

CHROM. 4423

UNTERSUCHUNGEN VON FAKTOREN, DIE DAS DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE VERHALTEN DER STOFFE BEEINFLUSSEN

2. MITT. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON COFFEIN, THEOPHYLLIN UND THEOBROMIN AUF pH-GRADIENT-SCHICHTEN

E. DUMONT UND L.J. KRAUS*

*Institut für Pharmakognosie und Analytische Phytochemie der Universität des Saarlandes***, 66
Saarbrücken (B.R.D.) und *Staatliches Institut für Arzneimittelkontrolle****, Prag (Tschechoslowakei)

SUMMARY

Investigations on factors influencing behaviour in thin-layer chromatography. 2. Thin-layer chromatography of caffeine, theophylline and theobromine on pH gradient layers

The relationship between the chromatographic behaviour of caffeine, theophylline and theobromine and the pH value of the silica gel layer is investigated by the pH gradient technique. For the development of the chromatograms use was made of several neutral organic mobile phases described in earlier publications by other authors.

EINLEITUNG

In der 1. Mitteilung¹ wurde auf Grund eingehender Literaturstudien und eigener Ergebnisse diskutiert, welche Faktoren das DC Verhalten der drei Xanthin-Derivate beeinflussen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass pH-Wert und Wassergehalt der Schicht eine wesentliche Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit soll nun der ausschliessliche Einfluss des pH-Werts der stationären Phase untersucht werden.

METHODE

Es ist angezeigt, zunächst die Arbeitsmethode kurz zu erläutern. Die Gradient-Technik wurde 1964 von STAHL² in die DC eingeführt. Von den verschiedenen Möglichkeiten³ eines Gradienten in der stationären Phase fanden besonders der Silbernitrat-Imprägnierungsgradient³⁻⁷ und pH-Gradienten^{2-4,8-10} Anwendung. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf den pH-Gradient-Schichten war damals jedoch noch

* z.Z. Studienaufenthalt an der Universität des Saarlandes.

** Direktor: Prof. Dr. E. STAHL.

*** Direktor: Dipl. Ing. J. BURIÁNEK, C.Sc.

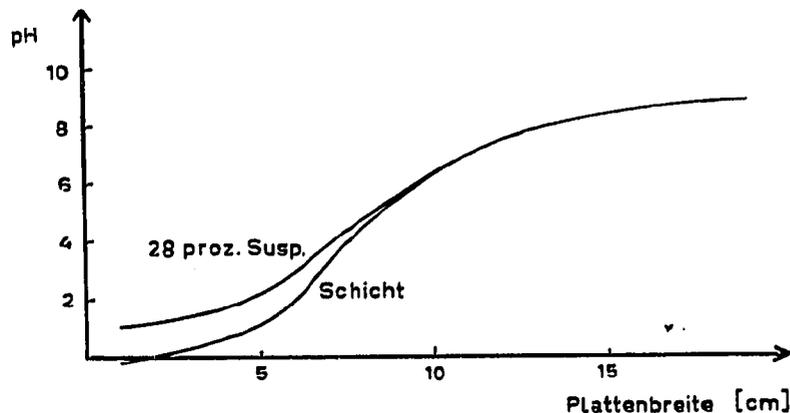


Fig. 1. Abhängigkeit des pH-Wertes der Schicht bzw. einer 28% Suspension von der Plattenbreite bei der Ausgangskonzentration 0,5 *N* an Schwefelsäure bzw. Natriumhydroxid.

