

CHROM. 3370

AUFTRAGSGERÄT FÜR DIE ANALYTISCHE DÜNNSCHICHT-  
CHROMATOGRAPHIE

W. WÄSSLE UND K. SANDHOFF

*Neurochemische Abteilung, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München (Deutschland)*

(Eingegangen den 27. Dezember 1967)

## SUMMARY

*Apparatus for the loading of samples on to thin layer chromatography plates*

An apparatus is described for the loading of samples on to thin layer chromatography plates. The dissolved substances are sprayed as a fine homogeneous strip (0.5 mm or more thick) without damaging the surface of the plate. The apparatus permits work on an analytical (from 3–4  $\mu$ l) or on a preparative scale, and has great advantages for the loading of plates for quantitative densitometry.

Die Dünnschichtchromatographie mit ihren bekannten Vorteilen hat sich in den letzten Jahren auch bei der quantitativen Mikrobestimmung von Substanzen bewährt. Für die quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen werden in der Hauptsache zwei Methoden angewendet:

(1) Die getrennten Verbindungen werden zusammen mit dem Sorptionsmittel aus der Schicht entfernt und nach Elution mit Hilfe einer herkömmlichen, meist spektroskopischen Methode bestimmt.

(2) Die quantitative Auswertung erfolgt direkt auf der Platte durch Messen der Fleckenflächen oder durch eine densitometrische Methode.

Die wichtigste Voraussetzung für beide Methoden ist die Ausbildung von scharf getrennten Substanzzonen. Diese Forderung lässt sich nur durch das gleichmässige Auftragen der zu trennenden Substanzgemische in Strichform ohne Verletzung der Trennschicht erfüllen. Es fehlt daher nicht an Versuchen, derartige Geräte zu konstruieren<sup>1–5</sup>. Die Substanzlösung wird gewöhnlich durch eine Kanüle in Tropfenform oder als Strahl auf die Platte appliziert. Nach unseren Erfahrungen sind jedoch die meisten beschriebenen Geräte mehr für den präparativen Einsatz als für den Routinebetrieb im analytischen Massstab geeignet. Für diesen Zweck hat sich bei uns das Prinzip bewährt, die Substanzlösung durch einen Gasstrom auf die Platte zu sprühen. Das dazu konstruierte Gerät mit einem Spezialauftragstisch erlaubt ein strichförmiges und absolut homogenes Auftragen in quantitativ-analytischem Massstab.

