Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 73 (1982)

Heft: 2

Rubrik: Beiträge zur Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 73, 131–138 (1982)

Beiträge zur Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie

Anläßlich der Jahrestagung 1981 der Schweiz. Naturforschenden Gesellschaft haben die Schweiz. Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie und die Schweiz. Gesellschaft für Instrumentalanalytik und Mikrochemie am 24. September 1981 in Davos gemeinsam ein Symposium über Hochleistungsdünnschichtchromatographie durchgeführt. Die Vorträge von H. R. Schmutz, W. Funk, G. Székely und P. Georges werden im folgenden publiziert. Ein weiterer Beitrag ist bereits andernorts veröffentlicht worden (S. Dogan und W. Haerdi, Chimia **35**, 339, 1981). J. S.

Instrumentelle Dünnschichtchromatographie: Grundzüge der Arbeitstechnik, Instrumentierung, Anwendungsbeispiele aus der Praxis

Instrumental Thin-Layer Chromatography: Principles, Instrumentation and Practical Applications

H. R. Schmutz
Camag, Muttenz

Einleitung

Die eindrücklichen Fortschritte der modernen Dünnschichtchromatographie können einer Reihe von Faktoren zugeschrieben werden:

- Industriell gefertigte Schichten mit Korngrößen um 5 μm und einer engen Korngrößenverteilung weisen eine hohe Trennleistung auf.
- Neue Auftragetechniken ermöglichen kleine Startzonen und damit eine optimale Nutzung der zur Verfügung stehenden Trennleistung.
- Neue Methoden der Zuführung mobiler Phase sowie der Schichtkonditionierung sichern hohe Reproduzierbarkeit der chromatographischen Bedingungen.
- Die bessere Schichtoberfläche ergibt ein günstigeres Signal/Rausch-Verhältnis bei der optischen Direktauswertung; dadurch werden niedrigere Detektionslimiten erreicht.
- Eine an die reduzierten Dimensionen der Probenzonen angepaßte Direktauswertung erlaubt die Messung großer Probenzahlen bei ausgezeichneter Auflösung und Reproduzierbarkeit.

Diese Ausführungen sollen verdeutlichen, daß nur eine Verbesserung aller an der Analyse beteiligten Schritte zu einer Methode führt, die den heutigen Anforderungen eines analytischen Labors gerecht wird.

Für die Praxis bedeutet das, daß auch für die Dünnschichtchromatographie ein aufeinander abgestimmtes Sortiment von Instrumenten für Probenauftragen, Entwickeln und Auswerten zur Verfügung stehen muß.

Die Leistungsfähigkeit von solchen Systemen wird anhand von 3 Beispielen gezeigt. Im Beispiel 1 wurden die Proben punktförmig aufgetragen.

Eine Alternative zur punktförmigen Auftragung, welche besonders vorteilhaft ist für verdünnte Lösungen, wird in den Beispielen 2 und 3 gezeigt. Es handelt sich dabei um ein spezielles Verfahren zum strichförmigen Probenaufsprühen.

In allen 3 Beispielen wird die konventionelle (lineare) Entwicklungstechnik eingesetzt. In Beispiel 1 und 2 wird die Doppeltrogkammer (Fließmittelsättigung) und in Beispiel 3 die HPDC-Linearentwicklungskammer, ohne Einwirkung von Fließmitteldampf, eingesetzt. Die Wahl des Entwicklungssystems hängt von der Art der zu trennenden Substanzen und vom gewählten Fließmittel ab.

Quantitative Bestimmung von Sulfathiazol, Sulfadiazin und Sulfamerazin in einer Sulfonamid-Tablette*

Probenvorbereitung

20 Tabletten werden fein pulverisiert und die einer Tablette entsprechende Menge Pulver eingewogen und mit 200 ml Methanol versetzt. Die Suspension wird während 5 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend mit einer mit Membranfilter versehenen Spritze ein Aliquot entnommen. 1 Tablette enthält 167 mg Sulfathiazol, Sulfadiazin und Sulfamerazin. Standardlösung in gleicher Zusammensetzung und Konzentration.

Probenauftragung

Mit Nanomat und eingesetztem Nano-Applicator 100 nl, nach Data-Pair-Technik, 11 Proben und 6 Standards, Auftrageabstand 5 mm, auf eine HPTLC-Fertigplatte Kieselgel 60 F 254 (Merck). Das aufgetragene Volumen entspricht je 83,5 ng Sulfathiazol, Sulfadiazin und Sulfamerazin.

Chromatographie

In der Doppeltrogkammer 10 x 10 cm mit Chloroform-Methanol-n-Hexan 15:5:15. Trennstrecke 70 mm. Anschließend Trocknen der Platte im Trockenschrank.

Quantitative Auswertung

Mit DC/HPDC Scanner, Monochromatorversion. Absorptionsmessungen bei 280 nm, Monochromatorbandbreite 10 nm. Spaltabmessungen 3,5 x 0,2 mm, automatische Auswertung mit Bahnlänge A = 26 mm, Bahnabstand B = 5 mm, Vorschubgeschwindigkeit 1 mm/s.

* Die Methode wurde uns freundlicherweise von Herrn N. Jühlcke, Viernheim, zur Verfügung gestellt.

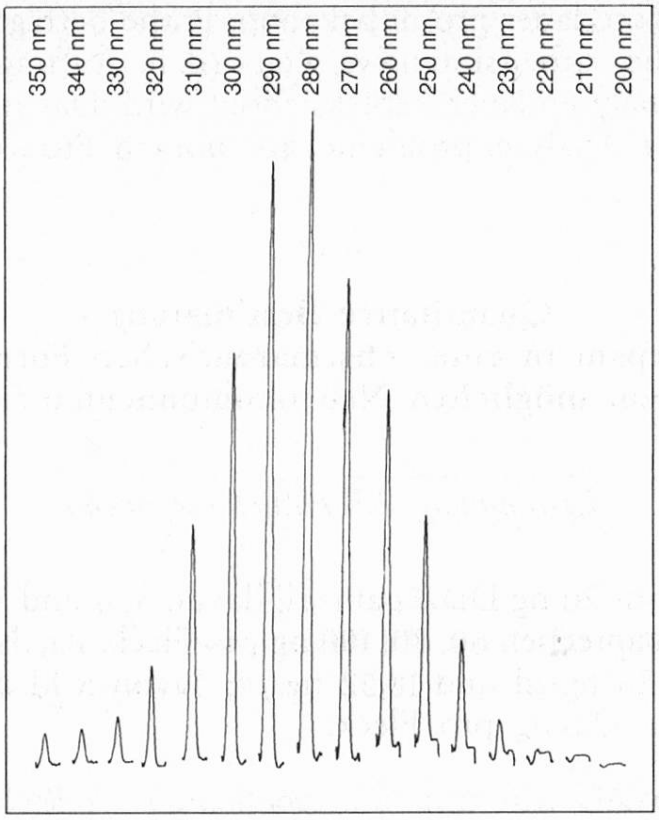


Abb. 1. Spektrum von Sulfathiazol im Bereich von 200 bis 350 nm, aufgenommen mit dem Camag DC/HPDC Scanner direkt auf der HPDC-Platte

Die günstigste Meßwellenlänge wurde ermittelt durch Aufnahme der Absorptionsspektren direkt auf der Platte (Abb. 1). Gehaltsbestimmung über die mit Hilfe des angeschlossenen Integrators Varian CDS-111-C ermittelte Peakfläche (Abb. 2). (Alternativ kann die Integration auch mit einem Integrator Spectra-Physics SP 4100 mit eingebautem Printer/Plotter durchgeführt werden.) Die erreichte Genauigkeit der Gesamtmethode liegt zwischen 2—3% rel. Standardabweichung (abhängig vom R_f-Wert). Reihenfolge der Substanzen in Chromatographierichtung: Sulfathiazol, Sulfadiazin, Sulfamerazin.

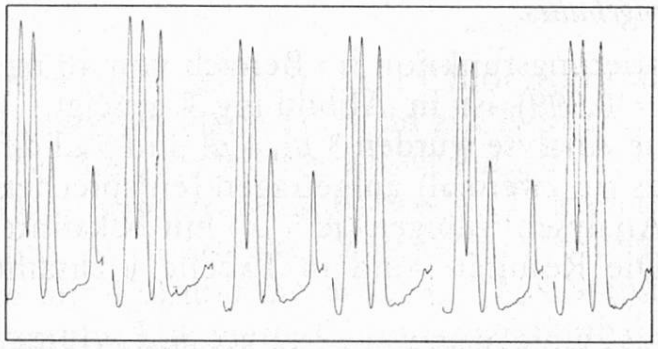


Abb. 2. Meßkurven von zersetzter Probe (1., 3. und 5. Kurve von links) und 3 Standards

Die Gesamtanalysendauer pro unbekannte Probe beträgt 1,5 und 2,5 min, je nachdem, ob nur die «arbeitsintensive Zeit» (d. h. Auftragen und Auswerten) oder die gesamte Analysendauer berücksichtigt wird. Das macht die HPDC besonders geeignet für Analysenprobleme mit hohem Probenbefall, z. B. in der Qualitätskontrolle.

Quantitative Bestimmung von Diazepam in einer pharmazeutischen Formulierung: Spurenanalyse von möglichen Nebenkomponenten im ppm-Bereich*

Bestimmung der Hauptkomponente

Proben

Standardlösung mit 20 ng Diazepam/μl; davon 3, 4 und 5 μl für die Kalibrierung aufgetragen, entsprechen 60, 80, 100 ng pro Fleck. Analysenlösungen mit einem Gehalt von 19,23 ng/μl und 18,52 ng/μl; davon 5 μl aufgetragen, entsprechend 96,2 ng bzw. 92,6 ng pro Fleck.

Probenauftragung

Mit Linomat III, 5 μl strichförmig, Bandlänge 6 mm, Zwischenraum 4 mm, 16 Proben pro Platte, auf HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (Merck) 20 x 10 cm. Platten mit Methanol vorgewaschen und 30 min bei 110 °C getrocknet.

Chromatographie

Mit Essigsäureethylester-n-Hexan 1 : 1 in der Doppeltrogkammer (Fließmittelsättigung), Trennstrecke 40 mm.

Quantitative Auswertung

DC/HPDC Scanner, Monochromatorversion, Absorptionsmessungen bei 265 nm (Hg-Lampe), Spaltabmessungen 3 x 0,3 mm. Automatische Auswertung mit Bahnlänge A = 20 mm, Bahnabstand B = 10 mm, 16 Meßbahnen. Meßvorschub 1 mm/s. Ermittlung der Peakflächen mit angeschlossenem Integrator Spectra-Physics SP 4100.

Ermittlung des Probengehaltes

Die lineare Kalibrierungsfunktion im Bereich von 40 ng bis 120 ng (Korrelationskoeffizient r^2 = 0,999) ist in Abbildung 3 gezeigt.

Für die eigentliche Analyse wurden 3 μl, 4 μl und 5 μl der Standardlösung als Kalibrationsstandards (je zweimal) aufgetragen (entsprechend 60 ng, 80 ng und 100 ng) sowie zwei Analysenlösungen (je 5 μl) mit bekanntem Gehalt an Diazepam (je fünfmal). Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

* Die Methode wurde uns freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt.

