

CHROM. 4173

## TUBE-CHROMATOGRAPHIE AUF SELBSTGEFERTIGTEN SCHICHTEN

## I. HERSTELLUNG VON CHROMATOTUBES MIT EINEM BESCHICHTUNGSGERÄT

HANS PETER LENK UND WILHELM GLEICH

*Max-von-Pettenkofer-Institut des Bundesgesundheitsamtes, Berlin-Dahlem (B.R.D.)*

(Eingegangen am 12. Mai 1969)

## SUMMARY

*Chromatography in self-coated tubes. I. Manufacture of chromatotubes using a coating apparatus*

Coating of chromatotubes with any given adsorbent was successful when using a special apparatus with alcohol as the suspending medium. Thin-layer chromatography preparations with and without an admixture of plaster of Paris, starch or fluorescence indicator may be applied. The amounts of adsorbent and alcohol per mixture (three tubes) and the filling quantities per tube are given. Thirty adsorbents from three manufacturers were used: cellulose, silica gel, aluminium oxide, kieselguhr, magnesium silicate and polyamide. Acetone as the suspending medium gives less compact layers and reduces the drying times considerably.

## EINLEITUNG

Bei einer Variante der Dünnschichtchromatographie werden innenbeschichtete Glasrohre verwendet. Diese Rohre können mit Kieselgel G beschichtet als "Chromatotubes" von der Firma Desaga (Heidelberg) bezogen werden. Sie sind 125 mm lang und haben einen Aussen- bzw. Innendurchmesser von 26 bzw. 24 mm. POGACAR UND KLEIN<sup>1</sup> untersuchten diese Chromatotubes auf ihre Brauchbarkeit. Sie fanden eine bessere Reproduzierbarkeit der  $R_F$ -Werte und führten das auf die exakte Einstellbarkeit des Wassergehaltes der Schicht zurück. Weil das Tube selbst als Entwicklungskammer benutzt wird, ist die Kammersättigung konstant und es treten keine Randphänomene auf. Tubes können nach Wärme-Aktivierung mit Gummikappen verschlossen werden. Sie lassen sich in diesem Zustand unverändert aufbewahren, was bei Platten schlecht möglich ist. POGACAR *et al.*<sup>2</sup> trennten Phenacetin und verwandte Verbindungen an Chromatotubes. Sie fanden hier eine günstigere Fleckenform als auf den Platten.

Im Handel sind nur solche Chromatotubes erhältlich, welche mit Kieselgel G

beschichtet sind. Um die Tube-Chromatographie auf breiterer Basis anwenden zu können, werden auch Rohre mit anderen Sorptionsmitteln benötigt. Für Vergleiche mit der Dünnschichtchromatographie auf Platten werden sie ebenfalls gebraucht. HANNIG UND LENK<sup>3</sup> beschrieben ein Gerät, mit welchem drei Chromatotubes gleichzeitig mit beliebigen Sorptionsmitteln im eigenen Labor beschichtet werden können. Die Rohre werden dazu waagrecht in Halterungen eingespannt, welche durch einen regelbaren Antriebsmotor gemeinsam mit diesen zum Rotieren gebracht werden. Durch die Wirkung der Zentrifugalkraft wird die eingebrachte Suspension gleichmässig über die Innenzylinder der Rohre verteilt. Die Entlüftung der Rohre erfolgt durch die Sogwirkung von Bohrungen, welche sich in den Halterungen befinden.

#### EXPERIMENTELLES

Zur Beschichtung wurden Cellulose-, Aluminiumoxid-, Kieselgel-, Kieselguhr-, Magnesiumsilicat- und Polyamid-Präparate für die Dünnschichtchromatographie der Firmen Merck (Darmstadt), Macherey, Nagel & Co. (Düren) und Woelm (Eschwege) verwendet. Im allgemeinen wurden für drei Rohre 20% der Menge angesetzt, wie sie zum Bestreichen von fünf Dünnschichtplatten (20 cm × 20 cm) benötigt wird. Teilweise entstanden so zu dicke Suspensionen. Um dem abzuhelfen, wurde eine grössere Menge Suspensionsmittel verwendet. Als solches diente meist Äthylalkohol. Einige Versuche wurden auch mit Aceton und verschiedenen Mischungen aus Wasser und Aceton oder Alkohol sowie Alkohol und Aceton durchgeführt. Vergällter Alkohol ist für diese Zwecke ausreichend. Am zweckmässigsten verwendet man Alkohol, welcher mit Butanon (Äthylmethyleketon) vergällt ist, weil dieses dem Äthanol in seinem Verdunstungsverhalten ähnlich ist. Mit Pyridin vergällter Alkohol ist nicht zu empfehlen, weil jenes nur langsam verdunstet.

