

Workshop Dünnschicht-Chromatographie Bern 2006

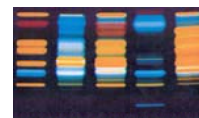
*Praktische Einführung in die Dünnschicht-Chromatographie für
Restauratoren an ausgewählten Beispielen kunsttechnologisch
relevanter Bindemittel*

Martina Schulz

www.archaeometrielabor.com

HAWK HAWK HOCHSCHULE
FÜR ANGEWANDTE
WISSENSCHAFT UND KUNST
Fachhochschule Hildesheim / Holzminden / Göttingen

© 2001-2006 Archäometrielabor



Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------------|---|-----------------|
| 1. | Einleitung | Seite 2 |
| 2. | Was ist Dünnschicht-Chromatographie? | Seite 5 |
| 3. | Warum Dünnschicht-Chromatographie? | Seite 5 |
| 4. | Praktische Durchführung | Seite 7 |
| 4.1 | Auswahl der DC-Platten | Seite 8 |
| 4.2 | Fliessmittel, die mobile Phase | Seite 10 |
| 4.3 | Auftragen und Entwickeln | Seite 13 |
| 4.4 | Trocknen nach der Entwicklung | Seite 20 |
| 4.5 | Detektion der getrennten Substanzen | Seite 20 |
| 4.5.1 | Detektion ohne Derivatisierung | Seite 21 |
| 4.5.2 | Detektion mit Derivatisierung | Seite 22 |
| 4.6 | Fotodokumentation | Seite 25 |
| 4.7 | Analysenergebnis | Seite 26 |
| 5. | Ausgewählte Bindemittel | Seite 27 |
| 5.1 | Wachse | Seite 28 |
| 5.2 | Harze | Seite 29 |
| 5.3 | Pflanzliche Leime | Seite 30 |
| 5.4 | Tierische Leime | Seite 31 |
| 6. | Literatur | Seite 32 |
| 7. | Glossar | Seite 34 |



1. Einleitung

Der Begriff *Chromatographie* (wörtlich „mit Farbe schreiben“) geht auf den italienisch-russischen Zellphysiologen Tswett (russisch Cvet, Michail Semenovitšch) zurück [Pötsch87]. Er beschreibt 1906 als Erster in den *Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft* ein kontinuierlich arbeitendes Verfahren, mit dem es ihm gelang, die verschiedenen Blattfarbstoffe voneinander zu trennen [Gros 89, Wintermeyer 89]. Das Herzstück seiner Apparatur war ein mit gefälltem Calciumcarbonat gefülltes Glasrohr. Auf diese „CaCO₃-gefüllte Glassäule“ gab Tswett den methanolischen Extrakt grüner Pflanzenblätter, die den „Kopf der gefüllten Säule“ dunkelgrün färbten. Die Farbstoffe werden an der Oberfläche des Füllmaterials Calciumcarbonat gebunden. Dieser Vorgang –auf den wir noch ausführlicher zu sprechen kommen- wird allgemein als **Adsorption** bezeichnet. Anschließend liess Tswett Petrolether durch die Säule fließen. Während dieser **Elution** (zu lat. *eluere* >auswaschen<, >ausspülen<) machte Tswett die erstaunliche Beobachtung, dass sich der anfänglich schmutzig-grüne Säulenanfang in orange, gelb und grün gefärbte Zonen „auftrennte“. Mit fortschreitender Elutionszeit trennten sich die farbigen Zonen innerhalb der gefüllten Säule vollständig voneinander, so dass die einzelnen Fraktionen nacheinander und gut voneinander getrennt am Ausgang der Säule im Petrolether-**Eluenten** gelöst „aufgefangen“ werden konnten. Diese buchstäbliche **Entwicklung** der einzelnen Farbstoffkomponenten brachten Tswett vermutlich auf den Namen für sein Trennverfahren: **Chromatographie** (zu griech. *chrōma* >Farbe< und *gráphein* >schreiben<, >zeichnen<). Die „Tswettsche Chromatographie“ ist nach unserem heutigen Verständnis eine **Säulenchromatographie** und die erste **Adsorptions-Elutionschromatographie** überhaupt.

Heute steht der Begriff **Chromatographie** als Synonym für eine Vielzahl hochtechnisierter Trenn- und Analysemethoden in der modernen instrumentellen Analytik. Schätzungen nach bedienen sich etwa 60 Prozent aller weltweit ausgeführten Analysen [Keller 98] chromatographischer Verfahren.

Die beeindruckende Tswettsche Blattfarbstofftrennung in ihrer dünnenschichtchromatographischen Variante [Koch 95] setzt wegen der Lichtempfindlichkeit des Chlorophylls einige experimentelle Erfahrungen voraus, so dass wir in der einleitenden Demonstration zur Handhabung der Dünnschicht-Chromatographie auf ein synthetisches Farbstoffgemisch zurückgreifen werden.

Es wurden bereits eine Reihe von Begriffen genannt, die für das Verständnis der Methode **Chromatographie** ganz allgemein wichtig sind. Im folgenden werden wichtige Begriffe im Text durch Fettdruck hervorgehoben und im Anhang in einem Glossar zusammengestellt und kurz erklärt.



Kommen wir noch einmal auf die Säulenchromatographie zurück. In Abb. 1 ist eine mit Feststoff gefüllte Säule schematisch dargestellt. Der Füllstoff wird als **stationäre Phase** bezeichnet. Der zeitliche Verlauf der fortschreitenden **Elution** der Probe ist ebenfalls dargestellt.

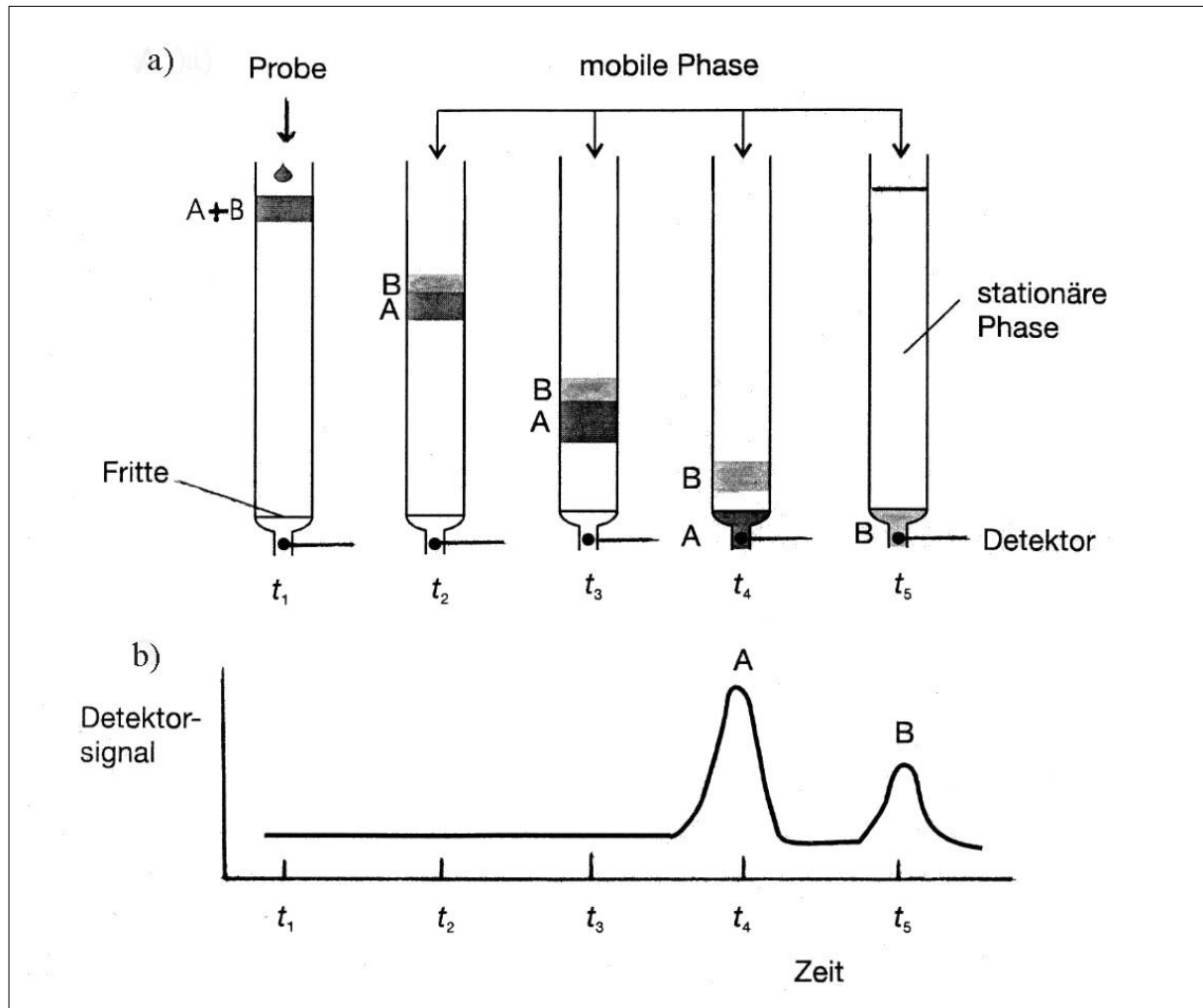


Abb. 1: Schema einer Trennung von zwei Stoffen A und B mit Hilfe der Säulenchromatographie.
 a) Entwicklung des inneren Chromatogramms an der stationären Phase und
 b) äußeres Chromatogramm, das am Detektor registriert wird [nach: Otto 95].

