

CHROM. 12,307

## Note

### **Hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennungen von Kohlenhydraten mit einem colorimetrischen Nachweisverfahren\***

M. H. SIMATUPANG

*Institut für Holzchemie und chemische Technologie des Holzes der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Leuschnerstrasse 91, 2050 Hamburg 80 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 26. April 1979; geänderte Fassung eingegangen am 15. August 1979)

In der Natur finden sich eine Vielzahl von Kohlenhydraten, die in Form von Monosacchariden, Oligosacchariden oder Polysacchariden in Pflanzen und Tieren vorkommen können. Die Variation des chemischen Aufbaus solcher Verbindungen ist sehr gross, jedoch kommt in den meisten Fällen gemeinsam nur eine begrenzte Zahl von Sacchariden vor. Diese Tatsache erleichtert in vielen Fällen die Analyse solcher natürlich vorkommenden Gemische, so dass oft mit relativ einfachen Trennungsmethoden solche Bestimmungen durchgeführt werden können.

In der Lebensmittelanalyse zum Beispiel ist die quantitative Bestimmung folgender Saccharide wichtig: Saccharose, Lactose, Maltose, Fructose, Glucose, Raffinose, Stachyose und eventuell Melezitose. Zur Trennung solch eines Gemisches eignet sich ein chemisch modifiziertes Kieselgel als stationäre Phase mit einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril als mobile phase<sup>1</sup>. Die getrennten Saccharide werden mit einem Differentialrefraktometer nachgewiesen. Bestrebungen, die in dem Säuleneluat vorhandenen Zucker bei 192 nm nachzuweisen, ergaben befriedigende Ergebnisse für Zucker, die in grösseren Mengen vorhanden sind<sup>2</sup>. Für komplizierte Gemische eignen sich die Verteilungschromatographie auf Ionenaustauscher mit einem Äthanol-Wasser-Gemisch als mobiler Phase<sup>3,4</sup> oder eine Anionenaustauschchromatographie mit einem Boratpuffer<sup>5-7</sup>. In beiden Fällen werden kontinuierliche colorimetrische Verfahren für die Detektion der getrennten Verbindungen angewendet. Die Verteilungschromatographie mit einem Äthanol-Wasser-Gemisch hat den Nachteil, dass ein Lösungsmittelgradient schwer zu verwirklichen ist. Dagegen können natürlich vorkommende und komplizierte Saccharid-Gemische, wie z.B. im Urin, mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie und mit einem Boratpuffergradienten getrennt werden. Zum Nachweis der Zucker werden sowohl colorimetrische als auch fluorometrische Verfahren angewendet<sup>8,9</sup>. Die bisherigen Verfahren erfordern Trennungszeiten bis zu 12 Stunden.

Nachfolgend wird eine Trennungsmethode gezeigt, bei der durch die Verwendung eines feineren und geringer vernetzten Harzes die Trennungszeiten reduziert werden können. Weniger komplizierte Gemische können mit Hilfe eines Einpufferverfahrens auf einfache Weise analysiert werden.

\* Zum Teil vorgetragen bei den Königsteiner Chromatographie-Tagen, 26.–30. Oktober 1977.

## EXPERIMENTELLES

Für die Trennungen wurden Elementen aus dem NC2-P-System der Firma Technicon (Frankfurt, B.R.D.) und käufliche Chromatographieteile verwendet. Ein Schema dieser Apparatur ist in der Fig. 1 dargestellt.

