

CHROM. 14,907

Note

Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von peracetylierten Oligosacchariden an Sephadex LH-20

THEODOR PREY

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

(Eingegangen am 17. März 1982)

Bei Untersuchungen von Polysacchariden ist die Bestimmung der Kettenlänge und somit des Molekulargewichts oft ein wesentlicher Punkt. Die Bestimmung des mittleren Molekulargewichts der Zellulose ist durch Viskositätsmessungen und osmotische Messungen von Lösungen möglich. Bei solchen polydispers vorliegenden Stoffen ist neben dem mittleren Molekulargewicht auch die Molekulargewichtsverteilung von Interesse¹. Beide gewünschten Grössen können durch Gelchromatographie ermittelt werden. In wässrigen Lösungsmittelsystemen, für die die meisten Dextran- und Polyacrylamidgele gedacht sind, sind aber Oligosaccharide mit einer Kettenlänge über 5 β -Glukoseeinheiten fast nicht mehr löslich. Zellulose selbst ist überhaupt unlöslich. Mit der Entwicklung von Gelen, die gegen organische Lösungsmittel resistent sind, ergab sich dann die Möglichkeit die in organischen Lösungsmitteln löslichen Derivate nach dem Molekulargewicht (MG) zu fraktionieren. So werden Salpetersäureester der Zellulose meist an "Styragelen" mit Tetrahydrofuran als Eluens²⁻⁵ chromatographiert.

Peracetylierte Oligosaccharide sind ebenfalls in vielen polaren organischen Lösungsmitteln gut löslich; so wurden in Methanol an Sephadex LH-20 die acetylierten Oligomeren der Chitinose getrennt⁶. Auch mit "reversed-phase" Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) wurden acetylierte Oligosaccharide nach der Molekülgrösse fraktioniert, wobei aber eine Gradientenelution notwendig ist⁷.

Sephadex LH-20 kann zur Molekulargewichtsbestimmung von Ligninbruchstücken sowohl mit Dimethylformamid (DMF)⁸ als auch mit Dioxan-Wasser⁹ mit gutem Erfolg verwendet werden. Auch die Trennung von freien Cellodextrinen gelingt an Sephadex LH-20/DMF¹⁰.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun versucht werden, inwieweit sich acetylierte Zelluloseabbauprodukte aus verschiedenen Hydrolyseversuchen an Sephadex LH-20 mit DMF als Eluens fraktionieren lassen, und ob eine Molekulargewichtsbestimmung über einen grösseren Bereich möglich ist.

EXPERIMENTELLER TEIL

Material

Glukosepentaacetat, Cellobioseoctaacetat und Raffinosehendecaacetat stan-

den als reine Vergleichssubstanzen (Fluka) zur Verfügung. Die Reinheit wurde mit Dünnschichtchromatographie überprüft und lediglich Cellobioseoctaacetat musste einmal aus Methanol umkristallisiert werden.

Ein Oligomergemisch von peracetylierten Celloedextrinen wurde durch Acetylyse von Zellulosepulver mit Eisessig, Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure hergestellt¹¹. Niedermolekulare Bruchstücke von Zellulosetriacetat mit definiertem Molekulargewicht (viskosimetrisch bestimmt) waren aus eigenen Versuchen vorhanden.

Hydrolyseprodukte von Holzzellulose wurden in Anlehnung an die Vorschrift zur Acetylierung von Zellulose¹² mit Acetanhydrid-Essigsäure derivatisiert. Statt Toluol wurde Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet.

Die Apparatur für die Gelchromatographie bestand aus einer peristaltischen Pumpe (P 1, Pharmacia), sowie Säule, Flow Adaptoren, 4-Wegventilen, Schlauchverbindungen in lösungsmittelresistenter Ausführung (Pharmacia, SR - Ausführung). Die Detektion der chromatographierten Substanzen erfolgte mit einem Differentialrefraktometer (Siemens) und nach Fraktionierung mit einem automatischen Fraktions-sammler durch Dünnschichtchromatographie auf 10 × 10 cm HPTLC-Platten (Merck) im Fließmittel Benzol-Methanol (96:4)¹³.

Methodik

Die Proben wurden, in DMF gelöst, über eine Probenschleife (Inhalt = 1.3 ml), die mit zwei 4-Wegventilen in den Lösungsmittelfluss geschaltet werden konnte, auf die Säule gebracht (siehe Fig. 1 und Tabelle I).

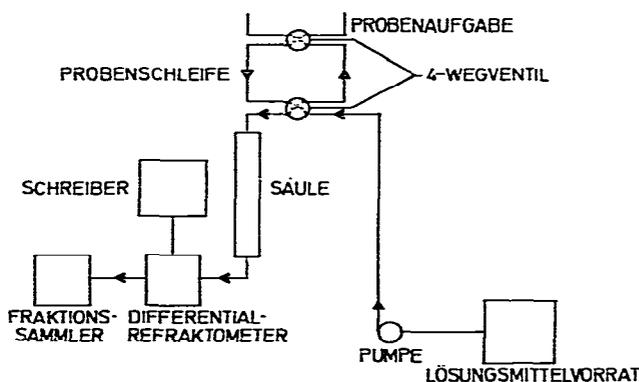


Fig. 1. Fließschema und Apparatur.

