

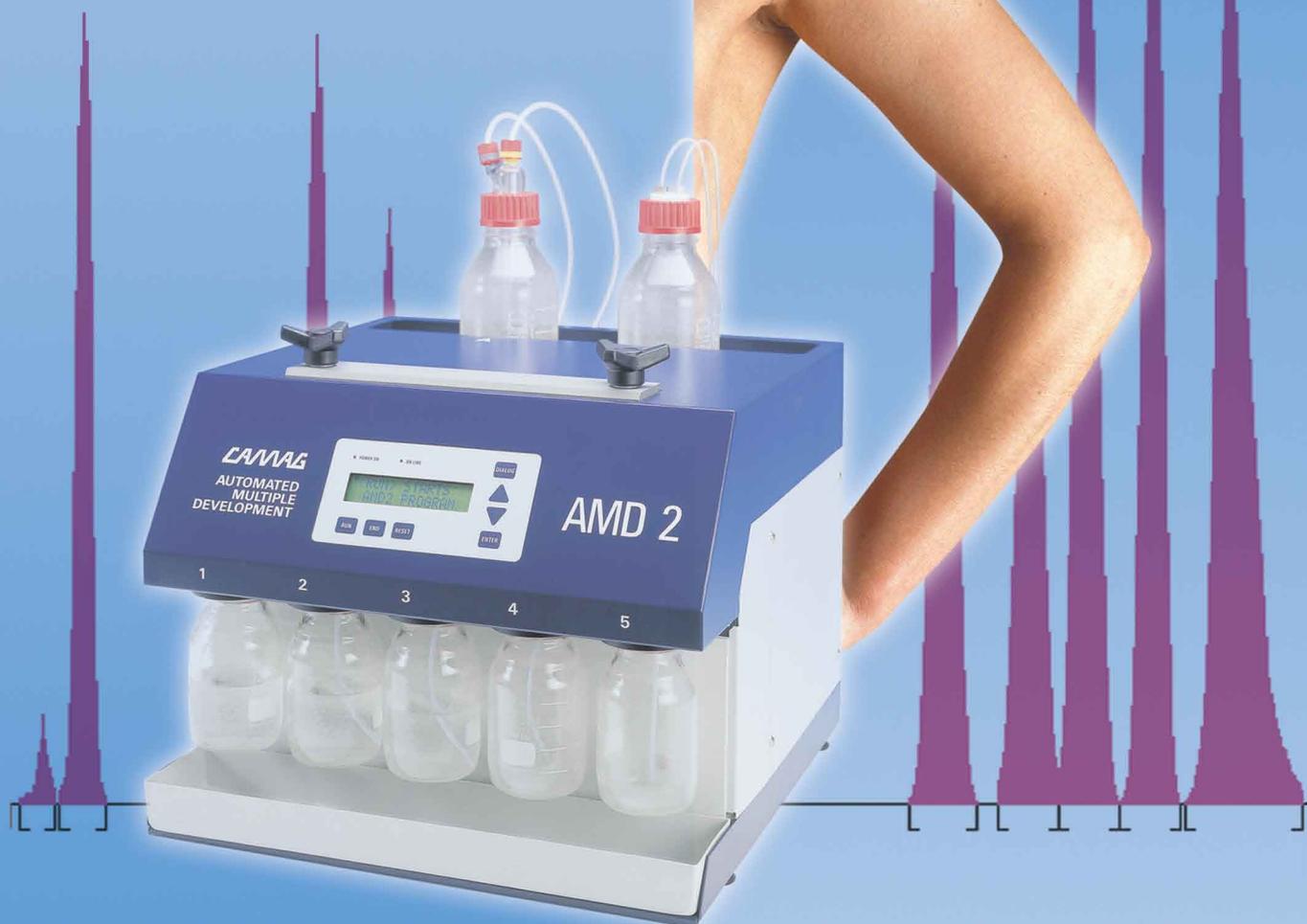
CAMAG

CAMAG LITERATURDIENST
PLANAR-CHROMATOGRAPHIE

**Planar-Chromatographie
als Methode der Wahl,**
zum Beispiel bei der Analytik
von Hautlipiden

CBS

CAMAG BIBLIOGRAPHY SERVICE



CBS90 März 2003

Wichtiger Termin:

International Symposium for High Performance
Thin-Layer Chromatography,
Lyon, 15.-18. Oktober 2003

März 2003

90

<http://www.camag.com>

IN DIESER AUSGABE

Verfahren, Anwendungen

Verbesserte Analytik von Hautlipiden mittels AMD 2-4

Selektive Bestimmung von Taurin und L-Lysin Hydrochlorid in Energiegetränken und Multivitaminisyrup 5

Effektive Analytik von Phospho- und Glycolipiden in Pflanzenlecithinen .. 6-7

Was ist aus dem Club CCM geworden? 9

Schnelle Analytik von Indol Alkaloiden 10-11

Monitoring von Proinsektiziden (Oxazolinen) in biologischen Proben 12-13

Bestimmung von Antibiotika in Fabrikabwasser 14

In dieser Ausgabe hervor- gehobene CAMAG Produkte

AMD System 3

Tauchvorrichtung 7

Horizontal-Entwicklungskammer 11

DC-Probenautomat (ATS4) 13

ATS4 Freemode 15

Neues von winCATS

Spektrbibliothek 16

Rubrik: Kennen Sie CAMAG?

Unser weltweites Vertriebssystem 8

Planar-Chromatographie in der Praxis

Verbesserte Analytik von Hautlipiden mittels AMD



▲ Prof. Neubert, H. Farwanah, Dr. Raith (von links nach rechts)



▲ Dr. Zellmer

Der Arbeitskreis von Prof. Neubert beschäftigt sich mit der Entwicklung kolloidaler Arzneiformen, der Wirkstoffpenetration und -permeation bei topischer Applikation sowie der Konzentrationsbestimmung und Charakterisierung von Arznei- und Hilfsstoffen in komplexen biologischen Matrices. Seit nunmehr fast 10 Jahren beschäftigt er sich auch mit der Charakterisierung von Naturstoffen, insbesondere den Lipiden der Haut.

Einleitung

Zum besseren Verständnis von Hautkrankheiten wie Psoriasis, atopische Dermatitis, Ichthyosis oder Xerosis ist es wichtig, die Zusammensetzung und den Einfluss der Stratum corneum-Lipide bei diesen Krankheitsbildern zu kennen. In diesem Zusammenhang extrahiert man Lipide in vivo aus einer definierten Hautzone und analysiert sie hinsichtlich der Zusammensetzung der Lipide, v.a. Ceramide, Fettsäuren und Cholesterin. Bereits vor 6 Jahren berichteten wir im CBS 77 über eine interessante Arbeit von F. Bonte, P. Pinguet, J.M. Chevalier und A. Meybeck zu diesem Thema. Die nun dargestellte Methode von H. Farwanah, R. Neubert, S. Zellmer und K. Raith* hat demgegenüber den Vorteil, dass sie neben der Trennung und Quantifizierung der wichtigsten Lipidfraktionen eine detailliertere Analytik der Ceramide erlaubt, indem die 7 bekannten Ceramidklassen im gleichen Lauf getrennt werden.

Die Planar-Chromatographie hat in diesem speziellen Analytikbereich klare Vorzüge gegenüber der HPLC. Sie ist robuster gegenüber Matrix-Effekten, schneller (Chromatographiezeit 10 min pro Probe), sparsamer im Lösungsmittelverbrauch (nur 8 mL pro Probe) und verfügt mit der Densitometrie über eine nahezu universelle Detektion. Die Trennung der Ceramidklassen erfolgt nach Anzahl und Position der Hydroxygruppen, im Gegensatz zur RP-HPLC, bei der durch den Einfluss der Kettenlängen eine unübersichtlichere Elutionscharakteristik resultiert. Als Methode der Wahl wird sie sowohl für diagnostische Zwecke als auch zur High-throughput Analyse erfolgreich eingesetzt.

Probenvorbereitung

12 cm² Hautfläche am inneren Unterarm für 5 min mit n-Hexan – Ethanol 2:1 extrahieren, Extrakt bei 50° C eindampfen, Rückstand unter Argon trocknen und in 500 µL Chloroform – Methanol 1:1 aufnehmen.

Schicht

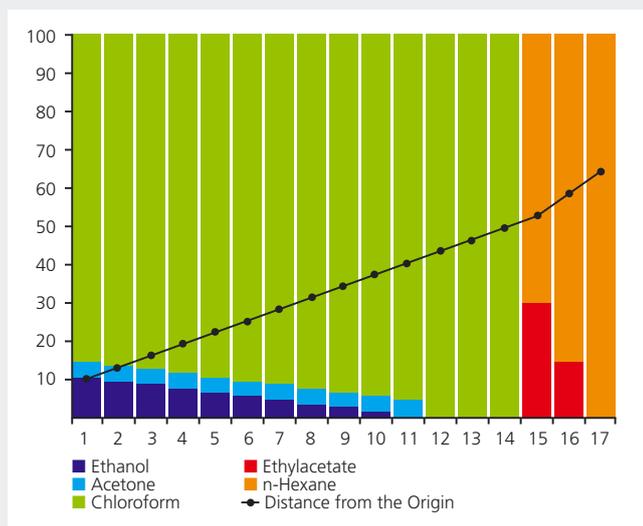
HPTLC Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), 20 x 10 cm, vorgewaschen.

Probenauftragung

Bandförmig mit DC Probenautomat 4, 15 Bahnen, Auftragsvolumen 4 bzw. 6 µL, Bandlänge 8 mm, unterer Randabstand 8 mm, 10 mm vom Plattenrand, 12 mm Bahnabstand.

Chromatographie

Im AMD-2 System mit einem 17-Stufen Gradienten auf Basis von Chloroform (siehe Abb. 3), Lösungsmittelverbrauch insgesamt 120 mL (8 mL pro Probe), 90s Trocknung zwischen den einzelnen Entwicklungsschritten und anschliessend Konditionierung der Schicht mit 4 M Essigsäure, Laufstrecke 65 mm, Dauer: 150 min (10 min pro Probe).



