

QUANTITATIVE GLYKOGEN- UND ZUCKERBESTIMMUNG MIT HILFE DER PAPIERCHROMATOGRAPHIE*

GERHARD H. SCHMIDT UND HANS BRUNNERT

*Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg** (Deutschland)*

(Eingegangen den 2. Juli 1962)

Zur quantitativen Bestimmung des Glykogens wurde bisher im allgemeinen die auf PFLÜGER¹ zurückgehende Methode, die vielfach modifiziert wurde², angewandt. Hierbei wird das Gewebe zunächst mit 20%iger Natronlauge mazeriert und dann das Glykogen aus heisser Lösung mit Alkohol gefällt. Nach mehrmaligem Auswaschen lässt sich dann entweder die colorimetrisch arbeitende Anthron-Methode³ anwenden, oder das Glykogen wird einer saueren Hydrolyse unterworfen und danach die entstandene Glukose nach HAGEDORN-JENSEN titrimetrisch ermittelt.

Bei unseren Untersuchungen über die Glykogen- und Polysaccharidveränderungen während der Postembryonalentwicklung von Insekten (z.B. Ameisen) zeigte sich, dass die üblichen Fällungsmethoden viel zu niedrige und keine konstanten Werte ergaben. JOHN⁴ wies bereits bei ihren Untersuchungen über den Glykogengehalt der Biene darauf hin, dass ein Auswaschen des Niederschlages mit destilliertem Wasser erhebliche Glykogenverluste zeitigte. Das Glykogen soll in den Zellen häufig als lockere Eiweiss-Glykogen-Verbindung in zwei Formen vorliegen, dem löslichen Lyo- und dem unlöslichen Desmo-Glykogen⁵. Die beiden Glykogene sind mehr oder minder einheitlich in der Zusammensetzung und haben verschiedene Molekulargewichte. Da sich unsere bisherigen Kenntnisse hauptsächlich auf Erfahrungen mit Säugetier-Glykogen stützen, besteht die Möglichkeit, dass bei der Vielzahl der Insekten weitere bisher noch unbekannte Faktoren hinzukommen, die eine Glykogenbestimmung in üblicher Form erschweren.

Nach der wenig erfolgreichen Anwendung der erwähnten Fällungsmethode waren wir gezwungen, nach einer nicht sehr aufwendigen Mikromethode zu suchen, die eine zuverlässige und reproduzierbare Glykogen- und Zuckerbestimmung erlaubte. Mit Hilfe der Papierchromatographie erhielten wir befriedigende Ergebnisse.

BEKANNTE PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNGSVERFAHREN

Polysaccharide lassen sich papierchromatographisch nur nach Hydrolyse in Form ihrer Bausteine quantitativ ermitteln. In den letzten 10 Jahren sind eine Reihe von papierchromatographischen Bestimmungsmethoden für Zucker bekannt geworden. Zur quantitativen Bestimmung wird entweder ihr reduzierender Charakter oder ihre Furfurolisierbarkeit ausgenutzt. Prinzipiell wurden drei Verfahren beschrieben:

* Die Untersuchungen wurden in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft durch eine Sachbeihilfe unterstützt.

** Vorstand: Prof. Dr. K. GÖSSWALD.

1. Nach Chromatographie Anfärbung auf dem Papier und direkte Photometrie des Farbfleckens sowie Planimetrie der erhaltenen Kurvenflächen.

2. Nach Chromatographie Anfärbung auf dem Papier, dann Elution des Farbstoffs und Messung der Extinktion im Spektralphotometer bei bestimmter Wellenlänge.

3. Nach Chromatographie Elution der Zucker, dann Farbstoffbildung *in vitro* und Ermittlung der Extinktion wie bei 2.

Das erste Verfahren erfordert zweifelsohne den geringsten Arbeitsaufwand. Weiterhin sind die durch eine Elution entstehenden Fehlermöglichkeiten ausgeschlossen. Durch direkte Photometrie der Farbflecken ist prinzipiell jede Farbbildung auswertbar. Die zweite Methode erlaubt nur die Verwendung eluierbarer Farbstoffe nach einer vollkommenen Trennung der Substanzen. Ähnlich können im dritten Verfahren nur solche Nachweisreagentien verwendet werden, die lösliche Farbstoffe ergeben. FLOOD und Mitarbeiter⁶ umgehen die Farbstoffbildung und führen nach dem Herauslösen der Zucker aus dem Papier eine titrimetrische Mikromethode durch. Die Papierchromatographie wird lediglich als Reinigungsverfahren benutzt. Ähnliche Verfahren liegen besonders aus den letzten Jahren vor⁷.

McFARREN, BRAND UND RTKOWSKY⁸ verwendeten zur quantitativen Bestimmung von Zuckern auf Filtrierpapier wohl als erste ammoniakalisches Silbernitrat. Die nach Besprühen entstehenden Silberflecken sind nicht eluierbar und lassen sich nur direkt auf dem Papier photometrieren. FISCHER UND DÖRFEL⁹ bezeichneten diese Reaktion deshalb als ungünstig. Die Bestimmung auf dem Papier soll angeblich umständlicher und ungenauer sein. Weiterhin soll eine mangelhafte Proportionalität zwischen Zuckermenge und Silberschwärzung bestehen. Sie ziehen die Reaktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid vor, eluieren das entstandene Formazan und bestimmen die Extinktion mit einer maximalen Streuung der Messwerte von 4–9 % bei 12 Einzelbestimmungen. Der mittlere Fehler betrug 2–4 %. Aber auch hier wurde kein stöchiometrischer Verlauf der Farbreaktion gefunden. Sowohl bei der direkten Photometrie der Flecken auf dem Papier als auch mittels der Elutionsmethode war es nicht möglich, einmal festgelegte Eichkurven zu verwenden. WALLENFELS und Mitarbeiter¹⁰ benutzten beide Methoden, gaben jedoch der direkten Photometrie den Vorrang, während LÜDECKE UND STANGE¹¹ die TTC-Reaktion bevorzugten und den Farbstoff eluierten. WOHNLICH¹² wendete die direkte Photometrie mit Erfolg auf die Triphenyltetrazoliumchlorid-, Benzidin- und Molybdätophosphorsäure-Reaktion an. Das Lambert-Beer'sche Gesetz soll für einen um so grösseren Konzentrationsbereich Gültigkeit haben, je kurzwelliger die untersuchte Farbe auf dem Papier ist. Auch ROBERTS¹³ wertete die Farbreaktion der Zucker mit Benzidincitrat direkt auf dem Papier aus. Die Tatsache, dass Zucker unter bestimmten Bedingungen furfurolisieren und dann mit einer cyclischen Base einen Farbkomplex bilden, nutzten weiterhin BAAR¹⁴, v. CZARNOWSKI¹⁵, DATE¹⁶, ALBERS UND FREISKORN¹⁷, WILSON¹⁸, PHILIPPU¹⁹, COLOMBO und Mitarbeiter²⁰ sowie HIMES und Mitarbeiter²¹ zur quantitativen Zuckerbestimmung aus. Die meisten Autoren^{14, 17, 18, 20} verwendeten die Phthalsäure-Anilin-Reaktion. Der entstandene Farbstoff wurde entweder eluiert und dann kolorimetriert^{14, 16, 18} oder direkt auf dem Papier gemessen^{15, 17, 20, 21}. Für eine quantitative Bestimmung müssen bei dieser Farbreaktion wenigstens 20 Chromatogramme angefertigt werden, von denen die 12 besten Flecken ausgewertet werden¹⁷. Dann soll nach Angaben der Autoren ein mittlerer Fehler von $\pm 1\%$ er-

