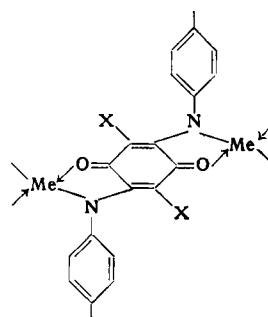
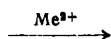
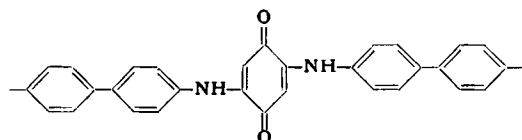


Aromatische Poly-phenylenaminochinone geben im Gegensatz zu aliphatischen Verbindungen scharfe Elektron-Spin-Resonanz-Banden hoher Intensität mit g-Faktoren freier Elektronen ($g = 2,0036$). Neben scharfen Linien treten breite ESR-Banden mit Abständen von 500 bis 600 \AA rstedt zwischen Maxima auf, die 10^{21} bis 10^{23} ungepaarten Elektronen pro Gramm paramagnetischen Stoffes entsprechen. Sehr ähnliche ESR-Spektren wurden an Nucleinsäuren und ihren Komplexen mit Proteinen bereits früher beobachtet.

Die als o-Substituenten in Poly-phenylaminochinonen vorliegenden Carbonyl- und NH-Gruppen machen die Darstellung einer neuen Klasse polymerer Chelate auf der Basis dieser Polymeren möglich.



Die magnetische Suszeptibilität des Kupfer-Komplexes von Poly-phenylenaminochinon ($\chi = 3,7 \cdot 10^{-6}$) verringert sich mit zunehmender Temperatur und magnetischer Feldstärke. Die ESR-Untersuchung dieser Komplexe zeigt weite asymmetrische Banden hoher Intensität mit Absorption im neutralen Feld. Die Aktivierungsenergie der Elek-

tronenleitfähigkeit der Polyaminochinone vom Typ II ($R = -COOH$) ist 0,5 bis 0,6 eV bei $\sigma = 2 \cdot 10^{-3} \text{ Ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Die spezifischen magnetischen und elektrischen Eigenschaften der Poly-phenylenaminochinone (II) kommen offenbar durch die Leichtigkeit der Bildung von Semichinon-Radikalen zustande, die Einbeziehung des einsamen Elektronenpaares am Stickstoff in das allgemeine Konjugationssystem und die Bildung intermolekularer Assoziate über Wasserstoff-Brücken oder Chelatbindungen. Solche Polymere besitzen katalytische Wirksamkeit in

Oxydations- und Reduktionsreaktionen und sind teilweise hochwirksame heterogene Katalysatoren für den Wasserstoffperoxyd-Zerfall.

Eingegangen am 7. April 1961 [A 150]

Übersetzt von Dr. B. Seidel, Pasadena, Calif.

Neue Anwendungsgebiete der Dünnschicht-Chromatographie

Von Prof. Dr. E. STAHL

Institut für Pharmakognosie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Zur analytischen und mikropräparativen Schnelltrennung von Stoffgemischen dient in steigendem Maße die Chromatographie in dünnen, feinkörnigen Schichten. Auf aktiven Schichten läßt sich ähnlich wie bei adsorptionschromatographischen Säulentrennungen arbeiten und auf inaktiven Schichten sind verteilungschromatographische Schnelltrennungen möglich. Einfache Handhabung und Schnelligkeit machen die Dünnschicht-Chromatographie in vielen Laboratorien zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel.

Einleitung

1958 wurde nach Überwindung verfahrenstechnischer Schwierigkeiten die Chromatographie in dünnen Sorptionschichten beschrieben und auf die Bedeutung dieser Methode hingewiesen¹⁾. Mit Hilfe einer mechanischen Vorrichtung werden zunächst annähernd 250 μ dicke, gleichförmige Trennschichten auf Glasscheiben aufgebracht, die dann das eigentliche Chromatographie-Medium darstellen. Nach der Trennung liegen die Komponenten des ursprünglichen Gemisches in der Regel nach ihrer Polarität geordnet im Chromatogramm vor; die Flächengrößen lassen quantitative Schätzungen zu. Inzwischen hat sich diese Dünnschicht-Chromatographie einen festen Platz unter den chromatographischen Trennmethoden erobert. Die experimentellen Möglichkeiten des recht einfachen Verfahrens sind weit größer als ursprünglich angenommen wurde²⁾. Die Methode vermag nicht nur eine Lücke im Bereich der chromatographischen Mikroverfahren zu schließen, sondern sie fand auch auf den klassischen Gebieten der Papierchromatographie Eingang. Mit der Dünnschicht-Chromatographie kann man gegenüber der Papierchromatographie außer

einer erheblichen Zeitersparnis (Trennzeiten 15 bis 60 min) oft eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit um den Faktor 10 bis 100 erreichen.

Bisher brachte jedes Verfahren, das in diesem Maße in den Mikrobereich weiter vordrang, neue Erkenntnisse: Der Übergang von der Verteilungssäule zur Cellulosefaser-Schicht erschloß die Trennmöglichkeit und Sichtbarmachung im Mikrogrammbereich (10–500 μg). Die Verwendung sehr feinkörniger, dünner Sorptionsschichten eröffnet diese Möglichkeiten für den Nanogrammbereich (1 ng = $10^{-3} \mu\text{g}$).

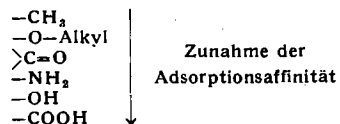
Bei Umsetzungen in den üblichen organischen Lösungsmitteln kann man die zu untersuchende Probe (1 bis 10 mm³) meist direkt auftragen. Bei der Auswahl des Elutionsmittels richtet man sich zunächst nach der elutotropen Reihe, d. h. man beginnt mit nicht polaren Lösungsmitteln und geht dann zu stärker polaren über. Die früher beschriebene Mikrozirkulartechnik führt schnell in den geeigneten Elutionsmittelbereich¹⁾. Bei solchen Versuchen bedient man sich der von Brockmann zusammengestellten Faustregeln, die besagen:

1. Gesättigte Kohlenwasserstoffe werden nicht oder nur gering adsorbiert.

¹⁾ E. Stahl, Chemiker-Ztg. 82, 323 [1958].

²⁾ Vgl. Übersichtsbericht von E. Demole, J. Chromatogr. 7, 24 [1958].

2. Ungesättigte Kohlenwasserstoffe werden um so fester adsorbiert, je mehr Doppelbindungen sie enthalten und je mehr davon in Konjugation stehen.
3. Werden funktionelle Gruppen in einen Kohlenwasserstoff eingeführt, so erhöht sich die Adsorptionsaffinität in der nachstehenden Folge:



Diese und weitere Einflüsse lassen sich in einem Schema zusammenfassen (Abb. 1). Die Dünnschicht-Chromatographie erweitert die experimentellen Möglichkeiten und baut sowohl auf dem Fundament der Adsorptions- als auch der Verteilungschromatographie auf. Es gelten daher auch die auf diesen Gebieten erarbeiteten theoretischen Grundlagen^{2a)}.

Stationäre Phase

Aktivität
(Kieselgel G
Aluminiumoxyd G)

Mobile Phase

Elutrope Reihe

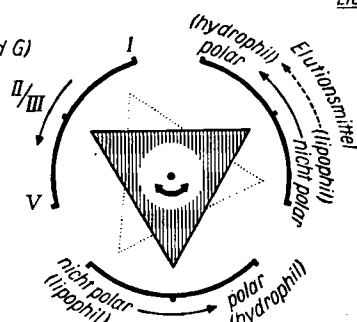


Abb. 1

Zu trennendes Gemisch

Abb. 1. Die drei variablen Hauptgrößen bei der Adsorptionschromatographie. (Die römischen Ziffern sind Hinweise auf die Brockmannschen Aktivitätsstufen.) Das schraffierte Dreieck denke man sich im Schwerpunkt drehbar. Ist eine Größe vorgegeben, so stelle man eine Dreiecksspitze hierauf ein und verlege dann den Drehpunkt an diese Spitze. Die beiden anderen zeigen die anwendbaren Möglichkeiten. Sind zwei Größen vorgegeben und die zwei Dreiecksspitzen darauf eingestellt, so zeigt die noch freie den zu wählenden Bereich.

^{2a)} M. Brenner u. G. Pataki, Helv. chim. Acta 44, 1420 [1961].

Typisch für die Möglichkeiten der neuen Methode ist, daß man nicht an eine bestimmte Sorptionsschicht, z. B. Cellulose, gebunden ist, sondern sich in kurzer Zeit die verschiedenartigsten anorganischen oder organischen Trennschichten herstellen und sie erproben kann. Zur Sichtbarmachung farbloser und auch nicht fluoreszierender Verbindungen kann man auf anorganische Trennschichten konzentrierte Säuren aufsprühen und anschließend bis zur Verkohlung erhitzen.

Neue Anwendungsmöglichkeiten

A. Alkaloide

Die Möglichkeit der Schnelltrennung sehr kleiner Mengen von Alkaloidgemischen ist in der Toxikologie und Arzneimittelanalyse von besonderem Wert. Man kann verschiedene Sorptionsschichten und Elutionsmittel verwenden³⁻¹¹⁾. Eine Adsorptionschromatographie auf Kieselgel G-Schichten mit Chloroform, dem 5–20% eines stärker polaren Lösungsmittels zugesetzt sind, erscheint am vorteilhaftesten^{11a)}. Zur Trennung der stärker basischen Alkaloide fügt man dem Elutionsgemisch eine Base, z. B. Diäthylamin, zu oder benützt alkalisierte Trennschichten. Letztere lassen sich einfach bereiten, indem man bei der Herstellung der Streichmasse statt Wasser z. B. n/2 Kalilauge verwendet³⁾.

