

Schnelle Analyse vor Ort

Moderne Auswertung in der Dünnschichtchromatographie

Die Weltwirtschaftskrise 2008 hat mit ihrer zeitweisen Verknappung von Acetonitril eindringlich gezeigt, dass man nicht nur auf eine einzige chromatographische Methode setzen sollte. Genau dies wird aber im Augenblick getan, denn Industrie und Forschung setzen mehrheitlich auf die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) als die Trennmethode ihrer Wahl. Für viele Anwendungen in der Pharmazie, in der Umweltanalytik, der Lebensmittelanalytik, aber auch in der Inprozesskontrolle gibt es mit der Dünnschichtchromatografie eine Alternative.



Prof. Dr. Bernd Spangenberg,
Hochschule Offenburg



Barbara Milz,
Hochschule Offenburg

Besteht die Aufgabe darin, nicht mehr als ca. 10 Substanzen zu trennen, reicht die Trennleistung der Dünnschichtchromatographie (DC) zur Analyse völlig aus. Dabei ist eine DC-Trennung meist preiswerter zu haben als ein HPLC-Chromatogramm [1]. Gespart werden insbesondere Zeit, Lösungsmittel (wie Acetonitril), aber auch Elektrizität.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie entstand aus der Papierchromatographie und ist die älteste Trennmethode, die mit fest/flüssig-Phasen arbeitet [1]. Diese altbekannte Methode wird gerne als nicht mehr zeitgemäß eingeschätzt. Dabei ist die DC eine vollwertige analytische Trennmethode, die durch ihre einfache Handhabung besticht. Als stationäre Phase werden Glasplatten oder Aluminiumfolien benutzt, die mit den verschiedensten Materialien belegt sind. Kommerziell verfügbar sind Kieselgel, Aluminiumoxid, Cellulose, RP-2, RP-8, RP-18, Aminopropyl-, Cyanopropyl- oder Diolphasen, wie auch Kationen- oder Anionen-

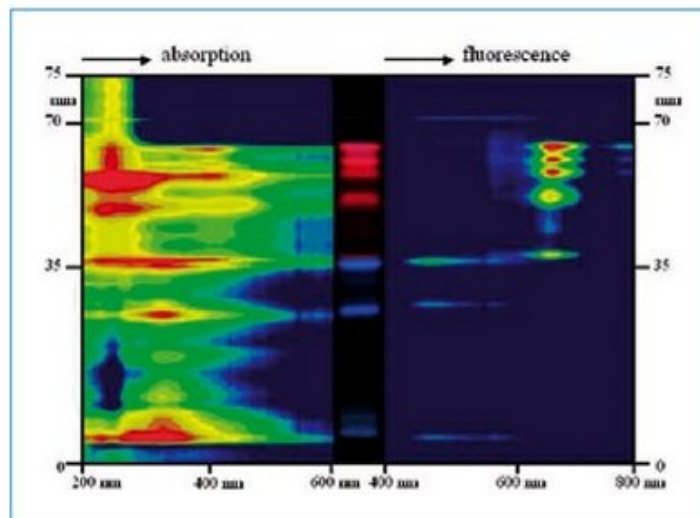


Abb. 1: Dargestellt ist die DC-Aufnahme eines Rosmarinextraktes, gefärbt mit Natriumtetraphenylborat-Reagenz (mittig). Links abgebildet sind die ortsauflösten UV-vis- und rechts die dazugehörigen Fluoreszenzspektren [1].

austauscher. Ein Wechsel der stationären Phase ist damit denkbar einfach. Verwenden sollte man sogenannte HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography)-Platten. Diese Platten zeigen eine enge Korngrößenverteilung. Sehr gute Trennergebnisse werden auf Trennstrecken von wenigen cm erreicht.

Vor der Trennung werden Standards und Proben mit Mikrokapillaren strichförmig auf die Platten aufgetupft und mit wenigen Millilitern mobiler

Phase aufgetrennt. Dazu benötigt man einen Glastrog, der eine 10 x 10 cm Platte fassen kann. In einer stehenden Kammer (Trogkammer) werden ca. 10 mL, in liegenden Kammern (Schmal-kammern) nur etwa 2 ml mobile Phase zur Entwicklung der Platte benötigt. Nach der Trennung, die etwa 10 bis 20 Minuten dauert, wird das Lösungsmittel verdunstet, und die Platte kann vermessen werden. Die DC ist damit die einzige chromatographische Methode, bei der nicht in der mo-

bilen-, sondern in der stationären Phase gemessen wird.