▲ AMD2 Gradient: 11 Entwicklungsschritte mit Chloroform – Ethanol – Aceton und anschliessend 3 isokratische mit Chloroform zur Trennung von Cholesterol, Cholesterol-sulfat und der Ceramidklassen; zur Trennung von Cholesterol, Fettsäuren, Triacylglycerin, Cholesterylester und Squalen 2 Entwicklungsschritte mit n-Hexan – Ethylacetat und der letzte Entwicklungsschritt isokratisch mit n-Hexan



CAMAG AMD System

(Automatisierte Mehrfachentwicklung)

AMD wird dann eingesetzt, wenn die gewünschte Trennleistung auf der zur Verfügung stehenden Trennstrecke mit einstufiger isokratischer Entwicklung nicht zu erreichen ist. Das kann der Fall sein bei grossem Polaritätsbereich der zu trennenden Komponenten, bei hoher und unterschiedlicher Matrixbelastung sowie generell bei Vielkomponenten-Gemischen.

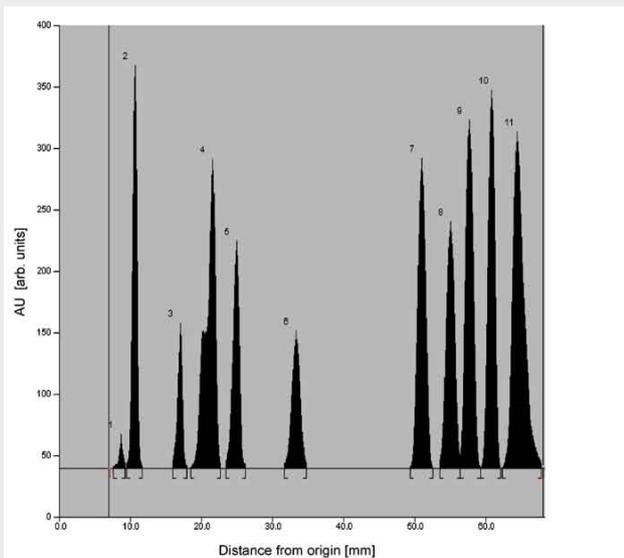
Zur Trennung von Proben, deren Komponenten einem weiten Polaritätsbereich angehören, arbeitet man mit einem Universalgradienten, der von hoher Elutionskraft zu extrem schwacher reicht.

Die in dieser Anwendung getrennten Lipide werden mit einem Gradienten auf Basis von Chloroform getrennt. Der Gradient ist flacher im Vergleich zu der früheren Arbeit von F. Bonte, P. Pinguet, J.M. Chevalier und A. Meybeck zu diesem Thema und ermöglicht somit die Trennung der Ceramidklassen nach Anzahl und Position der Hydroxygruppen. Die ersten 14 Entwicklungsschritte mit Chloroform (von 85% auf 100%) dienen zur Trennung von Cholesterol, Cholesterol-sulfat und der Ceramidklassen. Dagegen sind die drei letzten Entwicklungsschritte mit n-Hexan (von 70% auf 100%) zur Trennung von Cholesterol, Fettsäuren, Triacylglycerin, Cholesterylester und Squalen wichtig.

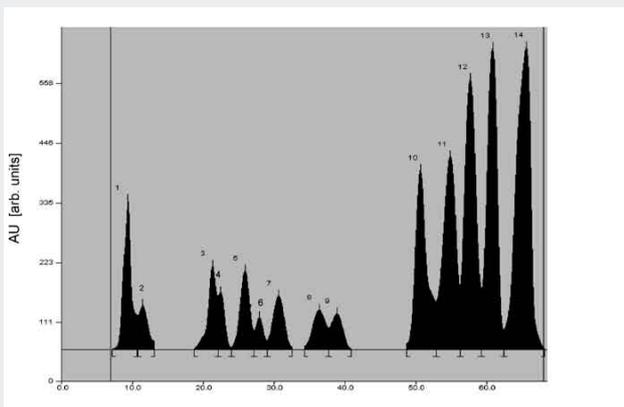
... Planar-Chromatographie in der Praxis

Postchromatographische Derivatisierung
 Platte in Kupfersulfat-Reagenz (wässrige Lösung von 10% Kupfersulfat, 8% Phosphorsäure und 5% Methanol) tauchen (Chromatogramm-Tauchvorrichtung), anschließend 20 min bei 150° C erhitzen.

Densitometrische Auswertung
 TLC-Scanner 3 mit winCATS Software, Absorptionsmessung bei 546 nm, Auswertung über die Peakfläche



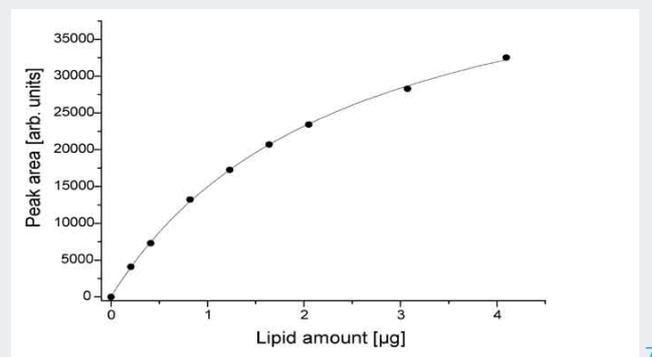
▲ Densitogramm einer Lipidstandard-Mischung: 1 = Start, 2 = Cholesterol-3-sulfat, 3 = erster Peak vom synthetischen Ceramid AP, 4 = Doppelpeak von Ceramid AS und dem zweiten Peak von Ceramid AP, 5 = Ceramid NP, 6 = Ceramid NS, 7 = Cholesterol, 8 = Palmitinsäure, 9 = Triolein, 10 = Cholesterol-oleat, 11 = Squalen



▲ Densitogramm von in vivo extrahierten Stratum corneum Lipiden: 1 = Start, 2 = Cholesterol-3-sulfat, 3 = Ceramid AH, 4 = Ceramid AP, 5 = Ceramid AS, 6 = Ceramid EOH, 7 = Ceramid NP, 8 = Ceramid NS, 9 = Ceramid EOS, 10 = Cholesterol, 11 = freie Fettsäuren, 12 = Triacylglycerol, 13 = Cholesterol-ester, 14 = Squalen.

Ergebnisse und Diskussion

Die dermatologisch bedeutsamen Hautlipidklassen, d.h. Ceramide, Fettsäuren und Cholesterol, werden gut getrennt. Die Variationskoeffizienten der Lipide liegen zwischen 0,2 und 10%. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Zusammensetzung der Lipidklassen je nach Individuum unterschiedlich sein kann, wobei die Ceramid-Zusammensetzung von Mensch zu Mensch relativ gleichbleibend ist. Die relativ milden in vivo-Extraktionsbedingungen bewirken vermutlich das im Vergleich zu anderen Literaturwerten leicht unterschiedliche Ceramidprofil.



▲ Kalibrationskurve (Michaelis-Menten) von Ceramid NP, Korrelationskoeffizient 0,9995

Lipide	µg/cm ²	Anteil an den gefundenen Ceramiden in %
Ceramid EOS	1.9 ± 0.7	15.7 ± 2.3
Ceramid NS	1.7 ± 0.4	14.1 ± 2.3
Ceramid NP	1.5 ± 0.4	12.1 ± 1.6
Ceramid EOH	1.0 ± 0.3	8.1 ± 0.7
Ceramid AS	2.7 ± 0.7	22.3 ± 1.5
Ceramid AP	0.9 ± 0.4	7.9 ± 3.2
Ceramid AH	2.4 ± 0.6	19.8 ± 1.7

▲ Profil der extrahierten Ceramide von 6 verschiedenen Personen

6 Eine Kopie der Original-Veröffentlichung im J. Chromatogr. B, 1 (2002) 443–450 ist bei CAMAG oder den Autoren (raith@pharmazie.uni-halle.de) auf Anfrage erhältlich.

H. Farwanah, K. Raith, R. Neubert, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Martin Luther Universität, W.-Langenbeck-Str. 4, D-06120 Halle (S.), und S. Zellmer, Labsoft Diagnostics AG, Robert-Franz-Ring 21, D-06108 Halle (S.)

Selektive Bestimmung von Taurin und L-Lysin Hydrochlorid in Energiegetränken und Multivitaminsirup

Einleitung

Prof. Indrayanto, T.K. Sia, und Y. I. Wibowo setzen in ihrem Labor für die Vitaminbestimmung routinemäßig die HPLC-UV/DAD ein. Jedoch kann die HPLC-Methode nicht ohne aufwendige Derivatisierung zur Bestimmung von Taurin und Lysin eingesetzt werden. Für die Bestimmung von Lysin ist in der indonesischen, britischen und amerikanischen Pharmacopoeia nur die potentiometrische Titration und für Taurin ist gar keine offizielle Methode vorhanden. Zwar gibt es Veröffentlichungen zu GC- und HPLC-Bestimmungen von Taurin in biologischen Medien, aber keine Methode zur simultanen Bestimmung von Taurin und Lysin, die beide in Multivitaminsirup vorhanden sind. Die Bestimmung mit Aminosäureanalyzer ist zu teuer und zeitaufwendig.

Sie entwickelten daher dieses einfache, schnelle und kostengünstige planar-chromatographische Verfahren. Auch hier zeigt sich wieder einmal die Flexibilität der Planar-Chromatographie. Die Proben werden direkt auf die Platte aufgetragen. Bei der postchromatographischen Derivatisierung mit Ninhydrin werden Taurin und Lysin (neben all den anderen Inhaltsstoffen inklusive der Vitamine) selektiv detektiert.

