

PRO EXPERIMENTIS

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von Zuckern

Die eindimensionale dünnschichtchromatographische Trennung von Zuckergemischen auf unterschiedlichem Trägermaterial mit bekannten Fließmittelsystemen¹⁻⁹ war für unsere Untersuchungen nicht ausreichend. Die vergleichsweise günstigsten, für unsere Zwecke aber noch nicht befriedigenden Trennungen erzielte man unter den von J. JACIN und A. R. MISHKIN¹ und S. ADACHI³ beschriebenen Bedingungen. Sie benutzten als Trägermaterial mit 0,02 M Boratpufferlösung (pH 8,0) bzw. mit 0,1 M Natriumbisulfatlösung getränktes Kieselgel G und als Fließmittelsystem *iso*-Butanol/Eisessig/Wasser (5:4:1) (System I) bzw. *n*-Propanol/Wasser (8,5:1,5) (System II). Auch die Durchlaufchromatographie nach M. BRENNER, A. NIEDERWIESER und G. PATAKI¹⁰ erwies sich hier als vorteilhaft. Das Ziel unserer Arbeit war, unter Berücksichtigung dieser beiden eindimensionalen Methoden Gemische aus 8 bis 14 Mono- und Disacchariden durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie vollständig zu trennen.

Methodik. (1) Bezeichnung der Zucker und Testgemische.

Nr.	Zucker	Abkürzung	Nr.	Zucker	Abkürzung
1	Sorbose	Sor	8	Saccharose	Sac
2	Xylose	Xyl	9	β -Cellobiose	β -Cel
3	Fructose	Fru	10	Mannose	Man
4	Galactose	Gal	11	Maltose	Mal
5	Glucose	Glu	12	Ribose	Rib
6	Arabinose	Ara	13	Raffinose	Raf
7	Lactose	Lac	14	Rhamnose	Rha

Zucker-Testgemische

	Bezeichnung	Zucker Nr.
A	2, 3 (bzw. 1, 5, 6, 10 oder 12), 4, 7, 8, 9, 11, 13, 14	
B	1 (oder 3), 2, 4 (bzw. 6, 8, 9, 11 oder 12), 5 (oder 10)	
C	1, 3, 5, 6, 10, 12	
D	1, 3	
E	5, 10	
F	4, 6, 8, 9, 11, 12	
G	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (oder 11), 13, 14	
H	1, 2, 3 (oder 12), 4, 5, 6 (oder 10), 7, 8, 9 (oder 11)	
I	2, 4, 5 (bzw. 10 oder 6), 7, 8, 9 (oder 11), 13, 14	
K	2, 4, 7, 8, 9, 10, 12	
L	1, 2, 4, 7, 8, 9, 10	
M	2, 3, 4, 7, 8, 9, 10	
N	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, (oder 11) 12, 13, 14	
O	1-14	
P	1, 5, 6, 12	
R	1, 3, 5, 6	
S	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12	
T	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 (oder 11), 10	

¹ J. JACIN und A. R. MISHKIN, J. Chromat. 18, 170 (1965).² D. W. VOMHOF und T. C. TUCKER, J. Chromat. 17, 300 (1965).³ S. ADACHI, J. Chromat. 17, 295 (1965).⁴ F. MICHEEL und O. BERENDES, Mikrochim. Acta 1963, 519.⁵ V. PREY, H. SCHERZ und E. BANCHER, Mikrochim. Acta 1963, 567.⁶ P. G. PIFFERI, Anal. Chem. 37, 925 (1965).⁷ H.-H. STROH und W. SCHÜLER, Z. Chemie 4, 188 (1964).⁸ D. WALDI, J. Chromat. 18, 417 (1965).⁹ G. JAYME und H. KNOLLE, Angew. Chem. 68, 243 (1956).¹⁰ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, Experientia 17, 145, 237 (1961).

Tabelle I. Abhängigkeit des Rf-Wertes von der Schichtzusammensetzung und dem Fließmittelsystem