unbefriedigend, weil das zur Herstellung der Schichten verwandte Beschichtungsgerät technisch noch nicht ausgereift war; ausserdem waren die pH-Intervalle der Schichten und der Verlauf des pH-Gradienten noch nicht untersucht. In den Jahren 1966–1968 wurde dann eine Methode zur reproduzierbaren Herstellung von pH-Gradient-Schichten mit definierter Ausbildung des pH-Verlaufs ausgearbeitet^{11,12} und das chromatographische Verhalten verschiedener Substanzklassen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Schicht untersucht^{12,13}. Mit dem Sorptionsmittel Kieselgel GF₂₅₄ (Merck) und drei verschiedenen Konzentrationen an Schwefelsäure bzw. Natriumhydroxid werden Schichten mit verschiedenen pH-Intervallen erhalten^{11,12}. Fig. 1 zeigt den pH-Verlauf von Gradient-Schichten, zu deren Herstellung 0,5 *N* Schwefelsäure bzw. Natronlauge verwandt wurden. Die pH-Charakteristik der Schichten wurde für den sauren Bereich aus pH-Messungen an wässrigen Suspensionen verschiedener Konzentrationen des Sorptionsmittels der betreffenden Schichtbereiche und Bestimmungen des Wassergehaltes der Schichten abgeleitet. Zum Vergleich mit diesem pH-Gradient einer zur Chromatographie bereiteten Schicht wurde daneben der Gradient für die konzentrierteste Suspension, die sich gerade noch herstellen lässt—eine 28% Suspension—wiedergegeben. Für den basischen Bereich ergibt sich auf Grund des dort vorliegenden Puffersystems Kieselgel-Natriumhydroxid für Suspensionen und Schicht der gleiche pH-Wert.

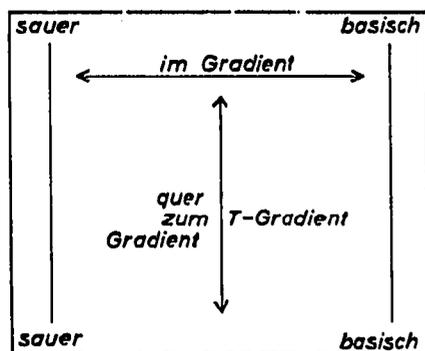


Fig. 2. Schematische Darstellung der verschiedenen Laufrichtungen einer pH-Gradient-Schicht.

Jede Gradient-Schicht bietet, wie die Fig. 2 zeigt, drei verschiedene Laufrichtungen. Im Falle eines pH-Gradienten kann z.B. von der sauren Schichtseite in Richtung auf die basische Seite und umgekehrt, also in beiden Fällen *im* Gradient chromatographiert werden. Es kann aber auch *quer* zum eigentlichen Gradient-Verlauf entwickelt werden, wofür STAHL³ den Begriff T-Gradient-Technik einführt (T von travers = quer). Mit dieser Technik lässt sich das chromatographische Verhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert untersuchen. Zur Erstellung eines pH-T-Chromatogrammes wird die Probelösung in Form einer sich über die ganze Breite einer Schicht erstreckenden band- bzw. strichförmigen Startzone aufgetragen. Dazu wurde der a.a.O.^{12,14} beschriebene "Autoliner" benutzt.

Die Arbeiten der Literatur, die sich mit der DC Trennung der drei Xanthine beschäftigen, lassen sich in zwei Gruppen einteilen und zwar sind es einmal Arbeiten, die neutrale unterschiedlich polare Fliessmittel auf nicht speziell präparierten Schichten einsetzen und zum anderen Arbeiten, die durch Änderung des pH-Wertes und zwar der mobilen oder der stationären Phase eine Verbesserung des Trenneffektes anstreben. Dies war Anlass, sich zur Untersuchung des Einflusses des Schicht-pH-Wertes auf das chromatographische Verhalten der drei Xanthine der pH-T-Gradient-Technik zu bedienen. Dazu wurden von den in der Literatur angegebenen neutralen mobilen Phasen sechs ausgewählt, die in der folgenden Tabelle zusammengestellt sind.

