

CHROM. 14,852

Note

Optimierung der Aldehyd–Schwefelsäurereagenzien zur Detektion in der Dünnschicht-Chromatographie

EGON STAHL* und A. GLATZ

Pharmakognosie und Analytische Phytochemie der Universität des Saarlandes, D-6600 Saarbrücken (B.R.D.)

(Eingegangen am 26. Februar 1982)

Zur Detektion werden in der Dünnschicht-Chromatographie (DC) häufig Aldehyd–Schwefelsäurereagenzien zur Farbbildung angewandt. Wir konnten kürzlich zeigen, dass hierbei 3 farbbildende Reaktionen ablaufen¹. Zunächst werden durch die starke Mineralsäure die entsprechenden Substanzen umgesetzt, dabei entstehen neben primär schwach farbigen Produkten wahrscheinlich Cyclopentenylkationen^{2,3}. Diese kondensieren dann mit dem entsprechenden Aldehyd zu mehr oder weniger intensiv gefärbten Verbindungen. Bei höherer Säurekonzentration kommt noch unerwünschterweise eine Autokondensation der Aldehyde zu polymeren Farbstoffen hinzu⁴. Deshalb sollten die in den Reagenzien angewendeten Aldehyde eine hohe Carbonylaktivität zeigen, gleichzeitig jedoch nur in geringem Masse zur Autokondensation neigen. Ferner müssen in den Aldehyden geeignete Substituenten vorhanden sein, die bewirken, dass die Kondensationsprodukte mit den umzusetzenden Verbindungen einen hohen Extinktionskoeffizienten im sichtbaren Bereich haben. Die Anforderungen an die Aldehyde sind also gegenläufig. Deshalb kann eine theoretische Abschätzung der Aldehydaktivität⁵ eine experimentelle Untersuchung nicht ersetzen. Auch die aus der klassischen Analytik bekannten Reagenzien, wie nach Kägi–Miescher (s. Lit. 6 und 7), Ekkert⁸, Komarowsky (s. Lit. 9 und 10) und andere können wegen der andersartigen Reaktionsbedingungen nicht direkt übertragen werden.

EXPERIMENTELLES

Schichtmaterial

Selbst beschichtete Glasplatten (Streichverfahren¹⁴) des Formats 20 × 20 cm, TLC-Kieselgel 60 HF₂₅₄ mit einer mittleren Korngröße von 15 µm (Merck, Darmstadt, B.R.D.) unter Zusatz von Acronal 250 D (BASF, Ludwigshafen, B.R.D.). Zusammensetzung der Suspension: 30 g Kieselgel + 98 ml Wasser + 1.8 ml Acronaldispersion; Mengenangabe für 5 DC-Platten, Nassschichtdicke 250 µm.

Detektionsreagenzien

Zu 100 ml eines abgekühlten Gemisches aus Methanol–Eisessig–konz. Schwefelsäure (85:10:5) werden jeweils 0.5 g eines zu untersuchenden Aldehyds (s. Tabelle I) zugesetzt. Davon werden pro 20 × 20 cm-Schichtfläche 20 ml aufgesprüht. Die Erwärmung erfolgte unter Beobachtung auf einer Heizplatte vom Typ Thermoplate (Desaga, Heidelberg, B.R.D.).

Probesubstanzen

Etherische Öle, wie z.B. von *Mentha piperita*, *Foeniculum vulgare*, *Solidago spec.*, *Acorus calamus*, *Salvia officinalis*.

Es wurden 1% Lösungen hergestellt und 2 μ l punktförmig aufgetragen.

Optimierung der Detektionsbedingungen und Vergleich der Aldehyde.

Es wurden Temperaturen zwischen 50 und 150°C erprobt, und die Zonenfärbung zunächst nach 30 sec, dann jeweils nach doppelten Zeitabständen fotografisch dokumentiert. Später wurden die Fotografien visuell nach den Grauwerten ausgewertet.

