

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON *meso*-INOSIT AUF FERTIGPLATTEN

P. STUDER UND P. HAEFELFINGER

Kontroll-Abteilung der Firma Hoffmann-La Roche & Co., AG., Basel (Schweiz)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic determination of meso-inositol on ready-for-use plates

The separation of *meso*-inositol from sugar syrups described here is a typical example of the excellent separation properties and absolute homogeneity of the DC-Fertigplatten "Merck", compared with the silica gel plates for thin-layer chromatography made in the laboratory. Furthermore, it is shown that the spectrophotometric determination method developed by GAITONDE AND GRIFFITH in combination with the separation by thin-layer chromatography, makes it possible to determine *meso*-inositol in pharmaceutical preparations quantitatively in a relatively short time and with good accuracy.

ALLGEMEINES

meso-Inosit, oft auch unter den Namen Bios I oder *myo*-Inosit bekannt, ist ein optisch inaktiver Cyclit (Hexaoxycyclohexan), der im Tier- und Pflanzenreich ausserordentlich stark verbreitet ist.

Heute wird *meso*-Inosit zu den B-Vitaminen gerechnet und scheint auch im menschlichen Stoffwechsel eine wichtige Rolle zu spielen.

Die bekannten chemischen Bestimmungsmethoden beruhen auf der MALAPRADE-Reaktion^{1,2}, d.h. auf der Perjodatoxydation von vicinalen OH-Gruppen. Daher ist es nicht möglich, in einem Gemisch von Zuckern und Glykolen—wie wir es in vielen Spezialitäten vorfinden—den *meso*-Inosit direkt zu bestimmen. Es muss deshalb vorgängig eine Abtrennung des *meso*-Inosits von den störenden Verbindungen durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit möchten wir nun darlegen, dass sich die DC-Fertigplatten "Merck" für diese Abtrennung als ein ausgezeichnetes Hilfsmittel erwiesen haben. So zeigen sie in unserem Falle ganz andere Trenneigenschaften, als die selbstgemachten Kieselgelplatten. Im Beispiel eines Vitamin-Sirups, in dem *meso*-Inosit neben einer grossen Menge Invertzucker vorliegt, war es uns mit den selbstgefertigten Platten nicht möglich den *meso*-Inosit vom Zucker im Sirup abzutrennen. Die DC-Fertigplatten "Merck" hingegen zeigen im gleichen Fließmittel eine R_F -Wert Differenz von ca. 0.3 Einheiten zwischen *meso*-Inosit und Invertzucker.

Auf Grund unserer Versuche bestätigen sich als weitere entscheidende Vorteile gegenüber den selbst angefertigten Platten: Die homogene Schicht, die gleichmässige Schichtdicke, sowie auch die Abriebfestigkeit der DC-Fertigplatten "Merck". Zudem lassen sich von den dünnen Glasplatten sehr leicht Kontrollstreifen mit Leitchromatogrammen ausschneiden.

Unsere im Vergleich dazu durchgeführten Versuche zur papierchromatographischen Abtrennung von *meso*-Inosit nach der von GAITONDE UND GRIFFITH beschriebenen Methode³ zeigten deutlich die Vorteile einer dünnschichtchromatographischen Trennung. Neben Trennschärfe, Kompaktheit der Flecken und viel kürzerer Laufzeit (2.5 zu 16–20 St.) ist bei der letztern auch die Sichtbarmachung des *meso*-Inosits im Leitchromatogramm viel einfacher. Kurzes, starkes Erhitzen der mit Tollens-Reagens besprühten Platte genügt. Dagegen muss das Papierchromatogramm viel spezifischer behandelt werden, um brauchbare Flecken zu erhalten. Vor allem ist die Eluierung des *meso*-Inosits aus Kieselgel genauer zu handhaben, da aus dem Papier oxydierbare Stoffe miteluiert werden können und man so eine grössere Streuung der Werte erhält. Die genannten Autoren³ gaben für die Eluierung des *meso*-Inosits aus Papier ein "recovery" von 97–106% an. Unsere orientierenden Versuche fielen noch ungünstiger aus. Bei der von uns hier beschriebenen Abtrennung mit Hilfe der DC-Fertigplatten "Merck" hingegen sind solche Schwankungen nie aufgetreten.