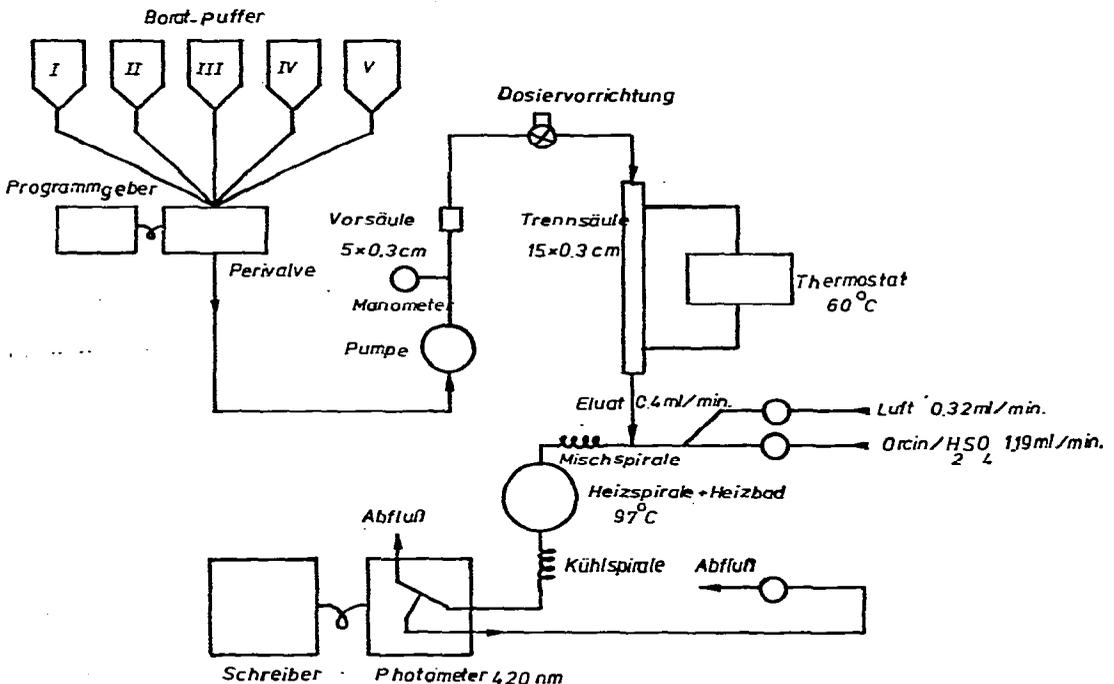


Fig. 1. Schematische Darstellung des Flüssigkeitschromatographen für Kohlenhydratanalyse.

Die Versorgungseinheit besteht aus den Gefäßen für die fünf Boratpuffer, einem von dem Programmgeber steuerndes automatisches Ventil, den Zuleitungen aus Stahlkapillaren und der Kolben-Hochdruckpumpe. Im Gegensatz zu den in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie üblich verwendeten Pumpen ist es bei diesem Nachweissystem nicht erforderlich, die Pulsation zu dämpfen.

Der analytische Teil besteht aus einer Vor- oder Reinigungssäule, einem Dosierventil und einer Trennsäule. Diese Einheiten sind aus Stahl und wurden von der Firma Latek (Heidelberg, B.R.D.) geliefert.

Das Nachweissystem besteht aus Einheiten des Technicon-AutoAnalyzer-II-Systems, und zwar einer peristaltischen Pumpe mit einer Luftschleusenvorrichtung, zur exakten Dosierung der für die Segmentierung erforderlichen Luftblasen, Verbindungsstücken, Mischspiralen, dem Heizbad, dem Colorimeter und dem Potentiometerschreiber. Das aus der Säule kommende Eluat wird direkt segmentiert und anschließend mit einem Gemisch aus 70%iger Schwefelsäure und 0.1% Orcin vermischt. Das Schwefelsäuregemisch wird mit einem Acidflexschlauch befördert. Der Flüssigkeitsstrom durchläuft dann eine Mischspirale, um die spezifisch schwerere Schwefel-

säure mit dem Säuleneulat gründlich zu vermischen. In dem nachfolgenden Heizbad findet die Farbreaktion statt. Bevor der Flüssigkeitsstrom zum Colorimeter gelangt, wird er erst in einer Kühlspirale gekühlt und anschliessend entlüftet. Das Ergebniss der Messungen wird durch den Potentiometerschreiber registriert.

