

# **Instrumentelle Dünnschichtchromatographie : Grundzüge der Arbeitstechnik, Instrumentierung, Anwendungsbeispiele aus der Praxis = Instrumental thin-layer chromatography : principles, instrumentation and practical applications**

Autor(en): **Schmutz, H.R.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und  
Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **73 (1982)**

Heft 2

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983447>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Beiträge zur Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie

Anlässlich der Jahrestagung 1981 der Schweiz. Naturforschenden Gesellschaft haben die Schweiz. Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie und die Schweiz. Gesellschaft für Instrumentalanalytik und Mikrochemie am 24. September 1981 in Davos gemeinsam ein Symposium über Hochleistungsdünnschichtchromatographie durchgeführt. Die Vorträge von H. R. Schmutz, W. Funk, G. Székely und P. Georges werden im folgenden publiziert. Ein weiterer Beitrag ist bereits andernorts veröffentlicht worden (S. Dogan und W. Haerdi, *Chimia* 35, 339, 1981).

J. S.

---

### Instrumentelle Dünnschichtchromatographie: Grundzüge der Arbeitstechnik, Instrumentierung, Anwendungsbeispiele aus der Praxis

Instrumental Thin-Layer Chromatography:  
Principles, Instrumentation and Practical Applications

*H. R. Schmutz*  
Camag, Muttenz

#### Einleitung

Die eindrucklichen Fortschritte der modernen Dünnschichtchromatographie können einer Reihe von Faktoren zugeschrieben werden:

- Industriell gefertigte Schichten mit Korngrößen um  $5\ \mu\text{m}$  und einer engen Korngrößenverteilung weisen eine hohe Trennleistung auf.
- Neue Auftrage Techniken ermöglichen kleine Startzonen und damit eine optimale Nutzung der zur Verfügung stehenden Trennleistung.
- Neue Methoden der Zuführung mobiler Phase sowie der Schichtkonditionierung sichern hohe Reproduzierbarkeit der chromatographischen Bedingungen.
- Die bessere Schichtoberfläche ergibt ein günstigeres Signal/Rausch-Verhältnis bei der optischen Direktauswertung; dadurch werden niedrigere Detektionslimiten erreicht.
- Eine an die reduzierten Dimensionen der Probenzonen angepaßte Direktauswertung erlaubt die Messung großer Probenzahlen bei ausgezeichneter Auflösung und Reproduzierbarkeit.

Diese Ausführungen sollen verdeutlichen, daß nur eine Verbesserung aller an der Analyse beteiligten Schritte zu einer Methode führt, die den heutigen Anforderungen eines analytischen Labors gerecht wird.

Für die Praxis bedeutet das, daß auch für die Dünnschichtchromatographie ein aufeinander abgestimmtes Sortiment von Instrumenten für Probenauftragen, Entwickeln und Auswerten zur Verfügung stehen muß.

Die Leistungsfähigkeit von solchen Systemen wird anhand von 3 Beispielen gezeigt. Im Beispiel 1 wurden die Proben punktförmig aufgetragen.

Eine Alternative zur punktförmigen Auftragung, welche besonders vorteilhaft ist für verdünnte Lösungen, wird in den Beispielen 2 und 3 gezeigt. Es handelt sich dabei um ein spezielles Verfahren zum strichförmigen Probenaufsprühen.

In allen 3 Beispielen wird die konventionelle (lineare) Entwicklungstechnik eingesetzt. In Beispiel 1 und 2 wird die Doppeltrogkammer (Fließmittelsättigung) und in Beispiel 3 die HPDC-Linearentwicklungskammer, ohne Einwirkung von Fließmitteldampf, eingesetzt. Die Wahl des Entwicklungssystems hängt von der Art der zu trennenden Substanzen und vom gewählten Fließmittel ab.

### **Quantitative Bestimmung von Sulfathiazol, Sulfadiazin und Sulfamerazin in einer Sulfonamid-Tablette\***

#### *Probenvorbereitung*

20 Tabletten werden fein pulverisiert und die einer Tablette entsprechende Menge Pulver eingewogen und mit 200 ml Methanol versetzt. Die Suspension wird während 5 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend mit einer mit Membranfilter versehenen Spritze ein Aliquot entnommen. 1 Tablette enthält 167 mg Sulfathiazol, Sulfadiazin und Sulfamerazin. Standardlösung in gleicher Zusammensetzung und Konzentration.