Kieselgel G/ Kieselgur G (% -Gehalt an Kieselgur) Nr.	Fließmittel- system	Rf-Werte (Mittelwerte aus drei Bestimmungen) von													
		Sor (1)	Xyl (2)	Fru (3)	Gal (4)	Glu (5)	Ara (6)	Lak (7)	Sac (8)	Cel (9)	Man (10)	Mal (11)	Rib (12)	Raf (13)	Rha (14)
8:0 (0%) I	I	0,44	0,53	0,42	0,39	0,44	0,44	0,23	0,34	0,29	0,44	0,32	0,45	0,21	0,58
	II ^a	0,53	0,65	0,54	0,57	0,61	0,59	0,48	0,59	0,56	0,61	0,57	0,53	—	—
	II ^b	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7:1 (12,5%) II	I	0,47	0,56	0,43	0,42	0,47	0,47	0,26	0,37	0,33	0,48	0,36	0,49	0,22	0,61
	II ^a	0,58	0,67	0,54	0,58	0,63	0,58	0,50	0,59	0,57	0,62	0,60	0,57	—	—
	II ^b	0,18	0,55	0,32	0,51	0,57	0,51	0,53	0,62	—	—	0,58	—	0,51	0,47
5:3 (37,5%) III	I	0,59	0,67	0,57	0,53	0,59	0,59	0,35	0,49	0,43	0,61	0,47	0,63	0,28	0,72
	II ^a	0,68	0,76	0,66	0,71	0,72	0,71	0,59	0,72	0,72	0,76	0,71	0,69	—	—
	II ^b	0,16	0,48	0,29	0,49	0,56	0,50	0,49	0,61	—	—	0,57	—	0,47	0,41
3:5 (62,5%) IV	I	0,68	0,74	0,67	0,63	0,69	0,69	0,44	0,59	0,53	0,69	0,57	0,71	0,41	0,79
	II ^a	0,74	0,84	0,73	0,79	0,83	0,79	0,70	0,80	0,77	0,80	0,77	0,76	—	—
	II ^b	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:7 (87,5%) V	I	0,87	0,92	0,87	0,86	0,90	0,90	0,68	0,83	0,77	0,90	0,79	0,89	0,60	0,93
	II ^a	0,86	0,93	0,86	0,89	0,91	0,85	0,85	0,87	0,86	0,90	0,85	0,80	—	—
	II ^b	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0:8 (100%) VI	I	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1
	II ^a	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1
	II ^b	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

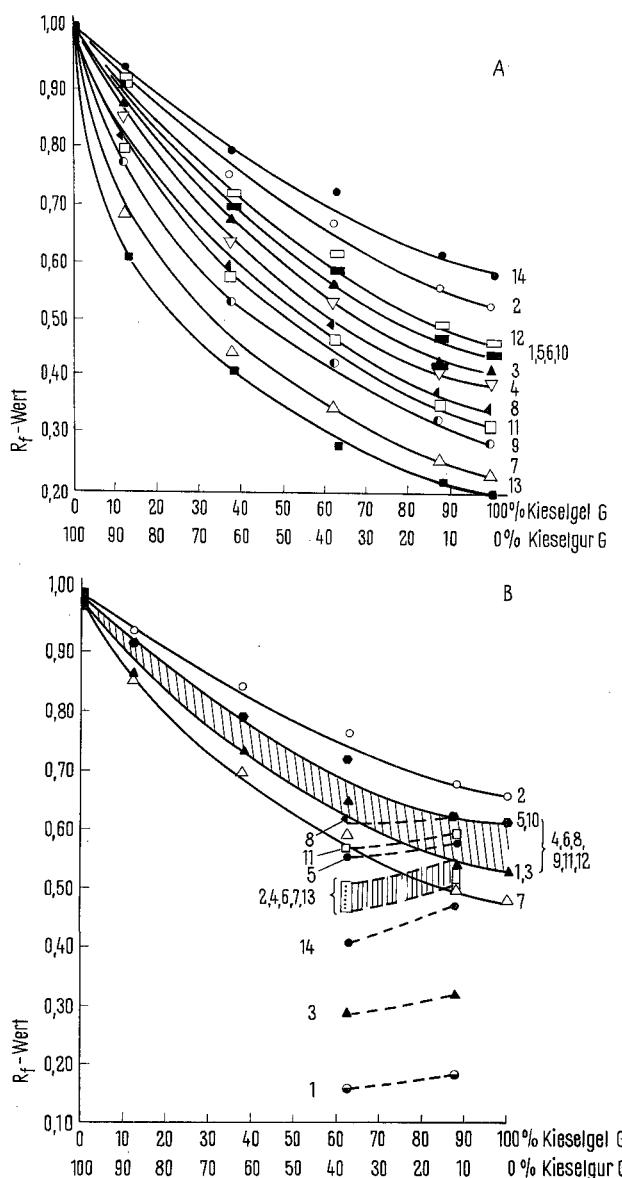
^a zunächst leere Platte im Fließmittelsystem I – Zwischentrocknung – Auftragen der Zucker – dann in derselben Richtung im Fließmittelsystem II entwickelt. ^b Rf-Werte der zweiten Dimension aus der zweidimensionalen Chromatographie des Testgemisches G.