reicht werden. Die italienischen Autoren²⁰ mussten allerdings 12 Chromatogramme mit je zwei Testflecken und fünf Vergleichsflecken anfertigen, um einen mittleren Fehler von $\pm 2-4\%$ zu erreichen. Bei direkter Photometrie auf dem Papier erhalten die Autoren zwischen Extinktion und Konzentration auf semi-logarithmischem Papier eine Gerade. Eine lineare Beziehung wurde auch gefunden zwischen den planimetrisch bestimmten Extinktionsflächen und der Quadratwurzel der Zuckerkonzentration¹⁷ sowie zwischen der Extinktionsfläche und dem Logarithmus der Zuckerkonzentration²². Nach Elution des Farbstoffes und Photometrie wurde eine Proportionalität zur Menge zwischen 10–125 μg festgestellt¹⁸. Wird der Zucker zunächst eluiert und die Farbstoffbildung *in vitro* durchgeführt, erhält man Fehlergrenzen von 0.8–5.4%, die von der Zuckerkonzentration abhängig sind¹⁹. Bei höherer Zuckermenge ist der Fehler geringer. ATHENSTEDT²³ fand nach Anwendung der Anthron-Reaktion einen mittleren Fehler von $\pm 3\%$.

Viele Arbeiten, die sich mit der quantitativen papierchromatographischen Zuckerbestimmung beschäftigen, sind wenig kritisch durchgeführt worden. Einige Bestimmungsverfahren sind nach unseren Erfahrungen zu wenig zuverlässig. In keinem Falle war es möglich, eines der beschriebenen chromatographischen Verfahren zu unserer Zufriedenheit anzuwenden.

ERARBEITUNG EINER NEUEN CHROMATOGRAPHISCHEN METHODE

In zahlreichen Vorversuchen haben wir die verschiedenen im Schrifttum angeführten Bestimmungsmethoden unter Verwendung von Reinsubstanzen wie Glukose und Glykogen der Firma Merck (beide Substanzen enthielten 7–8% Wasser) geprüft. Durch Kombination bekannter Verfahren und verschiedene Abänderungen in der Methodik gelang es uns, ein neues einfaches und zuverlässigeres Verfahren zur Polysaccharid- und Zuckerbestimmung zu entwerfen.

Zur Chromatographie der Zucker erwiesen sich Schleicher & Schüll-Papiere Nr. 2043b Mgl gegenüber den dünneren Whatman Nr. 1-Papieren als vorteilhafter; das dickere Papier lässt sich vor allem beim Wässern besser handhaben. Wir erhielten mit Silbernitrat leicht auswertbare, runde bis ovale Flecken auf weißem Grund. Praktisch jedes Chromatogramm war auswertbar, sobald die Konzentration günstig gewählt war. Hierzu ist jeweils ein Vorversuch notwendig, indem neben bekannten Mengen die zu ermittelnden unbekannt Konzentrationen aufgetragen, chromatographiert und angefärbt wurden. Leider konnten wir wiederholt feststellen, dass Papiere aus verschiedenen Fertigungsserien mitunter unterschiedliche Laufzeiten hatten, die vorher jeweils ermittelt werden mussten. Die Whatman-Papiere sind in ihrer Laufgeschwindigkeit wesentlich konstanter. Mit dem von FISCHER UND DÖRFEL⁹ verwendeten Laufmittel (Äthylacetat–Pyridin–Wasser, 40:11:6) erzielten wir im absteigenden Verfahren (Durchlaufchromatogramm) eine Laufgeschwindigkeit für Glukose von ca. 15 cm in 9–15 Stunden bei 25° und gute quantitative Ergebnisse.

Zur Ermittlung der Lage der Glukoseflecken auf dem Papierchromatogramm verwendeten wir Silbernitrat, Triphenyltetrazoliumchlorid^{9, 10}, Anilin–Phthalsäure-Reagens²⁴, Anilin–Phosphorsäure-Reagens²⁵, *p*-Aminohippursäure²⁶, und Benzidin–Trichloressigsäure²⁷. Das Triphenyltetrazoliumchlorid wird in alkalischer Lösung durch reduzierende Substanzen zum tiefroten Triphenylformazan hydriert. Selbst unter vollständigem Lichtausschluss war es nicht möglich, einen weissen Papier-

grund zu erhalten. Wir fanden stets tiefrote Flecken auf nicht gleichmässig rötlich gefärbtem Papier, wie auch in der Literatur angegeben wird⁹. Dies erschwerte eine direkte photometrische Auswertung auf dem Papier, die unseres Erachtens am wenigsten aufwendig ist. Wir waren deshalb bestrebt, letzteres Verfahren auszunutzen. Die Färbung mit Anilin-Phthalsäure ist relativ schwach mit leichter Papiergrundfarbe. Es ist nötig, grössere Zuckermengen aufzutragen. Dies ist jedoch insofern von Nachteil, weil dann gewöhnlich keine vollständige Reaktion der Zucker mit dem Reagens erreicht wird, was sich nachteilig auf die photometrische Auswertung und quantitative Bestimmung auf dem Papier auswirkt. Weiterhin ist diese Reaktion nur etwa zu 60% zuverlässig reproduzierbar. Auch ALBERS UND FREISKORN¹⁷ erhielten nach dieser Anfärbung einen hohen Prozentsatz an Chromatogrammen, die nicht auswertbar waren. Ähnlich verhielten sich die Färbungen mit Anilin-Phosphorsäure, *p*-Aminohippursäure und Benzidin-Trichloressigsäure.

Da wir verlangten, dass die Farbreaktion auf dem Papier möglichst vollständig verläuft und eine hohe Extinktion ergibt, fiel unsere Wahl auf die Silbernitrat-Färbung. Diese Reaktion ist sehr empfindlich, so dass nur geringe Zuckermengen zur Chromatographie benötigt werden. WALLENFELS, BERNT UND LIMBERG¹⁰ haben verschiedene Farbagentien auf ihre Empfindlichkeit hinsichtlich der Reaktion mit Zuckern geprüft und gelangten auch zu dem Ergebnis, dass die Reaktion der Zucker mit Silbernitrat am empfindlichsten ist und die höchste Extinktion bei Verwendung von gleichen Zuckermengen ergibt. Die Extinktion steigt mit zunehmender Zuckermenge steil an, wodurch der Absolutfehler verringert wird.

