

V. Hauptthema: Dünnschichtchromatographie

H. W. RAUDONAT (Frankfurt a. M.): Die Bedeutung der Dünnschichtchromatographie für die chemisch-toxikologische Analyse.

Das Analysenverfahren „Dünnschichtchromatographie“ wurde im Jahre 1938 erstmals von den Russen ISMELOW und SCHRAIBER beschrieben. Sie bestrichen damals Objektträger mit einer selbst bereiteten Paste aus Aluminiumoxid und Wasser und tropften nach Trocknen der etwa 2 mm starken Schicht alkoholische Pflanzenauszüge auf diese Glasplättchen. Hierbei beobachteten sie die Ausbildung unterschiedlich gefärbter ringförmiger Zonen, deren Abgrenzung durch Nachtropfen von Alkohol noch verbessert werden konnte. Es war der erste Schritt von der „geschlossenen“ Säulenchromatographie (nach TSWETT) zur „offenen“ Chromatographie, Jedoch erst 20 Jahre später war es STAHL, der diese Methode, nachdem er sie weitgehend standardisiert hatte, in die Praxis des analytischen Laboratoriums einführte. Er schaffte zweckmäßige Hilfsgeräte, vielseitige Sorptionsmittel und fand immer neue Anwendungsgebiete, zumal es ihm gelang, nicht nur Methoden zur Auftrennung *lipophiler*, sondern auch *hydrophiler* Körperklassen zu erarbeiten. Die bis dahin meist angewendeten papierchromatographischen Verfahren hatten somit einen Konkurrenten, die *Dünnschichtchromatographie*. In vieler Beziehung war sie der Papierchromatographie überlegen. Ihre Vorteile lagen nicht allein in der zehnfach bis hundertfach größeren Empfindlichkeit, sondern auch in einer besseren Trennschärfe und, vor allem, in der Schnelligkeit der Analyse. Ein Papierchromatogramm benötigt zur Entwicklung Stunden, ein Dünnschichtchromatogramm nur Minuten. Damit war auch dem Toxikologen eine Methode gegeben, die es ihm ermöglicht, in aller kürzester Zeit, bei akuten Vergiftungen, Art und Menge eines Giftes im Urin, Blut oder Magenspülflüssigkeit nachzuweisen. Ein solcher Befund kann unter Umständen lebensrettend sein.

I.

Das Prinzip der Dünnschichtchromatographie ist äußerst einfach: Man bringt die etwa 250 μ starke Schicht eines Adsorbens auf 10 \times 20 cm oder 20 \times 20 cm große Glasplatten, stellt diese in Kammern, die ein Laufmittel enthalten, das durch Capillarität in die Schicht gesaugt wird und damit die Auftrennung des zu prüfenden Substanzgemisches bewirkt. Gefärbte Stoffe sind nach Abschluß der Analyse, die meist 30–60 min erfordert, einfach zu lokalisieren. Nicht gefärbte Verbindungen lassen sich durch ihre Fluorescenz oder mittels Farbreagentien leicht auffinden.

Auf die wichtigsten Methoden dieser allgemeinen Technik soll hier näher eingegangen werden:

Das für den chemisch-toxikologisch arbeitenden Analytiker bedeutendste Verfahren der Dünnschichtchromatographie ist die Absorptionschromatographie. Es fußt auf der Anreicherung eines gelösten Stoffes an einer Phasengrenzfläche, wie z. B. an der Oberfläche von Kieselgel oder Aluminiumoxid. Der Trenneffekt ist hierbei nicht nur abhängig von der Korngröße des Adsorbens, sondern auch von der Konzentration der Substanz und der Temperatur im Lösungsmittelsystem. Im Idealfall werden während der Analyse Adsorption und Desorption im Gleichgewicht stehen.