TABELLE I

NEUTRALE FLIESSMITTEL, DIE ZUR pH-T-GRADIENT-CHROMATOGRAPHIE EINGESETZT WURDEN

<i>Fliessmittel</i>	<i>Literatur</i>
CHCl ₃ -(C ₂ H ₅) ₂ O (85:15)	15
CCl ₄ -CHCl ₃ -CH ₃ OH (50:50:10)	16
CCl ₄ -CHCl ₃ -CH ₃ OH (80:50:10)	17
CHCl ₃ -(CH ₃) ₂ CO-CH ₃ OH (30:30:30)	18
C ₆ H ₆ -(CH ₃) ₂ CO (30:70)	19
CHCl ₃ -C ₂ H ₅ OH (90:10)	20

ERGEBNISSE

Wie die Fig. 3a zeigt, liefert das von MACHATA¹⁵ eingesetzte Fliessmittel im gesamten pH-Bereich der Gradient-Schicht keine befriedigende Trennung. Die Entwicklung des in der Fig. 3b wiedergegebenen Chromatogramms wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, nur wurde zusätzlich noch ein Becherglas mit 20 ml Wasser in die Kammer eingestellt, also eine Klimatisierung mit Wasser vorgenommen. Diese Veränderung der chromatographischen Bedingungen lässt im neutralen und schwach alkalischen Schichtbereich die Trennung gelingen. MACHATA¹⁵ hat in seiner Arbeit folgende *hR_F*-Werte angegeben: Coffein 35, Theophyllin 20, Theobromin 40. Die pH-T-Gradient-Kurven liegen im gesamten pH-Bereich der Schicht wesentlich unter diesen Werten. Dies lässt vermuten, dass der Autor¹⁵ bei seinen schon im Jahre 1960 publizierten Versuchen mit einem gröberkörnigen Sorptionsmittel und/oder bei höherem Wassergehalt der Schicht gearbeitet hat. Wie die Fig. 4 zeigt, wird, soweit sich dies nach dem Behandeln mit Sprühreagenz (vgl.

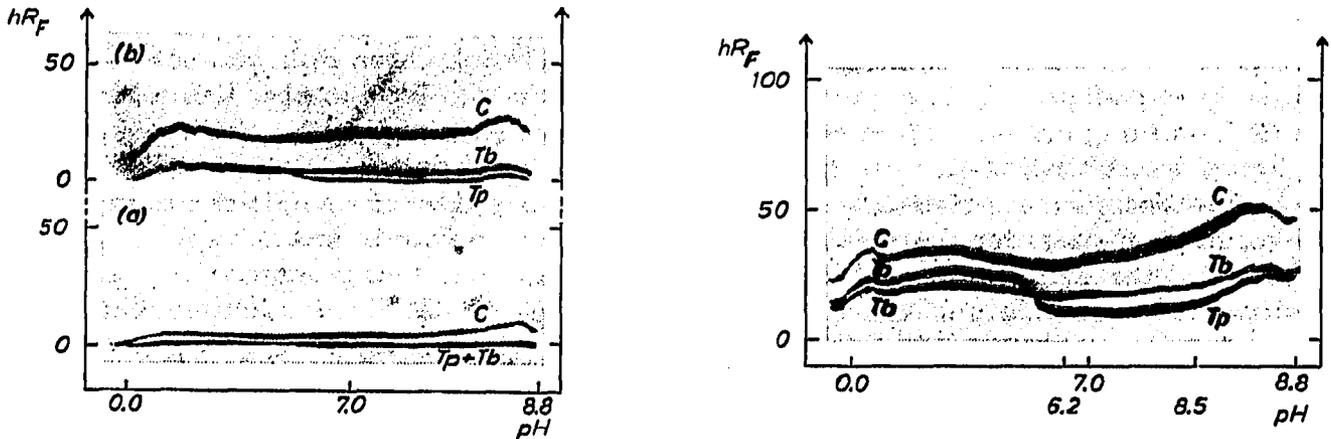


Fig. 3. (a) Dünnschichtchromatogramm von Coffein, Theophyllin und Theobromin im pH-T-Gradient der Konzentration 0.5 N. C = Coffein; Tp = Theophyllin; Tb = Theobromin. Mobile Phase: nach MACHATA (15) (vgl. Tabelle I). Laufstrecke: 10 cm, KS. Sichtbarmachung: Besprühen mit Jod-Kaliumjodid-Reagenz; Nachbehandlung mit Salzsäure. Zusammensetzung der Reagenz-lösung: 3 g J_2 + 1 g KJ in 100 ml Äthanol; 12.5% Salzsäure in Äthanol. Farben: C = hellbraun; Tp = rotviolett; Tb = blauviolett. (b) Wie (a). Zusätzlich Klimatisierung der Kammer mit Wasser.

