

CHROM. 4174

TUBE-CHROMATOGRAPHIE AUF SELBSTGEFERTIGTEN SCHICHTEN

II. PRÜFUNG DER BESCHICHTETEN TUBES

HANS PETER LENK UND HEIDE GRUBER

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

(Eingegangen am 12. Mai 1969)

SUMMARY

Chromatography in self-coated tubes. II. Testing of the coated tubes

Chromatotubes, coated by means of a home-made coating apparatus with cellulose, silica gel, aluminium oxide, kieselguhr, magnesium silicate and polyamide with and without an admixture of plaster of Paris, starch or fluorescence indicator, were tested for application in chromatography. Sudan Red G, Dimethyl Yellow and Indophenol were separated on these layers with benzene, Fast Red E, Chrysoine SGX and Indigotin I with *n*-propanol-ethyl acetate-water (6:1:3), sorbic acid, salicylic acid and *p*-hydroxybenzoic acid ethyl ester with *n*-pentane-*n*-hexane-acetic acid (10:10:3) (admixture of fluorescence indicator). The reproducibility of the R_F values and the size of the spots correspond to those obtained with commercial chromatotubes. Development times, spot sizes and medium errors of mean values of layers coated with alcohol or acetone as suspending medium are given.

EINLEITUNG

Die von POGACAR und Mitarbeitern^{1,2} zu chromatographischen Zwecken verwendeten innenbeschichteten Glasrohre (Chromatotubes) waren bisher nur mit Schichten von Kieselgel G verfügbar. In dieser Form konnten sie von der Firma Desaga (Heidelberg) bezogen werden. Da die Tube-Chromatographie gegenüber der Dünnschichtchromatographie auf Platten Vorteile bietet, verspricht auch eine Anwendung anderer Sorptionsmittel Erfolg. HANNIG UND LENK³ konstruierten ein Gerät, mit dem sich Chromatotubes mit beliebigen Sorptionsmitteln beschichten lassen. LENK UND GLEICH⁴ beschrieben eingehend die Herstellung von Chromatotubes mit diesem Beschichtungsgerät. Bei 30 Sorptionsmitteln von drei Firmen verlief die Beschichtung erfolgreich. Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die so hergestellten Schichten auf ihre Verwendbarkeit für chromatographische Zwecke zu prüfen.

EXPERIMENTELLES

Um die Schichten auf ihre Brauchbarkeit zu untersuchen, wurden mit diesen Chromatogramme angefertigt. Im allgemeinen wurden Farbstoffgemische getrennt. Farbstoffe haben den Vorteil, dass man die Gleichmässigkeit der Schicht nicht nur am fertigen Chromatogramm testen kann (gleiche R_F -Werte, Beibehaltung des Abstandes der Auftragsflecken voneinander), sondern dass Unregelmässigkeiten schon während der Entwicklung mit dem Fliessmittel erkennbar werden.

Folgende Farbstoffgemische wurden verwendet:

Sudanrot G, Buttergelb (*p*-Dimethylaminoazobenzol) und Indophenol, je 1% in Benzol (Testfarbstoffgemisch der Firma Desaga). Die Entwicklung erfolgte mit Benzol.

Echtrot E, Chrysoin SGX und Indigotin I, je 1/3% in Wasser. Entwicklung⁵ mit *n*-Propanol-Äthylacetat-Wasser (6:1:3).

Polyamid-Schichten wurden wie folgt getestet:

Sorbinsäure, Salizylsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure-äthylester, je 0.2% in Wasser. Dem Beschichtungsgemisch wurden pro Ansatz (drei Tubes) jeweils 0.1 g Fluoreszenzindikator F₂₅₄ (Merck) zugesetzt. Entwicklung⁶ mit *n*-Pentan-*n*-Hexan-Eisessig (10:10:3). Detektion im UV bei 254 nm: Salizylsäure fluoresziert hellblau, die beiden anderen Substanzen erscheinen als dunkle Flecken auf gelbgrün fluoreszierendem Grund.