Die Probe besteht aus einem Stoffgemisch von A und B (z.B. A: grünes Chlorophyll und B: gelbes Xanthophyll). Dieses Gemisch befindet sich zu Beginn der Trennung (Zeit $t_1 = 0$) am Säulenanfang. Im anschließenden Elutionsprozess wird kontinuierlich eine Flüssigkeit, z.B. Petrolether, über die **stationäre Phase** geschickt. Die Flüssigkeit bewegt sich hier infolge der Schwerkraft durch die Säulenfüllung. Diese Flüssigkeit wird allgemein als **Elutionsmittel** oder **mobile Phase** bezeichnet. Der eigentliche Trennprozess findet auf Wegstrecke zwischen Säulenanfang und Säulenende statt.



Der Trennprozess besteht im wesentlichen aus drei Schritten:

- Der **Adsorption** von A und B an der stationären Phase,
- der Verdrängung und **Desorption** von A und B durch Adsorption von Elutionsmittel an der stationären Phase und
- der vielfachen Wiederholung von Adsorption und Desorption an noch nicht stoffbeladener Oberfläche der stationären Phase mit räumlich und zeitlich fortschreitender **Elution**.

In unserem Experiment sind A und B farbige Substanzen. Die Auftrennung der beiden Stoffe A und B in farbige Zonen entlang der Säule ist unmittelbar zu erkennen. Idealerweise führen diese wiederholten Adsorptions- und Desorptionsprozesse bereits innerhalb der Säule zur vollständigen Trennung der Stoffe A und B noch bevor die Stoffe aus der Säule gespült werden. Die Stoffe verbleiben auf der Trennsäule und werden nicht „ausgewaschen“. Man spricht dann von **innerer Chromatographie**. Die örtliche Verteilung entlang der Trennstrecke wird als **inneres Chromatogramm** bezeichnet.

Erfolgt die Elution bis zur vollständigen Verdrängung der aufgetragenen Probe von der Säule, dann spricht man von **Elutions- oder äußerer Chromatographie**. Zur Registrierung des zeitlichen Verhaltens der Elution wird ein **Detektor** am Ende der Säule angebracht, der die Veränderungen im **Eluenten** gegenüber dem reinen Elutionsmittel anzeigt. Als Detektorsignal eignen sich z.B. Veränderungen der elektrischen Leitfähigkeit, des optischen Brechungsindex oder der Lichtabsorption. Die graphische Darstellung des Detektorsignals (Stärke bzw. Intensität) in Abhängigkeit von der Zeit (**Verweilzeit**) wird allgemein Chromatogramm genannt. Es ist ein äußeres Chromatogramm. Die Verweilzeit wird auch als **Retentionszeit** bezeichnet. Für festgelegte Trennbedingungen (Art der stationären und mobilen Phase, Temperatur, Druck, Fließgeschwindigkeit) ist die Retentionszeit für einen bestimmten Stoff charakteristisch.

In Abb. 1a und 1b sind innere und äußere Chromatographie und die entsprechenden Chromatogramme gegenüber gestellt. Wir wenden uns nun der Dünnschicht-Chromatographie zu. Die Dünnschicht-Chromatographie ist eine innere Chromatographie. Für die Trennung steht nur eine relativ kurze Trennstrecke zur Verfügung. Wie wir gleich zeigen werden, würde eine Verlängerung der Trennstrecke nicht zur Verbesserung der Trennleistung führen. Der große Vorteil der Dünnschicht-Chromatographie gegenüber allen anderen chromatographischen Verfahren ist die Möglichkeit zur direkten Parallelanalyse. Die Gleichzeitigkeit der Analyse von mehreren Proben in ein und demselben Analysengang ist für die vergleichende Bindemittelanalytik von großer Wichtigkeit und gibt der Dünnschicht-Chromatographie ein besonderes Gewicht.



2. Was ist Dünnschicht-Chromatographie?

Die **Dünnschicht-Chromatographie** (DC, TLC) gehört zur **Planarchromatographie**. Die stationäre Phase ist auf einem ebenen Träger fixiert. Dieser Träger ist in der Regel aus Glas, Kunststoff oder Aluminium. Bei der **Papierchromatographie** ist die stationäre Phase gleichzeitig auch Träger.

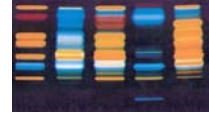
Die chromatographischen Techniken werden oft nach dem Aggregatzustand der beiden Phasen eingeteilt:

- Gas - Flüssig Chromatographie GLC (gas-liquid chromatography)
- Gas - Fest Chromatographie (GSC (gas-solid chromatography)
- Flüssig - Flüssig Chromatographie LLC (liquid-liquid chromatography)
- Flüssig - Fest Chromatographie LSC (liquid-solid chromatography)

Die Dünnschicht-Chromatographie erfolgt nach der LSC-Technik. Man bezeichnet alle Verfahren, die mit flüssiger mobiler Phase in einer Säule oder planaren Schicht arbeiten, als Flüssigchromatographie **LC** („Flüssigchromatographie“ hat sich gegen den sprachlich korrekten Ausdruck „Flüssigkeitschromatographie“ durchgesetzt). Zur Flüssigchromatographie zählt auch die **HPLC** (High Performance Liquid Chromatography), die hochauflösende Flüssigchromatographie. Das Akronym **HPTLC** steht für hochauflösende Dünnschicht-Chromatographie (High Performance Thin-Layer Chromatography). Beides sind LC-Verfahren. In beiden Verfahren wird die stationäre Phase aus sehr kleinen, runden Sorbentien mit nahezu gleicher Teilchengröße gebildet. Bei der HPLC wird die mobile Phase unter sehr hohem Druck durch die stationäre Phase gepresst. Deshalb ist die stationäre Phase in einer druckfesten Säule untergebracht. Bei der HPLC erfolgt die Bewegung der mobilen Phase unter Normaldruck durch das Wirken der Kapillarkräfte („Löschpapier-Effekt“). Die Dünnschicht-Chromatographie ist somit die Flachbett-Variante der Flüssigchromatographie. Wir werden die mobile Phase der Dünnschicht-Chromatographie im folgenden stets als **Fliessmittel** bezeichnen, um auf das Prinzip der inneren Chromatographie aufmerksam zu machen. Die Begriffe **Elution** und **Elutionsmittel** sind allgemeiner und sollten immer in Zusammenhang mit der äußeren Chromatographie gebraucht werden.

3. Warum Dünnschicht-Chromatographie?

Die Dünnschicht-Chromatographie (DC) ist für die qualitative organische Analyse sehr gut geeignet. Mit der DC ist das parallele Bearbeiten vieler Proben auf einer DC-Platte möglich. Diese „Gleichzeitigkeit“ der Analysen ist bei keiner anderen chromatographischen Methode gegeben. Gerade in der Bindemittelanalytik ist diese parallele Entwicklung von verschiedenen Referenzmaterialien neben den unbekanntem Bindemittelproben von großem Vorteil für die anschließende Interpretation der Trennungen.



Durch die unmittelbare Vergleichbarkeit vieler verschiedener Proben auf einer DC-Platte ist die Dünnschicht-Chromatographie oft die einzige Methode, die tatsächlich eine Bindemittel-identifizierung gestattet. In Abb. 2 sind weitere Vorteile der DC „rund um die DC-Platte“ zusammengestellt.

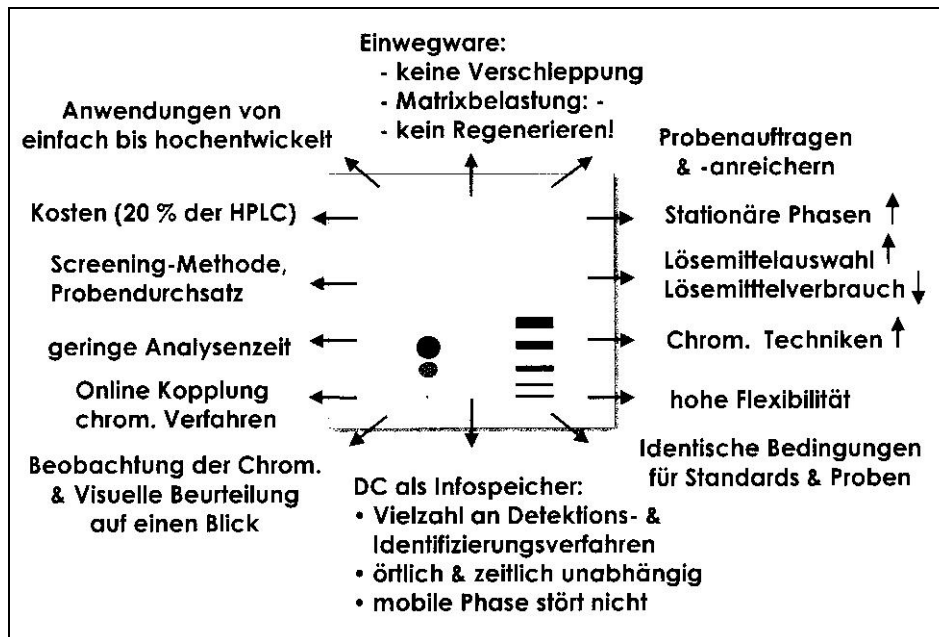
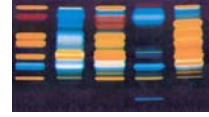


Abb. 2. Die Vorteile der modernen, instrumentellen Dünnschicht-Chromatographie [nach Morlock 97]

Natürlich hat auch die DC ihre Grenzen. Die DC ist ein offenes System, d.h. zum eigentlichen Zwei-Phasen-System (mobile und stationäre Phase) kommt die Gasphase hinzu. Über die Gasphase werden die Phasengleichgewichte zusätzlich beeinflusst. Fließmittelgemische verändern während der Trennung ihre Zusammensetzung. Durch den offenen Kontakt der DC-Platten mit der Umgebungsatmosphäre kommt es zu einer schwer reproduzierbaren Wasseraufnahme und anderer möglicher Fremdadsorptionen, die die Aktivität der stationären Phase stark beeinflussen. Wesentlicher Nachteil der DC ist die stetig abnehmende Fließgeschwindigkeit während der Entwicklung. Mit abnehmender Fließgeschwindigkeit nimmt die Zonenverbreiterung durch Diffusion zu und führt zu einer Verschlechterung des Trennergebnisses (mehr hierzu im Abschnitt 4.3). Die Länge der Trennstrecke wird schliesslich zum limitierenden Faktor der DC-Trennung.



