

7. Chromatographische Fraktionierung von Polysacchariden an Cellulose-Anionenaustauschern

13. Mitteilung über Ionenaustrauscher¹⁾

von **H. Neukom, H. Deuel, W. J. Heri und W. Kündig**

(28. X. 59)

Bei Polysaccharidpräparaten handelt es sich oft um Gemische, deren Makromoleküle sich sowohl in Grösse und Form als auch in Art und Verknüpfung der Zuckerbausteine unterscheiden können. Für die Auftrennung von Polysacchariden in einheitliche Fraktionen fehlen bis heute allgemein anwendbare Methoden²⁾. Bisher wurden vor allem die Elektrophorese und die fraktionierte Fällung³⁾ z. B. mit organischen Lösungsmitteln, Metallsalzen, Ammonsulfat oder quaternären Ammoniumbasen verwendet. Chromatographische Methoden sind nur vereinzelt beschrieben worden, z. B. zur Fraktionierung von Stärke an Al_2O_3 ⁴⁾ und von O-Acetylaraab an Kohle⁵⁾. Es fehlt an geeigneten Adsorptionsmitteln für die Chromatographie von Polysacchariden. Fraktionierte Elution mit Alkohol ist zur Trennung von Mukopolysacchariden, die auf einer Cellulosekolonne ausgefällt wurden, benutzt worden⁶⁾. Anionenaustauscherharze erwiesen sich bei der Chromatographie von sauren Polysacchariden als wenig wirkungsvoll; die Polysaccharide werden lediglich an der Harzoberfläche festgehalten, und die Austauschkapazität der Harze kann daher nur zu einem kleinen Teil ausgenutzt werden¹⁾. Schon damals haben wir vermutet, dass die von PETERSON & SOBER⁷⁾ in die Proteinchromatographie eingeführten basischen Cellulosederivate, deren grosse Oberfläche auch für Makromoleküle leicht zugänglich ist, sich auch zur Fraktionierung von Polysacchariden eignen.

Im folgenden soll gezeigt werden, dass sich basische Cellulosederivate (Cellulose-anionenaustauscher) zur chromatographischen Fraktionierung von Polysaccharid-gemischen verwenden lassen. Die Trennversuche wurden mit DEAE-Cellulose (Diäthylaminoäthylcellulose) ausgeführt, die sich auch in der Proteinchromatographie bewährt hat⁷⁾. Es wurde gefunden, dass saure Polysaccharide von DEAE-Cellulose selbst bei neutraler Reaktion adsorbiert werden. Neutrale Polysaccharide werden dagegen erst im alkalischen Milieu, wo sie eine schwach negative Ladung annehmen, adsorbiert. Dieses Verhalten steht in Analogie zur Fällbarkeit saurer und neutraler Polysaccharide mit quaternären Ammoniumbasen⁸⁾. Die folgenden Versuche sollen zeigen, dass es durch Ausnutzung der unterschiedlichen Haftfestigkeit der einzelnen

1) 12. Mitteilung: K. STEINER, H. NEUKOM & H. DEUEL, *Chimia* **12**, 150 (1958).

2) Vgl. W. G. OVEREND, *Ann. Rpts. Progr. Chemistry* **55**, 315 (1959).

3) Vgl. A. J. ERSKINE & J. K. N. JONES, *Canad. J. Chemistry* **34**, 821 (1956); H. DEUEL & H. NEUKOM, *Verhandlungsber. Kolloid-Ges.* **18**, 91 (1958).

4) F. ULMANN, *Kolloid-Z.* **116**, 10 (1950); **123**, 105 (1951); ED. H. FISCHER & W. SETTELE, *Helv.* **36**, 811 (1953).

5) A. E. GOODBAN & H. S. OWENS, *J. Amer. Soc. Sugar Beet Technol.* **9**, 129 (1956); A. E. GOODBAN & H. S. OWENS, *J. Polymer Sci.* **23**, 825 (1957).

6) S. GARDELL, *Acta chem. scand.* **11**, 668 (1957).

7) E. A. PETERSON & H. A. SOBER, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 751 (1956); H. A. SOBER, F. J. GUTTER, M. M. WYCKOFF & E. A. PETERSON, *ibid.* **78**, 756 (1956); J. PORATH, *Arkiv Kemi* **17**, 97 (1957).

