

CHROM 10,780

Note

Übertragung von stark wasserhaltigen Reversed-Phase-Hochdruckflüssigkeitschromatographischen Systemen auf die Dünnschichtchromatographie und Bioautographie von Reversed-Phase-Dünnschichtchromatogrammen

E. VON ARX und M. FAUPEL

Forschungslaboratorien der Division Pharma der Ciba-Geigy AG, Basel (Schweiz)

(Eingegangen am 29. November 1977)

Bei der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) zeichnet sich in der letzten Zeit ein starker Trend zu reversed-phase (RP) Trennsystemen an C_8 - C_{18} -alkylsilanisierten Kieselgelen ab. Diese Systeme ermöglichen den Einsatz der HPLC speziell für stark polare (hydrophile) Stoffklassen, die bis anhin nur mittels Ionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt werden konnten. Mit diesen neuen Systemen konnten ausgezeichnete Trennungen erzielt werden. Die Anwendung der RP-Dünnschichtchromatographie (RP-DC) mit alkylsilanisierten Kieselgelen als stationäre Phase steht hingegen erst in den Anfängen.

Für unsere Versuche benützten wir vorerst mit Kieselgel beschichtete DC-Fertigplatten die nach Gilpin und Sisco¹ mit Dodecyltrichlorsilan silanisiert wurden. Nach diesen Autoren liefert eine C_{12} -Belegung die besten Trennungen in der RP-Schichtchromatographie, die auch mit Chromatogrammen auf C_{18} -belegten RP-HPLC-Säulen verglichen werden können. Ein Nachteil der Methodik von Gilpin und Sisco besteht darin, dass die bereits mit Kieselgel beschichteten Platten silanisiert werden, was relativ aufwendige Wasch- und Trockenprozesse erfordert. Wir beschreiben hier eine Methode zur Beschichtung der Platten mit dodecyl-silanisiertem Kieselgel und die damit erhaltenen Resultate.

Wie es bei der RP-HPLC meistens erforderlich ist, wurden hauptsächlich Fließmittel mit einem Wassergehalt von über 25% eingesetzt. Die Versuche wurden mit Gemischen von Methanol-Wasser und Acetonitril-Wasser mit Zusätzen von Essigsäure, Trifluoressigsäure, Ammoniumsulfat, Ammoniumcarbonat und Natriumperchlorat durchgeführt.

Für den Nachweis von Antibiotika verwendeten wir die Technik des Bioautogramms.

MATERIALIEN UND METHODEN

Testsubstanzen

Als Testsubstanzen dienten Steroide, Peptide und Antibiotika, die zum Teil in unseren Laboratorien synthetisiert wurden.

Herstellung der stationären Phase

Verwendet wurden: Kieselgel 60 F (Merck), 0.04–0.063 mm, getrocknet bei 120° am Hochvakuum; Dodecyltrichlorsilan, PCR 27930 (PCR, Gainesville, Fla., U.S.A.); Toluol, absolutiert mit Alox W 200 (Woelm). Kieselgel (1.11 kg) wurde in 10 l Toluol bei 50° unter gutem Rühren langsam mit 96 g Dodecyltrichlorsilan, gelöst in 1 l Toluol, versetzt. Nach Rühren über Nacht bei 50° wurde abgekühlt, filtriert, und der Rückstand mit viel Toluol, Aceton und Methanol gewaschen. Der Rückstand wurde anschliessend mit 3 l Methanol während 2 h verrührt, nochmals filtriert und bei 120° am Hochvakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet; Ausbeute 1.19 kg.

Dünnschichtchromatographie

Die Beschichtung der Glasplatten erfolgte mit einer Aufschlämmung von 30 g stationärer Phase + 0.6 g Calciumsulfat gebrannt (Merck 2162) in 60 ml Alkohol-Wasser (1:1) auf einem Eigenbau-Streichgerät². Anschliessend wurden die Schichten über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet*.

Die Substanzproben wurden mit dem Linomat III (Camag, Muttenz, Schweiz) 1 cm breit aufgetragen. Als Trennkammer wurde eine Doppeltrogkammer, 20 × 20 cm (Camag, Muttenz, Schweiz)³, verwendet.