Weiterhin hat der Untersuchende folgendes zu beachten:

1. Es können nur begrenzte Mengen Substanz adsorbiert werden.
2. Während des Wanderns der zu trennenden Substanzen werden die aktiven Zentren des Adsorbens zuerst besetzt (Schwanzbildung — Tailing).
3. Die Trennung von Substanzen homologer Reihen kann durch Konkurrenzadsorption die Leerzone, die sich in der Regel zwischen den einzelnen Flecken ausbildet, wegfallen.

4. Letzthin ist die Wanderungsgeschwindigkeit von Begleitstoffen abhängig, die in jedem noch so vorgereinigtem Organextrakt zugegen sind.

Bei der Wahl des Adsorbens und des Laufmittels ist zu bedenken, daß starke Adsorbentien auch starke Eluentien erfordern. Wie bei jeder neuen Methode wird man sich durch Vorproben informieren müssen, ob ein neues System für die geplante Fragestellung geeignet ist. Daneben gibt es zahlreiche Möglichkeiten der Variation. So kann z. B. die Aktivität einer Schicht durch Erhitzen auf 100 bzw. 150°C beträchtlich erhöht, durch Befeuchten erniedrigt werden. Die Zugabe polarer Lösungsmittel verbessert oft die Elutionskraft eines Eluens. Solche Vorproben werden meist auf verschieden beschichteten Objektträgern unternommen. Um saure Gruppen im Adsorbens zu binden und damit die Trennleistung zu verbessern, können diesem außerdem basische Zuschläge gegeben werden. Den gleichen Erfolg erzielt man auch mit geringen Mengen organischer Basen im Laufmittel.

Im Gegensatz zur Adsorptions-Dünnschichtchromatographie wird die Verteilungs-Dünnschichtchromatographie in der chemisch-toxikologischen Analyse relativ selten eingesetzt, da offenbar die Herstellung brauchbarer Schichten und zweiphasiger Laufmittel mehr Zeit erfordert. Diese Methode hat jedoch den großen Vorteil, daß störende Ballaststoffe den R_f -Wert wandernder Substanzen weniger beeinflussen können. Als Schicht verwendet man indifferente Träger, die auf ihrer Oberfläche eine flüssige, stationäre Phase tragen, die mit dem Laufmittel nicht mischbar sein darf. Die zu trennenden Komponenten werden, wenn man dem Nernstschen Verteilungssatz folgt, ihrem Konzentrationsgefälle entspre-

chend, vom Fließmittel mitgeführt. Zwischen Adsorptions- und Verteilungschromatographie gibt es Übergänge und Überlagerungen, vor allem, wenn mit wasserhaltigen Laufmitteln an Adsorbentien geringer Aktivität chromatographiert wird.

Andere Methoden, wie die Dünnschichtchromatographie an Ionenaustauschern und Cellulose, an Polyamiden und Dextrangelen sollen hier unbeachtet bleiben, da sie für die chemisch-toxikologische Analyse bisher nur sehr geringe oder gar keine Bedeutung gewonnen haben.

II.

