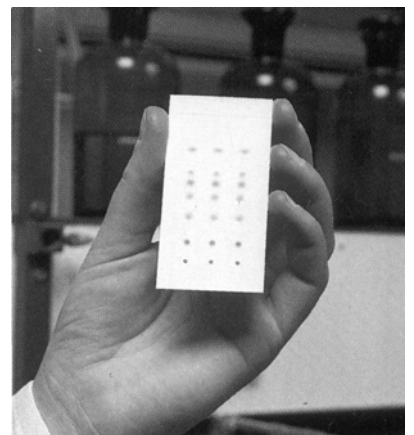
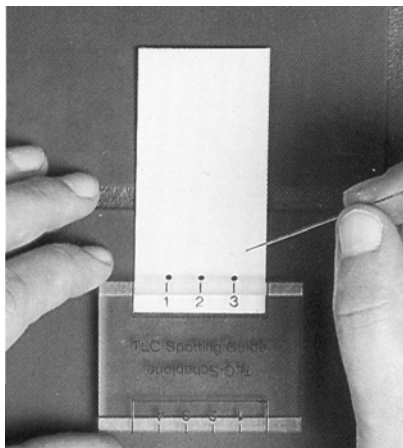


Dünnschichtchromatographie mit *TLC MIKRO SETS*



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL

MN



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6-8 · D-52313 Düren · Germany

Germany

and international:

Tel.: +49 (0) 24 21 98 90

Fax: +49 (0) 24 21 98 91 98

e-mail: sales.de@mn-net.com

Switzerland:

MACHEREY-NAGEL AG

Tel.: +41 (0) 62 388 55 00

Fax: +41 (0) 62 388 55 05

e-mail: sales.ch@mn-net.com

France:

MACHEREY-NAGEL EUROL

Tel.: +33 (0) 3 88 68 22 68

Fax: +33 (0) 3 88 51 78 88

e-mail: sales.fr@mn-net.com

USA:

MACHEREY-NAGEL Inc.

Tel.: +1 484 821 09 84

Fax: +1 484 821 12 72

e-mail: sales.us@mn-net.com

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
Einleitung	2
Lieferprogramm	3-5
Prinzip der Dünnschicht-Chromatographie	6
Durchführung einer dünnschicht-chromatographischen Trennung	6-8
Vorbereitung der Probe	6
Auftragen der Probe	6
Entwicklung eines Chromatogramms	7
Sichtbarmachung der getrennten Substanzen	7
Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen	8
Trennbeispiele des TLC Mikro-Sets A für Anfänger	9-12
Auftrennung eines lipophilen (fettlöslichen) Farbstoffgemisches	9
Auftrennung eines Gemisches aus Anthrachinonfarbstoffen	10
Auftrennung eines Gemisches aus Lebensmittelfarbstoffen	11
Auftrennung von Filzschreiberfarben	12
Trennbeispiele des TLC Mikro-Sets F 1	13-16
Trennung von Aminosäuren (Modellmischung und Urin)	13
Trennung von Schwermetall-Kationen	15
Trennbeispiele des TLC Mikro-Sets F 2	17-19
Analyse von Speisefetten	17
Analyse von Fetten und Cholesterin im Blut	18
Trennbeispiele des TLC Mikro-Sets F 3	20-23
Trennung von Analgetika (Schmerzlinderungsmittel)	20
Drogenanalyse am Beispiel der Chinarinde	22
Verzeichnis weiterführender Literatur	24
Hinweis auf Firmenschriften	24

EINLEITUNG

Die chemische Analytik von Rohstoffen, Produktionskontrollen, die Reinheitsprüfung der hergestellten Produkte und die Umweltanalytik gewinnen ständig an Bedeutung.

Einen festen Platz unter den Verfahren, die diese Probleme zu lösen vermögen, hat die Dünnschicht-Chromatographie (DC) oder Thin Layer Chromatography (TLC) erobert. Sie ist eine elegante analytische und präparative Trennmethode und hat die Papier-Chromatographie nahezu vollständig abgelöst. Auf vielen Gebieten ist sie zum Standardverfahren bei Routine-Analysen geworden. Sie zeichnet sich dabei nicht nur durch Schnelligkeit, Genauigkeit und eine hohe Empfindlichkeit, sondern vor allem auch durch Wirtschaftlichkeit aus.

Wir haben die DC seit ihren Anfängen, also seit etwa 40 Jahren, tatkräftig unterstützt und gefördert durch die Schaffung zahlreicher Sorptionsmittel. Dazu zählen vor allem Kieselgel, Cellulose, Aluminiumoxid und Polyamid bzw. entsprechend modifizierte Materialien für spezielle Trennprobleme.

Mit diesen praxisbewährten Sorptionsmitteln werden in unserem Hause nicht nur Glasplatten als DC-Fertigplatten maschinell beschichtet, sondern auch Polyester- und Alufolien als DC-Fertigfolien. Dadurch ersparen wir dem Analytiker das zeitraubende und kostspielige Herstellen von handbeschichteten DC-Platten und DC-Folien, und gleichzeitig garantiert die maschinelle Fertigung eine größere Gleichmäßigkeit der Schichten.

Damit die Methode in noch mehr Laboratorien und Ausbildungsstätten Eingang findet, haben wir TLC-

Mikro-Sets zusammengestellt, die sowohl die Schnelligkeit des Verfahrens als auch die Leistungsfähigkeit unserer POLYGRAM-Fertigfolien unter Beweis stellen. Dafür und für eine schnelle Produktkontrolle noch während der Herstellungsphase eignen sich besonders die DC-Fertigfolien. Gleichzeitig wollen wir Anregungen geben zur Lösung weiterer Probleme und zu eigenen Forschungen.

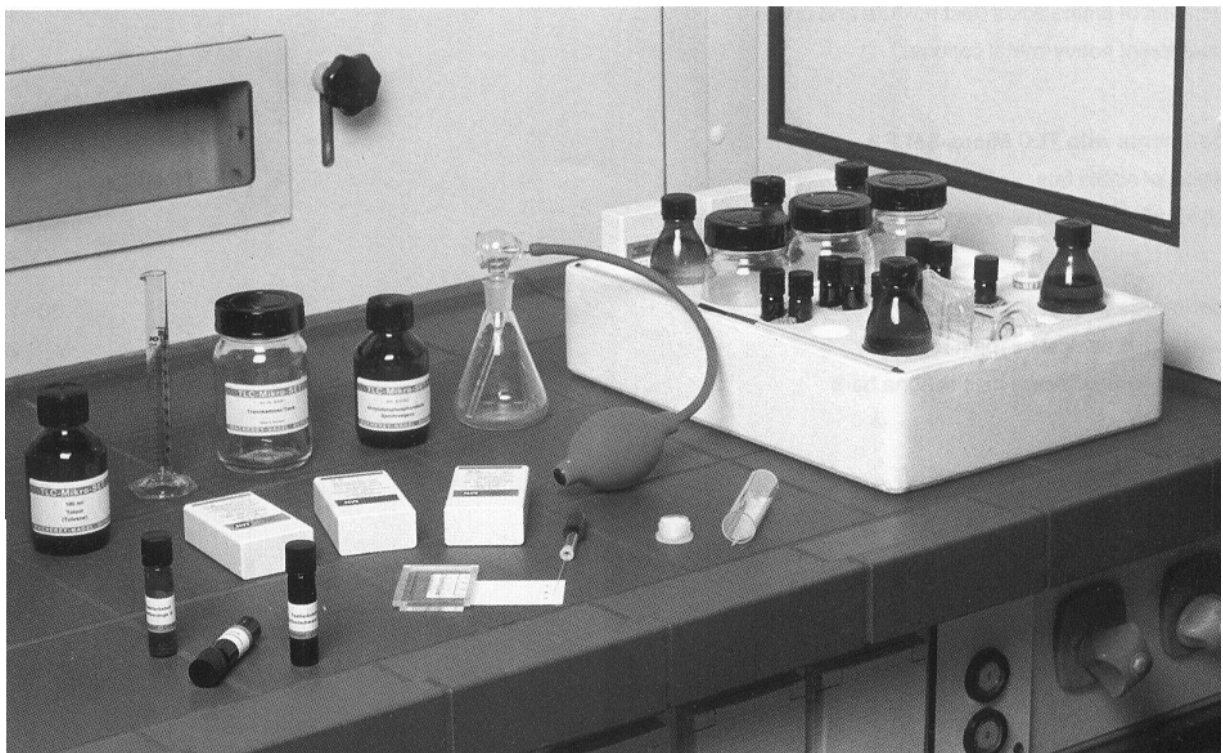
Wir bieten an:

1. das Anfänger-Set, welches sich vor allem dadurch auszeichnet, dass es mit einfachen Laufmitteln Proben auftrennt, die eine Eigenfarbe besitzen, so dass eine Anfärbung entfällt. Alle erforderlichen Gerätschaften sind im Set enthalten.

2. das Fortgeschrittenen-Set, wofür von dem geübten Anfänger bereits etwas mehr Fingerspitzengefühl erwartet wird. So muss ein Teil der Proben selbst aufgearbeitet und zur Identifizierung der Substanzen müssen Sprühreagenzien angewandt werden. Aufbauend auf einem Material-Set, das auch selbständiges dünn-schicht-chromatographisches Arbeiten ermöglicht, können die einzelnen Versuche durchgeführt werden.

Zusätzlich zum Material-Set setzen wir die im Labor üblicherweise vorhandene Ausrüstung voraus (wie z. B. Fön, Abzug, Lösungsmittel, Reagenzgläser, Trockenschrank etc.).

Damit bietet diese Erweiterung die konsequente Weiterführung in ein interessantes Gebiet der analytischen Chemie. Gemeinsam ist beiden Mikro-Set-Typen, dass alle Trennungen auf DC-Fertigfolien des Formates 4 x 8 cm durchgeführt werden, und dass grundsätzlich die aufsteigende chromatographische Technik Anwendung findet.



LIEFERPROGRAMM

TLC Mikro-Sets für die Dünnschicht-Chromatographie

Bei den TLC-Mikro-Sets handelt es sich um Material- und Chemikalienzusammenstellungen zur Durchführung von einfachen Trennungen mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie (DC).

Besonders empfohlen werden diese Sets zur Einführung in die DC für Schüler, Studenten und Lehrlinge.

Jedes Set enthält ausführliche Erläuterungen und Arbeitsanleitungen zur Durchführung der aufgeführten Trennbeispiele.

TLC Mikro-Set A für Anfänger (Art.-Nr. 814 000)
1 Set

Dieses Set enthält Chemikalien und Hilfsmittel zur Durchführung folgender Trennungen

- Auftrennung eines lipophilen (fettlöslichen) Farbstoffgemisches
- Auftrennung eines Gemisches aus Anthrachinonfarbstoffen
- Auftrennung eines Gemisches von Lebensmittelfarbstoffen
- Auftrennung von Filzschreiberfarben

Inhalt:

1 Arbeitsanleitung	8 ml Testfarbstoff Blau 1
3 Trennkammern	8 ml Testfarbstoff Violett 2
50 Glaskapillaren 1 µl	8 ml Testfarbstoffgemisch 3 (7 Lebensmittelfarbstoffe)
1 Auftragschablone	8 ml Testfarbstoff Gelborange 5
50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄	8 ml Testfarbstoff Brillantschwarz BN
50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® ALOX N/UV ₂₅₄	100 ml Toluol
50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® CEL 300	100 ml Toluol-Cyclohexan (2 : 1, v/v)
1 Messzylinder à 10 ml	100 ml Chloroform-Aceton (1 : 1, v/v)
8 ml Testfarbstoffgemisch 1 (4 lipophile Farbstoffe)	100 ml 2,5%ige Natriumcitratlösung
8 ml Testfarbstoff Sudanrot G	100 ml 25%iges Ammoniak-2-Propanol (5 : 3, v/v)
8 ml Testfarbstoff Sudanblau II	2 Filzschreiber
8 ml Testfarbstoffgemisch 2 (7 Anthrachinonfarbstoffe)	

Ergänzungsteile zu TLC Mikro-Set A
Art.-Nr.