Die Dünnschichtchromatographie ist eine offene Methode, denn die auf der Platte getrennten Zonen sind einfach zugänglich. Das Plattenmaterial ist inert, und weil die Zonen nach der Trocknung lösungsmittelfrei vorliegen, können auch biologische Detektionsverfahren eingesetzt werden. Hier haben sich Leuchtbakterien bewährt, die die Toxizität von Substanzen über Hemmhöfe direkt auf der Platte anzeigen [1]. Häufig werden die getrockneten Platten in chemische Reagenzlösungen getaucht oder mit diesen besprüht. Möchte man die Trennergebnisse quantifizieren, wird allerdings ein relativ teurer Scanner zur Auswertung im Fluoreszenz-, im UV- oder im vis-Bereich benötigt (Abb. 1).

DC-Trennungen sind in Schule, Hochschule und Industrie weit verbreitet, werden aber häufig nur qualitativ ausgewertet. Dazu wird bei farblosen Substanzen eine mehr oder weniger spezifische Färbereaktion auf der Plattenoberfläche durchgeführt, die eine farblose DC-Platte in ein farbiges Bild umwandelt. Es gibt mehrere hundert Färbereakti-

VI. Offenburger DC-Kurs

Im Rahmen des GDCh-Fortbildungsprogrammes leitet der Autor dieses Beitrages auch den VI. Offenburger DC-Kurs (vormals Isnyer DC-Kurs) „Moderne Dünnschichtchromatographie für Anwender“. Dieser findet vom 19.–21. September 2012 in Offenburg in der Ortenau statt.

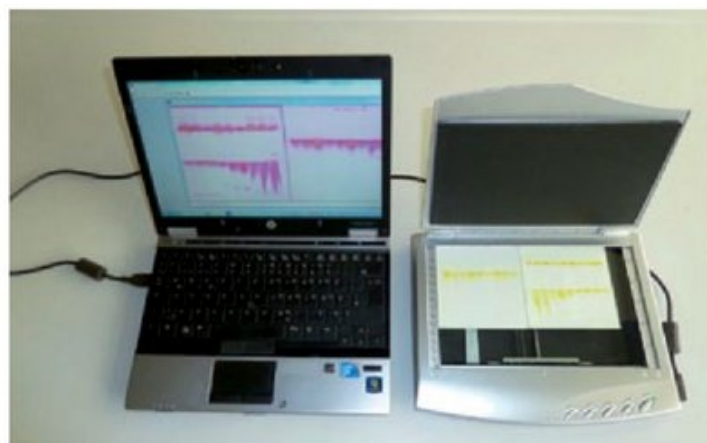


Abb. 2: Kombination eines 64-bit Rechners mit einem Flachbettscanner

onen, die mit allen chemischen Substanzen, teilweise hochselektiv, Farbstoffe bilden [1–3].

Meist werden DC-Platten mit den eigenen Augen ausgewertet. Mit den heutigen Flachbettscannern bietet sich eine preiswerte und vor allem schnelle Alternative zur visuellen Auswertung an, die echte 16-bit Chromatogramme erzeugt (Abb. 1). Beide Geräte sind über einen USB-Anschluss miteinander verbunden. Eine separate Stromquelle für den Scanner ist nicht nötig [4].

Analytische Ergebnisse

Die Trennung von Benzocain (4-Ethylaminobenzoat) und seinem Abbau-produkt 4-Aminobenzoensäure erfolgt auf Cyanopropyl-Platten (Fa. Merck, Darmstadt) mit dem Laufmittel Wasser, Acetonitril, Dioxan, Ethanol, NH_3 (25%) (8+2+1+1+0.05, v/v). Die Laufzeit über 70 mm beträgt 35 Minuten. Nach der Trennung wird die Platte mit Ehrlich's Reagenz behandelt. Dazu löst man 500 mg 4-Dimethyl-amino-benzaldehyd in 50 mL Methyl-tert.-butylether (MTBE) mit 250 μL konz. HCl und taucht die trockene Platte für 2 Sekunden. Es resultieren charakteristische gelbe Banden auf weißem Untergrund (Abb. 2) [4]. Ein Erwärmen der Platte kann entfallen.

