

CHROM. 14,860

QUANTITATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE VON ZUCKERN, ZUCKERSÄUREN UND POLYALKOHOLEN

R. KLAUS* und J. RIPPHAHN

E. Merck, Postfach 4119, D-6100 Darmstadt 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 19. Oktober 1981; geänderte Fassung eingegangen am 25. Februar 1982)

SUMMARY

Quantitative thin-layer chromatographic analysis of sugars, sugar acids and polyalcohols

The possibilities of quantitative *in situ* fluorimetric analysis of sugars and diols are described with several examples.

For the chromatographic separation, high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) plates or better still, HPTLC aluminium foils precoated with silica gel 60 are used. An *in situ* reaction which is primarily restricted to silica gel layers is used for the detection, which gives approximately similar fluorescence spectra with all sugars, sugar alcohols, sugar acids and sugar compounds. Compared to the staining methods which can be used on cellulose layers, this derivatisation is characterised by a very high detection sensitivity in quantitative analysis. However, qualitative determinations of unknown mixtures such as aldose–ketose or pentose–hexose differentiations should be conducted by conventional staining methods.

Finally, an experiment is described, in which qualitative and semi-quantitative determinations of oligosaccharide mixtures up to 9 times the glucose value are carried out. The limits of HPTLC methods are exceeded, when satisfactory identification of the individual components in the sample is not possible.

EINLEITUNG

Die quantitative Bestimmung von Zuckern (Zuckeraustauschstoffen)¹ beruht, wenn man von enzymatischen Methoden^{2,3} absieht, im wesentlichen auf zwei grundlegend verschiedenen Analyseverfahren.

Für die Analyse von Reinsubstanzen ist die polarimetrische Bestimmung sowohl bezüglich des Arbeitsaufwandes als auch der Genauigkeit optimal. Bei Mehrkomponentengemischen nähert sich diese Methode jedoch sehr schnell der Grenze ihrer Leistungsfähigkeit. So müssen z.B. bei einer 2-Komponenten-Mischung — von einander abweichende Rotationsdispersion vorausgesetzt — Drehwinkelmessungen bei zwei Wellenlängen λ_1 und λ_2 vorgenommen werden. Mit Hilfe dieser berechnet man aus einem Gleichungssystem mit zwei Unbekannten die Komponentenanteile.

Wesentlich rationeller ist bei Mehrkomponenten — bzw. unbekanntem Gemischen — die Anwendung eines Trennverfahrens. Aus dem Bereich der chromatographischen Techniken bieten sich an: (a) Gaschromatographie (GC). (b) Dünn-

schichtchromatographie (TLC) und Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) und (c) Flüssigchromatographie (HPLC).

Die chemische Konstitution der zu behandelnden Substanzen erlaubt nun bei keinem Verfahren eine restlos befriedigende direkte qualitative bzw. quantitative Analyse. Während bei der GC die Möglichkeit einer chromatographischen Trennung von einer vorherigen chemischen Derivatisierung abhängig ist, verlangen die flüssigchromatographischen Methoden mit Ausnahme der refraktometrischen Detektion der Säulenchromatographie bzw. HPLC entsprechende Nachweisreaktionen während bzw. nach der chromatographischen Trennung. Für die HPLC als eine Methode relativ neueren Datums sind bisher nur wenig derartig realisierbare Reaktionen bekannt. Weit umfangreicher sind die in der Literatur veröffentlichten, z.T. aus der Papierchromatographie^{4,5} übernommenen Arbeiten über TLC-*in situ*-Reaktionen^{3,6-13}. In diesen Publikationen sind neben Anfärbemethoden für eine visuelle Beurteilung weiterhin die verschiedensten Adsorbentien und Fließmittelsysteme^{9,14-17} beschrieben. Durch eine geeignete Kombination dieser TLC-Parameter erreicht man eine Selektivität, die nahezu für alle anstehenden qualitativen Zuckerprobleme ausreichend ist.

Nicht ganz zufriedenstellend sind die meisten Anfärbemethoden hinsichtlich einer quantitativen Aussagefähigkeit: So stellt bei der photometrischen Auswertung¹⁵ durch Absorption eine des öfteren nicht zu vermeidende Fleckdeformation¹⁹⁻²¹ auch zwischen Vergleich und Probe eine systematische Fehlerquelle dar. Auf

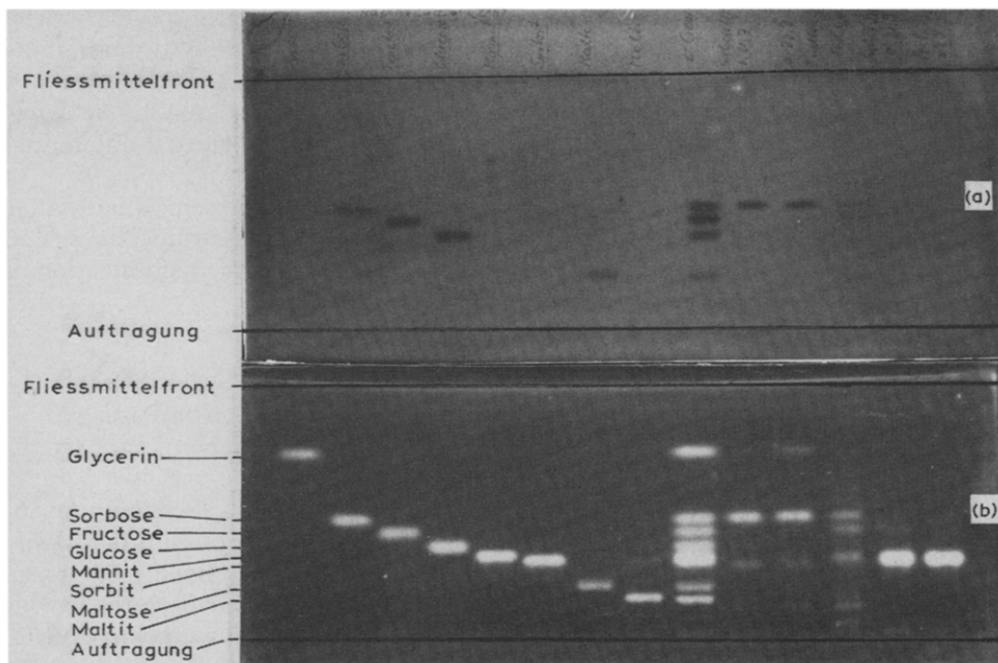


Fig. 1. Gegenüberstellung der Derivatisierung mit Fluoreszenznachweis und einer üblichen Derivatisierung mit Farbnachweis (a) Derivatisierung: *in situ*-Reaktion. Tauchlösung: Naphthoresorcinlösung, 0,2%, in Äthanol, 100 ml; Phosphorsäure (85%) 10 ml. Nachbehandlung: 5-10 min, ca. 100 C. Nachweis: Absorption im Sichtbaren. (b) Derivatisierung: *in situ*-Reaktion Tauchlösung: s. Lit. 23-25. Nachweis: Fluoreszenz.

sie wird in der Literatur eingehend hingewiesen. Nicht selten zeigt des weiteren der Plattenuntergrund nach der Aktivierung ein die quantitative, *in situ*-photometrische Auswertung beeinträchtigendes, fleckenartiges Aussehen. Dagegen kennt man bei Umsetzungen von Substanzen mit Reagenzien, die zu fluoreszierenden Verbindungen führen, diese Effekte allgemein nicht. Da der fluoreszierende Nachweis²² sich ferner durch niedrigere Nachweisgrenzen auszeichnet, sind Fluoreszenzreaktionen kolorimetrischen Anfärbemethoden überlegen.

Eine solche Methode — sie wurde in der Literatur bereits vorgestellt²³⁻²⁵ — wurde aufgegriffen. Kombiniert mit HPTLC-Techniken ergibt sie für alle Substanzen die eine vicinale Diolgruppierung aufweisen ein vielen Bedürfnissen genügendes quantitatives Analyseverfahren.

Mit zwei Chromatogrammen (Fig. 1) soll die erwähnte fluorimetrische Derivatisierung vorgestellt und einer Anfärbe-Derivatisierung einiger Zucker bei gleichen chromatographischen Bedingungen gegenübergestellt werden.

EINZELHEITEN DES VERFAHRENS

HPTLC-Schichten

HPTLC-Schichtmaterialien zeichnen sich gegenüber den in der TLC verwendeten Materialien durch verbesserte Trenneigenschaften und Nachweisgrenzen, kleinere Trennzeiten und eine erhöhte Bahnkapazität aus²⁶.

Aus dem Adsorbentensortiment wurde Kieselgel 60 als Fertigplatten bzw. Alufolien für die chromatographischen Trennungen der Substanzen verwendet. Das Arbeiten mit Alufolien erweist sich insofern als sehr zweckmässig als sie nach der Auswertung zusammen mit Messprotokollen und Berechnungsunterlagen abgeheftet werden können.

Auftragstechnik

Die Substanzauftragung wird mit den für die Nano-TLC bereits handelsüblichen Geräten vorgenommen, z.B. werden Dosierungen im Nanoliterbereich mit zwei von der Fa. Camag (Muttensz, Schweiz) vertriebenen Geräten ermöglicht: (a) Camag-Nanoapplikator für variable Dosierungen im Volumenbereich 0–230 nl sowie (b) Camag-Mikroapplikator für variable Dosierungen im Volumenbereich 0–2.3 μ l. Für Probenauftragungen im Mikroliter-Bereich können ferner Mikroliter-Kapillaren verwendet werden. Mit diesen ist neben einer Punktauftragung die besonders bei der fluorimetrischen *in situ*-Analytik vorteilhafte Bandauftragung möglich.

Der Bedeutung wegen — verbesserte chromatographische Trennung bei voller Messempfindlichkeit — erfolgt mit Fig. 2 ein Vergleich Bandauftragung–Punktauftragung mit Ausschnitten zweier Chromatogramme eines Zuckergemisches.

In situ-Reaktion

Die angewandte *in situ*-Reaktion, d.h. die chemische Umsetzung in photometrisch auswertbare Substanzen von Tanner²³ als Nachweisreaktion für Sorbit und andere Polyhydroxyverbindungen deklariert, fand zwischenzeitlich relativ selten definiertere Anwendungsgebiete^{24,25}.

Aktivierungsschema: Nach der chromatographischen Trennung wird die mit einem Heissluftfön ausreichend getrocknete TLC-Platte oder Alufolie *ca.* 8–10 sec in die eigentliche jeweils neu anzusetzende Reaktionslösung getaucht. Dies erfolgt

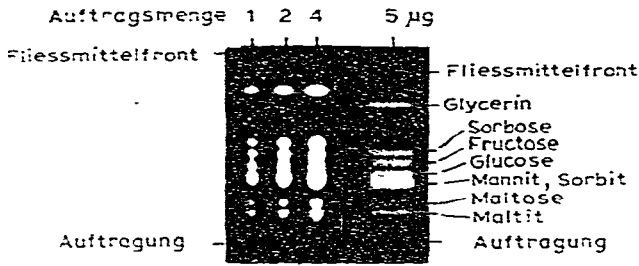


Fig. 2. Gegenüberstellung Punktauftragung-Bandauftragung eines Zuckergemisches. Derivatisierung: *m*-*om*-Reaktion. Tauchlösung: s. Lit. 23-25. Nachweis: Fluoreszenz.

zweckmässigerweise in einem vertikal stehenden Schmaltank, welcher der Platten-grösse angepasst ist. Als Tauchflüssigkeit dient eine gesättigte Lösung von Bleitetraacetat in Eisessig und eine 1‰ige Lösung von 2,7-Dichlorfluorescein je 5 ml gemischt und mit Toluol auf 200 ml aufgefüllt. Anschliessend wird mit einem Heissluftfön bzw. im Trockenschrank *ca.* 3 min bei *ca.* 100 C thermisch aktiviert. Bei Verwendung einer 0.5 bzw. 0.2‰igen Lösung von Dichlorfluorescein kann das Fluoreszenzverhältnis Fleck-Untergrund besonders bei Anregung mit UV-A wesentlich verbessert werden.