Tabelle I gibt die Menge an Sorptionsmittel und an Alkohol an, welche für einen Ansatz (drei Tubes) benötigt werden. Bei Verwendung dieser Suspensionen wurden die besten Beschichtungen erzielt. Die Zahlen wurden durch Variation der Menge der jeweiligen beiden Komponenten ermittelt. Ausserdem ist die Einfüllmenge pro Tube angegeben.

Bei einigen Sorptionsmitteln gelang zwar die Beschichtung, doch fielen die Schichten schon bei geringfügigem Klopfen wieder ab, so dass sie zum Chromatographieren nicht verwendet werden konnten. In dieser Weise verhielten sich folgende Sorptionsmittel (in Klammern die Zahlenangaben entsprechend Tabelle I):

|   |       |           |
|---|-------|-----------|
| Kieselgel N                             | MN    | (6;22;5), |
| Kieselgel HF <sub>254</sub> silanisiert | Merck | (6;18;5), |
| Aluminiumoxid neutral                   | Merck | (7;13;4), |
| Aluminiumoxid neutral DC                | Woelm | (6;15;5), |
| Aluminiumoxid sauer                     | Merck | (7;13;4), |
| Aluminiumoxid sauer DC                  | Woelm | (6;15;5). |

Zur Herstellung der Suspension wird das trockene Sorptionsmittel mit der entsprechenden Menge Alkohol in einem Schliff-Erlenmeyer-Kolben mit Glasstopfen geschüttelt, bis die Suspension homogen erscheint. Von der fertigen Suspension werden 5 (bzw. 4) ml mit einer Stabpipette entnommen. Für diesen Zweck eignen sich am besten ältere Ausführungen mit weiten Auslauf-Öffnungen. Moderne Pipetten mit feinen Öffnungen verstopfen leicht, besonders beim Arbeiten mit Cellulose. Der

TABELLE I

MENGEN AN SORPTIONSMITTEL UND ALKOHOL FÜR EINEN ANSATZ (DREI TUBES) UND EINFÜLLMENGE PRO TUBE

| Nr. | Sorptionsmittel                    | Firma           | Sorptionsmittel (g) | Alkohol (ml) | Einfüllmenge (ml) |
|-----|------------------------------------|-----------------|---------------------|--------------|-------------------|
| 1   | Cellulose mikrokristallin (Avicel) | Merck           | 4                   | 18           | 5                 |
| 2   | Mikrokristallines Cellulosepulver  | MN <sup>a</sup> | 6                   | 22           | 5                 |
| 3   | Cellulosepulver MN 300             | MN <sup>a</sup> | 3                   | 18           | 5                 |
| 4   | Kieselgel H                        | Merck           | 6                   | 18           | 5                 |
| 5   | Kieselgel HF <sub>254</sub>        | Merck           | 6                   | 18           | 5                 |
| 6   | Kieselgel HF <sub>254</sub> + 300  | Merck           | 6                   | 18           | 5                 |
| 7   | Kieselgel DC                       | Woelm           | 6                   | 15           | 5                 |
| 8   | Kieselgel G                        | Merck           | 6                   | 15           | 5                 |
| 9   | Kieselgel GF <sub>264</sub>        | Merck           | 6                   | 17           | 5                 |
| 10  | Kieselgel G                        | MN <sup>a</sup> | 6                   | 18           | 5                 |
| 11  | Kieselgel G DC                     | Woelm           | 6                   | 15           | 5                 |
| 12  | Kieselgel S                        | MN <sup>a</sup> | 6                   | 18           | 5                 |
| 13  | Aluminiumoxid H                    | Merck           | 6                   | 13           | 4                 |
| 14  | Aluminiumoxid HF <sub>254</sub>    | Merck           | 7                   | 13           | 4                 |
| 15  | Aluminiumoxid N                    | MN <sup>a</sup> | 6                   | 18           | 5                 |
| 16  | Aluminiumoxid G                    | Merck           | 6                   | 13           | 4                 |
| 17  | Aluminiumoxid GF <sub>254</sub>    | Merck           | 7                   | 13           | 4                 |
| 18  | Aluminiumoxid G                    | MN <sup>a</sup> | 6                   | 22           | 5                 |
| 19  | Aluminiumoxid G DC                 | Woelm           | 6                   | 15           | 5                 |
| 20  | Aluminiumoxid basisch              | Merck           | 7                   | 13           | 4                 |
| 21  | Aluminiumoxid basisch DC           | Woelm           | 6                   | 15           | 5                 |
| 22  | Kieselguhr N                       | MN <sup>a</sup> | 6                   | 25           | 5                 |
| 23  | Kieselguhr G                       | Merck           | 6                   | 17           | 5                 |
| 24  | Kieselguhr G                       | MN <sup>a</sup> | 6                   | 25           | 5                 |
| 25  | Magnesiumsilikat DC                | Woelm           | 3                   | 15           | 5                 |
| 26  | Polyamid                           | Merck           | 3                   | 13           | 4                 |
| 27  | Polyamid DC 6                      | MN <sup>a</sup> | 3                   | 14           | 4                 |
| 28  | Polyamid DC 11                     | MN <sup>a</sup> | 3                   | 14           | 4                 |
| 29  | Polyamid DC 66                     | MN <sup>a</sup> | 3                   | 13           | 4                 |
| 30  | Polyamid DC                        | Woelm           | 1.5                 | 13.5         | 4                 |

