

CHROM. 4422

UNTERSUCHUNGEN VON FAKTOREN, DIE DAS DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHISCHE VERHALTEN DER STOFFE BEEINFLUSSEN

1. MITT. DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE VON COFFEIN, THEOPHYLLIN UND THEOBROMIN AUF UNIFORMEN SCHICHTEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT

LJ. KRAUS* UND E. DUMONT

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

SUMMARY

Investigations on factors influencing behaviour in thin-layer chromatography. 1. The influence of the pH value in thin-layer chromatography of caffeine, theophylline and theobromine on uniform layers

The paper starts with a review of work published on the thin-layer chromatography of caffeine, theophylline and theobromine with regard to the different chromatographic conditions. The separation results obtained by the different methods are briefly discussed. The second part reports systematic investigations on the influence of the pH value of the stationary phase after climatization with solutions of ammonia or acids and investigations on the influence of the pH value of the mobile phase.

EINLEITUNG

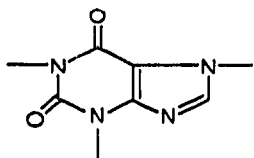
Coffein, Theophyllin und Theobromin sowie ihre Derivate sind für verschiedene Zweige der Nahrungs- und Genussmittelindustrie von Interesse. Für Kontroll-Laboratorien ist also eine einfache und schnelle DC Abtrennung der Einzelkomponenten von Wichtigkeit. Bei der Durchsicht der Literatur fällt auf, dass eine Trennung von je zwei der drei betrachteten Xanthine verhältnismässig einfach ist. Bei der chromatographischen Unterscheidung aller drei Xanthine traten jedoch, wie aus der Vielzahl der beschriebenen chromatographischen Bedingungen hervorgeht (vgl. Tabelle I),

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

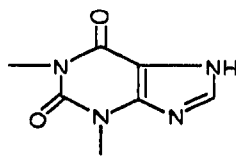
** Direktor: Dipl. Ing. J. BURIÁNEK, C.Sc.

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

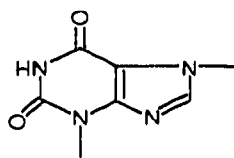
Schwierigkeiten auf, was bei Betrachtung der sehr ähnlichen Strukturformeln verständlich ist:



Coffein
(1,3,7-Trimethylxanthin)



Theophyllin
(1,3-Dimethylxanthin)



Theobromin
(3,7-Dimethylxanthin)

VERGLEICHENDE ÜBERSICHT ÜBER DIE BISHERIGEN PUBLIKATIONEN

Die ersten Arbeiten aus dem Bereich der Arzneimittel-Prüfung betrafen nicht die Trennung der drei methylierten Xanthine untereinander, sondern die Abtrennung nur eines jeweils allein vorliegenden Xanthinderivats von den übrigen Wirkstoffen (vgl. COMER UND COMER¹). Publikationen, die zumindest die Trennung von zwei der drei betrachteten Xanthine zum Ziel haben, sind in Tabelle I erfasst; sie lassen sich nach den verschiedenen chromatographischen Bedingungen in die folgenden sieben Gruppen einteilen:

- (1) Entwicklung auf Kieselgel- bzw. Aluminiumoxid-Schichten mit neutralen Fließmitteln.
- (2) Entwicklung auf gepufferten Kieselgel-Schichten mit neutralen Fließmitteln.
- (3) Entwicklung auf mit Ammoniak bedampften Kieselgel-Schichten mit neutralen Fließmitteln.
- (4) Entwicklung auf Kieselgel-Schichten mit alkalischen Fließmitteln.
- (5) Entwicklung auf Kieselgel- bzw. Aluminiumoxid-Schichten mit sauren Fließmitteln.
- (6) Entwicklung auf Kieselgel-Schichten mit Pufferlösungen.
- (7) Entwicklung auf gepufferten Kieselgel-Schichten mit sauren Fließmitteln.

Eine der ersten Publikationen, die die Trennung der drei Xanthine untereinander behandelt, ist die Arbeit von TEICHERT *et al.*² (vgl. Tabelle I, Gruppe 2). Die Autoren erhalten auf den mit einem Puffer von pH 6.8 hergestellten Kieselgelschichten mit einem einfachen Fließmittel eine gute Trennung (vgl. Fig. 1d). Nach O'CONNOR⁴ sowie auch unseren eigenen Erfahrungen kann der Pufferzusatz unterbleiben und trotzdem der gleiche Trenneffekt erzielt werden. Die Arbeit von TEICHERT *et al.*² wurde in dieser kurzen Besprechung deshalb als erste aufgeführt, weil in späteren Jahren von mehreren Autoren^{4,11,13,14,20} auf die chromatographischen Bedingungen—zumindest das Fließmittel—zurückgegriffen wurde. Wenn man von der bereits erwähnten Veröffentlichung von O'CONNOR⁴ absieht, ist in keiner der in Gruppe 1 zusammengestellten Arbeiten auf Kieselgel-Schichten ein ähnlich günstiges Ergebnis erreicht worden (vgl. z.B. Fig. 1a und 1b). Eine gute Trennung wird von ŠARŠUNOVÁ UND SCHWARZ¹⁰ für das Fließmittel Chloroform-Butanol (98:2) auf Aluminiumoxid-Schichten angegeben (vgl. Fig. 1c). In den Arbeiten der Gruppen 3–5 versuchen die Autoren den Trenneffekt durch Variation des pH-Werts der Schicht oder des Fließ-