Schicht

DC Alufolien Kieselgel 60 (Merck), 20 × 10 cm

Probenauftragung

Punktförmig mit Nanomat, 18 Bahnen, Auftragsvolumen 2 µL (Proben verdünnt mit Ethanol – Wasser 4:1), unterer Randabstand 10 mm, seitlicher Randabstand 15 mm, Bahnabstand 10 mm

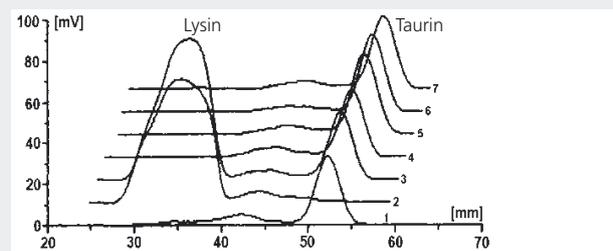
Chromatographie

In der Doppeltrangkammer mit n-Butanol – Essigsäure 96% – Ethanol – Wasser 4:2:3:3, Laufstrecke 80 mm

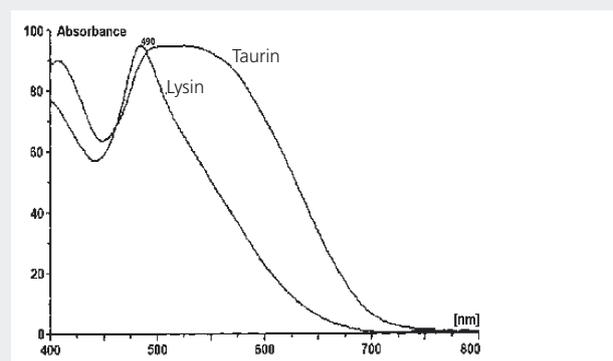
Postchromatographische Derivatisierung
Platte in das Ninhydrin-Reagenz tauchen und anschliessend 3–4 min bei 100° C erhitzen.

Densitometrische Auswertung

TLC-Scanner 3 mit CATS Software, Absorptionsmessung bei 490 nm, lineare Regression



▲ Densitogramm von Taurin-Standard (1), Lysin-Standard (2), Multivitaminsirup (3) und verschiedenen Energiegetränken (4–7)



▲ VIS-Spektren von Taurin und Lysin – die Spektren werden neben der Identitätsprüfung auch zur Reinheitsprüfung eingesetzt

Ergebnisse und Diskussion

Die vollständige Validierung kann in der Original-Veröffentlichung nachgelesen werden. Die Präzision unter Wiederholbedingungen (intermediate precision) liegt unter 1,6%. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus liegt für Taurin bei $99,4 \pm 1,7\%$ ($n = 13$) und für Lysin bei $100 \pm 0,9\%$ ($n = 5$).

Eine Kopie der Original-Veröffentlichung im J. of Planar Chromatogr. 14 (2001) 24–27 ist bei CAMAG oder den Autoren (indrayanto@hotmail.com) auf Anfrage erhältlich.

* G. Indrayanto, Lab. of Pharm. Biotechnology, Fac. of Pharm., Airlangga University, Jl. Dharmawangsa dalam, Surabaya 60286, sowie T. K. Sia und Y. I. Wibowo, Research and Development, PT Berofarm Pharmaceutical Comp., Buduran, Sidoarjo 61252, Surabaya, Indonesia

Effektive Analytik von Phospho- und Glycolipiden in Pflanzenlecithinen



◀ K. Schipmann, C. Heift und Dr. R. Lange (von links nach rechts)

C. Heift*, K. Schipmann und R. Lange sind bei der Degussa Texturant Systems Deutschland GmbH & Co. KG in Hamburg tätig. Sie beschäftigen sich im Zuge des Verbundprojektes NAPUS 2000 mit der Aufreinigung und Bestimmung von Phospho- und Glycolipiden und weiteren Minorkomponenten in Pflanzenlecithinen.

Das hier dargestellte, von C. Heift, K. Schipmann und R. Lange entwickelte planar-chromatographische Verfahren basiert nun auf HPTLC-Schichten. Im Vergleich zur klassischen DC ermöglicht es, ein größeres Spektrum von Verbindungen bei höherer Empfindlichkeit nachzuweisen und zu bestimmen. Die HPTLC-Methode zeigt eine sehr gute Trennleistung und Selektivität für alle Phospholipid-Verbindungen. Neben den Phospholipiden selbst werden gleichzeitig auch die Lyso-Verbindungen vollständig voneinander getrennt und können so auf einfachste Weise bestimmt werden. Ein weiterer Vorteil der Planar-Chromatographie liegt in ihrer bildhaften Darstellung als Chromatogramm (man sieht im Vergleich zur HPLC auch das, was am Start sitzen bleibt). Die HPTLC-Methode eignet sich ebenfalls zur Trennung und Bestimmung der Glycolipidklassen in Pflanzenlecithinen. Dieses insgesamt schnelle (Trennzeit 30 bzw. 40 s pro Probe, im Vergleich dazu dauert eine HPLC-Trennung 20 min pro Probe), leistungsfähige, aber einfache Verfahren wird von den Autoren als Methode der Wahl für alle lecithinhaltigen Substrate eingesetzt. Es wurden bisher Samen, Blätter, Rohöl und -fette, Lecithine, Zellkulturen, wässrige Extrakte, Brot- und Brötchenteige sowie Margarinen analysiert.

Einleitung

Phospho- und Glycolipide sind essentielle Bestandteile von allen lebenden Geweben. Kommerziell eingesetzt spielen sie eine wichtige Rolle aufgrund ihrer physiologischen Wirkung als Bestandteil in zahlreichen Lebensmitteln und Kosmetika sowie in medizinischen und biotechnologischen Anwendungen. Zur Analytik der Phospho- und Glycolipide bieten sich die ^{31}P -NMR, HPLC und Planar-Chromatographie an. Die ^{31}P -NMR ist auf alle Phospholipide anwendbar, wird aber wegen des technischen Aufwandes vor allem in der Forschung angewandt. Dagegen sind die HPLC und Planar-Chromatographie (jedoch noch auf DC-Schichten in der klassischen Form) in der Routineanalytik weit verbreitet. Die etablierten DC-Verfahren waren bisher wegen der fehlenden Spezifität und Trennleistung nur auf ausgewählte Phospho- und Glycolipide anwendbar.

Probenvorbereitung

Substrate werden homogenisiert und als Mehl, Suspension oder Flüssigkeiten auf Cyanopropyl-SPE-Säulen aufgetragen. Triglyceride werden mit n-Hexan, Glycolipide mit Isopropanol/Aceton und Phospholipide mit Methanol eluiert, eingedampft und in Chloroform – Methanol 2:1 aufgenommen.

Schicht

HPTLC Platten Lichrospher® Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), 20 × 10 cm

Probenauftragung

Bandförmig mit DC Probenautomat, 20 Bahnen, Bandlänge 7 mm, Auftragevolumen 1 bis 5 µL für Phospholipide und 0,2 bis 2 µL für Glycolipide, unterer Randabstand 8 mm, seitlicher Randabstand 10 mm, Bahnabstand 9 mm

Chromatographie

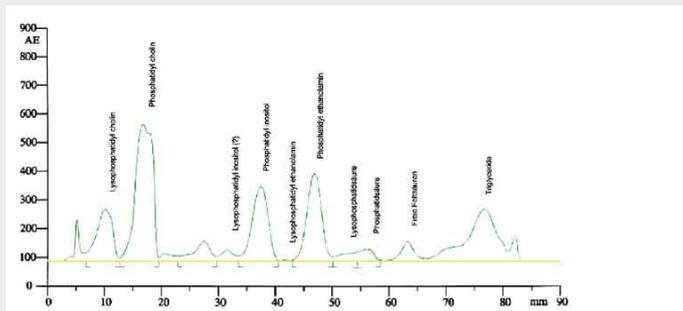
In der Horizontal-Entwicklungskammer 20 × 10 cm (Tank-Konfiguration) mit 4 mL Chloroform – Methanol – Aceton – Wasser 18:15:3:1, Laufzeit 15 min für die Phospholipid-Trennung und mit 4 mL Aceton – Chloroform – Wasser 30:15:2, Laufzeit 10 min für die Glycolipid-Trennung, Laufstrecke je 70 mm

Postchromatographische Derivatisierung

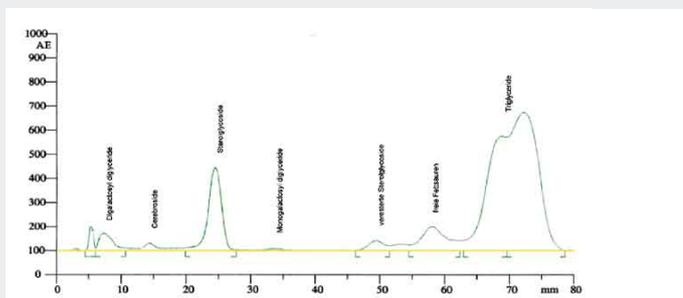
Platte in das Molybdätdi-phosphorsäure-Reagenz (5% in Ethanol) tauchen (Chromatogramm-Tauchvorrichtung) und anschliessend 15 min bei 120° C erhitzen. Phospholipide und auch Glycolipide erscheinen als dunkelgrüne Zone auf hellblauem Grund.

Densitometrie

TLC-Scanner 3 mit winCATS Software, Absorptionsmessung bei 720 nm, Auswertung über die Peakfläche mit linearer Regression



▲ Densitogramm der Phospholipide aus Rapssaat^{**}: Lyso-Phosphatidylcholin 0.2 µg, Phosphatidylcholin 2.3 µg, Phosphatidylinositol 1.5 µg, Phosphatidylethanolamin 1.2 µg, Phosphatidsäure 0.3 µg



▲ Densitogramm der Glycolipide aus Rapssaat^{**}: Digalactosyldiglycerid 0.3 µg, Cerebroside 0.1 µg, Sterylglycoside 0.4 µg, Monogalactosyldiglycerid <0.1 µg, veresterte Sterylglycoside 0.1 µg

Ergebnisse und Diskussion

Dieses entwickelte planar-chromatographische Verfahren ergänzt und erweitert hervorragend das Anwendungsspektrum der in der Routineanalytik dieser Verbindungen bereits etablierten Methoden (HPLC, ³¹P-NMR und DC). Die Wiederfindungsraten betragen für die Phospholipid-Verbindungen 96 bis 102% und für die Glycolipidklassen 98 bis 103%. Die Kalibrierfunktionen der einzelnen Phospholipide sind im Bereich von 0,09–4,4 µg und die der einzelnen Glycolipidklassen im Bereich von 0,1–2,0 µg linear. Die Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 0,997 und 0,999.