## AUFBAU DES GERÄTES

*(a) Auftragsgerät*

Für unsere Zwecke haben wir eine im Handel befindliche Mikrospritzpistole

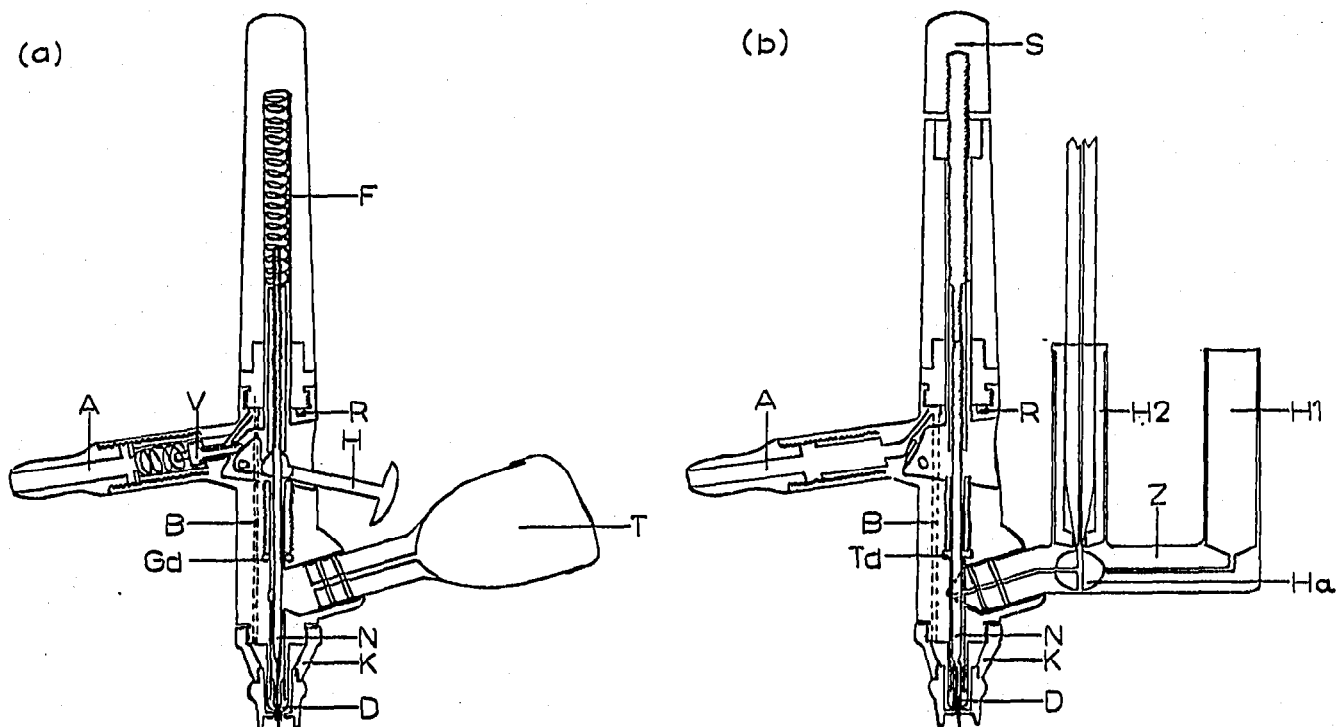


Fig. 1. (a) Sprühpistole der Fa. Desaga. Beschreibung siehe Text. (b) Modifizierte Sprühpistole für die analytische Dünnschichtchromatographie. Beschreibung siehe Text.

(Fa. Desaga) in mehreren Punkten modifiziert. Fig. 1a zeigt eine schematische Darstellung der ursprünglichen Spritzpistole. Diese arbeitet nach dem Bernoulli'schen Prinzip. Das Druckgas wird unter einem Betriebsdruck von 0.5–1.5 atm durch den mit dem Ventil V verschliessbaren Ansatz A in den Verteilerring R geleitet. Von da aus gelangt es durch zwei seitliche Bohrungen B in den Konus K und tritt durch den kreisförmigen Spalt zwischen Konus und Düse D aus. Die Düse ist durch die mit einer Feder angedrückte Düsennadel N verschlossen. Das Öffnen der Düse und die Einstellung der Strahlstärke erfolgt durch Anheben des Hebels H. Dadurch wird gleichzeitig das Ventil V freigegeben. Die aufzubringende Lösung befindet sich in dem seitlich eingesteckten Vorratsgefäss T (Inhalt 5 ml). Sie wird auf das mit Glasplatten begrenzte Startband gesprüht. In dieser Form ist die Sprühpistole nur für präparative Zwecke zu verwenden. Wir haben das Gerät so umgebaut und vervollständigt, dass es auch für den analytischen Einsatz geeignet ist. Fig. 1b zeigt die abgeänderte Sprühpistole. Das Öffnen der Düse und damit auch die Feinregulierung der Strichbreite von 0.5–5 mm erfolgt mit der Stellschraube S. Der Hebel H und das Ventil V wurden entfernt und die Führung für den Ventilstift verlötet. Die in organischen Lösungsmitteln leicht quellende Gummidichtung Gd wurde durch eine Teflondichtung Td ersetzt. In die seitliche Öffnung der Pistole ist der neu konstruierte analytische Zusatz Z genau eingepasst und mit zwei Teflonringen abgedichtet. Die Hülse H1 ist für reines Lösungsmittel vorgesehen. Die Hülse H2 ist mit einem konischen Teflonfutter ausgekleidet, in das Messpipetten verschiedener Grösse dicht eingesetzt werden können. Der Dreiwegehahn Ha ermöglicht das Umschalten von Lösung auf reines Lösungsmittel.