8) H. DEUEL & J. SOLMS, *Kolloid-Z.* **124**, 65 (1951); J. E. SCOTT, *Chemistry & Ind.* **1955**, 168; H. PALMSTIerna, J. E. SCOTT & S. GARDELL, *Acta chem. scand.* **11**, 1792 (1957).

Polysaccharide an DEAE-Cellulose bei verschiedenen pH-Werten und Elektrolytkonzentrationen gelingt, mit geeigneten Elutionsmitteln eine Fraktionierung zu erzielen.

Die zu beschreibenden Trennversuche wurden vor allem mit folgenden neutralen und sauren Polysacchariden ausgeführt: Dextrin, Zuckerrübenaraban, Pektinsäure, einem künstlichen Gemisch dieser beiden, Zuckerrübenpektinsäure (von Natur aus stark arabanhaltig), einer Mischung von Arabinoxylan aus Weizenmehl und Serumalbumin und den wasserlöslichen Mehlpolysacchariden (von Natur aus etwas proteinhaltig). Über die Fraktionierung von Bodenpolysacchariden an DEAE-Cellulosekolonnen soll an anderer Stelle berichtet werden⁹⁾.

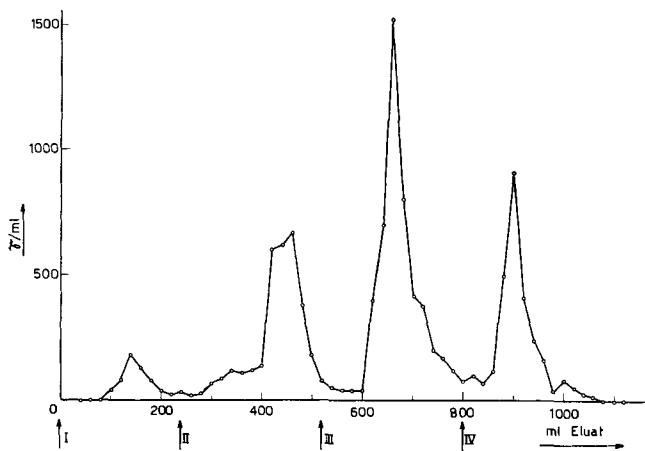


Fig. 1. *Fraktionierung eines Weizenstärkedextrins (200 mg) an einer DEAE-Cellulosekolonne (20 g)*

OH-Form; Elutionslösungen: I H_2O , II 0,01 N, III 0,05 N, IV 0,1 N NaOH

Neutrale Polysaccharide, wie Dextrin, Glykogen, Arabinoxylan aus Weizenmehl und Zuckerrübenaraban, werden von der DEAE-Cellulose in Chlorid- oder Phosphatform nicht oder nur sehr schwach adsorbiert; mit verdünnten Salzlösungen werden sie leicht und vollständig eluiert. Von der DEAE-Cellulose in der OH-Form werden sie dagegen vollständig adsorbiert und können durch Elution mit NaOH steigender Konzentration fraktioniert werden. Als Beispiel sei die Fraktionierung eines Dextrins erwähnt (Fig. 1). Unter den angewandten Elutionsbedingungen konnte das Dextrin in drei Fraktionen zerlegt werden, die sich eindeutig durch ihre Jodfarbe unterscheiden. Zuerst wurden zwei stark abgebauten Fraktionen (gelbe bzw. weinrote Jodfarbe) eluiert, dann folgte eine mehr oder weniger stark abgebauten Amylosefraktion (blaue Jodfarbe). Das Dextrin wurde quantitativ eluiert.

In ähnlicher Weise konnten auch 200 mg Zuckerrübenaraban an einer Kolonne von 20 g DEAE-Cellulose in der OH-Form fraktioniert werden. Mit Wasser konnte kein Polysaccharid eluiert werden, dagegen wurde durch Gradientelution mit NaOH zwischen 0,03 und 0,2 N NaOH praktisch alles Araban eluiert. Das Araban wurde dabei in zwei Fraktionen aufgetrennt, die sich im Galaktosegehalt unterscheiden.