TABELLE I

ZUSAMMENSTELLUNG VON PUBLIKATIONEN ÜBER DIE DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHISCHE TREN-
NUNG VON COFFEIN, THEOPHYLLIN UND THEOBROMIN

Schicht und Fließmittel	hR _F -Werte			Literatur	
	C	T _p	T _b		
<i>Zu (1) — Kieselgel, neutrale Fließmittel</i>					
CHCl ₃ -(C ₂ H ₅) ₂ O (85:15)	35	20	40	3	
CHCl ₃ -C ₂ H ₅ OH (90:10)	57	—	22	4	
CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	50	23	26	5	
CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	51	—	26	6	
CHCl ₃ -CH ₃ OH (85:15)	64	—	46	6	
CCl ₄ -CHCl ₃ -CH ₃ OH (8:5:1)	54	46	31	8	
CCl ₄ -CHCl ₃ -CH ₃ OH (5:5:1)	—	—	—	7	
CHCl ₃ -(CH ₃) ₂ CO-CH ₃ OH (1:1:1)	50	49	44	9	
<i>Aluminiumoxid, neutrale Fließmittel</i>					
CHCl ₃ -BuOH (98:2)	54	30	15	10	
CHCl ₃ -C ₂ H ₅ OH (99:1)	100	10	10	10	
C ₆ H ₆ + x% C ₂ H ₅ OH	15	6	2	10	
	x = 5	47	8	4	
	x = 10	58	11	6	
	x = 20	75	27	19	
<i>Zu (2) — Mit Phosphatpuffer pH 6.8 imprägniertes Kieselgel, neutrale Fließmittel</i>					
CHCl ₃ -C ₂ H ₅ OH (90:10)	57	37	22	2	
CHCl ₃ -C ₂ H ₅ OH (90:10)	—	—	—	11	
<i>Zu (3) — Mit Ammoniak-Lösung klimatisiertes Kieselgel, neutrale Fließmittel</i>					
C ₆ H ₆ -(CH ₃) ₂ CO (30:70)	70	6	31	12	
CHCl ₃ -C ₂ H ₅ OH (90:10)	89	21	51	13	
CHCl ₃ -C ₂ H ₅ OH (90:10)	88	33	57	14	
Atmosphäre: H ₂ O mit BuOH gesättigt + 2.5% Ammoniak (BuOH mit H ₂ O gesätt.)	—	—	—	15	
<i>Zu (4) — Kieselgel, basische Fließmittel</i>					
(CH ₃) ₂ CO-CHCl ₃ -BuOH-25% Ammoniak (3:3:4:1)	78	26	46	16	
iPrOH-CHCl ₃ -10% wässrige Piperazinslösung (60:20:20)	80	55	67	17	
<i>Zu (5) — Kieselgel, saure Fließmittel</i>					
CH ₃ COOC ₂ H ₅ -CH ₃ OH-12 N HCl (90:10:0.25)	35	41	26	5	
CH ₃ COOC ₂ H ₅ -CH ₃ OH-CH ₃ COOH (80:10:10)	40	50	36	5	
CHCl ₃ -C ₂ H ₅ OH-HCOOH (88:10:2)	56	45	34	12	
<i>Aluminiumoxid, saure Fließmittel</i>					
BuOH-iAmOH-HCl-H ₂ O (8:2:1:20)	92	0	58	18	
<i>Zu (6) — Kieselgel, wässrige Pufferlösungen</i>					
Britton-Robinson-Puffer					
	pH 3	45	62	41	19
	pH 7	45	62	44	
	pH 10	45	62	46	
Britton-Robinson-Puffer + 0.025 M Lösung des Solubilisators					
	pH 3	50	64	52	19
	pH 7	57	74	63	
	pH 10	47	69	57	
<i>Zu (7) — Mit Phosphatpuffer pH 6.8 imprägniertes Kieselgel, saure Fließmittel</i>					
BuOH-H ₂ O-85% HCOOH (77:11:12)	—	—	—	11	
Zwei-dimensionale Entwicklung					
I. CHCl ₃ -C ₂ H ₅ OH (90:10)				20	
II. CH ₃ COOC ₂ H ₅ -CH ₃ OH-CH ₃ COOH (80:10:10)					

