

Automatische Aktivitätsmessung bei der Trennung radioaktiver Verbindungen auf Dünnschicht-Chromatogrammen

VON DR. PAUL-EBERHARD SCHULZE UND DR. MARTIN WENZEL

HAUPTLABORATORIUM DER SCHERING AG., BERLIN, UND PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHES
INSTITUT DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

Es wurde eine Anordnung zur kontinuierlichen und automatischen Messung der Aktivitätsverteilung weicher β -Strahler auf offenen Säulen, z. B. Dünnschicht-Chromatogrammen, entwickelt. Sie ist für analytische Trennungen ebenso anwendbar wie für präparative Trennungen im Halbmikro-Maßstab. Beim Messen werden die Substanzen nicht durch Zusätze verunreinigt.

Einleitung

Die Dünnschicht-Chromatographie wird seit ihrer Wiederentdeckung durch E. Stahl [1–4] vornehmlich für analytische Fragestellungen verwendet [4a]. Diese Arbeit soll die Brauchbarkeit dieser Methode für die Reinheitskontrolle radioaktiv markierter Verbindungen und für die präparative Trennung von Substanzen zeigen, die durch Gasaustausch nach Wilzbach [5, 6] mit Tritium markiert wurden. Auch durch chemische Synthese mit weichen β -Strahlern markierte Verbindungen, z. B. ^{14}C -markierte Steroide oder ^{35}S -markierte Sulfonamide, können auf Dünnschichtplatten direkt gemessen und von Verunreinigungen befreit werden.

Bisher wurden zur Reinheitskontrolle solcher Verbindungen Papierchromatographie, Gas-Chromatographie und Verteilungsverfahren benutzt. Die sichere Messung der Radioaktivität erfordert bei den letzten zwei Verfahren jedoch einen großen apparativen Aufwand und erschwert daher die Anwendung besonders für präparative Zwecke. In einzelnen Fällen ist die Papierchromatographie auch zur präparativen Trennung markierter Verbindungen verwendet worden, doch ist dieses Verfahren wegen der geringen Kapazität der Papierbögen – vornehmlich bei lipophilen Substanzen – wenig geeignet [6].

Grundlagen

a) Analytisches Arbeiten

Da die Dünnschicht-Chromatographie prinzipiell eine Trennung auf offener Säule ist, bietet sich hier die Mög-

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

[2] E. Stahl, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 292, 411 (1959).

[3] E. Stahl, Angew. Chem. 73, 646 (1961).

[4] Dünnschicht-Chromatographie. Broschüre der Fa. E. Merck, Darmstadt 1960.

[4a] Vergleiche dazu auch K. Randerath: Dünnschicht-Chromatographie. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962, im Druck.

[5] K. E. Wilzbach, J. Amer. chem. Soc. 79, 1013 (1957).

[6] M. Wenzel u. P. E. Schulze: Tritium-Markierung. W. de Gruyter, Berlin 1962.

lichkeit zur Direktmessung radioaktiv markierter Substanzen. Dazu wurde ein Gasstromzählrohr [*] mit extrem flacher Blende entwickelt (Abb. 1). Die Blende hat keine überstehenden Teile. Dadurch kann das Chromatogramm auf einem Wagen sehr nahe (Abstand Schichtoberfläche-Zählrohrinneres: 1–3 mm) unter der Blendenöffnung entlanggeführt werden. Mit dieser Anordnung lassen sich schwache β -Strahler – auch Tritium –

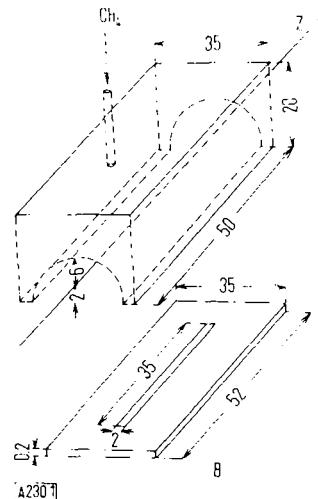


Abb. 1. Gasstromzählrohr mit extrem flacher Blende (B) zur Messung schwacher β -Strahler auf Dünnschicht-Chromatogrammen. Die Blende ist ohne überstehende Teile am Zählrohr befestigt. Z = Zähl draht (30μ Ø). Die Zahlen geben die Maße in mm an.

mit relativ hoher Meßausbeute messen. Mit einem an das Zählrohr angeschlossenen Kathodenfolger und Zählgerät, sowie einem synchron laufenden Linienschreiber wird die Aktivitätsverteilung aufgezeichnet.

