

## PYRENDERIVATE ALS FLUORESZENZINDIKATOREN BEI DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

R. TSCHESCHE, G. BIERNOTH UND G. WULFF

*Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn (Deutschland)*

(Eingegangen den 26. März 1963)

Bei der Anwendung der Dünnschichtchromatographie (D.C.) für präparative Trennungen und quantitative Bestimmungen muss man die Substanzen nach ihrer Trennung auf der Platte lokalisieren, ohne sie in der chemischen Struktur zu verändern. Die hierfür meist angewandten Methoden (z.B. des Anfärbens von Streifen auf dem Chromatogramm; siehe Zusammenstellungen in Zit. 1) sind recht umständlich und mit Substanzverlusten verbunden. Am günstigsten erschienen Verfahren, bei denen die Substanzen durch einen Fluoreszenzindikator lokalisiert werden. Von einem solchen Fluoreszenzindikator sollte man verlangen, dass er möglichst Substanzen jeglicher Struktur empfindlich nachzuweisen gestattet und dass er bei der Elution vom Adsorbens selbst nicht mit eluiert wird. Ferner sollte er nach Möglichkeit wasserlöslich und hitzebeständig sein, damit man ihn gleich bei der Herstellung der Platte auf das Adsorbens aufbringen kann. Man könnte dadurch das Ansprühen der Platte vermeiden, das für Fluoreszenzindikatoren ausserordentlich gleichmässig geschehen muss.

Die bisher benutzten Fluoreszenzindikatoren (anorganische Leuchtphosphore, Rhodamin B, 2',7'-Dichlorfluorescein, Na-fluorescein, Bromthymolblau u.a.<sup>1</sup> erfüllen diese Forderungen nicht. Die besonders günstig erscheinenden anorganischen Leuchtphosphore ermöglichen nur bei im U.V.-Licht absorbierenden Substanzen einen guten Nachweis, während Substanzen ohne Absorption im U.V.-Bereich nur in höheren Konzentrationen, wenn überhaupt, nachgewiesen werden können. Lediglich Morin ist für Platten mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gut brauchbar<sup>2</sup>. Für das in der D.C. meist benutzte Kieselgel dagegen ist es viel weniger günstig.

Auf der Suche nach einem möglichst universell anwendbaren Fluoreszenzindikator untersuchten wir einige als optische Aufheller (Blankophore) technisch benutzte Substanzen\*. Bessere Ergebnisse erzielten wir mit den Pyrenderivaten 3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium (P<sub>0</sub>) und 3,5-Dihydroxypyren-8,10-disulfonsaures Natrium (P<sub>2</sub>)<sup>4\*\*</sup>. Zur Prüfung der Empfindlichkeit beim Nachweis verschiedener Substanzen in der D.C. wurde bei der Bereitung der Platten eine wässrige Lösung von P<sub>0</sub> oder P<sub>2</sub> (enthaltend 1/3 mg P<sub>0</sub> bzw. 1/4 mg P<sub>2</sub> auf je 1 g Kieselgel G)

\* Wie wir nach Abschluss unserer Versuche feststellten, ist in der Literatur<sup>3</sup> die Anwendung eines optischen Aufhellers (Ultraphor WT, BASF) beim dünnschichtchromatographischen Nachweis von Weichmachern erwähnt. Es wird jedoch weder auf die allgemeine Anwendbarkeit des Nachweises noch auf die Verwendbarkeit in der präparativen D.C. hingewiesen.

\*\* Die Substanzen werden von der Fa. Bayer, Leverkusen, hergestellt. Wir danken der Firma, insbesondere Herrn Prof. Dr. S. PETERSEN, für die grosszügige Überlassung dieser Pyrenderivate sowie von optischen Aufhellern.