(2) Fließmittelsysteme. (I) iso-Butanol/Eisessig/Wasser 5:4:1¹; (II) *n*-Propanol/Wasser 8,5:1,5³; (III) *n*-Propanol/Dimethylsulfoxid/Wasser 8,6:0,5:0,9.

(3) Trägermaterialien. Folgende, in der Literatur beschriebene Trägermaterialien wurden als Sorptionsmittel zur Dünnschichtchromatographie freier Zucker eingesetzt: Kieselgel G^{1,3,4,6,14}; Kieselgur G^{8,11}; Gemische aus beiden^{5,12}; Aluminiumoxyd⁷; Magnesiumsilikat¹³; Cellulosepulver²; Glasfaserpapiere⁹. Häufig sind die Sorptionsmittel mit Boratpuffer-¹, Phosphatpuffer^{8,9}, Natriumacetat^{5,6}, Borsäure⁶ und Natriumbisulfit-Lösungen³ imprägniert.

Eindimensionale Vorversuche mit den Zucker-Testgemischen A, B, I, K, L, M (siehe 1) zeigten, daß boratpufferimprägnierte Kieselgel G/Kieselgur G-Platten mit den Fließmittelsystemen I, II bzw. III die beste Trennung erbrachten.

Nach MARTIN und SYNGE¹⁵ fällt der Rf-Wert bei Mischträgern im Falle einer reinen Verteilungschromatographie mit steigendem Gehalt an aktiver Komponente in Form einer hyperbolischen Kurve:



$$R_f = \frac{1}{1 + k' \alpha [f_0 (1 - x_a) + F_0 x_a]}$$

f_0 = spezifische Oberfläche der reinen inerten Komponente (hier Kieselgur G) in cm^2/g .

F_0 = spezifische Oberfläche der reinen aktiven Komponente (hier Kieselgel G) in cm^2/g .

x_a = Verhältnis der Gewichtsmenge der aktiven Komponente zur Gesamtmenge.

α = Nernstscher Verteilungskoeffizient c_s/c_m (c_s = Substanzkonzentration in der stationären, c_m = Substanzkonzentration in der mobilen Phase), kann als konstant angenommen werden (bei konstanter Temperatur)

k' = Proportionalitätsfaktor (Erklärung s. 15).

Wie Figur 1A bzw. Tabelle II zeigen, nehmen entsprechend dieser Gleichung die Rf-Werte aller untersuchten Zucker im Fließmittelsystem I mit steigendem Gehalt des Trägergemisches an Kieselgel G hyperbolisch ab. Wird das

¹¹ E. STAHL und U. KALTENBACH, J. Chromat. 12, 415 (1963).

¹² L. WASSERMANN und H. HANUS, Naturwissenschaften 50, 351 (1963).

¹³ H. GRASSHOF, J. Chromat. 14, 513 (1964).

¹⁴ E. RAGAZZI und G. VERONESE, Farmaco, Ed. prat. 18, 152 (1963).

¹⁵ A. J. P. MARTIN und R. L. M. SYNGE, Biochem. J. 35, 91, 1358 (1941).