Fluorimetrische und photometrische Angaben

Für eine quantitative *in situ*-Bestimmung ist zunächst die Photometrierung der einzelnen Bahnen der HPTLC-Platte mit einem Dünnschicht-Scanner erforderlich. Hierzu sind u.a. die fluorimetrischen Daten wie Fluoreszenz- und Anregungsspektrum der durch die Aktivierung entstandenen fluoreszierenden Komponenten zu beachten.

Nach einer Bewertung weiterer, die Analyse messtechnisch beeinflussender Faktoren -auf diese soll hier nicht näher eingegangen werden- hat sich die in Fig. 3 skizzierte Messanordnung am besten bewährt. Sie liefert als photometrisches Signal das Wellenlängenintegral der Fluoreszenzstrahlung F_{λ} , im sichtbaren Spektralbereich. Als Rechengrösse für die quantitative Auswertung wird die von einem elektrischen Auswertesystem über den Fleck integrierte Fluoreszenzstrahlung ΣF_{λ} verwendet.

Hinsichtlich der Fluoreszenz- und Anregungsspektren sei ergänzend vermerkt, dass diese für die betreffende Substanzgruppe weitgehend übereinstimmen. Eine zusätzliche chromatische Trennung bei eventuell ungenügender chromatographischer Trennung von Komponenten ist somit nicht möglich.

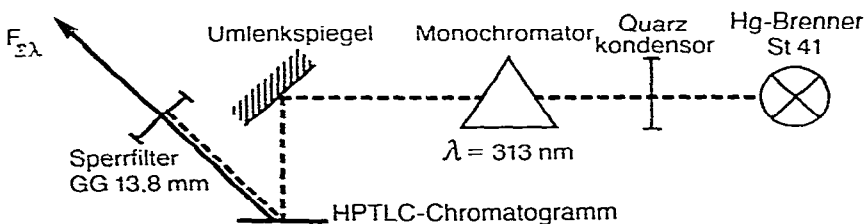


Fig. 3. Lichtführung eines Chromatogrammspektralphotometers für Fluoreszenzmessungen.

Chromatographie

Bei der Auffindung geeigneter Fließmittelsysteme für vorgegebene Trennprobleme kann zunächst auf sehr umfangreiche Literaturangaben zurückgegriffen werden.

In vielen Fällen sollten die in Frage kommenden Komponenten jedoch eigenständig hR_F -wertmässig erfasst werden. Unter diesen Gesichtspunkten sind die in den Figs. 4 und 5 dargestellten Chromatogramme zu werten. Sie verwenden die in Tabelle I angegebenen Mono-, Di- und Trisaccharide, einschliesslich Glycerin und Glycerinaldehyd mit den in den Legenden angegebenen Fließmittelsystemen. Aus den beiden Chromatogrammen können einige für die Problemstellung wesentliche systematische Zusammenhänge abgeleitet werden.

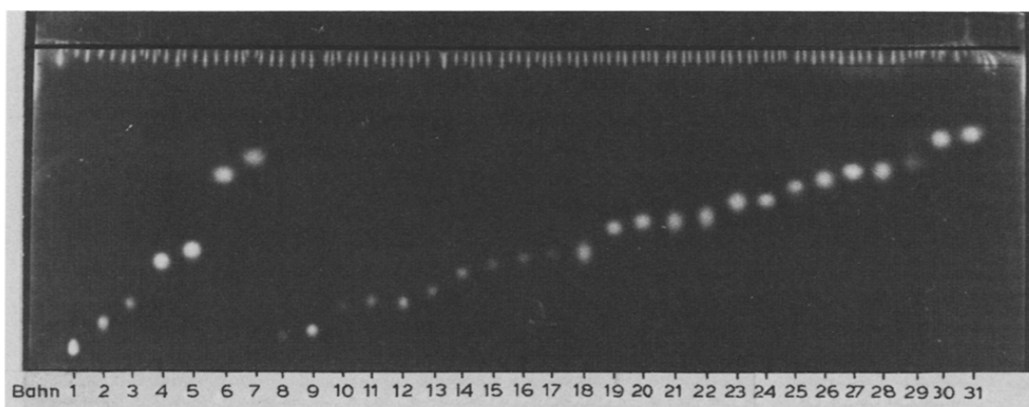


Fig. 4. Substanzen von Tabelle I. Auftragsmenge je 500 ng. Fließmittel: Essigsäureäthylester-Pyridin-Wasser-Essigsäure-Propionsäure (50:50:10:5:5). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 7 cm.

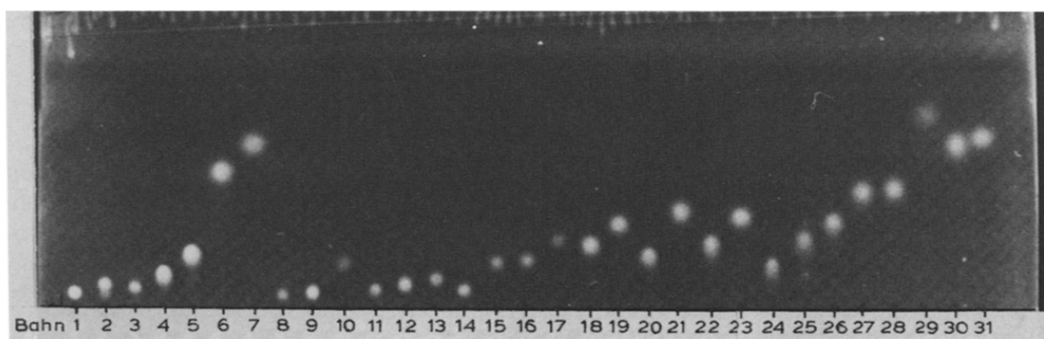


Fig. 5. Substanzen von Tabelle I. Auftragsmenge je 500 ng. Fließmittel: 1-Butanol-2-Propanol-Borsäurelösung (100 mg 20 ml Wasser) (30:50:10). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 7 cm. Es sei nachgetragen, dass ein Zusatz von 2 Anteilen Eisessig zu einer beträchtlichen Reduzierung der Schwanzbildung führt.

TABELLE I

hR_F-WERT-TABELLE DER VERBINDUNGEN VON CHROMATOGRAMM DER FIG. 4

<i>Bahn:</i>	<i>Name</i>	<i>hR_F</i>
<i>Zuckeralkohole</i>		
1	<i>meso</i> -Insoit	8
2	Isomaltit	15
3	Maltit	27
4	Sorbit	41
5	Mannit	44
6	<i>meso</i> -Erythrit	69
7	Glycerin	73
<i>Trisaccharide</i>		
8	Raffinose	14
<i>Disaccharide</i>		
9	Melibiose	16
10	Trehalose	27
11	Lactulose	27
12	Gentiobiose	29
13	Lactose	33
14	Palatinose	40
15	Cellobiose	43
16	Maltose	46
17	Saccharose	46
<i>Monosaccharide</i>		
18	Galactose	44
19	Glucose	53
20	Fructose	54
21	Mannose	56
22	Talose	56
23	Arabinose	61
24	Sorbose	61
25	Tagatose	66
26	Ribose	68
27	Xylose	69
28	Fucose	69
29	Glycerinaldehyd	71
30	Rhamnose	79
31	2-Desoxy-D-ribose	79

1. *Chromatogramm (Fig. 4)*. Die *hR_F*-Werte der untersuchten Zucker nehmen in der Folge Tri-, Di- und Monosaccharide zu. Hierfür muss eine im umgekehrten Sinne laufende Polaritätstendenz verantwortlich sein. An der oberen Grenze der Monosaccharide liegt Glycerin. Die spezifischen Fluoreszenzen der aufgetragenen Disaccharide sind unter sich annähernd gleich, ebenso die der Monosaccharide, letztere jedoch wesentlich höher.

Beide Effekte lassen bei gewissen quantitativen Analysen Summenangaben der Mono- und Disaccharide zu.

2. *Chromatogramm (Fig. 5)*. Bei den in gleicher Folge aufgetragenen Zuckern zeigen sich im Besonderen bei den Monosacchariden wesentliche *hR_F*-Unterschiede

zu Fig. 5 bei wenig ausgeprägter hR_F -Wert-Tendenz der Tri-, Di und Monosaccharide.

ANWENDUNGEN DES VERFAHRENS

In den folgenden Abschnitten wird an Hand einiger Analysendaten der breite Anwendungsbereich des Verfahrens skizziert. Die beschriebenen Beispiele entstammen der Routineanalytik, sie sind so zusammengestellt, dass die verschiedenartigsten Problemstellungen der Trennung und Quantifizierung beleuchtet werden. Neben den beiden erwähnten Fließmittelsystemen wurden weitere in den Legenden angegebene Fließmittel verwendet.

Trennung Glucose–Fructose

Glucose und Fructose neben Saccharose zwei wesentliche Kohlehydratträger dürften analytisch von allgemeinem Interesse sein: So ist Fructose, wenn man von einer industriellen Anwendung absieht, hauptsächlich ein in der diätischen Therapie eingesetzter Zuckeraustauschstoff. Die Verwendung von Invertzucker sowohl zu therapeutischen Zwecken als auch auf dem industriellen Sektor ist üblich. Aus letzterem Bereich —der Herstellung des Invertzuckers— ist die Trennung der Fig. 6 entnommen. Bei der Inversion der eingesetzten Saccharose bilden sich zeitabhängig die Komponenten Fructose und Glucose. Die zum Zeitpunkt der Probennahme entstandenen Monosaccharidanteile liefert die Auswertung des Chromatogrammes zu: Fructose 400 mg/ml Probe und Glucose 512 mg/ml Probe.