Entgegen den wenig ermutigenden Literaturangaben⁹ bezüglich der Auswertbarkeit der Silberflecken für quantitative Zuckerbestimmungen, fanden wir mit dieser Methode die beste Reproduzierbarkeit. Allerdings arbeiteten wir nicht mit ammoniakalischem Silbernitrat, sondern zogen das Chromatogramm sehr gleichmässig durch eine Silbernitrat-Lösung in Aceton (siehe S. 202). Nach dem Trocknen erfolgte ein beiderseitiges Besprühen mit äthanolischer Natronlauge²⁸. Die dunkelbraunen bis schwarzen Silberflecken erscheinen kurz danach bei Raumtemperatur. Damit die vorhandene Glukose möglichst quantitativ mit dem Silbernitrat reagiert, wird stets nach einigen Minuten nochmals mit äthanolischer Natronlauge besprüht. Das Papier ist dann auch bei Tageslicht nur leicht bräunlich gefärbt und kann durch anschliessendes Baden der Chromatogramme in Fixiersalz-Lösung bis auf die Silberflecken völlig entfärbt werden¹⁰. Es ist nur darauf zu achten, dass eine möglichst wenig benutzte, noch farblose Fixiersalz-Lösung verwendet wird. Das Salz wird durch Spülen in Leitungswasser wieder entfernt.

Nach dem Trocknen der Chromatogramme werden die Flecken direkt auf dem Papier mittels eines Extinktionsschreibers photometriert. Die schwarzen Silberflecken gestatten es, bei geringer Empfindlichkeit des Apparates zu arbeiten. Dies hat den Vorteil, dass die Grundlinie der Extinktionskurve, ermittelt aus dem Papierwert, nahezu eine Gerade darstellt und mit relativ grosser Genauigkeit festgelegt werden kann. Die bei hoher Empfindlichkeit stark hervortretenden optischen Unebenheiten des Papiers, wodurch die Festlegung der Grundlinie erschwert und die Genauigkeit der Bestimmung herabgesetzt wird, entfallen. Da die Höhe der Extinktion von vielen sehr schwer zu standardisierenden Faktoren abhängig ist, war es unbedingt erforderlich, die Flecken unbekannter Menge mit solchen bekannter Konzentration nebeneinander auf demselben Papierbogen, wie in Fig. 1, aufzu-

tragen und sie während des ganzen Prozesses möglichst gleich zu behandeln⁸. Ein Vergleich über denselben Papierbogen hinaus mit Hilfe einer generellen Eichkurve ist nicht möglich.

Die photometrierten Flecken liefern Kurvenflächen, deren Grösse planimetrisch

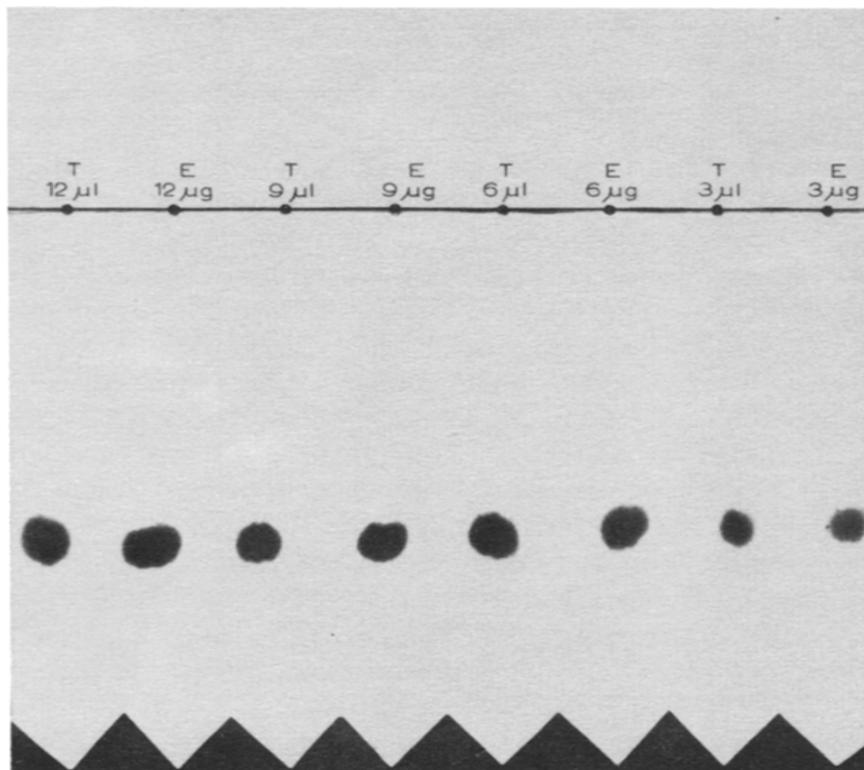


Fig. 1. Muster eines verwendeten Chromatogrammbogens, absteigend. E = Eichfleck; T = Testfleck, aufgetragen: bei 75° hydrolysiertes Glykogen.

ermittelt wird. Die Flächengrösse wird mit der der mitgewanderten Flecken bekannter Konzentration verglichen, und daraus werden die unbekanntenen Mengen graphisch ermittelt.

ZUR GÜLTIGKEIT DES LAMBERT-BEER'SCHEN GESETZES BEI DIREKTER PHOTOMETRIE

Das Lambert-Beer'sche Gesetz fordert eine geradlinige Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration eines absorbierenden Stoffes. Nach GRASSMANN UND HANNIG²⁰ hat es bei direkter Photometrie auf dem Papier jedoch nur dann Gültigkeit, wenn eine gleichmässige Verteilung eines Farbstoffes über die ganze Spaltbreite gewährleistet ist. Dies ist normalerweise in der Papierchromatographie nicht der Fall, so dass man bei direkter Photometrie stets Kurven erhält, die mit zunehmender Konzentration auf der Abszisse nach unten gekrümmt sind (Fig. 2). Wie erwähnt, ist die Steilheit der Kurven abhängig vom verwendeten Farbstoff. Eine mathematische Berechnung der Kurven soll nur dann möglich sein, wenn das Filtrierpapier vorher transparent gemacht wurde. Aufgrund der bei Verwendung von Silbernitrat nur wenig abweichenden Kurven haben wir für unsere Zwecke zur besseren Handhabung auf ein vorheriges Transparentmachen verzichtet.

Auffallend ist, dass Literaturangaben vorhanden sind, die trotz direkter Photometrie der Flecken dem Lambert-Beer'schen Gesetz für einen bestimmten Bereich Gültigkeit zuschreiben, obgleich Extinktionsschreiber bei nicht monochromatischem Licht normalerweise immer Kurven mit mehr oder weniger starker Krümmung

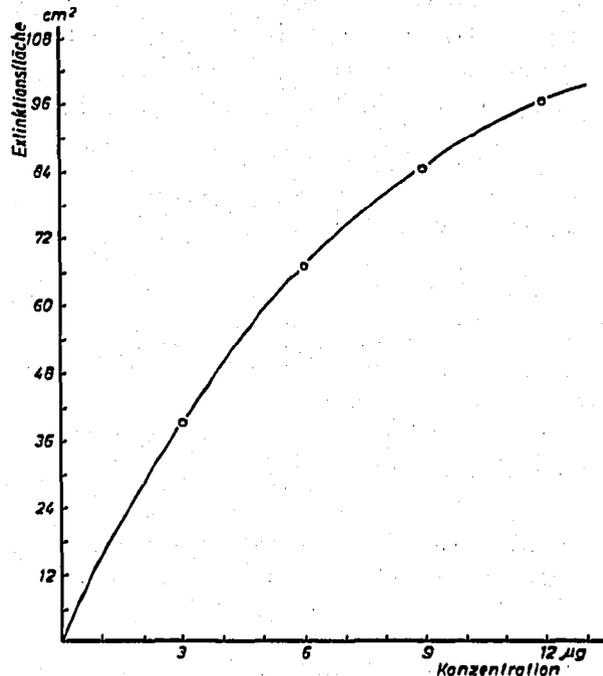


Fig. 2. Beziehung zwischen planimetrierter Extinktionsfläche und Glukose-Konzentration nach Anfärbung mit Silbernitrat.

liefern. Ihr Verlauf ist abhängig vom verwendeten Filter, der benutzten Lichtquelle sowie von der Extinktionskurve des verwendeten Farbstoffs. WALLENFELS und Mitarbeiter¹⁰ photometrierten Silberflecken mit monochromatischem Licht und auf transparentem Papier. Sie fanden dann eine Linearität zwischen Extinktionsfläche und Konzentration bis zu 25 µg.