Für Dünnschicht-Platten mit 0,25 mm Schichdicke und mit Silicagel-G „Merck“ als Schichtmaterial, fertigten wir Eichkurven für ^{14}C und ^3H an. Als Eichsubstanzen dienten Testosteron-4- ^{14}C (spezifische Aktivität 0,016

[*] Gebrauchsmusterschutz angemeldet am 7. Dezember 1961. Wir danken Herrn Bust, Feinmechaniker am Physiologischen Institut der Freien Universität, für die Herstellung des Zählrohrs.

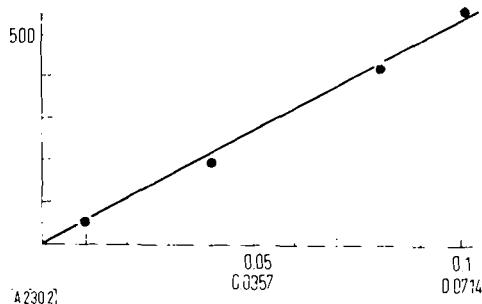


Abb. 2. Abhängigkeit der gemessenen Radioaktivität (Mittelwert aus 10 Messungen) von der aufgetragenen Aktivitätsmenge.
Schichtmaterial: Silicagel G „Merck“. Schichtdicke: 0,25 mm. Laufmittel: Cyclohexan/Essigester (90/60 v/v). Am Start wurden im Abstand von je 15 min steigende Mengen einer methanolischen Lösung von Östradiol-6,7-³H₂ punktförmig aufgetragen.
Ordinate: Impulse/min im Aktivitätsmaximum
Abszisse: obere Zahlen: aufgetragene Radioaktivität [μ c]
untere Zahlen: aufgetragene Substanzmenge [μ g]

mc/mg) und Östradiol-6,7-³H₂ (spezifische Aktivität 1,3 mc/mg). Abb. 2 zeigt die Eichkurve für ³H. Bei der geringsten gemessenen Aktivität ist der Fehler:

$$\sigma_M = \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n-1}} ; n = 10$$

naturgemäß am größten, so z. B. für 0,0001 μ c ¹⁴C \pm 8 %, für 0,01 μ c ³H \pm 9,3 %. Für Aktivitäten über 0,1 μ c bei ³H und über 0,001 μ c bei ¹⁴C bleibt der Fehler unter \pm 3 %.

Befinden sich auf einem Dünnschicht-Chromatogramm mehrere, in ihrem R_f-Wert unterschiedliche Substanzen, so ist die Aussage über die Aktivitätsverhältnisse noch genauer; denn beim einmaligen Ausmessen einer Platte sind Änderungen des Abstandes Platte-Zählrohrblende leichter zu vermeiden als beim wiederholten Plattentransport. Beim Tritium wirkt sich eine kleine Abstandsänderung wegen der geringen mittleren Reichweite der β -Teilchen in Luft (etwa 4,5 mm) auf den Fehler beson-

der von Scharpenseel [7] beschriebenen Flüssig-Szintillations-Spektrometrie erreicht, doch wiegt die Einfachheit des hier angegebenen Verfahrens diesen Nachteil auf, zumal das Probenmaterial beim Messen nicht verunreinigt wird und zurückgewonnen werden kann.

b) Präparative Trennungen

Beim Markieren durch Gas-Austausch nach Wilzbach treten manchmal gewichtsmäßig zu vernachlässigende radioaktive Verunreinigungen auf, deren spezifische Aktivität größer ist, als die des Hauptproduktes. Diese Nebenprodukte (z. B. mit Tritium hydrierte Doppelbindungen) können durch Umfällen oder Umkristallisieren allein oft schwer abgetrennt werden. Man reinigt dann am besten durch Umkristallisieren und Chromatographie. Bei einem nach Wilzbach ³H-markierten Nucleosid hat sich die Abtrennung von Verunreinigungen durch Dünnschicht-Chromatographie bewährt [8].