⁹⁾ M. MÜLLER & H. DEUEL, in Vorbereitung.

Das Na-Salz der Pektinsäure wurde von DEAE-Cellulose in der Phosphatform (pH 6) stark adsorbiert und konnte durch Phosphatpuffer steigender Konzentration vom selben pH nicht eluiert werden. Erst durch Steigerung des pH-Wertes konnte es völlig eluiert und dabei meist in drei Fraktionen aufgetrennt werden. Pektin, der partielle Methylester der Pektinsäure, haftet entsprechend seiner geringeren negativen Ladung schwächer.

Entsprechend der verschiedenen Haftfestigkeit von Araban und Pektinsäure an der DEAE-Cellulose sollten sich diese beiden Polysaccharide leicht voneinander trennen lassen. Ein künstliches Gemisch aus Zuckerrübenaraban und hochgereinigter *Citrus*-Pektinsäure wurde auf eine Kolonne von DEAE-Cellulose in der Phosphat-

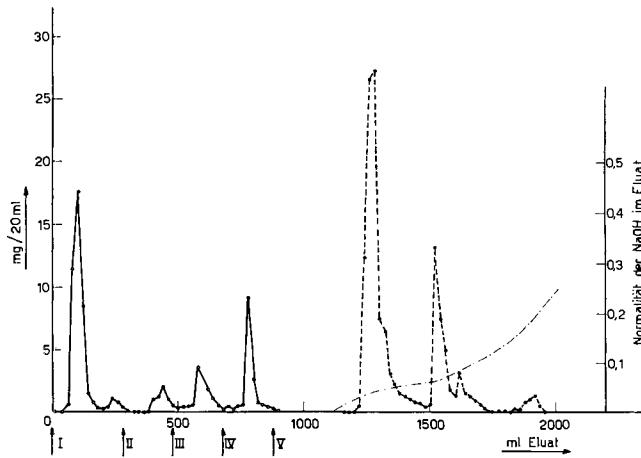


Fig. 2. *Faktionierung einer Mischung von Zuckerrübenaraban (100 mg) und Citruspektinsäure (200 mg) an einer DEAE-Cellulosekolonne (20 g)*

Phosphatform pH 6,1; Elutionslösungen: I 0,025 M, II 0,05 M, III 0,1 M, IV 0,25 M Na-Phosphatpuffer, V Gradientelution mit 0,01 bis 0,5 N NaOH

—○—○— Araban -●---●- Pektinsäure
----- NaOH-Konzentration im Eluat

form aufgetragen und zuerst stufenweise mit Phosphatpuffer steigender Konzentration und anschliessend durch Gradientelution mit NaOH eluiert (Fig. 2).

Die Elutionskurve zeigt, dass neben der Trennung von Araban und Pektinsäure auch eine Fraktionierung sowohl des Arabans als auch der Pektinsäure eintrat. Mit jeder Konzentration des Puffers wurde eine Arabanfraktion eluiert, total 89% des Arabans. Diese Fraktionen enthielten keine Uronsäuren; alle enthielten dagegen kleine, mit steigender Pufferkonzentration etwas zunehmende Mengen an Galaktose. Auch GOODBAN & OWENS⁵⁾ und ANDREWS *et al.*¹⁰⁾ erhielten bei ihren Fraktionierungsversuchen an Araban Fraktionen mit unterschiedlichem Galaktosegehalt. Galaktosefreie Fraktionen wurden ebenfalls nicht beobachtet. Die Pektinsäure erschien erwartungsgemäss erst in den NaOH-Eluaten, und zwar sobald das Eluat alkalisch wurde. Pektinsäure wurde in zwei Hauptfraktionen eluiert, eine dritte sehr kleine Fraktion erschien am Schluss. Im ganzen wurden 85% der aufgetragenen Pektinsäure

¹⁰⁾ P. ANDREWS, L. HOUGH, D. B. POWELL & B. M. WOODS, J. chem. Soc. 1959, 774.

zurückgewonnen. Es ist noch nicht untersucht worden, worin sich die einzelnen Pektinsäurefraktionen unterscheiden.

