (1963) 180.
- 10 W. Brown, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 273.
- 11 M. John, G. Trénel und H. Dellweg, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 476.
- 12 D. Noel, T. Hanai und M. D. Ambois, *J. Liquid Chromatogr.*, 2 (1979) 1325.
- 13 V. Kahle und K. Tesářík, *J. Chromatogr.*, 191 (1980) 121.
- 14 M. Chang, T. C. Pound und R. St. J. Manley, *J. Polym. Sci., Part A-2*, 11 (1973) 399.
- 15 Th. Prey und K. Scheidl, in Vorbereitung.
- 16 E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, p. 816.
- 17 P. Flodin, *J. Chromatogr.*, 5 (1961) 103.