Die eigentliche Bestimmung des *meso*-Inosits erfolgt mit kleinen Abänderungen nach GAITONDE UND GRIFFITH³ durch Metaperjodatoxydation und anschliessende spektrophotometrische Messung des durch unverbrauchtes Perjodat oxydierten Jodids bei 352 m μ .

Es ist noch beizufügen, dass die Versuche, *meso*-Inosit durch Sichtbarmachung auf der Platte direkt quantitativ zu bestimmen, leider kein befriedigendes Resultat ergeben haben.

EXPERIMENTELLER TEIL

Verwendete Geräte

Zeiss Spektralphotometer PMQ 2

Kieselgel DC-Fertigplatten "Merck"

Glastrennkammer der Firma Shandon Scientific für 20 cm Platten

10 μ l Pipetten (geeicht) nach Dr. BARROLIER

Reagenzien und Lösungen

Sprühreagenz: Lösung von gleichen Teilen 0.1 N AgNO₃-Lösung und 5 N NH₃-Lösung.

Boratpuffer: 6.183 g H₃BO₃ (Merck, p.a.) werden in 1.8 l dest. Wasser gelöst und mit 1 N NaOH auf pH 8.1–8.2 gebracht, dann wird mit dest. Wasser auf 2.0 l aufgefüllt.

Metaperjodatlösung: 106.9 mg Natriummetaperjodat (Merck) werden in 100 ml dest. Wasser gelöst (vor Licht schützen).

Kaliumjodidlösung (2%): 4.0 g KJ werden in 200 ml dest. Wasser gelöst (jeweils unmittelbar vor Gebrauch herstellen).

Dioxan p.a.

Musterlösung für Beispiel Vitamin-Sirup mit 150 mg *meso*-Inosit pro 5 ml: 2.00 ml Sirup werden mit Auswaschpipette in 10.0 ml Messkolben gebracht und mit dest. Wasser auf 10.0 ml verdünnt.

Standardlösung: 300.0 mg *meso*-Inosit p.a. werden in 50 ml dest. Wasser gelöst.

Durchführung der Bestimmung

Vorbereiten der DC-Fertigplatten "Merck". Man trägt auf der Startlinie mittels einer 10 μ l Mikropipette als 3.5 cm langen Strich folgende Konzentrationen auf:

Musterlösung: 60 μ g (= 10 μ l) und (oder) 120 μ g (= 20 μ l),

Standardlösung: 180 μ g (= 30 μ l).

Die Auftragung erfolgt portionenweise, jeweils 10 μ l (= 60 μ g), dann wird mit Heissluft getrocknet, bevor die nächste Auftragung erfolgt.

Eine Auftragszone lässt man leer, um damit später die Blindlösung herzustellen. Ferner trägt man auf den Kontrollstreifen ca. 20 μ g *meso*-Inosit für das Leitchromatogramm auf.

Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms. Entwickelt werden die DC-Platten im Fließmittel Dioxan-H₂O (70:30). Steighöhe ca. 10–12 cm (d.h. ca. 2.5 St. Laufzeit, in gesättigter Kammer).

Sichtbarmachung des Leitchromatogramms. Der Kontrollstreifen mit dem Leitchromatogramm wird mit einem Glasschneider abgetrennt und dann mit dem Sprühreagenz und nachfolgendem Erhitzen der *meso*-Inosit als brauner Fleck sichtbar gemacht.