Fig. 4. Dünnschichtchromatogramm von Coffein, Theophyllin und Theobromin im pH-T-Gradient der Konzentration 0.5 N. Mobile Phase: nach KAMP *et al.*¹⁶ (vgl. Tabelle I). Sonstige Bedingungen wie zu Fig. 3a.

Lit. 1) beurteilen lässt, mit dem von KAMP *et al.*¹⁶ angegebenen Fließmittel im sauren sowie neutralen und schwach alkalischen Schichtbereich eine recht gute Trennung der Xanthine erreicht. Die Trennung ist für pH-Werte über 7 am günstigsten zu beurteilen. Eine geringfügige Modifizierung dieses Fließmittels, wie sie SENANAYAKE UND WIJESKERA¹⁷ vorgenommen haben (vgl. Tabelle I), bringt im pH-T-Chromatogramm keine nennenswerten Änderungen.

Ganz bemerkenswert ist die Leistungsfähigkeit des von SZENDEY¹⁸ verwandten Fließmittels auf den pH-Gradient-Schichten. Wie die Fig. 5 zeigt, wird im schwach

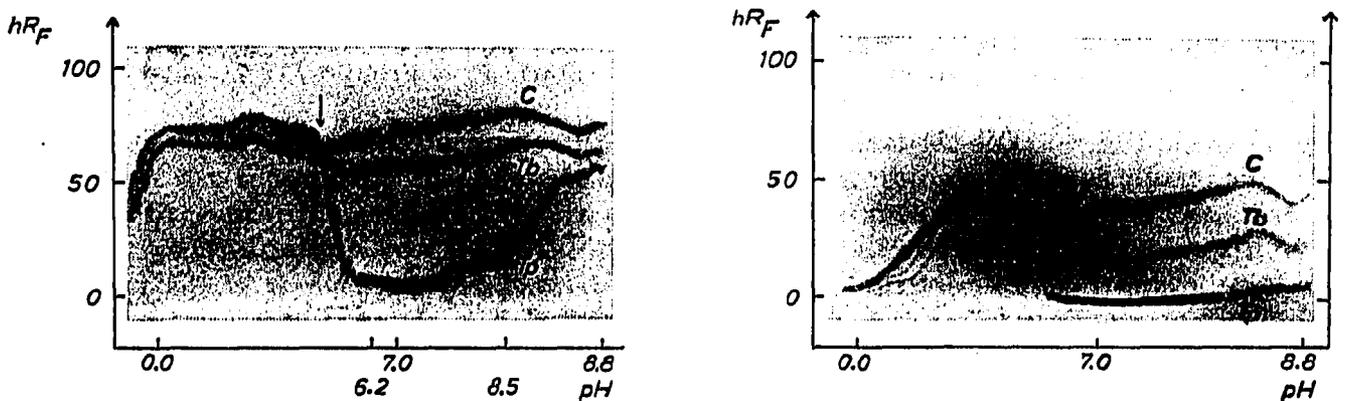


Fig. 5. Dünnschichtchromatogramm von Coffein, Theophyllin und Theobromin im pH-T-Gradient der Konzentration 0.5 N. Mobile Phase: nach SZENDEY¹⁸ (vgl. Tabelle I). Sonstige Bedingungen wie zu Fig. 3a.

