

DÜNNSCICHT-CHROMATOGRAPHIE

VI. MITTEILUNG. SPURENANALYSE VON ZUCKERGEMISCHEN
AUF KIESELGUR G-SCHICHTEN

EGON STAHL UND ULRICH KALTENBACH

Botanisches Institut der Universität des Saarlandes, Saarbrücken (Deutschland)

(Eingegangen den 22. August 1960)

Bisher wurde über die adsorptionschromatographische Trennung lipophiler Gemische auf Kieselgel G-Schichten berichtet und eine Reihe von Arbeitstechniken beschrieben (STAHL, I.-V. Mitteilung)¹⁻⁵. Es schien nun von Interesse, den Anwendungsbereich über die Aminosäuren^{6,7} hinausgehend in das Gebiet der hydrophilen Zucker auszuweiten, ohne allerdings die rein anorganischen Trennschichten zu verlassen.

SORPTIONSMITTEL UND ELUTIONSMITTEL

Auf den bisher von uns bevorzugten Kieselgel G- und Aluminiumoxyd G-Schichten lassen sich auch bei Verwendung entsprechend stark polarer Elutionsmittel keine brauchbaren Zuckertrennungen durchführen. Erst der Einsatz von Kieselgur G brachte Erfolge, die sich durch eine schwache Pufferung mit Natriumazetat verbessern liessen. Von den zahlreichen, bisher beschriebenen Lösungsmittelsystemen konnten wir keines direkt übernehmen. Durch stufenweise Variation eines Gemisches von Äthylazetat-Isopropanol-Wasser gelangten wir zu den optimalen Trennbedingungen.

Bei diesen Versuchen beobachteten wir eine u.U. interessante Erscheinung, die

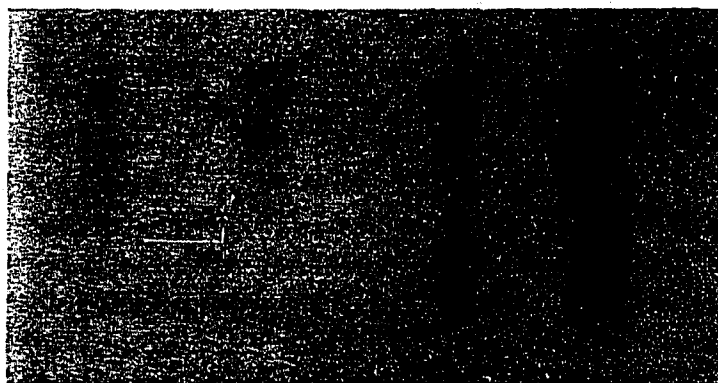


Fig. 1. Ausschnitt aus einem Dünnschicht-Chromatogramm auf ungepuffertem Kieselgur G. Bei der Glucose (links), 0.5 und 1 μ g, und der Galaktose (rechts), 0.5 und 1 μ g, treten 2 Zonen deutlich hervor.

auf ungepufferten Kieselgur G-Schichten bei Verwendung eines Gemisches Methylazetat (18 Volumenteile)–Isopropanol (1 Volumenteil)–Wasser (1 Volumenteil) besonders deutlich hervortrat. Die im Pyridin gelösten Monosaccharide, am deutlichsten Glucose und Galaktose, trennten sich in 2 Zonen (Fig. 1). Ob es sich hier um eine Trennung in die α - und β -Form oder Aldehyd- (Keto-) und Lactol-Form handelt, bleibt offen. Fig. 1 lässt erkennen, dass dieser Effekt nicht durch einen Entmischungsvorgang des Elutionsmittels zustande kommt. Dieses Phänomen tritt nicht auf, wenn wir ein Gemisch von 65 Volumenteilen Äthylazetat und 35 Volumenteilen Isopropanol 65% verwendeten. Hiermit lassen sich auf einer Strecke von 10 cm 8 Zucker in 25–30 Minuten trennen (Fig. 2). Durch Variation des Isopropanol–Wasser-Anteils im Gemisch lassen sich die R_F -Werte erhöhen beziehungsweise senken. Interessieren zum Beispiel mehr die Disaccharide, so wird man diesen Anteil auf 35–40% erhöhen, und ihn bei Pentosen u.U. auf 25–30% verringern.