Bei direkter Photometrie des Farbfleckens auf dem Papier hat das Lambert-Beer'sche Gesetz unter Verwendung von nicht monochromatischem Licht und nicht transparent gemachtem Papier demnach keine Gültigkeit. Trotzdem ist eine quantitative Auswertung der Flecken unter Beachtung der vorstehenden Ausführungen möglich und liefert gute Ergebnisse, wenn ein Bereich gewählt wird, in dem die

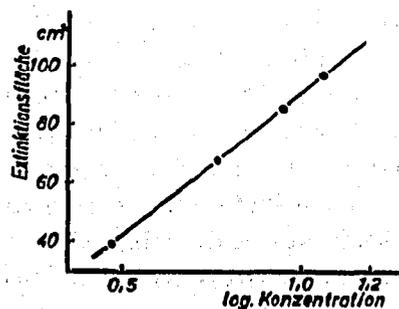


Fig. 3. Abhängigkeit der Extinktionsfläche von der Glukose-Konzentration im halblogarithmischen Koordinatensystem nach Anfärbung mit Silbernitrat.

Kurve möglichst steil verläuft. Dies ist bei geringen Konzentrationen der Fall. Glukoseflecken bis zu 15 μg sind für eine quantitative Auswertung brauchbar. Bei höheren Konzentrationen verlaufen die Kurven auch bei anderen Farbmethode so flach, dass der absolute Fehler grösser und die Bestimmung ungenauer wird.

Wir fanden für die vorliegende Methode eine lineare Abhängigkeit von Extinktionsfläche und dem Logarithmus der Konzentration (Fig. 3). Diese Proportionalität ist in der Literatur bereits für andere in der Zuckerchromatographie verwendete Farbstoffe angegeben worden^{20, 22}. Auch mit Hilfe dieser Darstellung ist durch Interpolation eine quantitative Bestimmung möglich.

HYDROLYSE VON GLYKOGEN UND WEITERE PRÄPARATION ZUR CHROMATOGRAPHIE

Glykogen zerfällt nach saurer Hydrolyse über Dextrine und Maltose in Glukose, die dann, wie beschrieben, ermittelt werden kann. Wir strebten eine möglichst optimale Hydrolyse des Glykogens an und haben deshalb zunächst die Wirkung der die Spaltung beeinflussenden Faktoren geprüft. Zur Hydrolyse benutzten wir Salzsäure, da sie sich leichter entfernen lässt als beispielsweise Schwefelsäure. 1 N Salzsäure ergab während einer Zeitdauer von 15 Stunden die höchste Glukoseausbeute. Zum Vergleich führten wir Versuche mit 1/10, 1/2, 1 und 2 N Salzsäure durch.

Weiterhin war der Einfluss der Temperatur zu prüfen. Bekanntlich hat die Temperatur einen beträchtlichen Einfluss auf den Hydrolyseverlauf. Nach Fig. 4

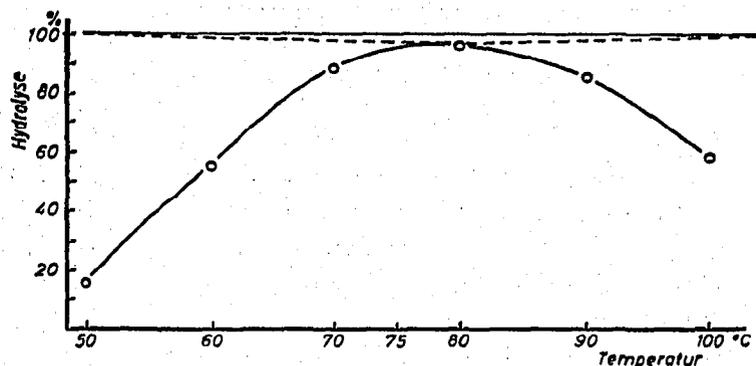


Fig. 4. Einfluss auf die Hydrolyse und Zersetzung von Glykogen mit 1 N Salzsäure; Dauer: 15 Stunden; Werte papierchromatographisch ermittelt.

liegt das Optimum unter unseren Bedingungen zwischen 70 und 80°. Bereits bei 90° tritt eine leichte Verfärbung des Hydrolysats ein, die auf eine schon eingetretene Zerstörung von Glukose hindeutet. Wir führten unsere Hydrolysen deshalb bei einer konstanten Temperatur von 75° im zugeschmolzenen Röhrchen durch. Wie chromatographisch nachgewiesen werden konnte, wurde unter diesen Bedingungen eine nahezu vollständige Spaltung des Glykogens in Glukose erreicht. Zwischenprodukte waren nicht mehr nachweisbar (vgl. Fig. 1).

Vor der Chromatographie ist es notwendig, die Säure weitgehend zu entfernen. Auch Salzsäure zersetzt beim Auftragen der Lösung das Filtrierpapier. Eine einfache Neutralisation lieferte uns quantitativ schlecht auswertbare Flecken. Die bei Verwendung von Schwefelsäure gewöhnlich durchgeführte Entfernung der Sulfationen mittels Bariumhydroxyd^{17, 30} ist aufwendig und birgt Fehlermöglichkeiten

in sich. Die von uns benutzte Salzsäure konnten wir bequem entfernen, wenn unter wiederholtem Hinzufügen von wenig Wasser mittels eines Vakuum-Rotationsverdampfers³¹ etwa dreimal bis zur Trockne eingengt wurde. Danach liess sich eine einwandfreie Chromatographie der Glukose durchführen.

FEHLERMÖGLICHKEITEN UND IHRE BERECHNUNG

Hydrolysefehler

Zur Abschätzung des durch die Hydrolyse bedingten Fehlers wurden vier Glykogenproben bei 80° an verschiedenen Tagen hydrolysiert. Nach Entfernung der Säure wurden auf einen Chromatogrammbogen (30 × 30 cm²) je zweimal nebeneinander von jedem Hydrolysat 8 µg aufgetragen und chromatographiert. Dies wurde achtmal wiederholt. Nach Photometrie der Silberflecken und Planimetrie der Kurvenflächen wurde für jedes Hydrolysat und Chromatogramm der Index *a/b* ermittelt und eine Fehlerberechnung durchgeführt (Tabelle I).

