

The R_F values in various solvent systems composed of halogenated hydrocarbons or benzene with the addition of alcohol, an ester or ether are listed in Tables I and II. Substitution of the estratrien, Δ^5 -androstene and Δ^5 -pregnene nucleus influences the R_F values in the usual manner as seen in adsorption chromatography on alumina. In estrogens, the mobility is decreased by the functional groups in the sequence: 16-ketone < 16 β -hydroxyl < 6 α -hydroxyl < 16 α -hydroxyl and in the 3 β -hydroxy- Δ^5 -steroids: Δ^7 -double bond < 17 α -hydroxyl < 16 α -hydroxyl < 21 hydroxyl < 7-ketone \leq 7 α -hydroxyl.

Research Institute of Endocrinology, Prague (Czechoslovakia)

L. STÁRKA

1 B. P. LISBOA AND E. DICZFALUSY, *Acta Endocrinol.*, 40 (1962) 60.

2 B. P. LISBOA, *J. Chromatog.*, in press.

3 M. MOTTIER AND M. POTTERAT, *Anal. Chem. Acta*, 13 (1955) 46.

4 L. STÁRKA AND J. MALÍKOVÁ, *J. Endocrinol.*, 22 (1961) 215.

5 W. M. ALLEN, S. J. HAYWARD AND A. PINTO, *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 10 (1950) 54.

6 G. M. BARTON, R. S. EVANS AND J. A. F. GARDNER, *Nature*, 170 (1952) 249.

First received June 22nd, 1964

Modified July 20th, 1964

J. Chromatog., 17 (1965) 599-602

Dünnschichtchromatographie von Aminozuckern auf Cellulosepulver

In den letzten Jahren wurden einige Verfahren zur Dünnschichtchromatographie von Zuckern bekannt. Während hierbei zunächst anorganische Schichten wie Kieselgel oder Kieselguhr¹ Verwendung fanden, wurde Cellulosepulver erstmals von SCHWEIGER² zur Trennung von Monosacchariden eingeführt. Nach diesen Ergebnissen schien es möglich, auch substituierte Zucker wie Glucosamin und Galactosamin und deren Acetyl-derivate auf Celluloseschichten zu trennen. In der vorliegenden Mitteilung wird über Versuche hierzu berichtet.

Die Platten wurden in bekannter Weise² mit dem Streichgerät der Fa. Desaga (Heidelberg) mit Cellulosepulver MN 300 der Fa. Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) beschichtet (Schichtdicke 0.25 mm). Folgende Laufmittelgemische hatten sich bewährt:

- | | | |
|------|---|-------------------|
| I. | Butanol-Äthanol-Isopropanol-Ammoniak-Wasser | (2:4:0.5:0.5:1.5) |
| II. | Pyridin-Äthylacetat-Eisessig-Wasser | (5:5:1:3) |
| III. | Äthanol-Pentanol-Ammoniak-Wasser | (8:2:2:1) |
| IV. | Äthylacetat-Pyridin-Tetrahydrofuran-Wasser | (7:3:2:2) |
| V. | Äthylacetat-Isopropanol-Pyridin-Wasser | (7:3:2:2) |

Gemische IV und V wurden bei Celluloseschichten angewandt, die mit Boratpuffer von pH = 8.0 (0.2 M Borsäure, 0.05 M NaCl und 0.05 M Borax = $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) besprüht worden waren. Die Entwicklung der Chromatogramme dauerte etwa 2-3 Std. Eine Trennung von Glucosamin, Galactosamin, N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalactosamin war in Systemen I, II und IV möglich (Tabelle I).