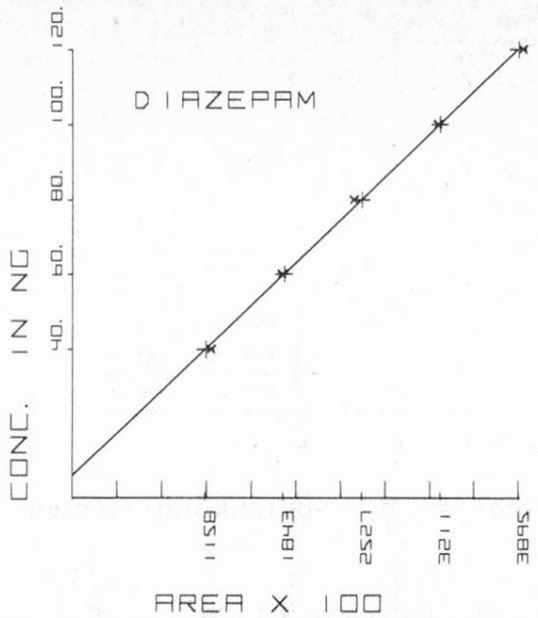


Abb. 3. Kalibrierungskurve Diazepam, ausgedruckt mit Integrator SP 4100 mit einem speziellen BASIC-Programm

Tabelle 1. Gehaltsbestimmung von Diazepam

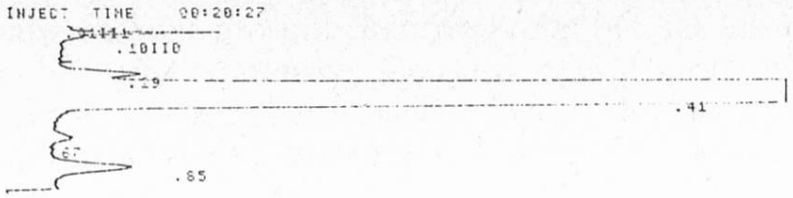
Probe	Aufgetragene Substanzmenge	Gefunden (Mittelwert)	Abweichung vom Sollwert	rel. Standardabweichung für $n = 5$
A_I	96,2 ng	96,6 ng	+ 0,4 ng	1,26 %
A_{II}	92,6 ng	93,3 ng	+ 0,7 ng	1,68 %

Spurenanalyse von möglichen Nebenkomponenten

Diese Analyse wird nach dem vorangehend beschriebenen Verfahren ausgeführt mit folgenden Modifizierungen:

Probenauftragung

200 mg Diazepam werden gelöst in 5 ml Chloroform und davon 4 μl aufgetragen, d. h. 160 μg Diazepam/Fleck. Da nicht alle Komponenten ausreichend getrennt werden, wird für die quantitative Auswertung das Verfahren der Standard-Addition gewählt. Dazu wird zuerst auf jeweils 4 Chromatogrammbahnen Probenlösung aufgetragen. Nach erfolgter Zwischentrocknung wird die erste Bahn mit 10 μl, die zweite mit 4 μl und die dritte mit 2 μl Standardlösung bekannter Konzentration übersprüht. Die vierte Chromatogrammbahn bleibt unverändert (d. h. nur mit Probe belegt). Wegen der extremen Konzentrationsunterschiede



00:20:27

FILE 1 METHOD 0. RUN 2 INDEX 1

PEAK#	RT	AREA	BC	
1	0.29	29056	62	COMP. 1
2	0.41	4219330	62	DIAZEPAM
3	0.67	15999	61	COMP. 2
4	0.85	82012	61	COMP. 3
TOTAL		4346397		

Abb. 4. Trennung der Spurenkomponenten in Diazepam

werden 90 mm Trennstrecke benutzt. Ein Beispiel eines Chromatogramms zeigt Abbildung 4.

Tabelle 2 zeigt die für ein bestimmtes Muster ermittelten Analysenergebnisse.

Tabelle 2.

Spurenkomponente	R_f	Ermittelte Menge (ng/Fleck)	ppm	rel. Standardabweichung, $n = 8$
Comp. 1	0,25	102	638	2,8 %
Comp. 2	0,63	5,9	37	4,0 %
Comp. 3	0,82	110	688	2,1 %

Quantitative Bestimmung von Carbamazepin und zwei Metaboliten in Serum (nach *Hundt* und *Clark* (1))

Serumproben werden ohne Extraktionsschritt direkt aufgetragen. Die Untersuchung zeigt, daß ein derartiges Vorgehen praktikabel ist und welche Präzision erreicht wird (Abb. 5).

Proben

Carbamazepin (I), Carbamazepin-10,11-epoxid (II) und 10,11-Dihydroxy-carbamazepin (III).

Probenvorbereitung

Stammlösung: 10 mg von I, 2,5 mg von II und 2,5 mg von III in 10 ml absolutem Methanol.

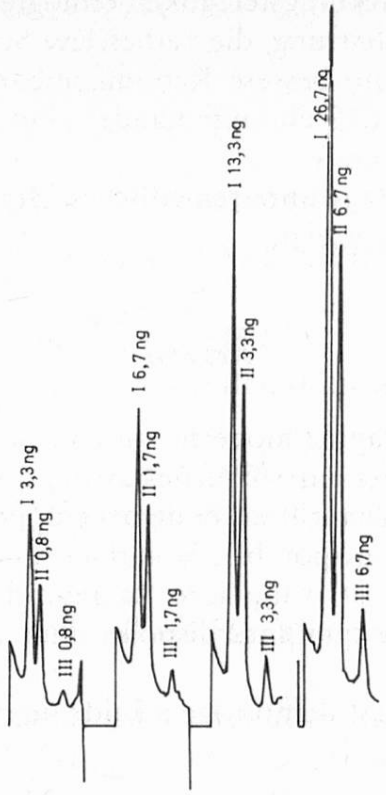


Abb. 5. Trennung von Carbamazepin

Standard Serumlösung: 2, 4, 8 und 16 μ1 von der Stammlösung zu 1 ml Portionen von Humanserum zugeben (in Plastik-Proben-Röhrchen). Die Serumlösungen werden vor der Auftragung 1 : 3 mit Wasser verdünnt (um die Viskosität zu verringern).

Probenauftragung

Mit Linomat III, strichförmig, 5 μl, Strichlänge 10 mm auf HPDC-Platten, Kieselgel 60 F 254, 20 x 10 cm (Merck).

Chromatographie

Ethylacetat-Benzol-Methanol 5 : 4 : 1. Entwicklung mit HPDC Linearentwicklungskammer 20 x 10 cm. Laufzeit ~ 10′, Laufstrecke 45 mm.

Quantitative Auswertung

DC/HPDC Scanner, Monochromatorversion, Quecksilberlampe, Anregung 366 nm, Emission > 400 nm, Monochromatorbandbreite 10 nm. Spalteneinstellung 0,3 x 5 mm, Papiergeschwindigkeit 3 cm/min.

Zusammenfassung

Die Leistungsfähigkeit der modernen Dünnschichtchromatographie wird durch eine Reihe von Faktoren bestimmt: Homogenes Schichtmaterial ergibt eine erhöhte Trennlei-

stung, neue Auftrage- und Entwicklungstechniken ermöglichen eine optimale Nutzung der zur Verfügung stehenden Trennleistung, die verbesserte Schichtoberfläche ermöglicht niedrige Detektionslimiten und eine bessere Repoduzierbarkeit.

Für die Praxis bedeutet das, daß ein aufeinander abgestimmtes Sortiment von Instrumenten zur Verfügung stehen muß.

Anhand von drei Beispielen aus unterschiedlichen Bereichen wird die Leistungsfähigkeit von solchen Systemen aufgezeigt.

Résumé

L'efficience de la chromatographie moderne sur couche mince est fonction d'un certain nombre de facteurs: L'homogénéité des couches assure une meilleure résolution, de nouvelles techniques de dépôt des échantillons et de développement permettent d'exploiter au mieux la capacité de résolution disponible, la surface améliorée des couches permet d'abaisser les limites de détection et d'améliorer la reproductibilité des résultats.

Cela signifie pour la pratique qu'il faut disposer d'un assortiment complet et cohérent d'appareils et d'instruments.

L'efficience de tels systèmes est démontrée à l'aide de trois exemples tirés de domaines d'application différents.

Summary

The efficiency of modern thin-layer chromatography is determined by a number of factors: homogeneous layer material gives better separation performance, new application and development techniques allow optimal usage of the available separation performance, the improved layer surface ensures low detection limits and improved reproducibility.

In practice this means that a complete system of compatible instruments is essential.

The efficiency of such systems is illustrated with reference to three cases from different areas.

Literatur

1. *Hundt, H. K. L.* and *Clark, E. C.:* Thin-layer chromatographic method for determining carbamazepine and two of its metabolites in serum. J. Chromatogr. **107**, 149–154 (1975).

Dr. H. R. Schmutz
Camag
Sonnenmattstraße 11
CH-4132 Muttenz

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 73, 139–154 (1982)

Anwendung der instrumentalisierten HPTLC in der Spurenanalytik fluoreszenzmarkierter Substanzen

Application of Instrumentalized HPTLC in the Trace Analysis of Fluorescence Labelled Compounds

W. Funk
Fachhochschule Gießen-Friedberg, Gießen

Einleitung

Jede Molekülart zeigt ein ihr typisches Absorptionsspektrum im sichtbaren Spektralbereich (farbige Substanzen) oder, wie bei der Mehrzahl der farblosen Substanzen, im UV-Bereich. Der photometrische Nachweis farbloser Substanzen ist häufig unspezifisch, da sich die charakteristischen Absorptionsmaxima dieser Substanzen in einem sehr engen Spektralbereich häufen. Deshalb versucht der Analytiker, durch eine gezielte, spezifische chemische Umsetzung die gesuchte Verbindung zu einem im sichtbaren Spektralbereich absorbierenden Derivat umzusetzen.

Daneben ist Ziel einer chemischen Derivatisierung, durch Einführung eines Chromophors ein Derivat mit großem Extinktionskoeffizienten zu erhalten, um somit die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens zu steigern. Verbindet man diesen Analysenschritt mit einer dünnschichtchromatographischen Trennung, so lassen sich zusätzlich Störungen ähnlich reagierender Stoffe vermeiden, was zu einer weiteren Steigerung der Spezifität des Nachweises führt. Damit ist es oftmals erst möglich, eine quantitative DC-Bestimmung im Spurenbereich durchzuführen (1).

Weiteres Ziel einer Derivatisierung kann die Verbesserung einer extraktiven Abtrennung, die Verbesserung der Stabilität der gesuchten Verbindung oder die Verbesserung der chromatographischen Trennung sein. Die wichtigsten Derivatisierungsreaktionen sind dabei:

1. Die *Acylierung* zum Nachweis von z. B. Aminen, Polyaminen oder Phenolen;
2. Die *Alkylierung* zum Nachweis von z. B. aromatischen und aliphatischen Carbonsäuren;
3. *Kondensationsreaktionen* zum Nachweis von z. B. Carbonylverbindungen;
4. *Kupplungsreaktionen* an C-H-aciden Verbindungen.

Im folgenden Fließschema (Abb. 1) sind die Möglichkeiten dargestellt, wann eine Derivatisierungsreaktion bei einer dünnschichtchromatographischen Bestimmungsmethode durchgeführt werden kann.

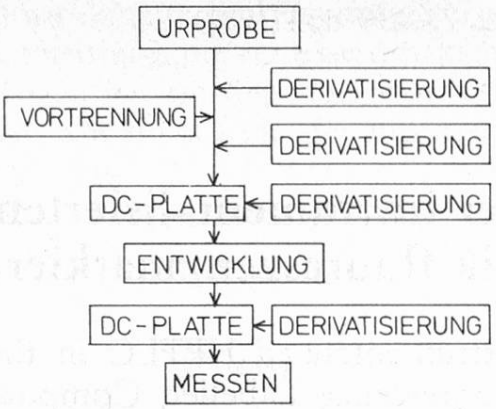


Abb. 1. Fließschema

Die *Postderivatisierung* nach erfolgter chromatographischer Entwicklung durch Besprühen oder Tauchen der DC-Platte hat häufig den Nachteil, daß Sprüh- oder Tauchreagenzien mit einer hohen Eigenabsorption eine quantitative Bestimmung verhindern.

Dieser Nachteil macht sich vor allem dann bemerkbar, wenn man die Derivatisierung mit fluoreszierenden Reagenzien durchführen will. In diesem Fall bleiben die Möglichkeiten der *Vorderivatisierung* als einziger Ausweg.

Daneben kann eine Vorderivatisierung die chromatographischen Eigenschaften schwer zu trennender Substanzen derart verändern, daß erst danach eine chromatographische Trennung möglich ist.

Ebenso ist es möglich, durch eine Vorderivatisierung die Stabilität (z. B. bei Oxidationsempfindlichkeit) von Verbindungen zu steigern sowie die Reaktivität von Verbindungen z. B. mit der stationären Phase zu verringern.

Beispiel der Vorderivatisierung

Quantitative Östriolbestimmung

Im mütterlichen Plasma und Urin ist die quantitative Bestimmung von Östriol bei der Überwachung des Fötus bzw. der Plazentafunktion insbesondere bei Risikoschwangerschaften von entscheidender Bedeutung.

Dabei unterscheiden sich die Konzentrationen dieses Steroids in diesen beiden Matrices um etwa den Faktor 1000 (siehe Tabelle 1).

Das *nicht* derivatisierte Östriol (Abb. 2) läßt sich demnach als Hauptsteroid in den letzten Schwangerschaftswochen nur im Harn direkt bestimmen, da es dort im mg/l-Bereich vorliegt. In Abbildung 3 ist die Remissionsortskurve — gemessen bei $\lambda = 282$ nm — dargestellt. In dem Fließmittel Cyclohexan/Essigester/Ethanol (45:45:10) läßt sich danach Östriol direkt im Arbeitsbereich von 20—100 ng/Fleck ($r = 0{,}99$) noch quantifizieren.