Trennung Arabinose–Ribose

Während im ersten Anwendungsfall eine quantitative Analyse der beiden Anteile einer Zweikomponentenprobe erfolgte, zeigt die hier beschriebene Analyse die

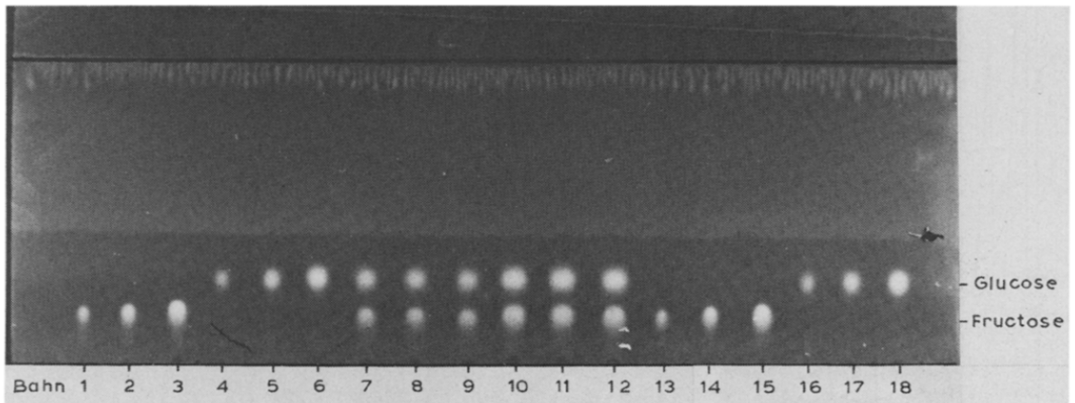


Fig. 6. Trennung Glucose–Fructose. Schicht: HPTLC-Fertigplatte Kieselgel 60 oF. Fließmittel: 1-Butanol–2-Propanol–Borsäurelösung 100 mg/20 ml Wasser (30:50:10). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 1 × 7 cm. Steigzeit: ca. 90 min. Auftragsmengen: Fructose: Bahn 1, 13, Vergleich 285 ng; 2, 14, Vergleich 570 ng; 3, 15, Vergleich 1140 ng; Glucose: Bahn 4, 16, Vergleich 250 ng; 5, 17, Vergleich 500 ng; 6, 18, Vergleich 1000 ng. Bahn 7–9, Probe 1 μ l (Verdünnung 1:1000); 10–12, Probe 2 μ l (Verdünnung 1:1000).

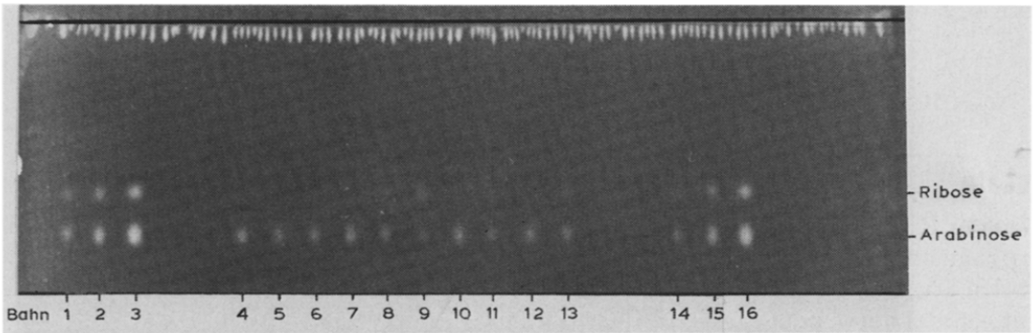


Fig. 7. Trennung Arabinose-Ribose. Schicht: HPTLC-Alufolie Kieselgel 60 oF. Fließmittel: Essigsäureäthylester-Pyridin-Tetrahydrofuran-Wasser-Eisessig (50:22:15:15:4). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 1 × 7 cm. Steigzeit: 45 min.

quantitative Bestimmung einer Komponente von 10 verschiedenen Proben als Einzelanalyse. Bei ausreichender hR_f -Konstanz für die einzelnen Bahnen kann wie bei dem Chromatogramm der Fig. 7 eine Photometrierung senkrecht zur chromatographischen Steigrichtung erfolgen. Eventuelle geringe Tailingeffekte bzw. Unsymmetrien der Belegung beeinträchtigen bei ausreichend gewählten Messflächen das Ergebnis nicht. Mit Fig. 8 ist die für die quantitative Auswertung registrierte Fluoreszenzortskurve

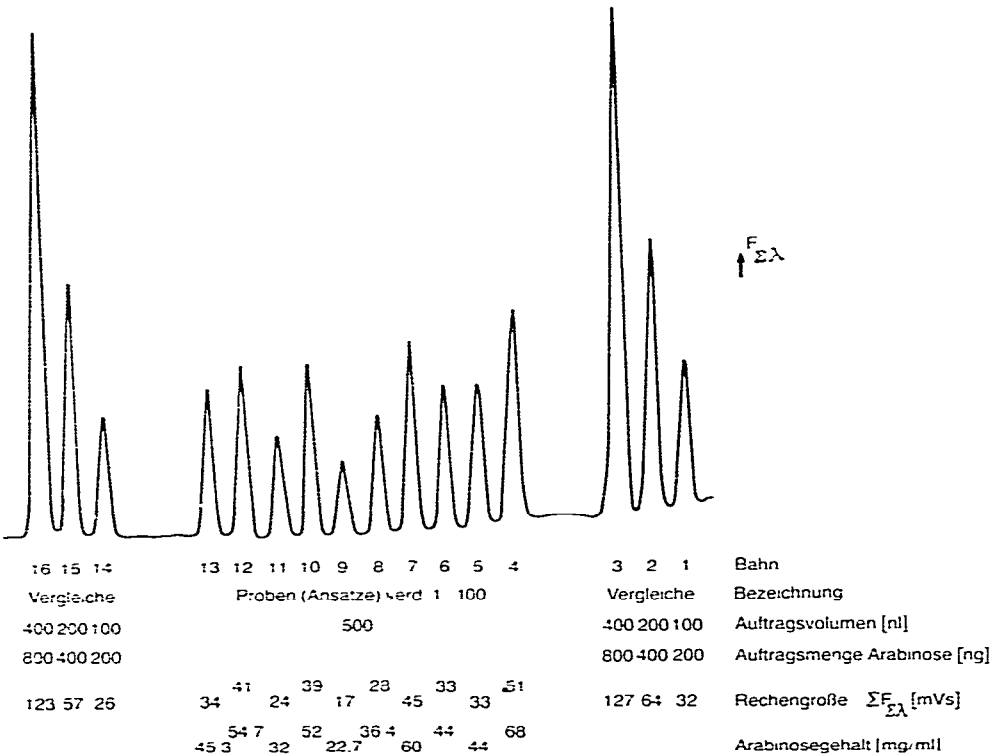


Fig. 8. Fluoreszenzortskurve registriert senkrecht zur chromatographischen Steigrichtung und Werttabelle der Komponente Arabinose von Chromatogramm Fig. 7.

der Komponente Arabinose und die dazu gehörige Wertetabelle wiedergegeben. Hingewiesen sei auf die gute Linearität der Beziehung Messwert-Auftragsmenge.

Trennung Arabinose–Ribose, Beispiel einer Spurenanalyse

Die Anwendung quantitativer HPTLC-Techniken in der Spurenanalytik erfolgt wie das Literaturstudium zeigt offenbar nur sehr zögernd. Dies ist um so erstaunlicher weil das Verfahren gerade auf diesem Sektor wesentliche Vorteile besitzt: Erreichbare hohe Fleckbelegungen in Sonderfällen bei Auftragsvolumina bis zu 20–50 μ l und Derivatisierungsmöglichkeiten in Lösung vor der Chromatographie und *in situ*. Ein Chromatogramm für die quantitative Analyse von Ribose in diesem Konzentrationsbereich zeigt Fig. 9. Die photometrische Registrierung, hier parallel zur chromatographischen Steigrichtung, dreier Probep Bahnen (Bahn 2, 5 und 7) und einer Vergleichsbahn (Bahn 4) sowie die entsprechende Wertetabelle gibt Fig. 10 wieder. Es sei zusätzlich vermerkt, dass eine wesentliche Verbesserung der Nachweisgrenze durch eine bandförmige Auftragung zu erreichen ist: Die verbesserte Trennung erlaubt z.B. für Probe P₂ die Photometrierung mit wesentlich höheren photometrischen Verstärkungsparametern und damit einem entsprechend grösseren Ribose-Signal. Für eine Festlegung der Nachweisgrenze selbst sind die statistischen Gesetzmässigkeiten anzuwenden.

Trennung Sorbose–Glucose–Sorbit–Mannit

Das in Fig. 11 wiedergegebene Chromatogramm soll auf die Möglichkeiten der vergleichenden visuellen Beurteilung von fluoreszierenden Chromatogrammen z.B. im Bereich von Fabrikationslaboratorien hinweisen. Neben hinreichenden auf hR_F -

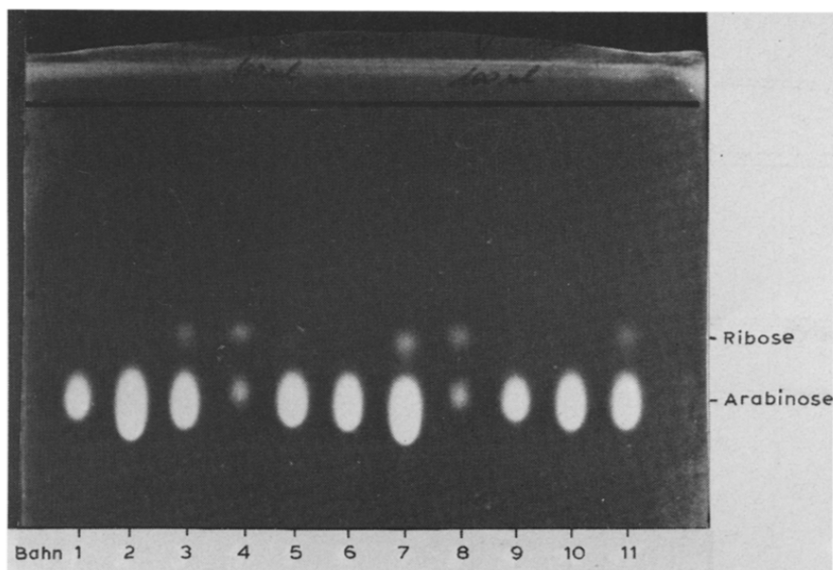


Fig. 9. Trennung Arabinose–Ribose, Spurenanalyse von Ribose. Schicht: HPTLC-Alufolie Kieselgel 60 oF. Fließmittel: Essigsäureäthylester–Pyridin–Tetrahydrofuran–Wasser–Eisessig (50:22:15:15:4). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 1 × 7 cm. Steigzeit: 45 min.