J. Chromatog., 17 (1965) 602-605

TABELLE I

VERGLEICH DER R_G -WERTE* IN VERSCHIEDENEN LAUFMITTELGEMISCHEN UND DER FARBNACHWEISE

Substanz	R_G im Laufmittel			Färbung im TBS-Test**	Färbung im U.V.-Licht	Nachweisgrenze (μg)	
	I	II	IV			TBS	Ninhydrin
Glucosamin	1.00	1.00	1.00	gelb-orange	gelb	5	0.5
Galactosamin	0.91	0.83	0.88	hellbraun	grün	5	0.5
N-Acetylglucosamin	1.28	1.62	1.82	karminrot	rosa	3	—
N-Acetylgalactosamin	1.24	1.53	1.70	karminrot	rot	3	—

* $R_G = \frac{\text{Strecke in cm der Substanz}}{\text{Strecke in cm von Glucosamin}}$ nach zweimaligem Lauf.

** TBS-Test = Thiobarbitursäuretest (siehe Text).

Während sich Glucosamin und Galactosamin in den Systemen I und II voneinander trennen lassen, konnte bei der Trennung der acetylierten Verbindungen die Fähigkeit von Galactose zur Bildung von Boratkomplexen ausgenutzt werden.

Hierbei wurden die Platten vor dem Auftragen der Substanzen mit Boratpuffer besprüht, getrocknet und nach zweimaligem Lauf (je 3 Std.) erhielt man im System V die R_G -Werte in Tabelle II.

Die Zugabe von Flavognost (Diphenylborsäure-äthanolamin³, Heyl, Hildesheim) zum Laufmittel hatte nur einen geringen Einfluss auf die R_G -Werte, die Flecke waren jedoch etwas kompakter. Die Trennung der N-Acetylderivate zeigt

TABELLE II

 R_G -WERTE IM SYSTEM V (MIT BORATPUFFER)

Substanz	R_G -Wert
Glucosamin	1.00
N-Acetylglucosamin	2.95
N-Acetylgalactosamin	1.65

Fig. 1. Um eine Trennung aller vier Aminozucker gleichzeitig zu erreichen, wurde zweidimensional chromatographiert: zuerst im System II oder III, dann im System IV oder V. Nach zweimaligem Lauf im System II oder III färbt man einen Kontrollstreifen auf einer Seite der Platte an (siehe unten), besprüht danach bei Anwesenheit eines Fleckes in Höhe der N-Acetylverbindungen die Platte mit Boratpuffer. Nach weiterem zweimaligem Lauf im System IV oder V ergibt sich das in Fig. 2 und Fig. 3 dargestellte Bild. Die beste Trennung wird erzielt, wenn man die Platte vor dem ersten Lauf in jeder Richtung in der Kammer sättigen lässt.

Beim Nachweis der Aminozucker können entweder die Ninhydrinreaktion bei den nichtacetylierten Verbindungen oder der ELSON-MORGAN Test⁴ bei den vier oben erwähnten Aminozuckern auf dem Cellulosepulver MN 300 A und der Thiobarbitursäuretest⁵ auf dem Cellulosepulver MN 300 angewandt werden. Bei dem