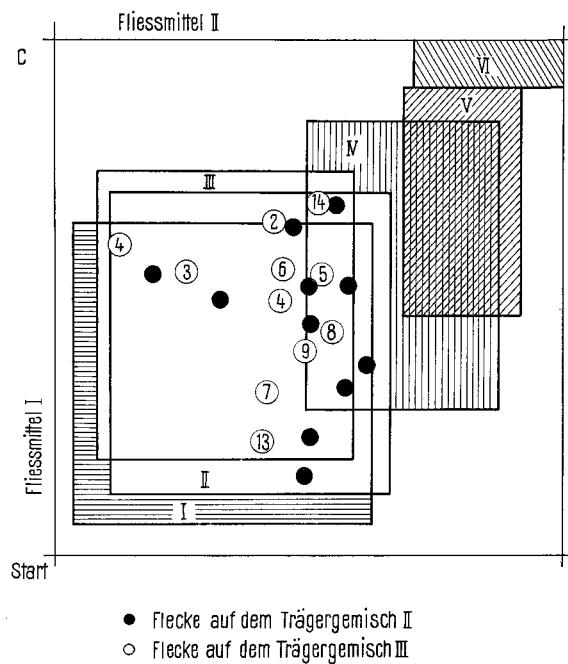


Fig. 1. (A) Abhängigkeit des Rf-Wertes der Zucker 1-14 (s.1) von der Schichtzusammensetzung bei Entwicklung mit Fließmittel I, (B) Abhängigkeit des Rf-Wertes der Zucker 1-12 (s.1) von der Schichtzusammensetzung bei Entwicklung mit Fließmittel II nach vorhergehender Entwicklung der leeren Platte in gleicher Richtung mit Fließmittel I und Zwischentrocknung (ausgezogen). Abhängigkeit des Rf-Wertes der Zucker 1-8, 11, 13 und 14 (s.1.) von der Schichtzusammensetzung bei Entwicklung mit Fließmittel II in der zweiten Dimension nach oben beschriebener Vorbehandlung (gestrichelt). (C) Abhängigkeit der Lage der Flecke des Testgemisches G vom Mengenverhältnis Kieselgel G/Kieselgur G im Trägermaterial (s. Tabelle II).

Trägermaterial zunächst durch Entwicklung im Fließmittelsystem I getränkt, reproduzierbar zwischentrocknet (s. 4), dann die Zucker aufgetragen und in derselben Richtung im Fließmittelsystem II entwickelt, so verhalten sich die Rf-Werte mit steigendem Kieselgel G-Gehalt ebenso (Figur 1B, ausgezogene Kurven, und Tabelle II). Nach diesen graphischen Darstellungen reichen die Unterschiede der Rf-Werte bei Trägergemischen bis zu 60% Kieselgur G-Gehalt aus, um in eindimensionaler Chromatographie im Fließmittelsystem I das Zuckergemisch A und im Fließmittelsystem II unter erwähnter Vorbehandlung das Gemisch B eindeutig zu trennen. Jedoch sind die Zucker-Kombination C im Fließmittelsystem I und die Zuckerkombinationen D, E und F im Fließmittelsystem II bei dieser eindimensionalen Chromatographie wegen der geringen Unterschiede der Rf-Werte kritische Gemische (Figur 1A und B, Tabelle II, Figur 3A und B).

Zuckergemische, die im eindimensionalen Dünnschichtchromatogramm sowohl mit Fließmittelsystem I als auch mit Fließmittelsystem II die gleichen kritischen Zuckerraupen ergeben, lassen sich auf boratpufferimprägnierten Kieselgel G/Kieselgur G-Platten dann gut auftrennen, wenn in der ersten Dimension mit dem Fließmittelsystem I und nach erfolgter Zwischentrocknung (siehe 4) in der zweiten Dimension mit dem Fließmittelsystem II bzw. III entwickelt wird (so zum Beispiel die Auftrennung der kritischen Zuckergemische P bzw. R, Figur 2C, D E).

Wir fanden, daß sich Kieselgel G/Kieselgur G-Trägerschichten mit 12–38% Kieselgur G-Gehalt zur zweidimensionalen Trennung von Zuckergemischen besonders gut eignen und benutzten daher Platten aus Kieselgel G und Kieselgur G im Gewichtsverhältnis 5:3 bzw. 7:1 (Figur 1A, B und C). Dadurch rückt das Fleckenfeld etwas mehr zur Mitte der Platte. Die spezifische Kieselgur G-Oberfläche ist sehr klein. Daher kann es bei höherem Kieselgur G-Anteil schnell zur Überladung und damit zum un-

erwünschten Ausbreiten und ineinanderlaufen der Flecke kommen, wodurch ihre eindeutige Unterscheidung verhindert wird. Diese Erscheinung trat besonders leicht bei Fructose und Sorbose auf.

(4) *Beschichtung, Aktivierung und Zwischentrocknung.* 40 g Sorptionsmittel wurden im Erlenmeyerkolben 30 sec mit 90 ml 0,02 M Boratpufferlösung (pH 8,0; 100 ml wässrige 0,02 M Borsäure und 3,0 ml 0,02 M Dinatrium-tetraborat-Lösung) geschüttelt und die Suspension mit dem Desaga-Streichgerät (Schlitzbreite 0,25 mm) auf Glasplatten (20 · 20 cm) gestrichen. Die beschichteten Platten wurden 45 min unter Raumbedingungen gelagert, anschließend 30 min bei 110°C aktiviert, über CaCl_2 aufbewahrt und kurz vor der Benutzung nochmals 30 min bei 110°C aktiviert. Eine durchgehende Aktivierung von 60 min bei 110°C ergab denselben Effekt.