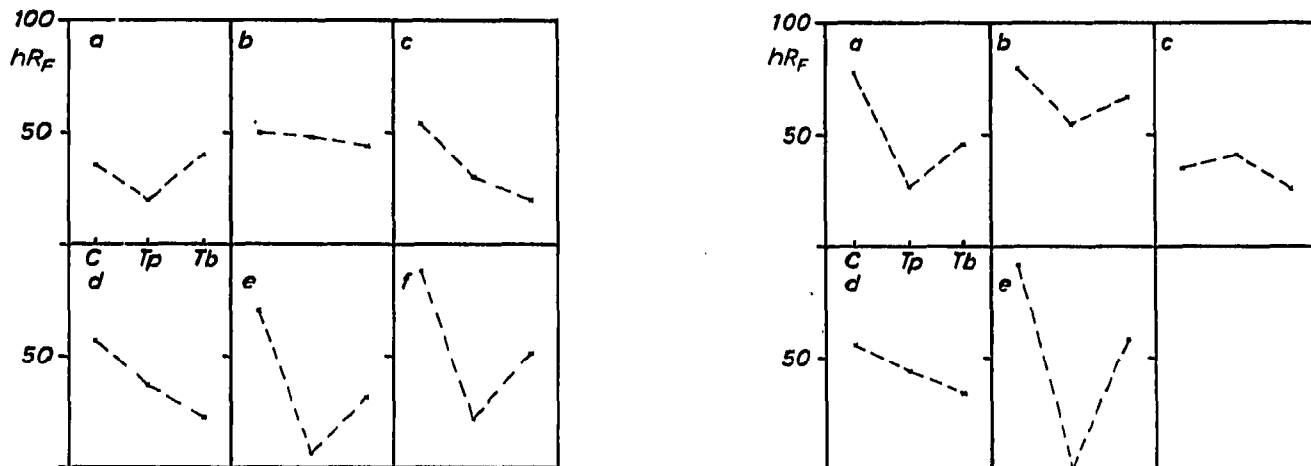


Fig. 1. Trennung von Coffein, Theophyllin und Theobromin auf Kieselgel und Aluminiumoxid. (a) Kieselgel. Fliessmittel: Chloroform-Äther (85:15)³. (b) Kieselgel. Fliessmittel: Chloroform-Aceton-Methanol (1:1:1)⁸. (c) Aluminiumoxid. Fliessmittel: Chloroform-Butanol (98:2)⁹. (d) Kieselgel mit Phosphatpuffer pH 6.8 imprägniert. Fliessmittel: Chloroform-96% Äthanol (90:10)². (e) Kieselgel. Fliessmittel: Aceton-Benzol (70:30). Entwicklung in einer Atmosphäre von 25% Ammoniak¹². (f) Kieselgel. Fliessmittel: Chloroform-96% Äthanol (90:10). Entwicklung in einer Atmosphäre von 25% Ammoniak¹³.

Fig. 2. Trennung von Coffein, Theophyllin und Theobromin auf Kieselgel und Aluminiumoxid. (a) Kieselgel. Fliessmittel: Aceton-Chloroform-*n*-Butanol-25% Ammoniaklösung (3:3:4:1)¹⁶. (b) Kieselgel. Fliessmittel: Isopropanol-Chloroform-10% wässrige Piperazinlösung (60:20:20)¹⁷. (c) Kieselgel. Fliessmittel: Äthylacetat-Methanol-12 *N* Salzsäure (90:10:0.25)⁶. (d) Kieselgel. Fliessmittel: Chloroform-Äthanol-Ameisensäure (88:10:2)¹⁸. (e) Aluminiumoxid. Fliessmittel: *n*-Butanol-Isoamylalkohol-Salzsäure-Wasser (8:2:1:20)¹⁸.

mittels zu verbessern, wohl weil die Mehrzahl der in Gruppe 1 für nicht speziell präparierte Kieselgel-Schichten angegebenen Trennungen unbefriedigend war.

Die Publikationen der Gruppe 3 beschreiben eine Klimatisierung der Trennschicht mit Ammoniak. Dazu muss gesagt werden, dass ein solcher Klimatisierungsvorgang abhängig ist von der Temperatur und Zeit sowie den speziellen Versuchsbedingungen (Kammervolumen und -form, Konzentration der Klimatisierungslösung, Form des Behälters der Klimatisierungslösung usw.). Obwohl diese Bedingungen u.U. schlecht reproduzierbar sind, wurden sie später auch für die eigenen Untersuchungen gewählt, um einen Vergleich mit den in der Literatur erwähnten Arbeiten zu ermöglichen. Die von SCHUNACK *et al.*¹² bzw. SZASZ *et al.*¹³ erzielten Trennergebnisse sind in den Fig. 1e bzw. f dargestellt. Wie aus Tabelle I hervorgeht, erhalten SZASZ *et al.*¹³ sowie auch STRUHAR UND NGUYEN THI BAN¹⁴ mit dem von TEICHERT *et al.*² verwandten Fliessmittel ähnliche Trennergebnisse mit der Reihenfolge Theophyllin, Theobromin, Coffein. Die Umkehr von Theophyllin und Theobromin bzgl. ihrer Lage im Chromatogramm gegenüber der Arbeit von TEICHERT *et al.*² wird von SZASZ *et al.*¹³ und STRUHAR *et al.*¹⁴ nicht diskutiert.