Tabelle 1

a) Östrogenkonzentrationen im Serum während der Schwangerschaft

Wochen nach der letzten Menstruation	Unkonjugiertes Östriol (µg/l)
25	2– 6
30	4,5–10,5
35	6–18
40	7–25

b) Ausscheidung von Östriol während der Schwangerschaft im 24-h-Harn

Schwangerschaftswoche	mg Östriol / 24 h
25	11
30	15
35	20
40	39

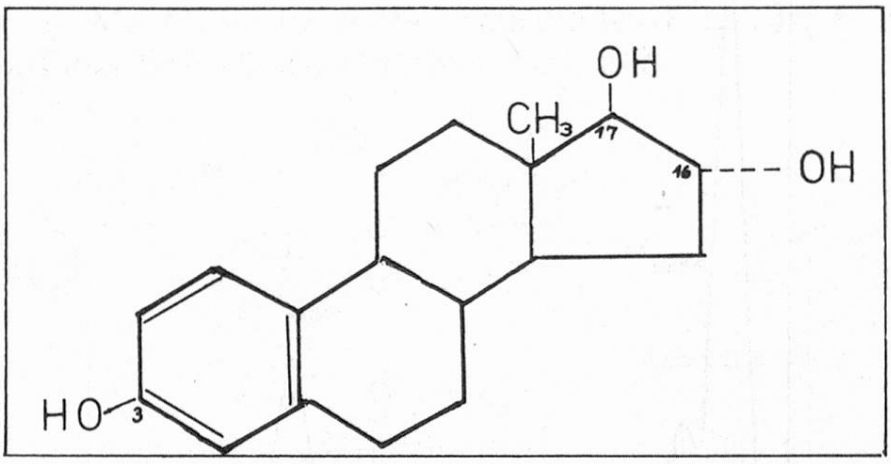


Abb. 2. Östriol

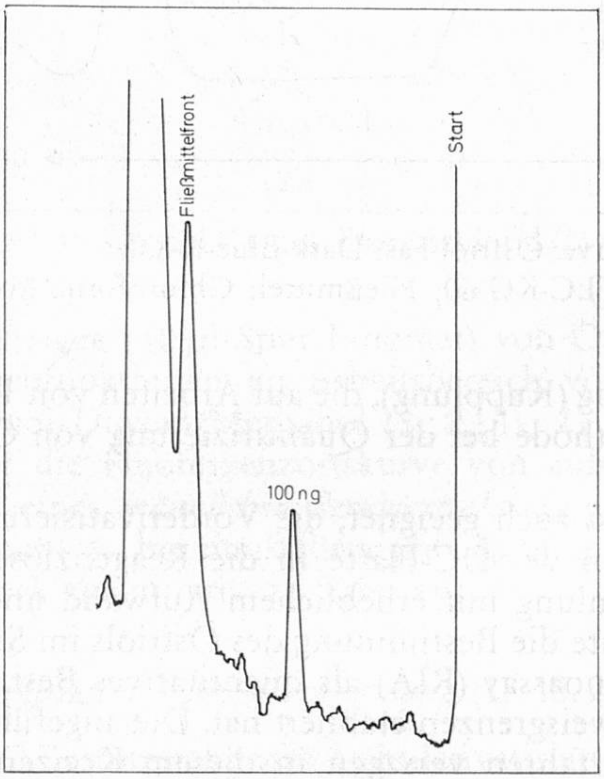


Abb. 3. Remissionsortskurve Östriol
Sorbens: HPTLC-KG-60; Fließmittel: Cyclohexan/Essigsäureethylester/Ethanol (45 : 45 : 10); λ = 282 nm

Die Spezifität und Empfindlichkeit eines Östriolnachweises läßt sich nun erhöhen, wenn man dieses als in 3-Stellung aromatisches Phenol mit Diazoniumsalzen kuppelt. In Abbildung 4 ist die Remissionsortskurve des Östriol-Azofarbstoffes mit Fast-Dark-Blue-R-Salz — gemessen bei 520 nm — dargestellt. Eine Quantifizierung ist damit im Arbeitsbereich von 5 ng/Fleck bis 30 ng/Fleck möglich (r = 0,998).

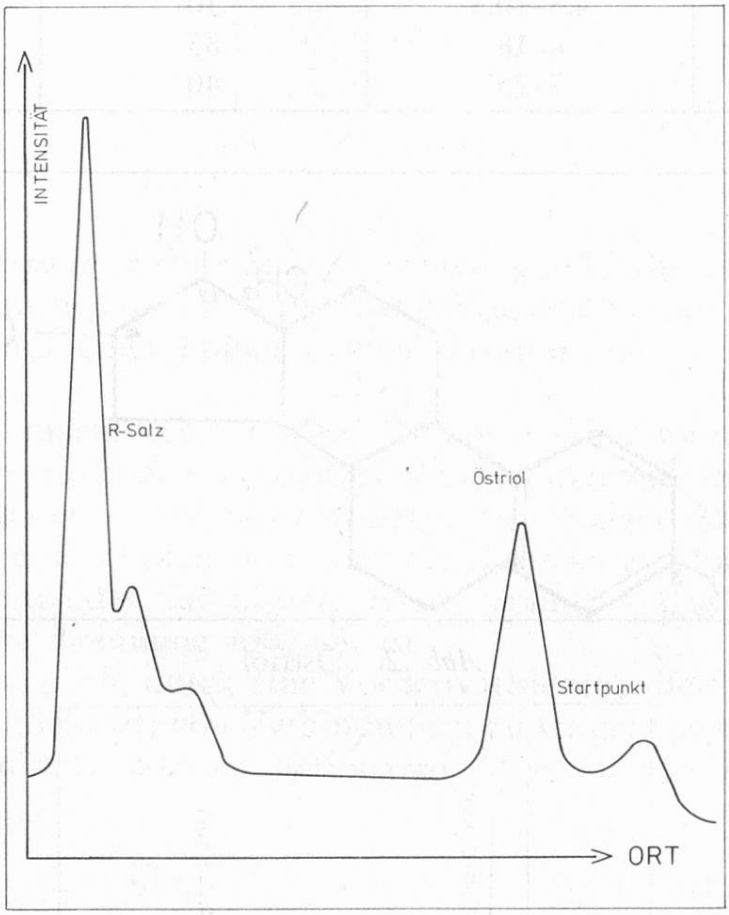


Abb. 4. Remissionskurve Östriol-Fast-Dark-Blue-R-Salz
Sorbens: HPTLC-KG-60; Fließmittel: Chloroform/Aceton (15/5); λ = 520 nm

Diese Diazotierung (Kupplung), die auf Arbeiten von *Weiss* (2—8) zurückgeht, ist heute Routinemethode bei der Quantifizierung von Östriol im 24-Stunden-Schwangernharn.

Diese Methode ist auch geeignet, die Vorderivatisierung direkt auf der DC-Platte durch Tauchen der DC-Platte in die Reagenzlösung vorzunehmen (9).

Da die Urinsammlung mit erheblichem Aufwand und Fehlermöglichkeiten behaftet ist, wird heute die Bestimmung des Östriols im Serum bevorzugt, wobei sich der Radioimmunoassay (RIA) als quantitatives Bestimmungsverfahren mit sehr niedrigen Nachweisgrenzen etabliert hat. Die angeführten dünnschichtchromatographischen Verfahren versagen in diesem Konzentrationsbereich wegen des zu geringen Östrolgehalts im Serum (siehe Tabelle 1).

Den einzigen Ausweg bietet in der quantitativen DC dann die Derivatisierung mit Fluoreszenzlabeln zu fluoreszierenden Verbindungen. Denn die in-situ-

Fluoreszenzmessung auf einer DC-Platte bietet gegenüber der Remissionsmessung entscheidende Vorteile:

- eine gesteigerte *Selektivität;*
- eine um den Faktor 100—1000 erhöhte *Empfindlichkeit;*
- bessere Linearität der Eichkurven (im unteren Arbeitsbereich);
- und daneben sind die Meßwerte unabhängig von der *Fleckform,* was für die Chromatographie von Extrakten aus biologischer Matrix besonders wichtig ist.

Als aromatisches Phenol läßt sich Östriol im alkalischen Bereich (pH = 8—10) mit dem Fluorenszenzlabel Dansylchlorid in einer Vorderivatisierung acylieren (10—12) (Abb. 5). Mit Hilfe dieses fluoreszierenden Esters ist es nun möglich, Östriol im pg/Fleck-Bereich quantitativ zu erfassen.

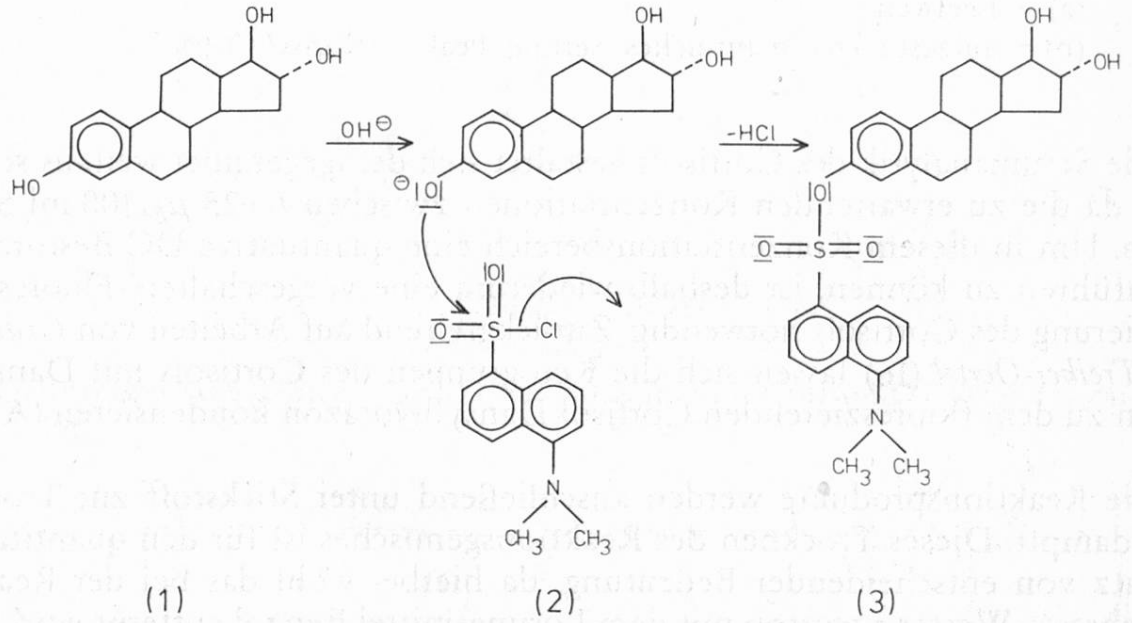


Abb. 5. Derivatisierung von Östriol (1) mit Dansylchlorid (2) zu Dansyl-Östriol (3)

Nach linearem Auftragen (10 μl/Spur Linomat) von Östrioldansylstandards erhält man lineare Eichfunktionen im Arbeitsbereich von 1—9 ng/Spur (r = 0,998; Fließmittel: Toluol/Dioxan/Methanol (8 : 2 : 1); λ_A = 313; λ_F = > 430).

In Abbildung 6 ist die Fluoreszenzortskurve von aufgestockten Serumextrakten dem Leerwert eines *männlichen Serumextrakts* gegenübergestellt (13).

Diese Methode erlaubt es, bei punktförmigem Auftrag (200 nl) noch 100 pg Östriol-Dansylester/Fleck quantitativ zu erfassen.

Quantitative Cortisolbestimmung (17, 18, 20)

Die quantitative DC-Bestimmung von nichtderivatisiertem Cortisol und dessen Metaboliten in Harnextrakten, die bis zu 11 mg/24 Stunden ausgeschieden werden, ist wenig problematisch (14), da hier pro DC-Fleck Substanzmengen im ng-Bereich nachgewiesen werden müssen.