Tabelle II. Lage der Flecken des Testgemisches G bei zweidimensionaler Chromatographie auf unterschiedlichen Trägergemischen begrenzt durch die Rf-Werte (s. auch Figur 1C)

Kieselgel G/ Kieselgur G (% -Gehalt an Kieselgur G) Nr.	1. Dimension	A-Rf-Wert	2. Dimension	A-Rf-Wert
8:0 (0,0) I	0,07 → 0,65	0,58	0,04 → 0,63	0,59
7:1 (12,5) II	0,12 → 0,72	0,60	0,11 → 0,67	0,56
5:3 (37,5) III	0,19 → 0,75	0,56	0,09 → 0,60	0,51
3:5 (62,5) IV	0,29 → 0,85	0,56	0,50 → 0,88	0,38
1:7 (87,5) V	0,47 → 0,91	0,44	0,69 → 0,93	0,24
0:8 (100) VI	0,91 → 1,0	0,09	0,74 → 1,0	0,26

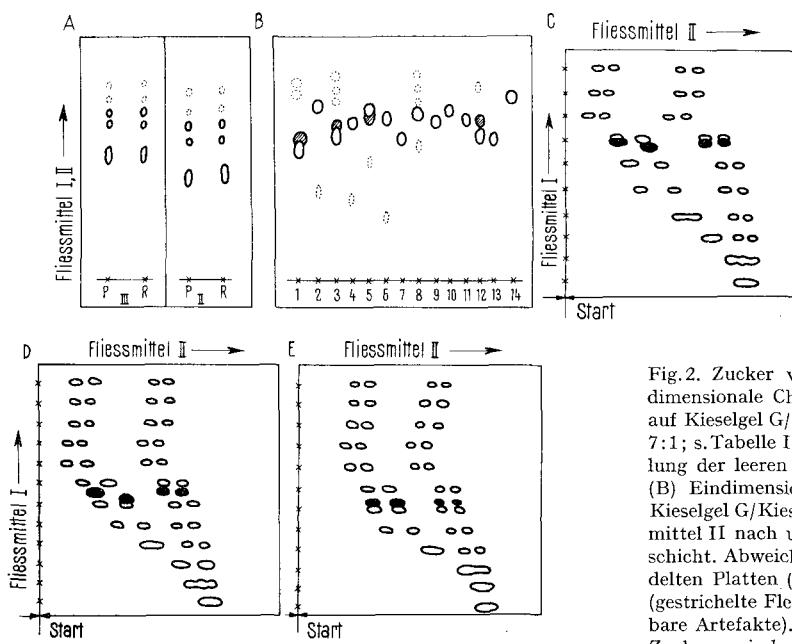


Fig. 2. Zucker vor der Zwischentrocknung aufgetragen. (A) Eindimensionale Chromatographie der Zuckergemische P und R (s. 1) auf Kieselgel G/Kieselgur G-Platten (Trägergemisch III = 5:3; II = 7:1; s. Tabelle II) mit Fließmittel II nach vorhergehender Entwicklung der leeren Platten mit Fließmittel I und Zwischentrocknung. (B) Eindimensionale Chromatographie der Zucker 1–14 (s. 1) auf Kieselgel G/Kieselgur G-Platte (Trägergemisch II = 7:1) mit Fließmittel II nach unter (A) beschriebener Vorbehandlung der Trägerschicht. Abweichungen von der Lage der Flecke auf nicht vorbehandelten Platten (schräffiert Flecke) bei den Zuckern 1, 3, 5 und 12 (gestrichelte Flecke auf Chromatogrammen A und B: schwach sichtbare Artefakte). (C) und (D) Eindimensionale Chromatographie des Zuckergemisches P auf Kieselgel G/Kieselgur G-Platten (C) Trägergemisch III = 5:3; (D) II = 7:1; s. Tabelle II mit Fließmittel II in der zweiten Dimension nach unter (A) beschriebener Vorbehandlung der Trägerschicht. Eingezeichnet wurde zusätzlich das zweidimensionale Chromatogramm des Zuckergemisches P (ausgefüllte Flecke). (E) Eindimensionale Chromatographie des Zuckergemisches R auf Kieselgel G/Kieselgur G-Platten (Trägergemisch II = 7:1; s. Tabelle II) mit Fließmittel II in der zweiten Dimension nach unter (A) beschriebener Vorbehandlung der Trägerschicht. Eingezeichnet wurde zusätzlich das zweidimensionale Chromatogramm des Zuckergemisches R (ausgefüllte Flecke).