Die Arbeiten der Gruppe 4 (Lit. 16, 17) bedienen sich alkalischer Fliessmittel. Dabei resultiert dieselbe Reihenfolge der drei Substanzen im Chromatogramm (vgl. Fig. 2a und b) wie bei der Klimatisierung mit Ammoniak-Lösungen.

Mit Ausnahme der Arbeit von CHUNG-LI¹⁸ (vgl. Fig. 2e), der auf Aluminiumoxid arbeitet, ist bei den in Gruppe 5 zusammengestellten sauren Fliessmitteln eine gegenüber den basischen Systemen veränderte Reihenfolge der drei Xanthine im

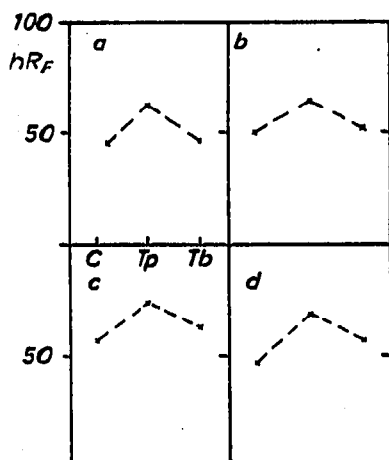


Fig. 3. Trennung von Coffein, Theophyllin und Theobromin auf Kieselgel. Entwicklung mit Britton-Robinson-Puffern verschiedener pH-Werte¹⁰: (a) pH 7, (b) pH 3, (c) pH 7 und (d) pH 10. Bei b-d Zusatz von 0,025 M Lösung von Dinatrium-naphthol-(2)-disulfonat-(6,8).

Chromatogramm festzustellen. Bei den von BAEHLER⁵ eingesetzten sauren Fließmitteln liegt Theophyllin am höchsten (vgl. Fig. 2c); SCHUNACK *et al.*¹² dagegen erzielen Trennergebnisse (vgl. Fig. 2d), die denen von TEICHERT *et al.*² (vgl. Fig. 1d) sehr ähnlich sind.

Während unserer Untersuchungen erschien eine Arbeit von STUHLIK *et al.*¹⁰. Die Autoren verwandten als Fließmittel Pufferlösungen der pH-Werte 3, 7, bzw. 10 nach BRITTON-ROBINSON²¹. Zur Verbesserung der Trennung wurde der mobilen Phase ein Solubilisator in drei verschiedenen Konzentrationen zugegeben (Dinatrium-naphthol-(2)-disulfonat-(6,8)). Eine graphische Darstellung der referierten Trennergebnisse zeigen die Fig. 3a-d. Der Übersichtlichkeit halber wurden wegen der sehr ähnlichen Trennergebnisse in Fig. 3a nur die Werte für den Puffer pH 7 wiedergegeben; entsprechend wurden in den Fig. 3b-d nur die für die niedrigste Solubilisator-Konzentration erhaltenen Werte aufgenommen, die nach den Angaben der Autoren die besten Trennergebnisse liefert. Allerdings resultiert beim Zusatz des Solubilisators nur eine unwesentliche Verbesserung der Trennung, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von KÜTTEL²² steht, wonach die Purinalkaloide nicht solubilisierbar sind.

Die vorstehende Übersicht über die Variationsmöglichkeiten, die zu einer Trennung der drei genannten Xanthinderivate führen können, zeigt die experimentelle Unsicherheit bzgl. des Einflusses der einzelnen Faktoren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Effekte des pH-Werts der Schicht nach vorheriger saurer bzw. alkalischer Klimatisierung sowie weiterhin den Einfluss des pH-Werts des Fließmittels zu untersuchen.

MATERIAL UND METHODE

Zur Chromatographie diente ein gut schliessendes 1-l Einweckglas, in das vor der Entwicklung zu den nachfolgend beschriebenen Klimatisierungsversuchen Bechergläser mit den jeweiligen Medien eingestellt wurden. Für alle Versuche mit sauren und basischen Klimatisierungsmedien wurde das neutrale und relativ unpolare Fließmittel Chloroform-96% Äthanol (99:1) verwandt, das sich in Vorversuchen als

zur Trennung der drei Xanthin-Derivate geeignet erwiesen hatte. Sorptionsmittel war jeweils Kieselgel GF₂₅₄ (Merck). Zur Einleitung des Entwicklungsvorgangs wurde die mobile Phase durch eine verschliessbare Öffnung im Kammerdeckel eingegeben. Die Laufstrecke betrug in jedem Falle 10 cm. Die Substanzen wurden in einem Gemisch von Chloroform-Methanol (60:40) gelöst. Die Konzentrationen waren wie folgt: Coffein 0.05%, Theophyllin 0.07% und Theobromin 0.03%. Es wurden davon jeweils 5 µl in Form eines 1 cm langen Startbandes aufgetragen.