#### *Probenauftragung*

Mit Nanomat und eingesetztem Nano-Applicator 100 nl, nach Data-Pair-Technik, 11 Proben und 6 Standards, Auftrageabstand 5 mm, auf eine HPTLC-Fertigplatte Kieselgel 60 F 254 (Merck). Das aufgetragene Volumen entspricht je 83,5 ng Sulfathiazol, Sulfadiazin und Sulfamerazin.

#### *Chromatographie*

In der Doppeltrogkammer 10 x 10 cm mit Chloroform-Methanol-n-Hexan 15:5:15. Trennstrecke 70 mm. Anschließend Trocknen der Platte im Trockenschrank.

#### *Quantitative Auswertung*

Mit DC/HPDC Scanner, Monochromatorversion. Absorptionsmessungen bei 280 nm, Monochromatorbandbreite 10 nm. Spaltabmessungen 3,5 x 0,2 mm, automatische Auswertung mit Bahnlänge  $A = 26$  mm, Bahnabstand  $B = 5$  mm, Vorschubgeschwindigkeit 1 mm/s.

\* Die Methode wurde uns freundlicherweise von Herrn N. Jühlcke, Viernheim, zur Verfügung gestellt.

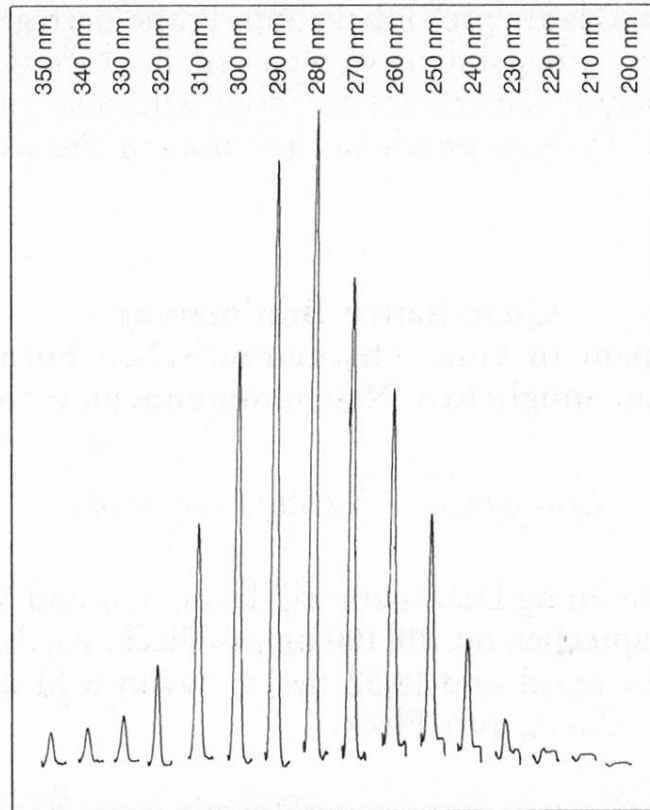


Abb. 1. Spektrum von Sulfathiazol im Bereich von 200 bis 350 nm, aufgenommen mit dem Camag DC/HPDC Scanner direkt auf der HPDC-Platte

Die günstigste Meßwellenlänge wurde ermittelt durch Aufnahme der Absorptionsspektren direkt auf der Platte (Abb. 1). Gehaltsbestimmung über die mit Hilfe des angeschlossenen Integrators Varian CDS-111-C ermittelte Peakfläche (Abb. 2). (Alternativ kann die Integration auch mit einem Integrator Spectra-Physics SP 4100 mit eingebautem Printer/Plotter durchgeführt werden.) Die erreichte Genauigkeit der Gesamtmethode liegt zwischen 2–3% rel. Standardabweichung (abhängig vom  $R_f$ -Wert). Reihenfolge der Substanzen in Chromatographie-richtung: Sulfathiazol, Sulfadiazin, Sulfamerazin.