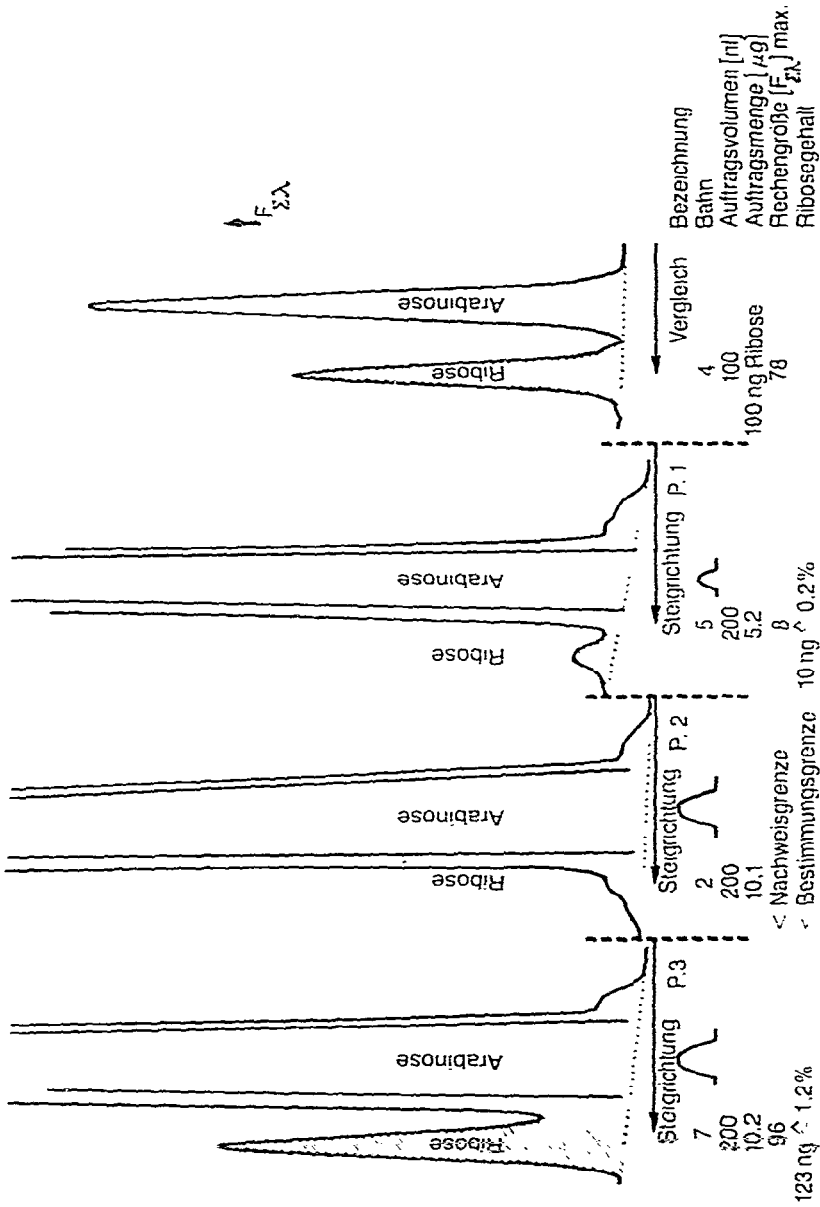


Fig. 10. Fluoreszenzortskurven der Bahnen 2, 4, 5 und 7 von Chromatogramm Fig. 9 und dazugehörige Werttabelle.

Werte gestützte Kriterien der Identitätsprüfung erbringt das Chromatogramm maximale Informationen über die Zusammensetzung der verschiedenen Proben. Hier sei im besonderen der geringe für die Gesamtanalyse erforderliche Zeitaufwand für derartige Beurteilungen erwähnt, ein für Fabrikationsanalysen wesentlicher Gesichtspunkt.

Trennung Sorbit–Mannit, Spurenanalyse von Mannit

Die mit dem Fließmittel der Fig. 11 erreichte Trennung Mannit–Sorbit ist für Auftragsmengen beider im μg -Bereich noch ausreichend. Für wechselseitige Spurenanalysen der beiden Zuckeralkohole besser geeignet sind die für das Chromatogramm der Fig. 12 benutzte Fließmittelsysteme. Aus der photometrischen Auswertung des Chromatogrammes resultiert ein Mannitgehalt von 0.90%. Für die Analyse ist eine Standardabweichung des Mittelwertes $S_{\bar{x}}$ zu 5% bei $n = 4$ ermittelt worden.

Sorbit, Prüfung auf Glycole, Mono-, Di- und Trisaccharide

Eine Abhängigkeit der hR_f -Werte von der chemischen Konstitution von Verbindungen die ihrerseits einer gewissen Systematik gehorchen kann nicht selten für eine quantitative Analyse ausgenutzt werden. Die gezielte Änderung von Fließmitteln oder Fließmittelzusammensetzungen liefert darüberhinaus die Möglichkeit hR_f -Wert-Bereiche den Bedürfnissen entsprechend zu spreizen. Die in diesem Anwendungsfall beschriebene Analyse macht hiervon Gebrauch. Im einzelnen handelt es sich um die quantitative Analyse von in Sorbit eventuell nachzuweisenden Glycolen wie Äthylenglycol, Propylenglycol, Butylenglycol bzw. Glycerin und der Mono-, Di- und Trisaccharide.

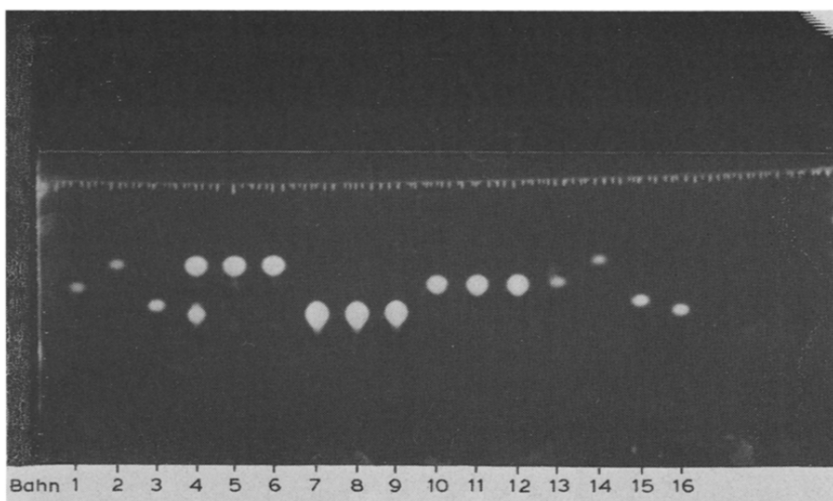


Fig. 11. Trennung Sorbose–Glucose–Sorbit–Mannit. Schicht: HPTLC-Alufolie Kieselgel 60 oF. Fließmittel: Essigsäureäthylester–Pyridin–Wasser–Eisessig–Propionsäure (50:50:10:5:5). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 2×7 cm. Steigzeit: 2×40 min. Auftragsmengen: Bahn 1, 13, Vergleich Glucose $1 \mu\text{g}$; 2, 14, Vergleich Sorbose $1 \mu\text{g}$; 3, 15, Vergleich Mannit $1 \mu\text{g}$; 4, Probe Sorbose $12 \mu\text{g}$; 5, Probe Sorbose; 6, Probe Sorbose; 7, Probe Sorbit, $12 \mu\text{g}$; 8, Probe Sorbit; 9, Probe Sorbit; 10, Probe Glucose $10 \mu\text{g}$; 11, Probe Glucose; 12, Probe Glucose; 16, Vergleich Sorbit $1 \mu\text{g}$.

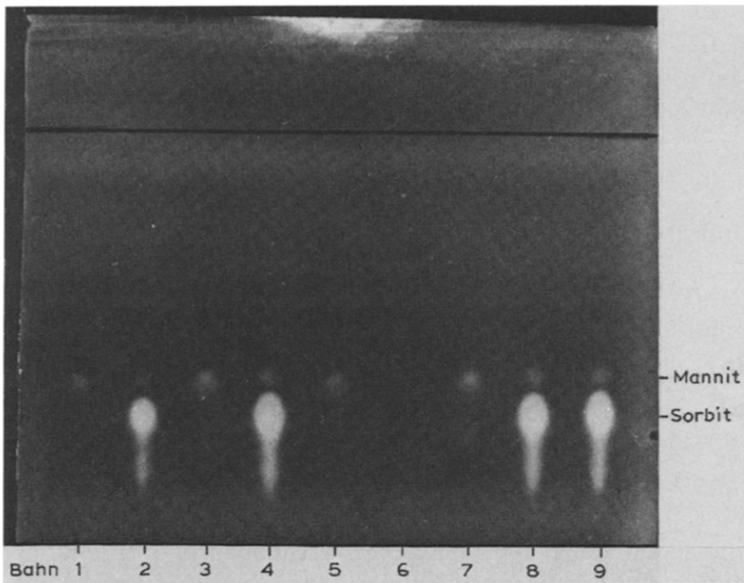


Fig. 12. Trennung Sorbit-Mannit. Spurenanalyse von Mannit. Schicht: HPTLC-Alufolie Kieselgel 60 oF. Fließmittel: 1-Butanol-2-propanol-Borsäurelösung 100 mg 200 ml Wasser Eisessig (30:50:10:2) oder (30:85:15:5). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 2×7 cm. Steigzeit: 150 min. Auftragsmengen: Bahn 1. 5. Vergleich Mannit 100 ng; 3. 7. Vergleich Mannit 200 ng; 2. Probe Sorbit $5 \mu\text{g}$; 4. 8. 9. Probe Sorbit $10 \mu\text{g}$; 6. Blindbahn. Das hier abgebildete Chromatogramm wurde ohne Eisessig entwickelt. Hierdurch wird die Schwanzbildung bei Sorbit hervorgerufen.

Glycerinbestimmung und qualitativer Nachweis von Äthylenglycol, Propylenglycol und Butylenglycol. Mit dem für das Chromatogramm der Fig. 13 angewandten Fließmittel gelingt eine ausreichende hR_F -Wert-Spreizung des Bereiches der Glycole (C_2 , C_3 , C_4) während der Bereich der Kohlehydrate mit $hR_F < 10$ für eine Auswertung ausscheidet. Wie das Chromatogramm der Fig. 13 (bei dem ausser den Ver-

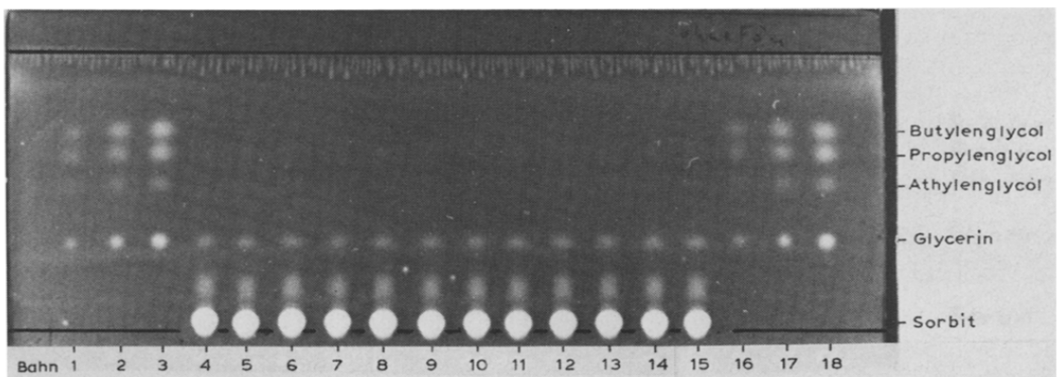


Fig. 13. Glycerinbestimmung und qualitativer Nachweis von Äthylenglycol, Propylenglycol und Butylenglycol. Schicht: HPTLC-Alufolie Kieselgel 60 oF. Fließmittel: 2-Propanol-Chloroform-Methanol-Ammoniak 10% (45:45:20:10). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 1×7 cm. Steigzeit: 50 min.