Zur Sichtbarmachung wurde mit Jod-Kaliumjodid-Reagenz besprüht und mit Salzsäure nachbehandelt (3 g Jod + 1 g KJ in 100 ml Äthanol, 12.5% Salzsäure in Äthanol). Dabei werden folgende Farben erhalten: Coffein hellbraun, Theophyllin rotviolett, Theobromin blaviolett.

1. KLIMATISIERUNG MIT AMMONIAK-LÖSUNGEN

(1) Einfluss verschiedener Ammoniak-Konzentrationen

Bei Verwendung von 2.5, 5.0, 10.0, bzw. 20.0% Ammoniaklösungen betrug die Klimatisierungszeit jeweils 30 min. Die erzielten Trennergebnisse sind aus den Fig. 4a-d ersichtlich. Während die Lage des Theophyllins im Chromatogramm sich bei den verschiedenen Ammoniak-Konzentrationen nur wenig ändert, nähern sich Coffein und Theobromin mit zunehmender Konzentration an Ammoniak der Front. Wird die Klimatisierung 60 min lang durchgeführt, so tritt bei den Ammoniak-Konzentrationen 2.5% und 5% eine Schwanzbildung des Theobromins auf (vgl. Fig. 4e und f), die bei den konzentrierteren Ammoniak-Lösungen nicht beobachtet wird. Dies lässt vermuten, dass bei längerer Klimatisierung mit den verdünnteren Lösungen ein höherer Wassergehalt der Schicht resultiert. Bei den Klimatisierungen mit den konzentrierteren Ammoniak-Lösungen (vgl. Fig. 4c und d) werden ähnliche Trennergebnisse erhalten, wie sie ZARNACK UND PFEIFER¹⁶ bzw. RINK UND GEHL¹⁷ mit alkalischen Fließmitteln erzielt hatten.

(2) Einfluss der Klimatisierungszeit

Wie aus den oben beschriebenen Versuchen mit ammoniakalischer Klimatisierung und den in Abschnitt II referierten sauren Klimatisierungen sowie aus der Literaturzusammenstellung in Tabelle I hervorgeht, eignet sich für die Trennung der drei Xanthin-Derivate die Klimatisierung mit konzentrierten Ammoniak-Lösungen am besten.

Im Folgenden wurde nun die Abhängigkeit der R_F -Werte von der Klimatisierungszeit untersucht. Es wurde dazu 20% Ammoniaklösung und Zeiten von 5, 10, 15, 20 und 30 min gewählt. Wie aus den Fig. 5a-e hervorgeht, erhielten wir für Klimatisierungszeiten zwischen 20 und 30 min die besten Trennergebnisse.

Beim Vergleich der Fig. 4d und 5e fällt auf, dass trotz gleicher chromatographischer Bedingungen die Ergebnisse voneinander abweichen. Die Aufeinanderfolge im Chromatogramm bleibt zwar erhalten, jedoch treten unterschiedliche R_F -Werte auf. Dies zeigt, dass bei solchen Klimatisierungen nur eine unbefriedigende Reproduzierbarkeit erreicht werden kann.

Zur Orientierung über die pH-Werte der Schichten, die nach der Klimatisierung mit Ammoniak-Lösungen vorliegen, wurden Reihenversuche durchgeführt. Dazu wurden die Kieselgel-Schichten mit 1-25% Ammoniaklösungen 1-30 min lang kli-

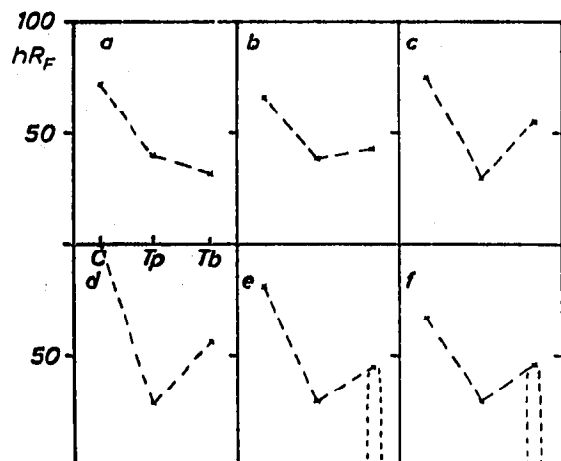


Fig. 4. Trennung von Coffein, Theophyllin und Theobromin auf Kieselgel in Abhängigkeit von der Klimatisierungszeit und der Ammoniak-Konzentration. (a) Klimatisierungszeit 30 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 2.5% Ammoniak. (b) Klimatisierungszeit 30 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 5% Ammoniak. (c) Klimatisierungszeit 30 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 10% Ammoniak. (d) Klimatisierungszeit 30 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 2.5% Ammoniak. (e) Klimatisierungszeit 20 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 20% Ammoniak. (f) Klimatisierungszeit 60 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 5% Ammoniak.

