

CHROM. 6080

## VOLLAUTOMATISCH ARBEITENDES PROBENAUFTRAGGERÄT FÜR DÜNNSCHICHT- UND PAPIERCHROMATOGRAPHIE

GERHARD KASANG UND HEINZ REMBOLD

*Max-Planck-Institut für Biochemie, München (B.R.D.)*

(Eingegangen am 6. März 1972)

---

### SUMMARY

#### *A fully automatic sample applicator for thin-layer and paper chromatography*

A fully automatic sample applicator for thin-layer and paper chromatography is described. This apparatus permits the application of sample solutions in the range of 10  $\mu$ l to 4 ml in the form of thin lines. A strong drying effect is achieved by the special construction of the spray system; no clubshaped thickenings in the lines are produced. A simple glass sprayer makes the routine use of radioactive isotopes possible.

---

### EINLEITUNG

Im folgenden wird ein vollautomatisch arbeitendes Probenauftraggerät beschrieben, mit dem man Substanzlösungen strichförmig auf Dünnschichtplatten und -folien, Papier- und Gelstreifen aufsprühen kann.

Die Trennschärfe eines Chromatogramms ist auf die Qualität des Trägermaterials, die Chromatographiemethode, und nicht zuletzt auf die Auftragtechnik zurückzuführen. Erfahrungsgemäss lassen sich strichförmig aufgetragene Substanzlösungen besser als punktförmig aufgetragene trennen und quantitativ auswerten<sup>1</sup>. Häufig ist nach strichförmigem Auftragen die Schwanzbildung und die Überlappung aneinandergrenzender Banden nach dem Chromatographieren nicht so ausgeprägt wie nach punktförmigem Auftragen.

### STAND DER TECHNIK

Gleichmässiges strichförmiges Auftragen von Proben ist nur maschinell möglich. Aus diesem Grunde wurden in der Vergangenheit viele Versuche unternommen, halb- und vollautomatisch funktionierende Geräte zu konstruieren. Alle bisher bekannten Auftragsvorrichtungen lassen sich in eine der folgenden vier Gruppen einordnen.

#### *Auftragen in Tropfenform*

Durch eine halbautomatische Aneinanderreihung<sup>2,3</sup> von Tropfen gelingt es, einen Strich auf dem Träger zu erzeugen. Obwohl die maschinellen Auftropfungen gleichmässiger als die von Hand sind, zeigen doch die meisten Chromatogramme die bereits erwähnten Nachteile des punktförmigen Auftragens. Diese Auftropfmetho-

### *Auftragen durch direkten Kontakt*

Die einfachsten Auftragshilfen zum strichförmigen Applizieren sind Pipetten, Kapillarröhrchen, Kanülen und feine Pinsel. Je nach der Beschaffenheit des Trägermaterials werden die Dünnschichten durch den direkten Kontakt mit diesen Auftragshilfen mehr oder weniger stark beschädigt. Einfache Geräte zum strichförmigen Auftragen kleiner Substanzmengen mit Kunststoffkapillaren<sup>4</sup>, Wattestiften<sup>5</sup>, oder Filzstiften haben sich bei präparativen Arbeiten nur begrenzt bewährt.