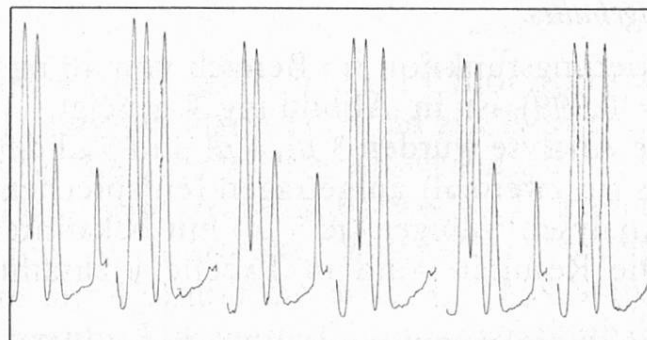


Abb. 2. Meßkurven von zersetzter Probe (1., 3. und 5. Kurve von links) und 3 Standards



Die Gesamtanalysendauer pro unbekannte Probe beträgt 1,5 und 2,5 min, je nachdem, ob nur die «arbeitsintensive Zeit» (d. h. Auftragen und Auswerten) oder die gesamte Analysendauer berücksichtigt wird. Das macht die HPDC besonders geeignet für Analysenprobleme mit hohem Probenbefall, z. B. in der Qualitätskontrolle.

## Quantitative Bestimmung von Diazepam in einer pharmazeutischen Formulierung: Spurenanalyse von möglichen Nebenkomponenten im ppm-Bereich\*

### *Bestimmung der Hauptkomponente*

#### *Proben*

Standardlösung mit 20 ng Diazepam/ $\mu\text{l}$ ; davon 3, 4 und 5  $\mu\text{l}$  für die Kalibrierung aufgetragen, entsprechen 60, 80, 100 ng pro Fleck. Analysenlösungen mit einem Gehalt von 19,23 ng/ $\mu\text{l}$  und 18,52 ng/ $\mu\text{l}$ ; davon 5  $\mu\text{l}$  aufgetragen, entsprechend 96,2 ng bzw. 92,6 ng pro Fleck.

#### *Probenauftragung*

Mit Linomat III, 5  $\mu\text{l}$  strichförmig, Bandlänge 6 mm, Zwischenraum 4 mm, 16 Proben pro Platte, auf HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (Merck) 20 x 10 cm. Platten mit Methanol vorgewaschen und 30 min bei 110 °C getrocknet.

#### *Chromatographie*

Mit Essigsäureethylester-n-Hexan 1 : 1 in der Doppeltrogkammer (Fließmittelsättigung), Trennstrecke 40 mm.

#### *Quantitative Auswertung*

DC/HPDC Scanner, Monochromatorversion, Absorptionsmessungen bei 265 nm (Hg-Lampe), Spaltabmessungen 3 x 0,3 mm. Automatische Auswertung mit Bahnlänge  $A = 20$  mm, Bahnabstand  $B = 10$  mm, 16 Meßbahnen. Meßvorschub 1 mm/s. Ermittlung der Peakflächen mit angeschlossenen Integrator Spectra-Physics SP 4100.

#### *Ermittlung des Probengehaltes*

Die lineare Kalibrierungsfunktion im Bereich von 40 ng bis 120 ng (Korrelationskoeffizient  $r^2 = 0,999$ ) ist in Abbildung 3 gezeigt.

Für die eigentliche Analyse wurden 3  $\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{l}$  und 5  $\mu\text{l}$  der Standardlösung als Kalibrationsstandards (je zweimal) aufgetragen (entsprechend 60 ng, 80 ng und 100 ng) sowie zwei Analysenlösungen (je 5  $\mu\text{l}$ ) mit bekanntem Gehalt an Diazepam (je fünfmal). Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

\* Die Methode wurde uns freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt.

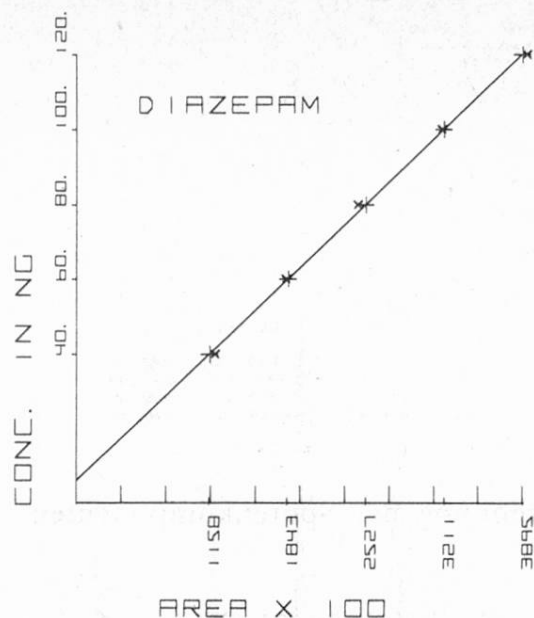


Abb. 3. Kalibrierungskurve Diazepam, ausgedruckt mit Integrator SP 4100 mit einem speziellen BASIC-Programm

