

CHROM. 4668

Dünnschichtchromatographische Trennung von Aflatoxinen auf Kieselgel-Fertigplatten

Bei den üblichen Nachweisverfahren werden die Aflatoxine (toxische Stoffwechselprodukte von *Aspergillus flavus* und verwandten Schimmelpilzen¹) auf Kieselgel-Platten dünn-schichtchromatographisch getrennt. Für Routineuntersuchungen in kleinen Laboratorien ist die Herstellung der erforderlichen Kieselgel-Platten zu zeitraubend und kostspielig. Es wurde daher die Brauchbarkeit von fünf gebrauchsfertigen Kieselgel-Platten bei verschiedenen Steigmitteln vergleichend untersucht. Über die Verwendung solcher Platten wurde bereits von anderen Autoren^{2,3} berichtet.

Material und Methodik

Verwendete Kieselgel-Fertigplatten. Die Tabelle I gibt eine kurze Beschreibung der untersuchten Fertigplatten. Die Dicke der Kieselgel-Schicht beträgt 0.2 mm (Platten 1, 2, 3, 5) und 0.25 mm (Platte 4).

Steigmittel. Folgende Steigmittel wurden verwendet: (a) Methanol-Chloroform (1.1:98.9)², (b) Methanol-Chloroform (1.5:98.5)⁴, (c) Methanol-Chloroform (3:97)^{3,5,6}, (d) Methanol-Chloroform (5:95)^{7,8}, (e) Methanol-Chloroform (7:93)^{8,9}, (f) Methanol-Chloroform (9:91)^{10,11}, (g) Aceton-Chloroform (1:9)¹²⁻¹⁴, (h) Benzol-Äthanol-Wasser (Oberphase) (46:35:19)^{15,16}, (i) Benzol-Methanol-Eisessig (48:4:2)¹⁷, (k) Methanol-Eisessig-Benzol (5:5:90)¹⁵, (l) Toluol-Äthylacetat-Ameisensäure (5:4:1)¹⁷, (m) Benzol-Äthylacetat-Ameisensäure (5:4:1)¹⁸ und (n) Äthylacetat-10% NH₄OH (Oberphase) (1:1)¹⁸.

Durchführung der Vergleichsuntersuchungen. Auf entsprechende Zuschnitte der einzelnen Streifen wurden 0.001 ml einer Standard-Aflatoxin-Lösung (0.02% B₁ und 0.0038% G₁ in Chloroform; C. Roth, Karlsruhe, B.R.D.) aufgetragen. Die Entwicklung wurde bei 20-22° in Tanks durchgeführt, die mit Filtrierpapier ausgekleidet waren und an jedem Tag mit neuem Steigmittel beschickt wurden. Die fluoreszieren-

TABELLE I

BESCHREIBUNG DER UNTERSUCHTEN FERTIGPLATTEN

Nr	Hersteller	Bezeichnung der Platten	Tragermaterial
1	Macherey, Nagel & Co., Düren (B.R.D.)	Polygram Sil N-HR	Polyterephthal-säureester
2	Eastman Kodak Co., Rochester, N. Y. (U.S.A.)	Eastman Chromagram K 301 V	Polyäthylen-terephthalat
3	Riedel-de Haën A.G., Seelze (B.R.D.)	DC-Karte SI	Aluminium
4	E. Merck A.G., Darmstadt (B.R.D.)	DC-Alufolie Kieselgel (Artikel-Nr. 5553)	Aluminium
5	M. Woelm, Eschwege (B.R.D.)	DC-Folie Woelm Kieselgel	Aluminium

den Flecke wurden unter langwelligem UV-Licht (Blak-Ray, UVL-21; Hormuth-Vetter, Heidelberg, B.R.D.) lokalisiert.

Beobachtungen

Aktivierete (30 min/105°) und nicht aktivierte Platten reagierten gleichartig, weswegen im folgenden die Beobachtungen an den nicht aktivierten Platten beschrieben werden sollen.

Platten 1 und 2. Die Aflatoxine werden getrennt durch die Steigmittel (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) und (n), nur unzulänglich durch (h), (i), (l) und (m), überhaupt nicht durch (k). Innerhalb der Reihe (a)–(f) steigen die R_F -Werte mit zunehmendem Methanol-Gehalt.

Platten 3 und 4. Bei Einsatz der Steigmittel (c), (d), (e), (f), (h) und (n) wandern die Aflatoxine vom Startpunkt weg, erreichen allerdings nur geringe R_F -Werte und können nur als kompakte Flecke lokalisiert werden, d.h. B_1 und G_1 trennen sich nicht voneinander. Bei (a), (b), (g), (k), (l) und (m) bleiben die Aflatoxine am Auftragsort. Das Verhalten bei (i) wurde nicht untersucht.

Platte 5. Lediglich bei Steigmittel (n) legen die Aflatoxine einen geringen Weg zurück, werden jedoch nicht aufgetrennt. Bei Verwendung der übrigen Fließmittel bleiben die Substanzen am Startpunkt.