TABELLE II

RECHNER PROTOKOLL ZUR STATISTISCHEN GLYCERINBESTIMMUNG IN SORBIT VON CHROMATOGRAMM DER FIG. 13

	Auftrags- mengen	Bahn	Rechnerprotokoll	
			Zeit (sec)	Fluoreszenz- integral $\Sigma F_{2,}$ (mV·sec)
				260.547
Vergleiche	658 ng	18	9.7	0.446
	329 ng	17	23.9	35.411
			43.9	17.524
			55.4	0.040
	165 ng	16	64.2	6.076
		15	83.6	13.744
		14	103.0	12.753
		13	123.5	11.816
		12	143.2	12.223
Probe 2 μ l	ca. 120 μ g	11	163.7	11.782
		10	181.8	11.328
		9	201.2	11.566
		8	223.1	12.814
		7	243.1	9.957
		6	262.5	12.631
		5	283.3	11.470
Vergleiche	658 ng	4	301.6	11.575
	329 ng	3	321.9	32.592
		2	341.9	17.787
	165 ng	1	363.2	7.009

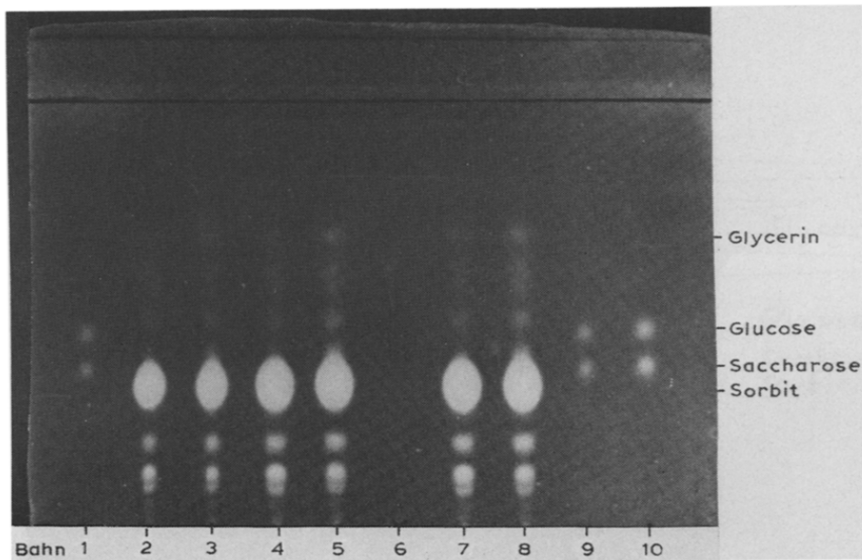


Fig. 14. Trennung Sorbit-Mono-, Di- und Trisaccharide. Schicht: HPTLC-Alufolie Kieselgel 60 oF. Fließmittel: Essigsäureäthylester-Pyridin-Wasser-Eisessig-Propionsäure (50:50:10:5:5). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 1 × 7 cm. Steigzeit: 40 min.

gleichsbahnen lediglich eine Probe für eine statistische Analyse wiederholt aufgetragen wurde) zeigt, sind 2-wertige Alkohole nicht nachzuweisen. Zur qualitativen Glycerinbestimmung wurde das Chromatogramm senkrecht zur chromatographischen Steigrichtung photometriert. Tabelle II gibt das dazugehörige Rechnerprotokoll wieder. Neben den aufgetragenen Substanzmengen sind in diesem die von den Registrierparametern abhängigen, mit den Bahnabständen korrespondierenden Zeiten, sowie die Fluoreszenzintegrale ΣF_{zi} (mV · sec) vermerkt. Die weitere Berechnung liefert einen Glyceringehalt in der Probe Sorbit von 242.5 ng/2 μ l Auftragslösung entsprechend 0.22%. Die Fehlerrechnung ergibt: Standardabweichung des Einzelwertes S_{abs} ca. 10 ng, $S_{rel} \approx 4.3\%$. Die zu erwartende Standardabweichung des Mittelwertes beträgt $(S_{rel}) \approx 1.3\%$.

Summen-Bestimmungen in den hR_F -Bereichen Tri- und Disaccharide bzw. Monosaccharide. Die Analyse der weiteren in der Probe als Verunreinigung nachzuweisenden Kohlehydrate beschränkt sich auf eine rein mengenmässige Ermittlung ohne eine Identifizierung der Komponenten im Einzelnen. Unter Berücksichtigung auf die zu Fig. 4 gemachten Angaben bietet sich bei Anwendung des betreffenden Fließmittels die Möglichkeit Summenanalysen im Bereich der Mono-, Di- und Trisaccharide vorzunehmen. Fig. 14 zeigt das hierzu angefertigte Chromatogramm, Fig. 15 die registrierten Fluoreszenzortskurven zweier Vergleichsbahnen ebenso zweier Probefahnen einschliesslich der dazu gehörigen Wertetabelle. Zur quantitativen Bestimmung werden sowohl die zwischen Glycerin als oberer hR_F -Wert-Begrenzung der Monosaccharide und Sorbit als auch die zwischen Sorbit und der Auftragung gelegenen Fluoreszenzen der einzelnen Komponenten addiert. Unter Bezug auf die spezifischen Fluoreszenzen von Glucose als Vergleichssubstanz für den Bereich der Monosaccharide und Saccharose für den Bereich der Di- und Trisaccharide resultieren die in Tabelle III zusammengefassten Einzelwerte der beiden Proben.

TABELLE III

WERTETABELLE DER SUMMENBESTIMMUNG VON BESTANDTEILEN VON SORBIT VON CHROMATOGRAMM DER FIG. 14

	<i>Im hR_F-Bereich</i>	
	<i>Di- und Trisaccharide</i>	<i>Monosaccharide</i>
	<i>liegende Komponenten berechnet als</i>	
	<i>Saccharose (%)</i>	<i>Glucose (%)</i>
Probe 2975		
Einzelwerte	13.3	0.9
	15.2	0.8
	14.6	0.9
Mittelwerte	14.4	0.9
Probe 3567		
Einzelwerte	14.0	2.0
	15.0	2.1
	14.6	1.9
Mittelwerte	14.6	2.0

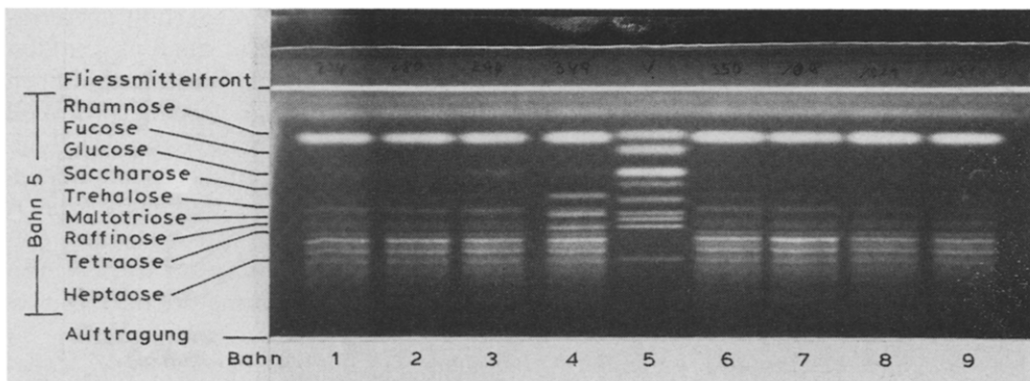


Fig. 16. Trennung im Bereich höherer Oligosaccharide. Schicht: HPTLC-Fertigplatte KG 60 oF HPTLC-Alufolie KG 60 oF. Fließmittel: 1-Propanol-Nitromethan-Wasser-Eisessig (50:30:20:1). Normalkammer ohne Kammer sättigung. Steighöhe: 2×7 cm. Steigzeit: 2×45 min. Auftragung bandförmig mit Mikropipillare $5 \mu\text{l}$. Auftragsmengen: Bahn 1-4 und 6-9, Proben je $20 \mu\text{g}$; Bahn 5, Vergleich Mono-Di-Trisaccharide (je $1.25 \mu\text{g}$) und Tetraose, Heptaose (je $5 \mu\text{g}$).

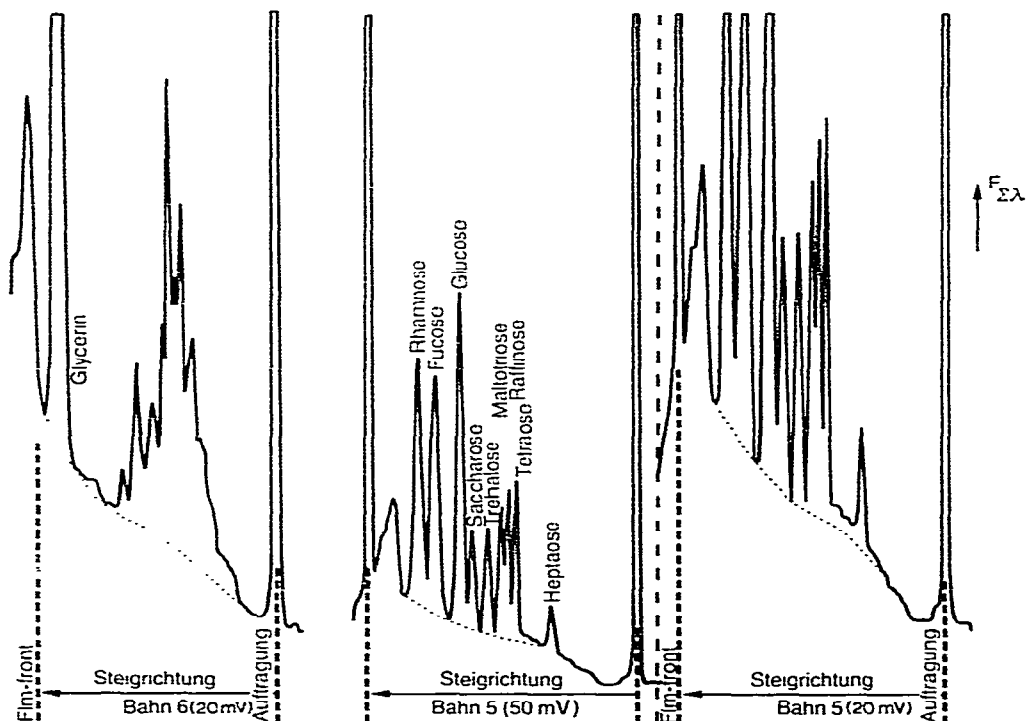


Fig. 17. Fluoreszenzortskurven der Bahnen 5 und 6 von Chromatogramm Fig. 16. Flm = Fließmittel.

Analysen im Bereich höherer Oligosaccharide

Die beiden unter Sorbit, Prüfung auf Glycole, Mono-, Di- und Trisaccharide angewandten Fließmittel ergeben sowohl eine ausreichende hR_F -Dispersion für die Substanzklasse der Glycole als auch der Mono-, Di- und Trisaccharide. Für Analysen im Bereich höherer Oligosaccharide eignet sich das in diesem Abschnitt vorgeschlagene Fließmittel. Fig. 16 zeigt das für die eine qualitative und halbquantitative Analyse vorbereitete Chromatogramm. Der Vergleich setzt sich aus drei Monosacchariden, zwei Disacchariden, zwei Trisacchariden, einer Tetraose und einer Heptaose zusammen. Das stark fluoreszierende Band in den Proben nahe der Fließmittelfront wurde als Glycerin nachgewiesen. Fig. 17 gibt die Fluoreszenzortskurven einer Probefahre und der Vergleichsbahn wieder.