814001	Testfarbstoffgemisch 1 , Lösung von 4 Farbstoffen in Toluol, 8 ml	1 Flasche
814011	Kollektion der 4 Einzelkomponenten von Testfarbstoffgemisch 1 , 4 x 8 ml	1 Kollektion
814002	Testfarbstoffgemisch 2 , Lösung von 7 Anthrachinonfarbstoffen in Chloroform, 8 ml	1 Flasche
814012	Kollektion der 7 Einzelkomponenten von Testfarbstoffgemisch 2 , 7 x 8 ml	1 Kollektion
814003	Testfarbstoffgemisch 3 , wässrige Lösung von 7 Lebensmittelfarbstoffen, 8 ml	1 Flasche
814013	Kollektion der 7 Einzelkomponenten von Testfarbstoffgemisch 3 , 7 x 8 ml	1 Kollektion
814021	Trennkammern , Packung à 4 Stück	1 Packg.
814022	Glas-Kapillaren à 1 µl Inhalt, Packung à 3 x 50 Stück	1 Packg.
814023	Auftragschablonen , Packung à 2 Stück	1 Packg.
814024	Messzylinder aus Glas à 10 ml Inhalt, Packung à 2 Stück	1 Packg.
814025	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814026	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® ALOX N/UV ₂₅₄ , 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814027	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® CEL 300, 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814028	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ 2 x 50 Stück, POLYGRAM® ALOX N/UV ₂₅₄ 1 x 50 Stück; POLYGRAM® CEL 300 1 x 50 Stück	1 Packg.
814029	Natriumcitrat 2,5 g in Flaschen à 100 ml zum Auffüllen mit dest. Wasser, Packung à 2 Flaschen	1 Packg.
814030	Chromatographie-Papier MN 260 , 100 Blatt 7,5 x 17cm	1 Packg.

TLC Mikro-Set M, Materialset (Art.-Nr. 814 100)

1 Set

Dieses Set ist Voraussetzung für die Durchführung der Trennungen gemäß Set F 1 bis F 3. Er ist gleichzeitig eine Grundausrüstung zur selbständigen Erarbeitung weiterer dünn-schicht-chromatographischer Versuche

Inhalt:

2 x 50 Glaskapillaren 1 µl	1 Plastikspritze 1 ml
2 Auftragschablonen	1 Becherglas 25 ml
1 Messzylinder à 10 ml	20 Bogen Filtrierpapier MN 713, DIN A5
1 Laborsprüher aus Glas mit Gummiball	50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄
2 Trennkammern	50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® ALOX N/UV ₂₅₄
1 Gummihütchen für Auftragkapillaren	50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® CEL 300

Ergänzungsteile zu TLC Mikro-Set M**Art.-Nr.**

814021	Trennkammern , Packung à 4 Stück	1 Packg.
814022	Glas-Kapillaren à 1 µl Inhalt, Packung à 3 x 50 Stück	1 Packg.
814023	Auftragschablonen , Packung à 2 Stück	1 Packg.
814024	Messzylinder aus Glas à 10 ml Inhalt, Packung à 2 Stück	1 Packg.
814025	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814026	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® ALOX N/UV ₂₅₄ , 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814027	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® CEL 300, 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814028	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 2 x 50 Stück, POLYGRAM® ALOX N/UV ₂₅₄ , 1 x 50 Stück; POLYGRAM® CEL 300 1 x 50 Stück	1 Packg.
814030	Chromatographie-Papier MN 260 , 100 Blatt 7,5 x 17cm	1 Packg.
814101	Laborsprüher aus Glas mit Gummiball	1 Stück
814102	Gummihütchen für Auftragkapillaren	2 Stück
814103	Filtrierpapier MN 713 , 100 Blatt DIN A5	100 Blatt
814104	Plastikspritze , 1 ml Inhalt mit Graduierung	1 Stück

TLC Mikro-Set F 1 (Art.-Nr. 814 200)

1 Set

Dieses Set enthält alle erforderlichen Chemikalien

- zur Trennung von Aminosäuren (Modellmischung),
- zur Trennung von Aminosäuren im Urin,
- zur Trennung von Schwermetall-Kationen

Inhalt:

1 Arbeitsanleitung	50 ml 50%ige Essigsäure
50 Glaskapillaren 1 µl	50 ml Salzsäure (18%ig)
50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄	8 ml Aminosäuren-Testgemisch
50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® CEL 300	8 ml Tryptophan-Vergleichslösung
100 ml n-Butanol	8 ml Arginin-Vergleichslösung
100 ml Ninhydrin-Sprühreagenz	8 ml Schwermetall-Kationen-Testgemisch
100 ml Aceton	8 ml Co ²⁺ -Vergleichslösung
100 ml 25%iges Ammoniak	8 ml Mn ²⁺ -Vergleichslösung
100 ml Rubeanwasserstoff-Sprühreagenz	8 ml Ni ²⁺ -Vergleichslösung

Ergänzungsteile zu TLC Mikro-Set F 1**Art.-Nr.**

814022	Glas-Kapillaren à 1 µl Inhalt, Packung à 3 x 50 Stück	1 Packg.
814025	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814027	Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® CEL 300, 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814103	Filtrierpapier MN 713 , 100 Blatt DIN A5	100 Blatt
814201	Aminosäuren-Testgemisch , 8 ml	1 Flasche
814202	Kollektion von 4 Einzelkomponenten des Aminosäuren-Testgemisches, 4 x 8 ml	1 Kollektion
814203	Ninhydrin-Sprühreagenz , 100 ml	1 Flasche
814204	Kationen-Testgemisch , 8 ml	1 Flasche
814205	Kollektion von 4 Einzelkomponenten des Kationen-Testgemisches, 4 x 8 ml	1 Kollektion
814206	Rubeanwasserstoff-Sprühreagenz , 100 ml	1 Flasche

TLC Mikro-Set F 2 (Art.-Nr. 814 300)
1 Set

Dieses Set enthält alle erforderlichen Chemikalien zur Analyse von Speisefetten sowie zur Analyse von Fetten und Cholesterin im Blut

Inhalt:

1 Arbeitsanleitung	3 Leergläschen 30 ml (Butter, Margarine, Speiseöl)
50 Glaskapillaren 1 µl	100 ml Chloroform
50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄	100 ml Methylenchlorid
5 Blutlanzetten	100 ml Toluol
5 Einmalpipetten 25 µl	100 ml Molybdatphosphorsäure-Sprühreagenz
5 Alkoholtupfer	50 ml Aceton mit kalibrierter Pipette
5 2 ml Gläschen mit Deckel	8 ml Cholesterin-Vergleichslösung

Ergänzungsteile zu TLC Mikro-Set F 2
Art.-Nr.

814022 Glas-Kapillaren à 1 µl Inhalt, Packung à 3 x 50 Stück	1 Packg.
814025 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814103 Filtrierpapier MN 713 , 100 Blatt DIN A5	100 Blatt
814301 Cholesterin-Vergleichslösung , 8 ml	1 Flasche
814302 Molybdatphosphorsäure-Sprühreagenz , 100 ml	1 Flasche

TLC Mikro-Set F 3 (Art.-Nr. 814 400)
1 Set

Dieses Set enthält alle erforderlichen Chemikalien zur Trennung von Analgetica (Schmerzlinderungsmittel) und zur Drogeanalyse am Beispiel der Chinarinde

Inhalt:

1 Arbeitsanleitung	100 ml Sprühreagenz Koffein
50 Glaskapillaren 1 µl	100 ml Dragendorff-Munier-Sprühreagenz
50 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄	100 ml Toluol-Diethylether (55/35, v/v)
5 Aspirin®-Tabletten	50 ml FeCl ₃ -Lösung
5 Thomapyrin®-Tabletten	50 ml K ₃ [Fe(CN) ₆]-Lösung
20 Faltenfilter MN 615 114,11 cm ø	30 ml Eisessig-Essigsäureethylester (6/2,5, v/v)
3 Leerfläschchen 8 ml (Aspirin-Probe, Thomapyrin Probe, Chinarindenextrakt)	25 ml 12,5%iges Ammoniak
5g Chinarinde	25 ml Diethylamin
100 ml 2-Propanol	8 ml Koffein-Vergleichslösung
	8 ml Paracetamol-Vergleichslösung
	8 ml Chinin-Vergleichslösung

Ergänzungsteile zu TLC Mikro-Set F 3
Art.-Nr.

814022 Glas-Kapillaren à 1 µl Inhalt, Packung à 3 x 50 Stück	1 Packg.
814 025 Fertigfolien 4 x 8 cm POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 50 Stück per Packung	1 Packg.
814 103 Filtrierpapier MN 713 , 100 Blatt DIN A5	100 Blatt
814401 Koffein-Sprühreagenz , 100 ml	1 Flasche
814402 Dragendorff-Munier-Sprühreagenz für China-Alkaloide , 100 ml	1 Flasche
814403 Eisen(III)chlorid-Lösung , 100 ml	1 Flasche
814404 Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung , 100 ml	1 Flasche
814 405 Chinin-Vergleichslösung , 8 ml	1 Flasche
814406 Paracetamol-Vergleichslösung , 8 ml	1 Flasche
814407 Koffein-Vergleichslösung , 8 ml	1 Flasche
814408 Faltenfilter MN 615 1/4, 11 cm ø, Packung à 100 Stück	1 Packg.

PRINZIP DER DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE

Bei der Dünnschicht-Chromatographie handelt es sich um einen mehrstufigen Verteilungsprozeß. An diesem Prozess sind beteiligt Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische, Probenmoleküle und ein geeignetes Sorptionsmittel. Bei der DC besteht dieses Sorptionsmittel aus einer dünnen Schicht - für analytische Zwecke üblicherweise 0,1 bis 0,25 mm dick - auf einen Träger aufgebracht (Glasplatte, Polyesterfolie, Alufolie).

Bei den Versuchen der vorliegenden Sets wird das zu trennende Substanzgemisch auf eine DC-Fertigfolie aufgetragen und in eine mit Laufmittel beschickte Trenn-

kammer gestellt. In vielen Fällen ist nach wenigen Minuten bereits die chromatographische Trennung beendet. Substanzen mit Eigenfärbung sind sofort sichtbar, ungefärbte Substanzen werden durch Besprühen mit geeigneten Nachweisreagenzien sichtbar gemacht (Bildung gefärbter Verbindungen).

Steht eine UV-Lampe zur Verfügung und enthält die Sorptionsmittelschicht einen geeigneten Fluoreszenzindikator, so können häufig die Substanzen durch Betrachten der Chromatogramme im UV-Licht lokalisiert werden.

DURCHFÜHRUNG EINER DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG

Zum besseren Verständnis einer dünn-schicht-chromatographischen Trennung beschreiben wir nachstehend 5 durchzuführende Schritte.

Vorbereiten der Probe

Die für eine chromatographische Trennung vorgesehene Probe muss mehrere Voraussetzungen erfüllen, wenn man eine gute Trennung erreichen will. Es ist nicht möglich, an dieser Stelle auf Einzelheiten einzugehen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass eventuell mehrere Arbeitsgänge zur Anreicherung oder Vorreinigung der zu trennenden Substanzen erforderlich sind.

Im Anfänger-Set sind die Trennbeispiele so gewählt, dass komplizierte Arbeitsgänge entfallen. Es handelt sich um gezielt zusammengestellte Farbstoffe bzw. deren Gemische, die ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt werden können. Zum Abschluss wird noch ein Beispiel aus der täglichen Praxis angeführt (Trennung von Filzschreiberfarben), wobei die Probe jedoch ebenfalls ohne Aufarbeitung aufgetragen werden kann.

Bei den Fortgeschrittenen-Sets müssen einige dieser Arbeitsschritte bereits eigenständig von Ihnen durchgeführt werden. Dazu zählt die mechanische Zerkleinerung einer Probe, Extraktionsschritte, Filtration und Anreicherung sowie Probennahme. Durch diese Eigenleistung bei der Vorbehandlung der Proben wird dem Anwender ein kleiner Einblick in industriell übliche Arbeitstechniken vermittelt, die wiederum Voraussetzung sind für eine erfolgreiche dünn-schicht-chromatographische Trennung.

Im Gegensatz zum Anfänger-Set, welches Proben abgestimmter Zusammensetzung enthält, bearbeiten die Fortgeschrittenen-Sets praxisnahe Probleme. Auf Einzelheiten wird bei dem jeweiligen Beispiel eingegangen.

Auftragen der Probe

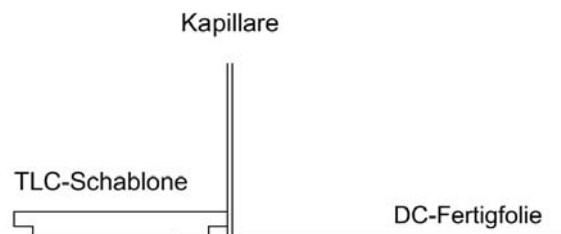
Wie man die zu trennenden Proben aufträgt, richtet sich nach dem Ziel der chromatographischen Trennung. Für qualitative Trennungen trägt man punktförmig mit Ka-

pillare oder Mikropipette auf, für quantitative Trennungen entweder punkt- oder strichförmig (5-10mm). Für präparative Trennungen wird bandförmiges Auftragen über die ganze Plattenbreite empfohlen.

Bei den nachfolgenden Trennbeispielen trägt man das zu trennende Gemisch bzw. die Vergleichslösungen punktförmig mit Hilfe von Glaskapillaren auf die DC-Fertigfolien auf. Die Auftragskapillaren sollten beim Auftragen verschiedener Proben nur einmal benutzt werden, weil sonst Probenreste zur nächsten Probe verschleppt werden.