Die Tabelle 1 greift die Opiumalkaloide und einige ihrer Derivate heraus⁴⁻⁶⁾. Man sieht, daß sich auf dem Wege der Adsorptionschromatographie (s. Spalte 2) bei Auswahl der

³⁾ E. Stahl, Arch. Pharmaz. u. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 292/64, 411 [1959]. u. Pharmaz. Rundschau 7, Nr. 2, 1 [1959].

⁴⁾ K. Teichert, E. Mutschler u. H. Rochelmeyer, Dtsch. Apotheker-Ztg. 100, 283 u. 477 [1960].

⁵⁾ G. Machata, Mikrophimica Acta 47, 79 [1960].

⁶⁾ D. Waidi, K. Schnackerz u. F. Munter, J. Chromatogr. 6, 61 [1961].

⁷⁾ F. Schlemmer u. E. Link, Pharmaz. Z. 104, 1349 [1959].

⁸⁾ A. Hofmann u. H. Tschertter, Experientia 46, 414 [1960].

⁹⁾ M. Klavehn, H. Rochelmeyer u. J. Seyfried, Dtsch. Apotheker-Ztg. 101, 75 [1961].

¹⁰⁾ M. Pailer u. W. G. Kump, Arch. Pharmaz./Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 293/65, 646 [1960].

¹¹⁾ K. H. Müller u. H. Honerlagen, ebenda 293/65, Mitt. 202 [1960].

^{11a)} Hersteller von Kieselgel G, Aluminiumoxyd G und Kieselgur G: E. Merck AG., Darmstadt.

Morphin und Derivate	Kieselgel G normal; I	Kieselgel G alkalis.; II	Cellulose- Pulver; III	Cellulose- Pulv. form- amidlmpr.; IV	Kieselgel G normal; V	Kieselgel G normal; VI
Morphin	0,02	0,02	0,27	0,00	0,24	0,10
Dihydromorphinon (= Dilaudid®)	0,05	0,13	0,27	0,06	0,14	0,24
Dihydrocodein (= Paracodin®)	0,06	0,22	0,34	—	—	0,38
Dihydrocodeinon (= Diconid®)	0,10	0,28	0,34	0,57	—	0,51
Codein (= Morphinmethylläther)	0,12	0,33	0,41	0,37	0,26	0,38
Morphinäthylläther (= Dlonin®)	0,14	0,37	0,44	0,57	—	—
Acetyl-dihydrocodeinon (= Acedicon®)	0,24	0,59	—	0,90	—	—
Dihydro-hydroxy-codeinon (= Eucodal®)	0,47	0,70	0,79	0,75	—	—
Papaverin	0,74	0,78	0,86	0,89	0,74	0,67
Narcotin	0,78	0,81	0,92	0,94	0,69	0,72

Tabelle 1. Einfluß von Trennschichten und Elutionssystemen auf die R_F-Werte

Elutionsgemisch I: Chloroform-Äthanol (9:1)⁴⁾

II: Chloroform-Äthanol (9:2)⁴⁾

III: Dimethylformamid-Diäthylamin-Äthanol-
Essigester (5:2:20:75)⁴⁾

IV: Benzol-Heptan-Chloroform-Diäthylamin
(6:5:1:0,02)⁴⁾

V: Methanol⁵⁾

VI: Chloroform-Aceton-Diäthylamin (5:4:1)
neben 7 weiteren Gemischen⁶⁾.

optimalen Bedingungen auch feinere Strukturunterschiede erkennen lassen (z.B. zwischen Codein und Dihydrocodein oder Methyl- und Äthyläther des Morphins). Neben dem bevorzugt verwendeten Kieselgel G kann man das an sich schon basische Aluminiumoxyd G verwenden. Auf dünnen Cellulosepulver-Schichten (Spalte 3 und 4) läßt sich eine bessere verteilungschromatographische Trennung erreichen als auf dem Papier⁴⁾. Es wurden auch die Trennmöglichkeiten für die Gruppe der Belladonna-, Lobelia-, Chelidonium- und der wasserdampfvlüchtigen Alkaloide untersucht⁴⁾. Häufig angewandt wurde die Dünnschicht-Chromatographie zur Trennung der Indolalkaloide^{3, 4, 6-8)}. Sowohl für die in diese Gruppe gehörenden Rauwolfia-Alkaloide⁷⁾ als auch für die Secale-Alkaloide⁹⁾ wurde die quantitative Auswertung der Chromatogramme beschrieben. Pailer und Kump¹⁰⁾ verwendeten bei ihren Untersuchungen über die basischen Inhaltsstoffe von *Achillea*-Arten die Dünnschicht-Chromatographie und konnten hiermit die auf Papier recht schwierige Trennung Betonicin-Glykokollbetain schon nach 3 cm Laufstrecke erreichen. Die Methode diente ferner bei der Analyse von Chinارين¹¹⁾.

Einen richtungsweisenden Beitrag zur systematischen Analyse unbekannter Alkaloidgemische lieferten Waldi und Mitarbeiter⁶⁾. Sie untersuchten in acht Lösungsmittelsystemen die Trennmöglichkeiten von über 50 Alkaloiden auf Kieselgel G-Schichten. Die Alkaloide wurden zunächst nach dem Rf-Wert in zwei Gruppen unterteilt. Dann wurde in weiteren Chromatogrammen mit anderen Lösungsmittelsystemen aufgeschlüsselt. Nach den erhaltenen Rf-Werten und Farbreaktionen ist die Identifizierung eines oder mehrerer Alkaloide möglich.

B. Aminosäuren, Peptide und Amine

Mottier zeigte 1958, daß sich Aminosäure-Gemische auch auf dünnen Schichten von Aluminiumoxyd auftrennen lassen¹²⁾. Er trug das üblicherweise für die Säulenchromatographie verwendete Brockmannsche Aluminiumoxyd lose auf Glasscheiben auf. Diese Technik läßt nur eine horizontale Anordnung zu, und es ergeben sich beim Aufsprühen der Reagentien und bei der Dokumentation gewisse Schwierigkeiten. Außerdem beträgt die Trenndauer 6 bis 8 Stunden. 1959 berichteten Nürnberg¹³⁾ u. a. ¹⁴⁾, daß man die wesentlich besser zu handhabenden festen Kieselgel G-Schichten mit bestem Erfolg zur zweidimensionalen Trennung von Aminosäure-Gemischen verwenden kann. Nürnberg verwendete für die erste Laufrichtung n-Propanol-Wasser 1:1 und für die zweite Phenol-Wasser 10:4 und trennte so die nicht entionisierten Hydrolysate von Gelatine und von Leberextrakten.

Brenner und Niederwieser¹⁵⁾ verglichen die Trennmöglichkeiten von 26 Aminosäuren in sechs Lösungsmittelsystemen auf dem Papierchromatogramm und in der Dünnschicht (s. Abb. 2)¹⁵⁾. Die Dünnschicht-Chromatographie erwies sich in Bezug auf den Trennerfolg als ebenbürtig

oder sogar überlegen. Zugunsten der Dünnschicht-Chromatographie werden die Steigerung der Nachweisempfindlichkeit etwa um den Faktor 10 und die erhebliche Zeitersparnis angeführt. Die Trenndauer für ein zweidimensionales

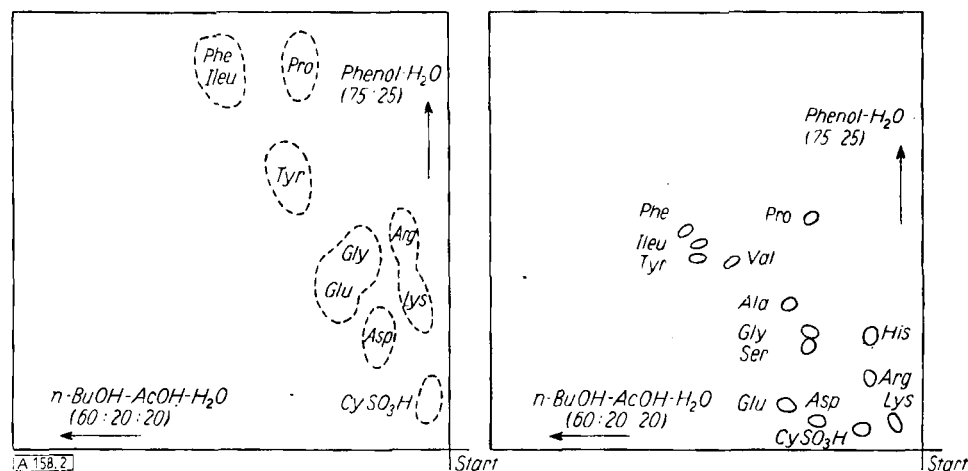


Abb. 2. Vergleich eines unter gleichen Bedingungen hergestellten Papier- und Dünnschicht-Chromatogramms von Aminosäuren. Links 10 Aminosäuren auf Whatman Nr. 1-Papier, rechts 14 Aminosäuren auf einer Kieselgel G-Schicht¹⁵⁾

Aminosäure-Chromatogramm kann von 2 bis 3 Tagen auf 4 bis 5 Stunden reduziert werden.

Cherbuliez und Mitarbeiter¹⁶⁾ verwenden die Dünnschicht-Chromatographie bei der Strukturaufklärung von Peptiden^{16a)}. Sie trennen die Phenyl-thiohydantoine auf Kieselgelschichten mit einem Gemisch von Heptan-Pyridin-Äthylacetat (5:3:2 Vol.) und weisen darauf hin, daß diese Methode zehn- bis zwanzigmal empfindlicher ist als das klassische Verfahren auf Papier. Kurz wurde die Verwendung der Dünnschicht-Chromatographie im Rahmen der Polymyxin-Synthese erwähnt¹⁷⁾. Kontrolliert wurden mit ihr der Verlauf der Synthese und die Reinigung von reaktionsfähigen Aminosäureestern¹⁸⁾.