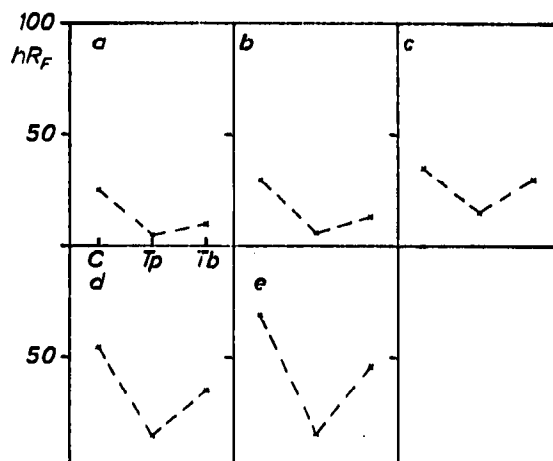


Fig. 5. Trennung von Coffein, Theophyllin und Theobromin auf Kieselgel in Abhängigkeit von der Klimatisierungszeit. Entwicklung in einer Atmosphäre von 20% Ammoniak. (a) 5 min, (b) 10 min, (c) 15 min, (d) 20 min und (e) 30 min.

matisiert, dann abgeschabt, und das Sorptionsmittel in 100 ml Wasser suspendiert. Die Suspension wurde geschüttelt, 15 min lang stehen gelassen und dann die pH-Messung durchgeführt. Die Messwerte lagen bei allen Versuchen zwischen 9.05 und 9.40. Offensichtlich sind also verschiedene Ammoniak-Konzentrationen bzw. Klimatisierungszeiten in den angegebenen Intervallen ohne Einfluss auf die resultierenden pH-Werte der Schicht.

Die bei den Klimatisierungen mit Ammoniak-Lösungen erhaltenen unterschiedlichen Trennergebnisse beruhen also nicht etwa auf verschiedenen pH-Werten, sondern müssen auf unterschiedliche Wassergehalte der Schichten zurückgeführt werden.

II. KLIMATISIERUNG MIT SÄUREN BZW. WASSER

In Analogie zu den mit sauren Fließmitteln beschriebenen Trennungen wurden

TABELLE II

ÜBERSICHT ÜBER DIE ZUR KLIMATISIERUNG BENUTZTEN SÄURELÖSUNGEN UND DIE ZUGEHÖRIGEN KLIMATISIERUNGSZEITEN

Klimatisierungsmedium	Klimatisierungszeit (min)	Fig.
25% Salzsäure	40	6a
12% Salzsäure	10	6b
10% Ameisensäure	10	6c
10% Ameisensäure	20	6d
Wasser	30	6e

die in Tabelle II zusammengestellten Säuren verschiedener Konzentration als Klimatisierungsmedien eingesetzt.

Nach der langzeitigen Klimatisierung mit konzentrierter Salzsäure bleibt Theobromin am Startpunkt, Coffein und Theophyllin haben annähernd gleiche R_F -Werte (vgl. Fig. 6a). Auch bei den Klimatisierungen mit den verdünnteren Säuren lässt sich keine befriedigende Trennung erzielen (vgl. Fig. 6 b–d). Trotz der langen Klimatisierungszeit von 40 min tritt im Falle der konzentrierten Salzsäure keine Schwanzbildung auf, die aber bei den verdünnteren Säuren schon nach kurzzeitiger Klimatisierung beobachtet wird. Auch hier lag die Vermutung nahe, dass bei der Klimatisierung mit den verdünnteren Säuren ein höherer Wassergehalt der Schicht vorliegt. Tatsächlich zeigt das bei einer Klimatisierung mit Wasser resultierende Chromatogramm (Fig. 6e) sogar ein den Chromatogrammen der Klimatisierungen mit verdünnten Säuren sehr ähnliches Trennergebnis mit gleicher Reihenfolge der Substanzen und nur wenig verschiedenen R_F -Werten.

Es werden für die Chromatogramme bei ammoniakalischer im Vergleich zu saurer Klimatisierung (vgl. Fig. 4a–f mit Fig. 6a–d) verschiedene Reihenfolgen der Xanthine erhalten. Die Aufeinanderfolge im Chromatogramm wird ausserdem vom Wassergehalt der Schicht beeinflusst (vgl. Fig. 4a mit 4b–f bzw. Fig. 6a mit 6b–d).