Fliessmittel

Für RP-DC und RP-HPLC wurden die folgende Fliessmittel verwendet: I, Methanol-Wasser-Essigsäure (60:38:2); II, Methanol-Wasser-Trifluoressigsäure (64:35:1); III, Acetonitril-Wasser-Natriumperchlorat (5:995:0.7, v/v/w). Die Laufzeiten für RP-DC betragen ca. 4 Stunden für 13–15 cm Laufstrecke.

Nachweis

Nachweis erfolgte mit UV bei 254 nm, 50% H₂SO₄ in Methanol, TDM-Reagens (Modifikation der Chlor-*o*-Tolidin Farbreaktion⁴) und Bioautographie.

Herstellung der Bioautogramm-Platten

Das Bakterium, *Neisseria catarrhalis* ETH 4163 (NC), wird in Lyoampullen oder auf Schrägagarröhrchen bei 4° aufbewahrt. Für die Stammanzucht werden in einem 500-ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane, 100 ml BHI-Nährlösung (BBL) mit 2.5% einer 24 h-Kultur von *Neisseria catarrhalis* beimpft. Der Kolben wird 24 h bei 250 upm und 25° geschüttelt.

In eine rechteckige Glasschale (21 × 34 cm) werden 300 ml DST-Agar (Oxoid) als Grundschicht gegossen. Nach dem Erstarren werden 100 ml DST-Agar, der mit 2% einer Schüttelkultur von *Neisseria catarrhalis* beimpft ist, auf die Grundschicht gegossen (= Oberschicht). Nachdem die Oberschicht der Bioautogramplatte fest geworden ist, wird die Platte für 45 min bei 37° getrocknet. Auf der Oberfläche des Agars darf kein Kondenswasser sichtbar sein. Anschliessend wird die beschichtete Seite der entwickelten DC-Platte sehr sorgfältig auf die Bioautogramplatte gelegt. Zwischen der DC-Platte und der Agaroberfläche sollen keine Luftblasen sein.

* Eine entsprechende Fertigplatte wird von der Fa. Antec hergestellt. Fertigplatte Kieselgel UP (Umkehr-Phase) C₁₂, Antec AG, CH-4127, Birsfelden, Schweiz.

Die Bioautogrammplatte wird darauf für 30 min bei 4° gehalten, damit die Substanzen von der DC-Platte in den beimpften Agar diffundieren können. Danach wird die DC-Platte vorsichtig entfernt und die Bioautogrammplatte für 18–24 h bei 37° inkubiert.

Antibiotisch aktive Substanzen erscheinen auf der Bioautogrammplatte als klare Zonen in denen kein Wachstum von *Neisseria catarrhalis* erfolgt.

Flüssigkeits-Chromatographie

Als Pumpen wurden Waters Assoc. M 6000, Orlita DMP 1515 und für die Beimischung des Farbreagens eine Langhubkolbenpumpe ISCO 314 gebraucht. Einspritzkopf, Waters Assoc. U6K; Säulen, Stahl, 250 × 3 mm, thermostatisiert bei 40°; Packung, Nucleosil C₁₈, Eigenfüllung. Detektion, (A) UV 254 nm (Waters Assoc. UV-Detektor 440) und (B) Derivatisierung nach der Säule mit einer OPA-Variante nach Benson und Hare⁵. Am Ende der Säule wird folgende Mischung über ein Misch-T-Stück zugepumpt: 215 ml 0.6 m Borsäure in Methanol-Wasser (600:400), 215 ml 0.6 m KOH in Methanol-Wasser (600:400), 320 mg *o*-Phtalaldehyd (Fluka, 7976 z.A.) in 5 ml Methanol, und 0.7 ml Mercaptoaethanol (Fluka, 73600 purum). Die Fluoreszenzmessung erfolgt mit einem Aminco-Fluorometer 4-7439 oder einem Perkin-Elmer LC 1000 Fluoreszenz-Detektor.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

An Hand der glatten Auftrennung von Steroiden, Peptiden und Cephalosporinen konnte die erfolgreiche Übertragung von RP-HPLC-Systemen auf RP-DC gezeigt werden. Die Trennungen wurden jeweils auf den RP-HPLC-Säulen und auf den RP-DC-Platten mit den gleichen Fließmitteln durchgeführt. Für den Nachweis der Wirkstoffe aus der Cephalosporin-Reihe wurden Bioautogramme (Fig. 1) die sich bei uns in der DC seit Jahren bewährten hergestellt. Diese Methode, wie auch die zum Nachweis dienenden Sprühreagenzien liessen sich ohne Schwierigkeiten auf die RP-DC übertragen.