Die Technik der Methode: Eine der wichtigsten Schritte zur Herstellung verwertbarer DC-Chromatogramme ist die Aufbringung einer brauchbaren Trägerschicht. Die mehr oder minder dickflüssige Streichmasse wird durch Mischen des Adsorbens mit Wasser oder organischem Lösungsmittel gewonnen. Unmittelbar danach wird sie mit Hilfe eines Profiles oder eines handelsüblichen Streichgerätes auf entfettete Glasplatten der Abmessung 10×20 cm oder 20×20 cm (Standardmaß) in einer Schicht von nicht stärker als 250μ (nach Trocknung) verteilt. Werden Auftrennungen im präparativen Maßstab beabsichtigt, so kann die Schicht bis zu 1 mm stark sein, bei besonders dicker Streichmasse nach HONEGGER sogar bis 5 mm. Allerdings ist es *dann* möglich, daß nach dem Trocknen Risse entstehen, die die Schicht unbrauchbar machen. Die Platten durch Sprühen, Tauchen oder Gießen mit dem Adsorbens zu versehen, ist prinzipiell ebenfalls möglich, doch wird hierbei nie die Gleichmäßigkeit einer gestrichenen Schicht erreicht. Als Adsorbentien werden in erster Linie Kieselgel und Aluminiumoxid in einer Korngröße von $5-25 \mu$ verwendet, die als Kieselgel „G“ und Aluminiumoxid „G“, je nach Hersteller $5-15\%$ Gips als Bindemittel enthalten. Gipsfreie Adsorbentien, oft mit „H“ bezeichnet, werden ebenso wie die bindemittelhaltigen häufig mit einem Fluorescenzzusatz versehen, der im kurzwelligen UV-Licht stark leuchtet ($254 m\mu$). Viele Substanzen löschen diese Fluorescenz und sind dann leicht — ohne vorherige Anfärbung mit Reagentien — im Chromatogramm zu lokalisieren. Da die meisten Adsorbentien heute handelsüblich sind, ist die Reproduzierbarkeit der Analysen weitgehend gewährleistet. Ob die Schicht vor dem Auftragen der Probe noch durch Erhitzen zu aktivieren ist, muß von Fall zu Fall, evtl. im Vorversuch, entschieden werden. Ratsam, jedoch nicht unbedingt erforderlich, ist die Schaffung einer mindestens 2 mm breiten schichtfreien Randzone, die ein zu schnelles Verdampfen des Fließmittels an den Plattenkanten verhindert und somit den Gleichlauf der Lösungsmittelfront erheblich verbessert.

Das Auftragen der gelösten Probe — Suspensionen sind ungeeignet — soll auch bei qualitativen Analysen mittels einer Mikropipette erfolgen.

Die Technik ist die gleiche wie bei der Papierchromatographie, man trocknet die Auftragstelle mit einem Ventilator, um Zeit zu sparen. Ist der Startfleck lufttrocken, wird die Platte in der Regel in eine Kammer (Glastrog) gestellt, deren Boden mit einer 0,5—1 cm hohen Schicht des erprobten Laufmittels versehen ist. An die Wand der Kammer heftet man durch Adhäsion ein mit Fließmittel getränktes Papier, um die Atmosphäre möglichst rasch mit Lösungsmitteldampf zu sättigen, weil sonst bei multiplexen Systemen die leicht siedenden Komponenten zuerst verdampfen würden. Dadurch verändert sich während der Chromatographie die Zusammensetzung des auf der Platte steigenden Lösungsmittels kontinuierlich. Da einerseits diese Konzentrationsverschiebung nie völlig zu verhindern ist, andererseits auch durch chemische Umsetzungen (Veresterung) die Konzentration einzelner Komponenten im Laufmittel abnimmt, sollte es möglichst häufig erneuert werden.

Das Entwickeln benötigt meist weniger als 1 Std. Man achte jedoch darauf, daß die Front nicht bis zur Oberkante der Platte durchläuft. 10 cm Laufstrecke sind ausreichend. Obwohl die Platten aufsteigend und absteigend entwickelt werden können, wählt man meist das aczendierende Verfahren. Ebenso wie bei der nahe verwandten Papierchromatographie kann sowohl ein- als auch zweidimensional mit zwei verschiedenen Fließmitteln entwickelt werden. Weitgehend ähnlich sind auch die Nachweisverfahren für die aufgetrennten Substanzen, doch hat die Dünnschichtchromatographie den großen Vorteil, daß sehr aggressive Reagentien wie z. B. konzentrierte Schwefelsäure oder konzentrierte Natronlauge bedenkenlos angewendet werden können. Für vergleichende qualitative Untersuchungen ist neben Farbreaktionen der R_f -Wert das geeignetste Charakteristikum einer noch unbekannt Substanz. Da dessen Größe von der *Schichtqualität*, dem Grad der *Aktivierung* und der *Schichtdicke* beeinflußt wird, ist es ratsam, wenn möglichst jede Probe mehrmals zu chromatographieren und entsprechende Kontrollen (Tests) mitlaufen zu lassen. Die aufgefundenen Flecken lassen sich danach leicht eluieren und oft auch durch UV-Spektrum identifizieren.

