

CHROM. 5515

Eine verbesserte Methode zur dünn-schichtchromatographischen Trennung von Mono- und Oligosacchariden*

Im Rahmen von Untersuchungen über die Carbohydrasen der Teleostier bestand die Notwendigkeit, die Spaltprodukte der enzymatischen Hydrolyse von Poly- und Oligosacchariden rasch und sicher zu identifizieren. Hierfür kommen papier- oder dünn-schichtchromatographische Verfahren in Betracht.

Die papierchromatographische Trennung von Mono- und Oligosacchariden ist umständlich und zeitraubend (vgl. z.B. Lit. 1 und 2). Andererseits sind die bisher entwickelten dünn-schichtchromatographischen Verfahren in erster Linie auf die Trennung bestimmter Zuckerpaare ausgelegt und daher nicht geeignet, die im Rahmen unserer Untersuchungen erwarteten Mono- und Oligosaccharide (z.B. die Spaltprodukte der amylytischen Stärkehydrolyse) in einem einzigen Arbeitsgang zufriedenstellend voneinander zu trennen.

So lassen sich auf Bisulfit-gepufferten Kieselgelplatten zwar Glucose und Maltose, nicht aber Glucose und Fructose voneinander trennen³. Auch die Pufferung der Kieselgelschichten mit Natriumacetat oder Borsäure⁴⁻⁶ ergibt zwar für jeweils bestimmte Kombinationen weniger Mono- und Disaccharide mit den entsprechenden Laufmittelgemischen gute Trennergebnisse; die bei unseren Untersuchungen anfallenden Zucker (in erster Linie Glucose, Maltose, Maltotriose, Maltotetraose und Maltopentaose sowie Fructose und Galaktose) sind jedoch mit diesen Verfahren nicht oder nicht in der gewünschten Schärfe trennbar. Das gleiche gilt für die eindimensionale Chromatographie auf mit Natriumacetat imprägnierten Trägerschichten aus Kieselgel und Kieselgur^{7,8}.

Nach vielen wenig erfolgreichen Vorversuchen mit gepufferten und ungepufferten Schichten ergaben sich gewisse Vorteile bei der Chromatographie auf Cellulose MN 300, mit deren Hilfe bereits die Trennung von freien Zuckern und Alduronsäuren⁹ sowie von Fructose, Glucose und Galaktose¹⁰ gelungen war. Die Lösung unseres Problems brachte die Kombination dieser Cellulose-Trägerschicht mit einem geeigneten Laufmittel. Dieses entwickelten wir durch Modifizierung eines von WOLFROM *et al.*¹¹ für die Trennung von Mono- und Disacchariden auf "Avicel" angegebenen Lösungsmittelgemisches.

Methode

Zur Herstellung der Trägerschichten werden 15 g Cellulosepulver MN 300 (Macherey, Nagel & Co, Düren/Rheinland) in einem "Omnimixer" (Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Conn.) 15 min unter Kühlung mit 100 ml glasdestilliertem Wasser dispergiert und anschliessend mit einem Streichgerät (C. Desaga GmbH, Heidelberg) auf fünf Platten 20 × 20 cm in einer Dicke von 0.25 mm aufgetragen. Nach Lufttrocknung über Nacht werden die Platten 10 min bei 105° nachgetrocknet. Die so vorbehandelten Platten sind, im Exsikkator über CaCl₂ aufbewahrt, jederzeit gebrauchsfertig.

Am Beispiel der enzymatischen Stärkehydrolyse (vgl. Fig. 1) soll das weitere

* Herrn Dr. H.-W. HAGENS† gewidmet.

