

## Note

### Untersuchung und Reinigung von kieselensäurehaltigen Kohlenhydraten

ULRICH SCHWARZMAIER

*Institut für Organische Chemie\*, Neue Universität, D-23 Kiel (B.R.D.)*

(Eingegangen am 22. Oktober 1975)

Bekanntlich eignet sich Kieselgel in Verbindung mit wasserhaltigen Laufmitteln vorzüglich für die chromatographische Auftrennung von Zuckern, Glycosiden und andersartigen Naturstoffen. Leider wird jedoch die Qualität der eluierten Komponenten durch einen gewissen Gehalt an kolloidaler Kieselsäure bisweilen merklich gemindert. Zu den mannigfaltigen Störungen, mit denen man unserer Erfahrung nach rechnen muss, zählen Verhinderung der Kristallisation durch Schutzkolloidwirkung, Substanzverluste durch wiederholtes Filtrieren und Umkristallisieren, uncharakteristische physikalische Konstanten für Schmelzpunkt und Drehwert, unbefriedigende Elementaranalysenwerte, untypische Kristallformen sowie Koagulationserscheinungen bei der Applikation an Testorganismen. Besonders betroffen sind naturgemäss Substanzen, die sich nicht zur Kristallisation bringen lassen. Wir waren im Rahmen unserer Naturstoffarbeiten<sup>1</sup> gezwungen, eine Lösung für das angesprochene Problem zu finden und möchten im folgenden darüber kurz berichten.

#### METHODEN, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Als Laufmittel für Kohlenhydrate bei der Dünnschicht-, präparativen Schicht- und Säulenchromatographie (DC, PSC, SC) auf Kieselgel verwenden wir gewöhnlich wassergesättigte Chloroform-Methanol-Gemische (Tabelle I). Je nach Zusammensetzung des Elutionsmittels, Provenienz des Trägers und Alter der Säulenfüllung bei Mehrfachverwendung enthält das Eluat 1–6 mg Kieselsäure pro 100 ml Lösung. Am einfachsten ergibt sich der Gehalt aus dem Eindampfrückstand von Blindelutionen.

Identifikation und halbquantitative Bestimmung der Kieselsäure erlaubt auch die Wassertropfenprobe<sup>2</sup>, bei der der Rückstand mit Calciumfluorid/Schwefelsäure aufgeschlossen und verflüchtigt und das auf feuchtem Filterpapier niedergeschlagene Hydrolyseprodukt nach dem Trocknen über Kaliumhydroxid ausgewogen wird. Die in chromatographisch gereinigten Kohlenhydraten enthaltene Kieselsäure lässt sich auf die gleiche Weise bestimmen. Eine zweite Möglichkeit besteht in der Acetylierung des Kohlenhydrats mit Acetanhydrid/Pyridin, Vakuumverdampfung des Reagenzes und gravimetrischer Bestimmung des in Chloroform unlöslichen Siliciumdioxids.

Welche Anomalien die mitgelöste Kieselsäure bedingt, zeigt an einigen Bei-

\* Direktor: Prof. Dr. A. Mondon.

spielen Tabelle I, in der die Schmelzpunkte und Drehwerte einiger kieselsäurehaltiger und von Kieselsäure befreiter Kohlenhydrate nach einmaliger Kristallisation gegenübergestellt sind. Im Falle von Saccharose, Amygdalin und Rutin ist die Kristallisation nicht merklich beeinträchtigt, der Schmelzpunkt jedoch deutlich erniedrigt. Der Drehwert lässt auf einen Gehalt an eingeschlossener Kieselsäure von *ca.* 1% schliessen. Isoamygdalin (racemisiertes Amygdalin<sup>3,4</sup>), das als Diastereomerenmisch nicht kristallisierbar ist, weist dagegen eine beträchtliche Drehwerterniedrigung auf, die von einem Kieselsäuregehalt von *ca.* 5% herrührt. Im Falle von Sambunigrin (*L*-Mandelsäurenitril- $\beta$ -D-glucosid<sup>5</sup>) tritt die Kristallisation ohne Animpfen nicht ein, bedingt durch einen als Schutzkolloid wirkenden Kieselsäuregehalt von *ca.* 2.5%.

Über ein schonendes Abtrennverfahren für Kieselsäurespuren, bei dem keine andersartigen Störsubstanzen eingeschleppt werden, liegt bisher kein Bericht vor. Filtration und Zentrifugation erweisen sich als völlig nutzlos. Ultrafiltration und Ultrazentrifugation konnten nicht ausprobiert werden. Das einzige brauchbare und einfache Verfahren, auf das wir stiessen, ist Verteilungschromatographie auf Cellulosepulver. Zur Elution verwendet man am besten dasselbe Laufmittel wie bei der vorherigen Trennung auf Kieselgel.