der Streichmasse zugesetzt, und es wurden die Platten wie üblich beschichtet. Nach Aktivieren während 30 Min. bei  $120^{\circ}$  wurden die Platten im Exsikkator aufbewahrt. Die Substanzen müssen nach Möglichkeit in Chloroform, Essigester oder Aceton aufgebracht werden, da Methanol Startflecke zeigte. Nach Entwickeln mit Lösungsmittelgemischen, die  $R_F$ -Werte von etwa 0.3 bis 0.6 ergaben, trocknete man die Platten kurz bei  $110^{\circ}$  und betrachtete die Platten nach 5 Min. Liegenlassen an der Luft unter der U.V.-Lampe ( $\sim 365 \text{ m}\mu$ ). Die Substanzen wiesen sich auf schwach fluoreszierendem Untergrund je nach der chemischen Struktur durch helle Fluoreszenzen oder dunkle Löschungen aus. Fig. 1 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm mit  $P_2$  als Fluoreszenzindikator, das im U.V.-Licht photographiert wurde.



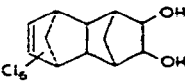
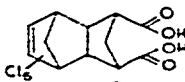
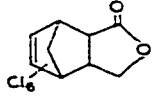
Fig. 1. Photographie eines Dünnschichtchromatogramms mit  $P_2$  als Fluoreszenzindikator, aufgenommen im U.V.-Licht von  $365 \text{ m}\mu$  auf Agfa AGP-Film. Chromatogramm entwickelt mit Benzol-Aceton (20:3); Adsorbens: Kieselgel H. Folgende Substanzen wurden aufgetragen: Auf Startpunkt 1, 6 und 11 Cholesterin (0.8 $\gamma$ , 1.2 $\gamma$  und 1.6 $\gamma$ ); auf 2 und 7 eine Mischung von Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol-3,6-diacetat, Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol-3-methyläther-6-acetat und Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol-3-methyläther (je 0.5 $\gamma$  und 0.75 $\gamma$ ); auf 3 und 8 das Diol Nr. 28 der Tabelle I (8 $\gamma$  und 12 $\gamma$ ), auf 4 und 9 Progesteron (1 $\gamma$  und 1.5 $\gamma$ ) und auf 5 und 10 Pentaacetyl-D-glucose (5 $\gamma$  und 7.5 $\gamma$ ).

Beim Lagern der Platten im Exsikkator waren die Flecke nach einer Woche kaum verblasst. Über die Empfindlichkeit des Nachweises und die auftretenden Löschungen bzw. Fluoreszenzen gibt Tabelle I Aufschluss.

Für analytische Zwecke ist  $P_0$  besser geeignet, da es einen empfindlicheren Nachweis der meisten Substanzen erlaubt (etwa um den Faktor 2–5), doch muss  $P_0$  als technisches Material für präparative Trennungen durch Umfällen aus wenig Wasser-Äthanol gereinigt werden, um fluoreszierende und leicht auswaschbare Verunreinigungen zu entfernen. Es wird aber auch dann leichter von Kieselgel

TABELLE I

NACHWEIS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN IN DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE MIT 3,5-DIHYDROXYPYREN-8,10-DISULFONSAUREM NATRIUM

Nr.	Substanz	Nachweis*	Nr.	Substanz	Nachweis*
1	Naphthalin	F +	23	$\alpha$ -Chlordan	F ++
2	Anthracen	L 0.1 $\gamma$	24	$\beta$ -Chlordan	F ++
3	Diels-Kohlenwasserstoff	F ++	25	Heptachlor	F ++
4	$\alpha$ -Äthyl-naphthalin	F +	26	Gammexan	F ++
5	Diphenyl	F +	27	Hexachlorbenzol	F ++
6	Cholesterin	F 0.1 $\gamma$			
7	5 $\beta$ -Cholestan-3 $\beta$ -ol-methyl-äther	F 0.08 $\gamma$	28		F 1 $\gamma$
8	5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol	F +++			
9	Progesteron	L 0.1 $\gamma$			
10	Dehydro-isoandrosteron	F +++			
11	5 $\beta$ -Androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on	F +++	29		F ++
12	digitogenindiacetat	F +++			
13	Digoxigenin	F +++			
14	Conessin	F** +			
15	Funtumidin	F** ++	30		F ++
16	Brucin	F** +			
17	Tryptamin	F** +	31	$\alpha$ -Pentacetyl-D-glucose	F 1 $\gamma$
18	Veronal	F +	32	2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose	F 20 $\gamma$
19	Aspirin	L +			
20	Pyramidon	F ++	33	2,3,4-Trimethyl-D-galactose	F 4 $\gamma$
21	Aldrin	F 1 $\gamma$	34	4,6-Dimethyl-D-glucose	F 1 $\gamma$
22	Dieldrin	F ++			