Die präparative Dünnschicht-Chromatographie bietet in Verbindung mit der hier beschriebenen Meßanordnung die Möglichkeit, leichte Messung mit scharfer Trennung zu vereinigen. Eine geringe Steigerung der Schichtdicke ändert die guten Trenneigenschaften der normalen Dünnschichtplatte nicht und gestattet Trennungen im präparativen Maßstab [6,9]. Beispiele zeigen Tabelle 1 und Abb. 3. Daß die Meßausbeute mit steigender Schichtdicke abfällt, spielt keine Rolle, da beim Trennen von mg-Mengen ohnehin große Aktivitäten zu erwarten sind.

Man kann das nach Wilzbach [5, 6] mit Tritium markierte Material ohne Vorreinigung auftragen. Vorher wird lediglich das labil gebundene Tritium entfernt. Nach Chromatographie und Aktivitätsmessung überträgt man die vom Schreiber aufgezeichnete Breite der radioaktiven Streifen auf das Chromatogramm, schabt das Silicagel streifenweise ab, eluiert und arbeitet auf. Dann prüft

Tabelle 1. Dünnschicht-chromatographisch im präparativen Maßstab getrennte Verbindungen. Schichtmaterial: Silicagel G „Merck“.

Eingesetzt	[mg]	Laufmittel	Isoliert	[mg]	Spezifische Aktivität [μ c/mg][*]
Δ^1 -Androsten-17 β -ol-3-on- ³ H [†]	20	[a]	Δ^1 -Androsten-17 β -ol-3-on- ³ H Androstan-17 β -ol-3-on- ³ H	12 3 [**]	0,6 1,1 [**]
1-Methyl- Δ^1 -androsten-17 β -ol-3-on- ³ H [‡]	20	[a]	1-Methyl- Δ^1 -androsten-17 β -ol-3-on- ³ H 1 β -Methyl-androstan-17 β -ol-3-on- ³ H	10 2,7 [**]	22,4 5,7 [**]
Androstan-3,17-dion- ³ H [†]	20	[a]	Androstan-3,17-dion- ³ H	15	2,5
Sulfanilsäureamid-N'-5-methoxy-pyrimidin- ³⁵ S [**]	40	[b]	Sulfanilsäureamid-N'-5-methoxypyrimidin- ³⁵ S	30	...
N-Methyl-thioharnstoff- ³⁵ S [**]	40	[b]	N-Methyl-thioharnstoff- ³⁵ S	28	...

[†] Aktivitätsmessung der Reinsubstanzen auf einem Schälchen bei unendlich dünner Schicht (1 g/cm^2) unter einem Methanstromzählrohr FH 407 mit 44 % Meßausbeute und einem mittleren Fehler von \pm 6 % [6,11].

[**] Beim Eluieren wurden kleine Mengen Trägersubstanz zugesetzt.

[‡] Nach Wilzbach markiert.

[**] Stark verunreinigte Syntheserückstände.

[a] Cyclohexan/Essigester = 3:2 (V/V)

[b] Butanol gesättigt mit konz. NH₃

ders stark aus. Bei Schichtdicken von 0,25 mm beträgt die Meßausbeute für ¹⁴C etwa 40 %, für Tritium etwa 0,3 %. Sie liegt beim Tritium unter der Ausbeute, die man mit

[7] H. W. Scharpenseel et al., Z. analyt. Chem. 180, 81 (1961); 182, 1 (1961); Angew. Chem. 73, 615 (1961).

[8] M. Wenzel u. H. P. Körtge, Naturwissenschaften 48, 431 (1961).