Eine von Natur aus stark arabanhaltige Pektinsäure ist jene aus Zuckerrüben. Zur Untersuchung gelangte ein Na-Pektat, das durch schonende alkalische Verseifung von Zuckerrübentrester und Extraktion des Pektates mit Wasser hergestellt wurde. Das Präparat enthielt 45% Polygalakturonsäure, der Rest bestand zur Hauptsache aus Araban und wenig Galaktan. Fig. 3 zeigt die Fraktionierung dieses Präparates an DEAE-Cellulose.

Nur ein kleiner Teil des Arabans, nämlich 15,4 mg oder ca. 14%, konnte durch Elution mit Phosphatpuffer abgetrennt werden. Der Hauptteil des Arabans wurde

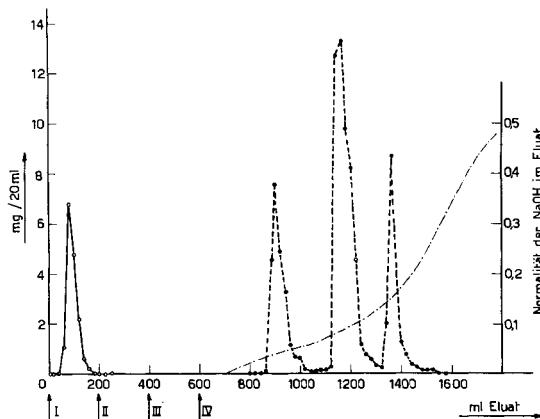


Fig. 3. Fraktionierung einer Zuckerrübenpektinsäure (200 mg) an einer DEAE-Cellulosekolonne (20 g)

Gleiche Kolonne und Elutionstechnik wie in Fig. 2.

Elutionslösungen: I 0,025 M, II 0,05 M, III 0,1 M Na-Phosphatpuffer, IV NaOH

—○—○— Araban -●---●- Pektinsäure
----- NaOH-Konzentration im Eluat

zusammen mit der Pektinsäure eluiert, die dabei in drei Fraktionen getrennt wurde. Alle Fraktionen enthielten nach Hydrolyse Galakturonsäure, Arabinose und Galaktose. Die Pektinsäure wurde dabei quantitativ eluiert (Ausbeute 102%). Diese Resultate sind eine starke Stütze für die Annahme, dass im untersuchten Präparat die Hauptmenge des Arabans und Galaktans kovalent an die Pektinsäure gebunden ist. Auch ASPINALL & CAÑAS-RODRIGUEZ¹¹⁾ ist es kürzlich nicht gelungen, durch die üblichen Fraktionierungsmethoden eine Abtrennung der neutralen Polysaccharide bei Sisalpektinsäure zu erzielen. Über den chemischen Aufbau dieser Polysaccharidkomplexe lassen sich vorläufig noch keine Angaben machen. Es erscheint aber als wahrscheinlich, dass die Verknüpfung dieser neutralen Zucker an die Polygalakturonsäure durch glykosidische Bindungen erfolgt, die bei der alkalischen Extraktion nicht gespalten werden. Danach scheinen die untersuchten Pektinpräparate in ihrem Aufbauprinzip synthetischen Pflanzensäurepolymeren ähnlich zu sein. Bei diesen wasserlöslichen Pektinstoffen handelt es sich wohl um Bruchstücke des wasserunlöslichen Protopektins der Zellwand, das noch komplizierter aufgebaut sein dürfte.

¹¹⁾ G. O. ASPINALL & A. CAÑAS-RODRIGUEZ, J. chem. Soc. 1958, 4020.

Die beobachtete leichte Eluierbarkeit neutraler Polysaccharide bei pH 6 bis 8 lässt sich auch zu ihrer Abtrennung von Proteinen verwenden, die in der Regel an DEAE-Cellulose stärker haften. Besonders gut gelingt die Trennung, wenn das neutrale Polysaccharid schon mit 0,005 M Phosphatpuffer, mit dem die Kolonne am