Fig. 2. Dünnschicht-Chromatogramm vom Zuckerm (je 0,5 μ g) auf einer gepufferten Kieselgur G-Schicht. Die Sichtbarmachung erfolgte mit dem beschriebenen Anisaldehyd–Schwefelsäure-Reagenz. G 1 = Gemisch vom No. 1–8; G 2 = Gemisch vom No. 9–12; G 3 = Gemisch von No. 5–9. In der Tabelle I sind unter dem Nummern 1–13 die verschiedenen Zucker aufgeführt.

SICHTBARMACHUNG DER GETRENNTEN ZUCKER

Von den zahlreichen im letzten Jahrzehnt beschriebenen Reagenzien zur Sichtbarmachung der getrennten Zucker (s. z.B. bei MERCK⁸ und HALL UND MACEK⁹) ergab das Anilinphtalatreagenz die brauchbarsten Ergebnisse. Als ein wesentlich empfindlicheres Sprühreagenz erwies sich die für Steroide empfohlene KAGE-MIESCHER-Reaktion mit Anisaldehyd–Schwefelsäure. Beim Erhitzen der hiermit besprühten Chromatogramme treten deutliche Farbdifferenzierungen auf, die sich neben den R_F -Werten zur Identifizierung heranziehen lassen (Tabelle I).

Das Reagenz ist allerdings nicht spezifisch, wie schon aus seiner bisherigen Verwendung zum Steroidnachweis hervorgeht. Nach unseren Erfahrungen möchten wir

es in die Reihe der Universalreagenzien für Naturstoffe einreihen. Es hat uns zum Beispiel auch bei der Charakterisierung der einzelnen Komponenten ätherischer Öle gute Dienste erwiesen.

TABELLE I
R_F-WERTE UND FARBREAKTIONEN DER ZUCKER

No. (Fig. 2)	Zucker	R _F -Werte*	Farbreaktion: 0.5 µg Zucker und Anisal- dehyd-Schwefelsäure 100°
1	Lactose	0.04	grünlich
2	Saccharose	0.08	violett
3	Glucose	0.17	hellblau
4	Fructose	0.25	violett
5	D(+)-Xylose	0.39	grau
6	D(-)-Ribose	0.49	blau
7	L(+)-Rhamnose	0.62	grün
8	D(+)-Digitoxose	0.94	blau
9	L(+)-Arabinose	0.28	gelbgrün
10	D(+)-Mannose	0.23	grün
11	D(+)-Galaktose	0.18	grüngrau
12	Maltose	0.06	violett
13	L(-)-Sorbose	0.26	violett

* Die R_F-Werte gelten für das System 65 Teile Äthylazetat – 35 Teile Isopropanol (65 %ig) für 20 × 20 cm Kieselgur G-Schichten und "Kammerübersättigung". Sie liegen auf 5 × 20 cm Schichten in runden Trennkammern höher.

DISKUSSION

Über papierchromatographische Zuckertrennungen liegen zahlreiche Arbeiten vor. Als optimale Auftragsmenge wird der Bereich zwischen 100 und 500 µg empfohlen und die untere Nachweisgrenze pro Zucker um 5 µg angegeben. Auf Kieselgur G-Schichten liegt bei Verwendung des Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenzes die untere Erfassungsgrenze bei 0.05 µg, der optimale Bereich um 0.5 µg und die maximale Auftragsmenge bei 5 µg pro Zucker (Fig. 3). Die beschriebene Methode ist gegenüber den bisherigen Verfahren um 2 Zehnerpotenzen empfindlicher, ein Vorteil, der bei der Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen kleiner Zellkomplexe (z.B. von pflanzlichen Drüsen, Siebröhren, Nektarien) von Wert ist.