[9] P. Schmialeck konnte an einer 20 cm² großen und ca. 1 mm dicken Silicagel-Schicht 250 mg eines Lipoidester-Gemisches trennen (persönliche Mitteilung).

man eine Probe in einem weiteren Chromatogramm auf radioaktive Einheitlichkeit und reinigt gegebenenfalls durch Sublimieren oder Umkristallisieren.

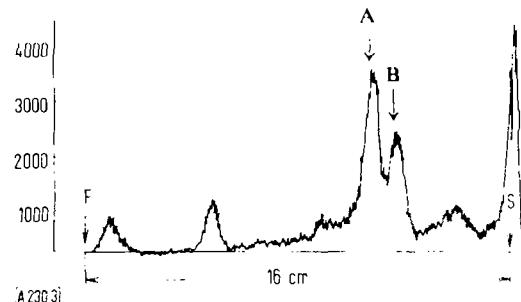


Abb. 3. Chromatographie von rohem Δ^1 -Androsten-17 β -ol-3-on- 3 H auf Silicagel G „Merck“. Schichtdicke: 0,9 mm. Laufmittel: Cyclohexan/Essigester (90/60 v/v).

Beim Abschaben der Silicagel-Zonen mit den Verbindungen A und B traten, wie Testchromatogramme zeigten, keine Überlappungen (Gemische A, B) auf. Daß die Radioaktivität zwischen A und B nicht auf Null abfällt, ist zum Teil eine Folge der Zählrohrgeometrie.

S = Start F = Front
A = Androstan-17 β -ol-3-on- 3 H
B = Δ^1 -Androsten-17 β -ol-3-on- 3 H
Ordinate: Impulse/min

Man kann die Aktivitätsverteilung auch autoradiographisch bestimmen. Dabei mischt man zur Tritium-Bestimmung Szintillatoren (z. B. 1,4-Diphenylbenzol und 1,4-Di-(5-phenyloxazol-2-yl)-benzol) unter das Fließmittel. Auch nachträgliches Besprühen des Chromatogramms mit einer Szintillatormittel-Lösung ist möglich [10]. Die Schwärzung der aufgelegten Filmplatte wird photometrisch ausgewertet. Diese Registriermethode nimmt jedoch erhebliche Zeit in Anspruch.

Experimentelles

Als Zählgerät verwendeten wir das handelsübliche Gerät der Fa. Frieseke und Höpfner, FH 49, mit Kathodenfolger, FH 484; an diesen war das Gasstromzählrohr angeschlossen. Die Zählrohrspannung betrug 2100 Volt, als Zählgas diente Methan. Der Strömungsgeschwindigkeit lag bei einer Blase pro Sekunde; der Nullwert erreichte bei dieser Einstellung nicht mehr als 30 Imp./min. Zum Messen der Aktivitätsverteilung wurde die Dünnschichtplatte auf einen kleinen, auf Schienen laufenden Wagen gelegt. Mit Wasserwaage und Stellschrauben wird der Wagen mit Platte waagerecht justiert. Der Wagen wurde mit einem um die Transportwalze des Papierchromatographen FH 552 (Fa. Frieseke und Höpfner) gewickelten Faden gezogen und die Aktivität auf einem synchron laufenden Linienschreiber registriert. Die Entfernung Schichtoberfläche-Zählrohrblende war nicht größer als 1 mm. Auch eine schrittweise Messung nach Impulsvorwahl mit einem Zeitdrucker ist möglich.

[10] P. Schmialeck, persönliche Mitteilung.

[11] J. Rydberg, Acta chem. scand. 12, 399 (1958).

Zum Herstellen gleichmäßig bestrichener Glasplatten benutzten wir das in Abb. 4 gezeigte Streichgerät. Durch Auflegen von Aluminiumfolien auf die Vinidur-Unterlage rechts und links der Glasplatte, kann die Schichtdicke variiert werden. Zum Bestreichen setzt man den Schieber vor die Glasplatte, gießt den Brei auf und zieht den Schieber langsam und gleichmäßig über die Glasplatte hinweg. Die Platten werden eine Stunde bei 120 °C getrocknet und anschließend in einem Kasten über Calciumchlorid aufbewahrt.