Die Auftragskapillaren füllen sich bei organischen Probelösungen beim Eintauchen sehr schnell von selbst, bei wässrigen Lösungen erfolgt das Aufsteigen der Lösung deutlich langsamer; eventuell muss ein Pipettenhütchen zur Hilfe genommen werden. Vor Entleerung der Kapillare rollt man das eingetauchte Ende horizontal auf Filtrierpapier ab. Ist die Kapillare jedoch vollständig bis zum oberen Rand gefüllt, stellt man sie mit dem nicht benetzten Ende auf die Schicht. Die Kapillare muss senkrecht und vorsichtig auf die Schicht aufgesetzt werden. Senkrecht deshalb, damit die Kapillare sich selbständig entleert und vorsichtig, damit die Schicht nicht verletzt wird. Verletzte Schichten führen zu ungleichmäßig geformten Flecken. Um die Auftragflecken möglichst klein und kompakt zu halten, muss man unter Umständen in mehreren Portionen mit Zwischentrocknen (Blasen, Fönen) auftragen. Dies gilt besonders für wässrige Probelösungen.

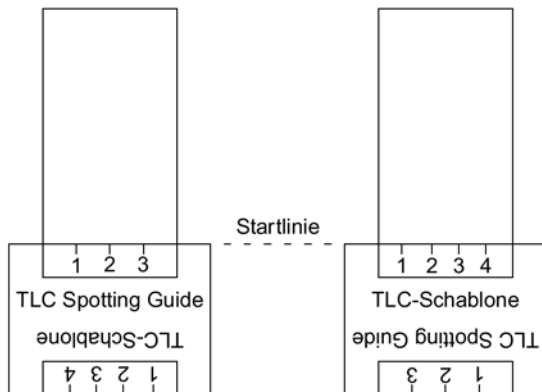
Zur Erleichterung des Auftragens empfehlen wir eine Auftragschablone, die speziell auf unsere DC-Fertigfolien abgestimmt ist. Die nachfolgenden Abbildungen demonstrieren einen einwandfreien Probenauftrag mit der erwähnten Schablone.



Auftragen einer Probe auf eine DC-Fertigfolie mit Kapillare und TLC-Schablone

Je nachdem ob man 3 oder 4 Substanzen auftragen will, klemmt man die Fertigfolie in den dafür vorgesehenen Rahmen der Schablone rutschfest auf eine Unterlage. Damit sind Startlinie und Auftragspunkte in den richtigen Abständen festgelegt. Zusätzlich ist die Unterseite der Auftragschablone entlang der Startlinie eingefräst, so dass beim Aufsaugen der Lösungen durch die Sorbenschicht der Fertigfolie keine Störungen auftreten können.

Bei den Versuchen zum Anfänger-Set wird grundsätzlich nur die Einteilung für 3 Startpunkte benötigt. Bei den Fortgeschrittenen-Versuchen kommt auch die Einteilung für 4 Startpunkte auf der Schablone zur Anwendung.



Entwicklung eines Chromatogramms

Nach dem Auftragen lässt man das Lösungsmittel der Proben vollständig abdunsten (etwa 10 Minuten) oder hilft mit einem Fön nach. Danach stellt man die DC-Fertigfolie in die mit etwa 10 ml Laufmittel beschickte Trennkammer (Glas mit Schraubverschluss) und schraubt den Deckel vorsichtig zu, indem man das Glas mit einer Hand festhält und gleichzeitig fest auf den Auflagetisch drückt. Der Flüssigkeitsspiegel des Laufmittels sollte sich während dieses Vorganges nicht bewegen. Das Laufmittel darf auf keinen Fall die Startflecken ungleichmäßig berühren oder überstreichen. Durch Kapillarwirkung steigt das Laufmittel in der Schicht hoch und bewirkt die Substanztrennung.

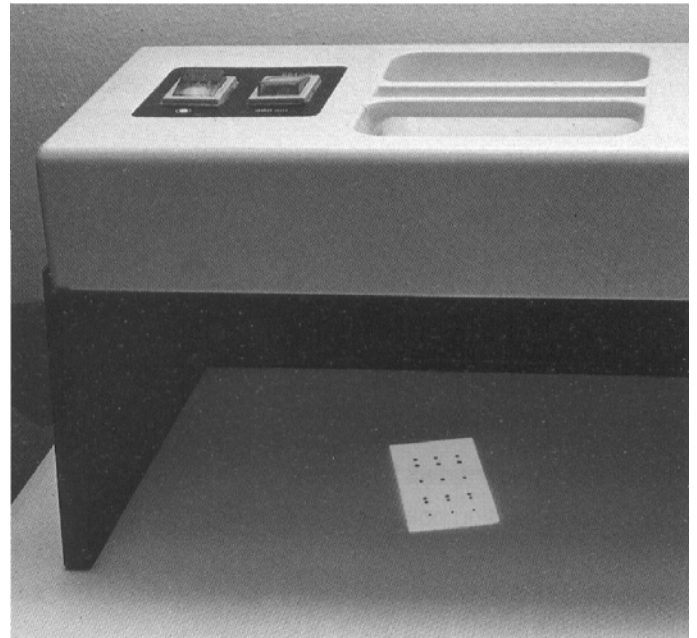
Hat das Laufmittel die gewünschte Höhe (etwa 6 bis 7 cm) erreicht, bricht man den Trennvorgang ab. Man nimmt die Folie aus der Trennkammer und markiert sofort die Laufmittelfront mit einem weichen Bleistift.

Aufmerksamkeit ist der Atmosphäre in der Trennkammer zu widmen. Bei allen aufgeführten Beispielen kommt man ohne eine Kammerfüllung aus. Sind jedoch reproduzierbare Laufstrecken erforderlich, so ist in vielen Fällen die Sättigung der Kammeratmosphäre mit Laufmitteldampf vorteilhaft. Dazu kleidet man die Trennkammer innen mit einem gut saugenden Chromatographie-Papier (MN 260) aus und beschickt die Trennkammer mit 15 ml Laufmittel anstelle der sonst ausreichenden 10 ml.

Sichtbarmachung der getrennten Substan-

zen

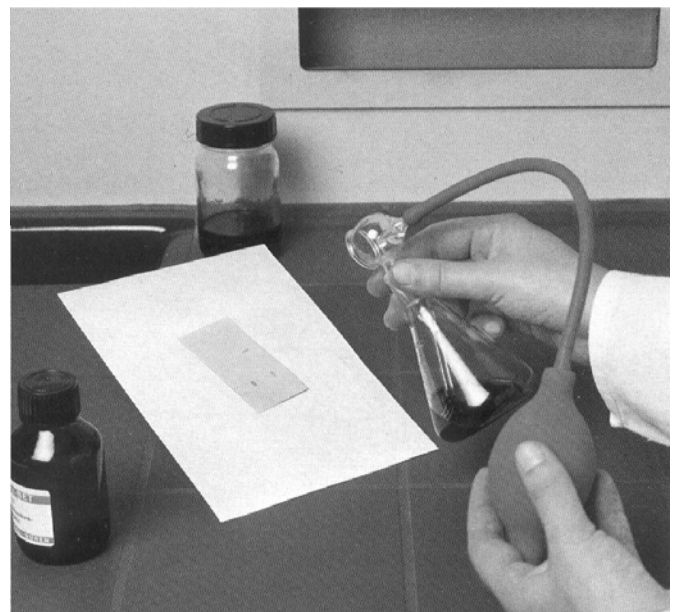
Nach der chromatographischen Entwicklung müssen die getrennten Substanzen sichtbar gemacht werden, sofern sie keine Eigenfärbung aufweisen. Zur unspezifischen Sichtbarmachung dient die Betrachtung im UV-Licht, wenn die Schicht einen Fluoreszenzindikator enthält oder die Anfärbung in der Jod-Kammer.



Spezifischere Farbreaktionen können durch Besprühen mit entsprechenden Nachweisreagenzien erzielt werden. Es kann auch eine Kombination der angeführten Verfahren angewendet werden.

Bei den Trennbeispielen im Anfänger-Set handelt es sich stets um Farbstoffe, d. h. um Substanzen, die ohne Anfärbung erkannt werden können.

Im Fortgeschrittenen-Set werden Substanzen getrennt, die farblos sind, wie es in der Praxis die Regel ist. Zur Sichtbarmachung werden geeignete Sprühreagenzien eingesetzt, auf die in der Versuchsbeschreibung näher eingegangen wird.



Jetzt folgen noch einige Anmerkungen zur »Sprühtechnik«. Sprühreagenzien sind grundsätzlich nur im Abzug anzuwenden. Die Folie legt man zum Besprühen auf einen Bogen Filtrierpapier. Meist genügt es, 5-10 ml Lösung in den Sprüher einzufüllen. Das Besprühen erfolgt aus ca. 15 cm Entfernung mit Hilfe des Gummiballes oder - falls vorhanden- mit Druckluft. Es ist grundsätzlich besser, die Schicht zweimal sehr dünn und regelmäßig zu besprühen (mit Zwischentrocknung), als gleich beim ersten Mal die Schicht durch und durch zu benetzen. Bei zu starkem Besprühen verlaufen die Flecken. In der Regel wird die DC-Fertigfolie nach dem Besprühen getrocknet.

Nach der Sichtbarmachung werden die Zonen mit einem Bleistift umrandet, um auch später nach dem Verblässen der Flecken deren Lage noch erkennen zu können.

Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen

Die Auswertung richtet sich nach dem Ziel der Chromatographie. Bei qualitativen Bestimmungen genügt oft die Lokalisierung der nachzuweisenden Substanzen. Dies geschieht sehr einfach durch Mitlaufenlassen von Vergleichssubstanzen.

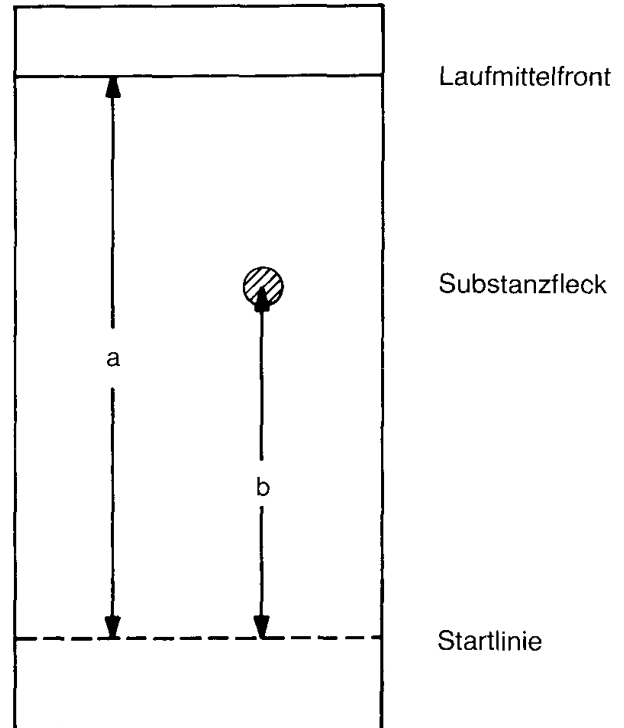
Eine häufig verwendete Größe ist der R_f -Wert (Retention Factor) oder sein 100facher Wert hR_f . Der R_f -Wert ist wie folgt definiert:

$$R_f = \frac{\text{Abstand Startlinie-Fleckenschwerpunkt}}{\text{Abstand Startlinie-Laufmittelfront}} = \frac{b}{a}$$

d. h., die R_f -Werte liegen zwischen 0 und 1, am günstigsten zwischen 0,1 und 0,8 (bzw. 10-80 für hR_f). Um gut reproduzierbare R_f -Werte zu erhalten, bedarf es

jedoch einer sorgfältigen Kammersättigung und der Konstanthaltung weiterer Parameter wie Laufmittelzusammensetzung, Temperatur etc.

Auch eine quantitative Auswertung über entsprechende Eichmessungen ist möglich. Dazu wird entweder die Fläche der Substanzflecken herangezogen oder eine densitometrische Auswertung direkt auf der Schicht durchgeführt. Bei letzterem Verfahren ist jedoch ein hoher apparativer Aufwand erforderlich.



TRENNBEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS A FÜR ANFÄNGER

Auftrennung eines lipophilen (fettlöslichen) Farbstoffgemisches

Lipophile (fettlösliche) Farbstoffe finden Verwendung bei der Anfärbung von natürlichen und synthetischen Ölen, Fetten und Wachsen, von Benzinen, Mineralölen sowie zur transparenten Anfärbung von Kunststoffen. Buttergelb war früher als Lebensmittelfarbstoff zugelassen.

Chemisch betrachtet sind diese Substanzen Vertreter einer ganzen Reihe von Farbstoffklassen: Azofarbstoffe, Azine, Indophenole und Anthrachinone.