Die Kieselgur G-Schichten sind den gepufferten Glasfaserpapieren überlegen*, bei denen JAYME UND KNOLLE¹⁰ als besonderen Vorteil die kurze Laufzeit von 2 Stunden (Papier ca. 8 Stunden) hervorheben. Wenn GRÜNE¹¹ zu den Zuckertrennungen auf Glasfaserpapieren schreibt "Hier und da versagt die Methode noch aus bislang nicht erklärbaren Ursachen", so wollen wir annehmen, dass das Kieselgur G "MERCK"¹² in gleichbleibender Güte herstellbar ist. Da es sich im Gegensatz zu den von uns bisher beschriebenen adsorptionschromatographischen Trennungen lipophiler Substanzen¹⁻⁵ hier um einen Verteilungsvorgang handelt, machen sich Störungen durch grössere Mengen von Fremdionen deutlich bemerkbar. Dieser Effekt lässt sich jedoch herab-

* Dies gilt wohl auch für die von DIECKERT UND MORRIS¹³ zum gleichen Zweck vorgeschlagenen mit Kieselsäure imprägnierten Glasfaserpapiere.

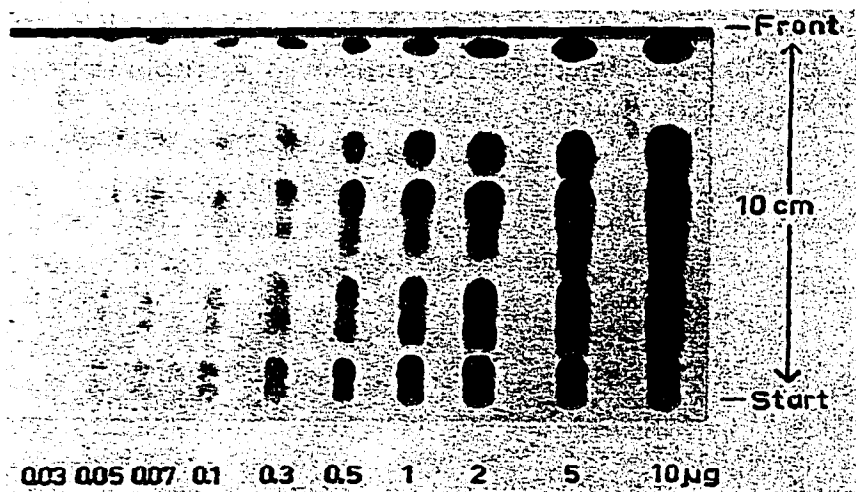


Fig. 3. Dünnschicht-Chromatogramm des Zuckergemisches G 1 (siehe Text Fig. 2). Die aufgetragene Menge pro Zucker steigt von links ($0.03 \mu\text{g}$) nach rechts ($10 \mu\text{g}$) an.

drücken, wenn etwa wie bei den zuckerhaltigen Fruchtsäften die Möglichkeit einer starken Verdünnung (z.B. 1:100) mit Pyridin besteht.

Der Anwendungsbereich der Dünnschicht-Chromatographie erstreckt sich nun von den lipophilen bis zu den hydrophilen Gemischen, und es ist nur noch eine Frage der Zeit, die verbliebenen Lücken zu füllen, und die Vor- und Nachteile der Verfahren gegeneinander abzuwägen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Kieselgur G-Schichten

Die Herstellung der Trennschichten 200×200 mm erfolgte in bekannter Weise mit der DESAGA-Grundausrüstung No. 600*. Als Sorptionsmittel wurden für je 5 Platten 30.0 g Kieselgur G für Dünnschicht-Chromatographie nach STAHL (Hersteller E. MERCK, Darmstadt) mit 60 ml einer 0.02 M wässrigen Natriumazetatlösung gleichmässig gemischt. Nach dem Aufstreichen der Schicht wurden die Platten 30 Minuten bei 100° getrocknet und danach die Startpunkte 15 mm vom unteren Rand entfernt durch Einstiche markiert. Die Trennstrecke betrug in allen Fällen 100 mm.