Der für die Trennungen benutzte Anionenaustauscher wurde von der Firma Hamilton geliefert (Typ Hamilton HA-X4.00, Korngrösse 7–10  $\mu\text{m}$ )\*. Nach Überführung in die Boratform wird das Harz unter Druck in die Stahlsäule gefüllt<sup>10</sup>. Wegen des relativ geringen Vernetzungsgrads des Harzes (4%) ist es ratsam, den Füllvorgang nur bei höchstens 80 bar durchzuführen. Bekanntlich quellen Anionenaustauscher am stärksten in verdünnten und am geringsten in konzentrierten Puffersystemen. Da für die Trennungen mit einem Borat-Puffersystem von 0.1–1.0 *M* gearbeitet wird, ist es vorteilhaft, bei dem Füllvorgang einen 0.6 *M* Boratpuffer zu verwenden, um später einen zu hohen Quellungsdruck und eine zu grosse Schwindung zu vermeiden. Auf die Oberseite der fertigen Säulenfüllung kann eine poröse Teflonscheibe gelegt werden. Es zeigte sich, dass eine Vileda-Scheibe (Poröse Scheibe aus Polyamidfasern) (Vileda, Weinheim, B.R.D.) den gleichen Zweck erfüllt. Es konnten keine nachteiligen Folgen für die Trennungen nachgewiesen werden. Poröse PTFE-Scheiben geben oft Anlass zu einem erhöhten Widerstand, wodurch der Druck in der Säule unnötig ansteigt. Bei Verwendung der Vileda-Scheibe wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Eine Reinigungssäule (50 × 3 mm) wurde der Trennsäule vorgeschaltet. Die Reinigungs- oder Vorsäule wird mit einem in der Boratform vorliegenden grobkörnigen Harz vom Typ Dowex 1-X4 gefüllt. Die Füllung wird periodisch erneuert. Wenn die Trennungsgüte der Säule nachlässt, wird der Oberteil des Harzes in der Trennsäule in einer Länge von ca. 1–2 cm entfernt und die Säule unter Druck wieder mit Anionenaustauscher gefüllt. Die Reagenzien und Vergleichsverbindungen lieferten die Firmen Merck (Darmstadt, B.R.D.), Serva (Heidelberg, B.R.D. und Riedel de Haen (Seelze-Hannover, B.R.D.).

Zum Nachweis der getrennten Zucker diente ein Gemisch von 70%iger Schwefelsäure und 0.1% Orcin<sup>5</sup>. Das Reagenz ist in dunklen Flaschen aufzubewahren. Wenn in dem Analysengemisch nur reduzierende Zucker vorhanden sind, wie z.B. in Holzhydrolysaten, kann Neucuproin verwendet werden<sup>11</sup>.

Die Vergleichsverbindungen wurden in Wasser gelöst und jeweils 20  $\mu\text{l}$  aufgetragen. Urinproben wurden von Herrn Dr. D. J. Byrd (Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover, B.R.D.) zur Verfügung gestellt. Nach den Angaben von Herrn Byrd wurde 500  $\mu\text{l}$  Urin mit 50  $\mu\text{l}$  1 *N* Perchlorsäure enteiwisst, anschliessend zentrifugiert, und der Oberstand in einem Injektionsfläschchen zur Trockenen eingengt. Zu dem Rückstand gab man 100  $\mu\text{l}$  Toluol. Von der Analyse gab man zu der in einer Tiefkühltruhe aufbewahrten Probe 500  $\mu\text{l}$  destilliertes Wasser und dosierte die unterstehende Flüssigkeit in den Zuckeranalysator. Die getrennten Verbindungen identifizierte man durch einen Vergleich mit bekannten Sacchariden. Die quantitative Bestimmung erfolgte manuell durch Auswertung der Peakhöhe und Vergleich mit Eichkurven.

---

\* Ein Harz mit ähnlichen Eigenschaften liefert auch die Firma Benson, Reno, Nev., U.S.A.; Typ BA-X4 (7–10  $\mu\text{m}$ ).

## ERGEBNISSE

In der Fig. 2 ist die Trennung eines Gemisches aus 21 Zuckern dargestellt. Die Trennung im vorderen Teil des Chromatogramms ist nicht besonders gut. Wenn dennoch eine bessere Auflösung erwünscht ist, kann diese durch eine Verringerung der Boratkonzentration erreicht werden. Dagegen ist die Trennung der Saccharide Maltose, Rhamnose, Lactose und Stachyose zusätzlich pH-abhängig<sup>5</sup>. Die gezeigte Trennung wird bei pH 8.5 durchgeführt. Die chromatographische Trennung einer Urinprobe, die vorher entproteinisiert war, ist in der Fig. 3 gezeigt. Es handelt sich