*(b) Auftragstisch*

Um ein möglichst homogenes Auftragen zu gewährleisten, wurde ein Auftragstisch konstruiert, der nach dem Prinzip einer mechanischen Kippschwingung arbeitet. Fig. 2 zeigt den Auftragstisch mit der Spritzpistole. Die Dünnschichtplatte wird mit der Klammer K<sub>1</sub> auf dem Tisch befestigt. Der Tisch T läuft achtfach kugelgelagert in den beiden Schienen Sch. Er wird durch die Schnecke V gleichmässig vorgeschoben. Die Strichlänge kann durch Auswechseln der Vorschubschnecken variiert werden. Der Motor M ist stufenlos regelbar. Nach Erreichen der grössten Auslenkung wird der Tisch durch die Feder E in die Ausgangsstellung zurückgeschnellt. Ein Zurückprallen des Tisches wird durch einen Magneten verhindert. Dieser befindet sich, auf der Abbildung nicht sichtbar, an der Unterseite des Tisches. Die Spritzpistole wird mit der Klammer K<sub>2</sub> am Block B festgeklemmt. Sie lässt sich mit den Stellschrauben S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> und dem Gewinderad G in alle drei Raumrichtungen verstellen. Die Stellschraube S<sub>3</sub> dient zur Fixierung des Armes A auf den Führungsschienen F. Zum Herausnehmen der Platte lässt sich die Sprühpistole mit ihrer Halterung hochklappen.

## ARBEITSWEISE

Eine nach dem Volumen der aufzutragenden Lösung ausgewählte Messpipette wird in die Hülse H<sub>2</sub> gesteckt und durch eine mit einer Kanüle versehene Pipette (Aussendurchmesser der Kanüle kleiner als lichte Weite der Messpipette) bei geschlossener Düse etwa 60  $\mu$ l über die Nullmarke gefüllt. Dann wird die Druckgaszufuhr geöffnet. Die Gaszuleitung ist verzweigt. Ein Anschluss führt direkt zur