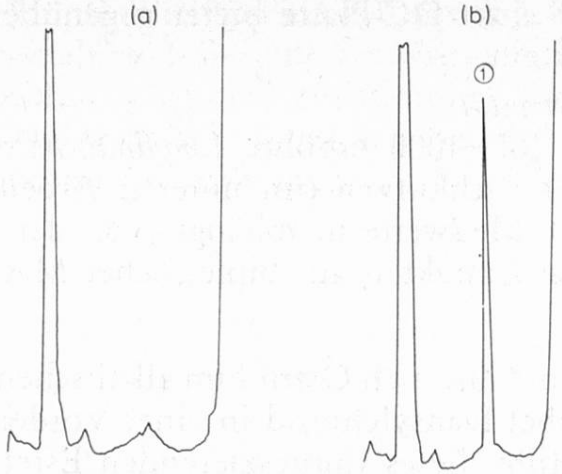


Abb. 6. Fluoreszenzortskurve von Serumextrakten
(a) = Leerwert
(b) = aufgestocktes männliches Serum; Peak 1: Dansyl-Östriol

Die Serumanalytik des Cortisols gestaltet sich demgegenüber weitaus schwieriger, da die zu erwartenden Konzentrationen zwischen 6—25 μg/100 ml Serum liegen. Um in diesem Konzentrationsbereich eine quantitative DC-Bestimmung durchführen zu können, ist deshalb wiederum eine vorgeschaltete Fluoreszenzmarkierung des Cortisols notwendig. Zurückgreifend auf Arbeiten von *Graef* (15) und *Treiber-Oertel* (16) lassen sich die Ketogruppen des Cortisols mit Dansylhydrazin zu dem fluoreszierenden Cortisol-Dansylhydrazon kondensieren (Abb. 7) (19).

Die Reaktionsprodukte werden anschließend unter Stickstoff zur Trockene eingedampft. Dieses Trocknen des Reaktionsgemisches ist für den quantitativen Umsatz von entscheidender Bedeutung, da hierbei wohl das bei der Reaktion entstehende Wasser azeotrop mit dem Lösungsmittel Benzol entfernt wird. Hierdurch wird das Reaktionsgleichgewicht offenbar quantitativ zur Seite der Reaktionsprodukte verschoben. Dieses grundsätzliche Problem jeder Vorderivatisierung, daß die Kinetik einer Derivatisierungsreaktion bei geringen Substanzkonzentrationen oft sehr langsame Reaktionsgeschwindigkeiten aufweist, wird hierdurch gelöst.

In Abbildung 8 ist die Fluoreszenzortskurve des Cortisol-Dansylhydrazons (CDH) dem Blindwert gegenübergestellt. Dabei ist festzustellen, daß die quantitative DC jedem herkömmlichen fluorometrischen Verfahren in einer Küvette überlegen ist, denn sie besitzt erhöhte Richtigkeit, da sie die Nebenprodukte (Peaks 1, 3, 4, 5 in Abb. 8) bei dieser Reaktion nicht miterfaßt.

Quantitativ verwertbare Ergebnisse lassen sich mit der HPTLC in diesem Arbeitsbereich aber nur erhalten, wenn besondere Bedingungen eingehalten werden:

Die Erfahrung mit der quantitativen Bestimmung vor allem fluoreszierender Substanzen auf einer HPTLC-Platte zeigt, daß unbehandelte Platten ein starkes Untergrundrauschen aufweisen. Dies stört dann aber besonders, wenn man

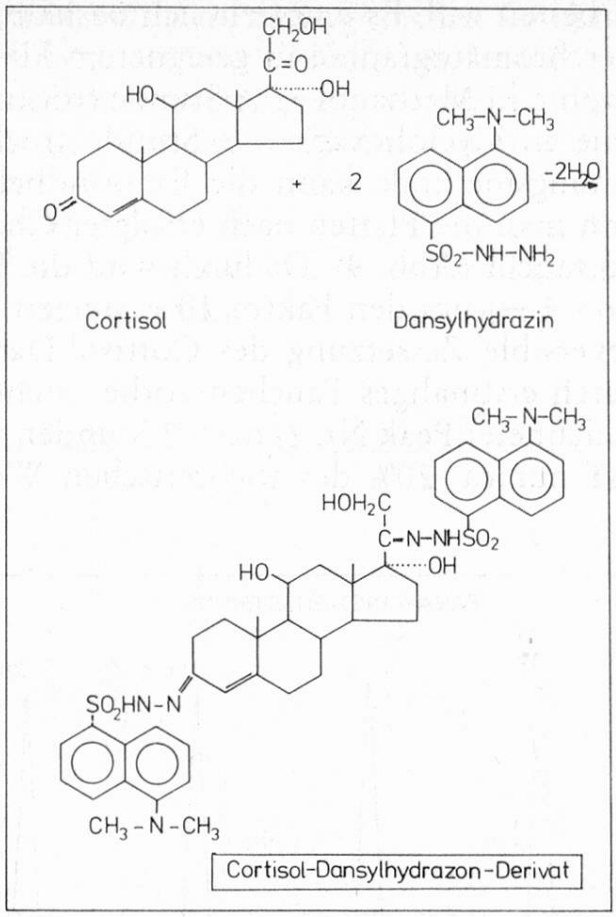


Abb. 7. Reaktion von Cortisol mit Dansylhydrazin zum Cortisol-Dansylhydrazon-Derivat

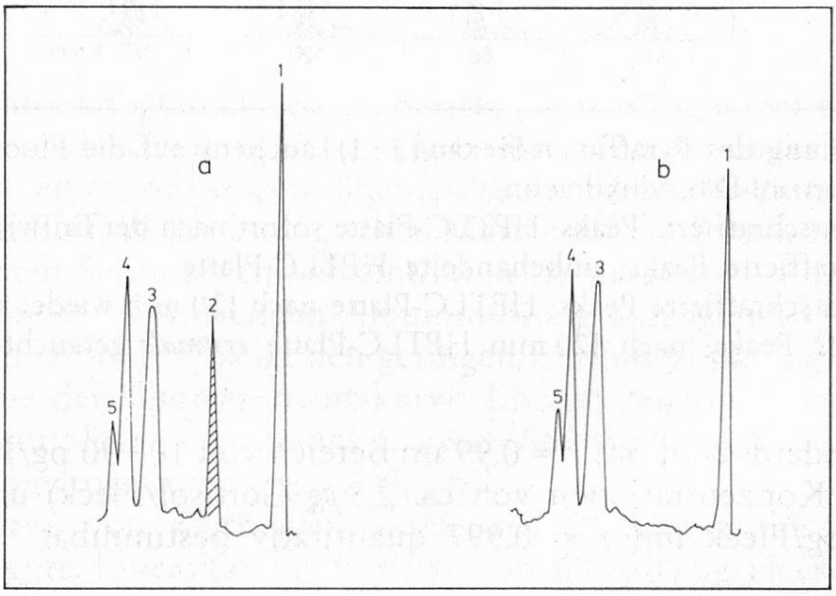


Abb. 8. Fluoreszenzortskurve von Cortisol-Dansylhydrazon (a) und Leerwert (b)
1 = Auftragpunkt
2 = Cortisol-Dansylhydrazon
3, 4, 5 = Nebenprodukte. Sorbens: HPTLC-KG-60; Fließmittel: Benzol/Dioxan/Methanol (8 : 2 : 1) λ_A = 365 nm; λ_F > 460 nm

im pg/Fleck-Bereich arbeiten will. Es empfielt sich deshalb, alle Platten vor Gebrauch durch eine Leerchromatographie in geeignetem Fließmitttel zu reinigen (z. B. Leerchromatographie in Methanol — ½ Stunde trocknen bei 120 °C; weitere Leerchromatographie in Cyclohexan — ½ Stunde trocknen bei 120 °C).

Bei dieser Bestimmungsmethode kann die Empfindlichkeit (21) signifikant gesteigert werden, wenn man die Platten nach erfolgter Chromatographie in ein Paraffin-/n-Hexan-Bad taucht (Abb. 9). Dadurch wird die Fluoreszenzintensität (ausgezeichnete Peaks — 1 —) um den Faktor 10 gesteigert. Ebenso läßt sich erkennen, daß eine irreversible Zersetzung des Cortisol-Dansylhydrazons unterbunden wird, denn durch erstmaliges Tauchen vorher nicht behandelter Platten (Abb. 9 schraffiert gezeichneter Peak Nr. 2) nach 2 Stunden wird die Fluoreszenzintensität lediglich auf nur ca. 20% des theoretischen Wertes gesteigert (20).

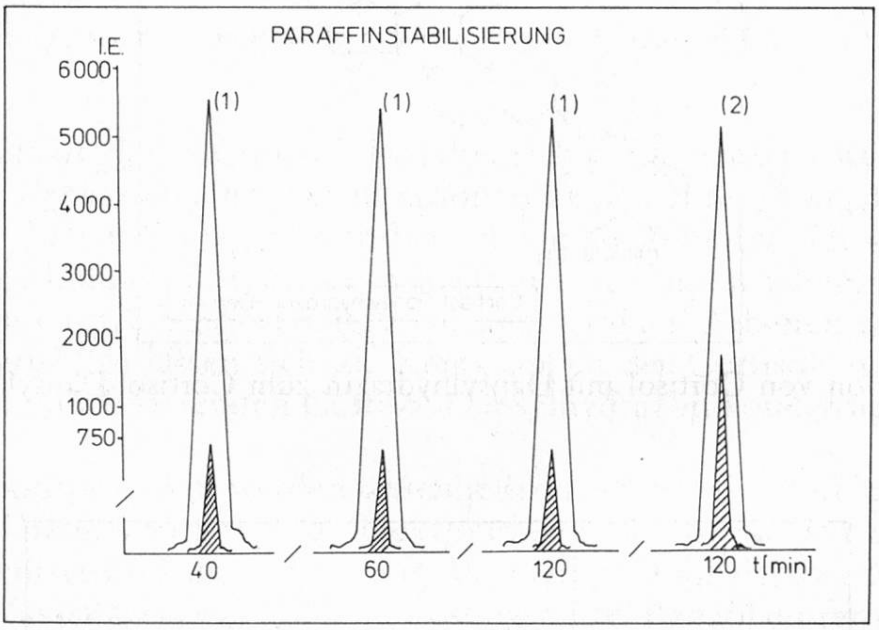


Abb. 9. Auswirkung des Paraffin-/n-Hexan-(2 : 1)Tauchens auf die Fluoreszenzausbeute von Cortisol-Dansylhydrazon:
(1) nichtschraffierte Peaks: HPTLC-Platte sofort nach der Entwicklung getaucht; schraffierte Peaks: unbehandelte HPTLC-Platte
(2) nichtschraffierte Peaks: HPTLC-Platte nach 120 min wieder getaucht; schraffierte Peaks: nach 120 min HPTLC-Platte *erstmals* getaucht

Cortisolstandards sind mit $r = 0{,}99$ im Bereich von 10—90 pg/Fleck (bei noch detektierbaren Konzentrationen von ca. *2,5 pg* Cortisol/Fleck) und im Bereich von 100—700 pg/Fleck mit $r = 0{,}997$ quantitativ bestimmbar.

Cortisolbestimmung in Serum

Die Serumanalytik im Spurenbereich gestaltet sich häufig schwierig, da diese komplexe Matrix oft eine Vielzahl, die Nachweisreaktion störende Begleitstoffe

entält. Dies gilt besonders, wenn man die gesuchte Komponente vor der quantitativen Bestimmung derivatisieren will. Daneben kann sich der relativ hohe Eiweißanteil auf die quantitative Bestimmung nachteilig auswirken. Deshalb empfiehlt es sich häufig, die zu bestimmende Komponente durch eine vorgeschaltete Extraktion abzutrennen.

In Abbildung 10 ist das nach einer Fertigsäulenextraktion eines wässerigen Cortisolstandards und anschließender Derivatisierung zum Cortisol-Dansylhydrazon erhaltene Chromatogramm (10 b) einem Leerwert (10 a) gegenübergestellt.

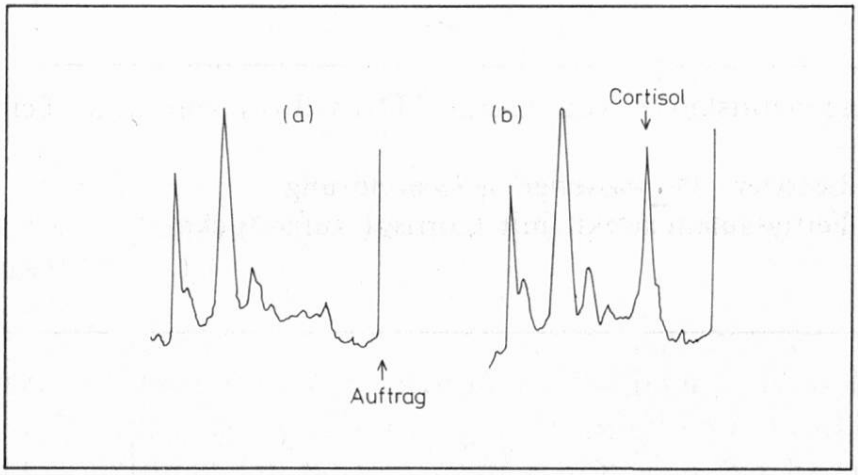


Abb. 10. Fluoreszenzortskurve von Cortisol-Dansylhydrazon nach Fertigsäulen-Extraktion
(a) = Leerwert
(b) = Fertigsäulenextrakt, mit Cortisol aufgestockt

Aus dem Chromatogramm des Leerwertes (10 a) ist dabei zu ersehen, daß es zur Zeit immer noch schwierig ist, untergrundfreies Säulenmaterial zu erhalten. Die Extraktion einer wässerigen Standardprobe läßt allerdings keine Rückschlüsse auf den Einfluß der biologischen Matrix auf die Extraktion zu. Um den Einfluß der hohen Serumeiweißkonzentration zu simulieren, wurde die gleiche Extraktion aus einer 3% wässerigen Albuminlösung durchgeführt. Das Leerwertchromatogramm (Abb. 11 a) zeigt den geringen Einfluß physiologischer Proteine auf die Basislinie der Fluoreszenzortskurve. Ebenso zeigt eine Aufstockung der wässerigen Albuminlösung mit reinen Cortisol-Standardlösungen (Abb. 11 b) vergleichbare Chromatogramme (vgl. Abb. 10 b).