4. Praktische Durchführung

Die Arbeitsschritte einer jeden DC-Trennung sind: Das Auftragen der Proben, das Entwickeln der Platten mit einem geeigneten Fließmittel in einer DC-Kammer, die Auswertung (qualitativ durch Detektion der Trennzonen und quantitativ durch Mengenbestimmung in den Trennzonen) und die abschliessende Dokumentation des Trennergebnisses. Abb.3 fasst den DC-Ablauf als Blockbild zusammen

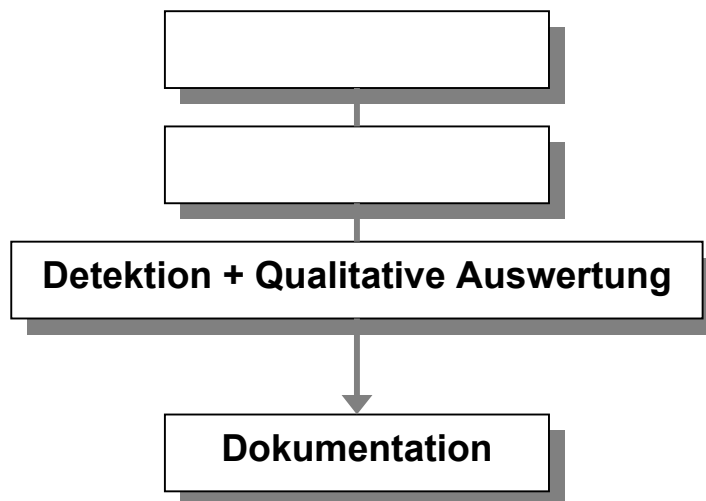


Abb. 3: Ablaufschema einer dünnenschichtchromatographischen Trennung [nach Morlock 97]

Die praktische Durchführung einer DC-Trennung scheint sehr einfach zu sein (Abb. 3). Jedoch muss einiges getan werden, um die **Reproduzierbarkeit** der Trennergebnisse (der sogenannten DC-Analysen) zu gewährleisten. Reproduzierbarkeit steht hier für die Qualität der DC-Trennung. Die Reproduzierbarkeit ist heute mit der instrumentellen Dünnschicht-Chromatographie gesichert. Deshalb werden heute fast ausschliesslich nur kommerzielle Platten verwendet.

Einfache, theoretische Überlegungen über die vielfältigen Wechselwirkungen der Phasen untereinander sind hilfreich, um den praktischen Aufwand zu verstehen, der getrieben werden muss damit eine scheinbar einfache Methode tatsächlich reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Bevor wir uns dem Auftragen der Probe zuwenden, werden wir in den folgenden Abschnitten einige Überlegungen zur richtigen Auswahl des geeigneten Plattenmaterials (stationäre Phase) und Fließmittels (mobile Phase) machen.



4.1 Auswahl der DC-Platten

Wir verwenden nur kommerzielle Fertigplatten. Die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse wird durch die Gewährleistung einer einheitlichen Schichtdicke, Teilchengröße und Teilchenverteilung wesentlich beeinflusst. Die Trennleistung hängt ebenfalls von diesen drei genannten Parametern ab. In Abb. 4 sind typische Korngrößenverteilungen an dem auch von uns meist verwendeten Kieselgel 60-Material zusammengestellt. Eine Vorstellung von der Teilchenform vermitteln die REM-Aufnahmen in Abb. 5.

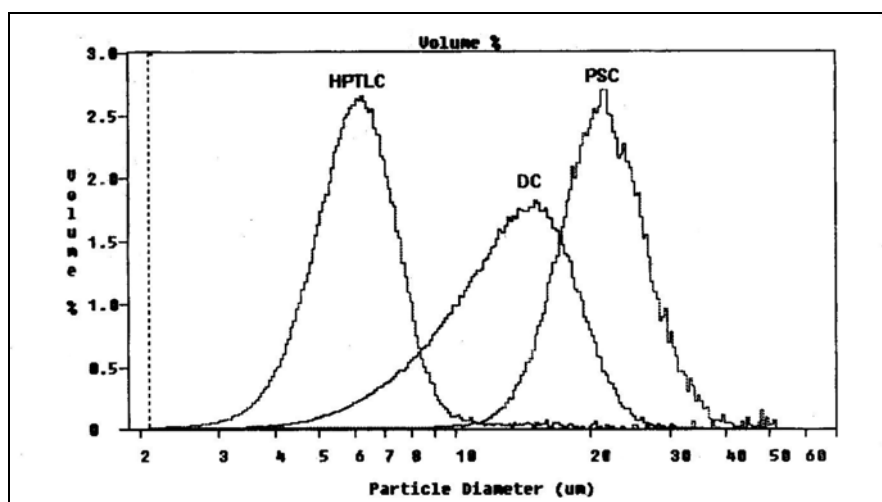


Abb. 4: Typische Teilchengrößenverteilung (Massenverteilung) eines HPTLC-, DC- und PSC-Kieselgel 60-Materials [nach Hahn-Deinstrop 98]; PSC (präparative Säulenchromatographie)

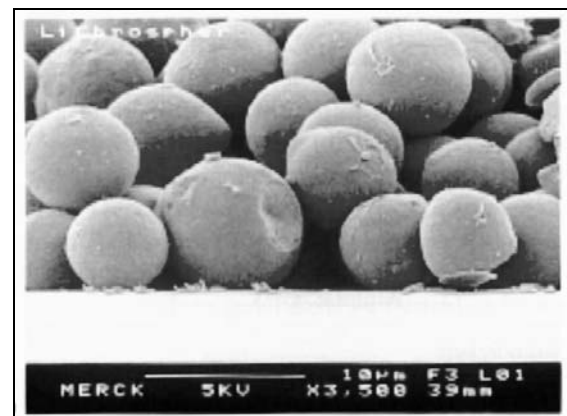
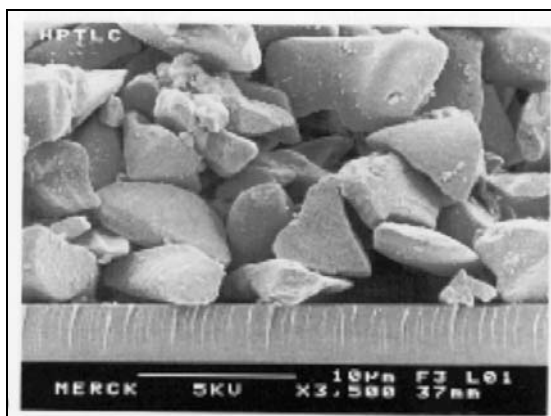


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen: links) HPTLC-Kieselgel 60-Platte und rechts) HPTLC-LiChrospher[®] Si 60-Material [nach Hahn-Deinstrop 98]; Merck, Darmstadt



Warum ist Kieselgel ein so weitverbreitetes Material? Die Antwort ist in Abb. 6 abzulesen. Die Oberfläche von Kieselgelen -amorpher Polykieselsäure- lässt sich chemisch breit variieren. Die stark polaren Silanol-Gruppen $\text{Si}-\text{OH}$ können durch organische Siloxane ausgetauscht werden. Damit ist eine ganze Palette oberflächenmodifizierter Kieselgele zugänglich, deren Polarität und **HLB-System** gezielt eingestellt werden kann. Abb. 6 zeigt –im Uhrzeigersinn mit der stark polaren Silanol-Gruppe beginnend– die ebenfalls stark polare Aminophase, gefolgt von Diol- und Cyanophase. In der anschließenden Gruppe der apolaren Phasen nimmt der **lipophile** Charakter mit steigender Anzahl an CH_2 -Gruppen zu. Da sich die Polarität der Kieselgelschicht umkehrt, spricht man von der sogenannten Umkehrphase oder RP-Phase (engl. *reversed phase*) bzw. von der Umkehrphasen-Chromatographie.

Als Faustregel gilt:



Je polarer die stationäre Phase, um so unpolarer das Fließmittel.

Und umgekehrt (für RP-Phasen): Je unpolarer die stationäre Phase, desto polarer muss das einzusetzende Fließmittel sein.