Fig. 6. Dünnschichtchromatogramm von Coffein, Theophyllin und Theobromin im pH-T-Gradient der Konzentration 0.5 N. Mobile Phase: nach SCHUNACK *et al.*¹⁹ (vgl. Tabelle I). Sonstige Bedingungen wie zu Fig. 3a.

sauren, neutralen und schwach alkalischen Bereich eine sehr gute Trennung erzielt. Der Autor¹⁸ hat in seiner Arbeit für Kieselgel HF-Schichten folgende hR_F -Werte angegeben: Coffein 50, Theophyllin 49, Theobromin 44. Er hat also keine befriedigende Trennung erzielt. Ein entsprechendes Trennergebnis zeigt die Pfeilmarkierung in Fig. 5 an. Allerdings liegen die von SZENDEY¹⁸ gefundenen Werte deutlich unter den hR_F -Werten des pH-Gradient-Chromatogrammes. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, dass der Autor ein anderes Kieselgel verwandt hat.

Für eine Trennung mit dem von SCHUNACK *et al.*¹⁰ eingesetzten Fließmittel sind nur der neutrale und der schwach alkalische Bereich der Gradient-Schicht ge-

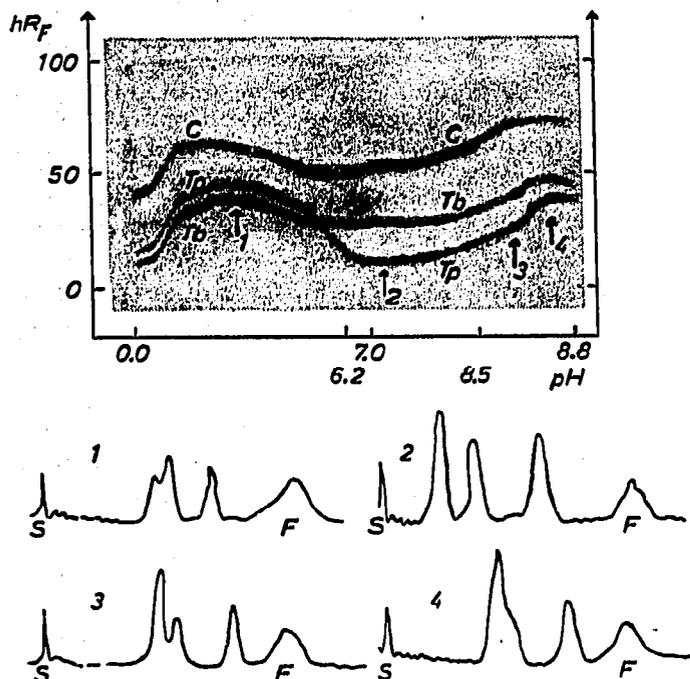


Fig. 7. Dünnschichtchromatogramm von Coffein, Theophyllin und Theobromin im pH-T-Gradient der Konzentration 0.5 N, mit vier Absorptions-Orts-Kurven zur Kontrolle der Trennung in den durch die Pfeile 1-4 markierten pH-Bereichen. Mobile Phase: nach TEICHERT *et al.*²⁰ (vgl. Tabelle I). Sonstige Bedingungen wie zu Fig. 3a. S = Start; F = Front.

eignet (vgl. Fig. 6). Die Abtrennung der drei Xanthine voneinander ist dort, soweit sich dies nach dem Behandeln mit Sprühreagenz beurteilen lässt, recht gut gelungen; allerdings bleibt Theophyllin am Start zurück, was in Übereinstimmung mit den Angaben von SCHUNACK *et al.*¹⁰ steht.

Wie aus Fig. 7 ersichtlich ist, wird mit dem von TEICHERT *et al.*²⁰ benutzten, sehr einfach zusammengesetzten Fließmittel (vgl. Tabelle I) auch im sauren Schichtbereich eine gute Trennung der drei Xanthine erreicht. Noch besser eignen sich allerdings das neutrale und das schwach alkalische Gebiet.