Chromatogramm Tauchvorrichtung

Alle Autoren dieser CBS-Ausgabe wählten bei erforderlicher postchromatographischer Derivatisierung die Chromatogramm-Tauchvorrichtung (siehe auch Seite 4 und 5). Gegenüber dem Sprühen hat das Tauchen viele Vorteile:

- Standardisierung der Reagenzübertragung (wählbare Tauchgeschwindigkeit und Verweildauer in der Reagenzlösung)
- Homogene Benetzung der Schicht und damit eine bessere Reproduzierbarkeit
- Geringere Konzentration des Wirkstoffes, da beim Tauchen effizienter Flüssigkeit übertragen wird
- Gesundheitlich unbedenklich hinsichtlich Luftkontamination

Durch die Automatisierung des Tauchvorgangs werden zudem die beim manuellen Tauchen sichtbaren fließmittelfrontähnlichen Verzeichnungen vermieden, die bei der Auswertung stören würden.

Danksagung: Die im Rahmen des Verbund-Projektes Napus 2000 durchgeführten Arbeiten wurden von BMBF finanziell gefördert.

* Degussa Texturant Systems Deutschland GmbH & Co KG, Ausschläger Elbdeich 62, D-20539 Hamburg, Kontakt: claudia.heift@degussa.com

** Gerade in der Saatgutanalytik hat sich die Planar-Chromatographie bewährt, da sie im Vergleich zur HPLC mit einer gering vorhandenen Probenmenge (Halbkornanalyse) besser auskommt.

Unser weltweites Vertriebssystem



14

In der Schweiz vertreiben wir unsere Produkte direkt von unserem Stammhaus, in Deutschland und in den USA durch unsere Tochterfirmen. An der neu gegründeten Firma, die uns in Frankreich vertritt, sind wir beteiligt. In mehr als 70 weiteren Ländern sind wir durch ausgesuchte Firmen vertreten, in den meisten Fällen auf exklusiver Basis.

Jede CAMAG Exklusiv-Vertretung ist verpflichtet, mindestens einen im Hause CAMAG ausgebildeten Produktspezialisten zu beschäftigen und ihn regelmässig – im allgemeinen mindestens alle 18 Monate – zur Weiterbildung und zur Ausbildung an neuen Produkten in unser Stammhaus zu delegieren. Alternativ dazu veranstalten wir auch Fortbildungskurse in Übersee, z.B. in Fernost, die von Mitarbeitern unseres Stammhauses abgehalten werden. Aufgabe der CAMAG Produktspezialisten ist es, den Kunden in Verkaufs- und Applikations-Belangen kompetent zu beraten und in den Betrieb seines CAMAG Systems einzuweisen. In kleineren Märkten, in denen der Spezialist unserer Vertretung sich nicht ausreichend in Übung halten kann, delegieren wir zu System-Einweisungen Mitarbeiter aus der Schweiz. Analog verfahren wir mit den Service-Ingenieuren unserer Vertretungen, die ebenfalls regelmässig zur Fortbildung nach Muttenz eingeladen werden.

Für Kunden, die gehalten sind, nach GMP/GLP zu arbeiten, bieten wir für die Qualifizierung ihrer CAMAG Systeme nach IQ/OQ (Installation Qualification/Operation Qualification) die Durchführung dieser Qualifizierung als Dienstleistung. Auch ein Teil der CAMAG Spezialisten unserer Vertretungen hat inzwischen die persönliche Zertifizierung zur Durchführung von IQ/OQ unserer Systeme erlangt.

Wir sehen uns als flexibles, kundenfreundliches und wissenschaftlich fundiertes Unternehmen, das sich in seiner 45-jährigen Firmengeschichte als anerkannter Partner in allen Bereichen der Planar-Chromatographie profiliert hat.

Parameter der Planar-Chromatographie

Die Beiträge dieser Reihe widmen sich in zwangloser Folge den wesentlichen Arbeitsschritten der Planar-Chromatographie und ihren Parametern, die Einfluss auf das chromatographische Ergebnis haben. Es werden Hinweise zur Optimierung gegeben, um einen effizienten Einsatz der Methode zu gewährleisten.

Das Sammeln dieser Blätter wird empfohlen.

Chromatogrammentwicklung – Teil 2:

Einfluss der Laufstrecke und Position im Chromatogramm auf die Trennung

Im Gegensatz zu HPLC und GC, bei denen die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase leicht zu steuern ist, kann diese bei der Planar-Chromatographie im allgemeinen nicht beeinflusst werden, abgesehen von der forced-flow Entwicklung (OPLC)¹. Die Fließgeschwindigkeit wird sowohl durch die Schicht (Porosität, Packung, Partikelgrösse, etc.) als auch durch das Fließmittel selbst (Viskosität, Oberflächenspannung, Dampfdruck der einzelnen Komponenten etc.) beeinflusst. Die Fließgeschwindigkeit verlangsamt sich während der Entwicklung i.a. mit dem Quadrat der Zeit (Abb. 1).

Aufgrund des höheren Fließwiderstandes bei einer feinkörnigen, dichtgepackten Schicht wird empfohlen, auf HPTLC Platten nur kurze Laufstrecken anzuwenden.

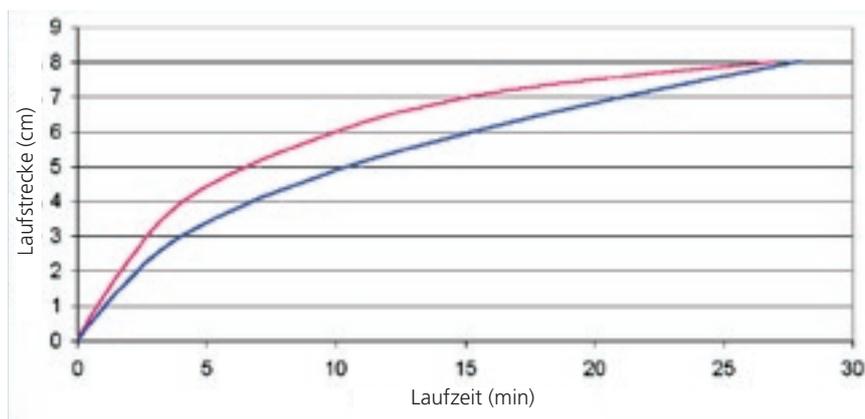


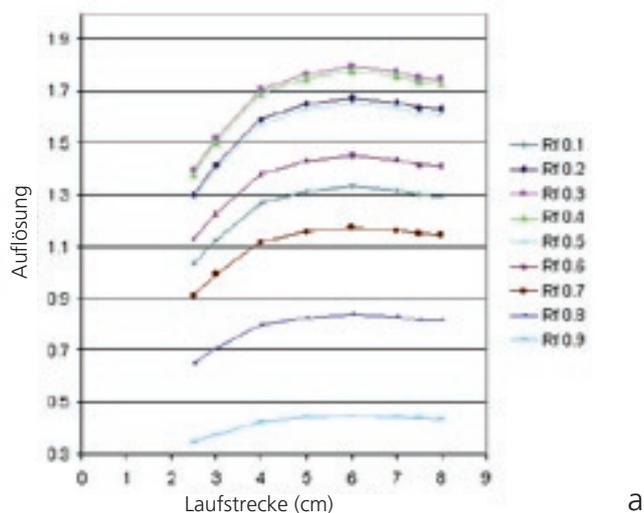
Abbildung 1 Zusammenhang zwischen Laufstrecke und Laufzeit auf HPTLC-Platten Kieselgel 60: Fließmittel: Toluol – Ethylacetat 19:1 (rot) und Ethylacetat – Methanol – Wasser – Ameisensäure 50:2:3:6 (blau)

¹ Diese ist jedoch nicht Gegenstand dieser Betrachtungen, weil das chromatographische Ergebnis aufgrund der Abwesenheit der Gasphase nicht vergleichbar ist mit solchen, die mit normaler Chromatogrammentwicklung erhalten werden.

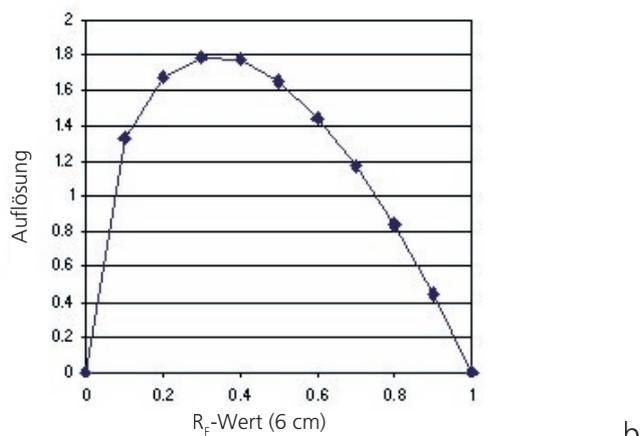
Werden alle anderen Parameter konstant gehalten, ist die Auflösung R_s zweier Komponenten von deren relativer Position im Chromatogramm (R_F) und auch von der Laufstrecke insgesamt abhängig. Die Auflösung (Resolution) wird gemäss der Gleichung nach Snyder berechnet:

$$R_s = 1/4 (\alpha - 1) (R_F \cdot N)^{1/2} \cdot (1 - R_F)$$

Abbildung 2 zeigt die Auftrennung zweier Komponenten in einem HPTLC System mit einer vorgegebenen Selektivität von $\alpha = 1,5$ als eine Funktion der Laufstrecken.



a



b

Abbildung 2 Einfluss der Laufstrecke und des R_F -Wertes (a) sowie des R_F -Wertes im Detail bei 6 cm Laufstrecke (b) auf die Auflösung $R_s = 1/4 (\alpha - 1) (R_F \cdot N)^{1/2} \cdot (1 - R_F)$, Selektivität $\alpha = 1.5$, Bodenzahl N aus²

Auf HPTLC-Platten wird die beste Auflösung bei einer Laufstrecke von 6 cm erreicht (siehe Abb. 2a). Bei den meisten Fließmitteln dauert eine Trennung auf Kieselgel-Schichten dann 7–20 min. Innerhalb eines Chromatogrammes ist die Trennung im R_F -Bereich von 0.3–0.4 am besten (siehe Abb. 2b). Aus diesem Grund soll die Lösungsmittelstärke des Fließmittels so angepasst sein, dass das kritische Substanzpaar in diesem Bereich zu liegen kommt.