Markierung der Zonen. Nun werden die entsprechenden Zonen auf dem Chromatogramm als 4 \times 2 cm grosse Rechtecke eingezeichnet (siehe Fig. 1). Dabei ist darauf zu achten, dass die Zonen in der Steighöhe nicht mehr als 2 cm messen und die Stellen, wo der Inosit-Fleck auf dem Leitchromatogramm liegt, einschliessen, ansonst können von nicht mehr abgetrennten Zuckern falsche Werte erhalten werden (siehe Fig. 2,

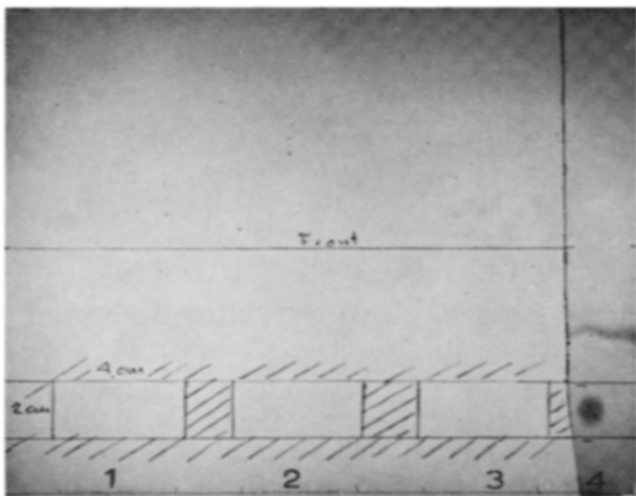


Fig. 1. Markierung der Zonen. Auftragung: (1) 120 μ g *meso*-Inosit in Vitamin-Sirup; (2) 60 μ g *meso*-Inosit in Vitamin-Sirup; (3) keine Auftragung (Blindzone); (4) ca. 20 μ g *meso*-Inosit als Leitchromatogramm.

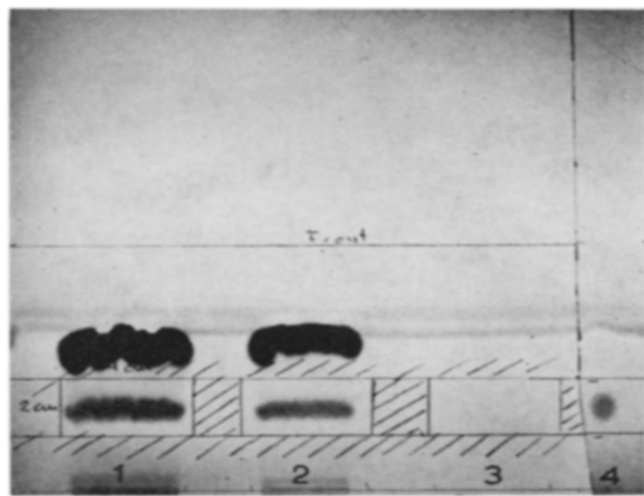


Fig. 2. Zur Demonstration ganze Platte "sichtbar gemacht". Auftragung: (1) 120 μ g *meso*-Inosit in Vitamin-Sirup; (2) 60 μ g *meso*-Inosit in Vitamin-Sirup; (3) keine Auftragung (Blindzone); (4) ca. 20 μ g *meso*-Inosit als Leitchromatogramm.

wo auf einer DC-Fertigplatte "Merck" nach Markierung der Zonen der *meso*-Inosit und die abgetrennten Zucker zur Demonstration sichtbar gemacht wurden).

Eluierung der Zonen. Man versetzt das herausgeschabte und fein pulverisierte Kieselgel der markierten Zonen in einem 10 ml Schliffzentrifugenglas mit 2 ml dest. Wasser. Anschliessend wird durch maschinelles Schütteln während 15–20 min der *meso*-Inosit eluiert. Danach wird 5–10 min zentrifugiert und 1 ml der klaren Lösung jeweils zur *meso*-Inosit-Bestimmung verwendet.