Probelösung:

Testfarbstoffgemisch in Toluol von Buttergelb, Sudanblau II, Sudanrot G, Indophenol

Vergleichslösung:

Sudanrot G und Sudanblau II gelöst in Toluol

Trennschicht:

POLYGRAM® ALOX N/UV₂₅₄

Laufmittel:

Toluol

Auftragevolumen:

ca. 1 µl (eine gefüllte Kapillare)

Trennzeit:

ca. 7 Minuten

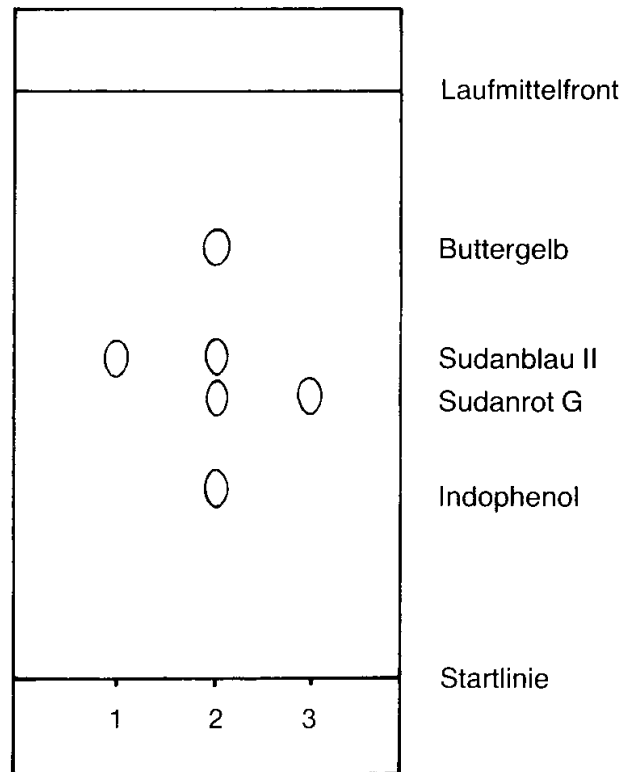
Sichtbarmachung:

Eigenfarbe der Farbstoffe erfordert keinen besonderen Nachweis

Durchführung:

Mit Hilfe einer Glaskapillare trägt man das Farbstoffgemisch auf Startpunkt 2 auf, die Vergleichssubstanzen auf die Startpunkte 1 und 3. Nach der Auftragung der Farbstoffe lässt man ca. 5 Minuten an der Luft trocknen und beschickt die Trennkammer mit Laufmittel. Dann stellt man die Fertigfolie in die Trennkammer und verschließt die Trenn-

kammer mit dem zugehörigen Schraubverschluss. Nach Beendigung der Trennung wird die Folie aus der Kammer genommen, und man lässt das Laufmittel unter dem Abzug abdunsten.



Anmerkung:

Die Trennung gelingt auch auf einer Kieselgelschicht, und zwar auf POLYGRAM® SIL G/ UV₂₅₄. Als Laufmittel kann man Toluol oder Chloroform einsetzen.

TRENNBEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS A FÜR ANFÄNGER

Auftrennung eines Gemisches aus Anthrachinonfarbstoffen

Anthrachinonfarbstoffe sind wichtige Farbstoffe in der Textil- und Lederindustrie. Sie zeichnen sich durch besondere Brillanz und Lichtehttheit aus. Sie leiten sich vom Anthrachinon ab durch entsprechende Substitution des Grundgerüsts oder durch Ankondensierung weiterer Ringsysteme.

Probelösung:

Testfarbstoffgemisch aus 7 Anthrachinonfarbstoffen gelöst in Chloroform

Vergleichslösung:

2 Einzelkomponenten (Blau 1 und Violett 2) gelöst in Chloroform

Trennschicht:

POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄

Laufmittel:

Toluol-Cyclohexan (2:1, v/v)

Auftragevolumen:

ca. 0,75 µl (1 µl = 1 volle Kapillare)

Trennzeit:

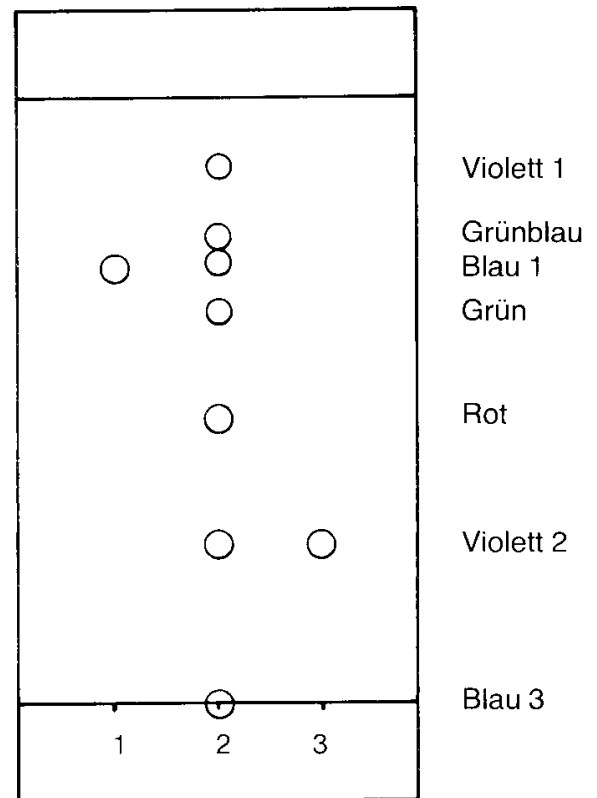
2 x 12 Minuten mit 10 Minuten Zwischentrocknen

Sichtbarmachung:

Substanzen besitzen Eigenfarbe

Durchführung:

Auf Startpunkt 2 der Fertigfolie trägt man das Anthrachinonfarbstoffgemisch, auf die Startpunkte 1 und 3 die Vergleichslösungen (Blau 1 bzw. Violett 2) auf. Nach ca. 5 Minuten ist das Lösungsmittel verdampft. Trennkammer mit dem Laufmittel (Toluol/Cyclohexan) beschicken und Chromatogramm entwickeln. Nach Beendigung der ersten Trennung (Laufstrecke ca. 65-70 mm) entnimmt man die Folie der Kammer und lässt 10 Minuten im Abzug trocknen (evtl. mit Kaltluftfön nachhelfen). Zur Optimierung der Trennung wird ein zweites Mal im gleichen Laufmittel entwickelt. Nach einer Steighöhe von wiederum 65-70 mm ist die Trennung beendet. Die Farbstoffe erscheinen in folgender Reihenfolge:



Anmerkungen:

Hierbei handelt es sich um eine so genannte Zweifachentwicklung ohne Laufmitteländerung. Dies ist immer dann angebracht, wenn zahlreiche Substanzen getrennt werden sollen, aber eine Einfachentwicklung noch nicht zum Ziel führt. Dabei kann man zur Erzielung bestimmter Gruppentrennungen bei der zweiten Entwicklung durchaus auch ein anderes Laufmittel wählen. Es ist in jedem Fall darauf zu achten, dass eine sorgfältige Zwischentrocknung vorgenommen wird (Abzug).

Um chromatographische Zusammenhänge zu erkennen, ist es auch hier wertvoll, andere Trennschichten (Aluminiumoxid = POLYGRAM® ALOX N/ UV₂₅₄ oder Cellulose = POLYGRAM® CEL 300) einzusetzen oder die Laufmittel nach eigenen Überlegungen zu variieren.

TRENNBEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS A FÜR ANFÄNGER

Auftrennung eines Gemisches von Lebensmittelfarbstoffen

Farbenvielfalt herrscht nicht nur in der Chromatographie, sondern auch in unserer täglichen Nahrung. Es gibt sogar Nahrungsmittel, deren Qualität vom Verbraucher nach ihrer Farbe bewertet wird. Dies ist mit ein Grund, weshalb auch heute noch Lebensmittel gefärbt werden.

Lebensmittel dürfen grundsätzlich keine nahrungsfremden Zusätze enthalten, sofern sie nicht durch den Gesetzgeber erlaubt sind. Gesetzlich geregelt ist dies in der Zusatzstoff-Zulassungs-Verordnung. Bevor ein Farbstoff (natürlich oder synthetisch) darin aufgenommen wird, muss eine toxikologische Beurteilung erstellt und durch wissenschaftliche Belege die cancerogene Unbedenklichkeit nachgewiesen werden. In der gegenwärtigen Liste der zugelassenen Farbstoffe für Lebensmittel sind etwa 30 Substanzen (natürliche und künstliche) enthalten, gemessen an der Zahl der bekannten Farbstoffe also eine verschwindend geringe Zahl. Diese Liste gilt nicht nur für den Bereich der Bundesrepublik, sondern inzwischen auch in der EU.

Unser Testgemisch enthält 7 Farbstoffe, davon sind einige zur Lebensmittelfärbung zugelassen. Echrot E z.B. erfüllt nicht die vom Gesetzgeber geforderten Bedingungen. Man erkennt daraus gleich die Bedeutung einer Trennung und Identifizierung solcher Substanzen.

Probelösung:

Testfarbstoffgemisch von 7 in Wasser gelösten Farbstoffen: Erythrosin (E127), Brillantschwarz BN (E151), Echrot E, Naphtholrot 5, Gelborange S (E110), Ponceau 4R (E124), Tartrazin (E102).

Vergleichslösung:

2 Einzelkomponenten: Gelborange 5 und Brillantschwarz BN, jeweils in Wasser gelöst

Trennschicht:

Cellulose MN 300 als Fertigfolie POLYGRAM® CEL 300

Laufmittel:

2,5% Natriumcitratlösung - 25% Ammoniak - 2-Propanol (20 : 5 : 3, v/v), hergestellt durch Mischen von 10 ml 2,5%iger Natriumcitratlösung und 4 ml vom fertigen Ammoniak-2-Propanol-Gemisch.

Auftragevolumen:

ca. 0,25 µl (vollständig gefüllte Kapillare = 1 µl)

Trennzeit:

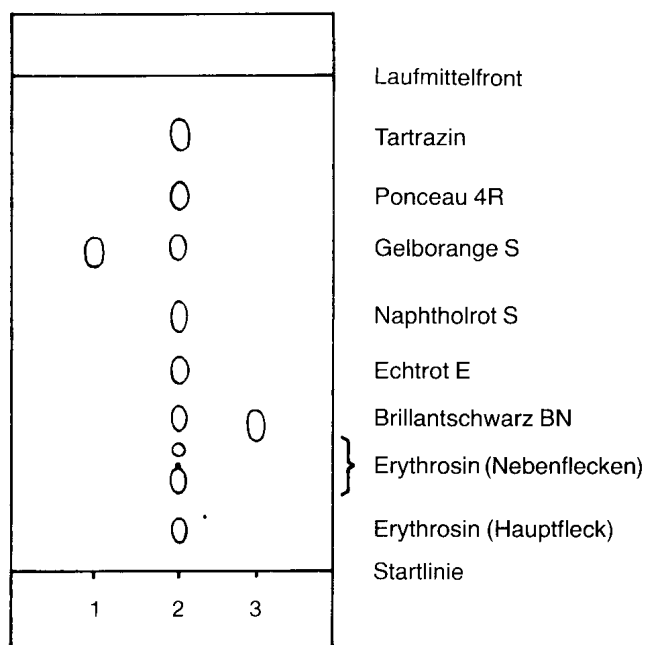
20-25 Minuten für eine Steighöhe von etwa 65 mm

Sichtbarmachung:

Substanzen besitzen Eigenfarbe

Durchführung:

Mit Hilfe der Glaskapillare wird das Testfarbstoffgemisch auf Startpunkt 2 aufgetragen. Das gleiche Volumen an Vergleichssubstanzen (Gelborange 5 bzw. Brillantschwarz BN) trägt man auf Startpunkt 1 bzw. 3 auf. Nach 5 Minuten ist die Folie trocken (evtl. mit Kaltluftfön nachhelfen). Dann stellt man sie in die mit Laufmittel beschickte Trennkammer. Nach Beendigung der Trennung die Folie der Kammer entnehmen und das Laufmittel abdunsten lassen (Abzug). Man erhält folgende Anordnung der Farbstoffe:



Anmerkungen:

Das Laufmittel muss vor jeder Trennung frisch angesetzt werden. Lässt man das Laufmittel längere Zeit stehen, ändert es seine Zusammensetzung und damit seine Trenneigenschaften.

Erythrosin zeigt im Chromatogramm 3 Flecken: einen stärkeren (Hauptfleck) und zwei schwächere (Nebenflecken). Unter Umständen kann man bei dieser Verbindung sogar einen weiteren schwachen Nebenfleck erkennen.

TRENNBEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS A FÜR ANFÄNGER

Auftrennung von Filzschreiberfarben

Die vorangegangenen drei Beispiele enthielten von uns gezielt zusammengesetzte Farbstoffmischungen. Der 4. Versuch - die Auftrennung von Filzschreiberfarben - zeigt, dass industrielle Farbstoffkompositionen komplexere Gemische darstellen und damit wesentlich schwieriger zu trennen sind. Besonders dankbare Versuchsobjekte sind schwarze Filzstifte, da sie häufig besonders schöne Farbzusammensetzungen zeigen. Ein roter Strich bedeutet noch lange nicht, dass nur eine einzige Rotkomponente darin enthalten ist.