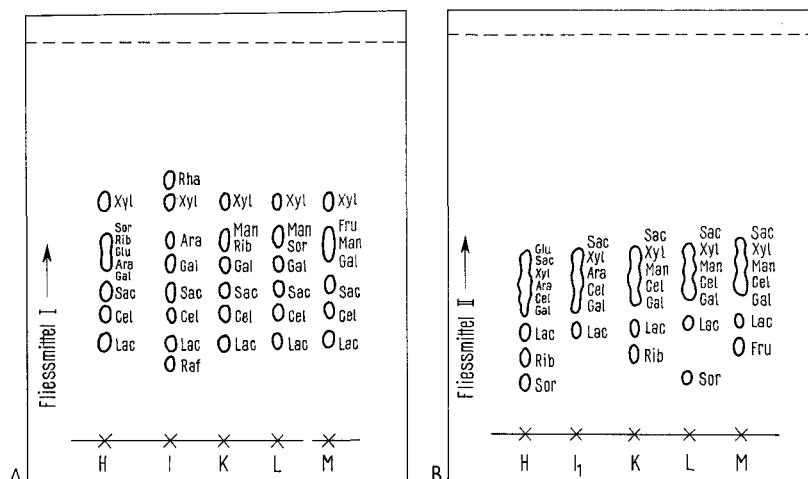


Fig. 3. (A) Eindimensionale Chromatographie der Zuckergemische H, I, K, L und M (s.1) auf Kieselgel G/Kieselgur G-Platten (Trägergemisch II = 7:1; s. Tabelle II) mit Fließmittel I. (B) Eindimensionale Chromatographie der Zuckergemische H, I₁ (= I außer Rha und Raf), K, L und M auf Kieselgel G/Kieselgur G-Platten (Trägergemisch II = 7:1; s. Tabelle II) mit Fließmittel II.

Nach der Entwicklung der Chromatogramme in der ersten Dimension mit dem Fließmittelsystem I wurde die folgende Zwischentrocknung eingeschoben: 1 h Vortrocknung bei 55°C im Umlufttrockenschrank (Typ FTV 340 Heraeus), anschließend 2 h Trocknung bei 55°C über Natriumhydroxid und Calciumchlorid im Vakuumtrockenschrank (0,15 Torr). Die Platten konnten sofort oder nach Lagerung über den erwähnten Trockenmitteln mit gutem Erfolg mit dem Fließmittelsystem II bzw. III in der zweiten Dimension entwickelt werden.

Ergebnisse und Diskussion. Durch die Zwischentrocknung wird die Trägerschicht polyzonal aktiviert. Das trockene Sorptionsmittel kommt während des Trennungsprozesses in der ersten Dimension mit dem Dreikomponenten-Fließmittel I in Berührung; es besteht also anfangs kein Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase; deshalb erleiden diese Systeme beim Eindringen in die Schicht eine teilweise Entmischung. Diese chromatographische Fließmittelauf trennung ist in der Papier- und Dünnschichtchromatographie bekannt¹⁶, und ein entsprechender Vorgang wird bei der Frontanalyse nach TISELIUS¹⁷ ausgenutzt; sie bedingt einerseits in Richtung der ersten Dimension eine polyzonale Desaktivierung und ermöglicht andererseits während der Zwischentrocknung eine parallel laufende abgestufte Aktivierung der Sorptionsschicht. Die Figuren 2A bis E veranschaulichen diese Erscheinung und lassen drei unterschiedliche Aktivitätsbereiche der Trägerschicht erkennen. Da ein Zusammenhang zwischen dem Elutionsvermögen eines Lösungsmittels, das heißt seiner Affinität zum Sorptionsmittel, und seiner Dielektrizitätskonstanten ϵ besteht¹⁸⁻²⁰, werden bei der Einstellung des jeweiligen lokalen Gleichgewichts zwischen stationärer und mobiler Phase die polaren Komponenten bevorzugt vom Trägermaterial abgefangen. Nach der Stellung der Komponenten des Fließmittelsystems I in der eluotropen Reihe muß Wasser (DK = 81,1; 18°C, $\lambda > 10^4$ cm)²¹ bevorzugt in einer an den Eintauchspiegel grenzenden Zone adsorbiert werden, iso-Butanol (DK = 28,2; 0°C, $\lambda > 10^4$ cm)²¹ und Eisessig (DK = 6,29; 0°C, $\lambda > 10^4$ cm)²¹ sollten sich dagegen zwischen dieser Zone und der Fließmittelfront anreichern. Jedoch werden die Adsorptionsvorgänge zusätzlich durch pK -Wert, Dipolmoment, Molekularstruktur des Lösungsmittels und Aktivität des Sorptionsmittels beeinflußt, so daß ohne weitere Untersuchungen eine genaue Zuordnung nicht getroffen werden kann.