Die Trennung von 12 Aminen und den 3,5-Dinitrobenzamidinen ist sowohl mit sauren als auch mit basischen Lösungsmittelgemischen auf den üblichen Kieselgelschichten möglich⁴⁾.

C. Arzneimittel

An zwei Kombinationspräparaten mit vier und sechs Wirkstoffen wurden die sich auf Kieselgel G-Schichten bietenden Möglichkeiten zur Identifizierung und zur Stabilitätsprüfung von Arzneimittelgemischen zunächst von Nürnberg demonstriert¹³⁾. Die Arbeiten von Gänshirt und Mitarbeitern^{19, 20)} erweitern diese Befunde und zeigen, daß sich auch bislang nicht mögliche Trennungen mit geeigneten Elutionssystemen erreichen lassen. Von besonderem Interesse sind die quantitativen Auswertungen der Analysen. Die Dünnschicht-Chromatographie wird vor allem in denjenigen Laboratorien, die schon früher chromatographische Kontrollmethoden verwendet haben, geschätzt und ein reiches Erfahrungsmaterial auf diesem Gebiet liegt bereits vor.

¹⁶⁾ E. Cherbuliez, B. Baehler u. J. Rabinowitz, *Helv. chim. Acta* 43, 1871 [1960].

^{16a)} Während der Drucklegung erschien eine beachtenswerte Arbeit von M. Brenner, A. Niederwieser u. G. Pataki, *Experientia* [Basel] 17, 145 [1961], über die zweidimensionale Trennung zahlreicher DNP- und PTN-Aminosäuren auf Kieselgel G-Schichten.

¹⁷⁾ K. Vogler, R. O. Studer, W. Legier u. P. Lanz, ebenda 43, 1751 [1960].

¹⁸⁾ H. G. Zachau u. W. Karau, *Chem. Ber.* 93, 1830 [1960].

¹⁹⁾ H. Gänshirt u. A. Malzacher, *Arch. Pharmaz. u. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.* 293/65, 925 [1960].

²⁰⁾ H. Gänshirt u. M. Morianz, ebenda 293/65, 1065 [1960].

¹²⁾ M. Mottier, *Mittl. Lebensmittelunters. u. Hygiene* [Bern] 49, 454 [1958].

¹³⁾ E. Nürnberg, *Arch. Pharmaz. u. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.* 292/64, 610 [1959].

¹⁴⁾ E. Mutschler u. H. Rochelmeyer, ebenda 292/64, 449 [1959].

¹⁵⁾ M. Brenner u. A. Niederwieser, *Experientia* 16, 378 [1960].

Liebich versuchte den Belangen eines Apothekenlaboratoriums Rechnung zu tragen und benutzte die Methode zur Identitätsprüfung und zur qualitativen Analyse einfach zusammengesetzter Schmerztabletten²¹⁾. Völksen beschreibt u. a. die schnelle Überführung eines Betäubungsmittelsüchtigen; die entwendeten Suchtmittel wurden dünnschichtchromatographisch im Urin nachgewiesen²²⁾.

Fischer und Lautner²³⁾ haben neben einer papierchromatographischen Schnellmethode erstmals die Dünnschicht-Chromatographie von Penicillin-Präparaten beschrieben. Bereits mit den Lösungsmittelgemischen Aceton-Methanol 5:5 und Isopropanol-Methanol 3:7 gelingt die Trennung von 10 Penicillinen beziehungsweise ihren medizinisch verwendeten Derivaten. Keine Schwierigkeiten sollten auch die Trennungen der Antibiotica aus der Familie der *Streptomyceten* bereiten.

D. Fette, Öle, Wachse

Durch Arbeiten von Mangold wurde die Dünnschicht-Chromatographie (= *Thin-layer chromatography* = TLC) in USA vor allem auf dem Lipidgebiet bekannt. Er wendete die Methode zunächst²⁴⁾ analog einer säulenchromatographischen Gruppentrennung von Blutlipiden²⁵⁾ an und benutzte hierbei die Kieselgel G-Schichten und Gemische von Petroläther-Diäthyläther mit und ohne Zusatz von 1% Essigsäure. Für weniger polare Lipid-Gemische wurde das Mischungsverhältnis 90:10 (Petroläther-Diäthyläther) und für stärker polare 30:70 vorgeschlagen und die Mikro-Fraktionierung von Fetten, Ölen und Wachsen beschrieben²⁶⁾. Bei der Schnellauftrennung in Polaritätsgruppen beobachtet Mangold eine gewisse „Subfraktionierung“ innerhalb der Gruppen. Um eine praktische brauchbare Auftrennung zu erreichen, imprägniert er die Kieselgel G-Schicht mit Siliconöl in Analogie zur „reversed-phase“-Technik der Papierchromatographie²⁷⁾. Das gelingt einfach durch Eintauchen der trockenen Schicht z. B. in eine 5-proz. Siliconöl-Lösung und anschließendes Abdampfen des Petroläthers. Auf diesen permanent hydrophobierten Schichten gelang es, mit der mobilen Phase Acetonitril-Eisessig-Wasser (70 + 10 + 25 Vol.-Teile) u. a. Fettsäure-methylester zu trennen. Die Kombination mit der Gasphasenchromatographie bietet Vorteile. Diesen Untersuchungen folgend, haben andere Autoren die Methode bei der Isolierung vicinal-ungesättigter Hydroxyfettsäuren²⁸⁾, zur Analyse von Acetoglycerid-Gemischen²⁹⁾ und zur Verfolgung der Synthese mehrfach ungesättigter Fetaldehyde³⁰⁾ sowie zur Schnell-

analyse von „Fecaliths“ (Faecoide Ablagerungen im Blinddarm) und Faeces-Lipiden verwendet³¹⁾. Über die genannten Arbeiten liegt ein Übersichtsbericht in spanischer Sprache vor³²⁾. Eine Reihe weiterer diesbezüglicher Mitteilungen ist erschienen oder im Druck³³⁻³⁶⁾. Unter den gleichen Gesichtspunkten hat man die Dünnschicht-Chromatographie im Deutschen Fettforschungsinstitut eingehend geprüft. So wurde von Seher über die Brauchbarkeit der Methode zur Schnellanalyse von Antioxidantien in Speisefetten berichtet und gezeigt, daß auf Kieselgel G-Schichten bei Anwendung der zweidimensionalen Technik (1. Chloroform, 2. Benzol) die Identifizierung der 12 wichtigsten Antioxidantien gelingt³⁷⁾. 1960 teilten Kauffmann und Makus ihre Erfahrungen bei der Trennung von zahlreichen Modellgemischen mit³⁸⁾. Zur Gruppentrennung verwenden sie die gewöhnlichen Kieselgel G-Schichten und zur weiteren Auftrennung die imprägnierten Schichten. Sie bevorzugen möglichst einheitliche Fließmittel (s. Tabelle 2) und im Hinblick auf die Sichtbarmachung eine temporäre Imprägnierung mit Undecan.

A. Normale Kieselgel G-Schichten zur Auftrennung in Polaritätsgruppen³⁸⁾

Trennung in	Fließmittel	Laufzeit für 12 cm Trennstrecke
Mono-, Di-, Triglyceride und Fettsäuregruppe	Isopropyläther	25 min
Triglycerid-, Fettsäure-, Epoxy-, Di-epoxy-, Hydroxy- u. Dihydroxy-Fettsäuregruppe	Isopropyläther desgl. + 1,5 % Essigsäure	25 min 40 min
Fettaldehyd-, Fettsäure-, Monoglycerid- und Ketosäuregruppe	Äthyläther	30 min

B. Undecan-imprägnierte Kieselgel G-Schichten³⁸⁾

Fettsäuren	96-proz. Essigsäure Essigsäure-Acetonitril 1:1	4 h 80 min
Epoxy- u. Episulfido-Fettsäuren	80-proz. Essigsäure	4 h
Fettalkohole	Essigsäure + Acetonitril 1:1	80 min
Diglyceride	Chloroform + Methanol + Wasser (5:15:1)	2,5 h
Triglyceride	Aceton + Acetonitril (7:3)	75 min

Tabelle 2. Trennung von Fetten und Ölen

Abb. 3 zeigt die auf einer normalen Schicht ausgeführte adsorptionschromatographische Trennung von 11 Verbindungen.

Das Chromatogramm, welches Abb. 4 wiedergibt, ist die richtungsweisende Kombination der adsorptionschromatographischen Gruppentrennung (Laufrichtung 1) und der verteilungschromatographischen Trennung nach Undecan-Imprägnierung (Laufrichtung 2).

Einen wichtigen Beitrag zur systematischen Analyse der Gehirn-Lipoide, ihrer Um- und Abbauprodukte mittels der Dünnschicht-Chromatographie gab Jatzkewitz^{39, 47 a)}. Es wurden für über 30 Testsubstanzen in 11 Lösungsmittelsystemen die R_f -Werte festgelegt und ein Universalreagens beschrieben³⁹⁾.

²¹⁾ H. Liebich, Dtsch. Apoth.-Ztg. 99, 1246 [1959]; 100, 393 [1960].

²²⁾ W. Völksen, Krankenhaus-Apoth. 11, 5 [1961], Beilage Dtsch. Apotheker-Ztg.

²³⁾ R. Fischer u. H. Lautner, Arch. Pharmaz. u. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 294/66, 1 [1961].

²⁴⁾ H. K. Mangold, Fette u. Seifen 61, 877 [1959].