² Poole CF, Poole SK: Chromatography today. Amsterdam: Elsevier Science, 1991, S. 666

Diese theoretischen Überlegungen können leicht experimentell nachgewiesen werden. Abbildung 3 zeigt die Trennung von Kamillenöl auf HPTLC-Platten Kieselgel 60. Betrachtet man im Chromatogramm von Abbildung 3a das Substanzpaar im R_F -Bereich 0.4–0.5, so scheint sich die Auflösung mit zunehmender Laufstrecke zu verbessern. Skaliert man jedoch die Chromatogramme auf die gleiche Grösse (Abb. 3b), ist ersichtlich, dass sich die relative Position der zwei Substanzen nicht ändert. Die Auflösung hat dennoch ihr Maximum bei 6 cm Laufstrecke. Generell nimmt der R_F -Wert mit zunehmender Laufstrecke ab. Dieser Effekt lässt sich mit der zunehmenden Beladung der Schicht mit flüchtigen Fließmittelkomponenten erklären. Der visuelle Eindruck lässt sich mit den auf die gleiche Grösse skalierten Analogkurven untermauern (Abb. 3c).

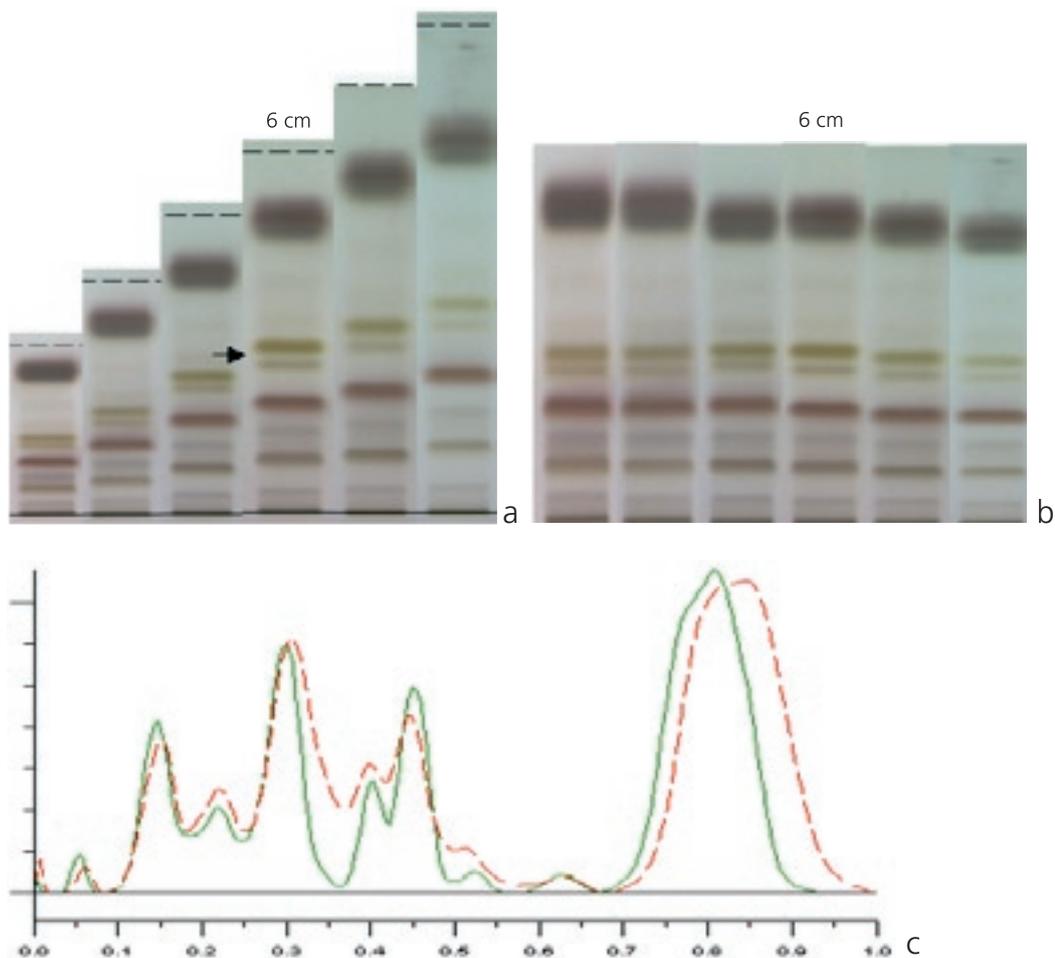


Abbildung 3 Trennung von Kamillenöl auf HPTLC-Platten Kieselgel 60. Fließmittel: Toluol – Ethylacetat 19:1, Derivatisierung durch Tauchen in 10% Schwefelsäure in Methanol

a) Chromatogramme bei ansteigenden Laufstrecken (3–8 cm)

b) Chromatogramme von a) auf die Grösse von Bahn 4 skaliert (Laufstrecke von 6 cm)

c) Analogkurven der Chromatogramme von 4 cm (rot) und 6 cm (grün) Laufstrecke

Praktische Hinweise:

Es ist empfehlenswert, HPTLC-Platten in einer gesättigten Kammer zu entwickeln, um die bestmögliche Reproduzierbarkeit zu erreichen.

Die Laufstrecke von 6 cm soll nicht überschritten werden. Die Komponenten von schwierigen Mischungen sollten möglichst gleichmässig über die gesamte Laufstrecke verteilt liegen. Zur Erreichung der bestmöglichen Trennung ist anzustreben, dass das kritische Substanzpaar bei ca. R_f 0.3 zu liegen kommt.



Die CAMAG Doppeltrogkammer gibt es für die Plattenformate 10x10, 20x10 und 20x20 cm.

Aus CBS 90, CAMAG Bibliography Service



CAMAG · Sonnenmattstrasse 11 · CH-4132 Muttenz 1 (Switzerland)
Tel. +41-614673434 · Fax +41-614610702 · info@camag.com

CAMAG · Bismarckstrasse 27-29 · DE-12169 Berlin (Germany)
Tel. +49-30 79570 81 · Fax +49-30 7957073 · info@camag-berlin.de

CAMAG Scientific Inc. · 515 Cornelius Harnett Drive · Wilmington, NC 28401 (USA)
Tel. +1-910 343 1830 · Fax +1-910 343 1834 · tlc@camagusa.com

Was ist aus dem Club de Chromatographie sur Couche Mince (CCCM) geworden?



◀ 8. Treffen des CCCM in Lyon im November 2002, hier: Prof. Jacques Pothier, Pierre Bernard-Savary, Prof. Friedrich Geiss, Erwin Malzacher (von links nach rechts)

Wir berichteten vor 4 Jahren im CBS 83 von der Gründung eines Clubs für Planar-Chromatographie in Frankreich. Dieser wurde auf Initiative von Monsieur Pierre Bernard-Savary* im September 1998 in Pommiers-la-Placette gegründet. Als Ziel setzte man sich, durch Erfahrungsaustausch unter den Mitgliedern, den Stand der Planar-Chromatographie anzuheben. Seitdem sind halbjährlich Seminare abgehalten worden, bei denen auch die Mitglieder über ihre jeweiligen Anwendungsbereiche referieren konnten und man sich in Diskussionen austauschen konnte. Der Club ist bei den Mitgliedern sehr gut angekommen.

Alle Mitglieder begrüßen und schätzen diese Art von Austausch sehr. Ihre Wertschätzung gegenüber der Planar-Chromatographie belegen sie in zahlreichen Vorträgen. Inzwischen fühlt man sich stark, dieses Verfahren selbstbewusst einzusetzen und gegen etwaige Unkenntnis der Arbeitskollegen durchzusetzen. Wo die Planar-Chromatographie als das am besten geeignete Verfahren abschneidet, setzen sie dieses bewusst als Methode der Wahl ein. Im November 2002 wurde das inzwischen 8. Treffen organisiert. Auf den nachfolgenden Seiten werden aus den letzten beiden Treffen Vorträge referiert.

Der Club umfasst etwa 90 Mitglieder (70% Industrie, 20% Universität und Administration, 10% Studenten). Der Kostenbeitrag beträgt pro Jahr EUR 150,- (Industrie), 75,- (Universität und Administration) bzw. 35,- (Studenten).

Nun auch ein internationales Symposium!

Herr Bernard-Savary wird mit Unterstützung des Clubs CCM in Fortführung der International Symposia on Instrumental Planar Chromatography, die bis 1997 in Interlaken abgehalten wurden, das Internationale Symposium vom 15.–18. Oktober 2003 in Lyon organisieren. Dies zeugt von einem regen Clubleben. Das Symposium wurde bereits im CBS 89 (letzte gelbe Seite) angekündigt. Teilnehmer und Vortragende aller Nationen sind dazu herzlich willkommen. Lassen Sie sich mit planar-chromatographischen Ideen und eleganten Problemlösungen anstecken.

Kontakt: Club de CCM, Mr. P. Bernard-Savary, l'Ancienne Eglise, F-38340 Pommiers-La-Placette, pbernardsavary@club-internet.fr oder www.clubdeccm.com

* P. Bernard-Savary war damals CAMAG Produktspezialist unserer Vertretung Merck-Frankreich. Inzwischen hat Herr Bernard-Savary die Firma Chromacim (steht für »Gipfel der Chromatographie«) gegründet, die CAMAG sehr erfolgreich in Frankreich vertritt.