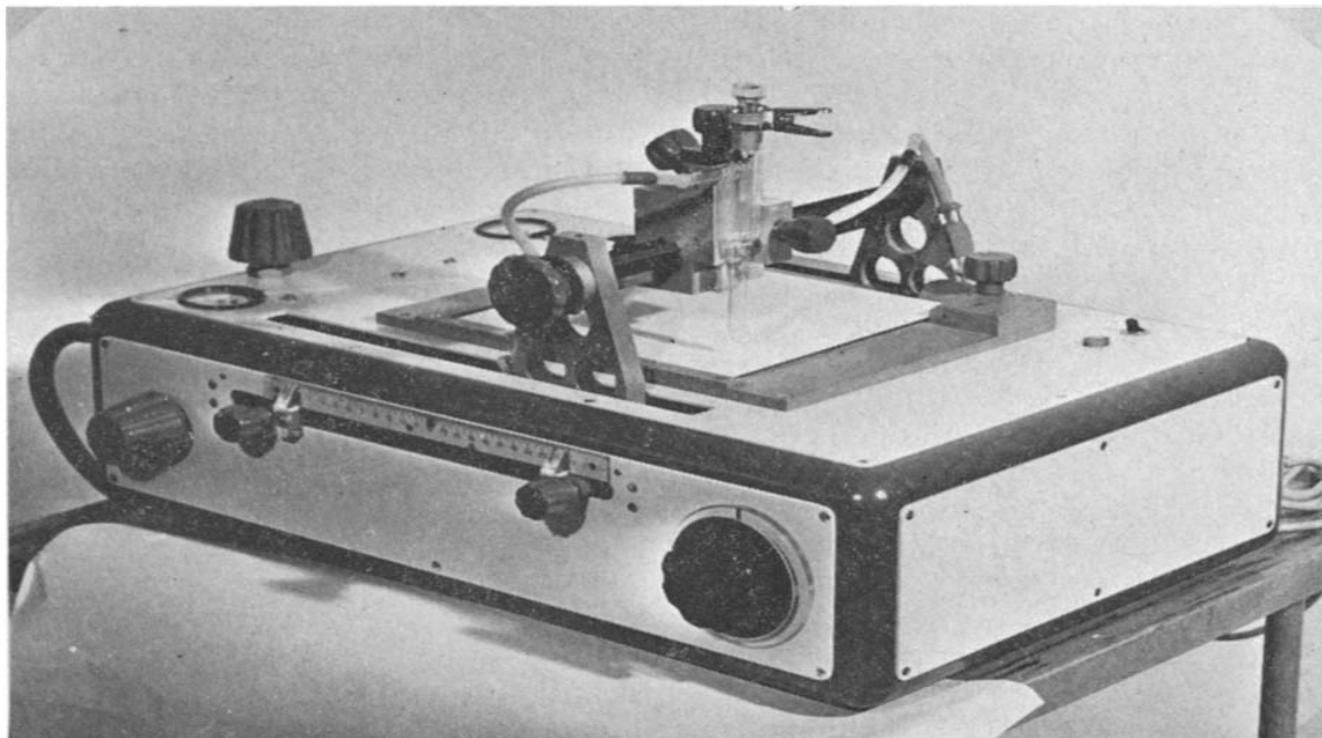
### *Aufspritzen*

Geräte zum Aufspritzen<sup>6</sup> von Substanzlösungen für die DC sind seit langem bekannt. Nach diesem Prinzip funktionieren z.B. die von Firmenich konstruierten "Chromatocharger"<sup>7</sup>. Andere halbautomatische Auftraggeräte nach dem "Delfter System"<sup>8</sup> wurden speziell für die präparative DC unter der Bezeichnung "TNO-Delft-System"<sup>9</sup> weiterentwickelt. Den letzten Stand dieser Aufspritztechnik verkörpert der von Desaga konstruierte "Autoliner"<sup>10</sup>.

Obwohl die neueren nach der Aufspritzmethode funktionierenden Geräte ein gleichmäßigeres Auftragen als von Hand ermöglichen, gibt es auch bei diesen Geräten noch Mängel, wie z.B. das Verstopfen von Kanülen oder deren Kontamination bei Verwendung radioaktiver Stoffe, Keulenbildungen an den Strichenden, und ganz besonders die Strichverbreiterung beim Auftragen grösserer Volumina polarer oder wenig flüchtiger Lösungsmittel.

### *Aufsprühen*

Das erste wertvolle Auftraggerät zum strichförmigen Aufsprühen von Substanzlösungen stammt von COLEMAN<sup>11</sup>. Ein automatisches Auftraggerät mit einer Mikro-



sprühpistole wurde von WÄSSLE UND SANDHOFF<sup>1</sup> für die analytische DC konstruiert. Eine Weiterentwicklung dieses Gerätes ist der "Linomat"<sup>12</sup> von CAMAG. Mit diesem Modell gelingt es, kleine und grosse Volumina bis zu einigen Millilitern vollautomatisch in Form von Strichen aufzusprühen.

Da bei dem "Linomat" nur zwei Strichlängen einzustellen sind, beim Auftragen grösserer Volumina stets keulenförmige Verdickungen an den Strichenden entstehen und bei der Verwendung von radioaktiven Stoffen die Sprüher sehr schnell kontaminiert wurden, wurde von uns ein vollautomatisches Auftraggerät (Fig. 1) mit einem neuartigen Sprühsystem und vielen wesentlichen Verbesserungen konstruiert. Patent- und Gebrauchsmusterschutz wurden für dieses Gerät angemeldet.