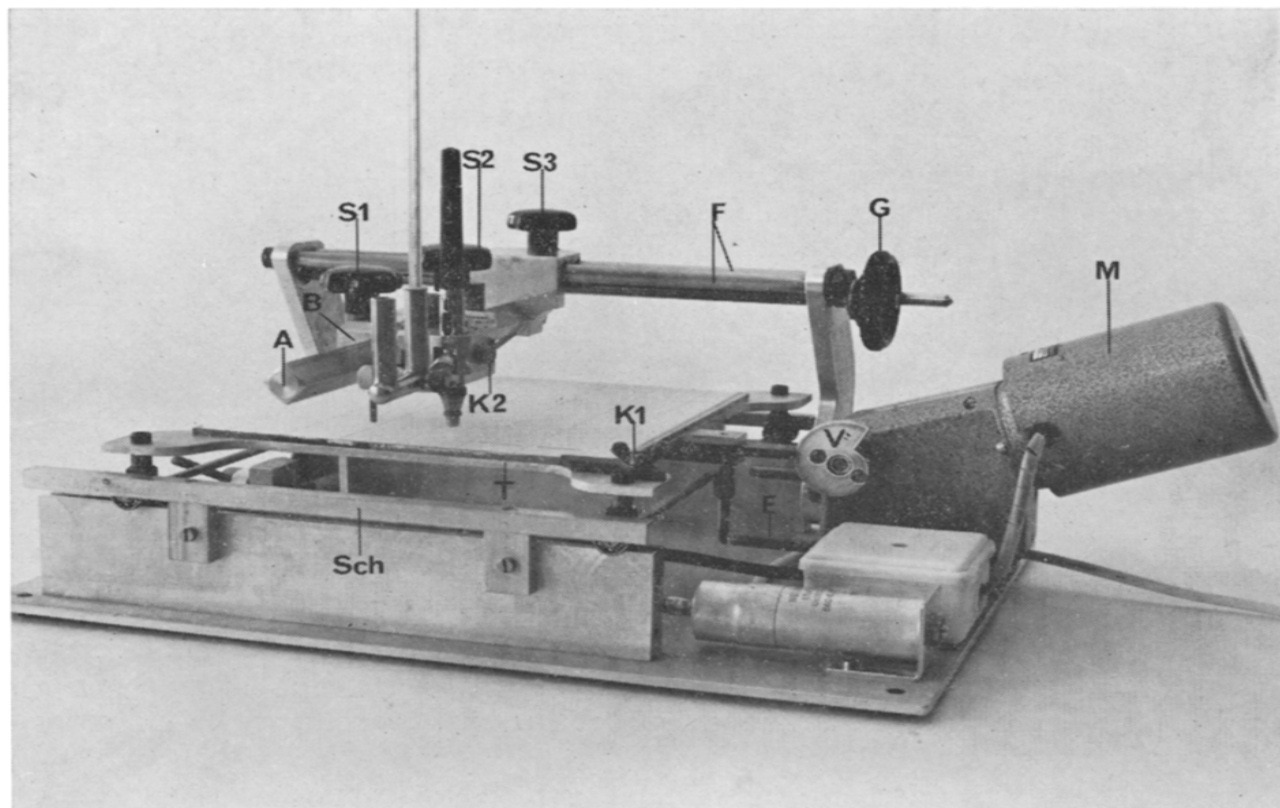


Fig. 2. Auftragsgerät für die analytische Dünnschichtchromatographie. Beschreibung siehe Text.

Sprühpistole. Der zweite Anschluss wird auf die Messpipette gesteckt, um eine konstante Auslaufgeschwindigkeit zu erreichen. Der optimale Betriebsdruck beträgt 400 mm Wassersäule (Reduzierventil: Saturn I-Regulus II, Fa. Dräger, Lübeck). Nun wird mit der Stellschraube S die Düse geöffnet. Nachdem das Totvolumen von etwa 50  $\mu\text{l}$  ausgefüllt ist, lässt man den Spiegel der Lösung langsam auf die Nullmarke absinken und verschliesst die Düse wieder. Die Dünnschichtplatte wird in den Auftragstisch eingelegt und das Sprühgerät mit Hilfe der Stellschrauben S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, G und S<sub>3</sub> auf die richtige Position eingestellt. Nach Einschalten des Schneckenantriebs wird die Düse geöffnet und die gewünschte Strichbreite einreguliert. Durch den Gasstrom trocknet das Lösungsmittel sofort ab. Ist die bestimmte Substanzmenge aufgetragen, wird die Düse verschlossen und die Spritzpistole kann mit dem Gewinderad G in eine neue Position gebracht werden. Zum Wechseln der Lösung werden das Sprühgerät und die Pipette nach ihrer Entleerung mit Lösungsmittel durchgespült, durchgeblasen und mit neuer Lösung gefüllt. Als Lösungsmittel wurden bisher Flüssigkeiten bis zur Viskosität des Wassers verwendet.

Stehen von einer Lösung nur geringe Mengen zur Verfügung, so wird die Pipette bei geschlossenem Dreiwegehahn genau bis zur Nullmarke gefüllt. Das Totvolumen wird aus der reinen Lösungsmittel enthaltenden Hülse H<sub>1</sub> gefüllt. Nach Umschalten des Dreiwegehahns wird die Düse geöffnet und die gewünschte Lösungsmenge kann in das Totvolumen einfließen und wird nach erneutem Umschalten des Hahns aus dem Gerät verdrängt.

#### ANWENDUNGSBEISPIEL

Je 50 und 100  $\mu\text{l}$  eines Farbstoff-Testgemisches (Desaga-Testgemisch für die Dünnschichtchromatographie) wurden punktförmig und strichförmig mit einer Mikropipette aufgetragen. Daneben wurden die gleichen Mengen mit dem Auftragsgerät aufgebracht. Fig. 3a zeigt den Start vor dem Lauf. Fig. 3b zeigt das Farbstoffgemisch nach einer Laufstrecke von 8 cm in Benzol.

Als praktische Beispiele seien hier eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Gangliosiden und eine Lipoidbestimmungsmethode angeführt<sup>6,7</sup>.

#### RESULTATE UND DISKUSSION

Während in Fig. 3 das mit der Hand aufgetragene Farbstoffgemisch noch keine Trennung zeigt, ist das Gemisch auf dem mit der Maschine aufgetragenen Teil der Platte bereits in scharfe Banden aufgetrennt. Die Möglichkeit der scharfen Auftrennung von Mischungen in gleichmässig ausgebildete Substanzzonen macht das Gerät daher vor allem für die densitometrische Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen geeignet. Die heute noch vielfach übliche punktförmige Auftragsweise ist dem strichförmigen Auftragen in vielerlei Hinsicht unterlegen. Die bei der Chromatographie von Substanzen häufig auftretende Schwanzbildung kann beim Übergang vom punktförmigen zum strichförmigen Auftragen oft vermieden oder zumindest stark zurückgedrängt werden. Vermutlich spielen hierbei Konzentrations- und Überladungseffekte eine grosse Rolle.