Eine quantitative Auswertung ist nach der Fleckengröße auf planimetrischem Wege möglich, wenn man entsprechende Flecken bekannter Kontrollmengen zum Vergleich hat. Sonst bleibt nur die Photometrie nach Umsetzung der Substanz mit farbgebenden Reagentien oder die direkte Auswertung nach den Extinktionsgrößen von Spektren einzelner Eluate.

Relativ umständlich ist die Dokumentation der Chromatogramme. Polyvinylpropionat, im Handel als Neatan, gibt der porösen lufttrocknen Schicht nach Aufsprühen oder Tränken eine gewisse Festigkeit, die ein späteres Abziehen von der Glasplatte ermöglicht. Auch Collodium ist als Stabilisator erprobt worden und MACHATA empfahl das Tauchen im ge-

schmolzenen Paraffin. Die Anfertigung einer kleinen Handskizze ist jedoch meist ausreichend und einfach.

Beabsichtigt man den Einsatz der Dünnschichtchromatographie in der toxikologischen Analyse, dann ist eine Vorreinigung des Ausgangsmaterials und Abtrennung sowie Anreicherung von Giften und Arzneimitteln vor Beginn der Trennversuche nicht zu umgehen. Man muß bemüht sein, die störenden biologischen Begleitstoffe weitgehend zu entfernen und bedient sich dabei üblicher Reinigungsmethoden, wie jener nach STAS-OTTO oder Varianten derselben. Schon MACHATA und BÄUMLER schlugen 1960 und 1961 einfache Extraktionsverfahren von Organen und Körperflüssigkeiten aus saurem, neutralem und alkalischem Medium mit organischen Lösungsmitteln vor. MACHATA setzte mit Erfolg einfache Lösungsmittelsysteme, die sich aus Chloroform und Äther zusammensetzen, zur Auftrennung von sauren und basischen Substanzen auf Kieselgel „G“ ein. Er färbte schließlich die Chromatogramme mit verschiedenen Fargreagentien wie Dragendorffs Reagens, essigsaurer Jodjodkalilösung, Kaliumpermanganatlösung, Fluorescein-Natrium, Eisenchlorid und Zwickers Reagens an. Die Leistungsfähigkeit des sehr einfachen Analysenverfahrens wurde damals an einem durch Opiumtinktur verursachten Vergiftungsfall bestätigt. Die Alkaloide *Morphium*, *Codein* und *Narcotin* konnten im Mageninhalt des Vergifteten aufgefunden werden.

COCHIN und DALY (1962) extrahierten zum Nachweis basischer Suchtmittel und Analgetica Urin, Blut und Gewebshomogenate mittels Äthylchlorid, das 10 % Isoamylalkohol enthielt und chromatographierten sowohl auf Kieselgel „G“ als auch auf Aluminiumoxid „G“. Schließlich erarbeiteten GEUDI, KISSER und MACHATA (1965) ein Verfahren, in dem man nach Vorextraktion mit organischen Lösungsmitteln den basischen Anteil des Extraktes mittels 2% iger Tetraphenylboratlösung bei pH 3–3,5 ausfällt und direkt auf ein Dünnschichtchromatogramm aufträgt. An der Gelschicht zerfällt der Komplex und gibt den Basenanteil frei. Dieser unterliegt dann der üblichen Gesetzmäßigkeit der Trennung. Eine solche Methode ist sowohl für die Untersuchung von Organhomogenaten als auch für die Harnanalyse brauchbar, setzt aber in jedem Fall eine Vorreinigung durch eingeschaltete Acetonfällung voraus. Zur Chromatographie empfiehlt es sich auch hier, mehrere Laufmittel einzusetzen. Die Autoren schlagen vier vor: Methanol, Chloroform mit 10% Aceton, Chloroform mit 10% Äthanol und Chloroform mit 20% Äthanol. Die Flecken lassen sich entweder mit Jodplatinatlösung oder nach Chlorieren und Umsetzen mit Benzidin-Kaliumjodid nach VIDIC sichtbar machen.