Schnelle Analytik von Indol-Alkaloiden in pflanzlichen Zellkulturen

Vortrag beim 7. Treffen des Club de Chromatographie sur Couche Mince in Tours im Juni 2002



▲ Prof. Joel Creche, Dr. Françoise Andreu, Dr. Martine Courtois (von links nach rechts)

Prof. Creche* und seine Mitarbeiter beschäftigen sich seit über 20 Jahren mit dem Einsatz biotechnologisch hergestellter Pflanzenzellen in der pharmazeutischen Forschung. Insbesondere untersuchen sie den Biosyntheseweg von Indol-Alkaloiden in Zellsuspensionen von *Catharanthus roseus*.

Als Methode der Wahl setzt die Arbeitsgruppe hier die Planar-Chromatographie ein, denn nur sie bietet die erforderliche Schnelligkeit und Effizienz. Es können mit Leichtigkeit 50 Proben in 2 Stunden quantifiziert werden. Die HPTLC-Trennung dauert 1,7s pro Probe, wogegen die HPLC-Trennung 20 min pro Probe benötigt. Zur Chromatographie werden nur 0,15 mL Lösungsmittel pro Probe benötigt. Die Detektion ist zudem sehr elegant und stellt wieder einmal die Flexibilität der Planar-Chromatographie unter Beweis, denn Ajmalicin kann im Gegensatz zu anderen Verfahren sogar ohne Derivatisierung und zudem mit geringerer Nachweisgrenze detektiert werden. Im Vergleich zu anderen planar-chromatographischen Verfahren, die auf einer Derivatisierung mit Dragendorff-Reagenz basieren, ist die neu entwickelte Methode um den Faktor 250 empfindlicher, im Vergleich zur HPLC-UV oder PDA Detektion um den Faktor 8–10.

Einleitung

Die Pflanze Tropisches Immergrün (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don oder *Vinca rosea*) ist eine der wichtigsten Lieferanten der Vinca-Alkaloide, die bei der Behandlung von Krebs, insbesondere auch Leukämie, zum Einsatz kommen. Die antitumor wirksamen Alkaloide (z.B. Vinblastin und Vincristin) sind aber in nur sehr geringen Mengen in der Pflanze vorhanden. So ergeben 1 t getrockneter Blätter nur 5 mg Vincristin. Bedingt durch die geringe naturgegebene Ausbeute ist man bestrebt, die Alkaloide in pflanzlichen Zellkulturen biosynthetisch herzustellen. Bei der Erforschung der optimalen Biosynthese-Bedingungen muss eine große Anzahl Proben mit sehr geringem Analytgehalt untersucht werden.

Nachfolgend wird die Bestimmung von Ajmalicin und Serpentin als Marker der Biosynthese aus Zellkulturen beschrieben.

Probenvorbereitung

Gefriergetrocknete Zellen werden mit einem Mörser zerkleinert, davon werden 25 mg mit 1 mL Methanol 1 h unter Ultraschall extrahiert, 5 min zentrifugiert und 0,5 mL des Überstandes in ein Probegläschen gefüllt.

Schicht

HPTLC Platten Kieselgel 60 (Merck), 20 × 10 cm, vorgewaschen

Probenauftragung

Bandförmig mit DC-Probenautomat, 52 Bahnen (26 pro Seite), Bandlänge 3 mm, Auftragevolumen 1 µL, unterer Randabstand 8 mm, seitlicher Randabstand 10 mm, Bahnabstand 7 mm

Chromatographie

In der Horizontal Entwicklungskammer 20 × 10 cm von beiden Seiten mit je 4 mL Ethylacetat – Diethylamin 9:1, Laufstrecke 25 mm, Laufzeit 1,5 min

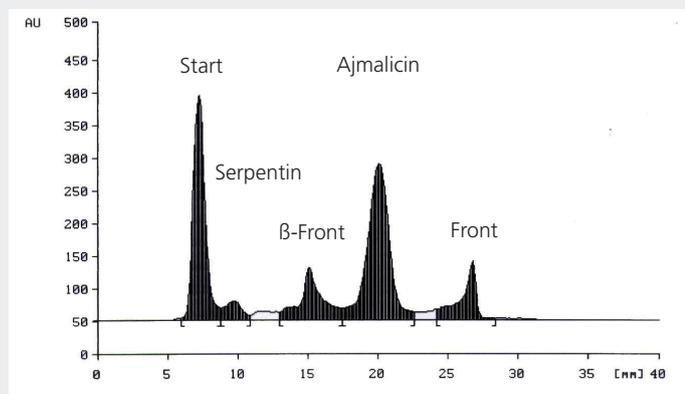
Fluoreszenzgenerierung und -verstärkung

Serpentin fluoresziert nativ, Ajmalicin fluoresziert – vermutlich durch Photo-Oxydation – nach 4 min Bestrahlung mit kurzwelligem UV 254 nm (CAMAG Reprostar oder UV-Lampe**). Dieser einfache Zwischenschritt, bei dem auf der Platte simultan 52 Proben durch Bestrahlung zur Fluoreszenz gebracht werden, ist sehr zeitsparend.

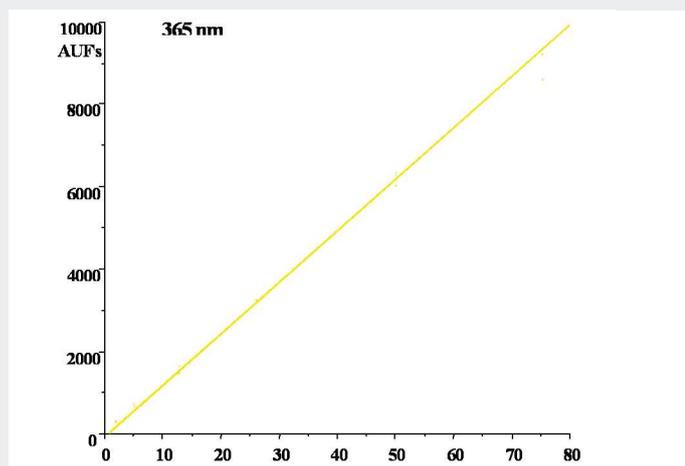
Bemerkung: Falls die Fluoreszenz im Bereich der Nachweisgrenze nicht ausreicht, kann die Platte 15 s in Paraffinöl – n-Hexan 1:3 getaucht werden (Chromatogramm-Tauchvorrichtung). Dieser zeitsparende Schritt verstärkt die Fluoreszenz um den Faktor 3 und erübrigt somit eine erneute Chromatographie.

Densitometrische Auswertung

TLC-Scanner 3 mit CATS Software, Fluoreszenzmessung bei 254 nm oder 365 nm (im Bereich der Nachweisgrenze ist 254 nm aufgrund der geringeren Hintergrund-Fluoreszenz vorzuziehen), lineare Kalibration über die Peakfläche und -höhe, Nachweisgrenze von Ajmalicin 2 ng und Serpentin 0,5 ng.



▲ Densitogramm einer Zellprobe mit Ajmalicin und Serpentin



▲ Lineare Kalibration von Ajmalicin, Korrelationskoeffizient 0,999

Eine Kopie des Vortrages ist bei dem Autor (creche@univ-tours.fr) auf Anfrage erhältlich.

* Prof. Joel Creche, Plant Molecular Biology and Biochemistry Department, EA 2106, Plant Biocompounds and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Tours, 31 avenue Monge, F-37200 Tours, France

**Creche et al. benutzten UV Crosslinker (Amersham Life Science)



19

Horizontal-Entwicklungskammer

Die Entwicklung in der Horizontal-Entwicklungskammer (HDC, Horizontal Developing Chamber) erweist sich in diesem Beispiel als sehr zeitsparend. Sie erlaubt es, die Platte von beiden gegenüberliegenden Seiten zur Mitte zu entwickeln und damit die Probenzahl pro Platte gegenüber herkömmlichen Entwicklungstechniken zu verdoppeln. Hier werden z. B. 52 Proben zeitgleich in 1,5 min entwickelt.

Für die eigentliche Entwicklung werden nur 4ml Fließmittel pro Seite benötigt. Somit ist die HDC auch hier im Vergleich zu anderen Kammertypen am sparsamsten.

Ihre einfache Handhabung beim Konditionieren in der Tank-Konfiguration oder bei der Entwicklung in der Sandwich-Konfiguration machen sie sehr flexibel. Die HDC ist unübertroffen ökonomisch, vielseitig und im Betrieb gut reproduzierbar (siehe auch Seite 6).

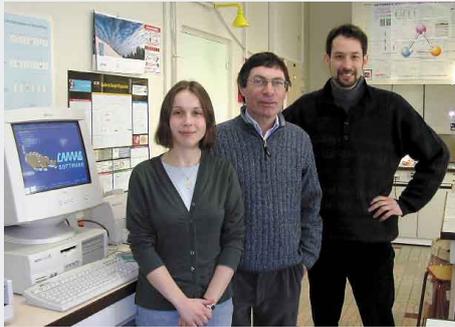


▲ Tropisches Immergrün

20

Monitoring von Proinsektiziden (Oxazolinen) in biologischen Proben

Vortrag beim 7. Treffen des Club de Chromatographie sur Couche Mince in Tours im Juni 2002



▲ Dr. M. Beaufour, Prof. J.-C. Cherton und A. Carlin-Sinclair (von links nach rechts)

Die Planar-Chromatographie ist an Schnelligkeit unübertroffen und als direktes analytisches Verfahren hervorragend geeignet. Die Proben werden nicht gereinigt, sondern nur verdünnt direkt auf die Platte aufgetragen. Ein Verschleppen von Matrix ist hier nicht möglich, da die Schicht nur einmal benutzt wird. Ein Vergleich der Planar-Chromatographie mit der ¹⁹F-NMR zeigt zudem, dass beide Verfahren bezüglich der Aktivierung bzw. Hinderung der Proinsektizide gleiche Ergebnisse liefern. Beide Verfahren können bezüglich des fluorierten Oxazolin Ia auch zur gegenseitigen Validierung eingesetzt werden.**

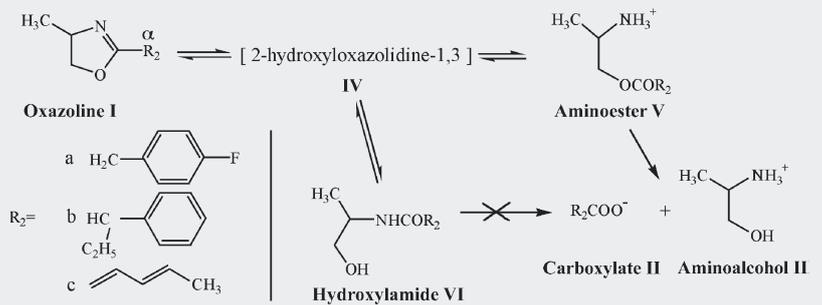
Eine Kopie der Original-Veröffentlichung im J. Chromatogr. B, 761 (2001) 35–45 ist bei CAMAG oder den Autoren (beaufour@chimie.uvsq.fr) auf Anfrage erhältlich.