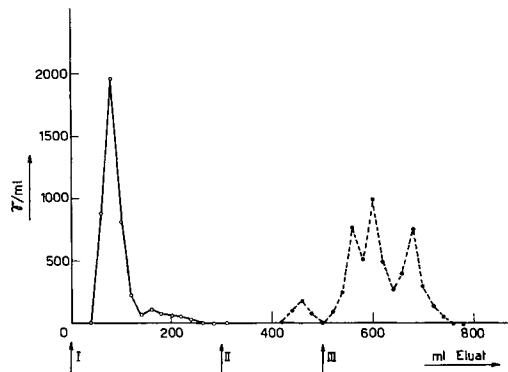


Fig. 4. *Faktionierung einer Mischung von Weizenpentosan (100 mg) und Serumalbumin (100 mg) an einer DEAE-Cellulosekolonne (20 g)*

Phosphatform pH 8; Elutionslösungen: I Na-Phosphatpuffer 0,005 M pH 8,
II Na-Phosphatpuffer 0,01 M pH 6, III 0,1 M NaCl + 0,05 M NaH₂PO₄
-○—○— Pentosan -●---●— Protein

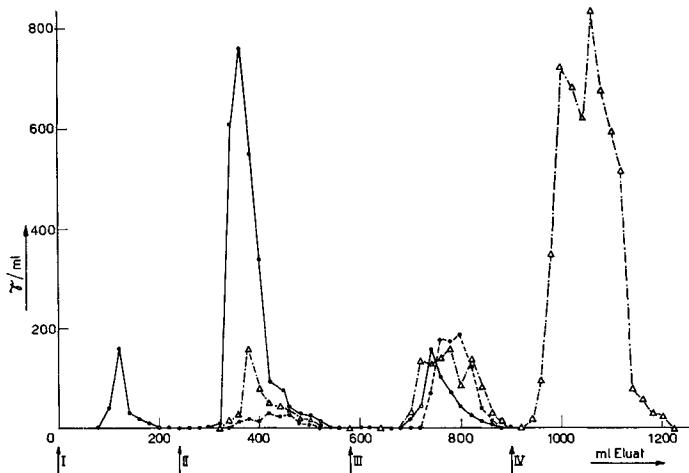


Fig. 5. *Faktionierung wasserlöslicher Weizenmehlpolysaccharide (200 mg) an einer DEAE-Cellulosekolonne (20 g)*

Boratform; Elutionslösungen: I H₂O, II 0,01 M, III 0,1 M, IV 0,5 M Na-Borat
-○—○— Pentosan -△---△— Hexosan -●---●— Protein

Anfang ins Gleichgewicht gebracht wird, vollständig eluierbar ist. Dies ist z. B. beim Arabinoxylan aus Weizenmehl der Fall, das aus einer Mischung mit Serumalbumin leicht abgetrennt werden kann (Fig. 4). Bei den stärker haftenden sauren Polysacchariden dürfte eine Abtrennung von Proteinen bedeutend schwieriger sein.

Es ist bekannt, dass Polysaccharide je nach ihrer Struktur mit Borat mehr oder weniger stabile Komplexe bilden, die negativ geladen sind¹²⁾. BARKER *et al.*¹³⁾ haben gezeigt, dass sich diese Borsäurekomplexe mit quaternären Ammoniumbasen aussäubern und zur Fraktionierung von neutralen Polysacchariden verwenden lassen. Es ist daher zu erwarten, dass bei Verwendung der Boratform des Celluloseaustauschers und von Borat als Elutionsmittel eine noch feinere Fraktionierung der Polysaccharide zu erzielen ist. Bei den kaltwasserlöslichen neutralen Weizenmehlpolysacchariden konnte mit dieser Technik eine Auftrennung in vier Fraktionen erzielt werden. Die löslichen Polysaccharide aus Weizenmehl bestehen aus einem Pentosan (Arabinoxylan), das wahrscheinlich geringe Mengen Galaktose enthält, und aus Glukosan, das zum grössten Teil aus löslicher Stärke besteht¹⁴⁾. Die Präparate enthalten im weiteren stets geringe Mengen Protein, die sich praktisch nicht von den Polysacchariden trennen lassen und nicht hitzeagulierbar sind. Fig. 5 zeigt die Trennung dieser wasserlöslichen Mehlpolysaccharide durch stufenweise Elution mit Natriumborat steigender Konzentration.