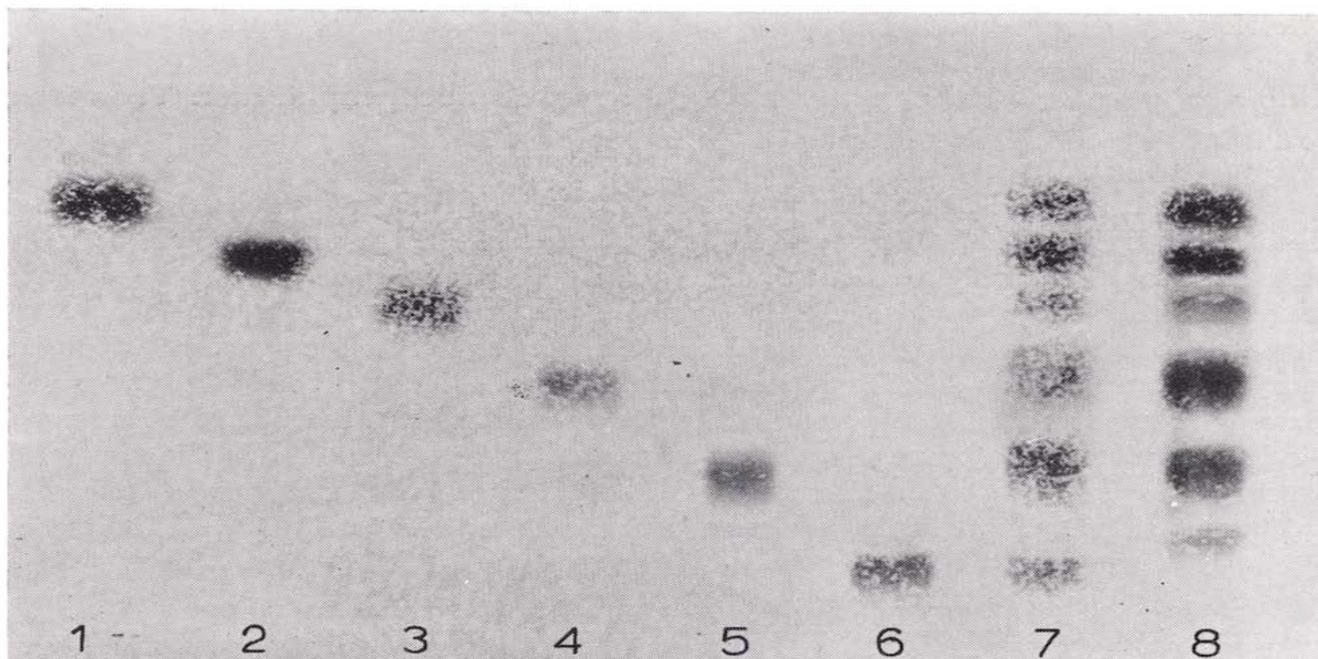


Fig. 1. Chromatogramm auf Cellulose MN 300 unter den im Text beschriebenen Bedingungen. Nachweis mit alkalischem Silbernitrat. 1 = D(-)-Fructose (8 μ g); 2 = α -D-Glucose (4 μ g); 3 = D(+)-Galaktose (4 μ g); 4 = D(+)-Maltose (10 μ g); 5 = Maltotriose (40 μ g); 6 = Maltopentaose (40 μ g); 7 = Gemisch aus 1 bis 6; 8 = enzymatisches Stärkehydrolysat. Bei der am langsamsten laufenden Komponente des Hydrolysats dürfte es sich um Maltotetraose handeln; eine entsprechend reine Referenzsubstanz stand allerdings nicht zur Verfügung.

Vorgehen dargestellt werden, 100 μ l einer 6% Lösung von Stärke nach Zulkowsky (E. Merck, Darmstadt, No. 1257) 100 μ l 0.2 M Phosphatpuffer, pH 7.0, und 100 μ l des zu prüfenden Extrakts in geeigneter Verdünnung werden 2.5 Std. bei 25° im Wasserbad inkubiert. Danach sistiert man die Reaktion durch Zugabe von absolutem Äthanol (Endkonzentration 70 bis 75%).

Das gefroren getrocknete Hydrolysat wird in 50 μ l Pyridin aufgenommen und 5 min extrahiert. Pyridin erweist sich deshalb als geeignetes Extraktionsmittel, weil nur die Zucker in Lösung gehen, die Puffersalze jedoch ungelöst zurückbleiben; dies erhöht bei der nachfolgenden Chromatographie die Fleckenschärfe und eliminiert die Schwanzbildung fast vollständig. Die Probe wird klarzentrifugiert (Mikrozentrifuge; O. Dich, Brøndby Strand, Dänemark) und wie die Vergleichssubstanzen mittels einer Konstriktionspipette mit abgewinkelter und aussen silikonierter Spitze im warmen Luftstrom auf die Celluloseplatte aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgt aufsteigend eindimensional in einem Chromatographietrog der Firma Desaga, Heidelberg. Das Laufmittel ist Eisessig-Essigsäureäthylester-Pyridin-Wasser (1:7:5:3); es wird frisch gemischt 1 Std. vor Beginn der Chromatographie in den Trog gegeben. Nach einer Laufzeit von 2 Std. (entsprechend einer Steighöhe der Laufmittelfront von 19 cm) wird die Platte 15 min bei 60° getrocknet.