²⁵⁾ E. Hirsch u. E. H. Ahrens, J. biol. Chemistry 233, 311 [1958], zit. nach²⁴⁾.

²⁶⁾ H. K. Mangold u. D. C. Malins, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 37, 383 [1960].

²⁷⁾ D. C. Malins u. K. H. Mangold, ebenda 37, 576 [1960].

²⁸⁾ L. J. Morris, R. T. Holman u. K. Fontell, ebenda 37, 323 [1960].

²⁹⁾ E. H. Gruger jr., D. C. Malins u. E. J. Gauglitz jr., ebenda 37, 214 [1960].

³⁰⁾ E. J. Gauglitz jr. u. D. C. Malins, ebenda 37, 425 [1960].

³¹⁾ J. A. Williams, A. Sharma, L. J. Morris u. R. T. Holman, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 105, 192 [1960].

³²⁾ E. Vioque, Grasas y Aceites 11, 223 [1960].

³³⁾ D. C. Malins, Chem. and Ind. 1960, 1359.

³⁴⁾ O. S. Privett, M. L. Blank u. W. O. Lundberg, J. Lipid Res. 2, im Druck [1961].

³⁵⁾ O. S. Privett u. M. L. Blank, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 38, im Druck.

³⁶⁾ L. J. Morris, R. T. Holman u. K. Fontell, J. Lipid Res. 2, 68 [1961].

³⁷⁾ A. Seher, Fette u. Seifen 61, 345 [1959].

³⁸⁾ H. P. Kauffmann u. Z. Makus, ebenda 62, 1014 [1960].

³⁹⁾ H. Jatzkewitz u. E. Mehl, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 320 251 [1960].

Alle Arbeiten zeigen, daß die Dünnschicht-Chromatographie auf dem Fettgebiet vor allem im Hinblick auf die einfache Handhabung, die große Zeitersparnis und die gesteigerte Nachweisempfindlichkeit aussichtsreich ist.

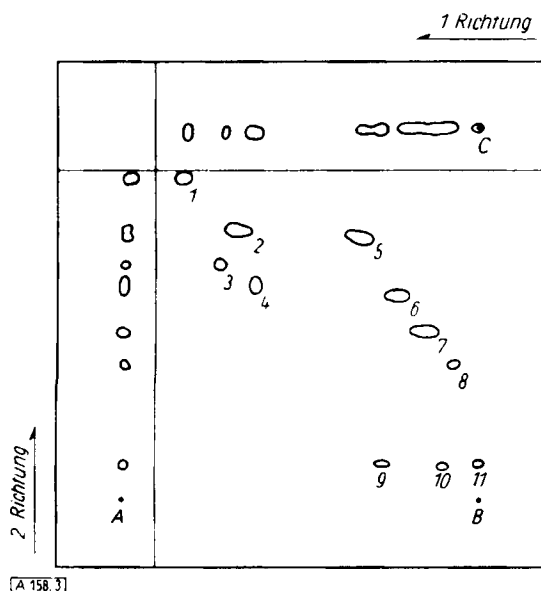


Abb. 3. Zweidimensionale adsorptionschromatographische Trennung auf einer Kieselgel G-Schicht mit folgenden Substanzen: 1. Tristearin, 2. Myristylaldehyd, 3. Distearin, 4. Stearylalkohol, 5. Stearinsäure, 6. 9.10-Epoxy-stearinsäure, 7. 12-Hydroxy-stearinsäure, 8. 9.10.-12.13-Di-epoxystearinsäure, 9. Monostearin, 10. Stearinsäureamid, 11. 9.10-Dihydroxy-stearinsäure; Elutionsmittel: Laufrichtung 1: Äthyläther (30 min), Laufrichtung 2: Isopropyläther + 1,5% Essigsäure (45 min)

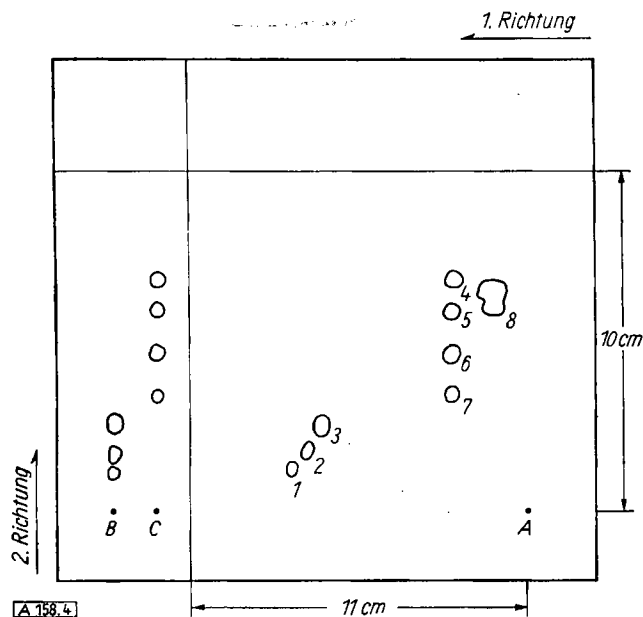


Abb. 4. Zweidimensionales Kombinationsverfahren³⁸⁾. Laufrichtung 1: adsorptionschromatographisch auf Kieselgel G-Schicht mit Dichloräthan. Laufrichtung 2: verteilungschromatographisch auf der imprägnierten Laufstrecke 2 mit Aceton-Acetonitril. 1. Triolein, 2. Trimyristin, 3. Trilaurin, 4. Dilauren, 5. Dimyristin, 6. Dipalmitin, 7. Distearin, 8. Fettsäuren (Abb. 3 und 4 nach Kauffmann und Makus)

E. Glykoside

Bislang wurden kleinere Mengen Herzgiftglykoside auf Formamid- oder Octanol-imprägniertem Papier chromatographiert⁴⁰⁻⁴²⁾. Die Trennzeiten betrugen zwischen 3 und 14 Stunden, die untere Erfassungsgrenze lag bei 2–5 µg.

⁴⁰⁾ O. Schindler u. Th. Reichstein, *Helv. chim. Acta* 39, 108 [1951].
⁴¹⁾ R. Tschesche, G. Grimmer u. F. Seehofer, *Chem. Ber.* 86, 1235 [1953].

⁴²⁾ F. Kaiser, *Chem. Ber.* 88, 556 [1955].

Neuerdings gelang es⁴³⁾, die hier interessierenden Stoffe mit einem Gemisch aus Methylchlorid-Methanol-Formamid (80 + 19 + 1, Vol.-Teile) auf den üblichen Kieselgelschichten in 30 min zu trennen. Mit der Trichloressigsäure-Chloramin-Reaktion⁴²⁾ werden die getrennten Stoffe im ultravioletten Licht noch bis 0,01 µg gut sichtbar. Abb. 5 zeigt ein derartiges Chromatogramm.

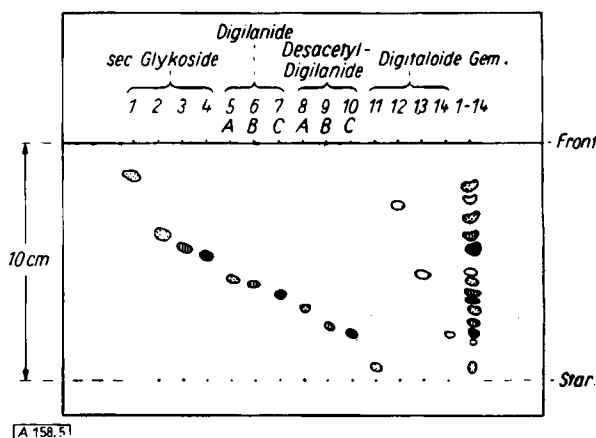


Abb. 5. Dünnschicht-Chromatogramm von Herzglykosiden (je 1 µg) auf einer Kieselgel G-Schicht

1. Acetyldigitoxin, 2. Digitoxin, 3. Gitoxin, 4. Digoxin, 5. Digilanol A, 6. Digilanol B, 7. Digilanol C, 8. Desacetyldigilanol A, 9. Desacetyldigilanol B, 10. Desacetyldigilanol C, 11. k-Strophanthosid, 12. Cymar, 13. Proscillaridin A, 14. Scillaren A.

Gemisch aus gleichen Teilen der Substanzen 1–14, Fluoreszenz nach der Chloramin-Essigsäurereaktion im langwelligeren UV-Licht: offene Flecke = hellgelb, punktierte Flecke = braungelb, gestrichelte Flecke = hellblau, schwarze Flecke = violettblau

Zur Trennung von Lignan und deren Glykosiden⁴³⁾ wurde die zunächst für Carotinoide und Opiumalkaloide verwendete Stufentechnik³⁾ benutzt. Das in der 1. Stufe (6 cm Laufstrecke) verwendete Gemisch (Chloroform + 10% Methanol) trennt die Glykoside. In der 2. Stufe (12 cm Laufstrecke) werden mit Chloroform + 35% Aceton die hauptsächlich in der Harzdroge vorliegenden Aglykone getrennt. Dergestalt wurde eine schnelle Unterscheidung der aus verschiedenen *Podophyllum*-Arten stammenden Harze möglich.

F. Indol-Derivate einfacher Struktur

Eine Spurenanalyse „einfacher“ Indol-Derivate ist einerseits bei Studien zur Biogenese von Indol-Alkaloiden von Wert und verspricht andererseits Fortschritte auf dem Gebiet der pflanzlichen Wuchsstoff-Forschung (Heteroauxin u. ä.) sowie auf dem z. Z. stark bearbeiteten Serotonin-Gebiet. Nach Stahl und Kaldewey ist eine solche Analyse auf Kieselgel-G-Schichten möglich. Sie beschreiben die Trennung, Sichtbarmachung und untere Erfassungsgrenze für 20 Indol-Derivate⁴⁴⁾. Einen Teil der Stoffe trennen sie mit Chloroform + 5% Essigsäure (96%), den anderen mit einem Gemisch aus Methylacetat, Isopropanol und 25-proz. Ammoniak-Lösung (45 + 35 + 20 Vol.-Teile). Die Vorteile beider Systeme vereinigt das zweidimensionale Chromatogramm (Abb. 6).