TABELLE I

KENNZAHLEN FÜR DIE IN EINER SÄULE 1000 × 25 MM VERWENDETE GELPACKUNG VON SEPHADEX LH-20

Bettvolumen V_t	= 385 ml
Ausschlussvolumen V_o	
Blue Dextran	= 137 ml
Durchfluss	= 80.0 ml/h
Probenvolumen	= 1.3 ml
Probenconc.	= ca. 15 mg/ml
Eluens	= Dimethylformamid p.A.

Nach Bestimmung von Bettvolumen (V_t), Ausschlussvolumen (V_0) und Elutionsvolumen (V_e) wurden zunächst die K_d Werte nach der Formel

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \text{ (ref. 14)}$$

bestimmt. Die K_d Werte der Eichsubstanzen (siehe Tabelle II) wurden gegen die Logarithmen der entsprechenden Molekulargewichte in ein Diagramm zur Erstellung einer Eichkurve eingetragen. Aus dieser Kurve konnten dann für die K_d Werte der einzelnen getrennten Zelluloseabbauprodukte die Molekulargewichte bestimmt werden.

TABELLE II

ZUSAMMENSTELLUNG DER ELUTIONSVOLUMINA (V_e), K_d WERTE UND MOLEKULARGEWICHTE (MG) DER TESTSUBSTANZEN ZUR ERSTELLUNG EINER EICHKURVE

Substanz	MG	log MG	V_e (ml)	K_d
Glukosepentaacetat (Fluka)	390	2.5911	270.6	0.539
Cellobioseoctaacetat (Fluka)	678	2.8312	227.8	0.366
Raffinosehendecaacetat (Fluka)	967	2.9854	202.2	0.263
Glukosepentaacetat*	390	2.5911	270.1	0.536
Cellobioseoctaacetat*	678	2.8312	227.3	0.364
Cellotriosehendecaacetat*	967	2.9854	201.5	0.262
Cellotetraosectetradecaacetat*	1255	3.0986	177.2	0.162
Cellopentaoseheptadecaacetat*	1543	3.1884	159.3	0.090
Zellulosetriacetatabbauprod.	1750**	3.2430	149.4	0.050

* Hergestellt durch Acetolyse von Zellulosepulver¹¹.

** Molekulargewicht viskosimetrisch bestimmt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Beziehung zwischen dem K_d Wert und log MG ist bei der Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit DMF als Eluens für peracetylierte Kohlehydrate weitgehend linear (siehe Fig. 2). Wie auch schon in früheren Arbeiten festgestellt wurde^{8,9} liegt die Ausschlussgrenze des Systems bei MG = ca. 1800.

Die Auftrennung von komplexen Oligosaccharidmischungen, wie sie in Hydrolysaten von Holzproben vorkommen, ist sehr gut. Die Unterschiede der Molekulargewichte werden gerade bei niedrigen Oligosacchariden durch die unterschiedliche Acetylgruppenanzahl noch vergrößert. In Fig. 3 und Tabelle III ist am Beispiel eines acetylierten Holzhydrolyseproduktes zu sehen, dass sich die durch Gelchromatographie ermittelten Molekulargewichte durchaus den, durch Dünnschichtchromatographie der entsprechenden Fraktionen identifizierten, Substanzen zuordnen liessen.

Interessant erscheint noch die Tatsache, dass die K_d Werte der peracetylierten Kohlehydrate durchwegs niedriger sind als sie ihrem Molekulargewicht — wenn man wie in früheren Arbeiten auf freie Kohlehydrate bezieht¹⁰ — entsprechen würden. Eine Erklärung dafür könnte dadurch gegeben werden, dass einerseits alle OH-Gruppen der Kohlehydrate besetzt sind und deshalb keinerlei Möglichkeit zu einer Wechselwirkung mit dem Gel gegeben ist, andererseits könnte aber auch die Molekülgröße

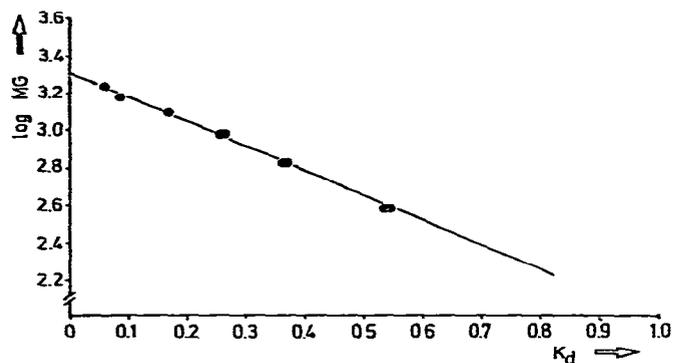


Fig. 2. Eichkurve zur Bestimmung von log MG aus den K_d Werten.