Die fertigen Chromatogramme können auch zur Qualitätskontrolle (Farbbrillanz) und vor allem zur Produktidentifizierung herangezogen werden. Neben den beiden mitgelieferten Filzschreibern können auch eigene Proben untersucht werden. Tinten können zum Vergleich gegenübergestellt werden.

Proben:

2 käuflich erhältliche Filzschreiber (Schwan stabilo »point 88«)

Trennschicht:

Kieselgel Fertigfolie POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄

Laufmittel:

Chloroform-Aceton (1 : 1, v/v)

Auftragung:

Direkt mit dem Filzstift auf die Trennschicht; Punkt von ca. 1 mm Durchmesser

Trennzeit:

ca. 10 Minuten

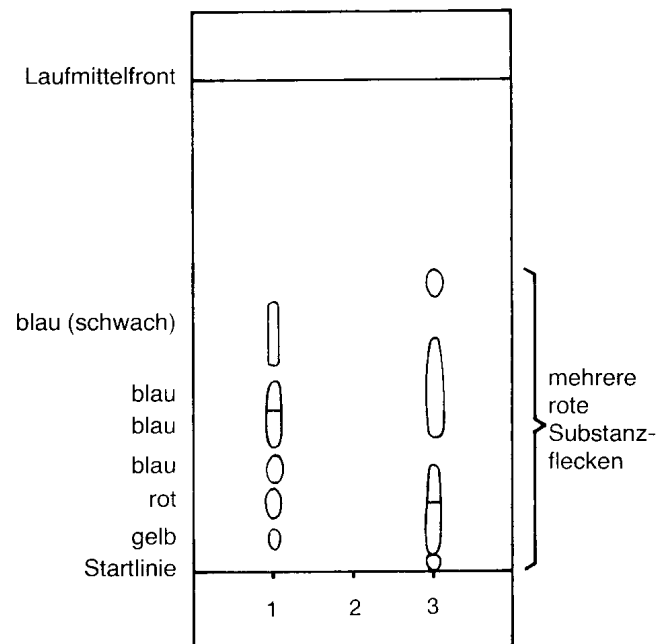
Sichtbarmachung:

Substanzen besitzen Eigenfarbe

Durchführung:

Auf Startpunkt 1 wird mit dem schwarzen Filzstift 1 Punkt direkt auf die Folie vorsichtig aufgedrückt. Auf Startpunkt 3 bringt man die rote Filzschreiberfarbe auf. Startpunkt 2 kann für eine Tinte (ca. 1 µl mit Kapillare) oder eine eigene Filzschreiberfarbe verwendet werden. Nach 3 Minuten ist das Lösungsmittel verdampft. Man beschickt die Trennkammer mit Laufmittel und stellt die Folie hinein. Nach ca. 10 Minuten ist die Trennung beendet. Für die beiden mitgelieferten Filzschreiberfarben erhält

man folgendes Chromatogramm:



Anmerkungen:

Das Trennergebnis wird von der Auftragemenge beeinflusst. Daher nicht zu viel (zu dicker Punkt) auftragen und darauf achten, dass die Schicht nicht verletzt wird. Hat man zu viel aufgetragen, kann eine Zweifachentwicklung im gleichen Laufmittel die Trennung noch etwas verbessern.

Für den schwarzen Filzschreiber ergibt sich ein besonders eindrucksvolles Trennmuster bei strichförmiger Auftragung entlang der Startlinie (Lineal oder Auftragschablone zur Hilfe nehmen).

Im vorgeschlagenen Laufmittel werden Tinten (z. B. Königsblau, Pelikan 4001) nicht aufgetrennt. Dies gelingt jedoch, wenn man als Laufmittel ein Gemisch aus n-Butanol-Eisessig-Wasser (12 : 3 : 5, v/v) bei gleicher Trennschicht verwendet (Trennzeit ca. 25 Minuten). Gleichzeitig ergibt sich auch ein anderes Chromatogramm für die Filzschreiberfarben (Ausprobieren!).

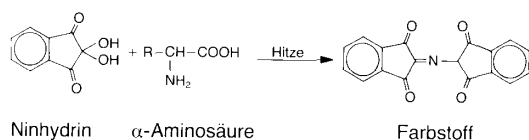
TRENNBEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS F 1

Trennung von Aminosäuren (Modellmischung und Urin)

Aminosäuren sind für alle Lebewesen von überragender physiologischer Bedeutung. Sie sind u. a. mitverantwortlich für das Zellwachstum, den Leberstoffwechsel, die Blutgerinnung, die Hämoglobinbildung, Funktionen des Nervensystems usw. Schließlich sind sie - zu größeren Einheiten verknüpft (Peptide) - Bausteine der Eiweißstoffe. Zum Teil werden sie im Körper aufgebaut (nicht-essentielle Aminosäuren), zum Teil müssen sie mit der Nahrung dem Körper zugeführt werden (essentielle Aminosäuren). Ihre Trennung und Identifizierung ist daher von großem analytischem Interesse.

Die natürlichen Aminosäuren kommen teilweise frei vor (Blutserum, Urin), oder man erhält sie durch Spalten von Eiweißstoffen. Dies geschieht durch Einwirkung von Enzymen oder durch saure Hydrolyse eiweißhaltiger Substanzen (z. B. Hühnereierweiß). Der menschliche Körper scheidet täglich etwa 1,1 g freie Aminosäuren aus.

Da Aminosäuren farblose Verbindungen sind, müssen nach erfolgter DC-Trennung die Flecken sichtbar gemacht werden. Dazu dient ein Sprühreagenz von hoher Empfindlichkeit auf Basis der Ninhydrin-Reaktion. Es entstehen während der Erhitzung gefärbte Produkte nach einem komplizierten Mechanismus (Desaminierung, Decarboxylierung) etwa nach folgendem Reaktionsschema:



Probelösungen:

Gemisch aus 4 Aminosäuren (Alanin, Arginin, Tryptophan, Valin) in wässriger Lösung und Urinprobe

Vergleichslösungen:

Arginin bzw. Tryptophan in wässriger Lösung

Trennschicht:

Kieselgel Fertigfolie POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄

Laufmittel:

n-Butanol-Eisessig-Wasser (3 : 1 : 1, v/v), jeweils frisch ansetzen durch Mischen von 6 ml n-Butanol und 4 ml 50%iger Essigsäure. Da das Laufmittel im Laufe der Zeit seine Zusammensetzung ändert, kann es nicht auf Vorrat angesetzt werden.

Auftragevolumen:

Ca. 0,5 µl der Aminosäurenlösungen bzw. ca. 1 µl einer Urinprobe (1 vollständig gefüllte Kapillare fasst etwa 1 µl).

Trennzeit:

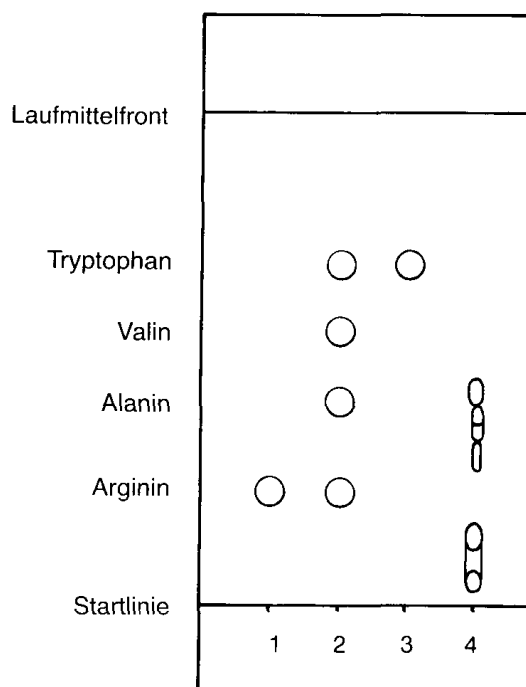
Etwa 60 Minuten für eine Steighöhe von 60 mm

Sichtbarmachung:

Als Sprühreagenz dient eine methanolische Ninhydrinlösung; anschließend folgt Erhitzen im Trockenschrank bei 110 °C während 5 Minuten.

Durchführung:

Man wählt auf der Schablone die Einteilung für 4 Startpunkte. Auf Startpunkt 1 trägt man ca. 0,5 µl Argininlösung auf, auf Startpunkt 2 ca. 0,5 µl des Aminosäuregemisches und auf Startpunkt 3 ca. 0,5 µl Tryptophanlösung. Falls erforderlich, Pipettenhütchen zum Ansaugen der Lösungen benutzen. Auf den 4. Startpunkt kann man noch ca. 1 µl Urin auftragen. Startpunkte sorgfältig trocknen (mit Fön nachhelfen). Kammer mit 10 ml des Laufmittels beschicken und Folie hineinstellen. Nach 60 Minuten ist die Trennung abgeschlossen. Die Folie der Kammer entnehmen und Laufmittelfront markieren. Unter dem Abzug mit Hilfe eines Föns das Lösungsmittel gründlich abdampfen, bis kein Essigsäuregeruch mehr wahrgenommen wird. In den Sprüher füllt man ca. 5-10 ml des Ninhydrin-Sprühreagenzes und besprüht die DC-Fertigfolie auf einer Filtrierpapierunterlage so, dass sie leicht durchfeuchtet ist. Mit dem Fön wird die Folie getrocknet und der Sprühvorgang wiederholt. Anschließend legt man die Folie etwa 5 Minuten bei 110 °C in den Trockenschrank. Man erhält orangerote bzw. braunrote Farbflecken gemäß nachfolgender Anordnung:



Man kann die Flecken umranden und die charakteristischen R_F-Werte der Substanzen ermitteln.

Anmerkungen:

Die Proben trägt man zweckmäßigerweise in mehreren Portionen auf - mit Zwischentrocknung -, damit der Startfleck möglichst klein und kompakt bleibt. Dies ist deshalb wichtig, weil sich bei der langen Laufzeit (ca. 60 Minuten) schon eine Zonenverbreiterung durch Diffusion bemerkbar machen kann, was eine Verschlechterung der Trennung bedeutet. Die Trocknungsschritte sind sorgfältig einzuhalten. Die Trockenschranktemperatur darf 130 °C nicht überschreiten.

Interessant ist die gleiche Trennung auf einer Cellulose-Fertigfolie (POLYGRAM® CEL 300). Nicht nur die Farbe der Flecken ist etwas anders (violett), sondern die Zonen sind auch nicht so schön kom-

pakt. Die Laufzeit beträgt zwar nur 40 Minuten, aber Valin und Tryptophan können nicht voneinander getrennt werden. Außerdem ist deren Reihenfolge gegenüber der Kieselgelschicht vertauscht.

Auf Aluminiumoxid erhält man für dieses System keine brauchbare Trennung.

Urinproben zeigen eine Vielzahl ineinander übergreifender Substanzen, also ein ganzes Spektrum von Aminosäuren. Das Ergebnis ist auch abhängig vom Spender, der Tageszeit und der Art der Nahrungsaufnahme. Eventuell kann eine Verbesserung der Trennung durch eine Zweifachentwicklung erreicht werden (sorgfältig zwischentrocknen).

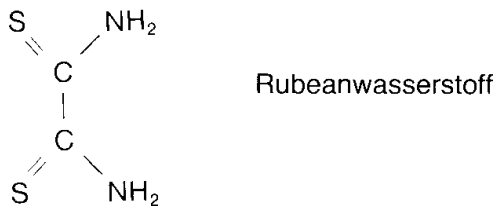
TRENNBEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS F 1

Trennung von Schwermetall-Kationen

Die überwiegende Zahl analytischer Trennprobleme in Industrie, Forschung und Entwicklung erstreckt sich auf organische Substanzen. Aber auch zur Trennung anorganischer Substanzen eignet sich die Dünnschicht-Chromatographie als analytische Methode.

Unser Beispiel beschäftigt sich mit der Trennung und Identifizierung der Schwermetalle Kupfer, Kobalt, Mangan und Nickel. Da viele Schwermetalle nicht nur in elementarer Form (z. B. als Staub), sondern auch in Form ihrer löslichen Salze stark toxisch wirken, wird deren Anreicherung in der Natur, aber auch im menschlichen Körper erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt. Dabei spielt die Konzentration eine entscheidende Rolle. Viele der Schwermetalle sind nämlich als Spurenelemente für Lebewesen unbedingt erforderlich, während sie in höheren Konzentrationen zahlreiche negative Folgen für die Gesundheit mit sich bringen.

Der Nachweis der Schwermetall-Kationen auf der DC-Folie erfolgt mit Rubeanwasserstoff als Sprühreagenz:



Dabei entstehen mit einer Reihe von Metallkationen farbige Innerkomplexe (ungeladene Chelatkomplexe), deren Bildung auch abhängig ist vom pH-Wert. Deshalb muss in unserem Versuch die Folie nach dem Besprühen zusätzlich mit Ammoniak bedampft werden.