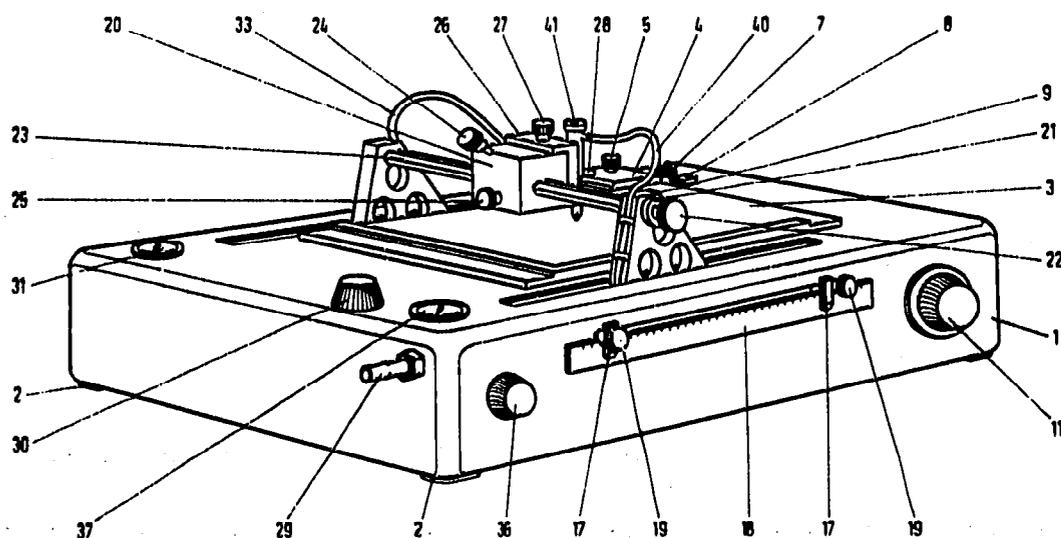


Fig. 2. Schematische Darstellung des Probenauftraggeräts (perspektivische Ansicht). Erläuterung siehe Konstruktionsbeschreibung.

### KONSTRUKTIONSBESCHREIBUNG

Aus der schematischen Darstellung der Fig. 2-5 ist die Konstruktion der Probenauftragvorrichtung zu ersehen. Auf dem Gehäuse (1) mit den Gehäusefüssen (2) ist der Arbeitstisch (3) für die DC-Platte montiert. Die DC-Platte lässt sich mit der Festklemmvorrichtung (4) und dem Griff (5) schnell und sicher befestigen. In dem Schaltkasten (6) befinden sich der Netzschalter (7) und die Kontrolllampe (8). Der automatische Arbeitsschlitten (9) wird über den Gleichstrommotor (10), die Antriebsseile (12), und die Seilrollen (13) angetrieben und seine Geschwindigkeit mit dem Regeltransformator (11) eingestellt und reguliert. Die Festklemmschraube (14) dient der Befestigung und dem Spannen der Antriebsseile (12). Die weitgehend reibungslose und gerichtete Bewegung des automatischen Arbeitsschlittens wird durch die Schlittenrollen (15) und die Schlittenführung (16) gewährleistet. Die Strichlänge kann mit Hilfe des Masstabes (18) und durch den Anschlag (17) mit seinen Feststellschrauben (19) festgelegt werden. Der Horizontalschlitten (20) mit dem Schwenkanschlag (21) und dem Schwenkgriff (22) wird durch den Verstellknopf (24) von Hand auf dem Gehäusende (23) bewegt und an der gewünschten Stelle mit der Feststellschraube (25)