Diskussion

Das Trägermaterial der Kieselgel-Schicht sowie das Steigmittel beeinflussen Wanderung und Auftrennung des Aflatoxin-Gemisches. Während bei Kunststoff-Folien als Unterlage (Platten 1 und 2) die Aflatoxine wandern, bleiben sie bei Aluminiumfolien-Unterlage (Platten 3–5) meist ganz am Startpunkt zurück. Als Ursache ist hierfür wohl eine spezifische Beeinflussung des Kieselgels durch das Metallgitter des Aluminiums zu nennen, wodurch die Wanderung der Aflatoxine verhindert wird. Platte 1 besitzt einen stärkeren Trenneffekt als Platte 2, ausserdem ist auf der ersten Platte im UV-Licht der Kontrast zwischen Kieselgel und schwachen Aflatoxin-Flecken deutlicher als bei Platte 2, was wohl auf Unterschiede in den einzelnen Kieselgel-Typen beruht. Die Polygram Sil N-HR-Fertigplatte (Macherey, Nagel & Co.) kann daher zur Auftrennung von Aflatoxinen empfohlen werden.

Als Steigmittel können alle untersuchten Kombinationen von Methanol und Chloroform (a–f) verwendet werden; wegen eines gering besseren Trenneffektes ist Methanol-Chloroform (3:97) vorzuziehen. Mit diesem Gemisch konnten auf Platte 1 für Aflatoxin B_1 ein R_F -Wert von 0.49, für G_1 ein solcher von 0.40 ermittelt werden. Die ursprünglich für die Identifizierung von Ochratoxinen entwickelten Steigmittel (i), (k) und (l) sind für die Trennung von Aflatoxinen unter den vorliegenden Bedingungen unbrauchbar.

Mikrobiologisches Laboratorium
der Grahamhaus Studt K.G.,
6550 Bad Kreuznach (B.R.D.)

JÜRGEN REISS

- 1 J. REISS, *Z. Allgem. Mikrobiol.*, 8 (1968) 303.
- 2 J. P. PETIT, *Rev. Elevage Méd. Vét. Pays Trop.*, 19 (1966) 87.
- 3 L. J. DENAULT UND L. A. UNDERKOFER, *Cereal Chem.*, 44 (1967) 1.
- 4 J. H. BROADBENT, J. A. CORNELIUS UND G. SHONE, *Analyst*, 88 (1963) 214.

- 5 J. A. ROBERTSON, JR., L. S. LEE, A. F. CUCULLU UND L. A. GOLDBLATT, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42 (1965) 467.
- 6 W. A. PONS, JR. UND L. A. GOLDBLATT, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42 (1965) 471.
- 7 T. J. COOMES, P. C. GROWTHER, B. J. FRANCIS UND L. STEVENS, *Analyst*, 90 (1965) 492.
- 8 O. L. SHOTWELL, G. M. SHANNON, M. L. GOULDEN, M. S. MILBURN UND H. H. HALL, *Cereal Chem.*, 45 (1968) 236.
- 9 Anonymus, *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 49 (1966) 229.
- 10 S. STREZLECK UND L. KOGAN, *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 49 (1966) 33.
- 11 H. K. FRANK, *Arch. Lebensmittelhyg.*, 17 (1966) 237.
- 12 R. H. ENGBRECHT, J. L. AYRES UND R. O. SINNHUBER, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 48 (1965) 815.
- 13 R. M. EPPLEY, *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 49 (1966) 473.
- 14 E. V. CRISAN, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 24 (1968) 37.
- 15 P. M. SCOTT, W. VAN WALBEEK UND J. FORGACS, *Appl Microbiol.*, 15 (1967) 945.
- 16 L. STOLOFF, A. GRAFF UND H. RICH, *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 49 (1966) 740.
- 17 P. M. SCOTT UND T. B. HAND, *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 50 (1967) 366.
- 18 H. K. FRANK UND W. EYRICH, *Z. Lebensm. Untersuch.-Forsch.*, 138 (1968) 1.

Eingegangen am 5. Januar 1970; geänderte Fassung am 12. Februar 1970

J. Chromatog., 49 (1970) 301-303

CHROM. 4663

Specific gas chromatographic determination of amitriptyline in human urine following therapeutic doses

The tricyclic antidepressant amitriptyline is widely prescribed in the treatment of mental disease. Spectrophotometric methods for the analysis of amitriptyline in blood and urine have been described¹⁻³, but these do not differentiate the parent drug from its demethylated metabolite, nortriptyline. Other spectrophotometric procedures, involving prior separation of these compounds by thin-layer chromatography^{4,5} are prohibitively time-consuming. Further, these methods are insensitive in the concentration range encountered after therapeutic dosage.

HUCKER AND MILLER⁶ have reported the gas chromatographic separation of amitriptyline and several related tertiary amines after exhaustive methylation to the corresponding olefinic derivative. The formation of a common product by amitriptyline and nortriptyline mitigates against the application of such a procedure to biological studies.

The present paper describes a gas-liquid chromatographic procedure for the separation of several tricyclic antidepressants and its application to the determination of therapeutic levels of amitriptyline in human urine.

Experimental

Reagents. The following reagents were used: Analar petroleum spirit (40-60°) (Hopkin & Williams Ltd., Chadwell Heath, Essex) purified by re-distillation; 1 N sulphuric acid and 2 N sodium hydroxide washed with re-distilled petroleum spirit; anhydrous sodium sulphate (Analar). The internal standard was a 0.15 mg% solution of triphenylamine (Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, Bucks.) in re-distilled petroleum spirit.

Gas chromatography. A Pye 104 Model 24 dual column gas chromatograph,

J. Chromatog., 49 (1970) 303-307