Auswertung: Die aus der Vergleichsbahn resultierende hR_F -Abhängigkeit der Oligosaccharide liefert zunächst eine Möglichkeit zur näherungsweise Identifizierung der Komponenten der Probefahren. Fig. 18 zeigt diesen Zusammenhang. Die auf der Abszisse zusätzlich vermerkte Zahlenfolge führt als Vielfaches des Molekulargewichtes von Glucose zu den Oligo-Näherungswerten der Probefahren.

Für eine mengenmäßige Abschätzung der identifizierten Probenkomponenten ermittelt man zusätzlich die spezifischen Fluoreszenzen der verschiedenen Oligobereiche von Vergleichsbahnen. Aus der Tendenz dieser spezifischen Werte resultieren schließlich die Faktoren die eine halbquantitative Analyse erlauben.

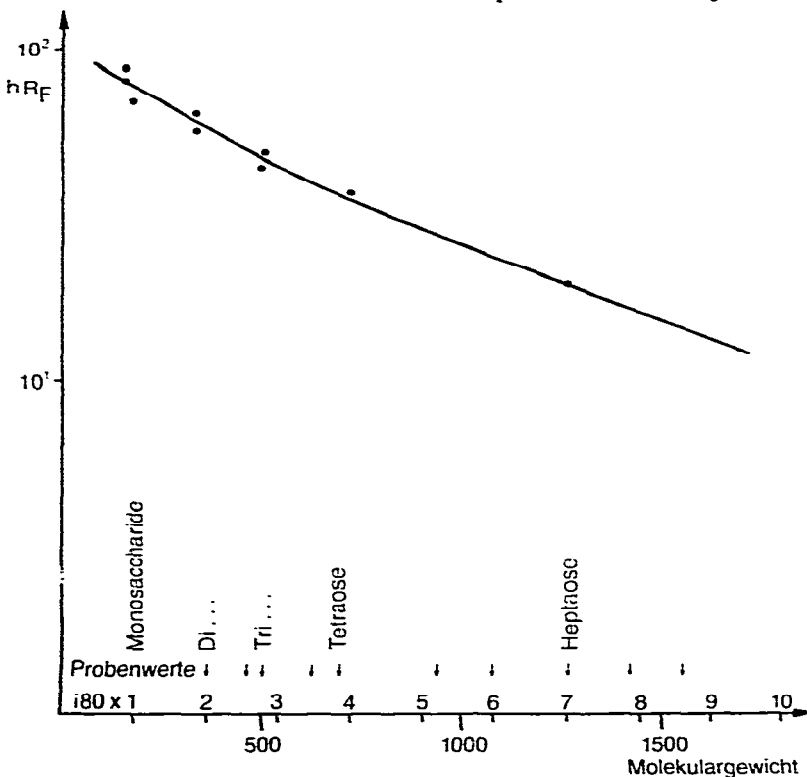


Fig. 18. Versuch einer näherungsweise Molekulargewichtsbestimmung von Oligosacchariden aus deren hR_F -Abhängigkeit.

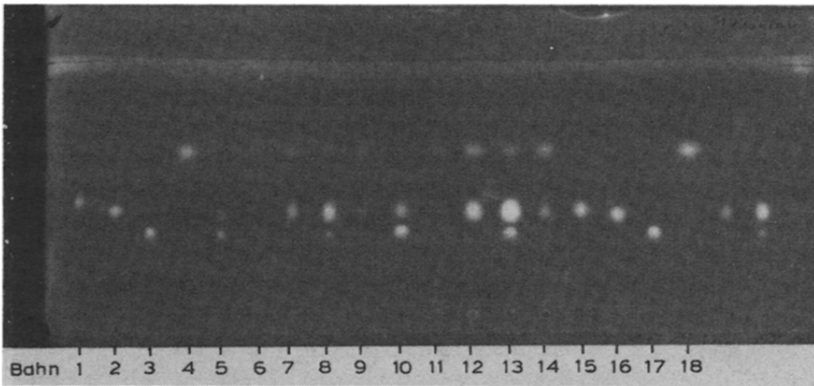


Fig. 19. Trennung Glucose + Fructose-Saccharose-Glycerin. Schicht: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 oF, HPTLC-Alufolie Kieselgel 60 oF. Fließmittel: Essigsäureäthylester-Pyridin-Wasser-Essigsäure-Propionsäure (50:50:10:5:5). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 1 × 7 cm. Steigzeit: ca. 45 min.

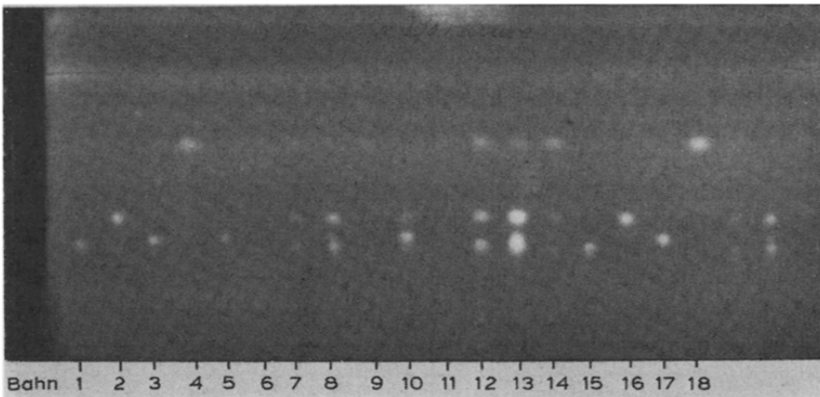


Fig. 20. Trennung Fructose + Saccharose-Glucose-Glycerin. Fließmittel: 1-Butanol-2-Propanol-Borsäurelsg. 100 mg 20 ml Wasser-Eisessig (30:50:10:2). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 2 × 7 cm. Steigzeit: ca. 90 min.

	<i>Auftragungsmengen (ng)</i>			
	<i>Fructose</i>	<i>Glucose</i>	<i>Saccharose</i>	<i>Glycerin</i>
Bahn 1 15 Vergleich	300 600			
Bahn 2 16 Vergleich		500 1000		
Bahn 3 17 Vergleich			2558 5115	
Bahn 4 18 Vergleich				408.815
Bahn 5 10 Probe Fanta (Verdünnung 1:10)			100/500 nl	
Bahn 6 11 Probe Bier (Verdünnung 1:10)			100/500 nl	
Bahn 7, 12 Probe Moselwein (Verdünnung 1:10)			100/500 nl	
Bahn 8 13 Probe Südwein (Verdünnung 1:10)			100/500 nl	
Bahn 9, 14 Probe Rheinwein (Verdünnung 1:10)			100/500 nl	

Trennung Glucose-Fructose-Saccharose-Glycerin bei Getränkeanalysen

Der dünnstschichtchromatographische Nachweis von Glucose, Fructose und Saccharose in Getränken z.B. in alkoholischen Getränken wird nicht nur durch seine quantitativen Möglichkeiten bestimmt, vielmehr ist die TLC-Methode in qualitativer Hinsicht das einzige Verfahren, welches die getrennten Komponenten sowohl als Messwertsignal als auch effektiv als Substanz dokumentiert.

Für die Analyse von Wein, Bier und Limonade wurde um eine relativ grosse Anzahl von Vergleichen und Proben bewerten zu können auch in diesem Anwendungsfall eine Punktauftragung der Bandauftragung vorgezogen. Die Problemstellung verlangt nicht unbedingt die Ausnutzung dieser zusätzlichen Verbesserung des chromatographischen Auflösungsvermögens.

Das für das Chromatogramm der Fig. 19 verwendete Fließmittel ergibt eine ausreichende Trennung für die Komponenten Fructose + Glucose und Saccharose bzw. Glycerin. Die quantitative Auswertung führt bei gleichen spezifischen Fluoreszenzen von Glucose und Fructose somit zur Summe der beiden Monosaccharide neben den Anteilen Saccharose und Glycerin. Zusätzliche quantitative Angaben für Glucose bzw. Fructose erhält man schliesslich durch Auswertung des Chromatogrammes der Fig. 20.

Tabelle IV fasst die für die verschiedenen Proben ermittelten Werte zusammen.

TABELLE IV

WERTETABELLE DER ANALYSE VON SACCHAROSE, GLUCOSE, FRUCTOSE UND GLYCERIN IN GETRÄNKEN

	<i>Saccharose</i> (mg/ml)	<i>Glucose</i> (mg/ml)	<i>Fructose</i> (mg/ml)	<i>Glycerin</i> (mg/ml)
Fanta	103.0	5.0	2.0	< Nachweis
Bier	< Nachweis	< Nachweis	< Nachweis	1.9
Moselwein	< Nachweis	14.2	15.5	7.6
Südwein	91.3	40.4	58.7	3.7
Rheinwein	< Nachweis	3.4	3.5	7.6

Quantitative in situ-Analyse einer Gruppe von Kohlehydraten ähnlicher chemischer Zusammensetzung

Mit diesem Beispiel wird versucht eine Arbeitsanleitung für die Analyse einer praxisbezogenen und chromatographisch interessanten Substanzklasse zu geben. Zur Lösung des Problems wird mit drei verschiedenen Fließmitteln und zwei verschiedenen Derivatisierungen gearbeitet. Die in den beiden folgenden Aufstellungen erwähnten Artikel-Nummern sind den Katalogen der Fa. E. Merck, Darmstadt, B.R.D. entnommen.

Kohlenhydrate

L(+)-Arabinose für biochemische Zwecke	Art.Nr. 1491	Symbol Ar
L(-)-Arabit für biochemische Zwecke	10173	At
Adonit (Ribit) für biochemische Zwecke	852	Rt
Arabonlacton		AL

D-Gluconsäure Kaliumsalz (Gluconsäure)	287	Gls
D-Gluconsäurelacton für biochemische Zwecke	288	GlsI
Lyxose		Ly
D(-)-Ribose für biochemische Zwecke	7605	Ri
Ribonlacton		RL
D(+)-Xylose für biochemische Zwecke	8689	Xy

Reagenzien für Fließmittel und Tauchflüssigkeiten

Borsäure krist. zur Analyse	Art.Nr.	165
Blei(IV)-acetat (Essigsäure feucht) z.S.		807418
2',7'-Dichlorfluorescein zur Analyse		9676
Phosphatpuffer pH 6.88		7294
1 N Natronlauge		9137
Indikatorpapier pH 5-10		9533
Äthanol abs. zur Analyse		972
Äthylmethylketon zur Analyse		9708
1-Butanol zur Analyse		1990
Essigsäure 100%, zur Analyse		63
Essigsäureäthylester zur Rückstandsanalyse		10972
Methanol zur Analyse		6009
Naphthalin-diol-1.3 zur Analyse		6252
2-Propanol		9634
Pyridin getrocknet zur Analyse		7463
Schwefelsäure 95-97%, zur Analyse		731
Tetrahydrofuran zur Analyse		9731
Toluol zur Analyse		8325

Auftragslösungen:

Vergleiche		Auftragsvolumina	Auftragsmengen (ng)						
			100 nl	200 nl	400 nl				
V 1	1 Arabinose	(20 mg 10 ml)	200	400	800				
	2 Xylose	(20 mg 10 ml)	200	400	800				
	3 Lyxose	(20 mg 10 ml)	200	400	800				
	4 Ribose	(20 mg 10 ml)	200	400	800				
V 2	1 Arabit (40 mg 10 ml)	} (1:1)	(20 mg 10 ml)	200	400	800			
	2 Ribit (40 mg 10 ml)								
	3 Arabonlacton (200 mg 10 ml)						1000	2000	4000
	4 Ribonlacton (40 mg 10 ml)						200	400	800
V 3	Gluconsäure	(20 mg 10 ml)	200	400	800				
V 4	Gluconsäurelacton	(20 mg 10 ml)	200	400	800				

Probe

Einwaage und Auftragsvolumen nach den Vergleichsmengen V 1-V 4 wählen. Bei System 1 und 2 können Auftragsvolumina bis 2 μ l angewandt werden, bei System 3 sollten 400 nl nicht überschritten werden.