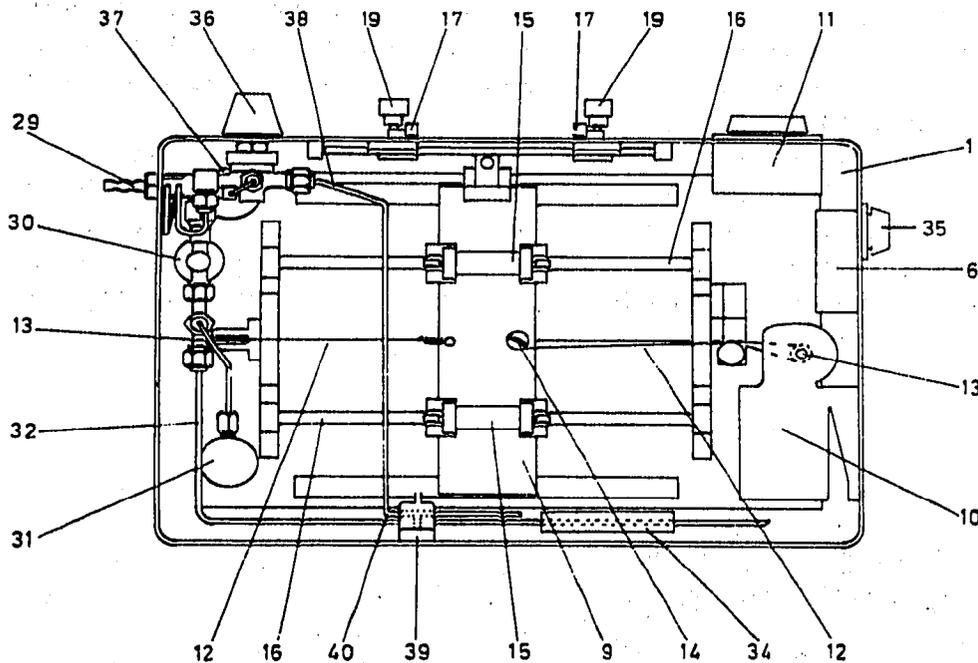


Fig. 3. Schematische Darstellung des Probenaufraggeräts (Ansicht von unten). Erläuterung siehe Konstruktionsbeschreibung.

und Betätigen der Feststellschraube (28) der Sprüher in einer bestimmten Entfernung von der DC-Platte befestigt werden.

Die Probenaufragvorrichtung wird über den Anschlussstutzen (29) an das Treibgassystem angeschlossen. Mit dem Primärtreibgasregler (30) und dem Manometer (31) wird der erforderliche Treibgasdruck eingestellt, das Treibgas durch das entsprechende Druckrohr (32) über einen Druckschlauch (33) durch die Heizpatrone (34) geleitet und bei Bedarf erhitzt. Der Regelwiderstand (35) sorgt für das Aufheizen der Heizpatrone und damit für die Temperatur des Primärtreibgases. Über den Sekundärtreibgasregler (36), das zugehörige Manometer (37), das Druckrohr (38), das Dreiwegmagnetschnellschaltventil (39) und den Druckschlauch (40) wird das Sekundärtreibgas dem Sprüher (41) zugeführt.

Der Sprüher (41) (Fig. 4) besteht aus einem zylindrischen Sprührohr aus Glas. Das Primärtreibgas tritt durch den Stutzen (42) in das Sprührohr ein und durch die Düse (43) und den Lochkranz (44) aus. In "Sprühstellung" wird die in dem Vorratsbehälter (45) befindliche Substanzlösung von dem Sekundärtreibgas, das über den Stutzen (46) eintritt, durch die Kapillare (47) ausgetrieben und versprüht. Das Sprührohr ist mit einem Stopfen (48) fest verschlossen.

Die elektrischen Schaltungen des Auftraggerätes werden durch die Schaltskizze (Fig. 5) verdeutlicht. Das Leitersystem besteht aus dem Aussenleiter R, dem Mittelpunktleiter Mp und dem Schutzleiter Sl. Der Stromanzeige dient die Kontrollampe (Signallampe) Si. Der Wechselstrom wird für den Gleichstrom-Nebenschluss-Motor M (10) mit den Gleichrichtern Gl gleichgerichtet und durch den Regeltransformator Tr (11) transformiert. Über die Relais Cl und die Endschalter e werden der Motor M