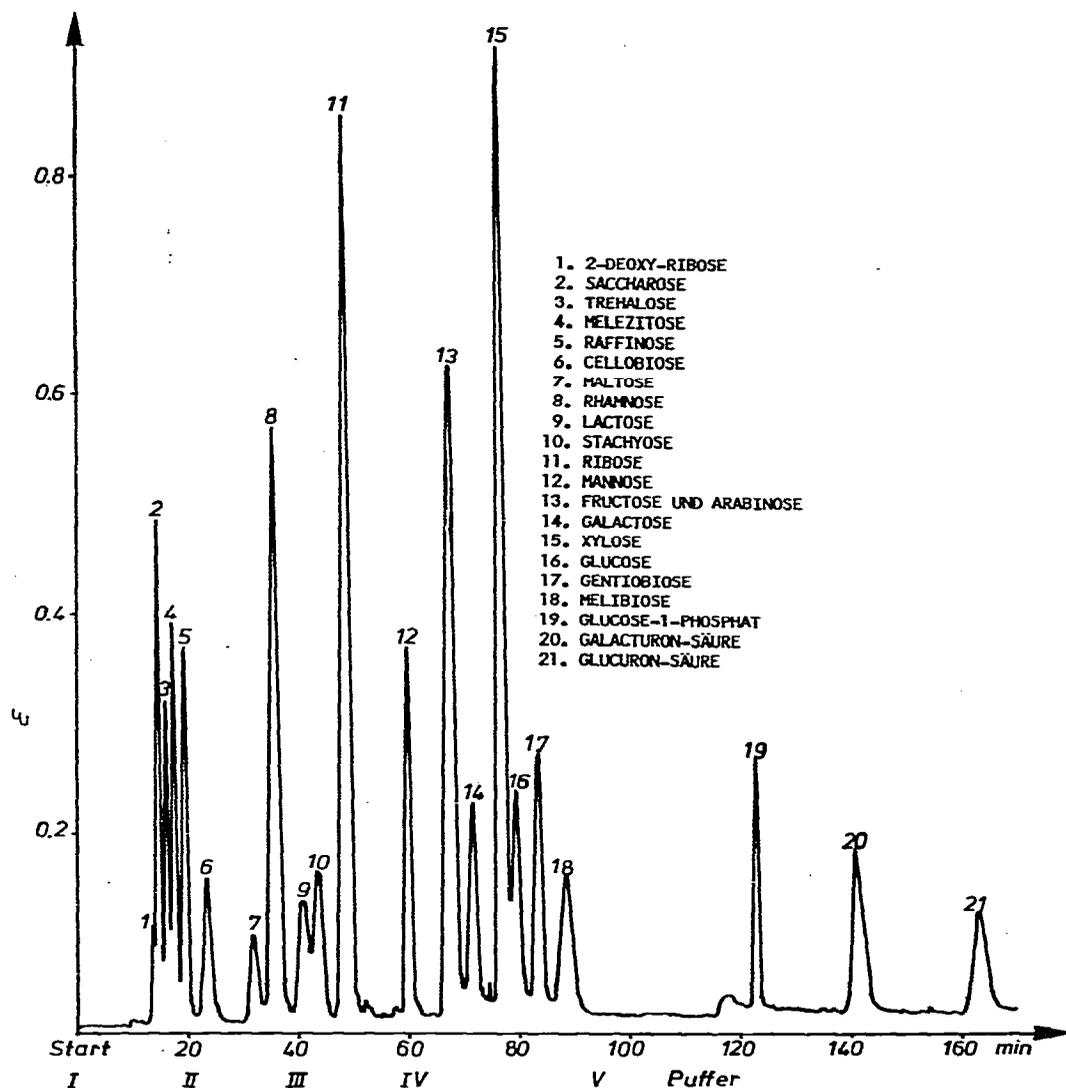


Fig. 2. Chromatographische Trennung von 21 Zuckern. Aufgetragene Menge: 20  $\mu$ l je 20  $\mu$ g der einzelnen Verbindung enthaltend. Vollausschlag des Photometers: 1.0 E. Verweilzeit im Heizbad: 3 min bei 97°. Puffer I: 0.1 M Borat pH 8.5; Puffer II: 0.2 M Borat pH 8.5; Puffer III: 0.4 M Borat pH 8.5; Puffer IV: 0.49 M Borat pH 8.8; Puffer V: 1.0 M Borat pH 9.4. Temperatur 60°.