Lösungsmittel für Vergleiche und Proben

Methanol-Wasser (8:2)

Haltbarkeit der Lösungen

V 1 mehrere Monate

V 2/1 und 2 mehrere Monate

V 2/3 und 4 täglich erneuern

V 3 täglich erneuern

V 4 täglich erneuern

Auftragsschema

Die anzuwendenden Auftragslösungen V 1–V 4 und die Anzahl der Eichpunkte 100, 200, 400 nl sind der jeweiligen Problemstellung anzupassen.

Chromatographie

System 1. Im Wesentlichen gekennzeichnet durch die Trennung Arabinose–(Ribose + Xylose + Lyxose) (Chromatogramm, siehe Fig. 21).

System 2. Wesentlich ist die Trennung (Arabinose + Ribose) von (Xylose + Lyxose) (Chromatogramm, siehe Fig. 22).

System 3. Vollständige Trennung Arabinose–Ribose–Xylose–Lyxose (Chromatogramm, siehe Fig. 23).

Eine Zusammenstellung der hR_F -Werte sämtlicher Komponenten für die drei Fließmittel zeigt Tabelle V.

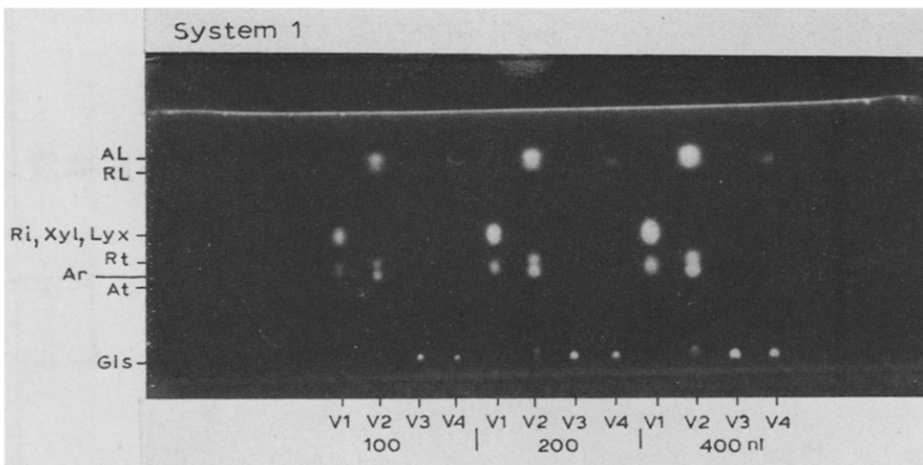


Fig. 21. Teil-Trennung eines Gemisches von Kohlehydraten speziell Arabinose–(Ribose + Xylose + Lyxose) nach System 1. Schicht: HPTLC-Fertigplatte KG 60 oF, 10 × 20 cm; HPTLC-Alufolie KG 60 oF, 10 × 20 cm. Bahnabstand: 10 mm mit einer Blindbahn. Fließmittel: Essigsäureäthylester–Pyridin–Tetrahydrofuran–Wasser–Essigsäure (50:22:15:15:4). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 1 × 7 cm. Steigzeit: 40 min. Derivatisierung: *in situ*-Reaktion. Tauchflüssigkeit: Bleitetraacetat, gesättigte Lösung in Eisessig–2,7-Dichlorfluorescein 1 g/100 ml Äthanol–Toluol (5:5:200, v/v/v). Platte oder Folie 10 sec tauchen, mit Warmluftfön trocknen.

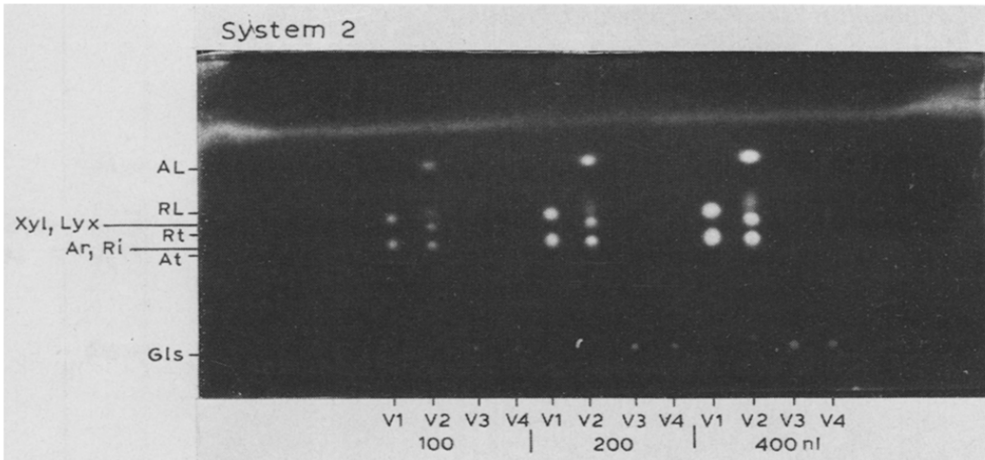


Fig. 22. Teil-Trennung eines Gemisches von Kohlehydraten speziell (Arabinose + Ribose)-(Xylose + Lyxose) nach System 2. Schicht: HPTLC-Fertigplatte KG 60 oF, 10 × 20 cm; HPTLC-Alufolie KG 60 oF, 10 × 20 cm. Bahnabstand: 10 mm mit einer Blindbahn. Fließmittel: 1-Butanol-2-Propanol-Borsäurelsg. 100 mg 20 ml Wasser-Eisessig (30:50:10:8). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 1 × 7 cm. Steigzeit: 90 min. Derivatisierung: *in situ*-Reaktion. Tauchflüssigkeit: Bleitetraacetat gesättigte Lösung in Eisessig-2,7-Dichlorfluorescein 1 g 100 ml Äthanol-Toluol (5:5:200, v v v). Platte oder Folie 10 sec tauchen, mit Warmluftfön trocknen.

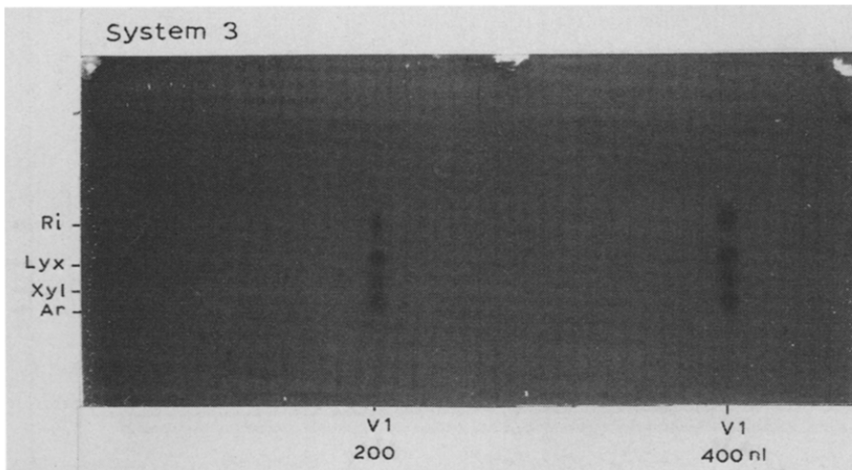


Fig. 23. Teil-Trennung eines Gemisches von Kohlehydraten speziell Arabinose-Ribose-Xylose-Lyxose nach System 3. Schicht: HPTLC-Fertigplatte KG 60 F_{254s} (wasserfest). Imprägnierung: Phosphatpuffer pH 8 Platte ca. 15 sec tauchen anschließend im Trockenschrank bei 120°C 30 min trocknen. Herstellen der Tauchflüssigkeit: Phosphat-Puffer pH 6.88 tropfenweise mit 1 N NaOH bis pH 8 einstellen (Indikatorpapier). Bahnabstand: 10 mm mit einer Blindbahn. Fließmittel: Methyläthylketon-Essigsäure-Borsäurelsg. gesättigt (90:10:10). Normalkammer mit Kammersättigung. Steighöhe: 2 × 7 cm. Steigzeit: 2 × 25 min. Derivatisierung: *in situ*-Reaktion. Tauchflüssigkeit: Naphthalin-diol-1,3 (0.2% in Äthanol)-H₂SO₄ (20%ig) (1:1). Tauchzeit: 15 sec. Nachbehandlung: Trockenschrank 110°C. 10 min.

TABELLE V

hR_F -WERT-TABELLE DER VERBINDUNGEN VON DEN CHROMATOGRAMMEN DER FIG. 20-22

	hR_F		
	System 1	System 2	System 3
Arabinose	29	46	32
Ribose	42	46	65
Xylose	42	56	41
Lyxose	42	56	69
Arabit	30	48	
Ribit	34	54	
Arabonlacton	73	76	
Ribonlacton	69	61	
Gluconsäure	3	5	
Gluconsäurelacton	79	43,76	

Photometrierung

System 1 und 2. Fig. 3 gibt die Lichtführung für die Fluoreszenzmessung der Platten von Fig. 21 und 22 wieder. Weitere photometrische Daten: Messfläche: 6×0.2 mm; Registrierungsgeschwindigkeit: TLC-Platte, 30 mm/min; Papier, 30 mm/min; Registrierrichtung: parallel zu Steigrichtung. Schreiberspannung: 20 mV. Als Messgröße wird das Fluoreszenzintegral F_{λ} im Wellenlängenintervall $380 < \lambda < 700$ nm verwendet. Dieses kann bei der Registrierung der Fluoreszenzortskurve aus dem Schreiberprotokoll bzw. aus den EDV-Werten entnommen werden. Rechengröße ist die über belegte Zone integrierte Messgröße (Peakfläche) ΣF_{λ} .

System 3. Mit Fig. 24 wird neben einigen photometrischen Daten für die Absorptionsmessung der Platte von Fig. 23 wiederum die entsprechende Lichtführung gezeigt. Fig. 25 lässt die Trennung Arabinose-Ribose-Xylose-Lyxose erkennen. Messgröße ist in diesem Fall das logarithmisch registrierte Remissionssignal $\log R_{546 \text{ nm}}$. Als Rechengröße wird die über die belegte Zone integrierte Messgröße (Peakfläche, Absorptionsintegral) $\Sigma A \log R_{546 \text{ nm}}$ eingesetzt.