Probelösung:
Gemisch aus 4 Schwermetallsalzen (Kationen Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+}) in wässriger Lösung

Vergleichslösungen:
je 1 wässrige Lösung von folgenden Salzen: Co^{2+} , Mn^{2+} und Ni^{2+}

Trennschicht:
Cellulose-Fertigfolie POLYGRAM® GEL 300

Laufmittel:
Aceton-18%ige Salzsäure (100 : 25, v/v) frisch ansetzen durch Mischen von 10 ml Aceton und 2,5 ml Salzsäure

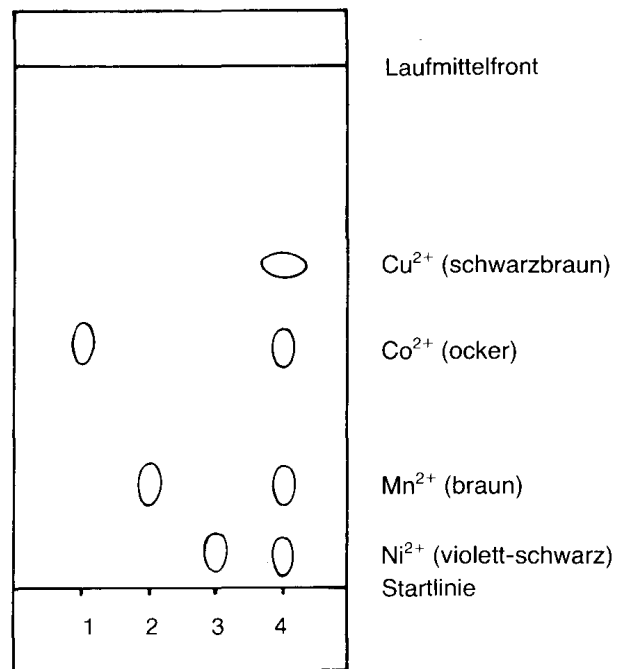
Auftragevolumen:
Ca. 1 µl mit Hilfe der Kapillaren

Trennzeit:
Ca. 13 Minuten

Sichtbarmachung:
Mit Rubeanwasserstoff-Sprühreagenz (0,2%ige Lösung in Ethanol) und Bedampfen mit 25%igem Ammoniak.

Durchführung:
Auf die 4 Startpunkte trägt man je ca. 1 µl des Kationengemisches bzw. der 3 Einzelkomponenten auf. Um die Startflecken möglichst klein zu halten, trägt man in mehreren Portionen auf und trocknet zwischendurch mit einem Heißluftfön.

Nach Beendigung der Auftragung nochmals sorgfältig trocknen. Trennkammer mit Laufmittel beschicken und Folie hineinstellen. Nach ca. 13 Minuten ist die Trennung beendet. Folie der Trennkammer entnehmen, Laufmittelfront markieren und Schicht gründlich mit dem Heißluftfön trocknen (Abzug!). Etwa 5 ml des Rubeanwasserstoffreagenzes füllt man in die Sprühflasche ein und besprüht die Folie (auf Filterpapier liegend). Mit dem Fön kurz zwischentrocknen, nochmals leicht besprühen und wiederum trocknen. Auf ein Uhrglas (oder in eine Petrischale) einige ml 25%iges Ammoniak geben und Folie (Schicht nach unten) einige Minuten darüberhalten, so dass die Schicht vollständig bedampft wird. Danach die gefärbten Zonen vorsichtig umranden (Bleistift). Man erhält folgendes Chromatogramm:



Aus den Zonenschwerpunkten und dem Abstand Start-Laufmittelfront erhält man die charakteristischen R_f -Werte.

Anmerkungen:

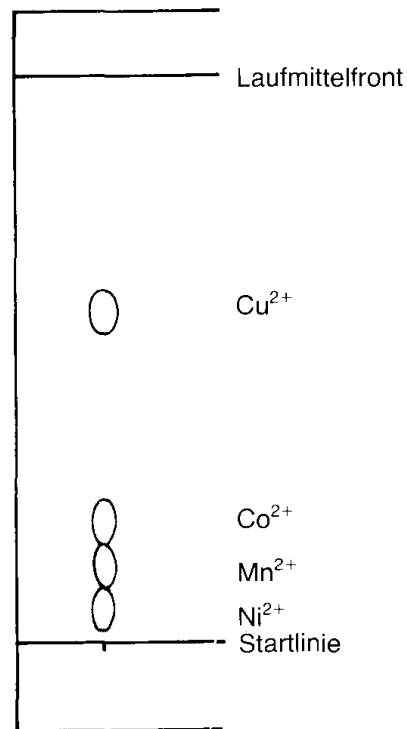
Auch hierbei ist es wichtig, durch portionsweises Auftragen die Startflecken möglichst klein und kompakt zu halten. Im Gegensatz zu den anderen Kationen erscheint der Mangan-Fleck erst nach Bedampfen mit Ammoniak. Nach ca. 30 Minuten verschwindet die Farbe wieder. Durch teilweise Entmischung des Laufmittels kann auch eine hauchdünne Sekundärfront vor dem Kupfer-Fleck erkannt werden.

Während der Trennung kann man 2 Farbzonen verfolgen:

Eine gelbe, die dem $(\text{CuCl}_4)^{2-}$ -Komplex zuzuordnen ist und eine blaue vom $(\text{CoCl}_4)^{2-}$ -Komplex.

Bei diesem Versuch kann man auch sehr beeindruckend durch Laufmittelvariation mit den R_f -Werten »spielen«. Wählt man als Laufmittel 10 ml Aceton, 1,5 ml der verdünnten Salzsäure und 1 ml Wasser, so ergibt sich das nebenstehende Chromatogramm.

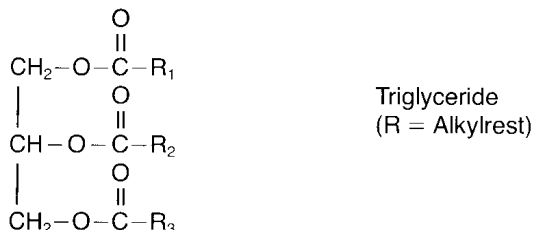
Weiteren eigenen Versuchen (Variation der HCl-Konzentration) steht nichts im Wege! Als Folgerung muss aber beachtet werden, dass die Salzsäure-Vorratsflasche gut verschlossen bleiben muss, um reproduzierbare Trennergebnisse zu erhalten. Schon geringe Schwankungen in der Salzsäurekonzentration verändern die R_f -Werte.



TRENNBEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS F 2

Analyse von Speisefetten

Im engeren Sinne sind Fette Glycerinester höherer Fettsauren (z. B. Palmitin-, Stearin-, Ölsäure). Ungesättigte Fettsäuren enthalten noch Doppelbindungen, und diese sind als Glycerinester von besonderer Bedeutung für die menschliche Ernährung. Neben diesen Estern (den so genannten Triglyceriden)



weisen natürliche und künstliche Fette und fette Öle weitere Bestandteile auf. Dazu zählen Cholesterin, Cholesterinester, freie Fettsäuren und Phospholipide. Durch Zutritt von Licht und Luft entstehen Hydroxyfettsäuren bzw. deren Triglyceride, das Fett wird »ranzig«.

In unserer Nahrung sind diese Bestandteile vor allem in Butter, Margarine und Speiseöl enthalten. Ein Teil dieser Lipide kann auch im Blut nachgewiesen werden, wobei vom medizinischen Standpunkt aus vor allem der Cholesteringehalt von Bedeutung ist.

Bei dem zunächst aufgeführten Versuch geht es um handelsübliche Fette, die in ihre wichtigsten Bestandteile aufgetrennt werden. Je nach Handelsprodukt können kleinere Abweichungen auftreten. Der Nachweis der Substanzen erfolgt mit dem Sprühreagenz Molybdato-phosphorsäure. Mit reduzierenden Verbindungen entstehen dunkelblaue bis grauschwarze Flecken (Molybdänblau).

Probenvorbereitung:

Je 1 g Butter, Margarine bzw. Speiseöl werden in die dafür vorgesehenen Gläschen eingewogen, mit 10 ml Chloroform versetzt und das gut verschlossene Glas durchgeschüttelt. Wegen des Wassergehaltes in einigen Fetten (z. B. der Butter) entstehen lediglich trübe Lösungen (Emulsionen). Sie können aber trotzdem direkt als Proben eingesetzt werden.

Vergleichslösung:

Lösung von Cholesterin in Aceton (1 mg/ml). Probe immer gut verschlossen halten!

Trennschicht:

Kieselgel-Fertigfolie POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄

Laufmittel:

Methylenchlorid-Toluol (5 : 2, v/v). Man mischt für die Trennung 7,5 ml Methylenchlorid und 3 ml Toluol direkt in der Trennkammer.

Auftragevolumen:

jeweils ca. 0,5 µl (halb gefüllte Kapillare)

Trennzeit:

Etwa 12 Minuten bei einer Steighöhe von 60-65 mm

Sichtbarmachung:

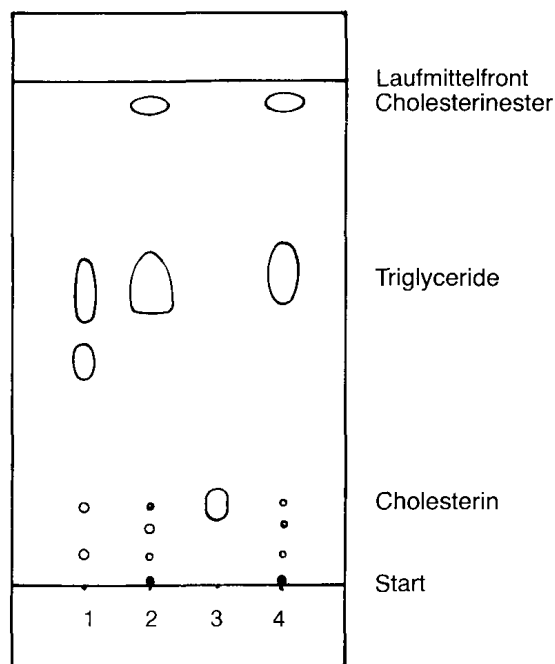
Mit Sprühreagenz Molybdato-phosphorsäure (gelöst in Ethanol)

Durchführung:

Zunächst setzt man aus Handelsprodukten die entsprechenden Probelösungen an. Auf die Startpunkte 1-4 trägt man dann jeweils ca. 0,5 µl der Proben von Butter, Speiseöl, Cholesterin bzw. Margarine auf. Nach 3 Minuten sind die Startflecken trocken. Kammer mit Laufmittel beschicken und Folie hinstellen. Nach ca. 12 Minuten ist die Trennung bereits abgeschlossen. Folie der Kammer entnehmen, Laufmittelfront markieren (Bleistift) und Lösungsmittel unter dem Abzug mit einem Heißluftfön sorgfältig abdampfen. 5 ml des Molybdato-phosphorsäure-Sprühreagenzes werden in die Sprühflasche gefüllt und die Folie gleichmäßig besprüht. Danach wird die Schicht trockengefönt und weitere 3-4 Minuten im Heißluftstrom erhitzt. Es erscheinen dunkelblaue Flecken (Molybdänblau) auf hellgelbem Untergrund. Danach umrandet man die Substanzzonen mit einem Bleistift. Man erhält folgendes Trennbild:

Proben:

1. Butter
2. Speiseöl
3. Cholesterin
4. Margarine



Anmerkungen:

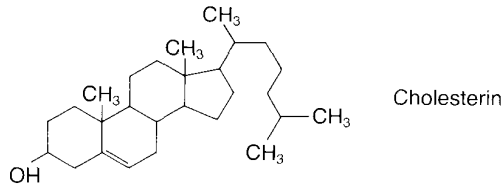
Als Hauptbestandteil der Fette erkennt man die Triglyceride. Unmittelbar oberhalb des Cholesterins können eventuell noch freie Fettsäuren auftreten. Einen kleineren R_F-Wert besitzen die Hydroxyfettsäuren bzw. ihre Triglyceride, und am Start verbleiben die Phospholipide. Die schwachen Flecken verschwinden nach einiger Zeit wieder, so dass eine baldige Markierung sinnvoll ist.

TRENNBEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS F 2

Analyse von Fetten und Cholesterin im Blut

Können Sie Blut sehen? -

Auch Ihr Blut enthält Lipidanteile, die man dünn-schicht-chromatographisch trennen kann. In unserem Versuch soll neben der Trennung auch eine halbquantitative Bestimmung des Cholesterins erfolgen.



Cholesterin ist das am längsten bekannte Steroid. Es kommt in freier oder veresterter Form in menschlichen und tierischen Organen und Flüssigkeiten vor. Es bildet den Hauptbestandteil der Gallensteine, aus denen es auch erstmals isoliert wurde.