\* Auftretende Löschung (L) oder Fluoreszenz (F). Nachweisgrenze etwa: + = 2–5  $\gamma$ ; ++ = 0.2–1  $\gamma$ ; +++ = 0.01–0.1  $\gamma$ ; die in der Tabelle angegebenen Zahlenwerte sind die ermittelten unteren Nachweisgrenzen.

\*\* Bei basischen Lösungsmittelsystemen fluoresziert der Untergrund gelbbraun, die Substanzen sind als helle Flecke zu erkennen.

eluiert als  $P_2$ . Es zeigt sich jedoch, dass die untersuchten Substanzen in den meisten Fällen auch mit  $P_2$  noch unterhalb 1  $\gamma$  gut nachgewiesen werden können. Tetramethylglucose (Nr. 32), die nur in höheren Konzentrationen (20  $\gamma$ ) zu erkennen ist, fällt etwas heraus, während Tri- und Dimethylzucker wieder sehr viel besser sichtbar zu machen sind.

Besonders empfindlich lassen sich Steroide der verschiedensten Struktur nachweisen. Günstig ist auch der Nachweis einer ganzen Reihe von Insektiziden (Nr. 21–30), die auf anderem Wege<sup>5,6</sup> nur recht umständlich und z.T. mit sehr viel geringerer Empfindlichkeit nachgewiesen werden können. So ist das Diol (Nr. 28) in einer Menge von 50  $\gamma$  mit Rhodamin B<sup>5</sup> nicht mehr sicher feststellbar<sup>7</sup>, während mit  $P_0$  noch 0.8  $\gamma$  erkannt werden können. Auch auf Platten mit  $Al_2O_3$  als Adsorbens lassen sich Substanzen durch  $P_0$  und  $P_2$  sichtbar machen. Der Untergrund fluoresziert in diesem Falle gelbgrün.

Die Pyrenderivate  $P_0$  und  $P_2$  sind daher dank ihrer einfachen Anwendung und der Empfindlichkeit des durch sie ermöglichten Nachweises für analytische Chromatogramme ausgezeichnet geeignet. Man kann beim Mehrfachentwickeln und bei der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie nach jeder Entwicklung direkt das Trennergebnis begutachten. Der weitere Nachweis der Substanzen auf der Platte mit den üblichen Sprühmitteln wird nicht gestört, lediglich im U.V.-Licht ist ein

stärker fluoreszierender Untergrund vorhanden. Mit Lösungsmittelsystemen, die stärker polar als Methanol-Chloroform (7:3) sind, werden die Pyrenderivate teilweise ausgewaschen. In solchen Fällen werden sie besser nicht mit der Sorptionsschicht aufgebracht, sondern nach dem Entwickeln in einer Lösung in Aceton aufgesprüht.

*Der besondere Vorteil bei der Anwendung der Pyrenderivate als Fluoreszenzindikatoren liegt aber in der präparativen Dünnschichtchromatographie, da durch sie die Substanzen, ohne dass sie chemisch verändert werden, zu erkennen sind und P<sub>2</sub> selbst durch Chloroform-Methanol (1:1) in der Siedehitze nicht vom Kieselgel eluiert wird.*

#### EXPERIMENTELLES

Die Ausführung einer präparativen Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Pyrenderivaten sei am Beispiel der Trennung eines Gemisches von Cholestan-3 $\beta$ ,-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol-3,6-diacetat, Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol-3-methyläther-6-acetat und Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol-3-methyläther beschrieben.