Das Absinken der hR_F -Werte im stark sauren Randbereich der Schicht, das in Abhängigkeit vom jeweiligen Fließmittel mehr oder weniger deutlich ist, lässt sich als Salzbildung erklären, da die pK_s -Werte der korrespondierenden Säuren zwischen 0 und 1 liegen²¹.

Der deutliche Abfall der Theophyllin-Kurve, der bei Verwendung der von

SZENDEY¹⁸ angegebenen mobilen Phase extrem stark in Erscheinung tritt (vgl. Fig. 5), kann nicht durch Protonenaufnahme oder -abgabe zustande kommen, sondern muss auf eine Abnahme der Löslichkeit des Theophyllins im neutralen und schwach alkalischen Gebiet der Schicht zurückgeführt werden.

Die mit den einzelnen Fließmitteln erhaltenen pH-Gradient-Chromatogramme wurden nun mit dem Zeiss'schen Chromatogramm-Spektralphotometer in verschiedenen pH-Bereichen daraufhin untersucht, ob eine Trennung wirklich gelungen ist oder vielleicht nur von einem unempfindlichen Sprühreagenz vorgetäuscht wird²². Dazu wurden bei einer Wellenlänge von 250 nm Absorptions-Orts-Kurven aufgenommen. Aus Fig. 7 sind die Ergebnisse für das mit dem von TEICHERT *et al.*²⁰ angegebenen Fließmittel entwickelte Chromatogramm ersichtlich. Wie aus dem zu Pfeil 1 gehörenden Kurvenverlauf geschlossen werden kann, sind Theophyllin und Theobromin im sauren Bereich nicht vollständig getrennt. Im Bereich nahe des Neutralpunktes (vgl. Pfeil 2) liegt eine gute Trennung vor; dagegen bleiben Theobromin und Theophyllin, wie die Kontroll-Kurven 3 und 4 zeigen, bei höheren pH-Werten ungetrennt. Eine entsprechende Kontrolle der mit den übrigen Fließmitteln der Tabelle I entwickelten pH-T-Gradient-Chromatogramme zeigt, dass die Trennung bei Verwendung der von KAMP *et al.*¹⁶ (bzw. SENANAYAKE UND WIJESEKERA¹⁷) sowie SZENDEY¹⁸ angegebenen Fließmittel jeweils im neutralen und im schwach alkalischen Bereich vollständig ist. Beim Einsatz des von SCHUNACK *et al.*¹⁹ angegebenen Fließmittels ist die Trennung der drei Xanthine untereinander zwar sehr gut (vgl. Fig. 6), Theophyllin bleibt jedoch am Start.

Die erstgenannten Autoren¹⁶⁻¹⁸, die auf den üblichen, nicht speziell präparierten Kieselgel-Schichten gearbeitet haben, sowie auch TEICHERT *et al.*²⁰, die bei der Herstellung der Schichten statt Wasser einen Phosphatpuffer vom pH 6.8 verwendeten, erzielten in ihren Chromatogrammen nach fallendem R_F -Wert geordnet die Substanzverteilung Coffein, Theophyllin, Theobromin (vgl. dazu Tabelle I, 1. Mitt.). Für die üblichen Kieselgel-Schichten wurde ein pH-Wert von etwa 6.6 festgestellt. Die erwähnte Aufeinanderfolge der Substanzen im Chromatogramm tritt in den entsprechenden pH-T-Chromatogrammen jedoch erst bei niedrigeren pH-Werten auf. Dieser Befund kann z.Zt. noch nicht erklärt werden.

SCHLUSSBETRACHTUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des pH-Wertes der stationären Phase auf die Trennung untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass im pH-Bereich zwischen pH 6.2 und 8.5 eine Trennung erzielt werden kann, die auf Grund einer Kontrolle durch Aufnahme von Absorptions-Orts-Kurven als vollständig bezeichnet werden kann. Das Arbeiten bei pH-Werten unter 6.2 bzw. über 8.5 ist nicht zu empfehlen, da in diesen Bereichen der pH-T-Gradient-Chromatogramme die Trennung jeweils unbefriedigend ist.

