

Zur Standardisierung der Dünnschichtchromatographie

I. „Tube-Chromatographie“*

P. POGACAR und H. KLEIN

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. B. MUELLER) (Verkehrsmedizin: Prof. Dr. H. KLEIN)

Eingegangen am 26. September 1966

Die Dünnschichtchromatographie (DC) hat sich in der Toxikologie — nicht nur zur Erfassung verschiedener Pharmaka und ihrer Metaboliten im Urin — in einer kaum zu erwartenden Weise bewährt und ist in der praktischen Arbeit nahezu unentbehrlich. Für eine schnelle routinemäßige Anwendung bestehen jedoch drei Schwierigkeiten: 1. Die Aktivität der Schicht ist wegen ihrer leichten Veränderlichkeit jeweils verschieden und schwer vorausbestimmbar; 2. die Herstellung und Aufbewahrung standardisierter Platten ist kaum möglich; 3. die R_f -Werte sind unter den bisherigen Bedingungen schlecht reproduzierbar. Diese Schwierigkeiten, auch die Versuche einer exakteren Standardisierung (BROKMANN und SCHODDER, 1941; HERNANDEZ u. AXELROD, 1961; STAHL u. SCHORN, 1961; BRENNER, NIEDERWIESER, PATAKI u. WEBER, 1962) sind bekannt. Eine bisher nicht genügend beachtete Möglichkeit (LIE und NYC, 1962) schien gegeben zu sein durch Benutzung von Dünnschichten in geschlossenen Röhren. Unter der Voraussetzung, zwischen Wassergehalt der Schicht und Aktivierungstemperatur bestehe ein bestimmbarer Zusammenhang, hätte eine derartige Methode folgende Vorteile: a) Die Abhängigkeit der Schichtaktivität vom Wassergehalt kann quantitativ bestimmt werden, b) durch Teilaktivierung der verschlossenen Röhren bei verschiedenen Temperaturen ist die Schicht auf den jeweils günstigsten Aktivierungsgrad einstellbar, c) die Röhre selbst kann als Entwicklungskammer benutzt werden, d) durch die kreisrunde Form der Laufmittelfront ist einerseits eine konstante Kammersättigung gegeben, andererseits entstehen keine Randphänomene. Da bei gleichbleibender Beschichtung der Aktivitätsgrad ausschließlich vom Wassergehalt der Schicht abhängt, kann die Aktivität durch die Temperatur, die durch Trocknung zur Gewichtskonstanz führt, gekennzeichnet werden.

Die unter a—d angeführten Einzelbedingungen wurden experimentell geprüft.

* Herrn Prof. Dr. B. MUELLER zur Vollendung des 68. Lebensjahres.

Experimentelle Prüfung

1. *Glasröhrchen.* Die zur DC verwendeten Glasröhrchen („Tubes“) sind 125 mm lang, Durchmesser 24 mm, innen mit 1,8 g Silicagel G beschichtet, Schichtdicke 0,25 mm. Der obere und untere Rand der Schicht ist etwa 5 mm abgeschliffen. Die tubes sind durch Gummikappen luftdicht verschlossen.

2. *Wassergehalt und Aktivität.* Die Abhängigkeit des Wassergehaltes der Schicht von der Aktivierungstemperatur wurde geprüft. Es wurden jeweils sechs luft-trockene Tubes bei den in Tabelle 1 angeführten Temperaturen bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank gehalten, dann sofort verschlossen, auf Zimmer-temperatur (etwa 20°C) abgekühlt, kurz entlüftet und die wieder verschlossenen tubes gewogen (x). Von den 6 Tubes wurden 2 zurückgehalten, 4 bei 110°C bis zur