Mit einer modifizierten *van Urk*-Reaktion liegt die untere Erfassungsgrenze z. B. für Heteroauxin und Tryptophan bei 0,02 µg (Trennstrecke 6 cm) und läßt sich mit der *Prochazkaschen* Fluoreszenzreaktion auf 0,001 µg (= 1 ng) senken. Eine biologische Auswertung (Wuchsstoffwirksamkeit) gelingt ohne Schwierigkeiten durch direktes Übertragen der abgeschabten Kieselgel-Zonen auf Agar.

⁴³⁾ E. Stahl u. U. Kaltenbach, *J. Chromatogr.* 5, 458 [1961].

⁴⁴⁾ E. Stahl u. H. Kaldewey, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 323, 182 [1961].

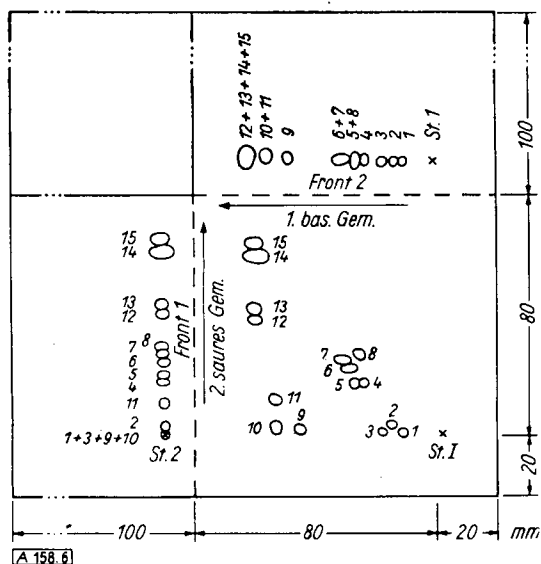


Abb. 6. Zweidimensionales Dünnschicht-Chromatogramm 14 „einfacher“ Indol-Derivate + Anthranilsäure auf Kieselgel G. Das aufgetragene Gemisch enthielt 0,5 µg von jeder Substanz. Aus dem Vergleichschromatogramm über Startpunkt 1 (St. 1) ist der Trennerfolg des basischen Elutionsmittels (Methylacetat-Isopropanol-Ammoniak-Lösung 45 + 35 + 20 Vol. Teile) und über St. 2 derjenige des sauren Elutionsmittels (Chloroform + 5 % Essigsäure) zu erkennen. 1. 5-Hydroxy-tryptophan, 2. [5-Hydroxy-indolyl(3)]-essigsäure, 3. Tryptophan, 4. Indolyl-(3)-essigsäure, 5. β-[Indolyl-(3)]-acrylsäure, 6. β-[Indolyl-(3)]-propionsäure, 7. γ-[Indolyl-(3)]-buttersäure, 8. Anthranilsäure, 9. Serotonin, 10. Tryptamin, 11. Indolyl-(3)-acetamid, 12. 3-Hydroxymethyl-Indol, 13. Indolyl-(3)-acetonitril, 14. Indol, 15. Skatol

G. Insektizide

In einer Arbeit über die Inaktivierung der Pyrethrine⁴⁵⁾ wird die Dünnschicht-Chromatographie dieser Naturstoffe, ihrer Photooxydationsprodukte sowie der Synergisten beschrieben. Sie gelingt auf Kieselgel G-Schichten mit chloroform-isoeleotropen Gemischen wie z. B. Hexan + 25 % Essigsäureäthylester, Benzol + 10 % Methyläthylketon usw. Von allgemeinerem Interesse scheint die in dieser Arbeit angewandte „TRT-Technik“ (Trennung-Reaktion-Trennung) zu sein. Hiermit ist eine schnelle Erkennung von Ver-

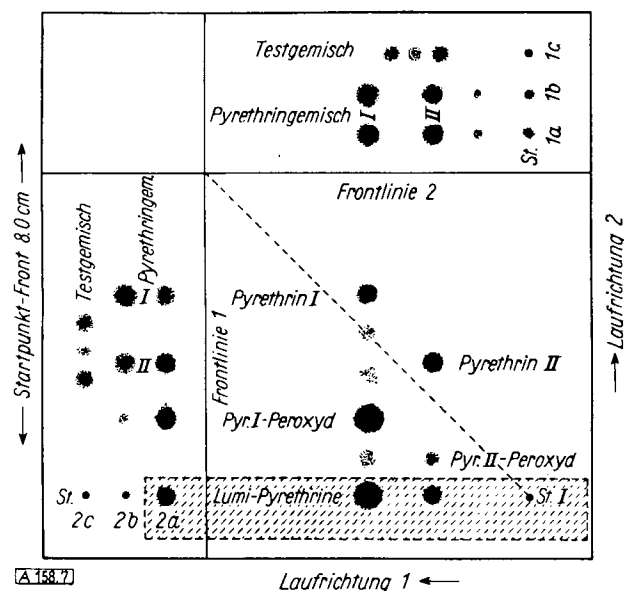


Abb. 7. Dünnschicht-Chromatogramm (TRT-Technik) eines Pyrethrum-Konzentrates. Die Bestrahlung (gestricheltes Feld) folgte nach der Trennung in Laufrichtung 1. Der Reaktionsausfall der Zonen mit Antimon(III)-chlorid, 2,4-Dinitrophenylhydrazin und Kalliumjodid/Essigsäure/Stärke wurde aufeinander projiziert. (Näheres vgl. Arch. Pharmaz. 293/65, 523 [1960])

⁴⁵⁾ E. Stahl, Arch. Pharmaz. u. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 293/65, 531 [1960].

änderungen (Polaritätsänderung einzelner Komponenten) in Stoffgemischen nach Einwirkung von Agentien möglich. Es sei z. B. an die Wirkung von Strahlen (γ-, Röntgen-, UV-Strahlen), von erhöhter Temperatur und von Gasen auf organische Stoffgemische gedacht. Die Abb. 7 veranschaulicht diese einfache Technik.

Im Gegensatz zur üblichen zweidimensionalen Methode verwendet man in beiden Laufrichtungen das gleiche Elutionsmittel. Findet keine Reaktion statt, so müssen alle Komponenten des Stoffgemischs etwa auf einer Diagonalen (gestrichelte Linie) liegen. Tritt durch die dazwischengeschaltete Reaktion bei dem einen oder anderen Stoff eine Veränderung ein, so liegen die Umwandlungsprodukte je nach ihrer Polarität entweder darüber oder darunter.

Die im letzten Jahrzehnt häufiger beschriebenen Vergiftungsfälle mit Insektiziden aus der Gruppe der Thiophosphorsäureester (E 605[®], Systox[®] usw.) veranlaßten Fischer und Klingelhöller neben dem „Test-Tube“-Verfahren (Laufzeit 3 h) auch die Dünnschicht-Chromatographie als Schnellnachweis-Methode für neun Thiophosphorsäureester zu erproben⁴⁶⁾. Eine brauchbare Trennung erreichten sie auf Kieselgel G-Schichten mit einem Gemisch aus Methylchlorid-Methanol-Ammoniak-Lösung 10-proz. (80:20:3). Die Laufzeit beträgt etwa 30 Minuten. Die untere Erfassungsgrenze liegt bei der verwendeten Jod-Azid-Reaktion zwischen 1 und 5 µg.

H. Phosphatide, Cerebroside

Bei der Aufarbeitung tierischer und pflanzlicher Lipidgemische ist zunächst eine Gruppentrennung unerlässlich. Eine schnelle Orientierungsmöglichkeit ergibt sich mit der Dünnschicht-Chromatographie⁴⁹⁾. Mit anderen Systemen gelingt dann eine Auftrennung der Gruppen. Bei der Analyse von Gehirnlipiden konnten so kleinste Mengen von Cerebroside, ihre Schwefelsäureester und Sulfatisierungsprodukte^{47a)} sowie Gehirnganglioside^{47b)} getrennt werden. Ebenfalls auf Kieselgel G-Schichten wurde z. B. mit dem Gemisch Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) eine saubere Auftrennung tierischer und pflanzlicher Phosphatidgemische (u. a. von „Sojalecithin“) erreicht⁴⁸⁾.

I. Purine, Pteridine

Die therapeutisch häufig verwendeten Purine: Theobromin (R_f 0,22), Theophyllin (R_f 0,37) und Coffein (R_f 0,57) lassen sich auf gepufferten Kieselgelschichten mit Chloroform, dem 10 % Äthanol (96-proz.) zugefügt sind, trennen und durch Aufsprühen von Jodlösung sichtbar machen⁴⁾. Die Trennung der den Purinen nahestehenden natürlichen und synthetischen Pteridine wurde mit zahlreichen stark polaren Laufmitteln versucht⁴⁹⁾. So konnten z. B. auf Kieselgel G-Schichten mit einer 5-proz. Citronensäure-Lösung 2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethylpteridin (R_f 0,46), 2-Amino-4-hydroxy-7-methylpteridin (R_f 0,60), 2-Amino-4-hydroxy-6-methylpteridin (R_f 0,69), 2-Amino-4-hydroxypteridin (R_f 0,78) und 2,4-Dihydroxypteridin (Lumazin[®] = R_f 0,88) getrennt werden. Einige der Xanthopterine, die bisher als einheitlich galten, müssen nach den Dünnschicht-Chromatogrammen als uneinheitlich angesehen werden⁴⁹⁾.