Im ersten Beispiel (Fig. 2) wurden Corticosteroide im Fließmittel I aufge-

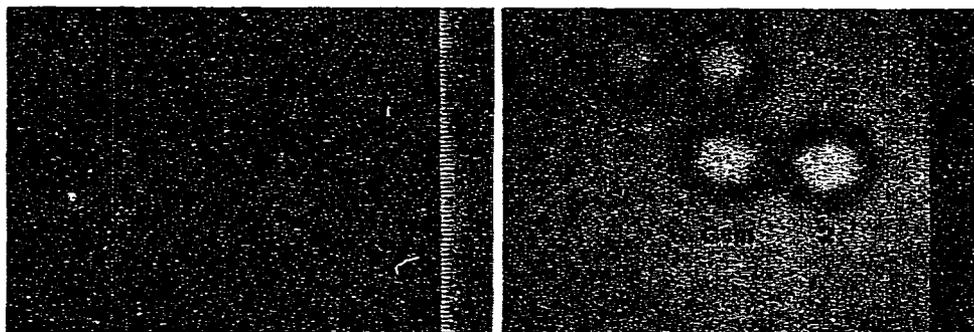


Fig. 1. Cephalosporine von Fig. 4 vergrößert. 1 = Desacetyl-Cephalosporin C; 2 = Cephalosporin C. Auftragung: (a) je 50 µg; (b) 1, 10 µg; 2, 1 µg. Nachweis: (a) UV 254 nm; (b) Bioautographie.

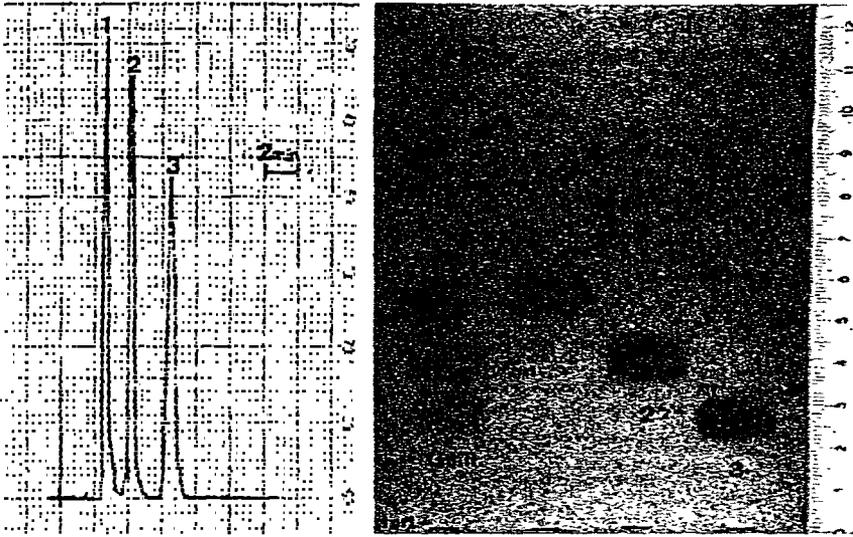


Fig. 2. Steroide, Chromatogramme mit Fließmittel I. 1 = Cortison; 2 = Corticosteron; 3 = Cortexon. Auftragung: RP-HPLC, je $7 \mu\text{g}$ in Methanol; RP-DC, je $7 \mu\text{g}$ in Methanol (Gemisch je $3 \mu\text{g}$). Nachweis: RP-HPLC, UV 254; RP-DC, H_2SO_4 50% in Methanol.

trennt. Fig. 3 zeigt eine Trennung von Peptiden im System II. Im dritten Beispiel (Fig. 4) wurden 2 Cephalosporine im System III glatt aufgetrennt.

Die RP-DC sollte es, neben dem Einsatz als Reinheitskontrolle, ermöglichen, auf einfache und rasche Art und Weise geeignete Lösungsmittelsysteme aufzufinden, die sich auf die RP-HPLC übertragen lassen.