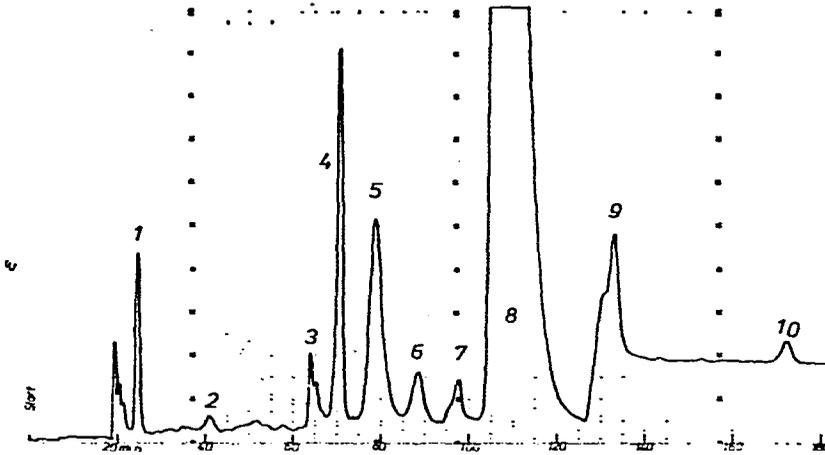


Fig. 3. Chromatographische Trennung einer entproteinisierten Urinprobe. Auftragsmenge:  $20 \mu\text{l}$ . Boratpuffer ähnlich wie in der Fig. 2. Vollausschlag des Photometers:  $0.2 E$ . Verweilzeit im Heizbad:  $10 \text{ min}$  bei  $97^\circ$ . Zuckerzusammenstellung: 1 = Saccharose,  $0.95 \mu\text{g}$ ; 2 = Maltose,  $0.27 \mu\text{g}$ ; 3 = Ribose (?),  $0.08 \mu\text{g}$ ; 4 = Mannose,  $2.4 \mu\text{g}$ ; 5 = Fructose + Arabinose,  $1.45 \mu\text{g}$  (Arabinosegehalt *ca.*  $0.15 \mu\text{g}$ ); 6 = Galactose,  $0.87 \mu\text{g}$ ; 7 = Xylose,  $0.17 \mu\text{g}$ ; 8 = Glucose,  $276.6 \mu\text{g}$ ; 9 = Glucose-1-phosphat,  $1.03 \mu\text{g}$ ; 10 = Glucuronsäure,  $0.52 \mu\text{g}$ .

hier um eine Urinprobe einer Patientin, die im Verdacht steht, an einer erhöhten Ausscheidung von Galaktose zu leiden.

Falls eine Probe vorliegt, die nur eine begrenzte Zahl von Sacchariden enthält, kann ein Einpufferverfahren angewendet werden (Fig. 4). Wenn nur reduzierende Zucker vorhanden sind, kann Neocuproin zum Nachweis der getrennten Zucker verwendet werden (Fig. 5)<sup>11</sup>.

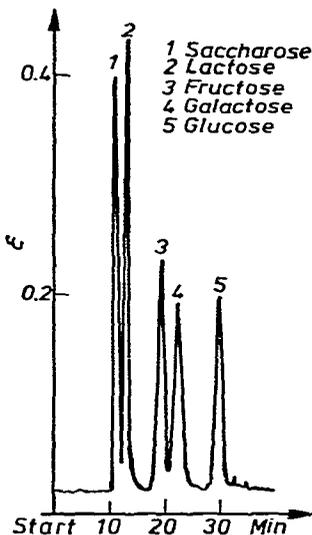


Fig. 4. Einpufferverfahren zur Trennung einiger Kohlenhydrate. Trennsäule und Nachweissystem ähnlich wie in der Fig. 2. Boratpuffer  $0.49 M$  (pH 8.8). Auftragsmenge:  $20 \mu\text{l}$  eines Gemisches, je  $20 \mu\text{g}$  der einzelnen Zucker enthaltend.