Tabelle 1. Gehaltsbestimmung von Diazepam

Probe	Aufgetragene Substanzmenge	Gefunden (Mittelwert)	Abweichung vom Sollwert	rel. Standardabweichung für $n = 5$
A <sub>I</sub>	96,2 ng	96,6 ng	+ 0,4 ng	1,26 %
A <sub>II</sub>	92,6 ng	93,3 ng	+ 0,7 ng	1,68 %

### Spurenanalyse von möglichen Nebenkomponenten

Diese Analyse wird nach dem vorangehend beschriebenen Verfahren ausgeführt mit folgenden Modifizierungen:

#### Probenauftragung

200 mg Diazepam werden gelöst in 5 ml Chloroform und davon 4  $\mu$ l aufgetragen, d. h. 160  $\mu$ g Diazepam/Fleck. Da nicht alle Komponenten ausreichend getrennt werden, wird für die quantitative Auswertung das Verfahren der Standard-Addition gewählt. Dazu wird zuerst auf jeweils 4 Chromatogrammbahnen Probenlösung aufgetragen. Nach erfolgter Zwischentrocknung wird die erste Bahn mit 10  $\mu$ l, die zweite mit 4  $\mu$ l und die dritte mit 2  $\mu$ l Standardlösung bekannter Konzentration übersprüht. Die vierte Chromatogrammbahn bleibt unverändert (d. h. nur mit Probe belegt). Wegen der extremen Konzentrationsunterschiede

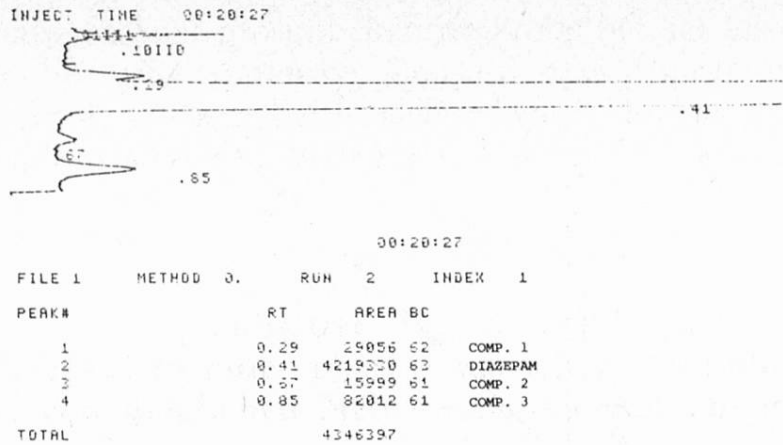


Abb. 4. Trennung der Spurenkomponenten in Diazepam

werden 90 mm Trennstrecke benutzt. Ein Beispiel eines Chromatogramms zeigt Abbildung 4.

Tabelle 2 zeigt die für ein bestimmtes Muster ermittelten Analyseergebnisse.

Tabelle 2.

Spurenkomponente	R <sub>f</sub>	Ermittelte Menge (ng/Fleck)	ppm	rel. Standardabweichung, <i>n</i> = 8
Comp. 1	0,25	102	638	2,8 %
Comp. 2	0,63	5,9	37	4,0 %
Comp. 3	0,82	110	688	2,1 %

### Quantitative Bestimmung von Carbamazepin und zwei Metaboliten in Serum (nach *Hundt* und *Clark* (1))

Serumproben werden ohne Extraktionsschritt direkt aufgetragen. Die Untersuchung zeigt, daß ein derartiges Vorgehen praktikabel ist und welche Präzision erreicht wird (Abb. 5).

#### Proben

Carbamazepin (I), Carbamazepin-10,11-epoxid (II) und 10,11-Dihydroxy-carbamazepin (III).

#### Probenvorbereitung

Stammlösung: 10 mg von I, 2,5 mg von II und 2,5 mg von III in 10 ml absolutem Methanol.