Elutionsmittel

65 ml Essigsäureäthylester "zur Chromatographie" + 35 ml einer Mischung aus 2 Volumenteilen Isopropanol p.a. und 1 Volumenteil dest. Wasser. Das Gemisch wurde täglich frisch bereitet.

Es wurde nur mit "Kammerübersättigung" (s. STAHL⁴) gearbeitet. Die Raumtemperatur lag um 20° .

Zucker

Neben der Zuckerkollektion "Merck" (Tabelle I, No. 1, 2, 3, 4, 5, 9, 11, 13) wurden die uns freundlicherweise von Fa. HOFFMANN LA ROCHE, Basel, überlassenen Zucker (Tabelle I, No. 6, 7, 8, 10, 12) verwendet.

* Hersteller: DESAGA, Heidelberg, Hauptstr. 60.

Die Zucker wurden 0.1 %ig in Pyridin p.a. gelöst und hieraus die entsprechenden 0.01 und 0.005 %igen Verdünnungen hergestellt. Zuckergemische wie Honig, Malzextrakt wurden 0.5 %ig in Pyridin gelöst, Fruchtsäfte wurden 1:100 mit Pyridin verdünnt.

Sichtbarmachung

Besprühen der Schicht nach dem Chromatographieren mit 10 ml eines jeweils frisch bereiteten Gemisches bestehend aus: 9 ml Äthanol 95 % + 0.5 ml konz. Schwefelsäure p.a. + 0.5 ml Anisaldehyd "MERCK". Danach 5–10 Minuten auf 90–100° erhitzen: Farben siehe Tabelle I.

Bei nicht mit Azetat gepufferten Schichten wurde dem vorstehenden Reagenz einige Tropfen Eisessig zugefügt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Dünnschicht-Chromatographie ermöglicht bei Verwendung von Kieselgur G-Schichten mit einem Gemisch von 65 Volumenteilen Essigsäureäthylester + 35 Volumenteilen Isopropanol (65 %ig) die Trennung einer Reihe von Zuckern in 25–30 Minuten. Die untere Erfassungsgrenze der Zucker liegt bei zusätzlicher Verwendung eines Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenzes um 2 Zehnerpotenzen unter der Papierchromatographie.

SUMMARY

By means of thin-layer chromatography on Kieselguhr G layers it is possible to separate a number of sugars in 25–30 minutes with a mixture (65:35 v/v) of ethyl acetate + isopropanol (65 %). Using an anisaldehyde-sulphuric acid reagent the minimum amount of sugar that can be detected is 2 orders of magnitude lower than in paper chromatography.

LITERATUR

- ¹ E. STAHL, *Pharmazie*, 11 (1956) 633.
- ² E. STAHL, *Chem. Ztg.*, 82 (1958) 323.
- ³ E. STAHL, *Parfümerie u. Kosmetik*, 9 (1958) 564.
- ⁴ E. STAHL, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 411; 293 (1960) 531.
- ⁵ E. STAHL, *Pharm. Rundschau*, 1, No. 2 (1959) 1.
- ⁶ E. NÜRNBERG, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 610.
- ⁷ E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 449.
- ⁸ E. MERCK, *Chromatographie*, Darmstadt, 1959.
- ⁹ I. M. HAIS UND K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, G. Fischer, Jena, 1958.
- ¹⁰ G. JAYME UND H. KNOLLE, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 243.
- ¹¹ A. GRÜNE, *Chimia (Switz.)*, 11 (1957) 173, 213.
- ¹² E. MERCK, *Dünnschicht-Chromatographie*, Darmstadt, 1960.
- ¹³ J. W. DIECKERT UND N. J. MORRIS, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 31.