*Spektralphotometrische Bestimmung des meso-Inosits*³. Je 1.0 ml der klaren Lösung wird in einem 10.0 ml Schliffreagenzglas mit 1.0 ml der Metaperjodatlösung versetzt und während 2 St. im Dunkeln bei 40° (Wasserbad) reagieren gelassen. Anschliessend werden je 1.0 ml des Reaktionsgemisches in einem 50 ml Messkolben mit ca. 20 ml Boratpuffer versetzt, dann je 10.0 ml der 2%igen Kaliumjodid-Lösung zugegeben und schliesslich mit Boratpuffer auf 50.0 ml aufgefüllt. Diese Lösungen werden dann in 1 cm Küvetten bei 352 m μ gemessen. Als Blindwert dient eine Lösung, die ganz analog durch Extraktion aus den leeren Zonen hergestellt wurde. Sie zeigt natürlich die grösste Extinktion. Alle Proben werden deshalb gegen die höchste *meso*-Inosit Konzentration (= 90 μ g; = 180 μ g Auftragung auf DC Platte) gemessen. Zum Auftragen der Funktion E /Konzentration an *meso*-Inosit bildet man die Differenz der Extinktionen: Blindwert minus Probenwert.

Als Beispiel dafür sollen die folgenden Werte in Tabelle I dienen, die bei Bestimmung einer Eichkurve gefunden wurden.

TABELLE I

MESSWERTE BEI 352 m μ

| | E | Δ |
|--|-------|----------|
| Für <i>meso</i> -Inosit 90 μ g (d.h. 180 μ g Auftragung) | 0.000 | 0.770 |
| Für <i>meso</i> -Inosit 60 μ g (d.h. 120 μ g Auftragung) | 0.251 | 0.519 |
| Für <i>meso</i> -Inosit 30 μ g (d.h. 60 μ g Auftragung) | 0.517 | 0.253 |
| Für <i>meso</i> -Inosit 0 μ g | 0.770 | 0.000 |

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengestellt. Es wurden an fünf verschiedenen Mustern jeweils mehrere Doppelbestimmungen durchgeführt.

Aus Tabelle II ist ersichtlich, dass die *meso*-Inosit Bestimmung mit der hier beschriebenen Methode mit einer mittleren Standardabweichung von maximal $\pm 2\%$ durchgeführt werden kann.

Diese *meso*-Inosit Bestimmung wurde auch für andere Spezialitäten mit gleichem Erfolg angewandt.

Bei unseren Versuchen hat es sich gezeigt, dass es—dank der absoluten Homogenität der DC-Fertigplatten "Merck"—keine Rolle spielt, ob Standard-, Muster-, oder Blindzone auf ein und derselben oder auf verschiedenen DC-Platten entwickelt werden. Hingegen ist es wichtig, für den Blindwert eine Zone mit entwickeln zu lassen, weil das Laufmittel die durch Perjodat oxydierbaren Stoffe in der DC-Platte, welche den Blindwert sonst um 5–10% verfälschen würden, abtrennt (siehe Fig. 2).