Das Auffinden der Flecken wurde ermöglicht (Konservierungsstoffe) bzw. erleichtert (Farbstoffe) durch die Verwendung eines Auswertgerätes (Desaga). Die Tubes werden über Leuchtstoffröhren geschoben und von diesen von innen bestrahlt. Weil das Glas der Tubes nur unzureichend UV-Strahlen durchlässt, ist eine Auswertung unter aufgestrahltem UV-Licht (UV-Lampen zur Auswertung von Dünnschicht-Platten) nicht in befriedigender Weise möglich. Die Empfindlichkeit wird durch Verwendung des Auswertgerätes ganz erheblich vergrössert. Bei diesem lassen sich wahlweise Leuchtstoffröhren für Tageslicht, für UV 254 nm und für UV 366 nm einschalten.

Die oben angegebenen Farbstoffe bzw. Konservierungsstoffe wurden stets als Lösung aufgetragen, welche bereits alle drei Substanzen enthielt. Zum Auftragen wurden Kapillaren verwendet, welche in Kapillarhaltern (Desaga) befestigt waren. Dadurch wurde eine konstante Entfernung des Auftragspunktes vom Rand des Tubes gewährleistet (2.0 cm). Die handelsüblichen kurzen Kapillaren (Desaga) mit einem angegebenen Volumen von 2 μ l erwiesen sich als zu gross. Sie wurden deshalb mit einer Ampullensäge in zwei Stücke von 1 μ l Inhalt zerteilt. Es muss darauf geachtet werden, dass das Ende der Kapillare, welches beim Auftragen die Schicht berührt, wirklich glatt abgebrochen ist. Gerät Sorptionsmittel in die Kapillare, so kann dies mit einem feinen Draht entfernt werden. Pro Tube wurden jeweils acht Punkte aufgetragen. Der Abstand der Punkte untereinander betrug also knapp 1 cm.

Die Entwicklung erfolgte in den handelsüblichen Gefässen. Das Tube wurde dazu vorsichtig von unten her in die Öffnung des zugehörigen Kunststoffringes geschoben und mit Gummikappe samt Entlüftungskapillare verschlossen. Das Ganze wurde auf das Entwicklungsgefäss stopfenartig aufgesetzt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden stets 10 ml Fliessmittel verwendet. Das Tube wurde so weit in das Entwicklungsgefäss geschoben, dass sich der untere Rand des Glasrohres

ABELLE I

AUFZEITEN, LAUFSTRECKEN AB AUFTRAGSPUNKT, FLECKENGRÖSSEN UND MITTLERE FEHLER BEI SELBSTBE-
SCHICHTETEN CHROMATOTUBES

Die Angaben unter den Rubriken "Laufzeit", "Laufstrecke" und "mittlere Fleckengrösse" stellen Mittelwerte
is bis zu fünf Tubes dar. Die Fleckengrösse ist dabei wiederum über alle Flecken eines Tubes gemittelt.