<sup>a</sup> MN = Macherey, Nagel & Co.

Pipetteninhalt wird unter leichtem Blasen vorsichtig in ein Tube entleert. Die Tubes mit den eingesetzten Gummiringen befinden sich dazu bereits in dem Beschichtungs-Gerät. Vor Eingabe der Suspension werden sie in langsames Rotieren versetzt (~ 300 Umdr./min). Auf die angegebene Weise werden alle drei Tubes gefüllt. Es empfiehlt sich, die Suspension vor jeder einzelnen Entnahme nochmals kurz zu

schütteln. Nachdem alle drei Tubes beschickt sind, werden sie in schnelle Rotation versetzt. Am günstigsten ist eine Drehzahl von  $\sim 1600$ /min. Zweckmässig ist es, vorher *ca.* 1 min sehr schnell rotieren zu lassen ( $\sim 2500$  Umdr./min). Nach 30 min sind die Röhrchen trocken, z.T. auch schon eher. Sie werden aus ihren Halterungen entnommen; die Gummiringe an den Enden werden entfernt. Vor Gebrauch sollten die Tubes noch 1 h offen liegen gelassen werden, ebenso vor dem Verschliessen mit den roten Schutz-Kappen. Um Verwechslungen zu vermeiden, ist es zweckmässig, die fertigen Tubes zu beschriften (z.B. mit einem Filzschreiber).

Als Glasrohre wurden die handelsüblichen Tubes verwendet, deren Schicht entfernt wurde. Vom Glasbläser bezogene Rohre waren zwar erheblich billiger. Sie waren jedoch wegen ihrer unregelmässigen Masse nicht zu verwenden. Vor Gebrauch müssen die Rohre gut gesäubert und entfettet werden (z.B. durch Waschen mit Alkohol).

Mit Cellulose gelingt es am schwierigsten, eine gleichmässige Schicht herzustellen. Hier ist ganz besonders darauf zu achten, dass die Rohre nicht "schlagen". Cellulose sollte vor dem Vermischen mit Alkohol gesiebt werden. Ebenso sollte die fertige Suspension noch einmal durch ein Sieb gegossen werden. Es kann auch ein elektrisches Mixergerät verwendet werden.—Kieselguhr benötigt längere Laufzeiten; sie trocknet nur langsam.

Sorptionsmittel mit Gips als Bindemittel benötigen keinen Zusatz von Wasser zum verwendeten Alkohol. Die dort enthaltenen Mengen reichen zum Abbinden aus. Derart hergestellte Tubes verändern sich auch nicht bei längerem Lagern durch weitere Wasseraufnahme aus der Luft. Durch Zusatz von Wasser zum Alkohol wird die Trocknung erheblich verzögert.