Für den Nachweis der aufgetrennten Zucker auf der Dünnschicht eignen sich (a) die empfindliche Reaktion reduzierender Zucker mit alkalischer Silbernitrat-Lösung (Nachweis I), und (b) die Farbreaktion reduzierender und nicht reduzierender Zucker mit einem kombinierten Anilinphthalat-Naphthoresorcin-Trichloressigsäure-Reagens¹⁰ (Nachweis II).

Nachweis I. Nachweis I ist die Modifikation eines von RANDEKATH¹² angegebenen Verfahrens. Man besprüht die getrocknete Platte nacheinander mit: (1) AgNO₃-Lösung (1.25 ml gesättigte wässrige AgNO₃-Stammlösung auf 500 ml mit destilliertem Aceton), (2) alkoholischer NaOH-Lösung (12 ml 55 % wässrige Stammlauge auf 500 ml mit 96 % Äthanol), (3) verdünnter Ammoniak-Lösung (5 % NH₃ in Wasser), und zuletzt mit (4) Thiosulfat-Lösung (20 % Na₂S₂O₃ in Wasser), um den Gelbstich aus der Cellulose zu entfernen. Die Platte muss nach dem Aufsprühen jeder Lösung mit dem Föhn getrocknet werden, um das Abheben der Schicht vom Glas und ein Zerfließen der Flecken zu vermeiden.

Nachweis II. Man besprüht die trockene Platte mit Anilinphthalat-Lösung¹⁴ (995 mg Phthalsäure in 60 ml wassergesättigtem Butanol-(1) lösen und 0.55 ml Anilin zusetzen), trocknet mit dem Föhn und besprüht anschliessend mit Naphthoresorcin-Trichloressigsäure-Lösung¹³ (eine frische Mischung aus einem Teil Trichloressigsäure, 20 % in Wasser, und zwei Teilen Naphthalindiol-(1,3), 0.2 % in absolutem Äthanol). Die Farbentwicklung erfolgt bei 105° (10 min).