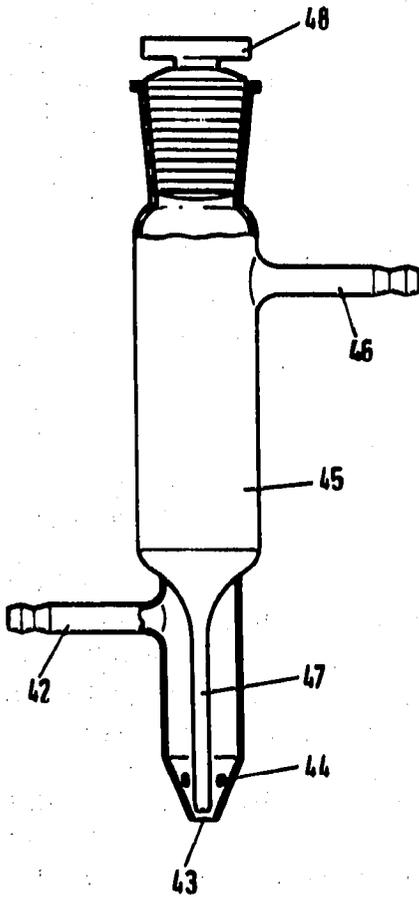


Fig. 4. Schematische Darstellung des Sprüher. Erläuterung siehe Konstruktionsbeschreibung.

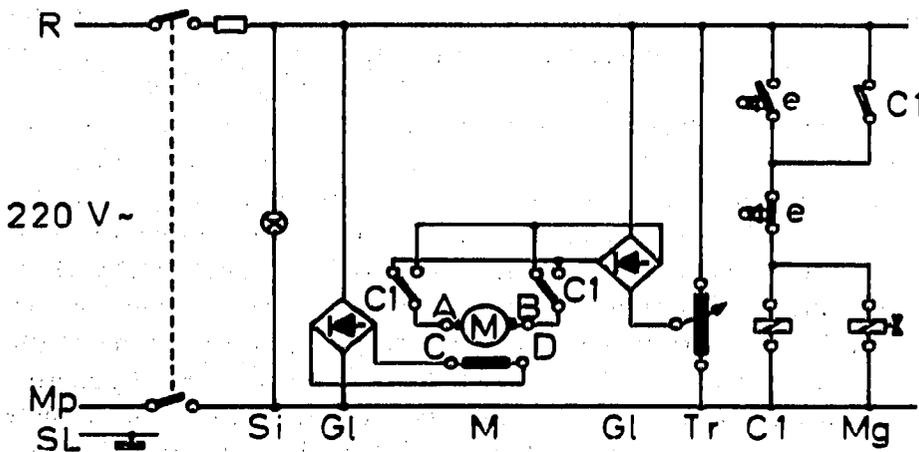


Fig. 5. Elektrische Schaltskizze. Erläuterung siehe Konstruktionsbeschreibung.

ARBEITSWEISE

Die DC-Platte wird auf dem Arbeitstisch (3) mit der Festklemmvorrichtung (4) befestigt. Das Gerät wird durch einen Stecker an das Wechselstromnetz geschlossen

(8) zeigt an, ob das elektrische System unter Strom steht. Dann wird mit dem Regeltransformator (11) der einwandfreie Transport des automatischen Arbeitsschlittens (9) überprüft. Mit Hilfe des Massstabes (18) und der Festklemmschrauben (19) für den verstellbaren Anschlag (17) kann man die gewünschte Strichlänge einstellen. Die Strichbreite ist abhängig von der Geschwindigkeit des automatischen Arbeitsschlittens (9), von der Zusammensetzung des Lösungsmittels, und nicht zuletzt von dem Überdruck der Treibgase.

Bevor der Sprüher (41) mit der Substanzlösung gefüllt wird, ist das Treibgas-system über ein Reduzierventil, dessen Druck nicht mehr als 4 atm aufweisen soll, an den Anschlussstutzen (29) anzuschliessen. Mit dem Primärtreibgasregler wird der Druck des Primärtreibgases eingestellt und das Gas über das Druckrohr (32), die Heizpatrone (34) und den Druckschlauch (33) dem Sprüher (41) zugeführt. Der Überdruck des Primärtreibgases soll im allgemeinen 1.5 atm, der des Sekundärtreibgases 0.5 atm nicht übersteigen. Die Substanzlösung wird mit einer Pipette von oben in den Vorratsbehälter (45) des Sprüher (41) eingefüllt und dieser mit einem Schliffstopfen (48) fest verschlossen.