K. Steroide

Sehr kleine Mengen von Steroid-Gemischen lassen sich — wie Modellversuche ergaben — auf Kieselgel G-Schichten schon mit Chloroform auftrennen³⁾. Die erste praktische Anwendung in der Medizin fand die Methode bei der Unter-

⁴⁶⁾ R. Fischer u. W. Klingelhöller, Arch. Toxikol., im Druck [1961].

^{47a)} H. Jatzkewitz, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 320, 134 [1960].

^{47b)} E. Klenk u. W. Gielen, ebenda 323, 126 [1961].

⁴⁸⁾ H. Wagner, Fette u. Seifen 62, 1115 [1960].

⁴⁹⁾ B. J. R. Nicolaus, J. Chromatogr. 4, 384 [1960].

suchung von Serumlipiden⁵⁰⁻⁵²). Der Arbeitskreis um Reichstein⁵³) prüfte dann die Möglichkeiten an 22 Steroiden und bevorzugte Cyclohexan-Essigester-Gemische (85:15 oder 70:30). Zur gleichen Zeit wurde — mit dem Schwerpunkt Cholesterin-Derivate — die Eignung von 13 Lösungsmitteln untersucht und danach die Dünnschicht-Chromatographie zur Trennung und Identifizierung der zahlreichen bei der Cholesterin-Oxydation anfallenden Neutralprodukte verwendet⁵⁴). Auch mit Tetrachlorkohlenstoff sind Cholesterinester auf Kieselgel G-Schichten gut trennbar⁵⁵).

Für die natürlichen Gallensäuren fand man, daß sie sich ebenfalls auf Kieselgel G-Schichten mit Gemischen aus Toluol-Eisessig-Wasser (10:10:1 und der Oberphase des Gemischs 5:5:1) sehr gut trennen lassen⁵⁶). Den gleichen Erfolg erzielt man bei den Konjugaten mit Butanol-Eisessig-Wasser (10:1:1). Diese Arbeit ist vor allem im Hinblick auf die quantitative Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen beachtenswert. Nach Abschaben der Zonen wurden diese mit 65-proz. Schwefelsäure eluiert und gleichzeitig umgesetzt. Nach dem Abzentrifugieren ermittelt man spektralphotometrisch die Extinktion. Die Endwerte zeigen eine Standardabweichung von nur $\pm 1,5$ bis 2,8%. Über die Anwendung dieser Methode zur Untersuchung von Duodenal- und Blasengalle soll in einer weiteren Arbeit berichtet werden.

Es ist leicht einzusehen, daß solche Schnellmethoden in der Medizin auf großes Interesse stoßen. So fand ein Frühschwangerschaftstest⁵⁷) größte Beachtung. Er beruht u. a. auf dem Nachweis des im Gravidharn vermehrt ausgeschiedenen Pregnandiols. Ohne Tiermaterial kann damit in 2 bis 3 Stunden ein Befund erhalten werden, dessen Zuverlässigkeit in einigen hundert Fällen überprüft wurde⁵⁷).

L. Terpen-Derivate

Das einzige vor 1958 mehrfach in der Literatur erwähnte Anwendungsgebiet der Chromatographie in dünnen Sorptionsschichten war die Trennung der in ätherischen Ölen vorkommenden Monoterpen-Derivate. Es hat den Anschein, daß bereits Kirchner und Mitarbeiter^{58, 59}), die sich hiermit am eingehendsten beschäftigt haben, bald die Grenzen der Methode auf diesem Gebiet erkannten. Anwendungen der Dünnschicht-Chromatographie in der Riechstoff- und Lackindustrie wurden beschrieben⁶⁰⁻⁶³). Es zeigt sich, daß sich die zumeist aus 5–20 Stoffen bestehenden ätherischen Öle in sog. Polaritätsgruppen (z. B. Kohlenwasserstoffe, Ester, Aldehyde, Alkohole, Säuren) zerlegen lassen. Dies ist ohne Zweifel schon wertvoll. Eine einwandfreie Auftrennung mehrerer Terpene, Terpenester oder Terpenalkohole gelingt jedoch so in der Regel nicht. Man verwendet hierzu die Gaschromatographie^{64, 65}).

⁵⁰) H. Weicker, Klin. Wschr. 37, 763 [1959].

⁵¹) K. Huhnstock u. H. Weicker, ebenda 38, 1249 [1960].

⁵²) M. J. D. van Dam, Bull. Soc. Chim. Belg. 70, 122 [1961].

⁵³) M. Barbier, H. Jäger, H. Tobias u. E. Wyss, Helv. chim. Acta 42, 2440 [1959].

⁵⁴) M. J. D. van Dam, G. J. de Kleuver u. J. G. de Heus, J. Chromatogr. 4, 26 [1960].

⁵⁵) H. Gänshirt, F. W. Koss u. K. Morianz, Arzneim. Forsch. 10, 943 [1960].

⁵⁶) D. Waldi, F. Munter u. E. Wolpert, Medicina Experimentalis [Basel] 3, 45 [1960].

⁵⁷) Privatmittellung D. Waldi.

⁵⁸) J. G. Kirchner, J. M. Miller u. G. J. Keller, Analytic. Chem. 23, 428 [1951].

⁵⁹) J. M. Miller u. J. G. Kirchner, ebenda 25, 1107 [1953].

⁶⁰) R. H. Reitsema, ebenda 26, 960 [1954].

⁶¹) R. H. Reitsema, J. Amer. Pharmac. Assoc. 43, 414 [1954].

⁶²) Weitere Arbeiten in Dissertation E. Demole, Ser. A. n° 844 N° d'ordre 870, Paris 1958.

⁶³) E. Stahl, Parf. u. Kosmetik 39, 464 [1958].

⁶⁴) H. D. Wulff u. E. Stahl, Naturwissenschaften 47, 114 [1960].

⁶⁵) E. Stahl u. L. Trennheuser, Arch. Pharmaz. u. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 293/65, 826 [1960].

Zur Analyse des ätherischen Öles von Salbei wurden beide Methoden nebeneinander benutzt⁶⁶). Zu erwähnen ist ferner, daß auf einer Kieselgel G-Schicht mit Benzol-Methanol (95 + 5) die Trennung der stereoisomeren Menthole, insbes. von Menthol und Neoisomenthol gelingt; diese beiden lassen sich gaschromatographisch nicht trennen⁶⁷). Dieser Befund unterstreicht den Hinweis, die gaschromatographisch erhaltenen Fraktionen anschließend dünnschichtchromatographisch zu untersuchen⁶⁸). Eine mikroanalytische Trennung von Diterpenen (Phytol, Isophytol und Geranyl-linalol) ist auf dünnen Kieselsäureschichten gut möglich⁶⁹). Sehr schöne Erfolge erzielten Tschesche und Mitarbeiter⁶⁹) mit der Dünnschicht-Chromatographie auf dem Triterpenoid-Gebiet. Sie verwendeten die üblichen Kieselgel G-Schichten und ermittelten für 23 Triterpensäuren und 16 neutrale Triterpenoide die Trennmöglichkeiten in einfachen Lösungsmittelsystemen. Oleanol-, Ur-

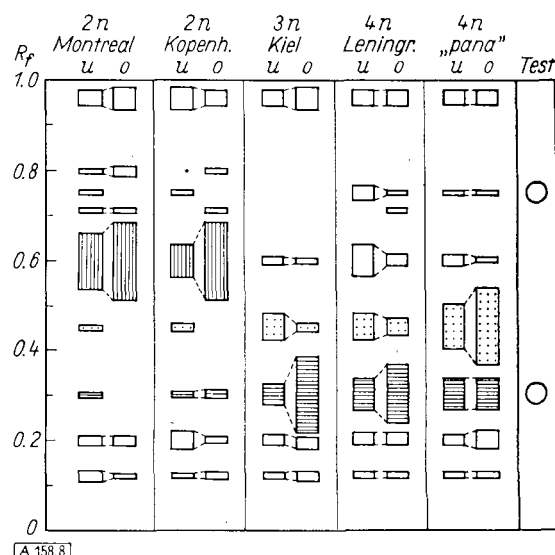


Abb. 8. Darstellung der quantitativen Unterschiede in der Zusammensetzung der ätherischen Öle verschiedener Kalmusrassen⁶⁴). Die Zonengröße (Mittelwerte aus zahlreichen Dünnschicht-Chromatogrammen) ist in entsprechend großen Rechtecken gleicher Grundkantenlänge wiedergegeben⁶). Aufgetragene Menge je 400 µg Öl in 10-proz. Benzol-Lösung, Elutionsmittel: Benzol p. a.; Test: Buttergelb $R_f = 0,8$ Sudanrot G = 0,3; NS; u = untere Blathälfte, o = obere Blathälfte. [] Geranylacetat; [] Asarone; [] Isoeugenol-methyläther

sol- und Betulinsäure konnten auch durch Variation der Sorptionsschicht nicht getrennt werden, wohl aber durch Ionenaustauscher-Papierchromatographie. Es ist möglich, daß hier die Dünnschicht-Chromatographie auf sehr feinkörnigen Ionenaustauscher-Schichten weitere Vorteile bringt⁶⁹).

M. Vitamine (fettlösliche) und Carotinoide

Ein klassischer Anwendungsbereich der Tswettischen Säulenchromatographie ist das Carotinoid-Gebiet. Verbunden mit den Namen R. Kuhn, A. Winterstein (+), P. Karrer, H. Brockmann und E. Lederer, führte es zum großen Aufschwung der Adsorptionschromatographie in den dreißiger Jahren.