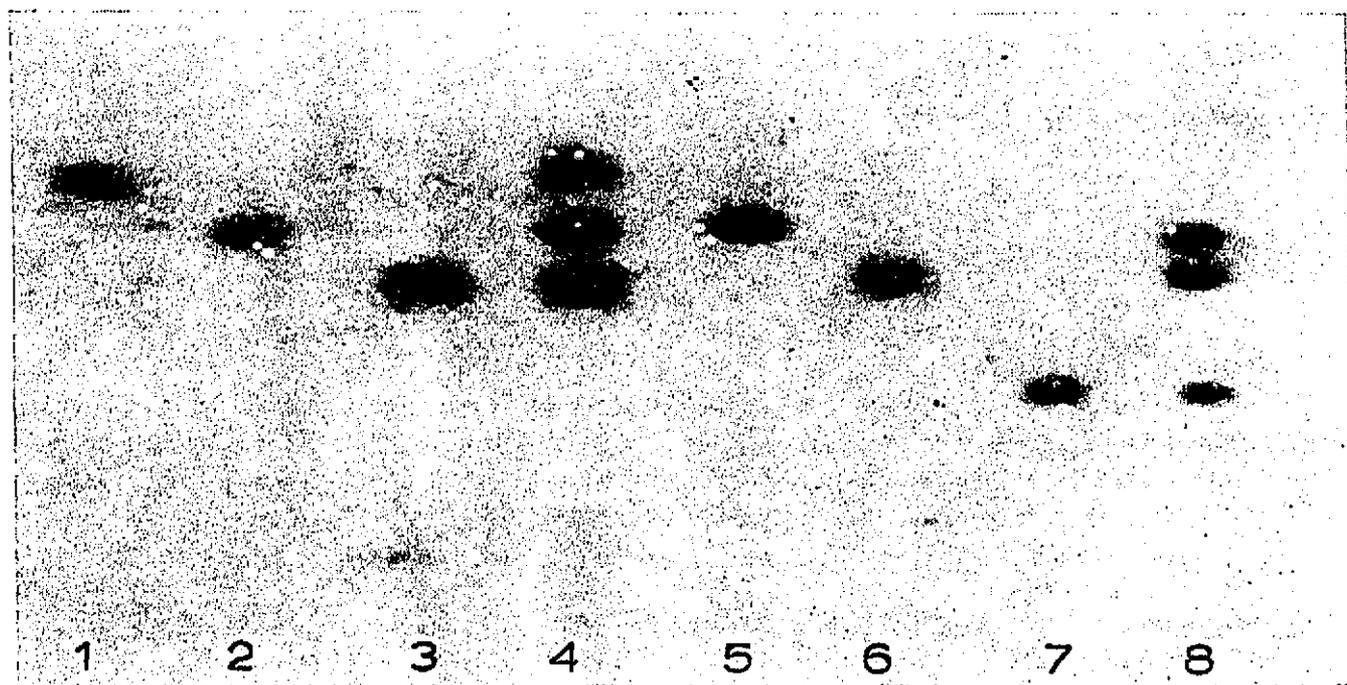


Fig. 2. Chromatogramm auf Cellulose MN 300. Kombiniertes Nachweis mit Anilinphthalat und Naphthoresorcin-Trichloressigsäure. 1 = D(-)-Fructose (22 µg); 2 = α-D-Glucose (11 µg); 3 = Saccharose (22 µg); 4 = Gemisch aus 1 bis 3; 5 = α-D-Glucose (11 µg); 6 = D(+)-Galaktose (11 µg); 7 = D(+)-Lactose (22 µg); 8 = Gemisch aus 5 bis 7. Zur besseren photographischen Wiedergabe liegen die aufgetragenen Mengen weit über den unteren Nachweisgrenzen.

Das hier beschriebene Verfahren zur dünnschichtchromatographischen Trennung von Mono- und Oligosacchariden ist seit einem Jahr routinemässig eingesetzt und hat sich für die Identifizierung der Spaltprodukte nach enzymatischer Stärkehydrolyse sehr gut bewährt. Es zeichnet sich durch seine einfache Handhabung, durch das breite Spektrum der mit seiner Hilfe trennbaren Zucker sowie durch seine hohe

Trennschärfe aus. Es dürfte daher bei der Charakterisierung verschiedener Carbohydrasen (vgl. Fig. 2) als Schnellmethode gute Dienste leisten.

Zoologisches Institut der Universität Heidelberg,
6900 Heidelberg, Berliner Strasse 15 (B.R.D.)

REINER SPITSCHAN

- 1 S. ALLMANN, *Dissertation*, Univ. Heidelberg, 1958.
- 2 B. HOFFMANN, *Dissertation*, Univ. Heidelberg, 1967.
- 3 S. ADACHI, *J. Chromatogr.*, 17 (1965) 295.
- 4 H. KÄSER UND G. MASERA, *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 94 (1964) 158.
- 5 M. LATO, B. BRUNELLI, G. CIUFFINI UND T. MEZZETTI, *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 26.
- 6 P. G. PIFFERI, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 925.
- 7 E. BANCHER, H. SCHERZ UND K. KAINDL, *Mikrochim. Acta*, (1964) 652.
- 8 V. A. DE STEFANIS UND J. G. PONTE, JR., *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 116.
- 9 A. SCHWEIGER, *J. Chromatogr.*, 9 (1962) 374.
- 10 W. VON BERG, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 6 (1968) 475.
- 11 M. L. WOLFROM, D. L. PATIN UND R. M. DE LEDERKREMER, *J. Chromatogr.*, 17 (1965) 488.
- 12 K. RANDEPATH, *Dünnschicht-Chromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1965.
- 13 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- 14 S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 164 (1949) 443.

Eingegangen am 22. April 1971