Tabelle. Einzelbestimmungen: Trocknungstemperatur, Schichtdicke, R_f -Werte

| °C | % H ₂ O | R _f 100 | | | °C | % H ₂ O | R _f 100 | | | | | |
|------|--------------------|--------------------|-----------|-------------|-----|--------------------|--------------------|-----------|-------------|-----|-----|------|
| | | Indo-phenol | Sudan-rot | Butter-gelb | | | Indo-phenol | Sudan-rot | Butter-gelb | | | |
| 18 | 31,1 | 59,0 | 74,0 | 89,7 | 80 | 3,25 | 1,2 | 6,7 | 19,6 | | | |
| | 30,6 | | | | | 2,77 | | | | 1,2 | 6,8 | 19,0 |
| 26 | 16,0 | 17,3 | 31,2 | 66,7 | | 3,31 | | | | 1,0 | 6,0 | 19,0 |
| | 15,7 | 16,5 | 31,1 | 63,5 | | 3,26 | | | | | | |
| 32,5 | 10,02 | 7,4 | 18,8 | 50,5 | 85 | 3,20 | | | | | | |
| | 9,88 | 7,7 | 19,0 | 50,5 | | 1,44 | 0,8 | 6,8 | 19,0 | | | |
| | 9,91 | | | | | 1,51 | 1,0 | 6,8 | 19,0 | | | |
| | 9,56 | | | | | 1,61 | 1,0 | 6,8 | 19,2 | | | |
| | 10,15 | | | | | 1,52 | | | | | | |
| 40 | 8,53 | 4,6 | 15,2 | 43,6 | 90 | 1,72 | | | | | | |
| | 8,15 | 4,3 | 14,2 | 42,8 | | 1,44 | 0,9 | 6,3 | 17,9 | | | |
| | 8,47 | | | | | 1,35 | 0,9 | 6,1 | 17,4 | | | |
| | 8,17 | | | | | 1,48 | 0,8 | 6,2 | 17,5 | | | |
| | 8,50 | | | | | 1,41 | | | | | | |
| 48 | 6,80 | 3,2 | 13,1 | 37,3 | 95 | 1,58 | | | | | | |
| | 6,52 | 3,2 | 12,8 | 47,4 | | 1,01 | 0,9 | 6,2 | 17,8 | | | |
| | 6,96 | | | | | 0,99 | 0,9 | 5,3 | 17,8 | | | |
| | 6,72 | | | | | 1,08 | | | | | | |
| | 7,08 | | | | | 1,17 | | | | | | |
| 60 | 5,58 | 2,0 | 8,6 | 28,0 | 100 | 1,18 | 0,8 | 4,9 | 15,8 | | | |
| | 5,21 | | | | | 0,47 | | | | 0,7 | 5,2 | 15,6 |
| | 5,5 | | | | | 0,45 | | | | | | |
| | 5,1 | | | | | 0,68 | | | | | | |
| | 5,44 | | | | | 0,75 | | | | | | |
| 70 | 4,58 | 1,8 | 8,1 | 23,5 | 105 | 0,72 | 0,7 | 5,2 | 15,6 | | | |
| | 4,18 | | | | | 0,32 | | | | 0,8 | 5,1 | 15,8 |
| | 4,50 | | | | | 0,25 | | | | | | |
| | 4,82 | | | | | 0,33 | | | | | | |
| | | | | | | 0,47 | | | | | | |
| | | | | | 110 | 0 | 0,5 | 4,5 | 12,2 | | | |

Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen (b). Nach Entfernung der Schicht wurden die sauberen getrockneten tubes verschlossen und wieder gewogen. Wenn der Wassergehalt bei 110° mit 0% angenommen wird (a), ist der Wassergehalt der Schicht bei der jeweiligen Temperatur bestimmbar aus $t = 100 \cdot \frac{x-a}{x-b}$. Zwischen 75° und 85°C ist die Wassergehaltskurve unregelmäßig, da der dem Silicagel G zugesetzte Gips bei dieser Temperatur pro Mol 1,5 Mol Kristallwasser abgibt (Abb. 1).

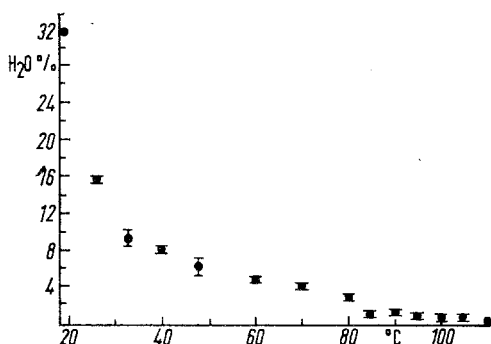


Abb. 1. Beziehung zwischen Wassergehalt und Trocknungstemperaturen (Kursenverlauf: Text)