Das Abscannen einer DC-Platte benötigt 40 Sekunden, dabei werden die farbigen Zonen der DC-Platte direkt in 16-bit Bilder



Abb. 3: Trennung von Benzocain (Bahnen 1–6, von links) und 4-Aminobenzoensäure (Bahnen 7–9) auf einer 10 x 10 cm Platte.

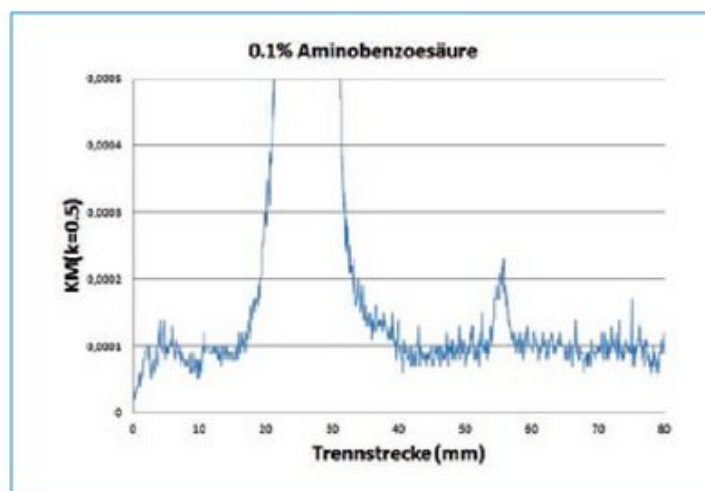


Abb. 4: Trennung von Benzocain (großes Signal) und 4-Aminobenzoensäure (Signal bei 55 mm Trennstrecke).

umgewandelt (Abb. 3). Die von der Plattenoberfläche reflektierten Lichtintensitäten stehen so als 16-bit Zahlenwerte zur Verfügung. Ausgewertet wird der Blaukanal.

Die Dünnschichtchromatographie arbeitet hochgradig parallel. Auf einer 10 x 10 cm Platte können bis zu neun Bahnen gleichzeitig entwickelt werden, wenn mit ca. 7 mm breiten Auftragun-

gen gearbeitet wird. Zur Auftragung wird eine gefüllte Glaskapillare mehrfach kurz auf die Platte aufgesetzt, um mit vielen kleinen Punkten die strichförmigen Startlinien zu formen.

Die Darstellung der Bahn 5 (in Abb. 2) als Chromatogramm (siehe Abb. 3) erfolgte mit der Software ImageTLC [4]. Eine Kalibration beider Substanzen zeigt Linearität im Bereich von 5 bis 2500 ng pro Auftragung.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Kombination aus Computer und Flachbettscanner kann in der Pharmazeutischen Analytik als präzises Remissionsspektrometer für den vis-Bereich verwendet werden. Sie bietet sich insbesondere in der Inprozesskontrolle zur Überwachung von Verunreinigungen an, da sich hier die Anschaffung eines teuren DC-Scanners meist nicht lohnt.

Ein Netzanschluss ist zum Betrieb nicht nötig, und damit kann die Kombination aus Rechner und Flachbettscanner weltweit „vor Ort“ zur schnellen Analyse genutzt werden.

Literatur

- [1] B. Spangenberg, C. Pool, Ch. Weins, Quantitative Thin-Layer Chromatography. A practical survey, Springer 2011
- [2] H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer, Thin Layer Chromatography, Volume 1a, Physical and chemical detection methods, Volume 1b, Reagents and detection methods. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1990, 1994
- [3] Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography, Merck-Company. http://www.cob.uha.fr/site%20cot/toolbox.php_files/TLC%20bible.pdf
- [4] B. Milz, B. Spangenberg, unveröffentlichte Resultate

Kontakt

Prof. Dr. Bernd Spangenberg
Hochschule Offenburg, Offenburg
Tel.: +49 781 205 101
spangenberg@hs-offenburg.de
www.hs-offenburg.de