Nr.	Sorptionsmittel	Firma	Suspen- sions- mittel ^a	Test- Methode (Nr.) ^b	Lauf- zeit (min)	Lauf- strecke (cm)	Mittlere Fleckengrösse (cm)		Mittlerer Fehler (R _F) ^c
							Länge	Breite	
1	Cellulose mikro- kristallin (Avicel)	Merck	A	2	133	9.6	0.7	0.5	0.002
2	Mikrokristallines Cellulosepulver (Avicel)	MN ^d	A	2	20	9.5	2.8	0.6	0.002
3	Cellulosepulver	MN ^d	A	2	58	9.4	1.0	0.6	0.002
4	Kieselgel H	Merck	A	1	20	9.3	0.5	0.3	0.000
5	Kieselgel H	Merck	Aceton	1	15	9.3	0.9	0.3	0.002
6	Kieselgel DC	Woelm	A	1	39	9.3	0.6	0.4	0.000
7	Kieselgel G	Merck	A	1	29	9.4	0.5	0.3	0.000
8	Kieselgel G	MN ^d	A	1	30	9.4	0.7	0.4	0.000
9	Kieselgel G DC	Woelm	A	1	46	9.3	0.6	0.3	0.000
0	Kieselgel S	MN ^d	A	2	72	9.4	1.0	0.6	0.000
1	Aluminiumoxid H	Merck	A	1	12	9.4	1.0	0.4	0.001 ^e
2	Aluminiumoxid H	Merck	Aceton	1	22	9.4	0.7	0.4	0.002
3	Aluminiumoxid H	Merck	A	2	51	9.4	1.9	0.6	0.001
4	Aluminiumoxid N	MN ^d	A	1	23	9.3	0.8	0.4	0.000
5	Aluminiumoxid G	Merck	A	1	19	9.4	0.9	0.5	0.000
6	Aluminiumoxid G	Merck	Aceton	1	19	9.3	0.8	0.4	0.000
7	Aluminiumoxid G	MN ^d	A	1	52	9.3	0.7	0.4	0.003
8	Aluminiumoxid G DC	Woelm	A	1	71	9.3	0.8	0.5	0.002
9	Aluminiumoxid basisch	Merck	A	1	37	9.4	0.8	0.6	0.000
0	Aluminiumoxid basisch	Merck	Aceton	1	39	9.4	0.8	0.5	0.002 ^e
1	Aluminiumoxid basisch DC	Woelm	A	1	39	9.4	0.9	0.4	0.004
2	Magnesiumsilikat DC	Woelm	A	1	56	9.4	0.9	0.3	0.000
3	Magnesiumsilikat DC	Woelm	A	2	161	9.4	2.8	0.7	0.002
4	Polyamid	Merck	A	3	18	9.4	0.6	0.6	0.004 ^e
5	Polyamid DC 6	MN ^d	A	3	10	9.4	0.7	0.8	0.005 ^e
6	Polyamid DC 11	MN ^d	A	3	27	9.3	0.7	0.7	0.005 ^e
7	Polyamid DC 66	MN ^d	A	3	9	9.4	0.8	0.7	0.005

^a A = Alkohol.

^b Die drei Testmethoden sind am Anfang des Abschnitts EXPERIMENTELLES beschrieben.

^c Der "mittlere Fehler" ist auf der folgenden Seite eingehend erläutert.

^d MN = Macherey, Nagel & Co.

^e Der Teil der Schicht, welcher beim Entwickeln in das Fließmittel eintaucht, fällt leicht ab.

ca. 1 mm über dem Boden des Entwicklungsgefässes befand. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Tube senkrecht stand. Die Entwicklung wurde dann beendet, wenn die Fliessmittelfront den unteren Rand der aufgesteckten Gummikappe erreicht hatte. Die Laufstrecke ab Auftragspunkt betrug meist 9.3 cm, schwankte zwischen 9.2 und 9.7 cm und hatte einen Mittelwert von 9.38 ± 0.01 cm. Bei einer Gesamtlänge des Tubes von 12.5 cm, der Entfernung der Auftragspunkte vom unteren Rand von 2.0 cm und der schichtfreien Zone am oberen Rand von 0.7 cm (bedingt durch den während der Beschichtung dort befindlichen Gummiring) wurde also die Fliessmittelfront ca. 0.4 cm unter dem Ende der Schicht gestoppt. Das Tube wurde dann aus dem Kunststoffring gezogen und ganz kurz abtropfen gelassen. Schliesslich wurde die Gummikappe entfernt und das Tube waagrecht zum Trocknen hingelegt.

Bei der Auswertung wurden die R_F -Werte bestimmt und die Länge und Breite der Flecken gemessen. Bei jedem Tube wurde für jede Substanz das arithmetische Mittel der R_F -Werte ermittelt und nach

$$F_m = \sqrt{\frac{\sum(f^2)}{n(n-1)}}$$

der mittlere Fehler des Mittelwertes errechnet. Von den pro Tube anfallenden drei mittleren Fehlern des Mittelwertes wurde wiederum das arithmetische Mittel gebildet. Dieser Wert ist als Kriterium für die Gleichmässigkeit der Schicht in der Tabelle I als "mittlerer Fehler" angegeben. Ausserdem sind Laufzeit, Laufstrecke ab Auftragspunkt und Fleckengrösse verzeichnet.