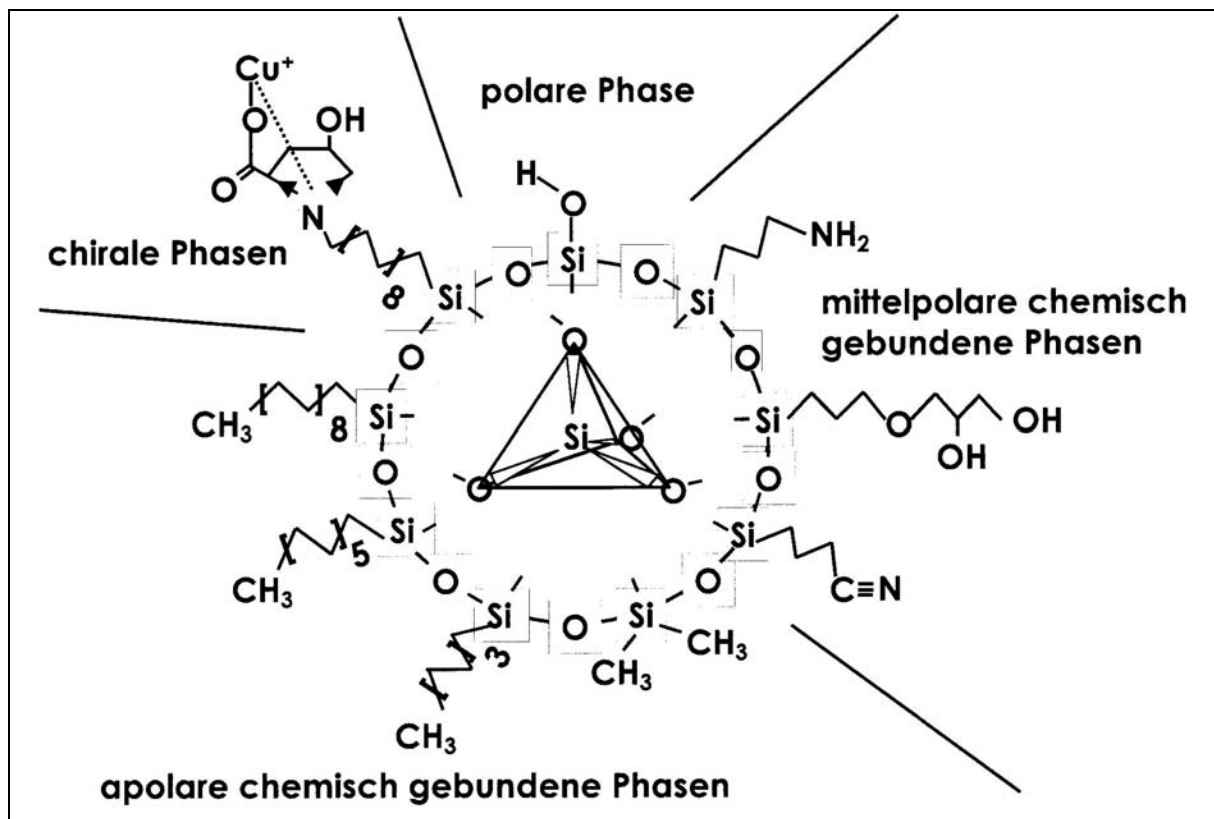


Abb. 6: Schematische Übersicht über oberflächenmodifizierte Kieselgele [nach Morlock 97]



4.2 Fliessmittel, die mobile Phase

Die Aufgabe des Fliessmittels ist die Aufnahme und der Transport der zu trennenden Substanzen entlang der chromatographischen Trennstrecke. Hierzu müssen die Substanzen der Probe im Fliessmittel löslich sein. Die Trennwirkung wird durch unterschiedlich starke Adsorptions- und Verteilungsgleichgewichte, die sich an der Phasengrenze zwischen mobiler und stationärer Phase einstellen, erreicht. Die verschiedenen Verweilzeiten der einzelnen Substanzen an der stationären Phase führen schliesslich zu einer räumlichen Trennung der Komponenten der Probe. In Abb. 7 ist dieser Prozess für zwei Substanzen mit deutlich unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten K_1 und K_2 schematisch dargestellt. In der Abbildung ist die Verteilung der Substanz 1 gegenüber Substanz 2 in der mobilen Phase begünstigt (es gilt die Relation $K_1 < K_2$). Folglich wird sich der Abstand der beiden Substanzen entlang der Trennstrecke zunehmend vergrössern. Substanz 2 bewegt sich langsamer als Substanz 1 und ist somit der Startlinie näher.

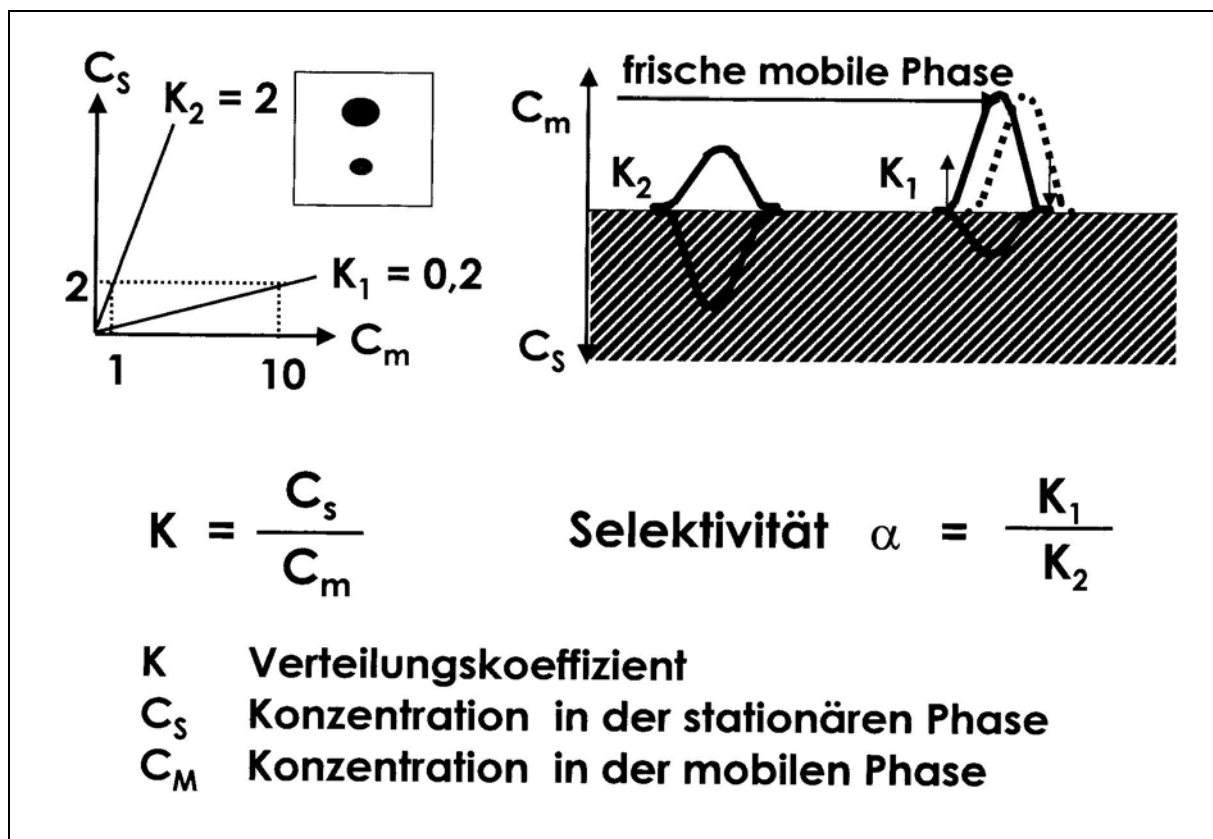
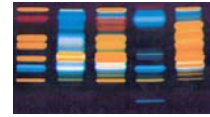


Abb. 7: Einfaches Modell der Verteilung zweier Substanzen 1 und 2 über die Phasengrenze DC-Platte/Fliessmittel hinweg [nach Morlock 97]

Der Grundsatz „Ähnliches löst Ähnliches“ (*similia similibus solvuntur*) trifft nur bedingt zu. Denn für eine gute Trennung ist neben einer guten Löslichkeit der Probe im Fliessmittel auch eine ausreichende Wechselwirkung der zu trennenden Substanzen mit dem Schichtmaterial erforderlich. Umso differenzierter dieses Retentionsvermögen der einzelnen Substanzen in der



aufzutrennenden Probe ist, desto effektiver wird die Trennung sein. Deshalb spielt die chemische Beschaffenheit der stationären Phase bei der Auswahl des Fließmittels eine wichtige Rolle. Vereinfachend kann die Rolle des Fließmittels als eine Art Konkurrenzadsorpt betrachtet werden, das das Substanzadsorpt aus dem Adsorbat verdrängt. In der Einleitung haben wir diesen Vorgang als **Elution** bezeichnet. Welchen Einfluss die Elutionswirkung des Fließmittels auf die Trennwirkung hat, zeigt Abbildung 8. Idealerweise besteht zwischen Verteilung, Adsorption und Desorption ein Gleichgewicht, das von der zu trennenden Stoffmenge unabhängig ist. Verkürzt gesagt; wenn die Elutionskraft des Fließmittels konstant ist, dann sind die getrennten Substanzflecken (**spots** oder chromatographische Zonen) symmetrisch. Ist die Elutionskraft (Desorption der Substanz) schwächer als die Adsorptionskraft kommt es zu einem „Verschleppen“ der zu trennenden Substanz entlang der Trennstrecke, dem **Tailing**. Ist die Elutionskraft stärker als die Adsorption dann kommt es zu einem „Vorauslaufen“ der zu trennenden Substanz, dem **Fronting**.

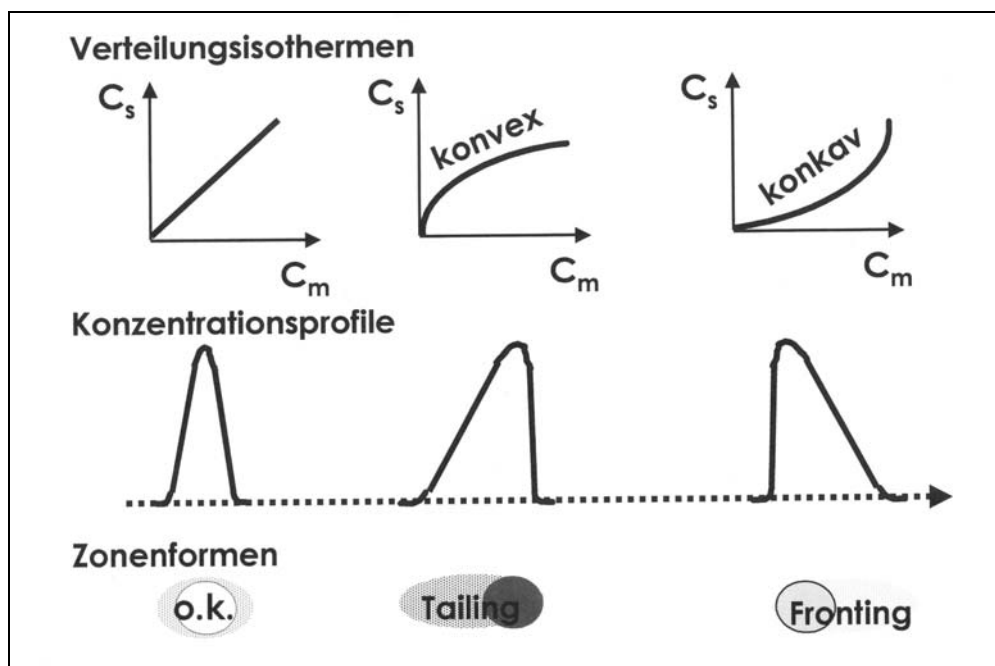


Abb. 8: Unterschiedliches Elutionsverhalten des Fließmittels und sein Einfluss auf die Form der chromatographischen Zonen (**spots**) [nach Morlock 97]

Wir wollen hier bewusst nicht auf die Besprechung der verschiedenen **elutropen Reihen** eingehen. Eigene Gedanken über den Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und Elutionseigenschaften sind oft bessere Ratgeber. Und ein weiterer praktischer Rat:



Glaube keiner Fließmittel-Vorgabe, solange sie nicht durch eigene Experimente bestätigt ist. [Hahn-Deinstrop 98a].