Die Charakterisierung isolierter und chromatographisch getrennter Substanzen kann auf Chromatogrammen nach zwei Methoden erfolgen. VIDIC und SCHÜTTE (1962) verwendeten zur Chromatographie basischer

Arzneistoffe nur ein Lösungsmittel und färbten nacheinander auf verschiedenen Platten mit mehr als 10 Reagentien an. WALDI, SCHNACKERZ und MUNTER (1961) trennten zahlreiche Alkaloide mittels sieben verschiedenen Lösungsmittelsystemen und benötigten zur Sichtbarmachung neben UV-Licht nur ein Reagens: Jodoplatinat. Hier ist also der *unterschiedliche* R_f -Wert ein wichtigeres Indiz und nicht die chemischen Farbreaktionen, die vorher genannt wurden. Beide Verfahren einzusetzen ist nur möglich, wenn sehr viel Material zur Verfügung steht. Da den Analytiker meist die Substanzmenge und nicht deren Wirkung interessiert, Gifte aber häufig nur in kleinsten Dosen aufgenommen werden, ist der Anteil an Ausgangsmaterial naturgemäß begrenzt. Die Trennleistung läßt sich oft verbessern, wenn durch Ausschüttelung der Gifte bei unterschiedlichem pH-Wert eine Vortrennung (Klassifizierung) erfolgt. Dieser Weg wurde von VIDIC beschrieben und dürfte sicher eine wesentliche Erleichterung sein.

Daß auch wasserdampfvlüchtige Substanzen durch Dünnschichtchromatographie zu identifizieren sind, konnte TEICHERT u. Mitarb. (1960) zeigen, die auf alkalischen Kieselgel „G“ Schichten mittels Chloroform-Äthanol-Gemisch Conein, Nicotin, Spartein und Arecolin trennten und mit Muniers-Reagens sichtbar machten.

Inzwischen sind zahlreiche Spezialverfahren zur Trennung bestimmter Stoffklassen entwickelt worden, doch nur selten wurden sie am biologischen Material erprobt. Sie dienen meist dem Nachweis der Reinsubstanz. So chromatographierte SUNSHINE 17 Phenothiacine an Kieselgel mit Cyclohexan-Diäthylamin (9:1), MELLINGER und KEELER (1962) mit fünf weiteren Laufmitteln am selben Adsorbens. GELDMACHER-MALLINCKRODT und WEIGEL sowie BÄUMLER und RIPPSTEIN erarbeiteten Methoden zum Nachweis von Phosphorsäureestern und chlorierten Insecticiden. Die Leistungsfähigkeit der Methoden wurde laufend verbessert, und so war es möglich, daß zur Konstitutionsaufklärung nicht nur die weniger Material benötigende UV-Spektralanalyse mit herangezogen werden konnte, sondern auch die Infrarottechnik kam zur Anwendung. PAULUS und BOENECHEA (1963) konnten aus dem Mageninhalt Vergifteter Revonal und Noludar isolieren, dünnschichtchromatographisch reinigen und schließlich durch ihre IR-Spektren sicher identifizieren. Eine Differenzierung von Barbiturat und Hydantoin gelang MACHATA auf gleiche Weise (KBr-Preßtechnik). Auch zur Auftrennung von Arzneimittelkombinationen, vor allem wenn es sich um Spuren handelt, kann die Dünnschichtchromatographie die Methode der Wahl sein. So berichteten FRAHM, GOTTESLEBEN und SOEHRING über erfolgreiche Versuche zur Auftrennung von barbituratfreien und barbiturathaltigen Schlafmitteln an Kieselgel „G“-Platten mittels Isopropanol, Ammoniak und Chloroform und GÄNSHIRT (1960) über den Nachweis von Wirkstoffen in verschiedenen Antneuralgica und Lokalanaesthetica.