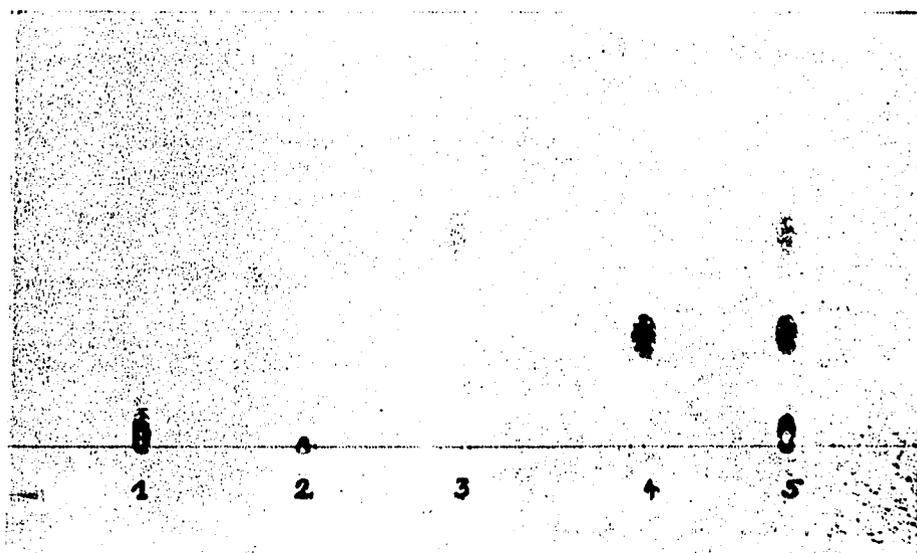


Fig. 1. 1 = Glucosamin; 2 = Galactosamin; 3 = N-Acetylglucosamin; 4 = N-Acetylgalactosamin; 5 = Mischung.

Cellulosepulver MN 300 A handelt es sich um ein von der Firma Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) vorbehandeltes Cellulosepulver MN 300. Diese Vorbehandlung hat eine Herabsetzung der Aktivität zur Folge. Das Auftreten der charakteristischen Farbe beim ELSON-MORGAN Test wird auf dem Pulver MN 300 verhindert.

Die Anfärbung mit Hilfe des Thiobarbitursäuretestes⁵ wurde folgendermassen durchgeführt. Die Schichten wurden nach dem Trocknen mit einer Lösung von 0.1 M Perjodsäure in Aceton (1.9 g HJO_4 in 10 ml H_2O , davon 1 ml + 19 ml Aceton), 10 Min. später mit einer Lösung von 3.5 %igem $NaAsO_2$ in 1 N HCl besprüht: Die braune Jodausscheidung verschwindet bei erneutem Besprühen. Nach 2 Min. wird die noch feuchte Platte mit einer 0.6 %igen alkoholischen Lösung von Thiobarbitursäure behandelt und 5 Min. bei 90° getrocknet.

Die beschriebene Methode weist einige Vorteile gegenüber der chromato-

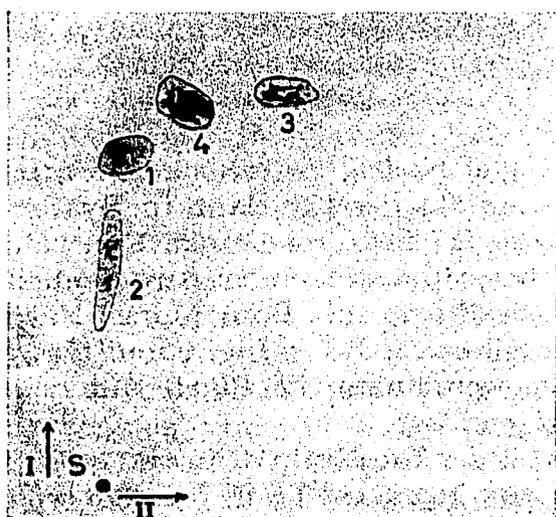


Fig. 2. 1 = Glucosamin; 2 = Galactosamin; 3 = N-Acetylglucosamin; 4 = N-Acetylgalactosamin. 1. Richtung: System III; 2. Richtung: System IV.