Tab.1: Prinzip der elutropen Reihe an hydrophoben und hydrophilen Adsorbentien (stationäre Phase)

| hydrophile Adsorbentien | | hydrophobe Adsorbentien |
|----------------------------|--|----------------------------|
| Wasser | | Hexan |
| Methanol | | Toluen |
| Ethanol | | Essigsäureethylether |
| Propan-1-ol | | Diethylether |
| Essigsäureethylester | | Propan-1-ol |
| Aceton | | Aceton |
| Diethylether | | Ethanol |
| Toluen | | Methanol |
| Hexan | | Wasser |

Zur Trennung an polaren Adsorbentien (Kieselgel, Aluminiumoxid) verwendet man unpolare oder wenig polare, **aprotische** Lösemittel (Hexan, Toluol, Chloroform) als Fließmittel. Mit dem **hydrophilen** Kieselgel werden hydrophile Substanzen (z.B. Alkohole, Amine, Säuren) besonders gut wechselwirken und an der Phasengrenze „haften“. Erst noch stärkere hydrophile Fließmittel werden diese Wechselwirkung aufheben können und dadurch die Desorption erzwingen, die dann zum Weitertransport der Substanz führt. **Lipophile** Substanzen werden nur gering mit den hydrophilen Silanolgruppen wechselwirken.

Das Ergebnis ist eine geringe Trennung, d.h. eine geringe Wechselwirkung zwischen der Probe und der Kieselgeloberfläche. **Lipide**, zu denen auch unsere Trocknenden Öle gehören (Glycerolipide), lassen sich deshalb nicht ohne weiteres an „normalem“ Kieselgel trennen. Hierfür sind die „**hydrophobierten**“ RP-Phasen weitaus geeigneter. Denn umgekehrt gilt: An unpolaren stationären Phasen (Umkehrphasen) verwendet man polare **protische** (Wasser, Methanol) und polare aprotische Lösemittel (Acetonitril) als Fließmittel.

Abschliessend noch einige Anmerkungen zur Steigerung der Trennleistung von sehr komplexen Stoffgemischen. Hierzu variiert man die Elutionskraft des Fließmittels schrittweise durch Veränderung der Fließmittelzusammensetzung. Man spricht dann vom Fließmittelgradienten oder vereinfacht von Gradientenelution. Dieses Vorgehen ist bisher nur der HPLC vorbehalten gewesen. Die Übertragung auf die DC ist ein wesentlicher Fortschritt in der instrumentellen HPTLC. An der Normalphase (polare Kieselgelschicht) beginnt man mit der Reinkomponente, die die grösste Elutionskraft hat, entwickelt aber nur eine kurze Laufstrecke entlang. Nach Zwischentrocknung wird wiederholt mit einer Fließmittelmischung von geringerer Elutionskraft entwickelt. Mit abnehmender Elutionskraft wird zunehmend weiter entwickelt. Dieses Verfahren ist automatisierbar und als AMD-Technik (Automated Multiple Development) bekannt. Die Trennleistung soll sich im Vergleich zur normalen HPTLC verdreifachen. Und ein weiterer wichtiger Aspekt; auf den Einsatz von schwerflüchtigen Fließmittel-Komponenten (z.B. Wasser) kann verzichtet werden [Hahn-Deinstrop 98b].



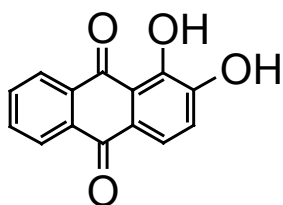
4.3 Auftragen und Entwickeln

Das „theoretische Fundament“ der DC ist mit der Wahl von stationärer und mobiler Phase gelegt. Die **Funktionalität** der zu trennenden Stoffe spielt hierbei eine zentrale Rolle. Die folgenden Arbeitsschritte sind mehr praktischer, handwerklicher Art, aber für das Gelingen der Methode von äusserster Wichtigkeit. Der Workshop reicht natürlich bei weitem nicht aus, hier die verschiedenen Techniken auch praktisch sicher zu beherrschen. Ziel der praktischen Übungen ist es, einen Einblick in die Herangehensweise, die potenziellen Möglichkeiten und eben auch die Grenzen der analytischen Methode **Chromatographie** zu bekommen.

In dem folgenden Versuch soll ein einfaches Chromatogramm zur Trennung eines synthetischen Farbstoffgemisches ausgeführt werden. Das manuelle Auftragen der Probelösung mit der Kapillare auf der Startlinie und die anschliessende Entwicklung in der Trennkammer (z.B. Marmeladenglas mit Schraubdeckel) machen auf einfache Art am deutlichsten erfahrbar, was diese Methode für Möglichkeiten bietet. Während sich die Farbstoffe „auf den Weg machen“ und mit blossen Auge die Trennung verfolgt werden kann, sollten Sie im Text zurückblättern und die Abbildungen über die Phasengleichgewichte nochmals betrachten. Sie sehen die Dinge jetzt vielleicht mit anderen Augen als vorher.

Einführungs-Experiment:

Auftrennung eines Gemisches aus Anthrachinonfarbstoffen [Macherey 88]



Anthrachinonfarbstoffe sind wichtige Farbstoffe in der Textil- und Lederindustrie. Neben den Azofarbstoffen sind die Anthrachinonfarbstoffe die weltweit meistproduzierte Farbstoffklasse. Sie sind Substitutionsprodukte des Anthrachinons oder anderer Chinone.

Die Synthese des klassischen Beizenfarbstoffes Alizarin (1,2-Dihydroxyanthrachinon), der bis 1875 aus den Wurzeln des Krapps (*Rubia tinctorum*) gewonnen wurde, gelang GRAEBE, CARO und LIEBERMANN erstmals 1869 [Hauptmann 76, Zollinger 99].



Auftrennung eines Gemisches aus Anthrachinonfarbstoffen [Macherey 88]

Probelösung:

Testfarbstoffgemisch aus sieben Anthrachinonfarbstoffen gelöst in Chloroform (je 1 mg/L)

Vergleichslösung:

2 Einzelkomponenten (Blau 1 und Violett 2) gelöst in Chloroform

Trennschicht:

POLYGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄

Fliessmittel:

Toluen/Cyclohexan (2:1, v/v)

Auftragsvolumen:

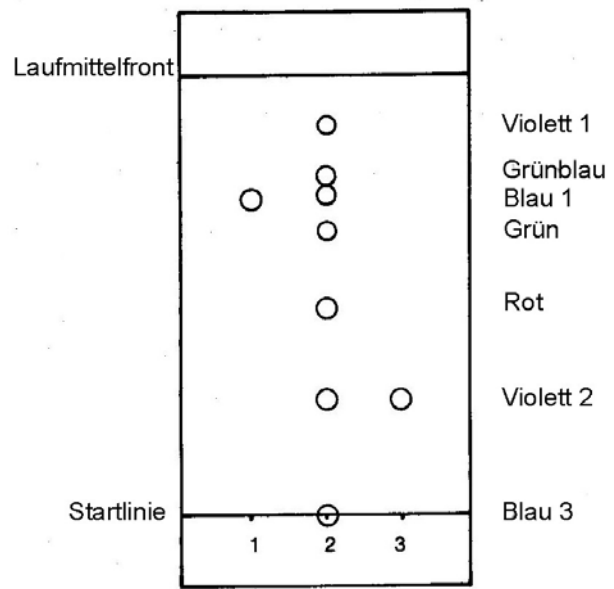
ca. 0.75 µL

Entwicklung:

1-2mal, versuchsweise variieren, mit und ohne Kammersättigung

Detektion:

visuell, Substanzen besitzen Eigenfarbe



Auf Startpunkt 2 der DC-Fertigfolie trägt man das Anthrachinonfarbstoffgemisch, auf die Startpunkte 1 und 3 die Vergleichslösungen (Blau 1 und Violett 2) auf. Nach ca. 5 Minuten ist das Lösemittel verdampft. Trennkammer mit dem Fliessmittel (Toluen/Cyclohexan) beschicken und das Chromatogramm entwickeln. Nach Beenden der ersten Trennung (Laufstrecke ca. 65-70 mm) entnimmt man die Folie der Kammer, kennzeichnet vorsichtig am Folienrand die Fliessmittelfront und lässt 10 Minuten im Abzug trocknen (evtl. mit einem Fön oder im Wärmeschrank (max. 100 °C) etwas beschleunigen). Zur Optimierung der Trennung wird ein zweites Mal im gleichen Laufmittel entwickelt. Nachdem die Fliessmittelfront die Markierung der vorherigen Steighöhe erreicht hat, ist die Trennung beendet. Die Farbstoffe erscheinen in der abgebildeten Reihenfolge.