Die Rolle und vor allem die gesundheitliche Bedeutung der Konzentration an Cholesterin im Blut des Menschen ist nicht ganz unumstritten. Sicher ist, dass es sich um einen lebensnotwendigen Stoff handelt, den der Körper in einer Menge von 6-8 g täglich selbst produziert. Bei fettarmer Ernährung werden noch zusätzlich täglich 0,04-0,1 g aufgenommen, bei fettreicher Kost bis zu 1,4 g, und zwar in Form des freien Cholesterins und seiner Ester. Bei zu hoher Konzentration im Blut wird eine Ablagerung in den Adern befürchtet (Arteriosklerose), so dass es zu einer erhöhten Infarktgefahr kommt. Daher ist eine Cholesterinbestimmung im Blut von großer medizinisch-diagnostischer Bedeutung.

Unser Versuch soll dazu beitragen, Lipidbestandteile im Blut zu identifizieren und eine halbquantitative Abschätzung des Gehaltes an freiem Cholesterin zu ermöglichen. Aus der bekannten Konzentration der Vergleichslösung (1 mg Cholesterin/ml Aceton) und dem Chromatogramm der Blutprobe werden die Cholesterinflecken bezüglich Fleckengröße und Intensität miteinander verglichen.

Probenvorbereitung:

Zunächst gibt man in das dafür vorgesehene 2 ml Gläschen mit Hilfe der kalibrierten Tropfpipette 0,5 ml Aceton und verschließt es bis zum Gebrauch. Dann reinigt man mit einem Alkoholtupfer eine Fingerkuppe des »Blutspenders« und drückt mit dem Daumen die Kuppe hoch. Mit einer sterilen Blutlanzette sticht man in die Kuppe. Durch mehrmaliges Drücken mit dem Daumen erhält man schließlich einen ausreichend großen Blutstropfen, von dem mit der vorgesehenen Einmalpipette 25 µl aufgesaugt werden (evtl. Gummihütchen benutzen). Das Blut wird sofort in das vorbereitete Gläschen mit Aceton gegeben, fest verschlossen und geschüttelt. Man lässt die Blutprobe absitzen und hält sie bis zum unmittelbaren Gebrauch gut verschlossen. Die überstehende klare Lösung (Serum) enthält die Lipidbestandteile und dient später als Probe.

Vergleichslösung:

Lösung von 1 mg Cholesterin in 1 ml Aceton.

Probe immer gut verschlossen halten!

Trennschicht:

Kieselgel-Fertigfolie POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄

Laufmittel:

Methylenchlorid-Toluol (5 : 2, v/v). Man mischt direkt in der Trennkammer 7,5 ml Methylenchlorid mit 3 ml Toluol

Auftragevolumen:

0,5 µl (= halb gefüllte Kapillare) Vergleichslösung, unterschiedliche Probenvolumina (siehe Durchführung)

Trennzeit:

Ca. 12 Minuten

Sichtbarmachung:

Molybdätophosphorsäure in Ethanol als Sprühreagenz

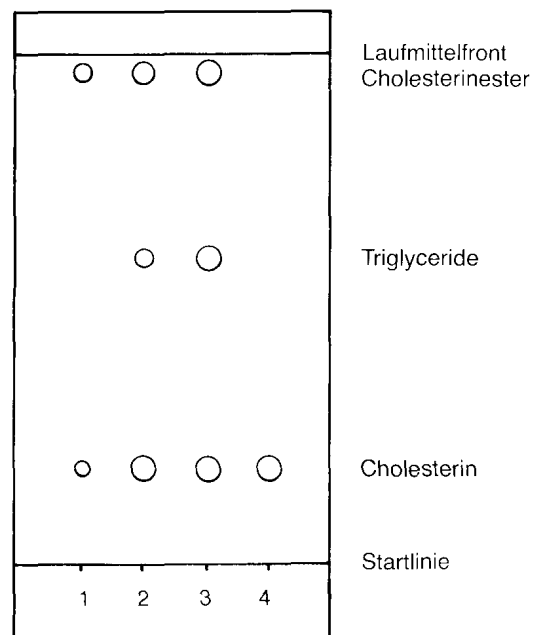
Durchführung:

Auf der DC-Fertigfolie wählt man die Einteilung für 4 Startpunkte und trägt folgendermaßen auf:

Startpunkt

- 1: 1x 1 µl der klaren Serumlösung
- 2: 2x 1 µl der klaren Serumlösung
- 3: 3x 1 µl der klaren Serumlösung
- 4: 0,5 µl der Vergleichslösung

Nach dem Trocknen der Schicht wird die Trennkammer mit Laufmittel beschickt und die Folie hineingestellt. Nach beendeter Trennung wird die Folie der Kammer entnommen und die Laufmittelfront markiert. Man trocknet die Schicht unter dem Abzug mit Hilfe eines Heißluftföns und besprüht dann mit dem Molybdätophosphorsäure-Sprühreagenz (ca. 5 ml in den Laborsprüher einfüllen). Die Schicht wird trockengeföhnt und danach weitere 3-4 Minuten im Heißluftstrom behandelt, bis die Substanzflecken erscheinen. Die erscheinenden Zonen werden sofort mit einem weichen Bleistift umrandet. Dabei ergibt sich folgendes Chromatogramm:



Anmerkungen:

Als lipide Bestandteile enthält Blut nicht nur Cholesterin, sondern auch Triglyceride und Cholesterinester (siehe auch vorherigen Versuch).

Das Chromatogramm ist natürlich individuell verschieden. Bei der Auftragung von 1 µl des Blutserums kann, z. B. wie vorstehende Abbildung zeigt, die Konzentration der Triglyceride so gering sein, dass sie nicht nachweisbar sind.

Außerdem hängt die Konzentration der nachzuweisenden Substanzen vom Alter des »Blutspenders« ab und vom momentanen Ernährungszustand, also ob er nüchtern ist oder erst wenige Stunden zuvor gegessen hat.

Nach Rückrechnung aus Vergleichsfleck und Probeflecken des freien Cholesterins kann der Experimentator das Ergebnis noch verfeinern, indem er das Auftragsvolumen an Blutserum weiter variiert und den Versuch wiederholt. Da die Probe in dem leicht flüchtigen Aceton gelöst ist, lassen sich mühelos auch 4 µl, 5 µl oder mehr Serumlösung auftragen.

Rechenbeispiel für den Gehalt an freiem Cholesterin in Blut: Üblicherweise gibt man den Wert in mg Cholesterin pro 100 ml Blut an. Zu berücksichtigen ist, dass der Verdünnungsfaktor der 25 µl Blutlösung in 0,5 ml Aceton (= 500 µl) 500/25 also 20 betrug.

Angenommen, der Cholesterinfleck unserer 3 µl Serumlösung zeigt die gleiche Intensität und Größe wie unsere 0,5 µl Vergleichslösung der Konzentration 1 mg/ml, dann war die Probe 1/6 der Konzentration der Vergleichslösung. Man erhält dann:

$$\frac{1}{6} \times \frac{500}{25} \times 100 = 333$$

In 100 ml Blut waren also 333 mg freies Cholesterin enthalten.

Interessant ist zum Abschluss noch folgendes Rechenbeispiel aus unserem Versuch: Welche Absolutmenge Cholesterin lässt sich auf der Folie noch eindeutig nachweisen? Man erhält so einen guten Eindruck von der Empfindlichkeit des Verfahrens.

TRENN BEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS F 3

Trennung von Analgetika (Schmerzlinderungsmittel)

Analgetika sind Medikamente, die sehr häufig Anwendung finden. Zu den bekanntesten Wirkstoffen zählt die Acetylsalicylsäure, die sich seit über 80 Jahren bewährt hat. Während in der Bundesrepublik Deutschland ca. 10 g/Kopf dieser Substanz jährlich verbraucht werden, sind es in England ca. 20 g und in den USA sogar fast 60 g pro Kopf der Bevölkerung.

Da noch eine ganze Reihe anderer Wirkstoffe als Analgetika eingesetzt werden, kann man die Gesamtmenge der produzierten Analgetika kaum abschätzen. Bei dieser Gelegenheit geben wir zu bedenken, dass einige Wirkstoffe wegen ihrer Nebenwirkungen nicht ungefährlich sind. Viele schmerzlindernde Präparate enthalten auch häufig noch Koffein.

In unserem Trennbeispiel haben wir aus dem riesigen Angebot an Analgetika die beiden Handelspräparate Aspirin® und Thomapyrin® ausgesucht. Der Nachweis der enthaltenen Wirkstoffe ist etwas aufwendiger als üblich, da es kein Sprühreagenz gibt, das uns alle Komponenten gleichzeitig anzeigt. Es werden daher zwei Chromatogramme parallel angefertigt.

Probenvorbereitung:

- 1 Tablette Aspirin im Mörser pulverisieren und mit 8 ml Chloroform verrühren. Die entstandene Suspension wird durch ein Faltenfilter MN 615 1/4 in ein Becherglas filtriert und mit weiteren 8 ml Chloroform nachgewaschen. Das klare Filtrat wird in das vorgesehene Probefläschchen als Aspirin-Probe überführt. Der verbleibende Rückstand wird verworfen.
- 1 Tablette Thomapyrin wird im Mörser zerkleinert, mit 5 ml 2-Propanol aufgeschlämmt und durch ein Faltenfilter in ein Becherglas filtriert. Mit 5 ml 2-Propanol wird nachgewaschen und das klare Filtrat als Thomapyrin-Probe in das entsprechende Fläschchen überführt.

Vergleichslösungen:

Koffein, gelöst in Chloroform; alkoholische Lösung von Paracetamol

Trennschicht:

Kieselgel Fertigfolie POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄

Laufmittel:

Chloroform-Eisessig-Essigsäureethylester (36 : 2,4 : 1, v/v), hergestellt aus 18 ml Chloroform und 1,7 ml Eisessig-Essigsäureethylester-Gemisch. Das

Volumen reicht aus, um 2 Trennkammern zu beschicken.

Auftragevolumen:

jeweils ca. 1 µl (= 1 gefüllte Kapillare)

Trennzeit:

etwa 15-18 Minuten

Sichtbarmachung:

Zum Nachweis von Acetylsalicylsäure und Paracetamol verwendet man eine Mischung zweier Eisensalzlösungen (FeCl₃ bzw. K₃[Fe(CN)₆]), die jeweils kurz vor der Anwendung direkt im Laborsprüher gemischt werden. Koffein wird mit einem Spezialsprühreagenz sichtbar gemacht.

Durchführung:

Zur Auftragung der Substanzen wählt man die Einteilung für 4 Startpunkte auf der Schablone:

Startpunkt

- 1 µl der Thomapyrin-Probe
- 1 µl Paracetamol-Lösung
- 1 µl der Aspirin-Probe
- 1 µl Koffein-Lösung

Diese Auftragung nimmt man auf zwei DC-Folien parallel vor. Um Verwechslungen zu vermeiden, kennzeichnet man sie gleich zu Anfang am Kopfe als Folie 1 und 2. Danach beschickt man zwei Trennkammern mit Laufmittel und stellt jeweils eine der Fertigfolien hinein. Nach etwa 15-18 Minuten sind die Trennungen beendet. Folien den Kammern entnehmen, Laufmittelfront markieren und die Schicht sorgfältig trockenfönen (Abzug!). Zur Sichtbarmachung der Substanzen werden die Folien unterschiedlich behandelt.

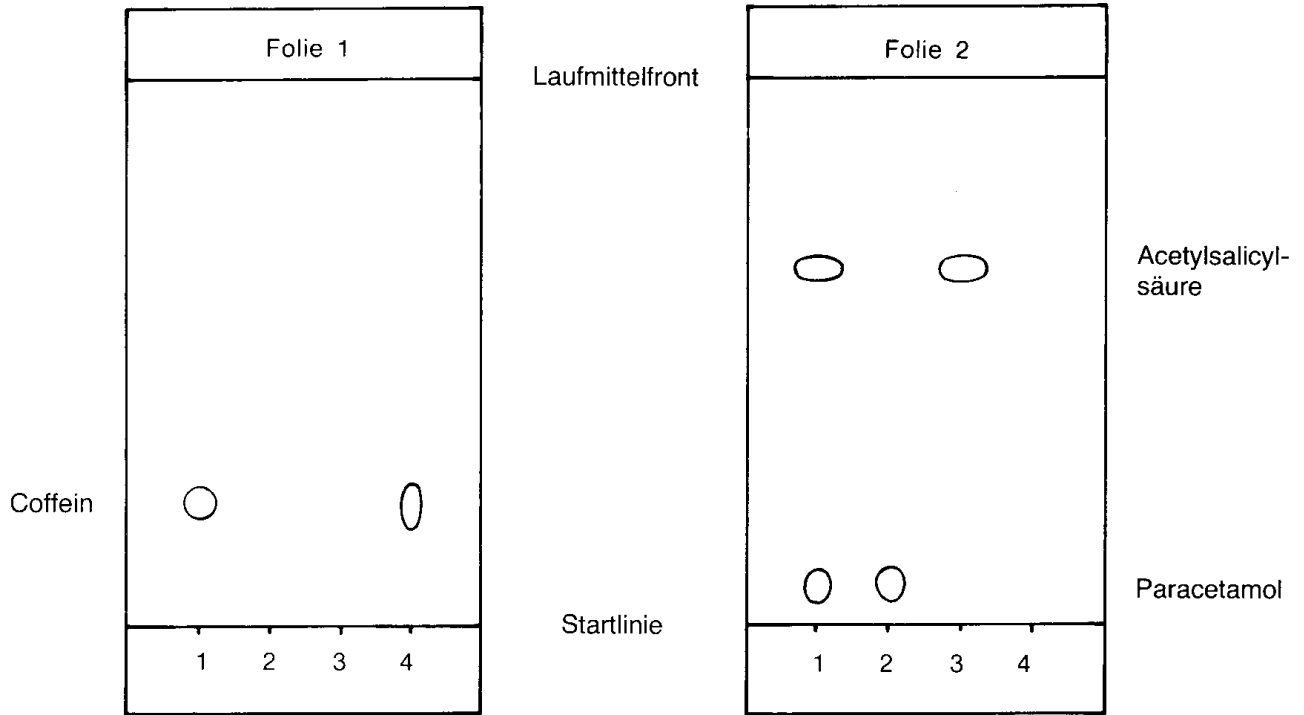
Zunächst wird Folie 1 hauchdünn mit dem Spezialreagenz für Koffein besprüht (Abzug!), kurz kalt gefönt und nochmals hauchdünn besprüht. Nach kurzem Trocknen im Kaltluftstrom werden die braunen Koffein-Flecken auf hellblauem Untergrund umrandet (Bleistift).