Mit Wasser wurde eine kleine Pentosanfraktion eluiert, die nur aus Xylose und Arabinose aufgebaut ist. Die eigentliche Pentosanfraktion konnte mit 0,01 M Borat eluiert werden und enthielt zusätzlich noch kleine Mengen Galaktose und Spuren von Protein. Die mit 0,1 M Borat eluierte Fraktion enthielt ca. 50% Protein, 20% Pentosan und 30% Hexosan, das praktisch nur aus Galaktose bestand. Über den Aufbau dieses Polysaccharid-Proteinkomplexes ist vorderhand nichts bekannt. Mit 0,5 M Borat wurde schliesslich eine Hexosanfraktion erhalten, welche nur aus Glucose bestand. Dieser Versuch zeigt, dass unter Ausnutzung des verschieden starken Komplexbildungsvermögens der Polysaccharide mit Borat in vielen Fällen zusätzliche Trenneffekte zu erwarten sind. Auf ähnliche Weise haben KHYM & ZILL¹⁵⁾ einfache Zucker an Anionenaustauschharzen in der Boratform getrennt.

Mit den beschriebenen Versuchen sollte demonstriert werden, dass sich Celluloseanionenaustauscher für die Fraktionierung von Polysaccharidgemischen verwenden lassen. Durch Verwendung entsprechend grosser Kolonnen gelingt es, auch grössere Mengen von Polysaccharidpräparaten, z. B. 2–5 g, aufzutrennen, um genügend Material für eine nähere Untersuchung der einzelnen Fraktionen zu erhalten. Die Trenneffekte sind von der Struktur der Anionenaustauscher, vor allem der Art der basischen Gruppen, und der Anionenaustauschkapazität, abhängig. Für die Erzielung reproduzierbarer Resultate sollte daher immer derselbe Austauscher verwendet werden. Mit der beschriebenen chromatographischen Methode dürften sich zahlreiche Polysaccharidpräparate als heterogen erweisen.

Experimenteller Teil

DEAE-Cellulose (Diäthylaminoäthyl-cellulose). Verwendet wurde ein Produkt der BROWN COMPANY, Berlin, N. H., USA.; Firmenbezeichnung: Reagent grade, Type 20, Lot No. 1011; Austauschkapazität: 0,76 mäq./g.

¹²⁾ H. DEUEL & H. NEUKOM, *Makromol. Chem.* 3, 13 (1949).

¹³⁾ S. A. BARKER, M. STACEY & G. ZWEIFEL, *Chemistry & Ind.* 1957, 332.

¹⁴⁾ A. S. PERLIN, *Cereal Chemistry* 28, 370, 382 (1952); I. A. PREECE & R. HOBKIRK, *J. Inst. Brewing* 41, 385 (1953).

¹⁵⁾ J. X. KHYM & L. P. ZILL, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 2090 (1952).

Herstellung der DEAE-Cellulosekolonnen. Auf die Bereitung dieser Kolonnen ist besondere Sorgfalt zu legen, denn es hat sich gezeigt, dass sie bei der Elution und beim Waschen oft geringe Mengen von Cellulosefragmenten abgeben, welche die Bestimmung der Polysaccharide mit Anthron stören können. Es hat sich daher als zweckmäßig erwiesen, die DEAE-Cellulose zuerst zu waschen, indem sie ca. dreimal abwechselungsweise in 0,5 N HCl bzw. 0,5 N NaOH aufgeschlämmt wurde und die anfänglich trüben Lösungen nach dem Sedimentieren abdekantiert wurden. Die Suspensionen wurden dabei stets in einem Becherglas im Vakuumexsikkator entlüftet und sedimentiert. Das Sediment wurde jeweils vor der nächsten Behandlung in Wasser aufgeschlämmt, filtriert und gewaschen. Vor dem Einfüllen in die Kolonne wurde die DEAE-Cellulose folgendermassen in die gewünschte Form gebracht; OH-Form: die DEAE-Cellulose wird in 0,5 N NaOH suspendiert, abfiltriert und mit Wasser gewaschen; Phosphatform: die wässrige Suspension wird mit einer 0,5 M Lösung von NaH_2PO_4 auf das gewünschte pH eingestellt, abfiltriert und mit 0,005 M Phosphatpuffer vom gleichen pH gewaschen; Boratform: es wird in 0,2 M Natriumboratlösung suspendiert, abfiltriert und mit Wasser gewaschen.