Zur Untersuchung des Einflusses von stationärer und mobiler Phase auf die Trennleistung kann der Versuch mit verschiedenen Fliessmitteln auf Aluminiumoxid (POLYGRAM[®] ALOX N/UV₂₅₄) oder Cellulose (POLYGRAM[®] CEL 300) wiederholt werden.



Mit der Bereitstellung der Probelösung haben wir Ihnen einen wichtigen Schritt vor der Auftragung der Proben abgenommen: Die Probenvorbereitung. Die damit verbundenen Schwierigkeiten werden Sie in den Versuchen zur Bindemitteltrennung noch zur Genüge kennenlernen. Der eigentlichen Probenauftragung geht in der Regel eine ziemlich aufwendige Probenvorbereitung voraus. Hier wird sprichwörtlich die „Spreu vom Weizen getrennt“. Der Analytiker sagt etwas eleganter: Für eine reproduzierbare Analyse muss der Analyt, die *Spur*, vom Begleitmaterial, der *Matrix*, getrennt werden. Das kann am einfachsten durch eine **Extraktion** mit einem geeigneten Lösemittel erfolgen. Erheblich aufwendiger ist die chemische Vorbehandlung. Beispielsweise muss der Identifizierung von tierischen und pflanzlichen Leimen unbedingt eine **Hydrolyse** der meist polymeren Bindemittel vorausgehen. Die Qualität dieser sogenannten prächromatographischen Derivatisierung entscheidet oft über das Ergebnis der sich anschließenden chromatographischen Trennung.

Wir setzen hier voraus, dass unsere Probe ausreichend „aufgearbeitet“ ist, d.h. genügend konzentriert und ausreichend rein in der Probelösung vorliegt. Wie bereits gesagt ist dieser Zustand nicht selbstverständlich und setzt einige präparatorische Fertigkeiten und stoffliche Kenntnisse voraus. Deshalb werden wir im Workshop weitgehend auf die „reinen Bindemittel“ und nicht deren maltechnisch viel aussagekräftigeren Mischungen (Binde- und Malmaterialien) zurückgreifen.

Das Auftragen bzw. Aufbringen der Probe erfolgt immer aus der Lösung. Sie haben die Proben mit der Kapillare möglichst punktförmig auf der Platte appliziert. Die strichförmige Auftragung mit dem CAMAG-LINOMAT werden wir Ihnen in den einzelnen Bindemittel-Gruppen zeigen. Hier werden Sie im Vergleich zu Ihren eigenen, punktförmig aufgetragenen Platten die höhere Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der automatisierten, strichförmigen Auftragung erkennen. Die physikalischen Verteilungsvorgänge bei der chromatographischen Trennung -egal ob punktförmig, oder strichförmig aufgetragen wurde- bleiben natürlich von der Auftragsart unbeeinflusst. Die **Diffusion** bleibt die wichtigste und zugleich alle DC-Verfahren limitierende physikalische Größe. Die Diffusion verursacht die Verbreiterung der chromatographischen Zonen mit zunehmender Trennstrecke. Abb. 9 zeigt dieses „Ausbluten der spots“ sehr anschaulich.

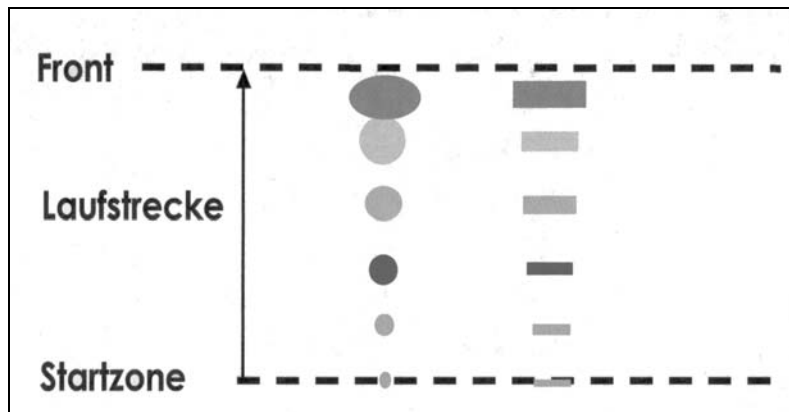
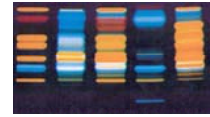


Abb. 9. Zonenverbreiterung durch Diffusion in der normalen DC (punktförmige Auftragung) und der HPTLC (strichförmige Auftragung) [nach Morlock 97]



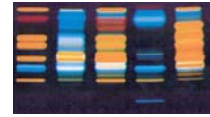
Je länger die Laufstrecke, umso diffuser die Zonen!

Diese Aussage ist ungemein wichtig. Denn ein gutes Chromatogramm zeichnet sich durch eine deutliche Trennung der einzelnen Zonen bei möglichst kurzer Laufstrecke aus. Diese physikalisch gesetzte Grenze der Dünnschicht-Chromatographie wird bei der bereits erwähnten AMD-Technik der Mehrfachentwicklung erreicht.

Weitere wichtige Einflussfaktoren auf die Qualität der Entwicklung/Trennung der DC-Platte sind:

- Aktivität der Schicht
- grosse Polaritätsunterschiede im Fliessmittel-Gemisch (Frontenbildung)
- Dampfdruck der Lösemittel
- Viskosität des Fliessmittels
- Stabilisatoren und Hersteller (Qualität der Platten)
- Labordämpfe (Vorwaschen der Schicht wird immer empfohlen)
- Temperaturschwankungen
- Zugluft

Die Schicht auf der Platte „vorzuwaschen“ ist gute Laborpraxis. Das Vorwaschen geschieht meist mit reinem Methanol. Diese Vorbehandlung „reingt“ die DC-Trennschicht und schafft einen optisch einheitlichen Untergrund [Hahn-Deinstrop 98c]. Wichtig ist, dass die „Waschrichtung“ auch die spätere „Entwicklungsrichtung“ ist. Durch eine unauffällige Markierung (z.B. auf der Plattenrückseite) können Verwechslungen vermieden werden, die sonst zu optisch unangenehmen Randeffecte führen.



Abschliessend noch einige Bemerkungen zur **Aktivierung** und **Konditionierung** der DC-Schicht. Beide Massnahmen dienen der Verbesserung der Reproduzierbarkeit der adsorptiven Trennung auf Kieselgel- und Aluminiumoxidplatten. Durch Ausheizen (120 °C, 30 Minuten) wird überschüssiges, nicht chemisorptiv gebundenes Wasser vertrieben. Solche „aktivierten Platten“ nehmen das gerade vertriebene Wasser schnell wieder auf. Ein reproduzierbares Luftfeuchtgleichgewicht zwischen Umgebung (Gasphase) und Plattenoberfläche (stationäre Phase) hat aber gerade auf die Trennung von Substanzen mit Hydroxyl- und Carbonylgruppen an aromatischen und alicyclischen Ringsystemen großen Einfluss. Eine Konditionierung über gesättigten Salzlösungen, wie sie in der mineralischen Materialprüfung üblich ist, kann in einem geräumigen **Exsikkator** erfolgen (vergl. auch Abb. 10). Es ist darauf zu achten, dass ein genügender Bodenkörper in der gesättigten Salzlösung vorhanden ist.

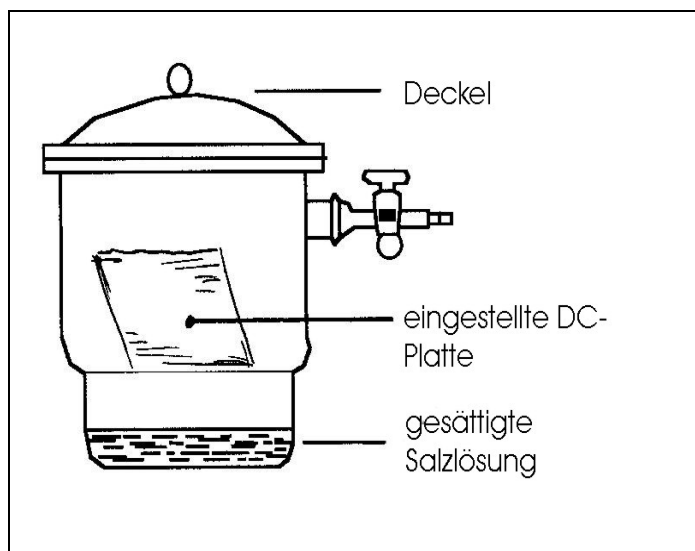


Abb. 10: Exsikkator zur Konditionierung zuvor thermisch aktivierter DC-Platten

Allgemein ist ein Konditionierung auch mit anderen Lösemitteln oft ratsam. Allerdings lassen sich hier die Partialdrücke des Lösemittels bzw. Lösemittelgemisches nicht so einfach einstellen wie im Fall der relativen Luftfeuchte über gesättigten Salzlösungen. Neben der Temperatur haben die Komponenten des flüssigen Lösemittelgemisches Einfluss auf die Zusammensetzung der Gasphase. Je mehr Lösemittelkomponenten das Fließmittel enthält, um so wichtiger wird die Plattenkonditionierung im Dampfraum über dem Fließmittel. Die Ausbildung eines stabilen Drei-Phasen-Gleichgewichtes (mobile, stationäre und Gasphase) ist für die Qualität der DC-Trennungen und deren Reproduzierbarkeit äusserst wichtig. Das Drei-Phasengleichgewicht wird als Kammersättigung bezeichnet.



Was bei unvollständiger Kammersättigung geschieht, zeigt Abbildung 11 für ein ternäres Fließmittel (drei Lösemittelkomponenten α , β und γ).