Die Eichkurve von Cortisolextrakten aus 3%-Albuminlösung zeigt mit $r = 0{,}998$ eine gute Linearität im Bereich von 60—600 pg/Fleck.

Die Extraktion eines Humanserums führt zu einem Chromatogramm wie in Abbildung 12 dargestellt (12 c mit 480 pg Cortisol und 12 d mit 240 pg Cortisol aufgestockte Humanserumextrakte).

Serumextrakte dexametasonbehandelter Patienten, deren Serum nahezu cortisolfrei ist, zeigen in dem hier interessierenden Bereich der Fluoreszenzortskurve

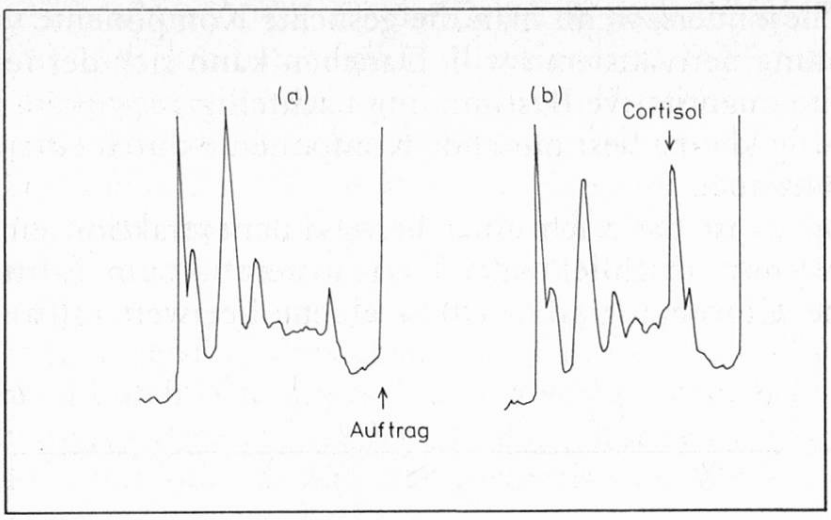


Abb. 11. Fluoreszenzortskurve von Cortisol-Dansylhydrazon nach Fertigsäulenextraktion
(a) = Leerwert 3% wässerige *Albumin*lösung
(b) = Fertigsäulenextrakt, mit Cortisol aufgestockt

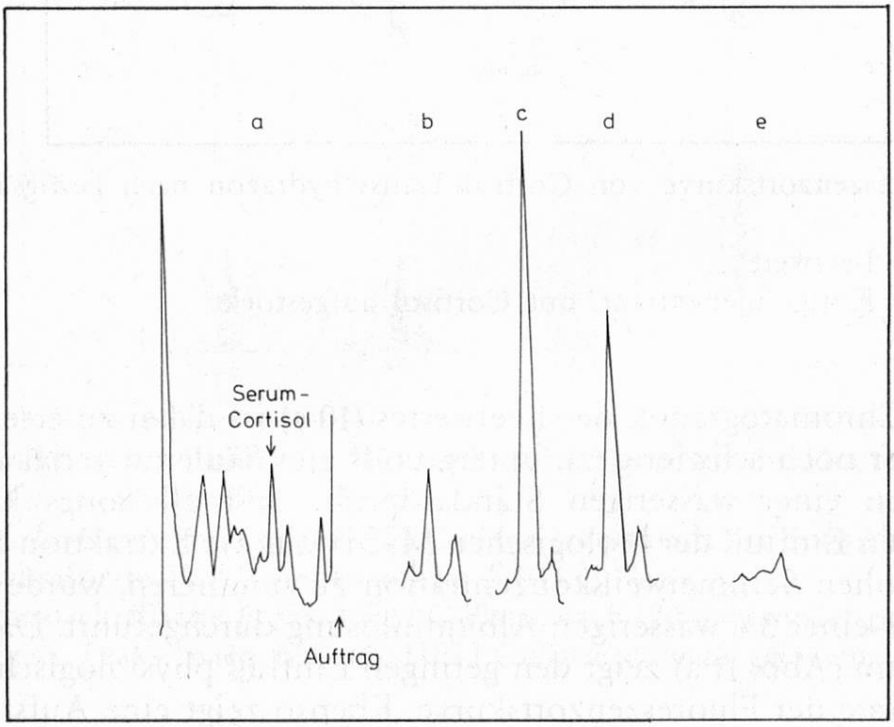


Abb. 12. Fluoreszenzortskurve eines Humanserum-Extrakts
(a) scan = 50 mm/min
(b) scan = 30 mm/min
(c) = Serum mit 480 pg C aufgestockt
(d) = Serum mit 240 pg C aufgestockt
(e) = Serum eines Dexamethason-Patienten

(Abb. 12 e) keine fluoreszierenden Komponenten. Diese quantitative HPTLC-Methode führt zu vergleichbaren Ergebnissen wie eine radioimmunologische Bestimmung (RIA) des Serumcortisols (Abb. 13).

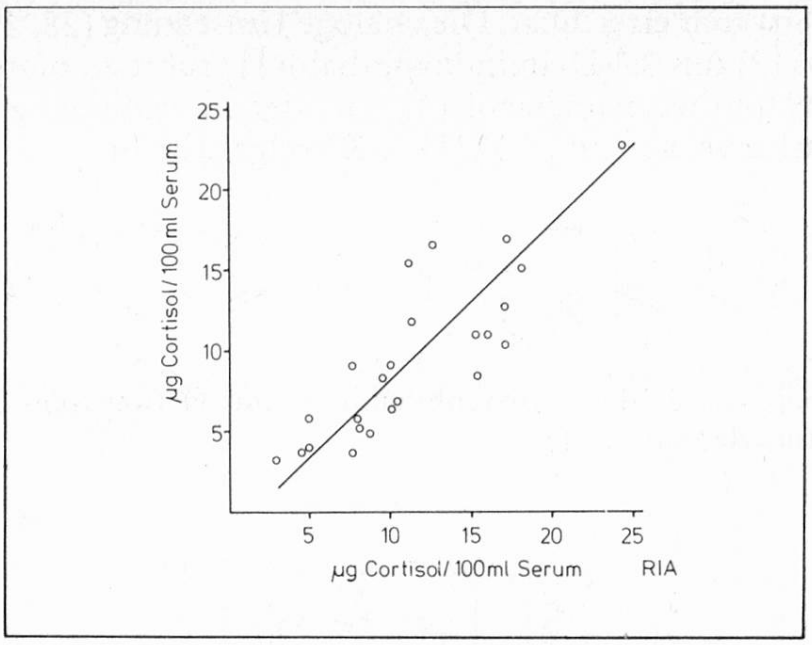


Abb. 13. Methodischer Vergleich: Quantitative Cortisolbestimmung in Serum
$Y = 0{,}9695\,x - 1{,}5$
$r = 0{,}8451$

Die Fluoreszenzintensität des Cortisol-Dansylhydrazons ist jedoch nur unter extrem sauberen Bedingungen stabil. Fast alle organischen Labordämpfe vermindern die Fluoreszenzintensität und machen damit den Nachweis unmöglich.

Quantitative Selenbestimmung (24—26)

Nach der deutschen Trinkwasserverordnung (27) ist eine photometrische Selenbestimmung (Abb. 14) gefordert, die auf einer Kondensation vierwertigen Selens (2) mit 1.2-Diaminobenzol (1) zu Benzoselenodiazol (3) beruht. Dieses Derivat des Selens läßt sich in Remission direkt auf einer DC-Platte quantitativ bestimmen und zeigt eine lineare Eichfunktion im Bereich von 2—8 ng Selen/Fleck (r = 0,99; Fließmittel: Toluol; λ = 330 nm).

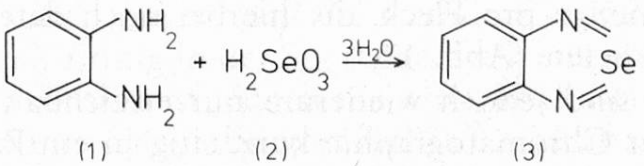


Abb. 14. Reaktion von o-Phenylendiamin (1) mit vierwertigem Selen (2) zu 2.1.3-Benzoselenodiazol (3)

Mit dieser quantitativen HPTLC-Methode ist es möglich, den geforderten Grenzwert von 8 µg Selen pro Liter Trinkwasser zu überwachen. Jedoch ist diese Methode ungeeignet, um Selen im Bereich der natürlichen Grundbelastung (ca. 100 ng Selen/Liter) nachzuweisen. Dieser Arbeitsbereich ist nur mit fluoreszie-

renden Selenderivaten erreichbar. Die analoge Umsetzung (28, 29) (Abb. 15) vierwertigen Selens (2) mit 2.3-Diaminonaphthalin (1) führt zu orangerot fluoreszierendem 2.1.3-Naphthoselenodiazol (3), mit der in Abbildung 16 dargestellten Fluoreszenzortskurve auf einer HPTLC-Kieselgelschicht.

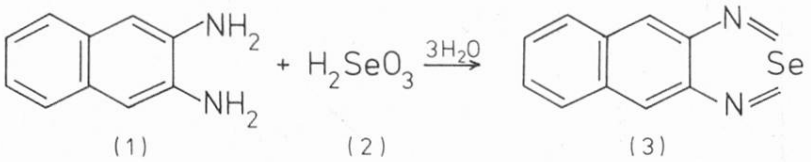


Abb. 15. Reaktion von 2.3-Diaminonaphthalin (1) mit vierwertigem Selen (2) zu 2.1.3-Naphthoselenodiazol (3)

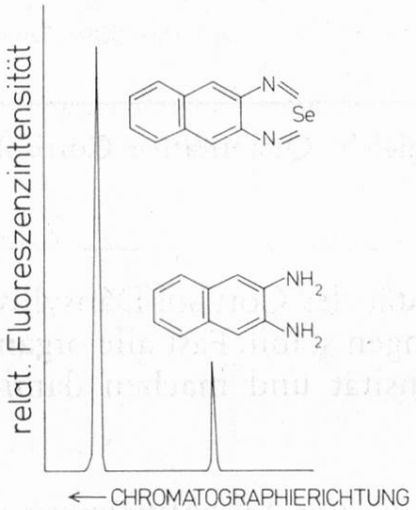


Abb. 16. Fluoreszenzortskurve von 2.1.3-Naphthoselenodiazol und 2.3-Diaminonaphthalin
Sorbens: HPTLC-KG-60; Fließmittel Toluol; λ_A = 365 nm; λ_F > 560 nm

Diese Verbindung zeigt eine lineare Eichfunktion im Arbeitsbereich von 14—93 pg Selen/Fleck (r = 0,998) bei einem Auftragvolumen von 200 nl. Die niedrigste Substanzmenge pro Fleck, die hierbei noch detektiert werden kann, liegt bei etwa 2 pg Selen (Abb. 17).