Bei der densitometrischen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen zeigt sich ein weiterer Nachteil des punktförmigen Auftrags: Neben der Farb-

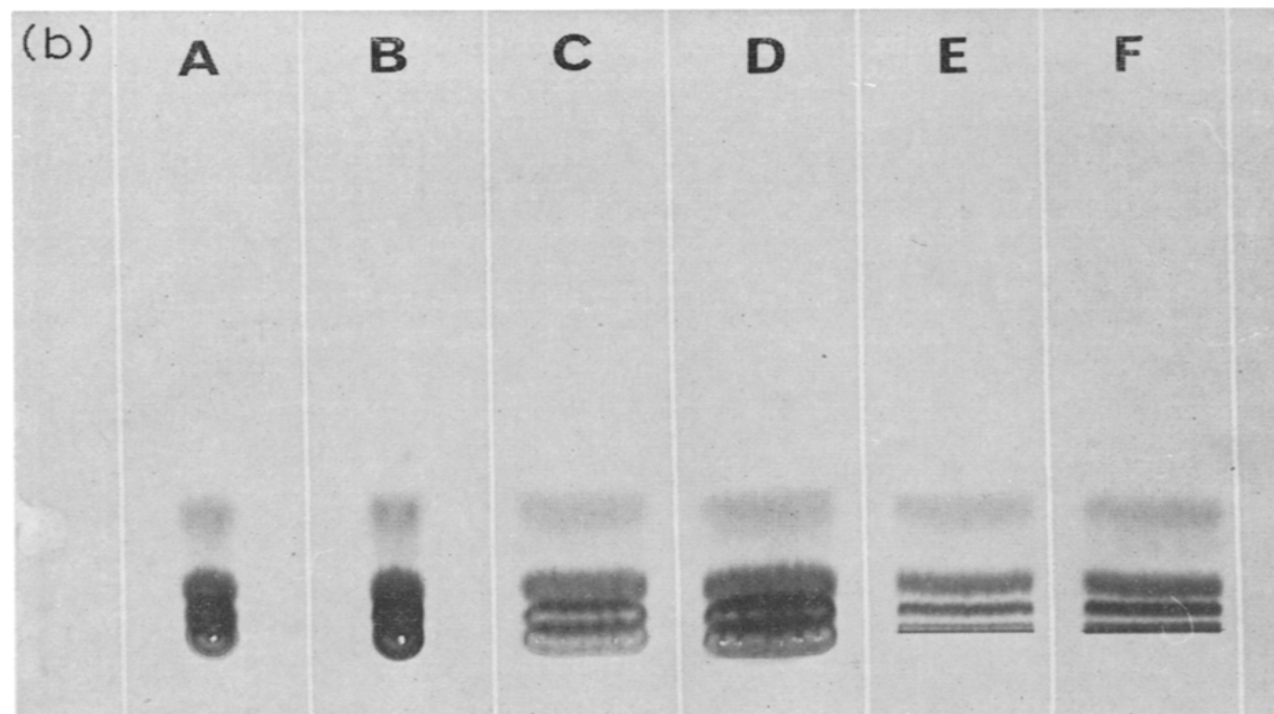
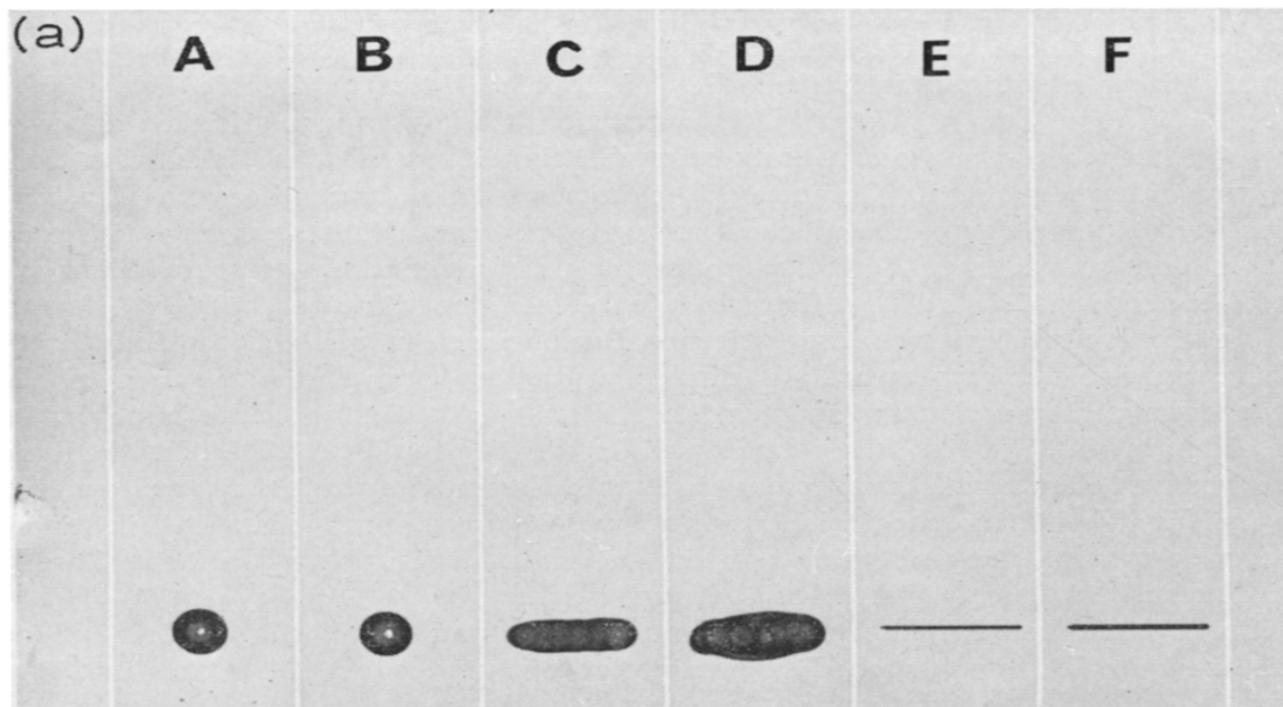