Bestimmung der Erfassungsgrenzen

Sie erfolgte nach Chromatographie und anschliessender visueller Auswertung der Chromatogramm-Zonen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Nach Arbeiten von Katz⁵ und Schaltegger^{11,12} war zu erwarten, dass insbesondere diejenigen aromatischen Aldehyde, deren Substituenten die Elektronendichte am Kern erhöhen, zu hochempfindlichen Reagenzien führen würden. Deshalb erfolgte auch die Auswahl unter besonderer Berücksichtigung dieser Gruppe. Als Testsubstanzen dienten sowohl etherische Öle als auch häufig vorkommende Terpenderivate und eine grössere Anzahl von Steroiden. In Tabelle I sind sowohl die positiven Kriterien, wie hohe Farbintensität der Substanzzonen als auch die an sich unerwünschte Schichtverfärbung angegeben. Als Vergleich diene jeweils das aldehydfreie Reagenz, das heisst die von ihm hervorgerufenen schwachen Färbungen.

Es ergibt sich, dass von den aliphatischen Aldehyden die Färbungen weder verstärkt noch die Farbtöne nennenswert geändert werden. Die schwachen Schichtverfärbungen sind wohl auf ein beginnendes Verkohlen des verwendeten Bindemittels zurückzuführen. Gering ist ebenfalls der farbverstärkende Einfluss von unsubstituierten aromatischen Aldehyden; er wird von der deutlichen Schichtfärbung kompensiert.

Verwendet man jedoch aromatische Aldehyde mit Substituenten mit positiven induktiven oder positiven mesomeren Effekten, so verändern sich die Detektionsfarben beträchtlich. Statt der vorherrschend gelben, orangen und braunen Färbungen mit nichtsubstituierten Verbindungen erhält man nun meist blaue oder violette Farbtöne. Ausserdem ist die Farbintensität zumeist stark erhöht.

Mit zunehmender Zahl an Substituenten wird dieser Effekt zwar immer ausgeprägter, aber gleichzeitig verstärkt sich die Verfärbung der Schicht. Deshalb sind alle dreifach substituierten Verbindungen in diesem Reagenz unbrauchbar; desgleichen auch die 2,5- und 3,5-disubstituierten aromatischen Aldehyde. Zum Teil ist die Schichtfärbung so intensiv und tritt so rasch auf, dass die eigentlichen Substanzzonen nicht erkennbar sind.

Gute Ergebnisse erhält man dagegen mit *p*-Methoxybenzaldehyd (Anisaldehyd), 2,4-Dimethoxybenzaldehyd und einigen 3,4-disubstituierten aromatischen Aldehyden. Man erzielt mit ihnen bei etwa vergleichbaren Erfassungsgrenzen farblich gut differenzierte Zonen. Am intensivsten erscheinen die Färbungen mit dem 2,4-

TABELLE I

DIE EIGNUNG VERSCHIEDENARTIGER ALDEHYDE ZUR DETEKTION VON TERPENDERIVATEN IN DER DÜNNSCICHT-CHROMATOGRAPHIE IM VERGLEICH ZUM ALDEHYDFREIEN REAGENZ

– = Schwach; + = deutlich; ++ = stark; +++ = sehr stark. +I = electronenschiebende; –I = electronenziehende Substituenten.