Diese Ergebnisse sind jedoch wiederum nur erreichbar, wenn die HPTLC-Platten nach erfolgter Chromatographie kurzzeitig in ein Paraffin-n-Hexan-Gemisch (2 : 1) (21) getaucht werden. Wie in Abbildung 18 dargestellt, wird damit die Fluoreszenzausbeute gegenüber nicht behandelten Flecken (I) (schraffiert gezeichnet) um den Faktor 25 (nichtschraffierte Peaks) gesteigert. Darüber hinaus stabilisiert diese Behandlung die Fluoreszenz über einen längeren Zeitraum und verhindert eine Zersetzung des 2.1.3-Naphthoselenodiazols. Werden vorher nicht behandelte DC-Platten nach einer fünfstündigen Lagerzeit erstmals behandelt (schraffiert gezeichneter Peak II), so steigt die Fluoreszenz nur auf etwa 10% der Fluoreszenz behandelter Flecke, die nach einem weiteren Tauchen

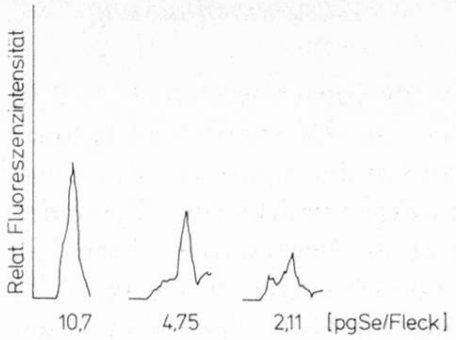


Abb. 17. Ausschnitte der Fluoreszenzortskurve von 2.1.3-Naphthoselenodiazol im Bereich der Nachweisgrenze

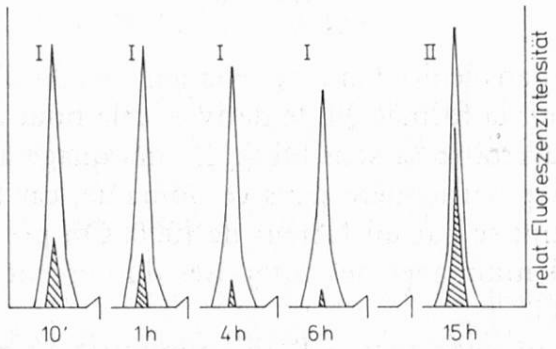


Abb. 18. Auswirkung des Paraffin-/n-Hexan-(2 : 1)Tauchens auf die Fluoreszenzausbeute:
(I) nichtschraffierte Peaks: HPTLC-Platte sofort nach der Entwicklung getaucht; schraffierte Peaks: HPTLC-Platte nicht getaucht
(II) nichtschraffierte Peaks: HPTLC-Platte nach 15 h *nochmals* getaucht; schraffierte Peaks: HPTLC-Platte nach 15 h *erstmals* getaucht

wieder die ursprüngliche Fluoreszenz aufweisen (nichtschraffierter Peak II). Extrahiert (Rührextraktion) man das entstandene 2.1.3-Naphthoselenodiazol mit Cyclohexan aus einer wässerigen Probe, ist es möglich, Selen im Arbeitsbereich von 200 ng Selen/Liter Wasser bis 6 μg Selen/Liter Wasser ($r = 0{,}999$) quantitativ zu erfassen.

Diese Beispiele sollen zeigen, daß die quantitative HPTLC fluoreszenzmarkierter Substanzen mit Erfolg in der Spurenanalytik eingesetzt werden kann. Die hierzu notwendige Präzision ist jedoch nur erreichbar, wenn die Analysengeräte dem Standard der «instrumentalisierten HPTLC» (Auftragegeräte, Trennkammern und Chromatogrammspektralphotometer) entsprechen.

Dank

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Firmen Camag, Muttenz, Schweiz und E. Merck, Darmstadt, durchgeführt.

Zusammenfassung

Eine quantitative Analytik im Spurenbereich ist häufig nur dann möglich, wenn das Analysenverfahren einen Derivatisierungschritt beinhaltet. Dies, um einmal die Spezifität des Verfahrens zu erhöhen und vor allem, um die Empfindlichkeit des Verfahrens zu steigern. Hierbei kommt der Fluoreszenzmarkierung besondere Bedeutung zu, da hierdurch die Nachweisempfindlichkeit eines Analysenverfahrens bis um den Faktor 1000 erhöht werden kann. Die Fluoreszenzmarkierung von Östriol, Cortisol und Selen und deren quantitative Direktbestimmung mit Hilfe der HPTLC wird vorgestellt. Ein Verfahrensvergleich mit Radioimmunoassay zeigt die Gleichwertigkeit dieser Methode auf.

Résumé

L'analyse quantitative dans le domaine des éléments traces n'est souvent possible que si le procédé analytique inclut la formation de dérivés; cela pour augmenter la spécificité du procédé et surtout pour accroître sa sensibilité. Le marquage avec des composés fluorescents revêt une importance particulière dans ce domaine, car la sensibilité d'un procédé analytique peut être multipliée par un facteur de 1000. On présente ici le marquage d'oestriol, de cortisol et de sélénium avec des composés fluorescents et leur évaluation quantitative directe par HPTLC.

La comparaison de ce procédé avec le Radioimmunoassay montre l'équivalence de ces deux méthodes.

Summary

The quantitative determination in the trace range of compounds frequently needs a derivative step. This leads to a higher specificity and especially an increase in the sensitivity of the analytical method. As a derivatisation procedure the fluorescence labelling is of main interest, because it normally reduces the limit of determination by a factor of 1000. For example the fluorescence labelling of estriol, cortisol and selenium and their quantitative in-situ HPTLC determination are presented. Compared with Radioimmunoassay the HPTLC shows at least similar performance characteristics.

Literatur

1. *Ritter, W.:* Thin-layer densitometric determination of Mucolimine. A structurally new diuretic drug, at the nanogram level in biological fluids. J. Chromatogr. **142**, 431–440 (1977).
2. *Weiß, P. A. M:* Kurzhydrolyse von Östriolkonjugaten aus Schwangerenharn. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. **12**, 279–281 (1974).
3. *Weiß, P. A. M.:* Einfache quantitative Bestimmung von Östron, Östradiol und Östriol mittels Dünnschichtchromatographie und Chromatogrammspektralphotometrie sowie deren praktische Anwendung zur Bestimmung von Östriol aus Schwangerenharn. Endokrinologie **59**, 273–278 (1972).
4. *Weiß, P. A. M.:* Quantitative Östriolbestimmung aus Schwangerenharn mittels Chromatogrammspektralphotometrie. Geburtsh. u. Frauenheilk. **30**, 623–629 (1970).

5. *Weiß, P. A. M.:* Zur dünnschichtchromatographischen Schnellbestimmung von Östriol aus Harn von Schwangeren. Geburtsh. u. Frauenheilk. **35**, 475—477 (1975).
6. *Weiß, P. A. M.:* Die Ausscheidung von Östriol-3-Sulfat im Harn von Schwangeren während des letzten Trimenons. Endokrinologie **65**, 249—253 (1975).
7. *Weiß, P. A. M., Esterbauer, H.* und *Scherr, F.:* Die Ausscheidung von Östriol, Östetrol, 16-Epi-Östriol, 16-Keto-Östradiol und 16-Hydroxy-Östron im 24-Stunden-Harn Schwangerer des letzten Trimenons. Endokrinologie **65**, 254—265 (1975).
8. *Weiß, P. A. M., Winter, R., Scherr, F.* und *Bayer, H.:* Die Überwachung der Risikoschwangerschaft anhand der Ausscheidung von Östriol-16-Glucuronid. Geburtsh. u. Frauenheilk. **36**, 256—262 (1976).
9. *Lewitzky, E.:* Diplomarbeit. FH-Gießen 1979.
10. *Kammerl, E.* und *Mutschler, E.:* Überprüfung der Einzeldosierung in der Arzneimittelqualitätskontrolle entsprechend dem Content Uniformity Test durch direkte quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen, 4. Mitteilung Pharmaz. Acta Helvetiae **50**, 269—274 (1975).
11. *Vogt, K.* und *Oehrle, K. L.:* Dünnschichtchromatographische Identifizierung und Bestimmung von Steroidöstrogenen und Stilbenderivaten in Kälberurin als Dansylester. Arch. Lebensmittelhyg. **28**, 44—50 (1977).
12. *Fishman, S.:* Determination of estrogens in dosage forms by fluorencence using dansylchlorid. J. Pharm. Sc. **64**, 674—680 (1975).
13. *Arndt, F.:* Dissertation. Universität Gießen (in Vorbereitung).
14. *Götz, Sachs, Wimmer:* Dünnschichtchromatographie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1978.
15. *Graef, V.:* Methode zur fluorometrischen Bestimmung von Oxosteroiden mit Dansylhydrazin. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. **8**, 320 (1970).
16. *Treiber, L.* und *Oertel, G. W.:* Zur Bestimmung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. **5**, 84—86 (1967).
17. *Boll, E.:* Diplomarbeit. FH-Gießen 1980.
18. *Kerler, R.:* Diplomarbeit. FH-Gießen 1981.
19. *Kawasaki, T., Maeda, M.* and *Tsuji, A.:* Determination of plasma and urinary cortisole by HPLC using fluorenscence derivatisation with dansylhydrazin. J. Chromatogr. **163**, 143—150 (1979).
20. *Funk, W., Kerler, R., Boll, E.* and *Dammann, V.:* High-performance thin-layer chromatographic determination of fluorescence-labelled cortisol. J. Chromatogr. **217**, 349—355 (1981).
21. *Uchiyama, S.* and *Uchiyama, M.:* Fluorescence enhancement in TLC by spraying vicous organic solvents. J. Chromatogr. **153**, 135—142 (1978).
22. *Scott, N. R.* and *Dixon, P. F.:* Determination of cortisol in human plasma by reversed-phase HPLC. J. Chromatogr. **164**, 29—34 (1979).
23. *Lautto, O.* et al.: Interlaboratory evaluation of 4 RIA-bits for determination of plasma Cortisol, with special reference to accuracy. Clin. Chem. **26**, 1899—1902 (1980).
24. *Vogt, H.:* Diplomarbeit. FH-Gießen 1980.
25. *Funk, W., Vogt, H., Dammann, V.* und *Weyh, C.:* Dünnschichtchromatographische Selenbestimmung. Vom Wasser **55**, 217—226 (1980).
26. *Funk, W., Vogt, H.* and *Dammann, V.:* Trace analysis of selenium in water. In: Bertsch, W., Hara, S., Kaiser, R. E., Zlatkis, A.: Instrumental HPTLC, S. 97—111. A. Hüthig Verlag, Heidelberg 1980.

27. *Quentin, K. E.:* Die Trinkwasserverordnung (Hrsg. K. Aurand), S. 127–133. Schmidt Verlag, Berlin 1976.
28. *Hall, R. J.* and *Gupta, P. L.:* The determination of very small amounts of selenium in plant samples. Analyst **94**, 292–299 (1969).
29. Analytical Methods Comittee: Determination of small amounts of selenium in organic matter. Analyst **104**, 778–787 (1979).

Prof. W. Funk
Fachhochschule Gießen-Friedberg
Wiesenstraße 14
D-6300 Gießen

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 73, 155–160 (1982)

Quantitative Dünnschichtchromatographie: Praktische Erfahrungen mit der direkten spektrophotometrischen Auswertung

Quantitative Thin-Layer Chromatography: Practical Experience with the «in situ» Spectrophotometric Evaluation

G. Székely
Zentrale Analytik, Ciba-Geigy AG, Basel

Einleitung

Die quantitative Dünnschichtchromatographie (DC) setzen wir hauptsächlich für selektive Gehaltsbestimmungen ein. Bisher wurden zahlreiche Wirksubstanzen in pharmazeutischen Darreichungsformen, in agrochemischen Formulierungen und in verschiedenen anderen chemischen Produkten bestimmt. Um unsere Arbeitswiese aufzuzeigen, wird ein konkretes Beispiel herausgegriffen. Es handelt sich um die Bestimmung der pharmazeutischen Wirksubstanz 6-Chlor-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazin-7-sulfonamid-1,1-dioxid in ESIDREX® 25 mg Tabletten, zwecks Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit.

Experimentelles

Extraktion

Jede einzelne ESIDREX® 25 mg Tablette wird mit 25 ml Ethanol naß zermahlen. Zu diesem Zweck wird eine von der Laborautomation der Ciba-Geigy entwickelte und als PREPSET bezeichnete Vorrichtung angewendet (1). Dieses einfache Gerät besteht aus 5 Einzelteilen (Abb. 1) und wird ab Frühling 1982 im Handel erhältlich sein (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die Wolfram-Karbid-Kugel, die Tablette und 25 ml Ethanol werden in das Extraktionsgefäß aus Polypropylen gegeben und dieses mit dem Schraubdeckel verschlossen. Die Extraktion erfolgt durch Schütteln innerhalb einiger Minuten. Nachdem die Wirksubstanz in Lösung gegangen ist, kann die Suspension durch Einschieben des Filtereinsatzes filtriert werden. Als Standardlösung werden 25 mg Wirksubstanz in 25 ml Ethanol gelöst.