Die Aufzählung von Beispielen soll hier nicht ohne den Hinweis auf die Bedeutung der Dünnschichtchromatographie für den Nachweis von Stoffwechselprodukten zahlreicher Pharmaka beendet werden. So verfolgten u. a. BÄUMLER und RIPPSTEIN den Abbau von Librium bei Körperpassage und isolierten auf diese Weise das 2-Amino-5-chlor-benzophenon aus dem Harn libriumbehandelter Personen als wichtigsten, mit Glucuronsäure gepaarten Metaboliten. Auch VIDIC konnte durch Dünnschichtchromatographie mehrere Abbauprodukte des Jetriums und des Polamidons im Urin nachweisen.

Die Zahl der Publikationen über dünn-schichtchromatographische Methoden nimmt laufend zu. Diese Übersicht mußte auf wenige Anwendungsbeispiele beschränkt bleiben, ohne damit einzelne Verfahren besonders hervorheben zu wollen. Die Zukunft wird zeigen, welche der Methoden einmal zu bevorzugen sein wird oder aber, ob jede für sich, die Papierchromatographie und die Dünnschichtchromatographie, die ihnen zugeordneten Aufgaben nebeneinander erfüllen werden.

Literatur

- BÄUMLER, J., u. S. RIPPSTEIN: *Pharmac. Acta Helv.* **36**, 382 (1961).
— — *Helv. chim. Acta* **44**, 2208 (1961).
CHOCHIN, J., u. J. W. DALY: *Experientia* (Basel) **18**, 249 (1962).
EL GENDI, S., W. KISSER u. G. MACHATA: *Mikrochim. Acta* **120** (1965/I).
FRAHM, M., A. GOTTESLEBEN u. K. SOEHRING: *Arzneimittel-Forsch.* **11**, 1008 (1961).
GÄNSHIRT, H., u. A. MALZACHER: *Arch. Pharma.* (Weinheim) **293**, 65, 925 (1960).
GELDMACHER-MALLINCKRODT, M., u. U. WEIGEL: *Arch. Toxikol.* **20**, 114 (1963).
MACHATA, G.: *Mikrochim. Acta* **79** (1960).
—, u. W. KISSER: *Arch. Toxikol.* **19**, 327 (1962).
RANDERATH, K.: *Dünnschichtchromatographie*. Weinheim: Verlag Chemie 1962.
STAHL, E.: *Dünnschichtchromatographie*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.
STOLMANN, A.: *Progress in chemical toxicology*, vol. 2, p. 321. New York and London: Academic Press 1965.
SUNSHINE, J., E. ROSE u. LE BEAU: *J. Clin. Chem.* **9**, 312 (1963).
TEICHERT, K., E. MUTSCHLER u. H. ROCHELMMEYER: *Dtsch. Apoth.-Ztg.* **100**, 283 (1960).
VIDIC, E.: *Arch. Toxikol.* **19**, 254 (1961).
—, u. J. SCHÜTTE: *Arch. Pharm.* (Weinheim) **295**, 342 (1962).

Dr. H. W. RAUDONAT
Institut für gerichtliche Medizin
der Universität
6 Frankfurt a. M., Kennedy-Allee 104

G. MACHATA (Wien): Die Dünnschichtchromatographie im systematischen, toxikologischen Analysengang.

Die Dünnschichtchromatographie (Dchr.) ist eine Methode, die an Einfachheit und Zweckmäßigkeit für das toxikologische Laboratorium nicht zu überbieten ist. Sie ist eine einfache Methode und soll eine einfache