Die zweite Folie legt man etwa 5 Minuten in den Trockenschrank bei 110 °C. In den sorgfältig gereinigten Sprüher gibt man 3 ml der K₃[Fe(CN)₆]-Lösung und anschließend 3 ml der FeCl₃-Lösung (auftretende Ausfällungen sind zu vernachlässigen). Die zuvor erhitze Folie wird zunächst leicht mit diesem Sprühreagenz durchfeuchtet und kurz gefönt. Die Substanzflecken von Paracetamol (blau) und Acetylsalicylsäure (graubraun bis violett) werden mit dem Bleistift umrandet (das übrig bleibende Sprühreagenz verwerfen).

Die erhaltenen Chromatogramme zeigen nachfolgende Abbildungen.

Aspirin® = Warenzeichen der Bayer AG, Leverkusen

Thomapyrin® = Warenzeichen der Boehringer Ingelheim, Deutschland



Anmerkungen:

Während Aspirin (Startfleck 3) als Wirkstoff nur Acetylsalicylsäure enthält, besteht Thomapyrin (Startfleck 1) aus Acetylsalicylsäure, Paracetamol und Koffein (Kombinationspräparat). Beim Koffein-Nachweis darf nicht heiß gefönt werden, weil sonst die Fleckenfärbung sofort wieder verschwindet. Eventuell kann durch eine geringe Jod-Adsorption auch bei Paracetamol und Acetylsalicylsäure eine leichte Gelbfärbung auftreten.

Beim Nachweis auf Folie 2 darf die Trockenschrankbehandlung nicht zu lange dauern, weil sonst diffuse und rein blaue Flecken der Acetylsalicylsäure erscheinen. Tritt eventuell noch ein weiterer kleiner Fleck vor der Acetylsalicylsäure auf, so handelt es sich um Salicylsäure (Hydrolyseprodukt bei älteren Proben). Wichtig bei diesem Nachweis ist auch die Sauberkeit des Sprüherers vor dem Einfüllen der Sprühreagenzien. Ist bereits eine blaue

Farbe im Sprüher erkennbar (Berliner Blau), so wird er zunächst gründlich mit verdünnter Natronlauge gereinigt. Bei zu starkem Besprühen färbt sich die ganze Folie kurze Zeit später blau. Nach längerer Zeit entsteht durch Reduktion von Fe^{3+} grundsätzlich »Berliner Blau« und damit ein blauer Untergrund. An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass Sprühreagenzien nur unter einem gut funktionierenden Abzug angewendet werden dürfen.

Steht eine UV-Lampe zur Verfügung, so kann die komplette Trennung auf einer einzigen Folie bei kurzwelligem UV-Licht (254 nm) beobachtet werden.

Interessant ist auch die Trennung in einem anderen Laufmittel (Essigsäureethylester-Methanol = 98 : 2, v/v), wobei auch die Reihenfolge der Substanzen nach der Trennung sich vom vorgeschlagenen Versuch unterscheidet! (Trennschicht POLYGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄).

TRENNBEISPIELE DES TLC MIKRO-SETS F 3

Drogenanalyse am Beispiel der Chinarinde

Wie bereits erwähnt, hat die Dünnschicht-Chromatographie bei der Analyse von Stoffgemischen eine sehr breite Anwendung gefunden. Auch für die Analyse von Drogen ist sie ein schnelles und informatives Verfahren.

Im heutigen Sprachgebrauch werden unter dem Begriff «Drogen» häufig die Rauschdrogen verstanden. Unter Drogen im eigentlichen Sinne versteht man jedoch getrocknete Stoffe pflanzlichen Ursprungs mit therapeutisch wirksamen Inhaltsstoffen. Sie finden direkt oder in Form ihrer Extrakte Anwendung als Arzneimittel.

In unserem Beispiel handelt es sich um die Droge Chinarinde (*Cortex chinae succirubrae*). Ihre Inhaltsstoffe sind bestimmte Alkaloide, die wir zunächst extrahieren und dann dünnenschichtchromatographisch trennen. Alkaloide wiederum sind eine Gruppe von stickstoffhaltigen, basischen Naturstoffen und stellen pharmakologisch hochwirksame Substanzen dar. Je nach Gehalt unterscheidet man Haupt- und Nebenalkaloide. Man kennt etwa 35 Chinaalkaloide, darunter die 4 Hauptalkaloide Chinin, Chinidin, Cinchonin und Cinchonidin.

Zu den pharmazeutisch wichtigsten gehören Chinin und Chinidin. Chinin ist ein Mittel gegen Malaria und wirkt fiebersenkend. Chinidin hat eine entspannende Wirkung und hilft bei Herzrhythmusstörungen.

Zur Sichtbarmachung der getrennten Substanzen dient das Dragendorff-Reagenz in der Variante nach Munier als allgemeiner Nachweis für Alkaloide.

Probenvorbereitung:

Ca. 1 g Chinarinde wird im Mörser pulverisiert. Das zerkleinerte Material gibt man in ein Becherglas und fügt ca. 1 ml 12,5%ige Ammoniaklösung und 5 ml 2-Propanol zu. Unter gelegentlichem Umrühren oder Schütteln wird die Droge ca. 10 Minuten warm extrahiert (Wasserbad 50-60 °C). Die Suspension wird über ein Faltenfilter MN 615 1/4 filtriert, mit 2 ml 2-Propanol nachgewaschen und anschließend in das vorgesehene Probegläschen überführt. Das anfangs klare, rot-braune Filtrat kann später Ausfällungen zeigen, die das Trennergebnis jedoch nicht beeinflussen.

Vergleichslösung:

Chinin gelöst in Ethanol

Trennschicht:

Kieselgel Fertigfolie POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄

Laufmittel:

Toluol-Diethylether-Diethylamin (55 : 35 : 10, v/v)

Auftragevolumen:

Je nach Probe 0,5-2 µl

Trennzeit:

2 x 10 Minuten mit Zwischentrocknung

Sichtbarmachung:

Dragendorff-Reagenz nach Munier, das im wesentlichen basisches Wismutnitrat, Weinsäure und Kaliumjodid enthält. Geringe Ausfällungen sind ohne Bedeutung.

Durchführung:

Auf der Schablone wählt man die Einteilung für 3 Startpunkte und trägt wie folgt auf:

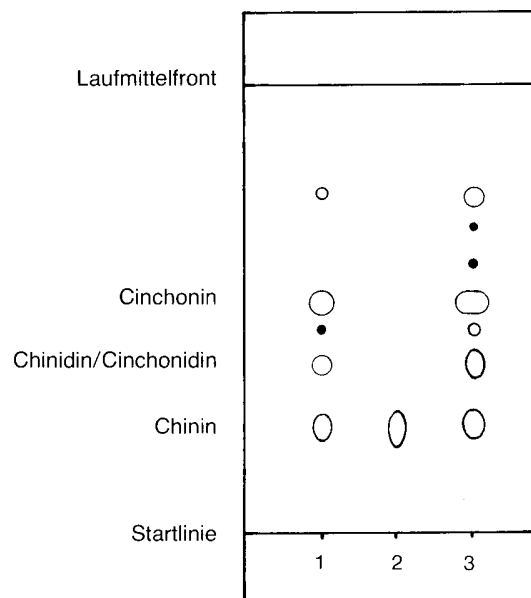
Startpunkt

- 1: 1 µl des Extraktes
- 2: 0,5 µl Chinin-Lösung
- 3: 2 µl des Extraktes

Dabei sollte man durch portionsweises Auftragen die Startflecken möglichst klein und kompakt halten. Anschließend wird die Trennkammer mit frischem Laufmittel beschickt, indem man 9 ml des Toluol-Diethylether-Gemisches (55 ; 35, v/v) und 1 ml Diethylamin zusammengibt.

Die getrocknete DC-Folie wird in die Kammer gestellt, 10 Minuten entwickelt und der Kammer entnommen. Man markiert die Laufmittelfront, fönt die Schicht trocken und entwickelt nochmals 10 Minuten im gleichen Laufmittel. Nachdem das Laufmittel verdampft ist (mit Fön nachhelfen), legt man die Folie auf Filtrierpapier, besprüht kurz mit Dragendorff-Reagenz (im Abzug), fönt trocken und besprüht nochmals hauchdünn. Es erscheinen orangefarbene Zonen auf hellgelbem Untergrund, die mit einem Bleistift umrandet werden.

Man erhält folgendes Chromatogramm;



Anmerkungen;

Die größten Substanzflecken gehören zu den Hauptalkaloiden, wobei Chinidin und Cinchonidin nicht voneinander getrennt werden. Die kleineren Flecken sind den zahlreichen Nebenalkaloiden zuzuordnen. Substanzen mit Eigenfarbe (rotbraun) wie z. B. Harze, verbleiben am Start.

Die Extraktion der Chinarinde kann auch mit Chloroform bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Im Gegensatz zum alkoholischen Extrakt erhält man ein farbloses Filtrat. Steht eine UV-Lampe zur Verfügung (254 nm), so kann die Trennung auch ohne die Verwendung eines Sprühreagenzes erkannt werden.

Aus dem vorhandenen Chemikalien-Set kann auch ein anderes Laufmittel ausprobiert werden: Chloroform-Diethylamin (9 : 1, v/v). Der Nachweis mit dem Sprühreagenz kann bereits nach einer Einmal-Entwicklung vorgenommen werden.

Verzeichnis ergänzender und weiterführender Literatur für Theorie und Praxis der Dünnschicht-Chromatographie

- E. Hahn-Deinstrop: Applied Thin-Layer Chromatography
Wiley-VCH, Weinheim 2000
- J. Sherma, B. Fried: Handbook of Thin Layer Chromatography
Marcel Dekker Inc., New York 1996
- H. Keuker et al.: Proceedings of the International Symposium on Instrumental
Thin Layer Chromatography, Brighton, Sussex, UK 1989, 105 – 114
- H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Winner: Dünnschicht-Chromatographie,
VCH Verlagsgesellschaft, 1989
- F. Geiss: Parameters of Thin Layer Chromatography
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg 1987
- R. E. Kaiser: Einführung in die HPTLC
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, 1987
- R. E. Kaiser (Editor): Planar Chromatography, Volume 1
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, 1986
- J. G. Kirchner: Thin Layer Chromatography
Wiley Interscience, New York 1973
- S. C. Touchstone: Quantitative Thin Layer Chromatography
Wiley Interscience, New York 1973
- E. Stahl: Thin Layer Chromatography,
1st edition, Springer-Verlag, Berlin/Academic Press, New York 1965
- G. B. Marini-Bettòlo: Thin Layer Chromatography
Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964
- E. Stahl; Dünnschicht-Chromatographie
2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, 1967
- F. Geiss; Die Parameter der Dünnschichtchromatographie
Vieweg, Braunschweig, 1972
- K. Randerath; Dünnschicht-Chromatographie
2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 1975
- G. Schwedt: Chromatographische Trennmethode
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1979
- G. B. Marini-Bettòlo; Thin-Layer Chromatography
Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964

Wenn Sie sich für andere MN Produkte interessieren, fordern Sie unsere Firmenschriften an:

- Schnellteste: - pH- und Indikatorpapiere
- VISOCOLOR® Schnellteste zur Wasseruntersuchung
- NANOCOLOR® photometrische Wasseranalysen

Chromatographie-Gesamtkatalog
Filtrierpapiere und Filtermembranen
Medi-Test Medizinisch-Diagnostische Testpapiere