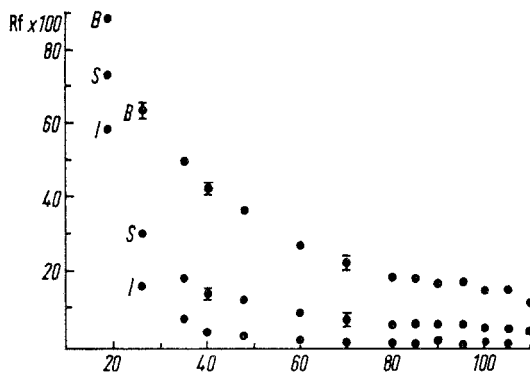


Abb. 2. Beziehung zwischen 3 R_f -Werten und Trocknungstemperatur

3. *Schichtaktivität, Wassergehalt, R_f -Wert.* Von den bei verschiedenen Temperaturen getrockneten Tubes wurden, wie angegeben, zwei zurückbehalten. Zur Bestimmung des R_f -Wertes wurde das Desaga-Testgemisch nach STAHL mittels geeichter Mikrocapillaren von 2 mm³ Inhalt aufgetragen. Die Tubes wurden mit einer Entlüftungskappe abgedeckt und in den mit 10 cm³ Benzol gefüllten Behälter eingestellt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1. In Abb. 1 sind die Beziehungen zwischen Trocknungstemperatur und Wassergehalt der Schicht ebenso deutlich wie in Abb. 2 die zwischen R_f -Werten und Aktivitätsgrad der Schicht.

4. *Auftragung: Mikrocapillaren.* Es wurden 2 mm³ Mikrocapillaren benutzt. Die Auftragung erfolgt mit einem Halterstift. Der Anschlag des Stiftes ist so eingerichtet, daß die Substanz in 15 mm Entfernung vom Rand des Tubes auf-

getragen wird. Die Laufstrecke beträgt bis zum unteren Rand der Entlüftungskappe 100 mm. Die R_f -Werte können unmittelbar abgelesen werden.

Durch die experimentelle Prüfung können die unter a—d gestellten einzelnen Voraussetzungen als bestätigt angesehen werden. Die Ansätze zur Entwicklung der beschriebenen Methode sind bereits durch die Untersuchungen von LIE und NYC (1962) gegeben: Durch zylindrische Auftragung der Dünnschicht — meist in einem Reagensglas — war die Front der Laufmittel weniger verzerrt, durch Verwendung von zwei oder mehr Laufmitteln konnten bei komplexen Fettgemischen bessere Trennungen erreicht werden. Eine Erörterung theoretischer Grundlagen (ausführlich: BRENNER, NIEDERWIESER, PATAKI u. WEBER, 1962) der Tube-Methode erscheint zweckmäßiger, wenn weitere experimentelle Erfahrungen vorliegen (POGACAR 1967).

Zusammenfassung

Es wird eine einfache Methode der Dünnschichtchromatographie in Glasröhren (Tubes) mit folgenden Vorteilen beschrieben:

1. Durch die exakte Einstellbarkeit des Wassergehaltes der Schicht sind die R_f -Werte besser als mit den bisher üblichen Methoden reproduzierbar.
2. Die vorgefertigten beschichteten Röhrchen (inaktive Tubes) ermöglichen, bei verschiedenen Temperaturen aktiviert, die Auswahl jeweils günstigster Trennungsbedingungen.
3. Die standardisierten Bedingungen erlauben den unmittelbaren Vergleich der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen.

Die beschichteten, aktivierten und luftgetrockneten tubes sowie das nötige Zubehör können jetzt von C. Desaga (Heidelberg) bezogen werden.

Summary

A simplified method for thin-layer chromatography (T.L.C.) in glass tubes is described, showing the following advantages:

1. Due to the accurate adjustment of the water content of the layer, the R_f values are better reproducible than with the conventional techniques.
2. Activated at the desired temperatures the ready-coated tubes (inactive tubes) allow the selection of the most favorable separating conditions.
3. Owing to the standardized conditions it is possible to directly compare the results of different tests.

Both the coated, activated, and air-dry tubes and the necessary accessories are available from C. Desaga, Heidelberg, Germany.

Literatur

- BROKMANN, H., u. H. SCHODDER: Ber. dtsh. chem. Ges. **74**, 77 (1941).
HERNANDEZ, R., R. HERNANDEZ jr. u. L. R. AXELROD: Annal. Chem. **33**, 370 (1961).
LIE, K. B., u. J. F. NYC: J. Chromatography **1**, 75 (1962).
POGACAR, P. u. Mitarb.: Tubchromatographie. J. Chromatog. **26**, (1967) (im Druck).
STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.
— u. P. J. SCHORN: Z. Physiol. Chem. **325**, 263 (1961).
STOLMAN, A.: Progress in chemical toxicology. New York and London: Academic Press 1965.

Prof. Dr. H. KLEIN
Leiter der Abteilung Verkehrsmedizin
im Institut für gerichtliche Medizin der Universität
69 Heidelberg, Voßstr. 2
Dr. P. POGACAR
Abteilung Verkehrsmedizin des obigen Institutes