<i>Aldehyd</i>	<i>Charakterisierung des Aldehyds</i>	<i>Optimierte Detektionsbedingungen*</i>	<i>Farbintensität der Zonen</i>	<i>Schichtfärbung</i>	<i>Intensität der Schichtfärbung</i>	
Aldehydfreies Reagenz	0	125°C; 5–10 min	–	Grau	–	
Formaldehyd	Aliphaten	125°C; 5–10 min	–	Grau	–	
Acetaldehyd		–	Grau	–		
Propionaldehyd		–	Grau	–		
Benzaldehyd	Unsubstituierte	100°C; 5–10 min	++	Gelb	+	
Zimtaldehyd	Aromaten		+	Gelbgrün	+	
Phthaldialdehyd			+	Gelb	+	
Anisaldehyd	Aromaten mit einem Substituenten (+I Effekt)	90°C; 10 min	+++	Rosa	+	
4-Benzoyloxybenzaldehyd		90°C; 10 min	+++	Orange	+++	
4-Dimethylaminobenzaldehyd		110°C; 5–10 min	+	Braun	+	
4-Carboxybenzaldehyd		(-I Effekt)	110°C; 10 min	+	Gelb	+
4-Dimethylamindobenzaldehyd				+	Braun	+
Vanillin		90°C; 5–10 min, unter Beobachtung	+++	Gelbgrün	++	
Isovanillin			+++	Gelbgrün	++	
Piperonal			++	Gelbgrün	++	
3,4-Dihydroxybenzaldehyd	Aromaten		+++	Gelbgrün	++	
3,4-Dimethoxybenzaldehyd	mit zwei Substituenten (+I Effekt)		+++	Gelbgrün	++	
4-Benzoyloxy-3-methoxybenzaldehyd		**	Graubraun	+++		
2,4-Dimethoxybenzaldehyd		+++	Violett	++		
2,5-Dimethoxybenzaldehyd		**	Orange	+++		
3,5-Dimethoxybenzaldehyd	**		**	Dunkelgrün	+++	
2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd	Aromaten mit drei Substituenten (+I Effekt)	80°C; 5 min	**	Orange	+++	
3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd		80°C; 5 min	++	Gelbbraun	+++	
5-Methylfurfural	Heteroaromat	100°C; 5 min	++	Braun	+	

* Gültig bei Erwärmung auf der Thermoplate (Desaga, Heidelberg, B.R.D.).

** Durch die starke Schichtfärbung ist die Zonenlage unkenntlich.

Dimethoxybenzaldehyd-Reagenz. Allerdings tritt hier die Schichtverfärbung stärker in Erscheinung als bei Verwendung von einfach substituierten Aldehyden. Nachteilig ist die auf nur wenige Stunden begrenzte Haltbarkeit dieser Reagenzlösung. Ähnliches gilt für das an sich häufig benutzte Vanillin und für die anderen disubstituierten Aldehyde.

Mit Abstand am besten eignet sich das Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz;

TABELLE II

ERFASSUNGSGRENZEN UND FARBEN BEI DETEKTIONEN VON STEROIDEN MIT DEM ANISALDEHYD-SCHWEFELSÄURE-REAGENZ.

Bei Verwendung der Thermoplate wurde unter Beobachtung 10 min auf 120°C erhitzt. Die beobachteten Farben gelten für Substanzkonzentrationen zwischen 1 und 10 µg.

Erfassungsgrenze in µg pro Zone

0.01-0.1	0.1-1	1-10
Androsteron (blau-violett)	Cholesterol (violett)	Aldosteron (grau-blau)
Dihydrotestosteron (blau-violett)	Cholsäure (grau-blau)	Cortison (ocker)
Epi-androsteron (blau-violett)	Dehydro-epi-androsteron (rot-violett)	Hydrocortison (grau-braun)
Lanosterol (blau-violett)	Desoxycholsäure (grau-violett)	Prednisolon (grau-grün)
Östradiol (oliv)	3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure (violett)	Tetrahydrocortison (grau)
Östriol (grün-blau)	Digitonin (grau-blau)	
Pregnantriol (blau)	Digitoxigenin (grün-blau)	
Pregnenolon (blau-violett)	Digitoxin (grau-violett)	
Sitosterol (blau-violett)	Digoxin (violett)	
Stigmasterol (blau-violett)	Ethinylöstradiol (blau-violett)	
Testosteron (chromoxid-grün)	Gitoxin (blau)	
	Östron (grau-grün)	
	Pregnandiöl (grau-blau)	
	Progesteron (ocker)	