Fig. 3a und b. Dünnschichtchromatographische Auftrennung eines Farbstoffgemisches (b) nach manuellem und maschinellm Auftragen (a). Das verwendete Farbstoffgemisch der Fa. Desaga, Heidelberg, besteht aus *p*-Dimethylaminoazobenzol, Sudanrot G und Indophenolblau (1:1:1) und wird aus benzolischer Lösung aufgetragen (1 mg Gemisch pro ml). Adsorbens: Merck Kieselgel G. Schichtdicke: 375  $\mu$ . Laufmittel: Benzol. Steighöhe: 8 cm. (A) 50  $\mu$ l manuell punktförmig aufgetragen. (B) 100  $\mu$ l manuell punktförmig aufgetragen. (C) 50  $\mu$ l manuell strichförmig aufgetragen. (D) 100  $\mu$ l manuell strichförmig aufgetragen. (E) 50  $\mu$ l maschinell strichförmig aufgetragen. (F) 100  $\mu$ l maschinell strichförmig aufgetragen.

intensität ändert sich auch die Fleckengrösse mit der Konzentration. Hinzu kommt noch, dass die Flecken infolge des Konzentrationsabfalles am Rand und wegen der Schwanzbildung nicht homogen sind. Der Messspalt erfasst unterschiedlich grosse Segmente, die ausserdem noch starke Konzentrationsschwankungen aufweisen. Damit verliert das Lambert-Beer'sche Gesetz seine Gültigkeit<sup>8,9</sup> und das Verhältnis von Extinktion (ausgedrückt als Gesamtextinktion des Flecks durch die vom Densitometerschreiber registrierte Peakfläche) zur aufgetragenen Substanzmenge ist nur innerhalb eines sehr kleinen Bereichs annähernd konstant. Soll ein grösserer Konzentrationsbereich erfasst werden, so ist das, wie verschiedene Autoren zeigten<sup>10,11</sup>, nur mit Hilfe von komplizierten mathematischen Beziehungen möglich. Diese Schwierigkeiten lassen sich nach unseren Erfahrungen weitgehend vermeiden, wenn man die Substanzen nicht punktförmig, sondern strichförmig aufträgt und eine Strichlänge wählt, die stets um etwa 20 % über der Länge des Messspaltes liegt<sup>6,7</sup>. Dadurch bleiben die störenden Randzonen ausgeblendet. Der Messspalt erfasst nur weitgehend homogene, im Verhältnis zur Strichbreite schmale Zonen, deren Einzelextinktionen über den gesamten Fleckenbereich addiert werden. Das Lambert-Beer'sche Gesetz ist bei diesem Verfahren in guter Annäherung erfüllt.