TABELLE III

ZUSAMMENSTELLUNG DER ELUTIONSVOLUMINA (V_e), K_d WERTE VON SUBSTANZZONEN DIE MIT GELCHROMATOGRAPHIE AUS ACETYLIERTEN HOLZHYDROLYSATEN FRAKTIONIERT WURDEN

Die Identifizierung erfolgte mit Dünnschichtchromatographie, die Zuordnung des Molekulargewichts [MG(gef.)] über die K_d Werte mit Hilfe der Eichkurve aus Fig. 2.

Probe	Peak	V_e (ml)	K_d	MG (gef.)	Substanz (DC)	MG (ber.)
Pappelholz (Probe 1980/14)	1	290.8	0.620	314	Xylosetetraacetat	318
	2	270.4	0.538	389	Glukosepentaacetat	390
	3	246.1	0.440	542	Dixylosetetraacetat	552
	4	227.5	0.365	677	Cellobioseoctaacetat	678
	5	200.3	0.255	955	Cellotrioshendecaacetat	967
	6	147.0	0.040	1817	—	—
Pappelholz (Probe 1980/17)	1	270.7	0.539	390	Glukosepentaacetat	390
	2	226.2	0.360	724	Cellobioseoctaacetat	678

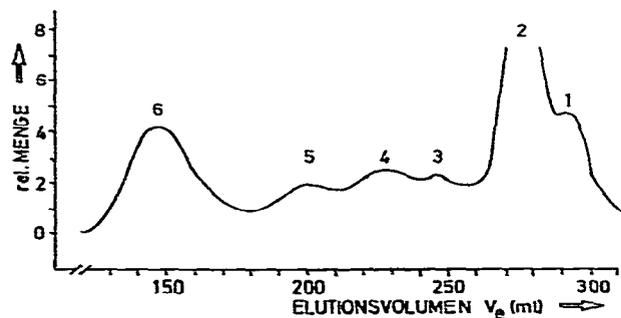


Fig. 3. Gelchromatographische Trennung eines Holzhydrolysats (Probe 1980/14). 1 = Xylosetetraacetat; 2 = Glukosepentaacetat; 3 = Dixylosetetraacetat; 4 = Cellobioseoctaacetat; 5 = Cellotrioshendecaacetat; 6 = Gemisch höherer acetylierter Cellodextrine.

für diesen Effekt verantwortlich sein; denn es ist durchaus denkbar dass insbesondere höhere acetylierte Oligosaccharide durch die sterische Behinderung der Acetylreste in gestreckterer Form vorliegen und diese Moleküle grösser sind als gleich schwere nicht acetylierte, somit würden die grösseren Moleküle vor den gleich schweren kleineren aus der Säule eluiert werden.

LITERATUR

- 1 H. Krässig, *Papier*, 25 (1971) 841.
- 2 G. Meyerhoff und S. Jovanovic, *J. Polym. Sci.*, B-5, (1967) 495.
- 3 Th. E. Muller und W. J. Alexander, *J. Polym. Sci.*, C-21, (1967) 283.
- 4 R. J. Brewer, L. J. Tanghe und Sh. Baily, *J. Polym. Sci.*, A-1, (1968) 1697.
- 5 M. Chang, T. C. Pound und R. St. J. Manley, *J. Polym. Sci.*, A-2 (1973) 399.
- 6 M. A. Raftery, T. Rand-Meir, F. W. Dahlquist, S. M. Parsons, C. L. Borders, R. G. Wolcott, W. Beranek und L. Jao, *Anal. Biochem.*, 30 (1969) 427.
- 7 G. B. Wells und R. L. Lester, *Anal. Biochem.*, 97 (1979) 184.
- 8 W. J. Connors, L. F. Lorenz und T. K. Kirk, *Holzforschung*, 32 (1978) 106.
- 9 R. Concini, E. Burtscher und O. Bobleter, *J. Chromatogr.*, 198 (1980) 131.
- 10 Th. Prey, *J. Chromatogr.*, 243 (1982) 158.
- 11 E. E. Dickey und M. L. Wolfram, *J. Amer. Chem. Soc.*, 71 (1949) 825.
- 12 L. J. Tanghe, L. B. Genung und J. W. Mench, *Methods Carbohydr. Chem.*, 3 (1963) 193.
- 13 B. A. Lewis und F. Smith, in E. Stahl (Editor), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, p. 784.
- 14 T. C. Laurent und J. Killander, *J. Chromatogr.*, 14 (1964) 317.