TABELLE I

BERECHNUNG DES GESAMTFEHLERS OHNE BERÜCKSICHTIGUNG DES HYDROLYSEFEHLERS
(GLYKOGENHYDROLYSATE)

| Chrom. Nr. | Indices | | | |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0.942 | 0.965 | — | — |
| 2 | 1.000 | 1.001 | 1.005 | 0.927 |
| 3 | 0.940 | 1.046 | 0.998 | 0.988 |
| 4 | 0.930 | 0.962 | 0.967 | 0.947 |
| 5 | 0.940 | 0.965 | 1.060 | 1.049 |
| 6 | 1.058 | 0.973 | 1.043 | 0.963 |
| 7 | 1.030 | 1.012 | 0.975 | 1.036 |
| 8 | 1.000 | 0.998 | 1.032 | 1.111 |
| Mittlere Fehler %-Fehler | 1 ± 0.019 ± 1.9 | 1 ± 0.011 ± 1.1 | 1 ± 0.014 ± 1.4 | 1 ± 0.025 ± 2.9 |
| Maximale Abweichung (%) | — 4.2 | — 2.6 | + 2.9 | + 5.3 |

Tabelle I zeigt die Reproduzierbarkeit des chromatographischen Vorgangs (Auftrage-, Anfärbe-, Photometrier- und Planimetrierfehler) ohne dabei den auf die Hydrolyse entfallenden Fehler zu berücksichtigen. Da auf jedem Chromatogramm für diesen Zweck nur zwei vergleichbare Flecken vorhanden sind, war es notwendig, die Indices zu berechnen, um den Fehler, der durch Verwendung von mehreren Chromatogrammen entsteht, auszuschalten und dann über das Chromatogramm hinaus Vergleiche vornehmen zu können. Ausserdem sind die einzelnen Extinktionsflächen eines Hydrolysats der verschiedenen Chromatogramme insofern nicht vergleichbar, da die Empfindlichkeit des Chromatometers jeweils so reguliert wurde, dass etwa gleich grosse Extinktionsflächen erhalten wurden. Die Berechnung ergab einen Maximalfehler von ± 4–5 %; der grösste errechnete mittlere Fehler betrug ± 2.5 %.

| Chrom. Nr. | Hydrolysate | | | | | | | | Hydrolysate $\frac{a+b}{2}$ | | | |
|------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------------------|------|------|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | a | b | a | b | a | b | a | b | | | | |
| I | 35.3 | 37.5 | 37.2 | 38.6 | 36.9 | — | — | — | 36.4 | 37.9 | 36.9 | — |
| II | 40.5 | 40.5 | 40.0 | 39.9 | 38.2 | 38.0 | 35.3 | 38.1 | 40.5 | 40.0 | 38.1 | 36.7 |
| III | 38.1 | 39.5 | 39.2 | 37.5 | 39.3 | 39.4 | 36.1 | 36.5 | 38.8 | 38.4 | 39.3 | 36.3 |
| IV | 40.0 | 43.0 | 42.8 | 44.5 | 41.3 | 42.7 | 39.6 | 41.9 | 41.5 | 43.5 | 42.0 | 40.8 |
| V | 39.2 | 41.7 | 40.2 | 41.6 | 43.6 | 41.2 | 36.5 | 34.8 | 40.4 | 40.9 | 42.4 | 35.7 |
| VI | 37.4 | 35.3 | 36.0 | 37.0 | 38.8 | 37.2 | 36.0 | 37.4 | 36.4 | 36.5 | 38.0 | 36.7 |
| VII | 40.2 | 39.0 | 39.3 | 38.8 | 39.8 | 40.9 | 42.1 | 40.6 | 39.6 | 39.1 | 40.3 | 41.3 |
| VIII | 38.6 | 38.6 | 39.8 | 39.9 | 41.3 | 40.0 | 41.6 | 37.4 | 38.6 | 39.8 | 40.6 | 39.5 |

Wird der Hydrolysefehler mit in die Berechnungen einbezogen, wie in Tabelle II, so ist zu fordern, dass der Gesamtfehler sich erhöht, wenn durch die zu verschiedenen Zeiten durchgeführte Hydrolyse der Fehler vergrößert wird. Nach Tabelle II beträgt die maximale Abweichung (Mittelwert) einschliesslich der Hydrolyse etwa $\pm 4\%$ und ist damit nicht höher als bei der in Tabelle I gezeigten Berechnungsweise. Der durch Hydrolyse verursachte Fehler liegt also innerhalb des gesamten Chromatographiefehlers. Er fällt praktisch nicht ins Gewicht und ist zu vernachlässigen. Dies bedeutet, dass die Herstellung einer geeichten Vergleichslösung unter den angegebenen Hydrolysebedingungen genügt.

Auftragsfehler

Der durch das Auftragen der Substanz auf das Papier entstehende Fehler ist stark abhängig von der Konzentration der verwendeten Lösung. Bei Verwendung einer zu konzentrierten Lösung ist die aufzutragende Menge zu gering und der Fehler wird vergrößert. Bei stark verdünnten Lösungen wird die Auftragszeit übermässig lang. Wir benutzten 0.1 %ige Glykogen- bzw. Glukoselösungen.

Auch die zum Auftragen verwendete Pipette ist für die Fehlerentstehung von grosser Wichtigkeit. Wir erzielten unter Verwendung möglichst ein und derselben Elphor-Pipette die grösste Reproduzierbarkeit. Eine Agla-Spritze war wegen ihres relativ grossen temperaturempfindlichen Volumens weniger geeignet.

Anfärbefehler

Um diesen Fehler möglichst niedrig zu halten, ist ein zweimaliges gleichmässiges Besprühen des Chromatogramms mit alkoholischer Natronlauge erforderlich, damit die Reaktion der Glukose mit dem Silbernitrat vollständig erfolgt. Jedoch dürfte gerade dieser Fehler sehr gering zu halten sein.

Photometrierfehler

Während sich die beiden vorstehenden Fehler nicht ohne weiteres quantitativ erfassen lassen, ist dies bei der Photometrie leicht zu erreichen. Da es nicht möglich ist,

II

EINSCHLIESSLICH HYDROLYSEFEHLER

| Mittelwert <i>M</i> | Abweichung von <i>M</i> | | | | Abweichungen (%) | | | |
|---------------------|-------------------------|-------|-------|-------|------------------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 37.1 | -0.7 | +0.8 | -0.2 | — | -1.9 | +2.15 | -0.54 | — |
| 38.8 | +1.7 | +1.2 | -0.7 | -2.1 | +4.38 | +3.09 | -1.81 | -5.41 |
| 38.45 | +0.35 | -0.05 | +0.85 | -2.15 | +1.01 | -0.15 | +2.46 | -6.23 |
| 41.95 | -0.45 | +1.55 | +0.05 | -1.15 | -1.07 | +3.70 | +0.12 | -0.74 |
| 39.85 | +0.55 | +1.05 | +2.55 | -4.15 | +1.38 | +2.64 | +6.40 | -10.4 |
| 36.9 | -0.5 | -0.4 | +1.1 | -0.2 | -1.35 | -1.08 | +2.98 | -0.54 |
| 40.1 | -0.5 | -1.0 | +0.2 | +1.2 | -1.24 | -2.49 | +4.98 | +2.99 |
| 39.6 | -1.0 | +0.2 | +1.0 | -0.1 | -2.52 | +5.05 | +2.52 | -0.25 |
| Maximalabweichung: | | | | | -1.86 | +2.54 | +2.72 | -4.08 |

mehr als einen Flecken gleichzeitig zu photometrieren, könnte der zeitlich verschobene Messvorgang beim Vergleich mehrerer Flecken Fehler verursachen, wenn sich die Empfindlichkeit des Apparates mit der Zeit ändert. Es wurde deshalb ein und derselbe Fleck innerhalb einer Stunde und über einen Arbeitstag hinweg jeweils achtmal gemessen. Das Ergebnis war:

| | |
|--|--------------|
| Photometrierfehler bei Messdauer von 1 Stunde | $\pm 0.68\%$ |
| Photometrierfehler bei Messdauer von 8 Stunden | $\pm 0.76\%$ |
| davon Planimetrierfehler | $\pm 0.22\%$ |