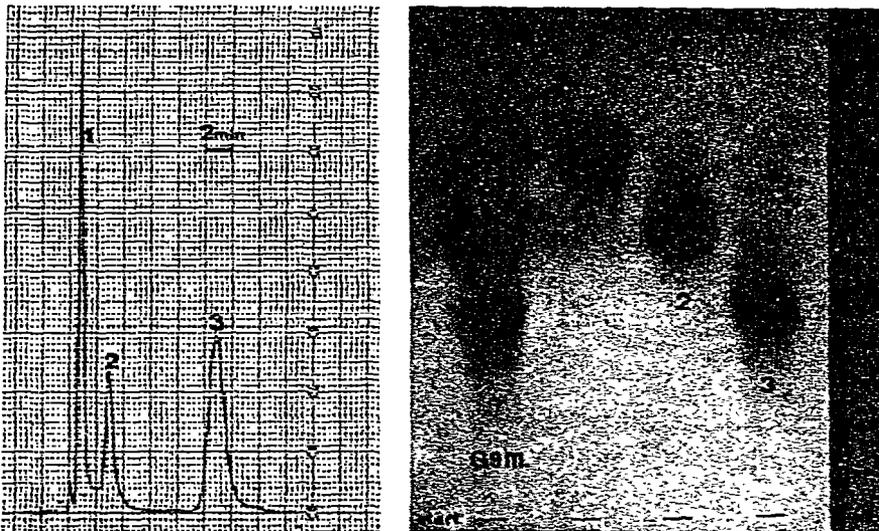


Fig. 3. Peptide, Chromatogramme mit Fließmittel II. 1 = Calcitonin M-(11-32)-docosapeptidamid; 2 = Calcitonin M-sulfoxid; 3 = Calcitonin M. Auftrennung: RP-HPLC, 1 und 2 je $2 \mu\text{g}$ und 3, $5 \mu\text{g}$ in Wasser; RP-DC, je $50 \mu\text{g}$ in Wasser. Nachweis: RP-HPLC, OPA; RP-DC, TDM.

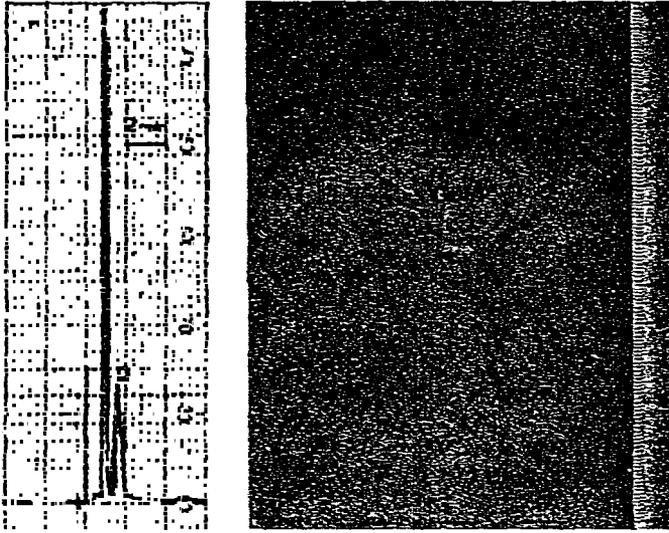


Fig. 4. Cephalosporine, Chromatogramme mit Fließmittel III. 1 = Desacetyl-Cephalosporin C; 2 = Cephalosporin C. Auftragung: RP-HPLC, je 5 μg in Wasser; RP-DC, 50 μg . Nachweis: UV 254 und Bioautographie (vgl. Fig. 1).

DANK

Wir danken den Herren Drs. M. Brugger, J. Gruner, A. Jöhl und Mr. C. McMartin für wertvolle Hilfe und Anregungen, Frl. I. Belkner für die Bioautogramme, den Herren Y. Born und R. Stoll für die Flüssigkeits-Chromatogramme und Herrn A. Müller für die Herstellung der stationären Phase.

LITERATUR

- 1 R. K. Gilpin und W. R. Sisco, *J. Chromatogr.*, 124 (1976) 257.
- 2 E. von Arx und R. Neher, *J. Chromatogr.*, 25 (1966) 109.
- 3 P. Petrin, *J. Chromatogr.*, 123 (1976) 65.
- 4 E. von Arx, M. Faupel und M. Brugger, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 224.
- 5 J. R. Benson und P. E. Hare, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 72 (1975) 619.