Eine Glasplatte (20 × 20 cm) wurde manuell mit einem homogenen Brei aus 15 g Kieselgel H (Merck), 2 mg P<sub>2</sub> und 44 ml Wasser gleichmässig beschichtet. Nach dreistündigem Trocknen an der Luft (die Platte liegt auf einer völlig ebenen Unterlage) wurde 1 Stunde bei 110° aktiviert. Das Substanzgemisch in gleichen Teilen (50 mg), in etwas Chloroform gelöst, wurde mittels einer Kapillare auf der Startlinie der Platte aufgetragen und in einem abgeschlossenen Chromatographiegefäss mit 100 ml Chloroform-Aceton (10:1.5) chromatographiert (Dauer: 1 Stunde). Auf der trockenen Platte liessen sich die drei Substanzen unter der U.V.-Lampe als 1 bis 1.5 cm breite fluoreszierende Zonen mit den R<sub>F</sub>-Werten (gemessen von der Startlinie bis zur Mitte der Substanzzone) 0.75, 0.60 und 0.25 leicht erkennen. Das Kieselgel der markierten Zonen wurde mit dem Spatel von der Platte abgekratzt und mit je 30 ml Chloroform-Methanol (1:1) bei Zimmertemperatur und in der Siedehitze eluiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurden 29 mg Diacetat, 29 mg Ätheracetat und 28 mg Äther erhalten. Die Substanzen waren dünnschichtchromatographisch völlig rein und fluoreszierten nicht im U.V.-Licht. Beim Vermessen ihrer U.V.-Absorption wurde ausschliesslich Eigenabsorption festgestellt, d.h. sie waren frei von Spuren des im U.V. stark absorbierenden Pyrenderivats.

*In Mengen bis zu 1 g (je nach Zahl, Grösse und Schichtdicke der Chromatographieplatten)\* zeichnet sich diese Art der präparativen Dünnschichtchromatographie gegenüber der Säulenchromatographie durch saubere Trennungen, Zeitgewinn und geringe Substanzverluste aus. Da aufgrund dieser Vorteile die Säulenchromatographie im Bereich obiger Substanzmengen immer mehr von der präparativen Dünnschichtchromatographie abgelöst wird, ist die Anwendung der Pyrenderivate als Indikatoren besonders zu empfehlen.*

#### DANK

Wir danken den Herren Dr. LUDWIG und Dr. VOGEL aus unserem Institut für die Überlassung der Substanzen Nr. 21-25 und Nr. 28-30 sowie Herrn STROH für die eifrige Mitarbeit bei der Ausführung der Versuche.

\* Nach einem besonderen Verfahren von H. HALPAAP<sup>8</sup>, ist es möglich, auf einer Platte von 1 m Breite und 2 mm Schichtdicke bis zu 10 g Substanzgemisch aufzutrennen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Für die analytische wie präparative Dünnschichtchromatographie wird ein Zusatz von geringen Mengen der Natrium-Salze von 3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfosäure oder der 3,5-Dihydroxypyren-8,10-disulfosäure zum Kieselgel empfohlen.

## SUMMARY

For purposes of identification in analytical and preparative thin-layer chromatography, it is recommended to add small amounts of the sodium salt of 3-hydroxypyrene-5,8,10-trisulphonic acid or 3,5-dihydroxypyrene-8,10-disulphonic acid to the silica gel.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 1962;  
K. RANDEKNECHT, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962.
- <sup>2</sup> W. CERNY, J. JOSKA UND L. LÁBLER, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 26 (1961) 1658.
- <sup>3</sup> J. W. COPIUS PEERBOOM, *J. Chromatog.*, 4 (1960) 323.
- <sup>4</sup> E. THEIPE UND O. BAYER, *Ann. Chem.*, 540 (1939) 189.
- <sup>5</sup> D. WALDE, in E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 1962, S. 374.
- <sup>6</sup> H. J. PEIBROWITZ, *Chemiker-Ztg.*, 85 (1961) 867.
- <sup>7</sup> Dr. G. LUDWIG, Bonn, Privatmitteilung.
- <sup>8</sup> H. HALPAAP, *Chem. Ing. Technik*, 35 (1963) 486.

*J. Chromatog.*, 12 (1963) 342-346