Die thermisch instabilen Zucker bilden unter den Bedingungen der Zwischentrocknung Artefakte (Figur 2A,

B), die an der Startlinie zur zweiten Dimension haften bleiben und somit die Identifizierung der Zucker nicht stören.

Durch eindimensionale Chromatographie im Fließmittelsystem I werden die Zucker des Testgemisches I eindeutig getrennt (Figur 3A). Dagegen erfolgt unter den gleichen Bedingungen eine Auf trennung der Testgemische K, L, M und insbesondere von H nicht mehr (Figur 3A). Noch weniger eignet sich hierfür das Fließmittelsystem II (Figur 3B).

Die beschriebene zweidimensionale Dünnschichtchromatographie ermöglicht auch die Trennung und Identifizierung dieser und noch komplizierteren Zuckergemische, wie zum Beispiel N und O (Figuren 4A-D und 1C). Wie jedoch die R_f -Werte in der Tabelle III zeigen, bleiben beim Testgemisch O (14 Zucker) Fru und Rib, β -Cel und Mal sowie Man und Glu bzw. Man und Ara kritische Zuckerpaare (Figur 4D). Auf Grund ihrer unterschiedlichen R_f -Werte in der zweiten Dimension können Glu und Ara ohne Schwierigkeiten bestimmt werden. In Gegenwart

Tabelle III. R_f -Werte der kritischen Zuckerpaare bei der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie

Zuckerpaare	1. Dimension	2. Dimension
Fructose	0,43	0,34
Ribose	0,49	0,31
β -Cellobiose	0,33	0,57
Maltose	0,36	0,59
Mannose	0,48	0,57
Glucose	0,47	0,61
Mannose	0,48	0,57
Arabinose	0,47	0,53

¹⁶ A. NIEDERWIESER und M. BRENNER, Experientia 21, 50, 105 (1965).

¹⁷ A. TISELIUS, Ark. Kemi Miner. Geol. 14B, 22 (1940).

¹⁸ W. TRAPPE, Biochem. Z. 305, 150 (1940).

¹⁹ H. BROCKMANN, Angew. Chem. 59, Teil A, 199 (1947).

²⁰ E. HULTIN, Acta chem. scand. 19, 584 (1965).

²¹ J. D'ANS und E. LAX, Taschenbuch für Chemiker und Physiker (1943).

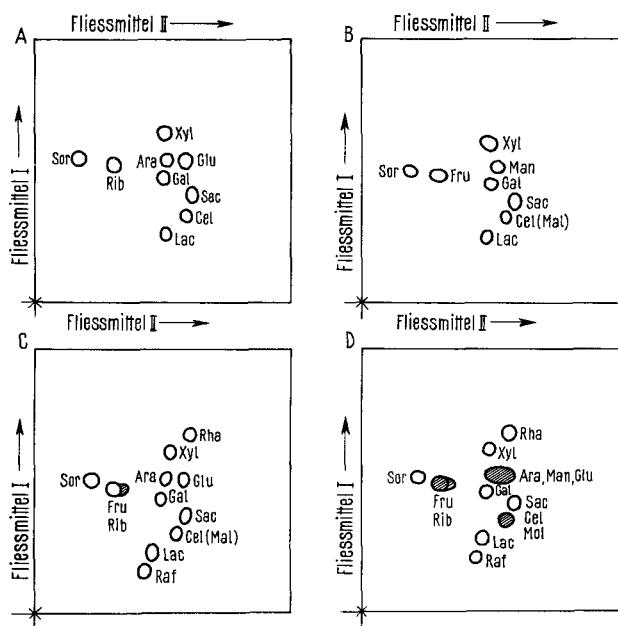


Fig. 4. (A) Zweidimensionale Chromatographie des Zuckergemisches S auf Kieselgel G/Kieselguhr G-Platte (Trägergemisch II = 7:1). (B) Ebenso Zuckergemisch T. (C) Ebenso Zuckergemisch N. (D) Ebenso Zuckergemisch O.