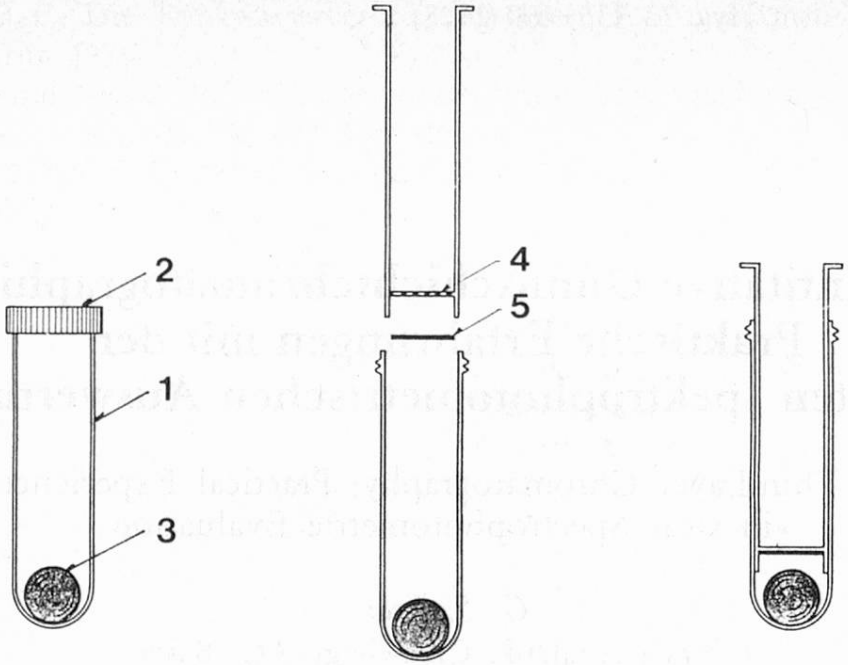


Abb. 1. PREPSET Extraktionsvorrichtung
1 = Extraktionsgefäß
2 = Schraubdeckel
3 = Wolfram-Karbid-Kugel
4 = Filtereinsatz mit Siebboden
5 = Filter

Chromatographische Trennung

Konventionelle Kieselgel-60 F 254-Fertigplatten, Format 20 x 20 cm (Merck Art. Nr. 5715) werden mit einem speziellen Schneidegerät (2) in 10 x 20 cm Stükke geteilt. Das Auftragen der Probelösungen erfolgt mit kalibrierten 1 μl Glaskapillaren, 15 mm vom unteren Plattenrand entfernt. Bei 17 Auftragungen pro Platte beträgt der seitliche Abstand zwischen den einzelnen Startpunkten 9 mm. Pro Platte werden 4 Tablettenextrakte je zweimal aufgetragen; jeder Extrakt ist von einem Standard flankiert (Abb. 2). Die aufgetragenen Lösungen läßt man bei Raumtemperatur und 50—60% relativer Feuchte eintrocknen. Danach wird die Platte in einer ungesättigten Camag-Doppeltrogtrennkammer für 10 x 20 cm Platten mit dem Fließmittel Chloroform-Essigsäureethylester-Methanol (4 : 5 : 1) chromatographiert. Die Laufzeit beträgt 20 Minuten für 8 cm Laufstrecke und die zu bestimmende Wirksubstanz befindet sich bei ungefähr Rf 0,28.

Spektrophotometrische Messung

Als Meßgerät wird ein Shimadzu High Speed TLC-Scanner Model CS-920 verwendet. Dieses Instrument besitzt einen Gittermonochromator für den Wellenlängen-Bereich 200—630 nm, Bahnwechselautomatik, Zickzack-Abtastung so-

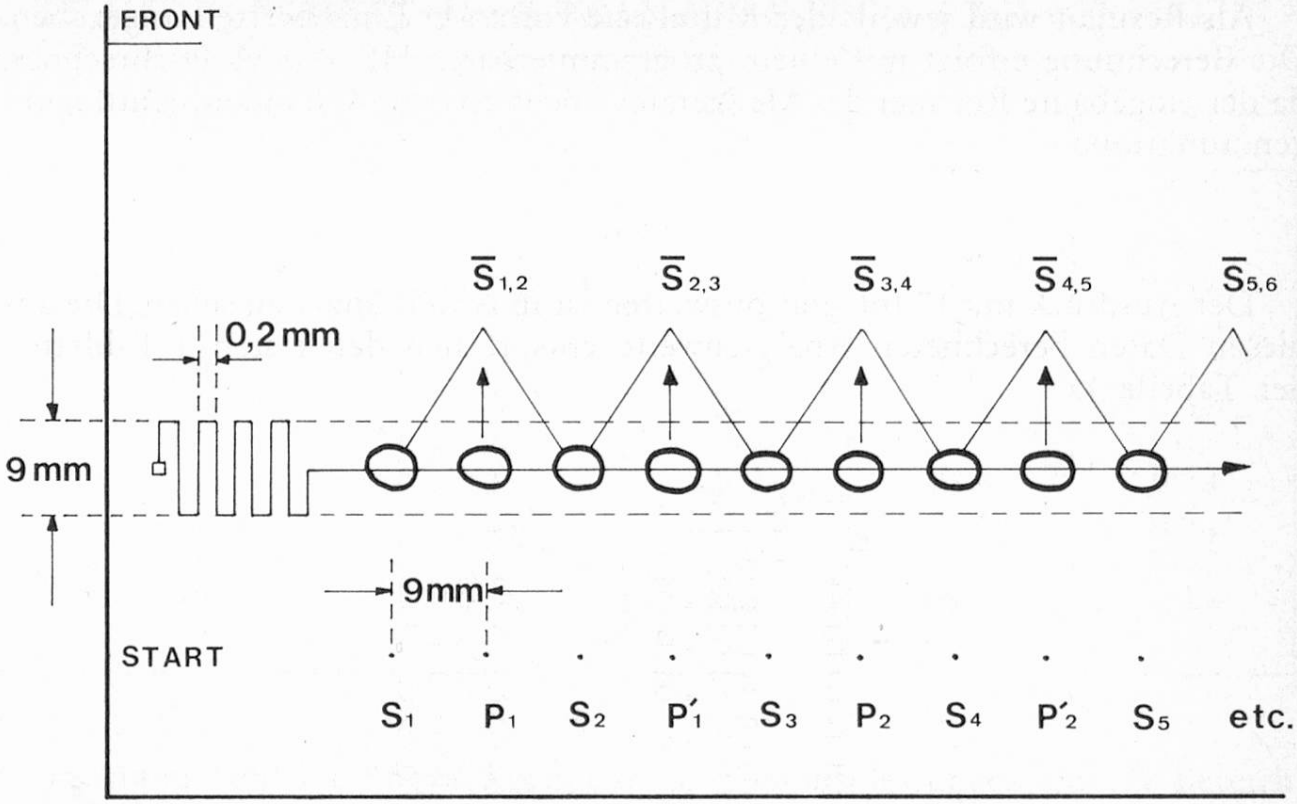


Abb. 2. Laterale Messung, quer zur Laufrichtung
S_1—S_9 = Standards entsprechend 100% der Deklaration
P_1, P_1' etc. = Proben, jeweils zweimal aufgetragen

Die Proben werden jeweils auf den Mittelwert der beiden direkt benachbarten Standards bezogen

wie eingebauten elektronischen Integrator mit Drucker, Linearisierungs-Korrektur gemäß *Kubelka-Munk* (3) und einen Rechner für Eichungen mit internen bzw. externen Standards.

Im erwähnten Beispiel erfolgt die Messung im Remissionsverfahren bei 270 nm Wellenlänge, mit 1,2 x 1,2 mm Lichtfleck und 9 mm Mäander-Breite, quer zur Trennrichtung (Abb. 2). Diese vorteilhafte laterale Messung wurde bereits beschrieben (4, 5) und bedingt konstante R_f-Werte sowie vollständig getrennte Zonen. Eine Platte kann auf diese Weise in 3 Minuten gemessen werden. Dank der automatischen Korrektur der Remissionswerte nach Kubelka-Munk ist das Verhältnis zwischen Konzentration und Meßwert im Bereich von 0,2—20 μg Substanz pro Zone linear.

Berechnung

$$\text{mg Wirksubstanz pro Tablette} = 25 \frac{I_P}{I_{\bar{S}}}$$

I_P = Integrationswert der Probe

$I_{\bar{S}}$ = Integrationsmittelwert der beiden direkt benachbarten Standards

Als Resultat wird jeweils der Mittelwert von zwei Einzelwerten angegeben. Die Berechnung erfolgt mit einem programmierbaren HP 9815 A Tischrechner, da der eingebaute Rechner des Meßgerätes höchstens mit 4 Standard-Auftragungen funktionert.

Beispiel

Der Ausdruck mit 17 Integrationswerten ist in Abbildung 3 zu sehen. Die aus diesen Daten berechneten Analysenwerte entsprechen den ersten 4 Tabletten der Tabelle 1.

LANE NO. 1

#	DIST.	AREA
1	29.6	3848
2	38.4	3943
3	47.6	3720
4	56.0	3788
5	65.2	3742
6	74.0	3897
7	83.2	3689
8	92.4	3882
9	101.2	3597
10	110.0	3551
11	119.2	3619
12	128.0	3575
13	137.2	3709
14	146.0	3784
15	155.2	3756
16	164.0	3720
17	172.8	3759

Abb. 3. Ausdruck einer nach erwähntem Schema chromatographierten Platte
1. Kolonne = Nr. der Auftragung
2. Kolonne = Abstand der jeweiligen Zonenmitte vom Plattenrand
3. Kolonne = Integrationswerte

Diskussion

Der Vergleich des Probeflecks mit jeweils direkt benachbarten Standards ist von Vorteil. Damit werden offensichtlich die von der Schichtdicke-Schwankung

Tabelle 1. ESIDREX 25 mg Tabletten, Beispiel von Analysenwerten

Tablette	1. Wert mg	2. Wert mg	Mittelwert	
			mg	% Deklaration
1	26,1	25,4	25,7	102,8
2	26,2	26,6	26,4	105,6
3	24,6	24,4	24,5	98,0
4	25,3	24,8	25,0	100,0
5	26,2	26,5	26,4	105,6
6	25,9	26,2	26,1	104,4
7	25,5	26,3	25,9	103,6
8	26,5	26,1	26,3	105,2
9	25,2	25,4	25,3	101,2
10	25,8	25,9	25,9	103,6

verursachten Fehler teilweise korrigiert. Remissionsmessungen im UV-Bereich mit verschiedenen Substanzen ergaben Streuungen zwischen 1—2% relative Standardabweichung, jedoch sind Chromatogramme mit runder oder ovaler Fleckenform und gleichmäßiger Steighöhe Voraussetzung. Durch wiederholte Messung ein und derselben DC-Zone (n = 20) mit jeweils 1 μg Substanz, wurde die Genauigkeit des verwendeten Instrumentes mit verschiedenen Substanzen überprüft. Sie beträgt ungefähr 0,2% relative Standardabweichung. Der Hauptanteil der Gesamtstreuung wird somit nicht vom Scanner, sondern von Fehlern beim Auftragen der Lösungen und von der Chromatographie verursacht. Versuche mit Kieselgel-HPTLC-Fertigplatten (Merck Art. 5 642) anstelle der erwähnten konventionellen Fertigplatten haben auf die Gesamtstreuung keinen Einfluß gezeigt.

Dank

Mein Dank gilt Frau *B. Abt* für technische Assistenz und Herrn PD Dr. *H. Bartels* (Laborautomation, Ciba-Geigy, Basel), der uns die erwähnte PREPSET-Vorrichtung zur Verfügung stellte.

Zusammenfassung

Anhand eines konkreten Beispiels wird eine quantitative DC-Methode zur selektiven Gehaltsbestimmung beschrieben. Die chromatographische Trennung erfolgt auf konventionellen DC-Fertigplatten, welche mit einem speziellen Schneidegerät in 10 x 20 cm Stücke geschnitten werden. Als Meßgerät hat sich der Shimadzu CS-920 Scanner mit eingebautem elektronischem Integrator bewährt. Bei sorgfältiger Arbeit beträgt die Genauigkeit der Methode 1—2% relative Standardabweichung.

Résumé

Une méthode quantitative de chromatographie sur couche mince pour la détermination sélective de substances actives est décrite à l'aide d'un exemple. La séparation a lieu sur des plaques préfabriquées classiques coupées en deux parties de 10 x 20 cm. Le Scanner CS-920 de Shimadzu avec intégrateur électronique a fait ses preuves comme instrument de mesure. Une précision de 1 à 2% (écart-type relatif) peut être atteinte avec la méthode décrite.

Summary

By means of an example this paper describes the selective determination of active substances by quantitative TLC. The chromatographic separation is accomplished on conventional precoated plate cut to the size of 10 x 20 cm with a special cutter. The Shimadzu CS-920 Scanner with built-in electronic integrator has proved suitable for the measurement. Provided the work is carried out carefully, the precision of the method as measured by the relative standard deviation is 1—2%.