Bevor der automatische Arbeitsschlitten (9) in Bewegung gesetzt wird, richtet man mit Hilfe des Horizontalschlittens (20) und des Vertikalschlittens (26) den Sprüher (41) auf die vorgesehene Startbahn aus. Mit dem stufenlos regelbaren Transformator (11) kann man die gewünschten Geschwindigkeiten für den automatischen Schlitten (9) einstellen. Die elektrische Schaltung ist so konstruiert, dass bei Berührung des Anschlags (17) der automatische Schlitten (9) in die entgegengesetzte Richtung umkehrt. Steht das Sekundärtreibgassystem unter leichtem Überdruck und ist das Magnetventil (39) nach aussen geschlossen, wird je nach Austrittsgeschwindigkeit und Überdruck der Treibgase die Substanzlösung als feiner Strahl auf die Platte gesprüht. Schlägt der automatische Schlitten (9) an dem verstellbaren Anschlag (17) an, kehrt der automatische Schlitten (9) seine Bewegungsrichtung um und öffnet über ein Relais das Magnetschnellschaltventil (39) nach aussen. Damit fällt der Überdruck im Sekundärtreibgassystem schlagartig ab und der Sprüher (41) hört auf zu sprühen.

Das Sprührohr ist so konstruiert, dass die Kapillare (47) etwa 1 mm über der an der Spitze befindlichen Sprühöffnung (Düse) (43) endet und bei Unterbrechung des Sekundärtreibgasstromes der Primärtreibgasstrom die Substanzlösung aus der Kapillare (47) in den Vorratsbehälter (45) zurückdrückt. Durch diesen Vorgang wird ein Abtropfen von Substanzlösung und Verstopfen der Kapillare (47) verhindert. Da der Primärtreibgasstrom ununterbrochen fliesst, wird bei jedem Umschaltvorgang aus dem "Sprühvorgang" ein "Trockenvorgang" oder umgekehrt. Durch die Düse (43) und den Lochkranz (44) tritt je nach Überdruck so viel Primärtreibgas aus, dass ein relativ hoher Trocknungseffekt erzielt wird. Bei polaren und nicht sehr flüchtigen Lösungsmitteln kann der Trocknungseffekt durch Erwärmen des Primärtreibgases noch weiter gesteigert werden.

#### ANWENDUNG

Das Probenauftraggerät eignet sich zum Auftragen von Substanzlösungen auf allen üblichen Fertignplatten oder Folien für die DC und auf Papierstreifen für die

von uns entweder mit einem Klebestreifen direkt auf dem Arbeitstisch (3) oder mit einer speziellen Halterung (unveröffentlicht) auf dem Gehäuse (1) befestigt. Es ist auch begrenzt anwendbar bei der Elektrophorese. Festes Trägermaterial erleichtert das Auftragen der Substanzlösung. Bei hoher Schlittengeschwindigkeit lassen sich sehr dünne Striche herstellen. Die Strichbreite ist von der Austrittsgeschwindigkeit des Primär- und Sekundärgasstromes, von der Polarität und Flüchtigkeit des Lösungsmittels, und von dem Volumen der applizierten Lösung abhängig.

Mit diesem Probenauftraggerät kann man Substanzlösungen auf allen üblichen Fertigplatten der Formate  $50 \times 200$ ,  $100 \times 200$  und  $200 \times 200$  mm auftragen. Wegen der geringen Strichbreite, der Einheitlichkeit und Geradlinigkeit der Striche kann man die entsprechenden Chromatogramme im allgemeinen sehr gut densitometrisch auswerten. Das Probenauftraggerät liefert die besten Voraussetzungen für die Anwendung der Scrapertechnik<sup>13</sup>.

Mit dem Probenauftraggerät können dünne und dicke Striche gezogen werden, ohne dass keulenförmige Verdickungen an den Enden der Striche entstehen. Das Sprühröhrchen ist aus Glas gefertigt, leicht auszuwechseln und zu reinigen. Es lässt sich verhältnismässig billig herstellen und eignet sich deshalb auch besonders gut zum