Tabelle IV. Farbreaktionen von Fructose und Ribose bzw. Arabinose, Mannose und Glucose mit verschiedenen Sprühreagencien

Sprühreagens	Zucker	Farbe bei Tageslicht	Literatur
Phenol- H_2SO_4 ^a	Fructose Ribose	blauviolett orange	³
Orcin-Fe-10%ige H_2SO_4 ^b	Fructose Ribose	rotbraun blau	²²
Anilin-Diphenylamin- H_3PO_4 ^c	Fructose Ribose	rotbraun olivgrün	^{22, 23}
Anisidin-Phthalat- Reagens ^d	Arabinose Mannose Glucose	rot braun braun	²⁴

^a Phenol- H_2SO_4 -Reagens³: 3,0 g Phenol und 5,0 ml konzentrierter H_2SO_4 in 95,0 ml Äthanol lösen. Platten bei 60°C 15 min im Umlufttrockenschrank trocknen, dann besprühen und 10–15 min auf 110°C erhitzen. ^b Orcin-Fe-10%ige H_2SO_4 -Reagens²²: Kurz vor der Benutzung zu 10 ml 10%iger H_2SO_4 , die 1% $FeCl_3$ enthält, 1 ml 6%ige äthanolische Orcinlösung zusetzen. (Behandlung der Chromatogramme wie oben; 100°C). ^c Anilin-Diphenylamin- H_3PO_4 -Reagens^{22, 23}: 1,0 g Diphenylamin und 1,0 ml Anilin in 50 ml Aceton lösen, mit 5,0 ml konzentrierter H_3PO_4 versetzen. (Behandlung der Chromatogramme wie oben; 80–100°C). ^d Anisidin-Phthalat-Reagens²⁴: 1,23 g *p*-Anisidin und 1,66 g Phthalsäure in 100 ml 95%igem Äthanol lösen (Behandlung der Chromatogramme wie oben, 100°C).

von Mannose, deren Rf-Wert dazwischen liegt, erscheint ein einziger langgezogener Fleck. In diesem Fall wird das Zuckergemisch isoliert und erneut mit dem Fließmittelsystem Phenol aq. (~90%): Wasser = 10:1,25 (V/V) + 0,02% 8-Hydroxychinolin eindimensional auf Cellulose-Platten (300 MN; Machery, Nagel & Company) aufgetrennt (Rf-Werte: Glucose = 0,35; Mannose = 0,40 und Arabinose = 0,50)². Auf dem ursprünglichen Chromatogramm kann Arabinose durch seine Rotfärbung mit Anisidin-Phthalat-Sprühreagens neben Mannose und Glucose (Braunfärbung) nachgewiesen werden (Tabelle IV). Dagegen ist eine nochmalige Chromatographie des kritischen Paars Fructose-Ribose nicht nötig. Bedingt durch die Abweichung der Rf-Werte besonders in der ersten Dimension sind die Flecke in ihrer Endlage so weit getrennt, daß durch unterschiedliche Farbreaktionen mit Sprühreagencien (Tabelle IV) beide Zucker nebeneinander nachgewiesen werden können.

Die chromatographische Trennung von β -Cel und Mal oder ihre differenzierte Anfärbung durch Sprühreagencien war nicht möglich. Die angegebenen Rf-Werte waren gut reproduzierbar. Jedoch erschwert das Verfahren zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie die Einhaltung konstanter Bedingungen; besonders die Zwischentrocknung muß sorgsam gehandhabt werden.

Erst durch eine standardisierte Methodik, das heißt gleiche Zusammensetzung und Vorbehandlung (Aktivierung) der Trägerschicht, konstante relative Luftfeuchtigkeit, Kammersättigung, konstante Temperatur usw., können genau reproduzierbare Rf-Werte ($\pm 0,01$ Einheiten) erwartet werden²⁵, die dann als Maßzahlen für die einzelnen Saccharide bezeichnet werden könnten.

Summary. Complex sugar mixtures can be separated and identified by twodimensional thin-layer chromatography using borate-impregnated silica gel G/kieselguhr G as carrier material. The separation of the solvent mixture iso-butanol/glacial acetic acid/water (5:4:1) during chromatography in the first dimension and the subsequent intermediate drying cause a polyzonal (graduated in zones) activation of the sorption layer. In this way, the critical sugar mixtures in one-dimensional thin-layer chromatography can be separated in the second dimension using the solvent system propanol/water (8.5:1.5) or *n*-propanol/dimethyl sulphoxide/water (8.6:0.5:0.9).

K. FIGGE

Unilever Forschungslaboratorium Hamburg (Deutschland)
25. Mai 1966.

²² E. BANCHER, H. SCHERZ und K. KAINDL, Mikrochim. Acta 1964, 1043.

²³ J. L. BUCHAU und R. I. SAVAGE, Analyst 77, 401 (1952).

²⁴ R. GRAU und A. SCHWEIGER, Z. Lebensmittelunters. u. Forsch. 119, 210 (1963).

²⁵ M. S. J. DALLAS, J. Chromat. 17, 267 (1965).