Ein direkter Vergleich zwischen den selbstbeschichteten und den von der Firma Desaga bezogenen Schichten war nur bei Kieselgel G möglich. Alle Angaben darüber sind in Tabelle II enthalten. Sie zeigen, dass Laufzeiten und Fleckenlängen, mittlere Fehler und R_F -Werte der einzelnen Farbstoffe bei gekauften und selbstbeschichteten (Kieselgel G Merck) Tubes weitgehend übereinstimmen. Bei Verwendung von Kieselgel G von Macherey, Nagel & Co. und von Woelm sind die Flecken etwas länger, ausserdem liegen die R_F -Werte höher. Die mittleren Fehler jedoch sind von ähnlicher Grösse wie diejenigen der gekauften bzw. mit Kieselgel G (Merck) beschichteten Tubes.

TABELLE II

VERGLEICH DER LAUFZEITEN, FLECKENGRÖSSEN, R_F -WERTE UND MITTLEREN FEHLER SELBSTHERGESTELLTER UND KÄUFLICHER KIESELGEL-G-TUBES

Alle Angaben entsprechend Tabelle I. Suspensionsmittel: Alkohol. a = Indophenol; b = Sudanrot G; c = Butergelb.

Nr.	Beschichtung	Kieselgel G der Firma	Laufzeit (min)	Fleckenlänge (cm)			R_F -Werte			Mittlerer Fehler (R_F)		
				a	b	c	a	b	c	a	b	c
	Desaga		26	0.2	0.4	0.6	0.04	0.16	0.48	0.000	0.001	0.001
	selbst	Merck	29	0.3	0.5	0.7	0.04	0.15	0.48	0.000	0.000	0.001
	selbst	MN	30	0.4	0.8	0.8	0.27	0.37	0.77	0.000	0.000	0.001
	selbst	Woelm	46	0.3	0.7	0.7	0.08	0.24	0.57	0.000	0.002	0.001

TABELLE III

ERGEBNISSE MIT KIESELGUR-SCHICHTEN

Angaben entsprechend Tabelle I.

Nr.	Kieselgur der Firma	Gips- Zusatz	Test- methode (Nr.)	Laufzeit (min)	Suspensions- mittel
1	MN	Ø (N)	2	63	Alkohol
2	Merck	+ (G)	2	68	Alkohol
3	Merck	+ (G)	2	77	Aceton
4	MN	+ (G)	2	63	Alkohol

Zur Überprüfung der Kieselgur-Schichten konnten die Ergebnisse der beiden Farbstoffgemische nicht so ausgewertet werden, wie dies bei den anderen Schichten geschehen ist. Bei allen Kieselgur-Schichten laufen nämlich beide Farbstoffgemische durch und wandern mit der Fließmittelfront. Sie sind dort zwar in die einzelnen Komponenten getrennt, doch bildet die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte innerhalb eines Tubes kein Kriterium mehr für die Gleichmässigkeit der Schicht. Die Farbstoffe wurden jedoch während der Entwicklung in ihrem räumlichen Verhalten verfolgt. Dabei ergab sich, dass auch mit allen Kieselgur-Präparaten eine gleichmässige Beschichtung gelungen war. Tabelle III enthält die entsprechenden Angaben.

Bei der Verwendung von Aceton als Suspensionsmittel war die Beschichtung weniger dicht. Die Auswirkungen dieser Tatsache auf Laufzeit und Fleckengrösse sind in Tabelle IV angegeben. Sie zeigt, dass bei Verwendung von Aceton die Laufzeit im allgemeinen zunimmt, während die Grösse der Flecken meist geringfügig abnimmt.

TABELLE IV

LAUFZEITEN UND FLECKENGRÖSSEN BEI VERWENDUNG VON ACETON ODER ALKOHOL ALS SUSPENSIONSMITTEL

Angaben entsprechend Tabelle I.