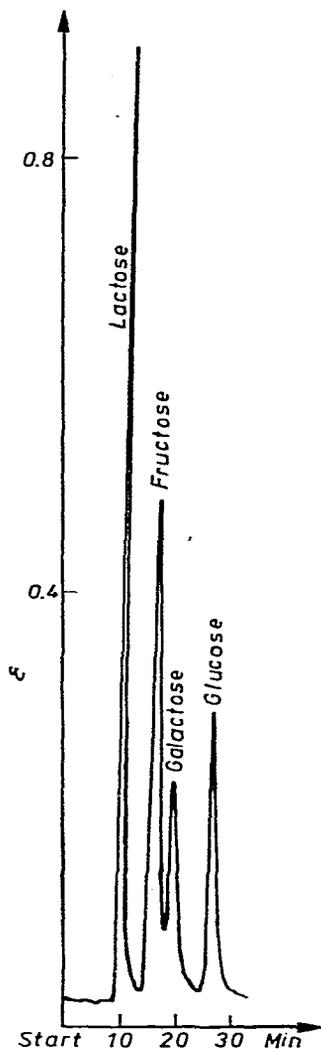


Fig. 5. Einpufferverfahren zur Trennung einiger reduzierender Zucker. Bedingungen ähnlich wie in der Fig. 4, nur Nachweissystem mit einem Gemisch aus Neocuproinhydrochlorid (0.04%) und  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.02%) ( $0.4 \text{ cm}^3/\text{min}$ ) sowie  $0.25 \text{ M}$  Soda ( $0.8 \text{ cm}^3/\text{min}$ ) betrieben. Verweilzeit im Heizbad: 4 min bei  $97^\circ$ .

## DISKUSSION

Komplizierte Saccharidgemische können mit einem Boratpuffergradienten in ihre Komponenten getrennt werden. Solche Gradienten können als Stufengradient oder kontinuierlich gestaltet werden. Die hier beschriebene Methode verwendet einen Stufengradienten, wie es auch in der Aminosäurenanalyse weit verbreitet ist. Der Einsatz von Stufengradienten hat den Vorteil, dass die Gradienten mit Hilfe eines zeitlich gesteuerten Ventils reproduzierbar gebildet werden können. Weiterhin besteht die Möglichkeit, eine Analyse mit nur einem oder auch zwei Gradienten durch-

zuführen, ohne an dem Gerät eine Änderung vornehmen zu müssen. Dies ist z.B. der Fall, wenn nur Hydrolysate zu trennen sind. Es ist auch möglich, die Reihenfolge der Gradienten zu wechseln, wenn z.B. das chromatographische Verhalten der Verbindungen bekannt ist. Ein weiterer Vorteil des vorliegenden Verfahrens besteht darin, dass das Stufengradientprogramm ähnlich dem ist, wie es für die Analyse von Aminosäuren in physiologischen Flüssigkeiten angewendet wird<sup>13</sup>. Somit kann das Gerät wahlweise für die Analyse von Aminosäuren oder Kohlenhydraten, nach einem entsprechenden Pufferwechsel, in physiologischen Flüssigkeiten angewandt werden.

Wie bereits erwähnt, kommen in den meisten Fällen nur eine begrenzte Zahl von Zuckern in natürlich vorkommenden Präparaten vor. Bei der Analyse z.B. von Hydrolysaten von Pflanzenmaterialien, die Glucose, Mannose, Galactose, Arabinose und Xylose enthalten, kann das Einpuffersystem vorteilhaft benutzt werden. Die in sehr kleinen Mengen vorkommenden Galacturonsäure sowie Glucuronsäure können eventuell mit einem zweiten Puffer analysiert werden. Somit bietet das hier gezeigte Verfahren die Möglichkeit, Hydrolysate aus Pflanzenmaterialien auf einfache Weise zu analysieren<sup>11,12</sup>.

#### LITERATUR

- 1 E. C. Conrad und J. K. Palmer, *Food Technol.*, October (1976) 84-92.
- 2 J. Hettinger und R. E. Majors, *Varian Instruments Applic.*, 10, No. 2 (1976) 6.
- 3 J. S. Hobbs und J. G. Lawrence, *J. Chromatogr.*, 72 (1972) 311.
- 4 P. Jonsson und O. Samuelson, *J. Chromatogr.*, 26 (1967) 194.
- 5 A. Floridi, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 61.
- 6 R. B. Kesler, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1416.
- 7 W. Voelter und H. Bauer, *J. Chromatogr.*, 126 (1976) 693.
- 8 S. Katz, S. R. Dinsmore und W. Pitt, *Clin. Chem.*, 17 (1971) 731.
- 9 J. E. Mrochek, S. R. Dinsmore und T. P. Waalkes, *Clin. Chem.*, 21 (1975) 1314.
- 10 M. H. Simatupang, M. Sinner und H. H. Dietrichs, *Technicon Symposium 1974*, No. 1802, Technicon, Frankfurt, 1975.
- 11 M. H. Simatupang und H. H. Dietrichs, *Chromatographia*, 11 (1978) 89-95.
- 12 M. Sinner, M. H. Simatupang und H. H. Dietrichs, *Wood Sci. Technol.*, 9 (1975) 307.
- 13 *Preliminary Operating Manual for the Technicon NC-2 and NC-2P*, Technical Report No. 9, Technicon International Division, Geneva, 1974.