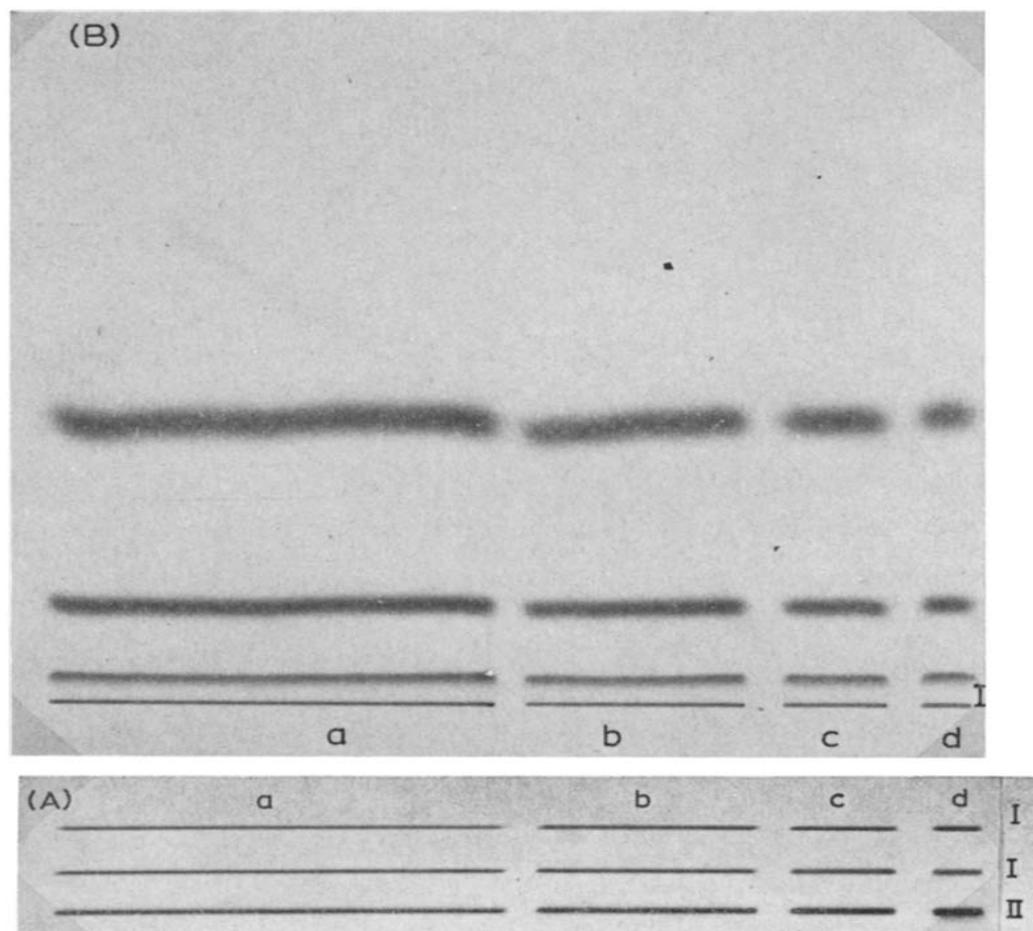


Fig. 6. (A) Farbstofftestlösung (Desaga) mit Probenauftraggerät aufgetragen. Platte: Kieselgel F 254/366 (Woelm); Schichtdicke  $250 \mu$ . Aufgetragene Volumina: I = (a)  $200 \mu\text{l}$ ; (b)  $100 \mu\text{l}$ ; (c)  $50 \mu\text{l}$ ; (d)  $25 \mu\text{l}$ . II = (a)  $400 \mu\text{l}$ ; (b)  $200 \mu\text{l}$ ; (c)  $100 \mu\text{l}$ ; (d)  $50 \mu\text{l}$ . (B) Dünnschichtchromato-

Auftragen radioaktiver Proben. Wegen der Feinheit der Kapillare und des relativ grossen trichterförmigen Vorratsgefässes lassen sich kleine Volumina von 10–100  $\mu$ l, aber auch grössere bis zu etwa 4 ml bequem auftragen. Das Totvolumen der Kapillare liegt in den meisten Fällen unter 10  $\mu$ l. Das Probenauftraggerät eignet sich also sowohl für analytische als auch für präparative Arbeiten.

#### EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Qualität und Leistungsfähigkeit des Probenauftraggerätes soll durch die folgenden Beispiele demonstriert werden (Fig. 6, 7). Ein Farbstofftestgemisch wird unter niedrigem Primärgasdruck (0.02 atm) bei einer mittleren Schlittengeschwindigkeit von 2 cm/sec in verschiedenen Mengen auf die Platte gesprüht (Fig. 6A). Die Einheitlichkeit und Geradlinigkeit der Striche führt bei Verwendung eines geeigneten Fließmittels zu einer einwandfreien Trennung des Substanzgemisches (Fig. 6B).

Die routinemässige DC-Auftrennung von Tritium-markierten Metaboliten des Pheromons [ $^3$ H]Bombykol<sup>14–16</sup> in Kombination mit einem DC-Scraper<sup>13</sup> und einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer unterstreicht die Vielseitigkeit dieses Probenauftraggerätes (Fig. 7).