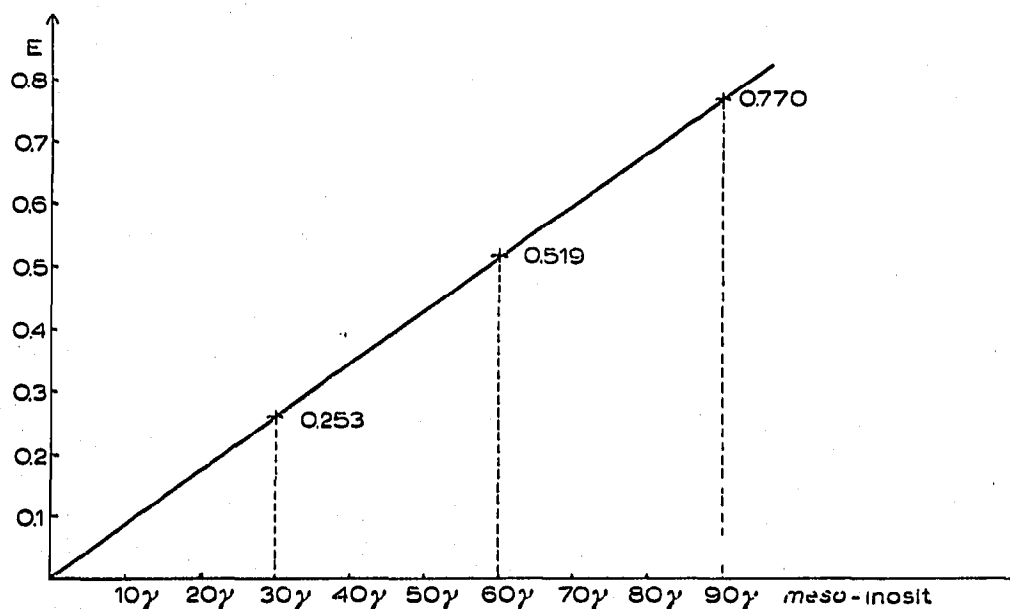
TABELLE II

BESTIMMUNG VON *meso*-INOSIT IN EINEM VITAMIN SIRUP

| Muster | Gehalt (mg) | Gef. Werte pro Doppelbestimmung (mg) | Mittelwert (mg) | Rel. Standardabweichung in % für Doppelbestimmung |
|--------|-------------|--------------------------------------|-----------------|---|
| A | 150 | 151/155 | 153 | ± 2 |
| | | 150/157 | 154 | ± 3.5 |
| | | 151/154 | 153 | ± 1.5 |
| B | 150 | 152/155 | 154 | ± 1.5 |
| | | 151/155 | 153 | ± 2 |
| C | 150 | 154/157 | 156 | ± 1.5 |
| | | 154/156 | 155 | |
| D | 150 | 154/155 | 155 | ± 1 |
| | | 158/161 | 160 | ± 1 |
| E | 150 | 159/159 | 159 | 0 |
| | | 153/155 | 154 | ± 1 |

Die für die Eichkurve (siehe Fig. 3 und Tabelle I) erhaltenen Werte liegen sehr schön auf einer Geraden durch den Nullpunkt. Es ist deshalb vollauf genügend, für eine Bestimmung jeweils nur eine Standardkonzentration mitzumessen, die *ca.* doppelt so gross ist wie die Konzentration der Musterlösung.

Abschliessend darf darauf hingewiesen werden, dass mit der vorliegenden Bestimmungsmethode *meso*-Inosit in den Spezialitäten mit guter Genauigkeit und relativ geringem Zeitaufwand bestimmt werden kann.

Fig. 3. Eichkurve für *meso*-Inosit Bestimmung.

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier beschriebene Abtrennung von *meso*-Inosit aus Zuckersirupen ein Musterbeispiel darstellt für die besonderen Trennfähigkeiten und für die absolute Homogenität der Kieselgel DC-Fertigplatten "Merck", verglichen mit den selbstgefertigten Kieselgel DC-Platten. Ferner erlaubt die von GAITONDE UND GRIFFITH entwickelte spektrophotometrische Bestimmungsmethode in Kombination mit der von uns beschriebenen Abtrennung die quantitative Bestimmung von *meso*-Inosit in den Spezialitäten mit guter Genauigkeit und relativ geringem Zeitaufwand.

LITERATUR

- 1 L. MALAPRADE, *Bull. Soc. Chim.*, 43 (1928) 683; *Compt. Rend.*, 186 (1928) 382.
 - 2 E. L. JACKSON, *Organic Reactions*, Vol. II, 8th printing, 1962, p. 341.
 - 3 M. K. GAITONDE AND M. GRIFFITH, *Anal. Biochem.*, 15 (1966) 532.
- J. Chromatog.*, 33 (1968) 385-390