Die so vorbehandelte DEAE-Cellulose wurde nochmals in Wasser aufgeschlämmt, im Exsikkator entlüftet, als Brei eingefüllt und sedimentieren gelassen. Der Durchmesser der Kolonnen betrug 1,5 bis 2 cm, die Höhe variierte je nach pH und Elektrolytkonzentration. Man perkoliert mit Wasser (oder mit der Lösung, mit der zuerst eluiert wird), bis der Anthrontest im Eluat negativ ist. Kolonnen, die auf diese Weise bereitet wurden, laufen gewöhnlich ohne zusätzlichen Druck, während komprimierte Kolonnen wesentlich langsamer und nur unter Druck laufen. Als Unterlage für die Cellulose dient Glaswolle, gefolgt von einer Schicht (1 cm) Quarzsand und einer Schicht (1,5 cm) Celit (letztere muss bei Versuchen mit Proteinen wegen Adsorptionserscheinungen weggelassen werden).

Elution. Das Polysaccharid wurde jeweils in möglichst konzentrierter wässriger Lösung auf die Kolonne gegeben; die Elution erfolgte stufenweise oder stufenlos durch Anwendung eines Konzentrationsgradienten («gradient elution»). Die Durchflusgeschwindigkeit betrug 1 bis 1,5 ml/Min. Die Eluate wurden in Fraktionen von 20 ml aufgefangen. Bei der Elution mit NaOH ist darauf zu achten, dass bei höheren Konzentrationen kleine Mengen des Austauschers abgelöst werden, welche die Polysaccharidbestimmungen im Eluat stören. Mit dem verwendeten Austauscher wurden nur NaOH-Konzentrationen bis 0,3 N verwendet; mit 0,5 N NaOH wurden im Eluat beträchtliche Mengen Zellulose gefunden.

Bestimmung der Polysaccharide in den Eluaten: Hexosane wurden mit Anthronreagenz bestimmt¹⁶⁾. Pentosane wurden mit einem modifizierten Anthrontest nach BAILY¹⁷⁾ bestimmt. Diese beiden Tests können nur bei reinen Hexosanen bzw. Pentosanen verwendet werden; die Eichkurve wird mit dem zu bestimmenden Polysaccharid ermittelt. Pektin wurde mit Carbazolreagenz bestimmt¹⁸⁾. Hexosane und Pentosane: Für die Bestimmung von einfachen Hexosanen und Pentosanen nebeneinander wurde ein modifizierter Anthrontest ausgearbeitet, der mit Hilfe eines Nomogramms Hexosan und Pentosan nebeneinander zu ermitteln gestattet¹⁹⁾.

Hydrolyse der Polysaccharide und Papierchromatographie. Die Fraktionen wurden entsprechend den Elutionskurven vereinigt, mit Ionenaustauschern oder durch Dialyse entionisiert, im Vakuum eingedampft und mit 0,5 N HNO_3 unter Zusatz einiger Kristalle Harnstoff hydrolysiert²⁰⁾. Die Pentosane wurden 4 Std. und die Pektinsäuren 12 Std. bei 110° hydrolysiert. Die Hydrolysaten wurden auf ca. die Hälfte eingedampft und direkt chromatographiert (WHATMAN-Papier Nr. 1, Rundfilter, Äthylacetat:Pyridin:Wasser (8:2:1) für neutrale Zucker und Äthylacetat: Pyridin:Eisessig:Wasser (5:5:1:3) für Uronsäuren); entwickelt wurde mit Anilinphthalat.

Bestimmung der Proteine in den Eluaten. Die Bestimmung erfolgte kolorimetrisch nach der Methode von FOLIN & CIOCALTEU²¹⁾. Als Eichsubstanz wurde Serumalbumin verwendet.

Polysaccharide und Proteine. — Weizenstärkedextrin: Handelspräparat der Firma BLATTMANN & CO., Wädenswil. Bezeichnung: 160/200.