Der mittlere Photometrierfehler einschliesslich Planimetrierfehler beträgt etwa $1/3$ bis $1/2$ des mittleren Gesamtfehlers. Es ist günstig, Flecken, die miteinander verglichen werden sollen, nach Möglichkeit nacheinander zu photometrieren. Die von uns eingestellte Arbeitsweise des Photometers erlaubte, etwa acht Flecken in einer Stunde durchzumessen.

Gesamtfehler bei Benutzung verschiedener Zuckermengen

In diesen Versuchen sollte die Frage geprüft werden, ob die aufgetragene Zuckermengen einen Einfluss auf den Gesamtfehler hat. Zu diesem Zwecke wurden von einer Probe hydrolysierten Glykogens verschiedene Mengen von 3, 6, 9 und 12 μg auf ein Chromatogramm wie in Fig. 1 aufgetragen. Dies wurde auf elf verschiedenen Chromatogrammbögen wiederholt, die nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewertet wurden. In Tabelle III wurden zur Ermöglichung eines Vergleichs über die einzelnen Chromatogrammbögen hinweg wiederum von den als Test- und Eichflecken bezeichneten Spots gleicher Konzentration die Indices gebildet und die mittlere Abweichung berechnet.

Nach Tabelle III ist der mittlere Fehler bei kleineren Auftragemengen etwas höher als bei grösseren. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass der durch die Festlegung der Grundlinie nach der Photometrie entstehende Fehler bei kleineren Extinktionskurven stärker ins Gewicht fällt als bei grösseren. Die beste Reproduzier-

barkeit wird demnach zwischen Auftragemengen von 8–12 μg erreicht, obgleich sich in diesem Bereich bereits ein deutlicher Abfall der Extinktionskurve bemerkbar macht (Fig. 3). Es wurde in diesem Bereich ein maximaler mittlerer Fehler von $\pm 2.6\%$ gefunden.

TABELLE III

VERGLEICH DER MITTLEREN ABWEICHUNGEN BEI VERWENDUNG VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN EINER HYDROLYSIERTEN GLYKOGENPROBE

| Chrom. Nr. | Indices Eichfleck/Testfleck für | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 3 μg | 6 μg | 9 μg | 12 μg |
| Gly I | 1.13 | 1.03 | 1.09 | 0.83 |
| Gly II | 1.16 | 1.27 | 0.89 | 1.01 |
| Gly III | 0.84 | 0.92 | 0.94 | 0.98 |
| Gly IV | 1.09 | 0.88 | 0.99 | 1.02 |
| Gly V | 1.02 | 1.07 | 0.98 | 1.04 |
| Gly VI | 0.95 | 0.93 | 0.99 | 0.94 |
| Gly VII | 1.15 | 1.01 | 0.87 | 0.99 |
| Gly VIII | 0.99 | 0.85 | 1.08 | 0.99 |
| Gly IX | 1.13 | 1.33 | 1.00 | 1.02 |
| Gly X | 0.95 | 1.04 | 0.94 | 0.91 |
| Gly XI | 1.05 | 1.15 | 0.85 | 1.08 |
| Mittlere Abweichung %-Fehler | 1 ± 0.036 ± 3.6 | 1 ± 0.049 ± 4.9 | 1 ± 0.026 ± 2.6 | 1 ± 0.018 ± 1.8 |

Um zu prüfen, wie gross die mittlere Abweichung bei Verwendung verschiedener Konzentrationen ist, wenn jeweils zwei Chromatogramme mit je acht Flecken verglichen werden, wurde jedes Chromatogramm, das zur Ermittlung der in Tabelle III eingetragenen Indices verwendet wurde, mit jedem anderen kombiniert und für die jeweils erhaltenen 8 Indices die mittlere Abweichung errechnet. Man erhält dann 55 Werte, deren arithmetisches Mittel nach Tabelle IV bei $\pm 4.3\%$ Abweichung liegt.

TABELLE IV

MITTLERE FEHLER NACH KOMBINATION ALLER VERFÜGBAREN CHROMATOGRAMME; ERRECHNUNG DES ARITHMETISCHEN MITTELWERTES UND DER MITTLEREN ABWEICHUNG

| | Gly I | Gly II | Gly III | Gly IV | Gly V | Gly VI | Gly VII | Gly VIII | Gly IX | Gly X |
|--------------------------------------|--------|--------|---------|--------|--------------|--------|---------|----------|--------|--------|
| Gly II | 0.0543 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Gly III | 0.0402 | 0.0512 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Gly IV | 0.0372 | 0.0488 | 0.0324 | — | — | — | — | — | — | — |
| Gly V | 0.0332 | 0.0459 | 0.0278 | 0.0233 | — | — | — | — | — | — |
| Gly VI | 0.0342 | 0.0466 | 0.0286 | 0.0245 | 0.0180 | — | — | — | — | — |
| Gly VII | 0.0421 | 0.0518 | 0.0367 | 0.0332 | 0.0296 | 0.0300 | — | — | — | — |
| Gly VIII | 0.0387 | 0.0499 | 0.0341 | 0.0320 | 0.0255 | 0.0266 | 0.0351 | — | — | — |
| Gly IX | 0.0568 | 0.0650 | 0.0538 | 0.0516 | 0.0488 | 0.0495 | 0.0544 | 0.0526 | — | — |
| Gly X | 0.0356 | 0.0476 | 0.0310 | 0.0363 | 0.0230 | 0.0218 | 0.0315 | 0.0283 | 0.0503 | — |
| Gly XI | 0.0437 | 0.0543 | 0.0406 | 0.0370 | 0.0330 | 0.0339 | 0.0408 | 0.0385 | 0.0566 | 0.0352 |
| Arithmetisches Mittel aus 55 Werten: | | | | | 0.0432 | | | | | |
| Mittlere Abweichung: | | | | | ± 0.0017 | | | | | |

Nach Tabelle IV liegen 2/3 aller für je 8 Indices berechneten mittleren Abweichungen zwischen ± 4.15 – 4.49 %. Die Methode ist also in den meisten Fällen mit einem Fehler von ± 4 – 4.5 % belastet. Bei Addition aller Fehler wird die Reproduzierbarkeit bis auf ± 6.5 % erhöht; im günstigsten Falle wurde ein Fehler von ± 1.8 % ermittelt. Eine Verringerung des Fehlers kann durch Verwendung günstiger Konzentrationen und durch Eliminierung schlecht auswertbarer Flecken bzw. stark abweichender Indices erfolgen, was in Tabelle IV nicht geschehen ist.