Umso interessanter ist es, daß A. Winterstein zu diesem Gebiet zurückkehrte und erkannte, daß die Dünnschicht-Chromatographie auf diesem intensiv bearbeiteten Gebiet kombiniert mit der klassischen Methode Fortschritte zu bringen vermag. In zwei Jahren entdeckten er und seine

⁶⁶) C. H. Brieskorn u. E. Wenger, ebenda 293/65, 21 [1960].

⁶⁷) H. J. Petrowitz, Angew. Chem. 72, 921 [1960].

⁶⁸) E. Demole u. E. Lederer, Bull. Soc. Chim. de France 1958, 1128.

⁶⁹) R. Tschesche, F. Lampert u. G. Snatzke, J. Chromatogr. 5, 217 [1961].

Mitarbeiter über ein Dutzend neue — zumeist nur in Spuren in der Natur vorkommende — Carotinaldehyde und stellten ihre weite Verbreitung fest. Seine Arbeiten⁷¹⁻⁷³⁾ widmete er R. Kuhn zu seinem 60. Geburtstag und schreibt darin u. a., daß sich die Dünnschicht-Chromatographie für den Nachweis der Spurencarotinoide als unentbehrlich erwiesen hat. Mit Rhodanin lassen sich noch 0,03 µg Carotinaldehyd erfassen⁷⁰⁾. Winterstein und Mitarbeiter verwendeten zwei Schichten⁷²⁾, einmal solche aus Kieselgel G + Calciumhydroxyd (5 + 20 Gew.-Teile), dabei diente in der Regel Petroläther-Benzol (1:1) als Elutionsmittel, zum anderen mit Paraffin imprägnierte Kieselgel G-Schichten mit der mobilen Phase Methanol (gesättigt mit Paraffinöl). Auf den letzteren Schichten wurden für Carotinaldehyde folgende R_f -Werte ermittelt:

	C ₄₀	C ₃₇	C ₃₅	C ₃₂	C ₃₀	C ₂₇	C ₂₅	C ₂₀
R_f	0,22	0,34	0,38	0,47	0,49	0,63	0,56	0,85

Auf den nicht imprägnierten Schichten lassen sich zwei Reihen von Carotinolen feststellen⁷⁴⁾. Ein Chromatogramm von Isler⁷⁴⁾ zeigt die Trennung der β -Apocarotinsäuremethylester. Am Beispiel einer β -Carotin-Lycopin-Canthaxanthin-Bixin-Trennung wurde die Stufentechnik demonstriert⁸⁾. Auf dem Gebiet der Vitamin A-, E-, D- und K-Reihe wurden von H. Bolliger die Bedingungen zur quantitativen Mikrobestimmung auf dünnen Sorptionschichten ausgearbeitet⁷⁵⁾. Über die qualitative Trennung einiger fettlöslicher Vitamine auf Kieselgel G-Schichten wurde u. a. in einem Bericht über neue Analysemethoden von Fettsäuren und Lipiden berichtet und ein entsprechendes Chromatogramm abgebildet⁷⁶⁾.

N. Vitamine (wasserlöslich)

Eine Schnelltrennung der immer häufiger anzutreffenden Vitaminkombinationspräparate stellt große Anforderungen an den Analytiker. In einer kurzen Mitteilung⁷⁷⁾ wird festgestellt, daß sich auf Kieselgel-G-Schichten mit dem System Eisessig-Aceton-Methanol-Benzol (5:5:20:70) Vitamin B₁ (R_f 0,00), Vitamin B₆ (R_f 0,15), Vitamin C (R_f 0,30), Vitamin B₂ (R_f 0,65) und Biotin (R_f 0,80) schnell trennen lassen. Unter den gleichen Gesichtspunkten wird die Methode zur Nicotinsäure-Nicotinsäureamid-Trennung benutzt⁷⁸⁾ und in einer weiteren Mitteilung⁷⁹⁾ über eine einfache Analyse von Pyridoxol-Pyridoxal-Pyridoxamin-Gemischen mittels der Stufentechnik berichtet. U. a. lassen sich auch die Isomeren des Pyridoxals trennen.

O. Weichmacher

Für 16 Weichmacher wurden auf Kieselgel G-Schichten mit drei Elutionsgemischen (Isooctan + 10% Äthylacetat; Benzol + 5% Äthylacetat; Dibutyläther + 20%

Hexan) die Trenn- und Nachweismöglichkeiten untersucht⁸⁰⁾. Neben den auf Dibutyl-sebacinsäureester bezogenen Rückhaltewerten wurde ihr Verhalten bei neun Farbreaktionen angegeben.

P. Zucker

Eine verteilungschromatographische Schnelltrennung sehr kleiner Zucker-Mengen läßt sich auf schwach mit Acetat gepufferten Kieselgur G-Schichten erreichen⁸¹⁾. Kieselgel G-Schichten sind hierzu nur bedingt geeignet. Mit Gemischen von Essigsäureäthylester-Isopropanol-Wasser (z. B. 65:23,5:11,5) trennen sich acht der Zucker. Die optimale Auftragemenge liegt bei 0,5 µg pro Zucker, die maximale bei 5 µg. Die untere Nachweisgrenze wurde bei Verwendung der Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reaktion mit etwa 0,03 µg ermittelt.

Dünnschicht-Chromatographie in der anorganischen Chemie

Die Erfolge bei der Säulentrennung organischer Gemische regten an, die Chromatographie der anorganischen Chemie dienstbar zu machen⁸²⁾. Meinhard und Hall haben die erstmals von Ismailov und Schraiber⁸⁴⁾ für Naturstofftrennungen beschriebene Dünnschicht-Chromatographie zur Eisen(III)-Zinksalz-Trennung verwendet⁸³⁾.

Die ersten systematischen Ergebnisse veröffentlichten H. und M. Seiler⁸⁵⁾. Auf vorgereinigten Kieselgel-Schichten war die Trennung der Kupfer-Reihe aus der H₂S-Gruppe und der (NH₄)₂S-Gruppe möglich (Abb. 9). Letztere gelang mit einem Gemisch von Aceton-konz. Salzsäure-

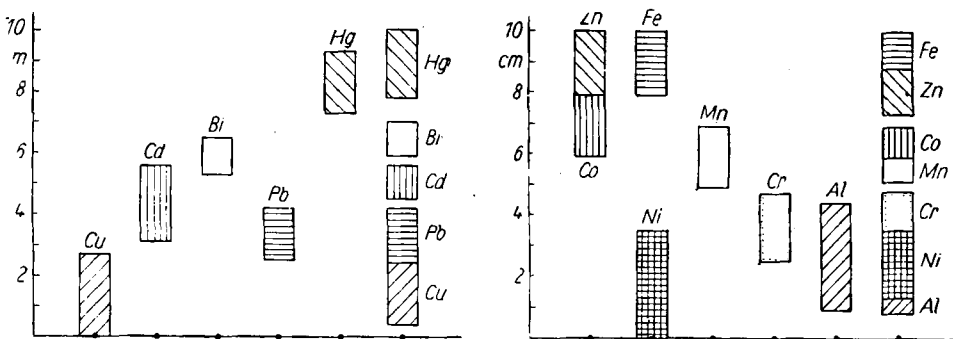


Abb. 9. Dünnschicht-Chromatogramm von Kationentrennungen; links die Cu-Reihe, rechts die (NH₄)₂S-Gruppe (H. und M. Seiler)

Acetonylacetone (100 + 1 + 0,5 Vol.-Teile) bei Laufzeiten von 15 bis 20 min (Papierchromatogramm 10–12 h). Auf Kieselgur-Schichten ist eine Kationentrennung (Nickel, Kobalt, Kupfer) mit Tetrahydrofuran-Aceton-10-proz. Salzsäure (7 + 4 + 1 Vol.-Teile) möglich⁸⁶⁾.

Ausblick

Zur Entwicklung der Chromatographie in dünnen Sorptionschichten galt es zunächst eine den praktischen Bedürfnissen angepaßte Standardisierung zu erarbeiten. Mit geeigneten Sorptionsmitteln⁸⁶⁾ und der „Grundausrüstung zur Dünnschicht-Chromatographie“⁸⁷⁾ war eine Ausgangsbasis geschaffen, und die Vor- und Nachteile der Methode

⁷⁰⁾ A. Winterstein u. B. Hegedüs, *Chimia* 14, 18 [1960].

⁷¹⁾ A. Winterstein, *Angew. Chem.* 72, 902 [1960].

⁷²⁾ A. Winterstein, A. Studer u. R. Rüegg, *Chem. Ber.* 93, 2951 [1960].

⁷³⁾ A. Winterstein u. B. Hegedüs, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 327, 97 [1960].

⁷⁴⁾ O. Isler, R. Rüegg u. P. Schudel, *Chimia* 15, 208 [1961].

⁷⁵⁾ H. Bolliger, Privatmitteilung.

⁷⁶⁾ K. Fontell, R. T. Homan u. G. Lambertsen, *J. Lipid Res.* 1, 391 [1960].

⁷⁷⁾ H. Gänshirt u. A. Malzacher, *Naturwissenschaften* 47, 279 [1960].

⁷⁸⁾ E. Nürnberg, *Dtsch. Apotheker-Ztg.* 101, 142 [1961].

⁷⁹⁾ E. Nürnberg, ebenda 101, 268 [1961].

⁸⁰⁾ J. W. C. Peereboom, *J. Chromatogr.* 4, 323 [1960].

⁸¹⁾ E. Stahl u. U. Kaltenbach, *J. Chromatogr.* 5, 351 [1961].

⁸²⁾ G. M. Schwab, *Angew. Chem.* 50, 546 [1937].

⁸³⁾ J. E. Meinhard u. N. F. Hall, *Analytic. Chem.* 21, 185 [1949].

⁸⁴⁾ N. A. Ismailov u. M. S. Schraiber, *Farmazia (russisch)* No. 3, 1 [1938].