Systematische Untersuchungen über die Rolle des Wassergehaltes der stationären Phase sollen Gegenstand einer weiteren Mitteilung sein.

DANK

Wir danken Herrn DR. JORK für seine Anregungen und Diskussionsbeiträge.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe der pH-Gradient-Technik das dünn-schichtchromatographische Verhalten von Coffein, Theophyllin und Theobromin in Abhängigkeit vom pH-Wert der Schicht untersucht. Als mobile Phasen wurden mehrere, von verschiedenen Autoren zur Trennung der Xanthine eingesetzte neutrale organische Fließmittel benutzt.

LITERATUR

- 1 L.J. KRAUS UND E. DUMONT, *J. Chromatog.*, 48 (1970) 96.
- 2 E. STAHL, *Chem.-Ing.-Tech.*, 36 (1964) 941.
- 3 E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 3.
- 4 E. STAHL, *Symposiumsber. 6. Intern. Kongr. klin. Chem., München, 1966*, Bd. 3, Verlag Karger, Basel, New York, 1968, S. 63.
- 5 E. STAHL UND H. VOLLMANN, *Talanta*, 12 (1965) 525.
- 6 E. STAHL UND J. PFEIFLE, *Naturwiss.*, 52 (1965) 620.
- 7 K. E. ROZUMEK, *J. Chromatog.*, 40 (1969) 97.
- 8 P. J. SCHORN, *Vortragsref. III. Intern. Symp. Chromatog.*, Brüssel, 1964.
- 9 E. J. SHELLARD, M. C. ALAM UND J. ARMAH, *Scientiae pharmaceuticae I, Symposiumsber. XXV. FIP-Kongress, Prag, 1965*.
- 10 J. FOLDERMANN, *Pharm. Weekblad*, 101 (1966) 421.
- 11 E. STAHL UND E. DUMONT, *Talanta*, 16 (1969) 657.
- 12 E. DUMONT, *Dissertation*, Saarbrücken, 1968.
- 13 E. STAHL UND E. DUMONT, *J. Chromatog. Sci.*, 7 (1969) 517.
- 14 E. STAHL UND E. DUMONT, *J. Chromatog.*, 39 (1969) 157.
- 15 G. MACHATA, *Mikrochim. Acta*, 1 (1960) 79.
- 16 W. KAMP, W. J. M. ONDERBERG UND W. A. SETERS, *Pharm. Weekblad*, 98 (1963) 993.
- 17 U. M. SENANAYAKE UND R. O. B. WIJESKERA, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 75.
- 18 G. L. SZENDEY, *Arch. Pharm.*, 299 (1966) 527.
- 19 W. SCHUNACK, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 105 (1965) 1551.
- 20 K. TEICHERT, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 100 (1960) 283.
- 21 LANDOLT-BÖRNSTEIN, *Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik*, 6. Aufl., II. Bd., 7. Teil, *Elektrische Eigenschaften*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1960.
- 22 E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1967) 294.

DISCUSSION

BRENNER: Sie stellten fest, dass die Mobilität von Coffein usw. vom Aciditätsgrad der Schicht abhängt, obwohl aufgrund der pK -Werte keine Salzbildung in Frage kommt. Dann muss man also wohl annehmen, dass der Aciditätsgrad die Menge oder die Aktivität der stationären wässrigen Phase beeinflusst. Wären Sie versuchsweise damit einverstanden?

DUMONT: In meiner Dissertation (DUMONT, Saarbrücken, 1968, S. 33) konnte ich feststellen, dass in den verschiedenen pH-Bereichen einer pH-Gradient-Schicht keine unterschiedlichen Wassergehalte vorliegen. Wir bemühen uns z.Z., eine Erklärung der chromatographischen Phänomene mit Hilfe der UV-Spektroskopie zu finden.