III. PUFFERLÖSUNGEN ALS MOBILE PHASEN

In Anlehnung an die Arbeit von STUHLIK *et al.*¹⁰ wurden zur Klärung des Zusammenhangs zwischen dem pH-Wert des Fliessmittels und dem Trennergebnis

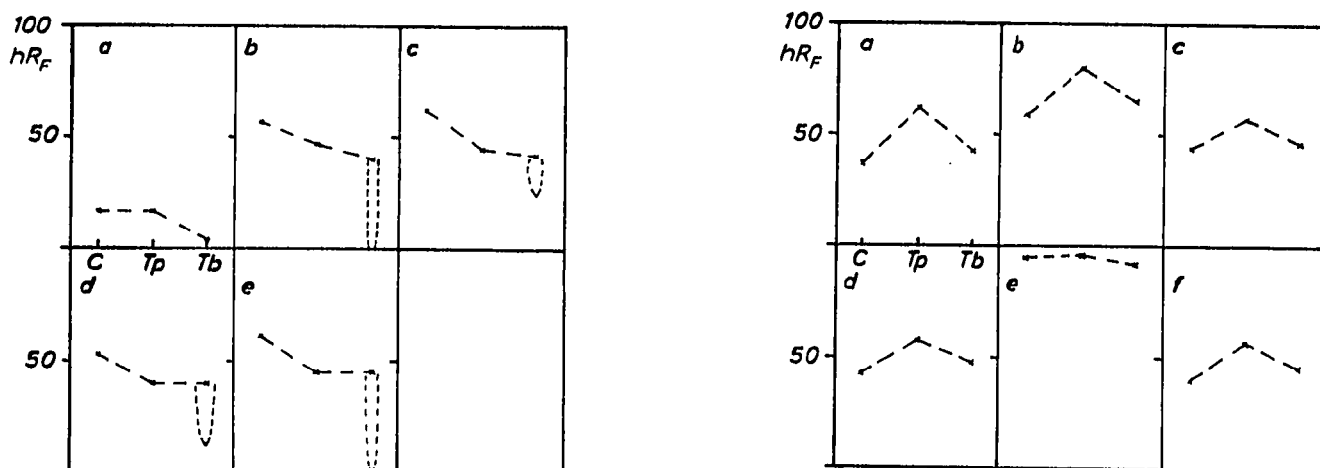


Fig. 6. Trennung von Coffein, Theophyllin und Theobromin auf Kieselgel in Abhängigkeit von der Klimatisierungszeit und der Säurekonzentration. (a) Klimatisierungszeit 40 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 25% Salzsäure. (b) Klimatisierungszeit 10 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 12% Salzsäure. (c) Klimatisierungszeit 10 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 10% Ameisensäure. (d) Klimatisierungszeit 20 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von 10% Ameisensäure. (e) Klimatisierungszeit 30 min. Entwicklung in einer Atmosphäre von dest. Wasser.

Fig. 7. Trennung von Coffein, Theophyllin und Theobromin auf Kieselgel mit Puffern verschiedener pH-Werte als Fliessmittel. (a) pH 3.6, (b) pH 3.8, (c) pH 4.15, (d) pH 9.99, (e) pH 10.05 und (f) pH 11.4.

TABELLE III

ZUSAMMENSTELLUNG DER ALS FLIESSMITTEL VERWANDTEN PUFFERLÖSUNGEN

pH	Zusammensetzung des Puffers	Literatur
3.6	3.920 g Phosphorsäure, 2.474 g Phenyllessigsäure und 5.446 g Borsäure mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen. Davon 100 ml mit 90 ml 0.2 N Natronlauge versetzen	21
3.8	300 ml dest. Wasser + 210 ml Ameisensäure + 100 g Ammoniumchlorid mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt	Ph. Gall. VIII
4.15	200 ml 0.2 N Natronlauge + 800 ml eines Gemisches von gleichen Teilen 0.25 M Borsäure, Essigsäure und Phosphorsäure	21
9.9	19.1 g Natriumborat und 100 ml 1 N Natronlauge, mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen. Davon 60 ml mit 40 ml 0.1 N Salzsäure versetzen	21
10.05	54 g Ammoniumchlorid + 440 ml 20% Ammoniak-Lösung mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen	Ph. Gall. VIII
11.4	21.008 g Citronensäure und 200 ml 1 N Natronlauge mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen. Davon 50 ml mit 50 ml 0.1 N Salzsäure versetzen	21

sechs Pufferlösungen im pH-Bereich zwischen 3.6 und 11.4 als Fließmittel eingesetzt. Die Tabelle III gibt Aufschluss über die Zusammensetzung der einzelnen Pufferlösungen.