⁸⁵⁾ H. u. M. Seiler, *Helv. chim. Acta* 43, 1939 [1960].

⁸⁶⁾ E. Merck, Druckschrift Aluminiumoxid G, Kieselgur G, Kieselgel G für die Dünnschicht-Chromatographie, Darmstadt 1960.

⁸⁷⁾ Hersteller: Fa. C. Desaga GmbH, Heidelberg, Hauptstr. 60.

konnten systematisch untersucht werden. Gerade bei vergleichenden Untersuchungen ist es — im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit — erforderlich, sich an die gegebenen Normen (Schichtdicke, Trägerscheibenformat, Kammergröße, Sättigungszustand, Laufstrecke usw.) zu halten. Modifikationen erscheinen nur dann als begründet, wenn sie einen weiteren Fortschritt bringen. Von gelegentlich beschriebenen Streichgeräten kann dies nicht behauptet werden⁸⁸⁾, auch nicht von sog. Vereinfachungen, die auf Kosten der Genauigkeit gehen.

Die Entwicklungsmöglichkeiten der Methode liegen in der Verwendung verschiedenartiger Schichten⁸⁹⁾ und Techniken⁹⁰⁾. Von besonderem Interesse sind „schnelllaufende“, einfach zusammengesetzte Fließmittel und noch empfindlichere und spezifischere Reaktionen zur Sichtbar-

⁸⁸⁾ Auf eine Veränderung der Schichtdicke wurde bisher bewußt verzichtet, um zu gut reproduzierbaren Standardbedingungen zu kommen. Neuerdings ist das Desaga-Streichgerät mit einer Schichtdickenregulierung (0–2 mm) versehen.

⁸⁹⁾ Vgl. ⁸⁸⁾ und Druckschrift Macherey, Nagel & Co., Düren, über MN-Cellulosepulver 300, 300 G und andere spezielle Pulver für die Dünnschicht-Chromatographie.

⁹⁰⁾ E. Stahl, Z. analyt. Chem. 181, 303 [1961].

machung. Für den Analytiker wären genauere, direkte spektralphotometrische Auswertemethoden wichtig. Nie sollte versäumt werden, Vergleiche mit anderen chromatographischen Methoden anzustellen.

Wie die Literatur zeigt, wurde die Dünnschicht-Chromatographie vor allem zur adsorptionschromatographischen Schnelltrennung lipophiler Stoffgemische verwendet. Besonders interessant erscheint die Möglichkeit, auf einer Schicht im zweidimensionalen Kombinationsverfahren zunächst eine adsorptions- und dann eine verteilungschromatographische Weiterauftrennung vornehmen zu können.

Die Dünnschicht-Chromatographie dürfte in der medizinischen Diagnose, in der Pharmakognosie und bei der Verfolgung organisch-chemischer Reaktionen zu einem ebenso unentbehrlichen Hilfsmittel werden, wie sie es in der pharmazeutisch-chemischen Industrie und in der Biochemie bereits ist.

Ich möchte zahlreichen Kollegen aus dem In- und Ausland danken, die mir durch laufende Mitteilungen und Übersendung ihrer Arbeiten einen Überblick auf diesem Gebiet ermöglichen.

Eingegangen am 5. Mai 1961 [A 158]

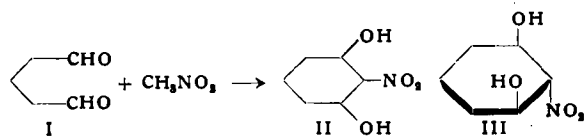
Zuschriften

Nitromethan-Kondensation von Pentandial-1.5

Von Dr. F. W. LICHTENTHALER

Department of Biochemistry, University of California, Berkeley (USA)

Einige Dialdehyde reagieren bekanntlich mit Nitromethan unter Ringschluß zu Nitrodien^{1,2)}. Ein weiteres Beispiel ist Pentandial-1.5 (I), das in wäßrig-methanolischer Lösung bei $p_H=10$ mit einem Überschuß von Nitromethan ein Gemisch isomerer 2-Nitro-cyclohexandiol-1.3 (II) liefert³⁾, woraus sich durch Ätherextraktion ein chromatographisch einheitliches Isomeres ($R_f=0,74$); Fp 143–144 °C in 55 % Ausbeute isolieren läßt. Das kernmagnetische Protonenresonanzspektrum des Diacetats (Fp 87–88 °C) ergab für die Protonen der Acetat-Gruppen ein scharfes Signal bei



$\delta = 2,0$ ppm, dessen Lage auf zwei äquatoriale Acetoxy-Gruppen hinweist⁴⁾ und somit von den drei theoretisch möglichen Konfigurationen (trans, cis und D,L) die D,L-Isomere ausschließt. Das Diacetat des cis-Isomeren könnte in einer der beiden Konformationen (zwei äquatoriale Acetoxy-Gruppen, axiale Nitrogruppe) ebenfalls ein Acetat-Signal bei 2,0 ppm geben, jedoch ist dies unwahrscheinlich im Hinblick auf die Nitromethan-Kondensation von Glyoxal²⁾ und 6-Nitrohexosen⁵⁾, wobei Nitrodiole mit äquatorialer Nitrogruppe entstehen. Der isolierten Verbindung dürfte somit die trans-2-Nitro-cyclohexandiol-1.3-Struktur (III) zukommen.

Behandeln von III mit Alkali und anschließendes Ansäuern ergibt ein Gemisch von III und einem anderen Isomeren ($R_f=0,4$), welches ebenfalls in der Kondensationslösung nachweisbar ist und wahrscheinlich D,L-Konfiguration besitzt.

Eingegangen am 12. Juni 1961 [Z 103]

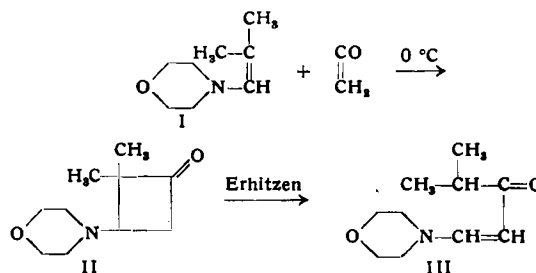
¹⁾ H. H. Baer u. H. O. L. Fischer, J. Amer. chem. Soc. 81, 5184 [1959]; 82, 3709 [1960]; H. H. Baer, Chem. Ber. 92, 2865 [1960]; A. C. Richardson u. H. O. L. Fischer, J. Amer. chem. Soc. 83, 1132 [1961]. — ²⁾ F. W. Lichtenhaler u. H. O. L. Fischer, J. Amer. chem. Soc. 83, 2005 [1961]. — ³⁾ Die Kondensation ist schon früher von McCasland, Matchett u. Hollander (J. Amer. chem. Soc. 74, 3429 [1952]) unter anderen Bedingungen versucht worden. Sie erhielten in 3 % Ausbeute ein unreines Produkt vom Fp 139–142 °C. — ⁴⁾ In n-Butanol/Eisigsäure/Wasser (4:1:5). — ⁵⁾ F. W. Lichtenhaler, Chem. Ber. 94, im Druck.

Cyclobutanon-Derivate durch Cycloaddition

Von Priv.-Doz. Dr. G. OPITZ, Dr. H. ADOLPH,
cand. chem. M. KLEEMANN
und cand. chem. F. ZIMMERMANN

Chemisches Institut der Universität Tübingen

Aus 1-Morpholino-isobuten (I) und Keten entsteht bei 0 °C durch Cycloaddition 2.2-Dimethyl-3-morpholino-cyclobutanon (II), farblose Kristalle vom Fp 40 °C, $K_{p,0.4}$ 82–84 °C, λ_{max} = 219 m μ ($\epsilon = 500$) in Hexan, IR-Spektrum 1778 cm^{-1} ; Hydrochlorid Fp 137 °C, IR-Spektrum 1790 cm^{-1} .



Bei der Destillation lagert sich II teilweise, bei längerem Erhitzen quantitativ unter Ringöffnung in das höhersiedende vinyloge Carbonsäureamid III um, das identisch ist mit der aus Morpholin und Isopropyl-(β -chlorvinyl)-keton erhaltenen Base vom $K_{p,0.4}$ 122–124 °C, λ_{max} = 289 m μ ($\epsilon = 23000$) in Hexan. III liefert bei der alkalischen Hydrolyse Isopropyl-methyl-keton, mit CH_3MgI Isopropyl-propenyl-keton. Aus der Menge an isoliertem III geht hervor, daß die Cycloacylierung von 1-Morpholinoisobuten mit Keten zur Cyclobutanon-Base II zu mindestens 85 % eintritt.

Analoge Cycloadditionen gelingen mit Keten und 1-Pyrrolidino- bzw. 1-Piperidino-isobuten, 1-Piperidino-2-äthyl-buten und ähnlichen Enaminen in guten Ausbeuten. Die Tendenz zur Ringöffnung der Cyclobutanon-Basen wird in erster Linie durch die Natur des Amin-Restes bestimmt.

Da aus Acetylchlorid und Triäthylamin im Reaktionsgemisch erzeugtes Keten ebenso glatt reagiert wie gasförmiges Keten, kann das Verhalten α,β -ungesättigter Amine gegenüber Keten und substituierten Keten ohne deren Isolierung bei Verwendung der entspr. Säurechloride untersucht werden. So erhält man in Gegenwart von Triäthylamin aus I und Propionylchlorid 2.2.4-Trimethyl-3-morpholino-cyclobutanon und mit Isobutyrylchlorid 2.2.4.4-Tetramethyl-3-morpholino-cyclobutanon, dem die Ringöffnung zu einem vinylogen Carbonsäureamid versperrt ist.

Eingegangen am 20. Juli 1961 [Z 134]