Wir verwenden für die Entkieselung Cellulosepulver Nr. 123 A (Schleicher & Schüll, Dassel, B.R.D.). Eine gründliche Vorreinigung ist unumgänglich und gelingt folgendermassen: Das Trägermaterial wird fünfmal jeweils 5 min mit reichlich Wasser ausgekocht und abgenutscht. Nach der letzten Filtration wird der Rückstand auf dem Filter mit Methanol und Chloroform nachgewaschen, sodann im Vakuum getrocknet oder als methanolische Suspension aufbewahrt. In der Säule wird der Träger unmittelbar vor dem Gebrauch nochmals mit dem jeweils vorgesehenen Laufmittel gewaschen, und zwar solange, bis das Eluat völlig kohlenhydratfrei und UV-inaktiv abtropft (benötigte Lösungsmittelmenge *ca.* 0.5–1.0 l). Das kieselsäurehaltige Kohlenhydrat gibt man in Form eines trocknen Adsorbats an hochreinem Cellulosepulver auf die Säule. Bei der Elution eilt das Kohlenhydrat der Kieselsäure voraus. Ist eine Entfärbung des Präparats erforderlich, kann man dem Träger 1% Aktivkohle zumischen. Nach der Reinigung weisen die Kohlenhydrate ein wesentlich verbessertes Kristallisationsvermögen auf, woraus merkliche Ausbeutesteigerung resultiert.

Bezüglich der Säulenkapazität gelten folgende Daten: Die optimale Schichtdicke beträgt *ca.* 20 cm. Für 1 g Kohlenhydrat sollte eine Querschnittsfläche von *ca.* 5 cm<sup>2</sup> zur Verfügung stehen.

Das beschriebene Entkieselungsverfahren ist von uns bisher zur Reinigung von Monosen, Biosen und Triosen sowie deren Glycosidderivaten herangezogen worden. Es lässt sich erwarten, dass die Methode bei höheren Oligomeren versagt, wenn deren Polarität grössenordnungsmässig der von kolloidaler Kieselsäure entspricht.

Als Störfaktor ist Kieselsäure kürzlich auch bei Biotests mit Steroiden in Erscheinung getreten<sup>6</sup>. Die Abtrennung erfolgte mit Hilfe von DC-Celluloseplatten. Das vorgeschlagene Verfahren ist für unsere Zwecke jedoch völlig unbrauchbar. Es führt zur Verunreinigung der Probe mit den in der Schicht vorhandenen löslichen Kohlenhydraten und UV-aktiven Stoffen und erlaubt nicht die Aufarbeitung präparativer Ansätze.

TABELLE I

## VERGLEICH KIESELSÄUREHALTIGER UND KIESELSÄUREFREIER KOHLENHYDRATE NACH EINMALIGER KRISTALLISATION

Träger: Kieselgel 0.05-0.2 mm (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.). Laufmittel: A = Chloroform-Methanol (2:1, wassergesätt.); B = Chloroform-Methanol (4:1, wassergesätt.); C = Chloroform-Methanol-Eisessig (80:40:3, wassergesätt.). Lösungsmittel: D = Wasser-Äthanol (1:9); E = Essigester; F = Methanol-Wasser (1:2); G = Wasser; H = 0.1 % Essigsäure; I = Äthanol-Wasser (1:1).

No.	Substanz	Laufmittel	$R_f$ -Wert	Schmelzpunkt ( $^{\circ}$ C)		Spez. Drehung $[\alpha]_D^{20}$		Lösungsmittel	Kiesel säure- gehalt (ca.) (%)
				Unrein	Rein	Unrein	Rein		
1	Saccharose	A	0.20	174-177	184-186	+65.7	+66.4	G	1
2	Amygdalin	A	0.49	208-212	222-224	-39.5	-40.0	H	1
3	Isoamylgda lin	A	0.49	—	—	-48.5	-51.1	H	5
4	Sambunigrin	B	0.34	—	156-157	-75.2	-77.1	H	2.5
5	Rutin	C	0.33	185-187	190-193	-36.0	-36.5	I	1

## LITERATUR

- 1 U. Schwarzmaier, *Dissertation*, Kiel, 1970.
- 2 G. Jander und E. Blasius, *Lehrbuch der Analytischen und Präparativen Anorganische Chemie*, Hirzel, Stuttgart, 9. Aufl., 1970, S. 208.
- 3 J. W. Walker, *J. Chem. Soc., London*, (1903) 472.
- 4 H. D. Dakin, *J. Chem. Soc., London*, (1904) 1512.
- 5 U. Schwarzmaier, *J. Chromatogr.*, 111 (1975) 430.
- 6 E. Schnurr, *J. Chromatogr.*, 84 (1973) 165.