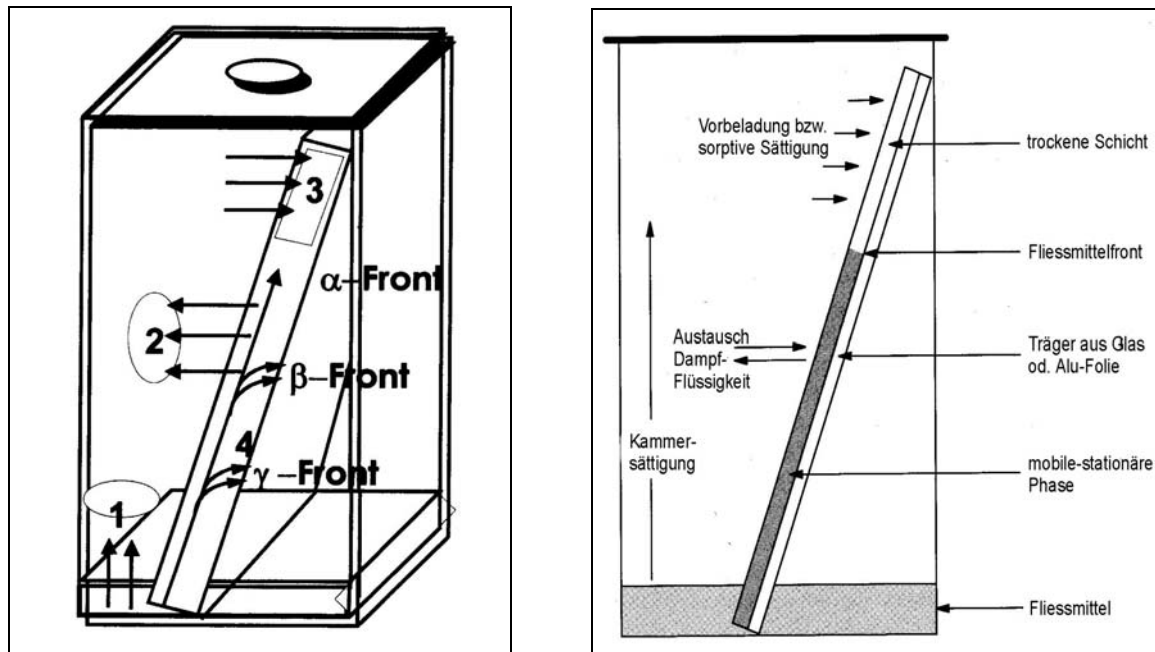


Abb. 11: Interner Frontenbildung (α -, β - und γ -Front) durch Entmischung eines ternären Fließmittels in unvollständig gesättigter Kammeratmosphäre [nach Morlock 97 und Hahn-Deinstrop 98d]

Gehen wir von einer normalen Kieselgelschicht (polare stationäre Phase) aus, so wird an der γ -Front die am stärksten polare Komponente angereichert, an der β -Front die Komponente mit der mittleren Polarität und an der α -Front die am schwächsten polare Komponente. Die Konditionierungsgeschwindigkeit hängt natürlich vom Totalvolumen der Gasphase in der Kammer ab. In der klassischen Doppeltrogkammer dauert die Kammersättigung und Konditionierung der DC-Schicht wesentlich länger als in der modernen Horizontalkammer mit vergleichsweise sehr kleinem Kammervolumen. Um das Phasengleichgewicht zwischen mobiler Phase und Gasphase reproduzierbar einzustellen, haben sich binäre azeotrope Lösemittelgemische bewährt. Unter einem azeotropen Gemisch oder kurz einem **Azeotrop** versteht man ein Gemisch aus zwei oder mehreren verschiedenen Lösemitteln, deren Dampf dieselbe Zusammensetzung wie die flüssige Phase hat.



Ein Azeotrop verhält sich wie ein reiner Stoff. Eine azeotrope Mischung aus zwei Komponenten nennt man ein binäres Azeotrop. In Tabelle 2. sind einige binäre Azeotrope, ihre Zusammensetzung und **Siedepunkte** bei Normaldruck zusammengestellt. Der grosse Vorteil von azeotropen Lösemittelgemischen besteht im gemeinsamen Siedepunkt der – abweichend vom idealen Verhalten – weitgehend temperatur- und druckunabhängig ist. Die Zusammensetzung von mobiler und Gasphase ist gleich. Aber auch diese Fließmittel entmischen sich bei unvollständiger Kammerfüllung (vergl. Abb. 10). Eine Konditionierung in der azeotropen Gasatmosphäre ist deshalb ratsam.

Tabelle 2. Azeotrope als Fließmittel [nach Koch 95a].

| Nr. | Fließmittelgemisch | Zusammensetzung (Verhältnis Ma-%) | Siedepunkt K_p bei 10^5 Pa in [°C] |
|-----|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1 | Methanol:Aceton | 12,0:88,0 | 55,5 |
| 2 | Ethanol:Wasser | 96,0: 4,0 | 78,2 |
| 3 | Isopropanol:Isopropylether | 16,3:83,7 | 66,2 |
| 4 | Methanol:Methylacrylat:Cyclohexan | 17,8:48,6:33,6 | 50,8 |
| 5 | Methanol:Methylacrylat | 17,7:82,3 | 54,0 |
| 6 | Chloroform:Methanol | 87,4:12,6 | 53,4 |
| 7 | Methanol:Benzen | 39,1:60,9 | 57,5 |
| 8 | Tetrachlormethan:Aceton | 12,6:87,4 | 56,0 |
| 9 | Ethanol:Benzen | 31,7:68,3 | 68,0 |
| 10 | Dichlormethan:Methanol | 92,7:7,3 | 37,8 |
| 11 | Chloroform:Ethanol | 92,0:8,0 | 59,4 |
| 12 | Chloroform:2-Butanon | 17,0:83,0 | 79,9 |
| 13 | Aceton:Cyclohexan | 67,5:32,5 | 53,0 |

Die so konditionierten Platten werden nun entwickelt. Zur Entwicklung wird die Seite der DC-Platte, auf der die Substanzen entlang der Startlinie aufgetragen wurden, in ständigen Kontakt mit dem Fließmittel gebracht. Üblicherweise geschieht das durch Hineinstellen der DC-Platte in das Fließmittel. Selbstverständlich muss dabei darauf geachtet werden, dass Flüssigkeitsoberfläche und Startlinie parallel zueinander verlaufen und dass sich die Startlinie oberhalb der Fließmitteloberfläche befindet (etwa 0.5 bis 1 cm).

Niemals die Startlinie im Fließmittel „versenken“.

Die starken Kapillarkräfte bestimmen die Fließrichtung und Fließgeschwindigkeit. Bei senkrechter, aufsteigender Technik (klassische Kammerentwicklung) wirkt der aufsteigenden Kapillarkraft die Schwerkraft entgegen. Die Fließgeschwindigkeit nimmt mit zunehmender Steighöhe ab. Als weitere Einflussgrößen sind zuzunennen: Viskosität und Oberflächenspannung des Fließmittels sowie Schichtdicke und Packungsdichte (Korngröße und Kornverteilung).



Wie in allen dynamischen Prozessen ist der langsamste Schritt der für den Gesamtprozess geschwindigkeitsbestimmende Schritt (sozusagen das „schwächste Glied in einer Kette“). Zu Beginn der Entwicklung ist die kapillare Fließgeschwindigkeit deutlich größer als die Diffusionsgeschwindigkeit der getrennten Substanzen der Probe. Mit zunehmender Laufstrecke wird die Fließgeschwindigkeit immer kleiner und unterschreitet schliesslich sogar die Diffusionsgeschwindigkeit. Spätestens jetzt sollte die DC-Trennung abgebrochen werden. Die Grenzen der Dünnschicht-Chromatographie werden durch diese beiden Transportprozesse –kapillares Fließen und Diffusion– bestimmt. Die Entwicklung von Fertigplatten mit sehr dünnen Sorptionsschichten (100 μm) und sehr enger Korngrößenverteilung (vergl. Abb. 4 und 5) sowie die automatische Mehrfachentwicklung (AMD) haben in den letzten Jahren entscheidend zur Verbesserung der DC-Trennleistung beigetragen und eine Art „Renaissance der Dünnschicht-Chromatographie“ bewirkt.

4.4 Trocken nach der Entwicklung

Unmittelbar nach der Entwicklung wird die Fließmittelfront markiert. Um die auf der feuchten Platte immer noch ablaufenden Diffusionsprozesse so schnell als möglich zu stoppen muss die Platte getrocknet werden. Außerdem stören Fließmittelreste die **Derivatisierung**. Der Situation angepasst kann das Trocknen durch einfaches waagrechtes Liegenlassen und Abdampfen unter dem Laborabzug, mittels eines Föns, im Trockenschrank oder auf einer Heizplatte (moderates Erwärmen!) erfolgen. Wichtig ist die vollständige Entfernung der Fließmittelreste ohne Verlust eventuell in der Probe enthaltener leichtflüchtiger Substanzen, wie z.B. Monoterpene in etherischen Ölen.

4.5 Detektion der getrennten Substanzen

Wir kommen nun zu „schönsten“ Schritt in der praktischen DC-Trennung; der Detektion. Die Detektion in der Dünnschicht-Chromatographie gibt dem Namen „Chromatographie“ tatsächlich wieder einen Sinn. Die Farbigkeit und Farbunterscheidung spielt in der DC-Detektion eine sehr wichtige Rolle.

Wir werden uns in unseren praktischen Übungen zur DC-Bindemittelanalytik nur mit dem qualitativen Nachweis bestimmter Stoffgruppen durch Vergleich mit Referenzmaterialien befassen. Die besondere Stärke der heutigen HPTLC liegt jedoch gerade in der einfachen, schnellen und vor allem kostengünstigen quantitativen Analytik synthetischer und pharmazeutischer Produkte.