Bei Verwendung von Aceton anstelle von Alkohol lässt sich die Trocknung erheblich beschleunigen. Es genügen dann Laufzeiten von 10 min. Die entstandenen Schichten sind in ihrem Gefüge lockerer und längst nicht so abriebfest wie die mit Alkohol gefertigten. Bei Kieselgel G (Merck) fiel die Schicht nach dem Trocknen sogar wieder ab. Da jedoch für manche Zwecke eine weniger dichte Schicht erwünscht

TABELLE II

MENGEN AN SORPTIONSMITTEL UND ACETON FÜR EINEN ANSATZ (DREI TUBES) UND EINFÜLLMENGE PRO TUBE

| Nr. | Sorptionsmittel                       | Firma | Sorp-<br>tions-<br>mittel<br>(g) | Aceton<br>(ml) | Einfüll-<br>menge<br>(ml) |
|-----|---------------------------------------|-------|----------------------------------|----------------|---------------------------|
| 1   | Cellulose mikrokristallin<br>(Avicel) | Merck | 4                                | 18             | 5                         |
| 2   | Cellulosepulver MN 300                | MN    | 3                                | 18             | 5                         |
| 3   | Kieselgel H                           | Merck | 6                                | 18             | 5                         |
| 4   | Aluminiumoxid H                       | Merck | 6                                | 13             | 4                         |
| 5   | Aluminiumoxid G                       | Merck | 6                                | 13             | 4                         |
| 6   | Aluminiumoxid basisch                 | Merck | 7                                | 13             | 4                         |
| 7   | Kieselguhr G                          | Merck | 6                                | 19             | 5                         |
| 8   | Polyamid                              | Merck | 3                                | 13             | 4                         |

ist und die Beschichtung der Tubes einen wesentlich geringeren Zeitaufwand erfordert, sind in Tabelle II einige Beschichtungsmöglichkeiten bei Verwendung von Aceton als Suspensionsmittel angegeben.

Mit mikrokristalliner Cellulose (Merck) wurde untersucht, ob sich der teilweise Ersatz von Aceton durch Alkohol günstig auswirkt. Das ist nicht der Fall: die Trocknungszeiten nehmen wieder erheblich zu, die Struktur der Schicht wird aber kaum verändert.

#### DISKUSSION

Die Beschichtung von Chromatotubes mit Cellulose, Kieselgel, Aluminiumoxid, Kieselguhr, Magnesiumsilicat und Polyamid kann mit der angegebenen Beschichtungsapparatur durchgeführt werden. Dabei wurden Präparate mit einem Zusatz von Gips (G) oder Stärke (S) oder ohne Zusatz (H, N, —) verwendet, ausserdem solche mit Fluoreszenzindikator (F). Diese Zusätze haben im allgemeinen keinen wesentlichen Einfluss auf die benötigten Mengen an Sorptions- und Suspensionsmittel. Bei einem Zusatz von Fluoreszenzindikatoren zu anderen Sorptionsmitteln dürfte deshalb das dafür angegebene jeweilige Mengenverhältnis unverändert beibehalten werden können. Eine dauerhafte Beschichtung misslang lediglich mit saurem und neutralem Aluminiumoxid und mit silanisiertem Kieselgel. Hier fielen die Schichten nach dem Trocknen leicht ab.

Bei 30 Sorptionsmitteln jedoch gelang die Beschichtung, so dass diese Schichten auf ihre Verwendbarkeit zum Chromatographieren getestet werden konnten. Darüber soll demnächst berichtet werden (LENK UND GRUBER<sup>4</sup>). Versuche mit Aceton als Suspensionsmittel zeigten, dass dieses anstelle von Alkohol dort eingesetzt werden kann, wo weniger dichte Schichten erwünscht sind und wo der Beschichtungsvorgang möglichst wenig Zeit erfordern soll.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Mit Alkohol als Suspensionsmittel gelingt die Beschichtung von Chromatotubes in einem speziellen Gerät mit beliebigen Sorptionsmitteln. Dabei können Dünnschicht-Präparate mit einem Zusatz von Gips, Stärke oder Fluoreszenzindikator oder ohne Zusatz verwendet werden. Die Mengen an Sorptionsmittel und Alkohol werden angegeben, welche pro Ansatz (drei Tubes) benötigt werden, ausserdem die Einfüllmengen pro Tube. Von drei Firmen wurden insgesamt 30 Sorptionsmittel verwendet: Cellulose, Kieselgel, Aluminiumoxid, Kieselguhr, Magnesiumsilicat und Polyamid. Aceton als Suspensionsmittler gibt weniger dichte Schichten und verkürzt die Trocknungszeiten erheblich.

#### LITERATUR

- 1 P. POGACAR UND H. KLEIN, *Deut. Z. Ges. Gerichtl. Med.*, 60 (1967) 1.
- 2 P. POGACAR, B. KIENLE, P. KRAPP UND K. LÜHRSEN, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 287.
- 3 G. HANNIG UND H. P. LENK, *Z. Anal. Chem.*, im Druck.
- 4 H. P. LENK UND H. GRUBER, *J. Chromatog.*, 43 (1969) 355.