VERGLEICH GLEICHER MENGEN GLUKOSE UND GLYKOGEN AUF DEM CHROMATOGRAMM SOWIE ERMITTLUNG DES WÄHREND DER HYDROLYSE ZERSTÖRTEN ANTEILS

Der Vergleich einer bestimmten Glukosemenge mit dem nach Hydrolyse aus einer gravimetrisch gleichen Glykogen- oder anderen Polysaccharidmenge entstandenen Glukoseanteil erschien insofern interessant, da hierdurch die Möglichkeit gegeben wird, mit Hilfe eines ermittelten Faktors Glukosemengen in Glykogen umzurechnen und diese neben Polysaccharidmengen relativ leicht ohne Abtrennung zu bestimmen. Der während der Säureeinwirkung verlustig gehende Glukoseanteil ist bei der Berechnung entsprechend zu berücksichtigen.

Zur Ermittlung des Umrechnungsfaktors wurden mehrere Chromatogramme angefertigt, auf denen Glukose mit hydrolysiertem Glykogen verglichen wird. Zur Bestimmung der während der Hydrolyse durch Säureeinwirkung auftretenden Verluste an Glukose wurde reine Glukose unter gleichen Temperaturbedingungen (75°) mit *N*-Salzsäure über 15 Stunden behandelt und dann papierchromatographisch mit einer unbehandelten Glukoseprobe gleicher Konzentration verglichen. Da die zeitliche Hydrolyse des Glykogens asymptotisch verläuft und anfangs die grösste Spaltung auftritt, scheint uns dieser Vergleich bei einer Hydrolysedauer von 15 Stunden gerechtfertigt zu sein. Unter Berücksichtigung der Hydrolyse bei der Säurebehandlung des Glykogens wird in diesen Fällen die Zerstörung noch etwas geringer anzunehmen sein als bei der hier zum Vergleich herangezogenen mit Säure behandelten Glukose. ALBERS UND FREISKORN¹⁷ fanden bei der Schwefelsäurehydrolyse bei einer Versuchstemperatur von 100° einen Verlust von 8 % Glukose.

Nach Literaturangaben³² entspricht 1 g Glukose 0.925 g Glykogen. Nach Hydrolyse entsteht demnach aus 1 g Leberglykogen 1.081 g Glukose, wenn die Hydrolyse vollständig ist und keine Verluste an entstandener Glukose auftreten. Unter Berücksichtigung der methodischen Fehlergrenzen von ± 4.5 % war unter unseren Hydrolysebedingungen kein Glukoseverlust feststellbar. Damit dürften unsere Hydrolysebedingungen schonender sein als die von ALBERS UND FREISKORN¹⁷. Jedoch war andererseits die Hydrolyse nicht vollständig, da wir aus unseren Glukoseproben nach Hydrolyse immer etwas weniger Glukose erhielten als dem Umrechnungsfaktor entspricht.

Glykogen (Merck)
Glukose, theoretisch
Glukose, gefunden

1 g ergibt
1.081 g
1.033 g (Mittel aus 4 Einwaagen
nach Hydrolyse)

Wir fanden demnach für unsere Methode einen Umrechnungsfaktor von 0.968. Es werden unter unseren Bedingungen etwa 4.5 % Glykogen nicht erfasst. Eine voll-

ständigere Spaltung ohne merkliche Zerstörung könnte durch eine Erhöhung der Hydrolysezeit erreicht werden.

METHODISCHE AUSFÜHRUNGEN

Hydrolyse und Entfernung der Säure

Jeweils genau 25 mg Glykogen der Firma Merck, Darmstadt (mit 7–8 % H₂O) wurden direkt in die zur Hydrolyse verwendeten kleinen Reagensgläser (ca. 10 ml) eingewogen, mit 1 ml N-Salzsäure versetzt und zugeschmolzen. Die nun folgende Hydrolyse erfolgte in einem Thermostaten bei 75° ± 1° über 15 Stunden. Danach wurde das Hydrolysierröhrchen in einem 50 ml Schliffrundkolben (NS 14.5 mm) zerbrochen und die am Kolbenhals hängengebliebenen Glas- und Substanzreste mit einigen ml destilliertem Wasser in den Kolben gespült. Mittels eines Vakuum-Rotationsverdampfers wurde bis zur Trockne eingedampft. Zur möglichst weitgehenden Entfernung der Salzsäure wurde dann der Rückstand im Kolben noch zweimal mit einigen ml destilliertem Wasser aufgenommen und dieses wiederum, wie vorher, abgedampft. Der verbliebene Rückstand wurde nun in genau 25 ml destilliertem Wasser gelöst und diese Lösung zur Chromatographie verwendet.

Chromatographie

Wir verwendeten Papier der Firma Schleicher & Schüll 2043b Mgl, Format 30 × 30 cm². Auf einer Startlinie wurden in Abständen von 3.5 cm acht Flecken pro Chromatogrammbogen mit einer Elphor-Pipette in Konzentrationen von 2–12 µg, besser 8–12 µg aufgetragen. Zur Erreichung einer möglichst grossen räumlichen Nähe wurden bei Vergleichen Test- und Eichfleck jeweils nebeneinander aufgetragen. Absteigendes Durchlaufchromatogramm; Laufmittel: Äthylacetat-Pyridin-Wasser, 40:11:6. Nach einer Wanderung der Glukose von 10–15 cm auf dem Papier (Laufzeit ist stark von der Papierserie abhängig: 6–15 Stunden) wurde das Chromatogramm zur Entfernung des Laufmittels bei ca. 25° getrocknet.

Anfärbung

Die trockenen Chromatogramme werden möglichst gleichmässig durch das in einer flachen Schale sich befindende Silbernitrat-Reagens (1.5 ml einer nahezu gesättigten wässrigen Silbernitrat-Lösung in 100 ml Aceton geben, dann eben so viel Wasser hinzutun, bis der entstandene Niederschlag sich gerade löst) gezogen und dann bei Zimmertemperatur im Abzug wiederum völlig getrocknet. Bei ungleichmässigem und ruckartigem Durchziehen der Chromatogramme durch das Silbernitrat-Reagens ergeben sich helle Streifen, die, wenn sie über die Zuckerflecken zu liegen kommen, zu Verfälschungen der Extinktionswerte führen. Nach ca. 10 Min. wird das Chromatogramm mit alkoholischer NaOH (10 g NaOH in möglichst wenig H₂O lösen und dann auf 500 ml mit 95 %igem Äthanol auffüllen) beidseitig gleichmässig mittels eines N₂-Stromes besprüht. Dieser Prozess wird nach einigen Minuten wiederholt, damit die Reaktion quantitativ erfolgen kann. Sogleich nach dem Abtrocknen des Alkohols (ca. 5–10 Min.) im Abzug wird das Chromatogramm in ein für die Photographie verwendetes Fixierbad gelegt. Nach Entfärbung des Untergrundes (ca. 5–10 Min. im frischen Fixierbad) sowie Entfernung des überschüssigen AgNO₃ gelangt es in ein fliessendes Wasserbad zur einstündigen Wässerung; anschliessend Trocknung bei etwa 70°.