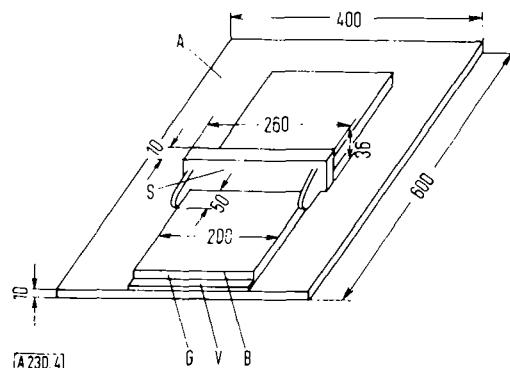


Abb. 4. Streichgerät zur Beschichtung von Glasplatten für Dünnschicht-Chromatogramme. Auflegeplatte (A) und das Streichgerät (S) bestehen aus Vinidur. Die Zahlen geben die Abmessungen in mm an. Erläuterungen siehe Text.

B = Schichtmaterial. G = Glasplatte, 4 mm dick.
V = Vinidurleiste, die das Wegrutschen der Glasplatte verhindert.

Die aufzutragenden Substanzen wurden in soviel Methanol oder Benzol gelöst, daß ein ca. 3 mm breiter Streifen über die ganze Plattenbreite aufgetragen werden konnte. Um die Schicht nicht zu beschädigen, trugen wir die Lösung mit einer Kapillare punktförmig in Abständen von 3 mm auf. Die Kapillar-Öffnung soll mindestens 0,6 bis 0,8 mm weit sein, damit sie beim leichten Aufsetzen nicht verstopft. Die aufgetragene Substanzmenge betrug 10 bis 40 mg.

Nach der Entwicklung wurden die Chromatogramme bei 60 °C getrocknet (in einigen Fällen im Vakuum-Trockenschrank) und wie beschrieben gemessen. Die radioaktiven Zonen wurden an Hand der vom Linienschreiber festgehaltenen Aktivitätsverteilung angezeichnet und abgeschabt. Man kann auch die nicht radioaktiven Zonen abschaben und durch Auftröpfen eines Lösungsmittels die Substanz aus den stehengebliebenen Streifen eluieren. Es ist manchmal zweckmäßig, den rechten und den linken Plattenrand zu vermessen, um zu prüfen, ob die Streifen gleichmäßig gelaufen sind.

Zum Eluieren von Steroiden benutzten wir Essigester, der mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet wurde. Nach dem Einengen des Lösungsmittels im Vakuum erhielten wir manchmal etwas mehr Rohmaterial als eingesetzt worden war (Gips?). Möglicherweise läßt sich dies durch Vorbehandeln des Schichtmaterials mit dem vorgesehenen Elutionsmittel vermeiden.

Für interessierte und fleißige Mitarbeit danken wir Fräulein D. Muchow und Fräulein I. Fischer.

Eingegangen am 30. April 1962 [A 230]

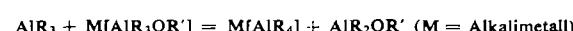
ZUSCHRIFTEN

Erdalkali-di-aluminium-octaäthyle

Von Dr. H. Lehmkuhl und Dipl.-Chem. W. Eisenbach

Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr

Im Rahmen einer Arbeit über komplexe Organoaluminium-Verbindungen [1] wurde gefunden, daß Aluminiumtrialkylen als stärkere Lewis-Säuren Alkoxy-aluminium-dialkylen aus deren Komplexverbindungen mit Alkali-alkylen verdrängen [2]:



Der OR' enthaltende Komplex ist seinerseits aus MOR' und AlR_3 zu erhalten. Daher ist die Reaktion zwischen alkoholfreiem Alkali-alkoholat und 2 Molen Aluminiumtrialkylen ein neuer, einfacher Weg zur Herstellung von Alkali-aluminium-tetraalkylen etwa gemäß



Das nebenher entstehende Alkoxy-aluminium-dialkylen kann leicht entweder infolge spontaner Bildung zweier Schichten