Auswertung

Die Berechnung der Komponentenmengen in den Proben erfolgt mit den Funktionen

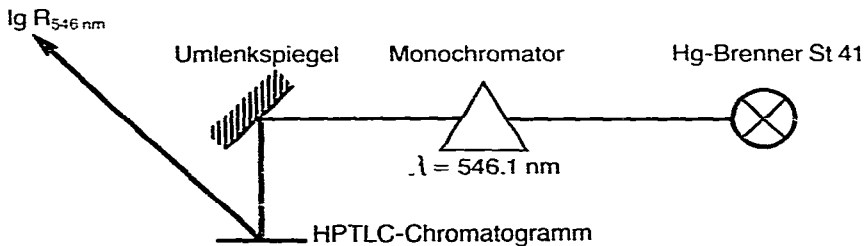
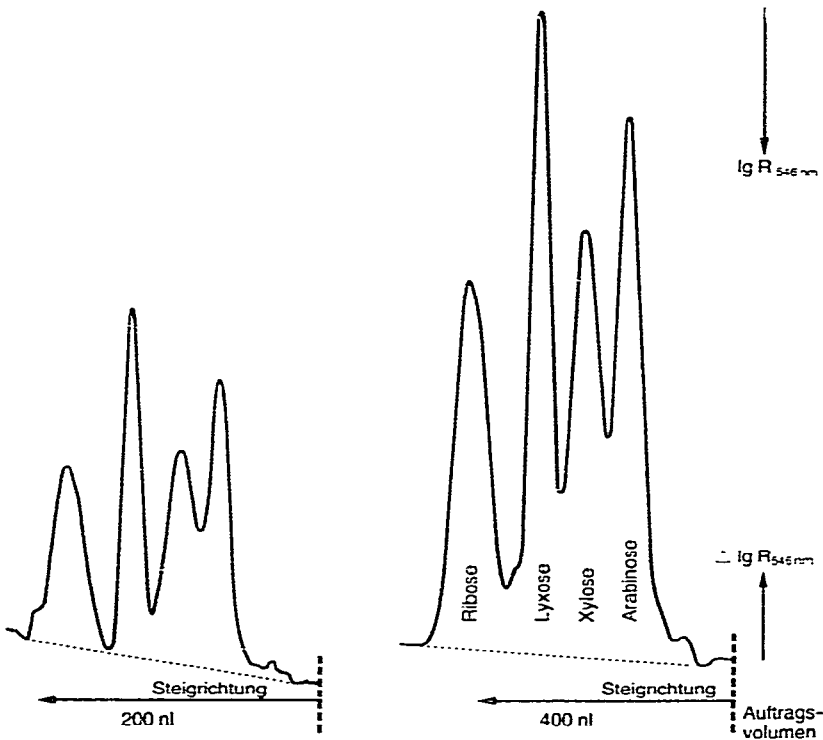


Fig. 24. Strahlengang für Absorptionsmessungen. Messfläche: 6×0.1 mm. Registrierungsgeschwindigkeit: TLC-Platte, 30 mm/min; Papier, 30 mm/min. Registrierrichtung: parallel zu Steigrichtung. Schreiberspannung: 200 mV.



Absorptionskurven Vergleiche V, von System 3

Fig. 25. Trennung Arabinose-Ribose-Xylose-Lyxose von Chromatogramm der Fig. 23.

Messgrösse bzw. Rechengrösse = $f(\text{Auftragsmenge der Vergleichssubstanzen})$

Diese können sowohl graphisch als auch mit einem elektronischen Auswertsystem ermittelt werden. Weisen Chromatogramme abweichende Fleckformen auf, sollte unter allen Umständen mit der Grösse ΣF_{λ_i} gearbeitet werden.

Koinzidenzen

Sofern nicht wegen des grösseren chromatographischen Aufwandes von System 3 mit diesem gearbeitet wird, können Koinzidenzen von Arabinose, Ribose, Xylose und Lyxose in System 1 und 2 nach dem angegebenen Selektivierungsschema der Tabelle VI eliminiert werden. Dies wird durch gleiche spezifische Fluoreszenzen der vier Verbindungen ermöglicht. Andererseits sind Summenanalysen z.B. von Arabinose + Ribose bzw. Xylose + Lyxose in vielen Fällen ausreichend.

Bei Anwesenheit von Arabit und Ribit wird nur die Eindeutigkeit der Berechnung von Arabinose in System 1 bzw. 2 vermindert. Durch Differenzberechnung von System 1 bzw. 2 und 3 kann, wenn erforderlich, eine Arabit-Ribit-Korrektur erfolgen. Eine zusätzliche Differenzierung zwischen Zuckern und Zuckeralkoholen erreicht man darüber hinaus durch Erhitzen der Platte oder Folie für ca. 15 min bei ca. 160°C^{27} .

TABELLE VI

HINWEISE AUF KOINZIDENZEN BEI DEN CHROMATOGRAMMEN DER FIG. 20-22

∅ = In Auftragslösung anwesend; x = in Auftragslösung anwesend, analysierbar ohne Koizidenz; ○ = in Auftragslösung nicht anwesend; x-x = chromatographisch bedingte Summenbildung.

Ar	Xy	Ly	Ri	At	Rt	AL	RL	Gls	Glsl	System
x	x	x	x	∅	∅	∅	∅	∅	∅	3
∅	x-----x-----x		x	∅	∅	x	x	x	x	1
x	x-----x-----x		x	○	○	x	x	x	x	1
x	∅	∅	x	○	○	x	x	x	x	1
x	x-----x		x	○	x	x	○	x	∅	2
○	x-----x-----x		x	x	x	x	x	x	x	1
∅	○	○	∅	∅	x	x	x	x	∅	2

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die Möglichkeiten einer quantitativen *in situ*-fluorimetrischen Analyse von Zuckern und Diolen mit mehreren Beispielen beschrieben.

Zur chromatographischen Trennung werden mit Kieselgel 60 beschichtete HPTLC-Fertigplatten oder mit wesentlichen Vorzügen HPTLC-Alufolien verwendet. Für den Nachweis wird eine vorwiegend auf Kieselschichten beschränkte *in situ*-Reaktion durchgeführt, welche für alle Zucker, Zuckeralkohole, Zuckersäuren und Zuckerverbindungen zu Fluoreszenzen mit annähernd übereinstimmenden Fluoreszenzspektren führt. Gegenüber den auch auf Celluloseschichten anwendbaren Anfärbemethoden zeichnet sich diese Derivatisierung durch eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit bei quantitativen Analysen aus. Qualitative Bestimmungen unbekannter Gemische wie z.B. Differenzierungen Aldosen-Ketosen oder Pentosen-Hexosen sollten jedoch zusätzlich mit Hilfe gängiger Anfärbemethoden vorgenommen werden. Schliesslich wird der Versuch qualitativer bzw. halbquantitativer Molekulargewichtsbestimmungen von Oligosaccharidmischungen bis zum 9fachen Glucosewert beschrieben.

Die Anwendung der Derivatisierung auf Zuckerverbindungen die einen weiteren molekular bedingten Nachweis zulassen zeigt den breiten Anwendungsbereich des Verfahrens. Im Falle Benzyliden-*d*-sorbit können die durch die Aktivierung nachweisbaren Mengen durch eine UV-Absorptionsmessung des Phenylrestes des Moleküls bestätigt werden. Je nach Anzahl der Phenylgruppen im Molekül ergänzen sich beide Methoden messwertmässig. Eine HPTLC-chromatographische Trennung α -Acetyldigoxin- β -Acetyldigoxin lässt 3 verschiedene Nachweismethoden zu: Neben dem UV-Absorptionsphotometrischen Nachweis bei 225 nm eignet sich der fluorometrische Aglyconnachweis mit Chloramin T. Beiden überlegen ist jedoch die Dichlorfluorescein-Derivatisierung der Zuckerkomponente.

Die Grenzen der HPTLC-chromatographischen Methode werden dann überschritten, wenn eine zufriedenstellende Identifizierung der einzelnen Komponenten der Probe nicht mehr gewährleistet ist.

LITERATUR

- 1 H. Förster, *Med. Monatschr. Pharm.*, 2 (1978) 42.
- 2 H. O. Beutler und J. Becker, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 73 (1977) 182.
- 3 A. Lomard, M. L. Tourn und M. Buffa, *J. Chromatogr.*, 134 (1977) 242.
- 4 G. Puey, *Ann. Falsif. Expert. Chim.*, 69 (1976) 605.
- 5 T. Momose und M. Nakamuva, *Talanta*, 10 (1963) 115.
- 6 H. Scherz, G. Stehlik, E. Bancher und K. Kaindl, *Chromatogr. Rev.*, 10 (1968) 1.
- 7 G. Avigad, *J. Chromatogr.*, 139 (1977) 343.
- 8 J. Cerbulis, *J. Chromatogr.*, 155 (1978) 226.
- 9 M. Ghebrezabher, S. Rufini, B. Monaldi und M. Lato, *J. Chromatogr.*, 127 (1976) 133.
- 10 F. Hsu, D. Nurok und A. Zlatkis, *J. Chromatogr.*, 158 (1978) 411.
- 11 R. Gauch, U. Leuenberger und E. Baumgartner, *J. Chromatogr.*, 174 (1979) 195.
- 12 K. Y. Lee, D. Nurok und A. Zlatkis, *J. Chromatogr.*, 174 (1979) 187.
- 13 J. Iwakawa, H. Kobatake, I. Suzuki und H. Kushida, *J. Chromatogr.*, 193 (1980) 33.
- 14 G. K. Munshi und P. R. Bhattacharya, *J. Inst. Chem. Calcutta*, 49 (1977) 103.
- 15 U. Siegenthaler und W. Ritter, *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, 68 (1977) 448.
- 16 V. Prey, H. Scherz und E. Bancher, *Mikrochim. Technanal. Acta.* (1963) 567.
- 17 B. P. Kremer, *J. Chromatogr.*, 110 (1975) 171.
- 18 S. Ebel, E. Geitz und D. Klarner, *Kontakte (Merck)*, No. 1 (1980) 11; No. 2 (1980) 12; No. 1 (1981) 44; No. 2 (1981) 34.
- 19 N. Seiler und H. Möller, *Chromatographia*, 2 (1969) 273.
- 20 N. Seiler und H. Möller, *Chromatographia*, 2 (1969) 319.
- 21 N. Seiler und H. Möller, *Chromatographia*, 2 (1969) 470.
- 22 W. Messerschmidt, *GIT Fachz. Lab.*, 15 (1971) 484.
- 23 H. Tanner, *Z. Obst.-Weinbau*, 103 (1967) 610.
- 24 H. Tanner und M. Duperrex, *Fruchtsaft-Ind.*, 13 (1968) 98.
- 25 G. Gübitz, R. W. Frei und H. Bethke, *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 337.
- 26 J. Rippbahn und H. Halpaap, *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 81.
- 27 B. Büchele und J. Lang, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 2 (1979) 585.