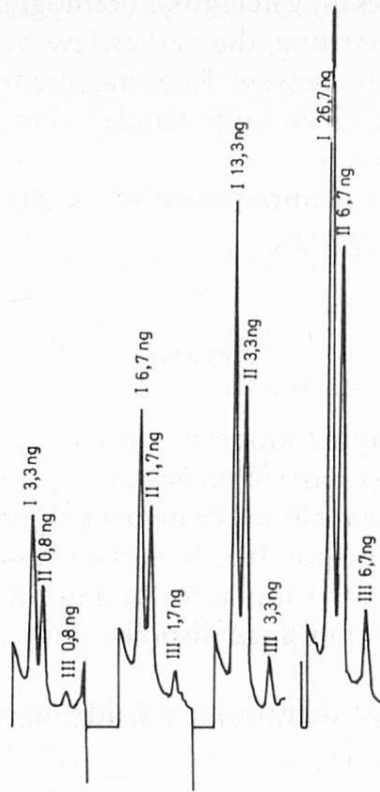


Abb. 5. Trennung von Carbamazepin

Standard Serumlösung: 2, 4, 8 und 16  $\mu$ l von der Stammlösung zu 1 ml Portionen von Humanserum zugeben (in Plastik-Proben-Röhrchen). Die Serumlösungen werden vor der Auftragung 1 : 3 mit Wasser verdünnt (um die Viskosität zu verringern).

#### *Probenauftragung*

Mit Linomat III, strichförmig, 5  $\mu$ l, Strichlänge 10 mm auf HPDC-Platten, Kieselgel 60 F 254, 20 x 10 cm (Merck).

#### *Chromatographie*

Ethylacetat-Benzol-Methanol 5 : 4 : 1. Entwicklung mit HPDC Linearentwicklungskammer 20 x 10 cm. Laufzeit  $\sim$  10', Laufstrecke 45 mm.

#### *Quantitative Auswertung*

DC/HPDC Scanner, Monochromatorversion, Quecksilberlampe, Anregung 366 nm, Emission  $>$  400 nm, Monochromatorbandbreite 10 nm. Spalteneinstellung 0,3 x 5 mm, Papiergeschwindigkeit 3 cm/min.

#### *Zusammenfassung*

Die Leistungsfähigkeit der modernen Dünnschichtchromatographie wird durch eine Reihe von Faktoren bestimmt: Homogenes Schichtmaterial ergibt eine erhöhte Trennlei-



stung, neue Auftrage- und Entwicklungstechniken ermöglichen eine optimale Nutzung der zur Verfügung stehenden Trennleistung, die verbesserte Schichtoberfläche ermöglicht niedrige Detektionslimiten und eine bessere Reproduzierbarkeit.

Für die Praxis bedeutet das, daß ein aufeinander abgestimmtes Sortiment von Instrumenten zur Verfügung stehen muß.

Anhand von drei Beispielen aus unterschiedlichen Bereichen wird die Leistungsfähigkeit von solchen Systemen aufgezeigt.

### *Résumé*

L'efficiencce de la chromatographie moderne sur couche mince est fonction d'un certain nombre de facteurs: L'homogénéité des couches assure une meilleure résolution, de nouvelles techniques de dépôt des échantillons et de développement permettent d'exploiter au mieux la capacité de résolution disponible, la surface améliorée des couches permet d'abaisser les limites de détection et d'améliorer la reproductibilité des résultats.

Cela signifie pour la pratique qu'il faut disposer d'un assortiment complet et cohérent d'appareils et d'instruments.

L'efficiencce de tels systèmes est démontrée à l'aide de trois exemples tirés de domaines d'application différents.

### *Summary*

The efficiency of modern thin-layer chromatography is determined by a number of factors: homogeneous layer material gives better separation performance, new application and development techniques allow optimal usage of the available separation performance, the improved layer surface ensures low detection limits and improved reproducibility.

In practice this means that a complete system of compatible instruments is essential.

The efficiency of such systems is illustrated with reference to three cases from different areas.

### *Literatur*

1. *Hundt, H. K. L. and Clark, E. C.*: Thin-layer chromatographic method for determining carbamazepine and two of its metabolites in serum. *J. Chromatogr.* **107**, 149–154 (1975).

Dr. H. R. Schmutz  
Camag  
Sonnenmattstraße 11  
CH-4132 Muttenz