Beim manuellen Auftragen entsteht das Startband durch enges Aneinanderreihen einzelner Lösungstropfen. Es wird infolge des ungleichen Abstandes und der unterschiedlichen Grösse der Tropfen unregelmässig. Ausserdem wird beim Auftragen von Hand die Schicht leicht verletzt, wodurch das Fliessmittel bei der Chromatographie verschieden schnell nachströmt. Aus diesen Gründen werden die Flecke verzerrt und für eine densitometrische Auswertung ungeeignet.

Diese Nachteile werden mit dem Auftragsgerät vermieden. Durch den periodischen Vorschub der Dünnschichtplatte unter der Sprühpistole (3–5 Perioden pro  $\mu\text{l}$  Auftragslösung) entstehen homogene Startbänder. Die Schicht wird selbst bei Auftragsmengen von 1000  $\mu\text{l}$  (Lsm. Chloroform–Methanol, 2:1) nicht verletzt.

Ein Nachteil des Gerätes ist sein Totvolumen von 50  $\mu\text{l}$ . Will man nicht nach der etwas umständlicheren Nachspülmethode (Vgl. S. 3) arbeiten, so verliert man bei quantitativen Arbeiten etwa 70  $\mu\text{l}$  der Lösung, da der Totraum mit etwa 20  $\mu\text{l}$  durchgespült werden sollte.

Bei den Auftragsmengen sollten 3–4  $\mu\text{l}$  nicht unterschritten werden, da sonst die Pipetten- und Ablesefehler zu gross werden. Durch entsprechende Verdünnung lassen sich jedoch auch kleinste Substanzmengen auftragen. Mit dem Gerät sollten keine gesättigten Lösungen aufgetragen werden, um ein Abscheiden der Substanzen an der Düse zu vermeiden.

DANK

Herrn Prof. Dr. H. JATZKEWITZ danken wir für grosszügige Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Für wertvolle technische Hilfe sind wir den Herren J. BRANDL, R. SCHWARZ und W. PASTOR zu Dank verpflichtet.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein automatisches Auftragsgerät für die Dünnschichtchromatographie

beschrieben. Die gelösten Substanzen werden als schmaler Strich (0.5 mm oder mehr) homogen und ohne Verletzung der Schicht aufgesprüht. Das Gerät erlaubt es, im analytischen (Auftragsmengen ab 3–4  $\mu$ l) oder wahlweise im präparativen Massstab zu arbeiten. Es bringt wesentliche Vorteile beim Auftragen auf Platten, die quantitativ-densitometrisch ausgewertet werden sollen.

## LITERATUR

- 1 F. A. VANDENHEUVEL, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 102.
- 2 T. DAROCHA, C. H. GRAY UND R. V. QUINCEY, *J. Chromatog.*, 27 (1967) 497.
- 3 A. HAGER UND T. MEYER-BERTENRATH, *Planta*, 69 (1966) 198.
- 4 CAMAG (Muttens, Schweiz) *Firmenschrift CL-66*.
- 5 DESAGA (Heidelberg, Deutschland), *Vorinformation Autoliner*.
- 6 K. SANDHOFF, K. HARZER UND H. JATZKEWITZ, *Z. Physiol. Chem.*, im Druck.
- 7 W. WÄSSLE, *Diplomarbeit*, Universität München (1967).
- 8 G. EXNER, *Acta Histochem.*, 9 (1960) 173.
- 9 H. G. SCHIEMER, *Acta Histochem.*, 9 (1960) 174.
- 10 R. KLAUS, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 311.
- 11 S. J. PURDY UND E. V. TRUTER, *Analyst*, 87 (1962) 802.

*J. Chromatog.*, 34 (1968) 357–363