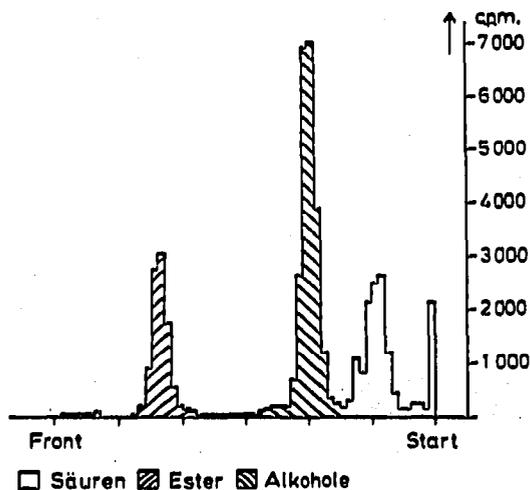


Fig. 7. Radiochromatogramm eines [ $^3$ H]-Lipidgemisches. Probenauftraggerät; Volumen, 200  $\mu$ l; Strichbreite < 1 mm; Strichlänge, 3 cm. Trägermaterial, Kieselgel H (Merck); Schichtdicke, 250  $\mu$ . Fließmittel, *n*-Hexan-Diisopropyläther-Methanol-12.5% Ammoniak (160:20:10:0.15). Steighöhe, 15 cm. DC-Scraper: Messer, 2.5 mm. Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer.

#### DANK

Das Probenauftraggerät wurde in Zusammenarbeit mit den Herren A. WITTENZELLER, K. STIEGLER und W. BREITENFELD entwickelt. Dank sagen wir Herrn Prof. DR. DANNENBERG für die Unterstützung bei der Entwicklung dieses Gerätes. Für technische Assistenz danken wir den Herren N. WEISS und B. LACKNER, ebenso Fräulein I. BIEDERMANN und Frau C. BUCHER.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein vollautomatisch arbeitendes Probenauftraggerät für die Dünnschicht-

sprühen von Substanzlösungen im Bereich von 10  $\mu$ l bis 4 ml in Form dünner Striche. Durch die besondere Konstruktion des Sprühsystems wird ein hoher Trocknungseffekt erzielt. Es entstehen keine keulenförmige Verdickungen an den Strichenden. Ein einfacher Glassprüher erlaubt den routinemässigen Einsatz radioaktiver Isotope.

## LITERATUR

- 1 W. WÄSSLE UND K. SANDHOFF, *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 357.
- 2 F. A. VANDENHEUVEL, *J. Chromatogr.*, 25 (1966) 102.
- 3 T. W. SCOTT UND J. W. E. BEESTON, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 456.
- 4 M. F. BACON, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 552.
- 5 T. DAROCHA, C. H. GRAY UND R. V. QUINCEY, *J. Chromatogr.*, 27 (1967) 497.
- 6 S. W. MCKIBBINS, J. F. HARRIS UND J. F. SAEMAN, *J. Chromatogr.*, 5 (1961) 207.
- 7 Camag, Firmenschrift TL - 70 MuttENZ, Schweiz.
- 8 F. J. RITTER UND G. M. MEYER, *Nature*, 193 (1962) 941.
- 9 Desaga, Firmenschrift 1970, Heidelberg.
- 10 Desaga, Heidelberg, *Br. Pat. 1.032.096 (Cl. B01 d)*, 8 June, 1966; Appl. 16 April, 1964, 3 pp.
- 11 M. H. COLEMAN, *Lab. Pract.*, 13 (1964) 1200.
- 12 Camag, Druckschrift 271-800, MuttENZ, Schweiz.
- 13 G. KASANG, G. GÖLDNER UND N. WEISS, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 393.
- 14 G. KASANG, *Z. Naturforsch.*, 23 b (1968) 1331.
- 15 G. KASANG, *Int. Symp. Gustation and Olfaction, Geneva, 1970*, Academic Press, London, New York, 1971, p. 245.
- 16 G. KASANG UND K. E. KAISLING, *IV Int. Symp. Olfaction and Taste, Starnberg, 1971*, Wiss. Verlagsgesellsch., Stuttgart, 1972, p. 200.

*J. Chromatogr.*, 71 (1972) 101-109