* Dr. M. Beaufour, Laboratoire Sircob, Bat. Lavoisier, 45 avenue des Etats-Unis, F-78035 Versailles Cedex

** hinsichtlich Trennzeit pro Probe als auch Zeitaufwand der Methodenentwicklung

Einleitung

Das Arbeitsgebiet von M. Beaufour*, J. C. Cherton und A. Carlin-Sinclair liegt seit 15 Jahren u.a. im Bereich der Proinsektizid-Forschung. Sie untersuchen unter anderem proaktive Komponenten, wie Oxazoline und N-Acylaziridine, die aktive Prinzipien mit insektizider Wirkung maskieren. Oxazolin (I) setzt z.B. als aktive Prinzipien Carboxylat (II) und β-Aminoalkohol (III) leicht frei. Beim Monitoring wird nun beobachtet, ob der Metabolismus der Startkomponente stattfindet, wenn Oxazolin im biologischem Medium von Insekten vorhanden ist. Zum Monitoring verwenden sie als direkte analytische Verfahren die HPLC und NMR. Im Falle der Bestimmung von nicht-fluorierten Oxazolinen wenden sie jedoch die nachfolgend beschriebene Methode an.



▲ Schema der hydrolytischen Spaltung und des Stoffwechselweges von Oxazolin

Probenvorbereitung

Fettkörper und Mesenterium der Heuschrecke werden aufgetaut, gemahlen und zentrifugiert (260 mg Fettkörper vor dem Mahlen mit 400 µL Phosphatpuffer verdünnen). 5% Acetonitril werden zugesetzt, um in den gewünschten Konzentrationsbereich zwischen 5×10^{-3} M und 5×10^{-4} M Oxazolin zu kommen. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten werden die Proben 1:4 mit einer Lösung von Acetonitril – Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7.4) 5:95, verdünnt, so dass die absoluten Auftragemengen im Bereich von 0.13–1.25 µg liegen.

Schicht

DC-Alufolien RP 18 (Merck), 20 x 20 cm (zugeschnitten auf 10 x 10 cm)

Probenauftragung

Bandförmig mit DC-Probenautomat, 7 Bahnen, Bandlänge 6 mm, Auftragevolumen 5 µL, unterer Randabstand 10 mm, seitlicher Randabstand 20 mm, Bahnabstand 10 mm

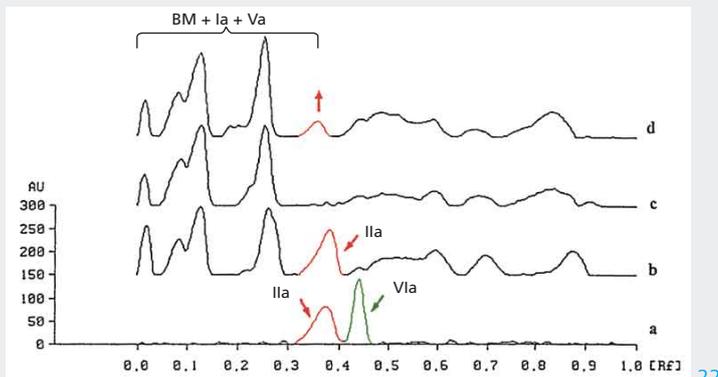
Chromatographie

In der Doppeltrogkammer, Laufzeit 30 min (ca. 5 min pro Probe), Monitoring des Metabolismus von

- Oxazolin Ia mit Umkehrphasen-Chromatographie: Fokussierung mit Methanol über 10 mm, dann Chromatographie mit Wasser – Acetonitril 1:1, Laufstrecke 55 mm
- Oxazolin Ia mit Ionenpaar-Chromatographie: vor dem Auftragen Platte in 2 mM Cetyltrimethylammoniumbromid (CTMA Br) tauchen, Chromatographie mit Phosphatpuffer – Acetonitril 1:1, Laufstrecke 60 mm
- Oxazolin Ib und Ic: Chromatographie mit Wasser – Acetonitril – Dioxan 4:3:3, Laufstrecke 65 mm

Densitometrische Auswertung

TLC-Scanner 3 mit CATS Software, Absorptionsmessung von Oxazolin Ia, Ib und deren verwandte Komponenten bei 200 nm sowie Oxazolin Ic und deren verwandte Komponenten bei 262 nm.



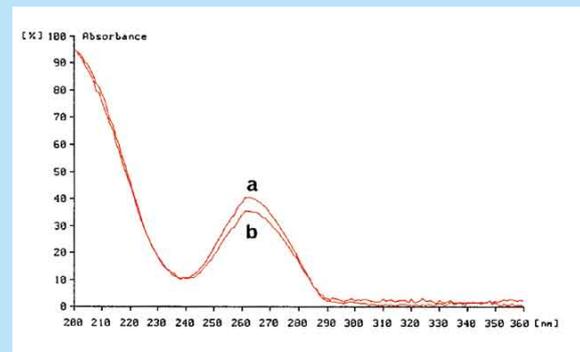
▲ Monitoring des Oxazolin Ia Metabolismus im Heuschrecken-Mesenterium mit Ionenpaar-Chromatographie: a = Standard IIa und VIa, b = Standard IIa im Mesenterium, c = biologische Blindprobe (BM), d = nach 3 stündiger Inkubationszeit von Oxazolin Ia im biologischen Medium

UV-Spektren von Carboxylat IIa zur Identifizierung ►
(a = Standard, b = Probe)



CAMAG DC-Probenautomat 4 (ATS 4)

Beim Monitoring von Proinsektiziden setzen M. Beaufour et al. noch das Vorgängermodell, den DC-Probenautomat 3 ein. Das Gerät wurde inzwischen überarbeitet und optimiert. Der DC-Probenautomat 4 (ATS 4) trägt Substanzen unter einer Abdeckhaube auf, um während der Auftragung die Platten vor Umwelteinflüssen zu schützen. Die Bedienung erfolgt über winCATS und weist einen hohen Komfort auf. Bei unterschiedlich dicken Objekten justiert sich die Objektauflage selbst. Die Sprühdüse muss nicht mehr nachjustiert werden. Neben dem Standardrack kann auch ein Spezialrack für Titerplatten eingesetzt werden. Das automatisierte Probenauftragen ermöglicht Präzision und Robustheit im Routinebetrieb mit GLP/GMP-Konformität.



Bestimmung von Antibiotika in Abwasser nach der biologischen Klärstufe

Vortrag beim 8. Treffen des Club de Chromatographie sur Couche Mince in Lyon im November 2002



▲ P. Charbinat, L. Vicard, F. Dubost (von links nach rechts)

Louise Vicard* leitet das Labor »Site Production Support« von Aventis Pharma in Neuville sur Saône, das vor Ort für die Produktionsunterstützung eingerichtet wurde. Das Team beschäftigt sich mit Qualitäts- und Prozessverbesserungen, In-Prozess-Kontrolle sowie Umwelt-, Hygiene- und Sicherheits-Monitoring bezüglich Wasser, Luft und Atmosphäre.

Einleitung

Für die Produktion eines neuen Antibiotikums verlangen die Behörden seit kurzem die Weiterverfolgung des Produktes im Abwasser nach der biologischen Klärstufe. Die Kontrolle muss viertelstündlich über eine Woche erfolgen. Die erforderlichen Nachweismengen liegen im ppm-Bereich.

Für die Abwasseranalytik wählten Louise Vicard und ihr Team die Planar-Chromatographie, weil sie im Vergleich zur HPLC schneller (Chromatographie ca. 1 min pro Probe) und robuster gegenüber Matrix ist. Zudem kann die Probenvorbereitung entfallen und das Abwasser direkt auf die Platte aufgetragen werden. Eine Matrixverschleppung ist aufgrund der einmaligen Benutzung der Schicht nicht gegeben.

* Louise Vicard, Aventis Pharma S.A, LAPS, 31–33 Quai Armand Barbès, F-69583 Neuville-sur-Saône (louise.vicard@aventis.com)

Schicht

HPTLC Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), 20 × 10 cm

Probenauftragung

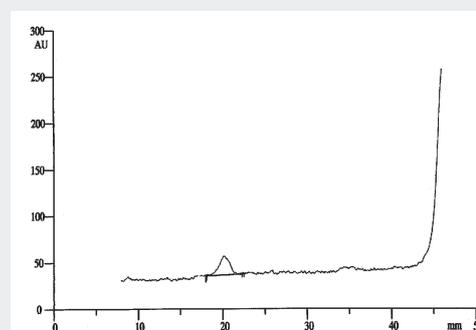
Bandförmig mit DC Probenautomat, 18 Bahnen, Bandlänge 5 mm, Auftragsvolumen für das Screening 1,25 und 2,5 µL (Standardlösung von 0,04 g/L in Chloroform) sowie 20 µL (Proben), unterer Randabstand 10 mm, seitlicher Randabstand 15 mm, Bahnabstand 10 mm

Chromatographie

In der automatischen Entwicklungskammer (ADC) mit Dichlormethan – Methanol – Ammoniak 90:10:1, Laufzeit 20 min, Laufstrecke 50 mm

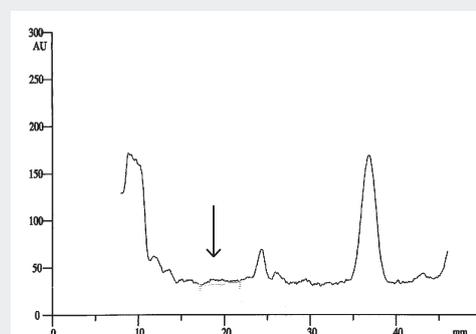
Densitometrische Auswertung

TLC-Scanner 3 mit CATS Software, Absorptionsmessung bei UV 270 nm. Michaelis Menten-Kalibration über die Peakfläche zur Bestimmung der Nachweisgrenze bei 0,01 µg (1 ppm) und der Bestimmungsgrenze bei 0,02 µg (2 ppm).