Nr.	Sorptionsmittel ^a	Laufzeit (min)		Fleckenlänge (cm)		Fleckenbreite (cm)	
		Alkohol	Aceton	Alkohol	Aceton	Alkohol	Aceton
1	Kieselgel H	20	15	0.5	0.9	0.3	0.3
2	Aluminiumoxid H	12	22	1.0	0.7	0.4	0.4
3	Aluminiumoxid G	19	19	0.9	0.8	0.5	0.4
4	Aluminiumoxid basisch	37	39	0.8	0.8	0.6	0.5
5	Kieselgur G	68	77				

^a Alle von der Firma Merck.

DISKUSSION

Während bisher für die Tube-Chromatographie nur solche Rohre zur Verfügung standen, die mit Kieselgel G beschichtet sind, wurden nun Rohre geprüft, welche mit beliebigen Sorptionsmitteln im eigenen Labor beschichtet worden waren. Es ergab

sich, dass alle diese Schichten für chromatographische Zwecke geeignet sind. Die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte innerhalb eines Tubes ist gut. Gelegentliche stärkere Abweichungen kommen zwar vor, doch wurden auch bei gekauften Kieselgel-G-Tubes für einzelne Farbstoffe mittlere Fehler des Mittelwertes bis zu $\pm 0.010 R_F$ gefunden. Ein direkter Vergleich zwischen den gekauften und den selbstbeschichteten Tubes war nur bei Kieselgel G möglich. Er zeigte, dass die Gleichmässigkeit der Beschichtung bei beiden etwa gleich gut war. Die R_F -Werte hatten die gleiche Streuung; die Fleckengrösse wich nur geringfügig ab. Somit ist es nunmehr möglich, auf Chromatotubes zu chromatographieren, welche neben Kieselgel G mit Cellulose, Kieselgel H, Kieselgel S, Aluminiumoxid H, Aluminiumoxid G, basischem Aluminiumoxid, Kieselgur N, Kieselgur G, Magnesiumsilicat oder Polyamid beschichtet sind. Damit ist der Anwendungsbereich der Tube-Chromatographie erheblich erweitert worden. Neben den angeführten Sorptionsmitteln dürften sich auch noch andere als Beschichtungsmaterialien für Chromatotubes eignen.

DANK

Frau Dr. CH. JUNGE (Max-von-Pettenkofer-Institut des Bundesgesundheitsamtes) danken wir für ihre Hilfe bei Anwendung der Testmethode Nr. 3.

ZUSAMMENFASSUNG

Chromatotubes, welche in einem eigenen Beschichtungsgerät mit Cellulose, Kieselgel, Aluminiumoxid, Kieselgur, Magnesiumsilicat und Polyamid unter Zusatz von Gips, Stärke, Fluoreszenzindikator oder ohne Zusatz beschichtet worden waren, wurden auf ihre Verwendbarkeit für chromatographische Zwecke untersucht. Dafür wurden Sudanrot G, Buttergelb und Indophenol an diesen Schichten mit Benzol getrennt, Echtrot E, Chrysoin SGX und Indigotin I mit *n*-Propanol-Äthylacetat-Wasser (6:1:3), Sorbinsäure, Salizylsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure-äthylester mit *n*-Pentan-*n*-Hexan-Eisessig (10:10:3) (Zusatz von Fluoreszenzindikator). Reproduzierbarkeit der R_F -Werte und Fleckengrösse entsprachen den Werten bei käuflichen Chromatotubes. Für Schichten, welche mit Alkohol oder Aceton als Suspensionsmittel hergestellt wurden, werden Laufzeiten, Fleckengrössen und mittlere Fehler der Mittelwerte der R_F -Werte angegeben.

LITERATUR

- 1 P. FOGACAR UND H. KLEIN, *Deut. Z. Ges. Gerichtl. Med.*, 60 (1967) 1.
- 2 P. FOGACAR, 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 W. GLEICH, *J. Chromatog.*, 43 (1969) 350.
- 5 T. SALO, E. AIRO UND K. SALMINEN, *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 125 (1964) 20.
- 6 H. WOIDICH, H. GNAUER UND E. GALINOVSKY, *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 133 (1967) 317.

J. Chromatog., 43 (1969) 355-360