Photometrie

Wir benutzten ein Chromatometer zur direkten Photometrie der erhaltenen Silberflecken auf dem Papier der Firma Dr. B. Lange, Berlin-Zehlendorff. Die Flecken wurden senkrecht zur Laufrichtung photometriert. Hierdurch und durch das Ausmessen von wenigstens vier Flecken eines Chromatogrammbogens hintereinander wird die Festlegung der Grundlinie wesentlich erleichtert. Nach planimetrischer Ermittlung der Kurvenflächen wurden diese in einer graphischen Darstellung in Beziehung zur Konzentration gesetzt. Anhand der erhaltenen Kurve kann der Glukose- bzw. Glykogenehalt unter Beachtung der oben erwähnten Bedingungen graphisch ermittelt werden.

Die Methode ist selbstverständlich auch zur Bestimmung anderer reduzierender Zucker anwendbar.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach eingehender Besprechung der im Schrifttum vorhandenen quantitativen papierchromatographischen Verfahren zur Zuckerbestimmung wird eine modifizierte Methode zur Glykogen- und Glukosebestimmung mitgeteilt. Durch absteigende Durchlaufchromatographie (Laufmittel: Äthylacetat-Pyridin-Wasser, 40:11:6) und Anfärbung mit Silbernitrat-Lösung in Aceton/alkoholischer Natronlauge sowie anschließende Entfärbung in Fixiersalz werden gut auswertbare Silberflecken erhalten. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch direkte Photometrie auf dem Papier und Planimetrie der erhaltenen Extinktionsflächen. Es besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der Extinktionsfläche und dem Logarithmus der Konzentration. Das Glykogen wurde vorher mit Salzsäure hydrolysiert. Der optimalste Hydrolysegrad wurde mit 1 N Salzsäure nach einer Zeitdauer von 15 Stunden bei 75° erreicht. Reproduzierbarkeit der Methode: Maximalabweichung $\pm 6.5\%$, mittlere Abweichung $\pm 4-4.5\%$. Die Reproduzierbarkeit kann durch Eliminierung schlecht auswertbarer Chromatogramme erhöht werden.

SUMMARY

Earlier work dealing with the quantitative determination of sugars by paper chromatography is reviewed extensively, and a modified method for the determination of glucose and glycogen is given. After one-dimensional descending chromatography (solvent system: ethyl acetate-pyridine-water, 40:11:6), the spots were detected by dipping the chromatograms into an acetone solution of silver nitrate and spraying them twice with sodium hydroxide dissolved in ethanol. In order to reduce the colour of the background the chromatograms were treated with a fixing bath used for photographic purposes. Quantitative estimation was carried out by direct photometry on the paper strip by means of an automatic densitograph. Glycogen was treated with hydrochloric acid before estimation. Hydrolysis could be carried out best with 1 N hydrochloric acid for 15 h at 75°. For the quantitative estimation the curves were measured with a planimeter. A linear relation was found between extinction area and the log of the concentration. Reproducibility of the method: maximum deviation $\pm 6.5\%$, standard deviation $\pm 4-4.5\%$. The reproducibility can be increased by eliminating the chromatograms that are difficult to evaluate.

LITERATUR

- ¹ E. PFLÜGER, *Das Glykogen*, Berlin, 1905; *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, 129 (1909) 362.
- ² C. GOOD, H. KRAMER UND M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 100 (1933) 485; F. VERZÁR UND V. WENNER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 35, 42; B. J. V. D. KLEIJ, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 481.
- ³ S. SEIFTER, S. DAYTON, B. NOVIC UND E. MUNTWYLER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 25 (1950) 191; L. A. KOHLER, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1576.
- ⁴ M. JOHN, *Z. Vergleich. Physiol.*, 41 (1958) 204.
- ⁵ R. WILLSTÄTTER UND M. RHODEWALD, *Z. Physiol. Chem.*, 225 (1934) 103.
- ⁶ A. E. FLOOD, E. L. HIRST UND J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.*, (1948) 1679.
- ⁷ R. H. QUICK, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1439; O. ANT-WUSRINEN UND A. HALONEN, *Paperi Puu*, 40 (1958) 481; R. BOURRILLON UND J. MICHON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 267.
- ⁸ E. F. MCFARREN, K. BRAND UND H. R. RUTKOWSKY, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1146.
- ⁹ G. F. FISCHER UND H. DÖRFEL, *Z. Physiol. Chem.*, 297 (1954) 164.
- ¹⁰ K. WALLENFELS, *Naturwiss.*, 37 (1950) 491; K. WALLENFELS UND E. BERNT, *Angew. Chem.*, 64 (1952) 28; K. WALLENFELS, E. BERNT UND G. LIMBERG, *Angew. Chem.*, 65 (1953) 581; *Ann. Chem.*, 579 (1953) 113.
- ¹¹ H. LÜDECKE UND L. STANGE, *Zucker*, 6 (1953) 551.
- ¹² H. WOHNLICH, *Z. Anal. Chem.*, 150 (1956) 2.
- ¹³ H. R. ROBERTS, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1443.
- ¹⁴ S. BAAR, *Biochem. J.*, 58 (1954) 175.
- ¹⁵ C. V. CZARNOWSKI, *Naturwiss.*, 41 (1954) 577.
- ¹⁶ J. W. DATE, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 10 (1958) 149.
- ¹⁷ P. ALBERS UND R. FREISKORN, *Ann.*, 622 (1959) 150.
- ¹⁸ C. M. WILSON, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 1199.
- ¹⁹ A. J. PHILIPPU, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 1615.
- ²⁰ P. COLOMBO, D. CORBETTA, A. PIROTTA, G. RUFFINI UND A. SARTORI, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 343.
- ²¹ J. B. HIMES, L. D. METCALFE UND H. RALSTON, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 364.
- ²² R. B. FISHER, D. S. PARSONS UND G. A. MORRISON, *Nature*, 161 (1948) 764.
- ²³ M. ATHENSTEDT, *Zuckerindustrie*, 88 (1958) 389.
- ²⁴ S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 164 (1949) 443.
- ²⁵ I. L. BRYSON UND T. I. MITCHELL, *Nature*, 167 (1951) 864.
- ²⁶ L. SÄTTLER UND F. W. ZERBAN, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1862.
- ²⁷ R. H. HORROCKS, *Nature*, 164 (1949) 444; J. S. D. BACON UND J. EDELMAN, *Biochem. J.*, 48 (1951) 114.
- ²⁸ H. F. LINKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, 2 Aufl. Springer Verlag, Berlin, 1959.
- ²⁹ W. GRASSMANN UND K. HANNIG, *Z. Physiol. Chem.*, 290 (1952) 1; *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 838.
- ³⁰ M. GEE UND R. M. MCCREADY, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 257.
- ³¹ G. H. SCHMIDT, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 63 (1961) 439.
- ³² C. GOOD, H. KRAMER UND M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 100 (1933) 485.

J. Chromatog., 10 (1963) 190-204