vorteilhaft ist, dass man es bei gleicher Wirksamkeit im Kühlschrank mehrere Wochen vorrätig halten kann. Hinzu kommt die Preiswürdigkeit und toxikologische Unbedenklichkeit des verwendeten Aldehyds. Die Aldehydkonzentration im Reagenz sollte bei etwa 0.5% liegen. Es hat sich gezeigt, dass höhere Konzentrationen, etwa von 1 oder 2%, schnell zu störenden Schichtverfärbungen führen und Konzentrationen unter 0.1% für eine quantitative Umsetzung nicht mehr ausreichend sind.

Entgegen der oft gegebenen und auch im Europäischen Arzneibuch aufgenommenen Vorschrift ist es sinnvoll, den Aldehyd stets als letzten Bestandteil zu dem *abgekühlten* Gemisch von Säuren und Methanol zuzugeben. Dies senkt die sonst unvermeidliche thermische Belastung des Aldehyds und erhöht so die Haltbarkeit des Reagenzes beträchtlich.

Die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen ist bei Verwendung des Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenzes äusserst unkritisch. Sie hängt in erster Linie von der

Säureempfindlichkeit der zu detektierenden Verbindungen ab. Beachtenswert ist jedoch die Tatsache, dass die Nachweisempfindlichkeit sehr stark von der Konstitution der entsprechenden Verbindungen abhängt, eine allgemein gültige Regel kann bei der Vielzahl der ablaufenden Reaktionen nicht gegeben werden. Die Nachweisempfindlichkeit liegt, wie die Tabelle II zeigt, sehr unterschiedlich. Manche Verbindungen lassen sich in Mengen von 10 ng nachweisen, bei anderen liegt die Nachweisempfindlichkeit bei 1–100 µg.

Generell wurde gefunden, dass man bei Verwendung tieferer Erhitzungstemperaturen und kürzerer Detektionszeiten selektivere Anfärbungen erhält. So ergibt sich beispielsweise beim Kalmusöl, dass man bereits bei Zimmertemperatur eine Blaufärbung von Pre-Isocalamendiol und Isocalamendiol erhält¹⁵, und erst bei einer Temperaturerhöhung die Zahl der Farbzonen beträchtlich zunimmt. Die höchste Empfindlichkeit ergibt sich jedoch zumeist erst dann, wenn sich die Schicht bereits schwach verfärbt.

DANK

Ein Teil der Versuche wurde in gewissenhafter Weise von Herrn stud. rer. nat. Leo Langenbahn im Rahmen einer Staatsexamensarbeit durchgeführt.

LITERATUR

- 1 E. Stahl und A. Glatz, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 518.
- 2 H. Auterhoff und Cl.-J. Lang, *Arch. Pharm.*, 305 (1971) 845.
- 3 H. Auterhoff und H. Bertram, *Arch. Pharm.*, 307 (1974) 742.
- 4 A. Glatz, *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 1982.
- 5 S. Katz, *Arch. Biochem. Biophys.*, 91 (1960) 54.
- 6 K. Miescher, *Helv. Chim. Acta*, 24 (1946) 743.
- 7 R. Neher und A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 2278.
- 8 L. Ekkert, *Pharm. Zentralhalle Dtschl.*, 68 (1927) 577.
- 9 A. Komarowsky, *Chem.-Ztg.*, 27 (1903) 807, 1086.
- 10 S. Nogare und J. Mitchell, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1376.
- 11 H. Schaltegger, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1945) 285.
- 12 H. Schaltegger, *Experientia*, 2 (1946) 27.
- 13 L. Langenbahn, *Staatsexamensarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 1978.
- 14 E. Stahl, *Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch*, Springer, Berlin, New York, Heidelberg, 2. Aufl., 1967.
- 15 K. Keller, *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, in Vorbereitung, 1982.