¹⁶⁾ Z. B. D. L. MORRIS, Science 107, 254 (1948).

¹⁷⁾ R. W. BAILY, Biochem. J. 68, 669 (1958).

¹⁸⁾ E. A. McCOMB & R. M. McCREADY, Analyt. Chemistry 24, 1630 (1952).

¹⁹⁾ W. KÜNDIG, Diplomarbeit, Agrikulturchemisches Institut, ETH., Zürich (1959).

²⁰⁾ M. A. JERMYN & F. A. ISHERWOOD, Biochem. J. 64, 123 (1956).

²¹⁾ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193,

Zuckerrübenaraban wurde durch Extraktion von Zuckerrübenschitzeln mit Ca(OH)_2 nach HIRST & JONES²²⁾ erhalten: Pentosangehalt 89%. Auf dem Papierchromatogramm sind Arabinoose, Galaktose und Spuren von Rhamnose feststellbar.

Zuckerrübenpektinsäure: Mit HCl-Alkohol behandelte Zuckerrübenschitzel wurden mit NaOH bei -10° in Glycerin verseift, das Na-Pektat mit Wasser extrahiert und in HCl-Alkohol gefällt. Diese Pektinsäure enthielt nur 45% Polygalakturonsäure, der Rest bestand aus Araban und Galaktan, die durch diese Extraktionsmethode möglichst wenig verändert werden sollten.

Citrus-Pektinsäure: Hochgereinigte Polygalakturonsäure, hergestellt aus *Citrus*-Pektin, Reinheitsgrad 88%.

Serumalbumin: Verwendet wurde Rinder-Serumalbumin, «reinst», BEHRINGWERKE, Marburg, Deutschland.

Weizenpentosan (Arabinoxylan) wurde durch fraktionierte Fällung eines wässrigen Weizengehlextraktes mit Ammoniumsulfat nach PREECE & HOBKIRK¹⁴⁾ hergestellt, Pentosangehalt 91%.

Wasserlösliche Weizengehlpolysaccharide: 1 Teil Weizengehl (Manitoba II) wurde mit 2 Teilen Wasser bei Zimmertemperatur extrahiert. Der Extrakt wurde erhitzt; die koagulierten Eiweißstoffe wurden in einer SPINCO-Zentrifuge abgetrennt. Die klare, viskose Lösung wurde dialysiert und lyophilisiert: Gehalt an Pentosan 29%, Protein 19% und Hexosan (Differenz) 52%.

Wir danken Herrn Dr. G. H. JOSEPH, SUNKIST GROWERS INC., Corona, Calif., USA., für die Überlassung der hochgereinigten *Citrus*-Pektinsäure. Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel der Eidgenössischen Stiftung zur Förderung der schweizerischen Volkswirtschaft durch wissenschaftliche Forschung sowie der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, ermöglicht. Wir danken bestens für diese Unterstützung.

SUMMARY

It is shown that diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-cellulose) columns can be used for efficient chromatographic fractionation of polysaccharide mixtures. At about pH 6 neutral polysaccharides are not or only weakly adsorbed by DEAE-cellulose. They can be readily eluted at the same pH by buffers of increasing strength. Neutral polysaccharides are adsorbed by DEAE-cellulose in the hydroxyl form and can be fractionated by elution with NaOH of increasing strength. Acidic polysaccharides like pectic acid are adsorbed readily at neutral and weakly acidic pH values, but can only be eluted by increasing the pH. The use of the borate form of DEAE-cellulose and elution with Na-borate of increasing strength increases the fractionation effect. Examples are given for the fractionation of wheat starch dextrin, a mixture of sugar beet araban and pectic acid, sugar beet pectic acid, a mixture of wheat pentosan and serum albumin, and of the cold water-soluble wheat flour polysaccharides.

The fractionation of a sugar beet pectic acid strongly indicates that araban and galactan are covalently linked to the polygalacturonic acid chains. The results with the water-soluble wheat flour polysaccharides indicate the presence of a polysaccharide-protein complex, the polysaccharide part of which consists of xylose, arabinose, and galactose.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

265 (1951).

²²⁾ E. L. HIRST & J. K. N. JONES, J. chem. Soc. 1948, 2311.