Wie aus den Fig. 7a-f und auch aus den Arbeiten von STUHLIK *et al.*¹⁰ (vgl. Fig. 3a-d) hervorgeht treten also bei der Verwendung saurer und alkalischer wässriger Pufferlösungen ähnliche Trenneffekte bzgl. der Reihenfolge der Substanzen im Chromatogramm auf. Es lässt sich also keine Beziehung zwischen dem pH-Wert der Puffer, wenn sie als Fließmittel dienen, und dem chromatographischen Verhalten feststellen. Im vorliegenden Falle wird das chromatographische Verhalten von der Zusammensetzung der einzelnen Puffer, die die Löslichkeit der Komponenten beeinflusst, bestimmt. Dafür spricht das in Fig. 7e wiedergegebene Ergebnis der Entwicklung mit dem Ammoniak-Puffer pH 10.05, da ein Ammoniakzusatz die Löslichkeit der drei Xanthine erhöht²³.

SCHLUSSBETRACHTUNG

Wie aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht, wird die Trennung der drei Xanthine von zwei Faktoren bestimmt: Einmal vom pH-Wert und zum anderen vom Wassergehalt der stationären Phase.

Will man Untersuchungen über den ausschliesslichen Einfluss des pH-Wertes der Schicht auf den Trenneffekt anstellen, so muss nach den Erfahrungen der referierten Arbeiten und der eigenen Versuche das Einbringen von Wasser in die Kammer vermieden werden. Solche Untersuchungen lassen sich bei Einhaltung einer konstanten relativen Feuchte auf pH-Gradient-Schichten durchführen; dies ist Gegenstand unserer zweiten Mitteilung, während der Einfluss des Wassergehaltes der Schicht in der dritten Mitteilung behandelt werden soll.

ZUSAMMENFASSUNG

In einer Übersicht werden die Arbeiten zur Dünnschichtchromatographie von Coffein, Theophyllin und Theobromin nach den verschiedenen chromatographischen Bedingungen gegliedert und die referierten Ergebnisse kurz diskutiert. Im Anschluss daran wurden systematische Untersuchungen der Effekte des pH-Wertes der Schicht nach vorheriger Klimatisierung mit Ammoniak- oder Säurelösungen sowie über den Einfluss des pH-Wertes der mobilen Phase beschrieben.

LITERATUR

- 1 J. P. COMER UND J. COMER, *J. Pharm. Sci.*, 56 (1967) 413.
- 2 K. TEICHERT, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 100 (1960) 283.
- 3 G. MACHATA, *Mikrochim. Acta*, (1960) 1, 79.
- 4 R. O'CONNOR, *J. Chem. Educ.*, 42 (1965) 492.
- 5 B. BAEHLER, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1961) 382.
- 6 F. WARTMANN-HAFNER, *Pharm. Acta Helv.*, 41 (1966) 406.
- 7 W. KAMP, W. J. M. ONDERBERG UND W. A. SETERS, *Pharm. Weekblad*, 98 (1963) 993.
- 8 U. M. SENANAYAKE UND R. O. B. WIJESEKERA, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 75.
- 9 G. L. SZENDEY, *Arch. Pharm.*, 299 (1966) 527.
- 10 M. ŠARŠUNOVÁ UND V. SCHWARZ, *Pharmazie*, 18 (1963) 207.
- 11 C. FRANZKE, K. S. GRUNERT, U. HILDEBRANDT UND H. GRIEHL, *Z. Physiol. Chem.*, 348 (1967) 1725.
- 12 W. SCHUNACK, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 105 (1965) 1551.
- 13 G. SZASZ, N. SZASZ-ZACSKO UND V. POLANKAY, *Acta Pharm. Hung.*, 35 (1965) 207; *C.A.*, 63 (1965) 14637f.
- 14 M. STRUHAR UND NGUYEN THI BAN, *Farm. Obzor*, 26 (1967) 549.
- 15 J. O. CERRI UND G. MAFFI, *Boll. Chim. Farm.*, 100 (1961) 951.
- 16 J. ZARNACK UND S. PFEIFER, *Pharmazie*, 19 (1964) 216.
- 17 M. RINK UND A. GEHL, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 143.
- 18 CHUNG-LI, *Hua Hsueh Hsueh Pao*, 31 (1965) 518; *C.A.*, 64 (1966) 11837d.
- 19 M. STUHLIK, J. CSIBA UND L. KRASNEC, *Česk. Farm.*, 18 (1969) 91.
- 20 G. LEHMANN UND P. MARTINOD, *Arzneimittel-Forsch.*, 17 (1967) 35.
- 21 LANDOLT-BÖRNSTEIN: *Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik*. 6. Aufl., II. Band, 7. Teil. *Elektrische Eigenschaften*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1960.
- 22 D. KÜTTEL, *Pharm. Zentralhalle*, 107 (1968) 593.
- 23 L. EKKERT, *Erkennung organischer Verbindungen, im besonderen von Arzneimitteln*, Enko-Verlag, Stuttgart, 1933.