▲ Standardbahn mit 0,05 µg Antibiotikum (5 ppm)

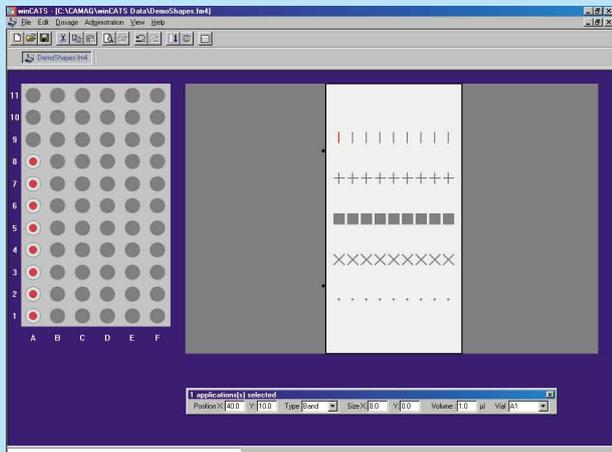
26



▲ Abwasserprobe mit negativem Befund (Nachweis des Antibiotikums unter 1 ppm)

27

CAMAG DC-Probenautomat 4 jetzt auch mit Option »FreeMode«



▲ FreeMode-Programmfenster mit Darstellung einer Auswahl von Auftragsvarianten

Der CAMAG DC-Probenautomat 4 (ATS4 = Automatic TLC Sampler 4) bietet vollautomatisches Probenauftragen für die qualitative, quantitative und präparative Planar-Chromatographie. Er ist hervorragend ausgelegt für Screening und Massenanalytik. Im Standardprogramm können Proben wahlweise punktförmig durch Kontaktübertragung oder strichförmig bzw. bei größeren Volumina rechteckförmig durch Sprühen aufgetragen werden. Die Gestaltungsmöglichkeit des Auftragemusters entspricht dabei dem üblichen planar-chromatographischen Zweck.

Die Option »FreeMode« erlaubt nun den Einsatz des DC-Probenautomat 4 für eine Vielzahl von Anwendungen auch ausserhalb der Planar-Chromatographie. Zum Auftragen von Lösungen auf jedwede Stelle planarer Medien stellt die FreeMode-Option die freie Ansprechbarkeit aller Funktionen und völlige Gestaltungsfreiheit zur Verfügung.

Diese Gestaltungsfreiheit nutzen Test-Kit-Hersteller zum Auftragen von Antigen-/Antikörper-Lösungen auf Nitrocellulose-Membranen. Sie tragen z.B.

- Kreuze mit dazwischen liegenden farbigen Punkten (zur Orientierung beim Zerschneiden der Bögen zu einzelnen Test-Kits) oder auch
- Mehrere lange Linien übereinander (aus 3 bis 5 Linien bestehende Gruppen) auf.

Aber auch Nutzer der Planar-Chromatographie haben mit der FreeMode-Option einige Vorteile:

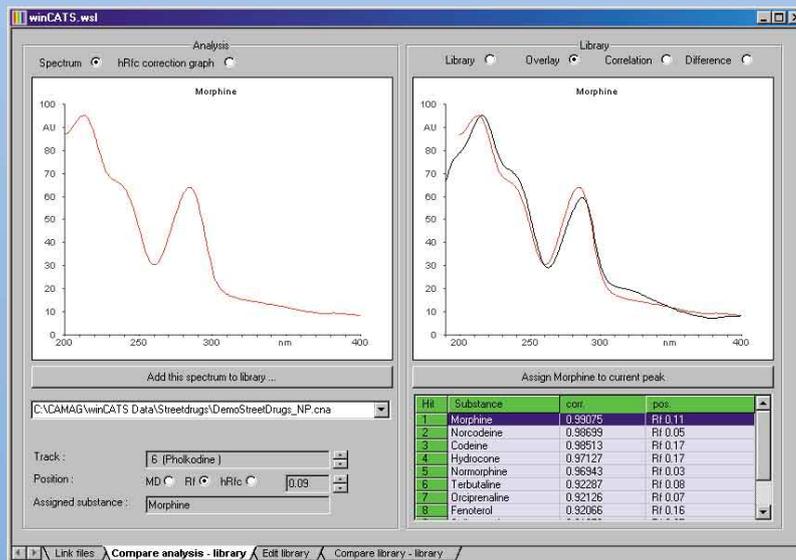
- Es können Banden überlappend aufgetragen werden. Dies ist von Vorteil, wenn die Laufstrecken von Standard und Probe bedingt durch den Matrixeinfluss nicht identisch sind. Eine überlappende Auftragung von Probe- und Standardzone gibt im resultierenden Chromatogramm Auskunft über die richtige Zuordnung.
- Für die kombinatorische Chemie oder beim High Throughput Screening kann auf bis zu 3 Platten 20×10 cm bzw. 6 Platten 10×10 cm aus einer Datei aufgetragen werden. Dabei kann wahlweise aus Mikrotiterplatten aufgetragen werden, z.B. aus einer 96 Loch-Titerplatte auf 3 Platten mit je 32 Proben (16 Proben jeweils auf den gegenüberliegenden Seiten jeder Platte).
- An allen Seiten der Platte kann für eine zweidimensionale Chromatographie aufgetragen werden. Bei der Methodenentwicklung wird z.B. die Robustheit des Verfahrens mit einer zweidimensionalen Chromatographie belegt. Hier wird mit dem gleichen Fließmittel nach einer bewussten Beeinflussung auch in der zweiten Richtung entwickelt. Liegen die Standards auf der Diagonalen, d.h. haben sie trotz der Einwirkung die gleiche Laufstrecke zurückgelegt, wirkt sich diese Einwirkung nicht negativ auf die Robustheit des Verfahrens aus. Oder für die zweidimensionale Rückstandsanalytik nach Ph. Eur., bei der 4 Proben, in den Ecken einer Platte aufgetragen, beidseitig mit zwei verschiedenen Fließmitteln chromatographiert werden.

Naturgemäss ist der Aufwand für die Parametereingabe im FreeMode grösser als beim Standardprogramm, doch kann eine einmal erstellte Methode beliebig oft wiederbenutzt und variiert werden. Die Bedienung im winCATS ist sehr angenehm. Die Anwendung ist GLP/GMP-konform.

Der Spezialprospekt ATS 4 ist erhältlich bei sales@camag.com

Neues von *winCATS* Planar Chromatography Manager

Spektren- bibliothek



Programmfenster mit Probenspektrum (links) ▶
und Vergleich mit dem markierten Bibliotheks-
treffer (rechts)

Die Spektrenbibliothek gibt es jetzt in winCATS.

Alle bewährten Funktionen der bisherigen Spektrenbibliothek wurden integriert, wie

- Vergleich der Spektren unbekannter Substanzen mit denen einer Bibliotheksdatei.
- Vergleich von Spektren aus zwei Bibliotheken.
- Aufstellung einer Hitliste mit den besten Treffer-Spektren. Als Suchparameter können wie bisher die Position (R_F , hR_{FC} , MD) und die Korrelationsgrenze eingegeben werden. Zudem können jetzt die chromatographischen Trennbedingungen (Schicht, Fließmittel oder Fließmitteltyp, i.e. alkalisch, neutral, sauer) in der Suche berücksichtigt werden.
- Grafische Darstellung der Korrelation, des Spektrenvergleichs, der Spektrendifferenz
- Individuelle Gestaltung des Protokolls, z.B. mit Hitliste, Spektrenvergleich etc

Was ist neu in der Spektrenbibliothek?

- Die Anzahl der Spektren, die jetzt in einer Bibliothek gespeichert werden können, ist unbegrenzt
- Die Suchkriterien wurden um die chromatographischen Trennbedingungen erweitert (siehe links)
- Während der Zuordnung von Fraktionen zu Substanzen (Spotcheck) kann die Bibliothek sowohl für die Zuordnung unbekannter Zonen als auch für die Bestätigung der automatischen Laufstreckenzuordnung eingesetzt werden
- Aus der umfassenden Bibliotheksdatei kann eine Untergruppe nach Suchbegriffen wie Anwendungsbereich (z.B. Kosmetika, Lebensmittel oder Umwelt), Schicht, Fließmittel oder Fließmitteltyp zusammengestellt werden. Somit erübrigt es sich nun, diverse Spektrenbibliotheken einzurichten, z.B. je nach verwendeter Schicht

Bereits mit CATS unter MS-Windows erstellte Bibliotheksdateien (.scl) können importiert und in das neue Format (.wsl) konvertiert werden. Auch besteht die Möglichkeit, bei CAMAG frühere CATS Bibliotheksdateien (.dsl) in das neue Format konvertieren zu lassen.

Eine Spektrensammlung mit über 750 Spektren basischer, amphoterer und quaternärer Drogen ist von CAMAG erhältlich. Diese kann zum Screening bei toxikologischen und forensischen Fragestellungen eingesetzt werden.

Verlangen Sie die neueste winCATS Demo-CD bei sales@camag.com
Sie enthält auch Analysenbeispiele und Spektrendaten.