Literatur

1. *Bartels, H.* und *Walser, P. E.:* Geplanter Vortrag an «Pitsburgh Conference», Atlantic City, N.J., März 1982
2. *Delley, R.* und *Székely, G.:* Die Effizienz der Schichtchromatographie. Anwendung dieser Größe zur visuellen Beurteilung von Trennungen mit 20-cm- oder 10-cm-Platten. Chimia **32**, 261—265 (1978).
3. *Yamamoto, H., Kurita, T., Suzuki, J., Hira, R., Nakano K., Makabe H.* and *Shibata K.:* Dual-wavelenght point zig-zag scanning of zones on thin-layer chromatograms as tool of quantitative assay. J. Chromatogr. **116**, 29—41 (1976).
4. *Székely, G.:* Contribution au développement de méthodes physicochimiques pour la séparation, l'identification et la détermination quantitative de Substances organiques. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel, 1973, Seite 87.
5. *Kreuzig, F.:* Application of quantitative high-performance thin-layer chromatography in the antibiotic industry. J. Chromatogr. **142**, 441—447 (1977).

Dr. G. Székely
Zentrale Analytik
Ciba-Geigy AG
CH-4002 Basel

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 73, 161–165 (1982)

Anwendung einer modifizierten Keilstreifenmethode in der HPTLC

Application of a Modified Tapered-Strip Method in HPTLC

P. Georges
Eidg. Alkoholverwaltung, Chemisch-technische Abteilung, Bern

Einleitung

Reindel et al. (1) und *Matthias* (2) beschreiben eine Methode, die in der Papierchromatographie als «Keilstreifentechnik» bekanntgeworden ist. Durch zungenförmiges Zuschneiden der Papierstreifen zwingt man die Stoffe zu bandenförmiger Auflösung. *Stahl* (3) übertrug die Technik auf die Sorptionsschichten in der TLC.

Es fällt auf, daß bei der Optimierung eines Trennverfahrens in der HPTLC die an sich bewährte Keilstreifentechnik kaum noch angewendet wird. Offensichtlich ist das aufwendige Vorbereiten der Platten Grund genug, um auf die vorzügliche Trennleistung dieser Methode zu verzichten.

Das Ziel dieser Arbeit war, die übliche Keilstreifentechnik so zu vereinfachen, daß ihre Anwendung für spezielle Trennprobleme wieder in Frage kommen kann.

Methode

Eine präzis gefertigte Lochschablone in der Größe der zu verwendenden HPTLC-Platte wird genau über diese gelegt und angepreßt. Mit Hilfe eines spitzigen Stahlnagels werden den kreisrunden Bohrungen entlang entsprechende Kreise in das Schichtmaterial geritzt. Zweckmäßigerweise wird mit einem etwas stumpferen Gegenstand nachgekratzt, so daß zum Schluß auf der Schicht 0,5–1 mm breite Ringe vorhanden sind. Das vollständige Entfernen der Kreisflächen ist unnötig.

Die Schablone wird parallel zum Plattenrand nach innen verschoben und je das äußerste Ringpaar mit einer Kerbe verbunden, damit die Zonenbreite gewahrt bleibt. Schließlich wird überschüssiges Schichtmaterial weggeblasen oder mit einem sehr weichen Haarpinsel entfernt.

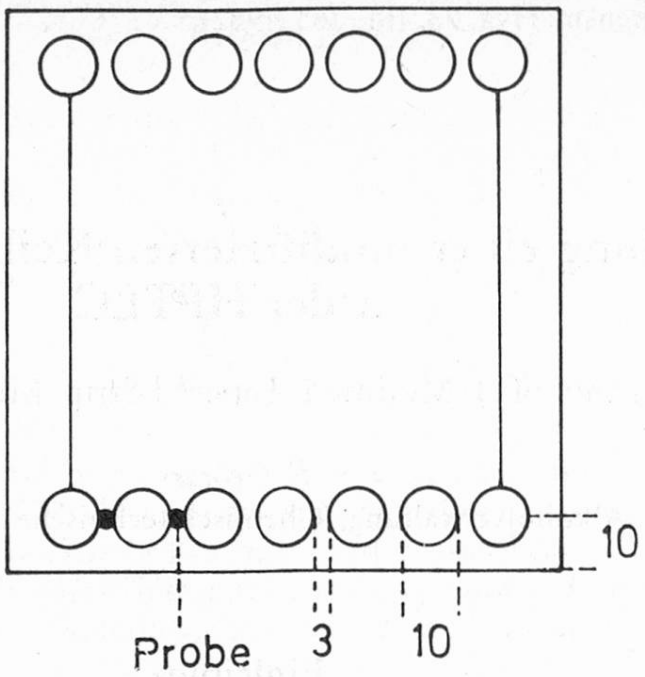


Abb. 1. HPTLC-Platte mit modifizierten Keilstreifen
Vorbereitungszeit ca. 2—3 min, Masse in mm

Die Probe wird am besten mit einem Mikroapplikator in der Mitte des jeweiligen Steges aufgetragen. Die Probemenge ist so zu dosieren, daß der sich bildende Fleck die Stegbreite eben gerade ausfüllt.

Nach dem Trocknen wird die Platte mit Vorteil in einer HPTLC-Linear-Entwicklungskammer horizontal von beiden Seiten her entwickelt.

Die übliche Tankentwicklung erfordert eine Unterbrechung der Seitenstreifen durch zusätzliche Kerben, deren Höhe im Vorversuch zu ermitteln ist, um Randeffekte weitgehend auszuschließen. Außerdem sind die Kreise entsprechend dem Fließmittelniveau um ca. 5 mm höher anzubringen.

Apparate

Schablone	Plexiglas 100 x 100 mm, Dicke 5 mm, eigene Ausführung entsprechend Abbildung 1
Probenauftragegerät	Micro-Applicator mit Grundplatte (Camag)
Entwicklungskammer	HPTLC-Linear-Entwicklungskammer (Camag)
Plattenmaterial	HPTLC-Fertigplatten, 100 x 100 mm (Merck)

Anwendung

Selbstverständlich ist die Anwendung dieser Technik nicht nur auf HPTLC-Schichten begrenzt. Speziell gute Dienste leistet die Methode — unabhängig vom

verwendeten Schichtmaterial — bei der Trennung natürlicher Extrakte und Konzentrate, wo eine vorgängige Abtrennung störender Begleitstoffe nicht oder nur in unvollkommener Weise vorgenommen werden kann.

Als Beispiel diene der Nachweis von Restzucker in vergorenem Kirschensaft, der lediglich durch ein Papierfilter filtriert wurde (Abb. 2).

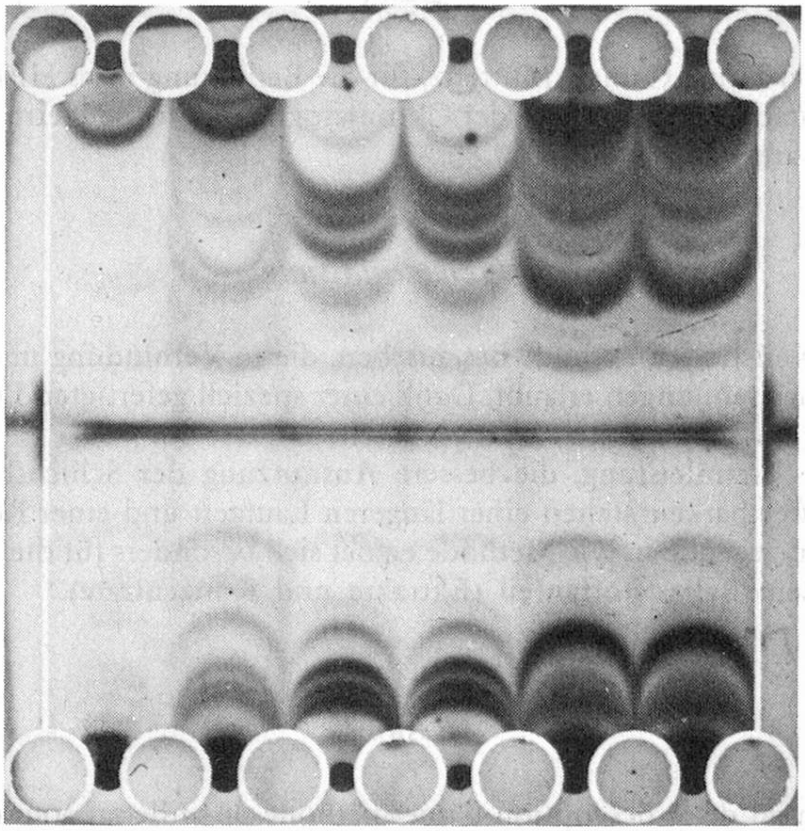


Abb. 2. Restzucker in vergorenem Kirschensaft
Gegenüberliegende Proben identisch, jedoch mit verschiedenem Fießmittel entwickelt

Plattenmaterial	HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60, (Merck)
Fließmittel oben	Ethanol/n-Butanol/Wasser: 4/2/1
Fließmittel unten	Ethanol/n-Butanol/Wasser: 3/5/2
Sprühreagens für Zucker	Diphenylamin, Anilin je 1 g und 10 ml Phosphorsäure in 100 ml Ethanol und 60 min bei 105 °C

Resultate und Diskussion

Es hat sich gezeigt, daß bei stark verunreinigten Proben bzw. bei Substanzen mit ähnlichem R_f-Wert eine ausreichende Trennung meistens nur über die Keilstreifentechnik zu erreichen ist. Der zweidimensionale Start der Trennung — vergleichbar mit einer «Zirkularentwicklung» — führt zu einer besseren Ausnut-

zung der Schichtkapazität und hat zudem den Vorteil, daß sich die sich bildenden Zonen bei entsprechender Konzentrationswahl quantitativ auswerten lassen.

Allerdings muß bei dieser Technik eine etwas längere Laufzeit und eine Reduktion in der Anzahl der Trennbahnen in Kauf genommen werden.

Dank

Wir danken der Firma Camag, Muttenz, für die Benützung ihres HPTLC-Scanners anläßlich der quantitativen Auswertung der Chromatogramme sowie Herrn *P. Clerc,* Bern, für die Übersetzungsarbeiten.

Zusammenfassung

Es wird eine Keilstreifenmethode beschrieben, die in Verbindung mit HPTLC-Schichten hervorragende Trennungen erlaubt. Dank einer speziell gefertigten Lochschablone lassen sich die Platten in kürzester Zeit vorbereiten.

Die sehr gute Trennleistung, die bessere Ausnutzung der Schichtkapazität und die quantitative Auswertbarkeit stehen einer längeren Laufzeit und einer Reduktion der Anzahl Trennbahnen gegenüber. Die Methode eignet sich besonders für die Auftrennung von Proben mit großem Ballaststoffanteil (Extrakte und Konzentrate).

Résumé

Il est question ici de la description d'une méthode de taille en cônes qui, combinée à des couches HPTLC permet d'obtenir d'excellentes séparations. Les plaques peuvent être préparées en très peu de temps à l'aide d'un gabarit perforé, spécialement façonné à cet effet.

A un très bon pouvoir séparateur, à une meilleure utilisation de la capacité de la couche et à une évaluation quantitative s'opposent une plus longue durée de développement et une réduction du nombre des bandes de séparation. La méthode se prête particulièrement bien pour l'analyse d'échantillons riches en sous-produits (extraits et concentrés).

Summary

Here is given a description of a tapered-strip method, which combined with HPTLC-layers enables to get excellent separations. Plates can be prepared in a very short time owing to a special drilled templet to this purpose.

The high separating-power, a better use of the layers' capacity and the quantitative evaluation are opposed to a longer spreading-time as well as to a reduction of the number of runs. The method is particularly suitable to the separation of samples with a large content of by-products (extracts and concentrates).

Literatur

1. *Reindel, F.* und *Hoppe, W.:* Verbesserung des Trenneffektes bei der Papierchromatographie durch die Formgebung des Papierstreifens. Naturwissenschaften **40**, 245 (1953).
2. *Matthias, W.:* Serienuntersuchungen mit Hilfe einer neuen Form der Streifen-Papierchromatographie. Naturwissenschaften **41**, 17–18 (1954).
3. *Stahl, E.:* Dünnschicht-Chromatographie, 3. Mitteilung. Parfümerie u. Kosmetik **39**, 564, 567–568 (1958).

P. Georges
Eidg. Alkoholverwaltung
Chemisch-technische Abteilung
Längaßstraße 31
CH-3009 Bern