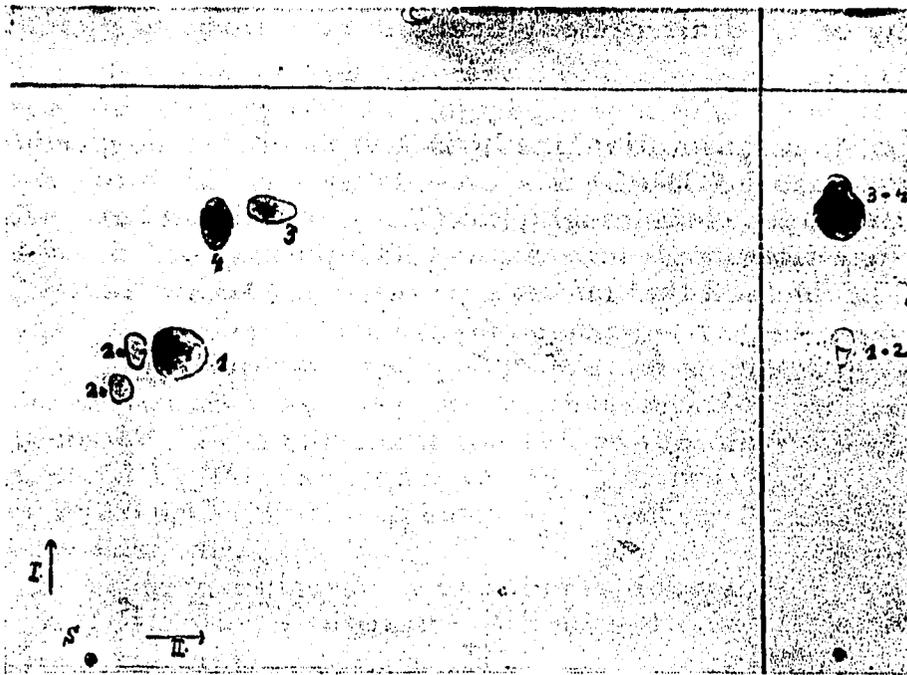


Fig. 3. 1 = Glucosamin; 2 = Galactosamin (2a = freie Base); 3 = N-Acetylglucosamin; 4 = N-Acetylgalactosamin. 1. Richtung: System II; 2. Richtung: System IV. Anfärbung im TBS-Test: Glucosamin = braun; Galactosamin = hellblau; N-Acetyl-Verbindungen = rot.

graphischen Trennung von Aminosuktern auf Papier auf. Während bei den bisherigen Verfahren Entwicklungszeiten von 24 Std. und mehr in Kauf genommen werden mussten^{6,7}, kann man auf der Cellulosedünnschicht eine Trennung in 4–6 Std. (bei zweidimensionaler Chromatographie in 6–8 Std.) erreichen. Auf Grund der kurzen Laufzeit treten Diffusionseffekte weniger stark in Erscheinung, es ergibt sich eine höhere Trennschärfe und endlich konnten durch die Auswahl der Laufmittel die bei Aminosuktern häufig auftretenden störenden Schwanzbildungen vermieden werden⁸.

Bundesanstalt für Fleischforschung, Institut für Chemie und Physik*, Kulmbach/Ofr. (Deutschland)

HERBERT GÜNTHER**
ANTON SCHWEIGER***

1 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, 1962, S. 473 ff.

2 A. SCHWEIGER, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 374.

3 E. PFEIL, *Angew. Chem.*, 70 (1948) 702.

4 L. A. ELSON UND W. T. MORGAN, *Biochem. J.*, 27 (1933) 1924;

W. T. MORGAN UND L. A. ELSON, *Biochem. J.*, 28 (1934) 988.

5 D. SASLAW UND V. S. WARAVDEKAR, *Arch. Biochem. Biophys.*, 90 (1960) 245.

6 R. W. JEANLOZ, J. I. GLAZER UND A. JEANLOZ, *J. Organ. Chem.*, 26 (1961) 53.

7 M. J. CRUMPTON, *Biochem. J.*, 72 (1959) 479.

8 H. MASUME, Z. YOSIZAWA UND M. MAKI, *Tohoku J. Exptl. Med.*, 155 (1950) 237, zitiert nach P. W. KENT UND M. W. WHITEHOUSE, *Biochemistry of the Aminosugars*, Academic Press, New York, 1955, S. 165.

Eingegangen den 22. Juni 1964

* Damaliger Direktor: Prof. Dr. R. GRAU.

** Gegenwärtige Anschrift: Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Würzburg, Deutschland.

*** Gegenwärtige Anschrift: Yale University, Department of Biology, J. W. Gibbs Research Laboratories, New Haven, Conn., USA.