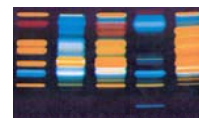
Die Detektion mit bloßem Auge haben Sie bereits in unserem Einführungsexperiment bei der Trennung der Anthrachinonfarbstoffe „angewandt“. Und genau das ist auch der erste „Detektionsschritt“: Auswertung der Trennung ohne chemische Nachbehandlung oder verkürzt gesagt: Detektion ohne Derivatisierung.



4.5.1 Detektion ohne Derivatisierung

Neben der bereits besprochenen Eigenfärbung der getrennten Substanzen macht man sich die **Lumineszenz** zahlreicher Stoffe nach Bestrahlen mit kurzwelligem Licht zu Nutzen. Sie kennen solche Erscheinungen von der Oberflächendiagnostik mit UV-Strahlern zur Erkennung originaler und retuschierter Bereiche, Firnisabnahmen, Kittungen usw. Oder die Betrachtung von Querschliffen unter dem UV-Mikroskop. Auf dem gleichen Prinzip beruht die physikalische Detektion ohne Derivatisierung. Hierzu wird die getrocknete DC-Platte mit kurzwelligem Licht „bestrahlt“. Die getrennten und lumineszierenden Substanzen sind als helle, teilweise farbige Substanzflecken zu erkennen. Hierzu wird die DC-Platte mit einer UV-Lampe in einem abgedunkelten Raum schräg bestrahlt und die Lumineszenz beobachtet. Bei geringen Substanzmengen oder nur geringer Lumineszenzaktivität stört die **Remission** des weissen Plattenhintergrundes. Andererseits besitzen zahlreiche Verbindungen keine Lumineszenz (z.B. Wachse, gesättigte Kohlenwasserstoffe). Dann geht man den umgekehrten Weg und bringt in das DC-Beschichtungsmaterial lumineszierende Stoffe ein. Solche Stoffe werden als sogenannte „**Fluoreszenz-Indikatoren**“ bezeichnet. Eigentlich sind es anorganische **Phosphoreszenz-Indikatoren**. Aufgrund ihrer Immobilität und chemischen Inertheit sind die bekanntesten „Fluoreszenzindikatoren“ das gelblich-grün emittierende, mit Mangan aktivierte Zinksilikat (Kennzeichnung F_{254}) und die nicht säurestabilen, schwach-blau emittierenden Erdalkaliwolframate (Kennzeichnung F_{254s}) [Jork 90]. Der Zahlenindex am Kennzeichen F gibt die optimale Anregungswellenlänge für die Aktivierung der Lumineszenz an. Diese Platten zeigen unter UV-Bestrahlung die entsprechende gelblich-grüne bzw. schwach-blaue Remission der Schicht. Substanzen, die selbst nicht lumineszieren (Licht emittieren) heben sich dann als dunkle Substanzzonen oder -flecken auf dem einheitlich emittierenden Plattenhintergrund ab. Man spricht dann auch von einer Fluoreszenz-minderung.

Die Lumineszenzerscheinungen können instrumentell sehr gut zur Auswertung (quantitativ und qualitativ) genutzt werden. Oft sind die Lichtausbeuten hoch und die Nachweisbarkeit sehr empfindlich. Eine zusätzliche Steigerung der Nachweisempfindlichkeit kann durch Tränken oder Tauchen der Platte in eine 1:10 Flüssigparaffin:Petrolether-Lösung erreicht werden. Das Paraffin selbst besitzt keine Eigenfluoreszenz. Durch die „optische Angleichung“ der Porenräume auf der DC-Platte wird die Remission zugunsten einer gerichteten Reflexion zurückgedrängt. Dieses Prinzip lässt sich verallgemeinern.



4.5.2 Detektion mit Derivatisierung

In den Fällen, in denen sich die getrennten Substanzen weder durch eine Eigenfarbe noch durch Eigenfluoreszenz oder Fluoreszenzminderung zu erkennen geben, müssen die Substanzen auf der DC-Platte nachträglich in farbige und/oder fluoreszierende Verbindungen umgewandelt werden. Man bezeichnet diese Nachweisreaktion auf der DC-Platte deshalb als **postchromatographische Derivatisierung**. Eine Vielzahl geprüfter Nachweisreaktionen ist in der bisher zweibändigen Sammlung „Reagenzien und Nachweismethoden“ [Jork 90 und Jork 93] zusammengestellt.

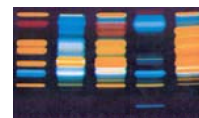
Zu den universellen, schnell durchführbaren und kostengünstigen Nachweismöglichkeiten für **lipophile** Substanzen gehört das Behandeln der fließmittelfreien Chromatogramme mit Iod-Dampf und die Behandlung mit Iod-Lösung (0,5 bis 1%ige Lösungen) durch Besprühen oder Tauchen. Iod reichert sich in molekularer Form in den Chromatogrammzonen an und färbt diese braun.

In der Praxis werden zumeist einige Iod-Kristalle auf den Boden einer trockenen, geschlossenen Trogkammer gegeben. Nach Sättigung des Kammerraumes mit violetter Iod-Dampf wird das fließmittelfreie Chromatogramm 30 Sekunden bis einige Minuten lang in diese Kammer eingestellt. Der Iod-Dampf schlägt sich auf der DC-Platte nieder und reichert sich in den Chromatogramm-Zonen an. Iod-Dampf ist ein Universalreagenz. Die Reihe der Stoffgruppen ist groß und eine tabellarische Zusammenstellung würde den Rahmen dieser kurzen Einführung sprengen [Jork 90a]. Lipide, Alkaloide, Steroide, Terpene, aber auch Aminosäuren seien hier stellvertretend genannt.

Sehr häufig werden Säuren mit Zusatz von Aldehyden verwendet, die Methinfarbstoffe bilden. Wir wenden z.B. die Farbbildung mit 4-(Dimethylamino)-benzaldehyd in Eisessig in Gegenwart von Pyrrol-Derivaten beim Gruppentest auf Proteine an (der sogenannter Pyrolysetest). In Tabelle 3. sind einige Aldehyd-Säure-Reagenzien zusammengestellt.

Tab. 3. Postchromatographische Derivatisierung mittel Aldehyd-Säure-Reagenzien
Eine Auswahl [nach Koch 95a]

| Trivialname des Reagenz | Aldehyd | Säure | Nachweisbare Stoffklasse |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| Morgan-Elson-Reagenz | Anisaldehyd | konz. H ₂ SO ₄ | Zucker, Terpene |
| EP-Reagenz | 4-Dimethylamino-benzaldehyd | Eisessig | Pyrrole, Pyrolyseprodukte der Proteine (tier. Leime) |
| Ehrlich-Reagenz | 4-Dimethylamino-benzaldehyd | konz. Salzsäure | Amine, Aminosäuren |
| | Vanillin | H ₂ SO ₄ | ether. Öle, Terpene Phenole, Alkohole |
| | Vanillin | konz. Salzsäure | Catechine |



Ein weiteres allgemeines „Anfärbeprinzip“ ist die Bildung farbiger Schwermetallkomplexe, ganz ähnlich dem Farbbeizen. Organische Schwermetallkomplexe sind oft charakteristisch gefärbt, ermöglichen oft erst die Lumineszenz und besitzen in der Regel stabilisierende Eigenschaften. Nachteilig ist die physiologische Bedenklichkeit (erbgutschädigend und krebserregend) der Schwermetalle. Das Wissen um das Gefahrenpotential ist wichtig für den richtigen Umgang mit diesen Detektionsreagenzien. In Tab. 4. sind einige wichtige Reagenzien zur Schwermetallkomplexbildung aufgeführt:

Tab. 4. Postchromatographische Derivatisierung mittel Schwermetallionen-Reagenzien
Eine Auswahl [nach Koch 95a]

| Trivialname des Reagenz | Schwermetallsalz | Nachweisbare Stoffklasse |
|-------------------------|-------------------------|---|
| Carr-Price-Reagenz | Antimon(III)-chlorid | Terpene, Flavonoide, Steroide, (Öle, Harze) |
| | Antimon(V)-chlorid | |
| | Molybdato-phosphorsäure | Stickstoffbasen (Heterocyclen) |
| Salkowski-Reagenz | Eisen(III)-chlorid | Indole, Phenole |
| Tollens-Reagenz | Silbernitrat/Ammoniak | reduzierende Verbindungen Aldosen, red. Zucker |

Gruppenspezifische Reagenzien reagieren mit definierten chemischen Gruppen. Dazu gehören z.B. zum Nachweis phenolischer Verbindungen, die Diazotierungsreaktion unter Bildung von farbigen Diazoverbindungen oder das Dinitrophenylhydrazin, das speziell mit der C=O-Gruppe von Carbonylverbindungen entsprechende farbige Hydrazone bildet. Für uns von besonderem Interesse ist das Ninhydrin-Reagenz, das mit Aminen und Aminosäuren blauviolett gefärbte Produkte bildet (Diketohydrindyliden-Diketohydramin). Die komplexe Reaktion ist in Abb. 12 dargestellt.

Die Applikation der Reagenzlösungen erfolgt entweder durch Aufsprühen oder durch Tauchen der gesamten DC-Platte im Nachweisreagenz. Das Tauchen hat gegenüber dem Besprühen mehrere Vorteile. Beim Tauchen ist die Konzentration der Nachweisreagenz geringer als im Sprühreagenz. Die Effektivität (Substanzverbrauch) ist beim Tauchen wesentlich verbessert. Und schliesslich ist die Kontamination mit gesundheitsschädlichen Aerosolen beim Tauchen ausgeschlossen. Die Derivatisierung muss dann nicht unbedingt unter dem Abzug erfolgen. Die Haltbarkeit der angesetzten Nachweisreagenzien ist begrenzt. Vor Anwendung ist die Brauchbarkeit älterer Reagenzien unbedingt zu überprüfen.

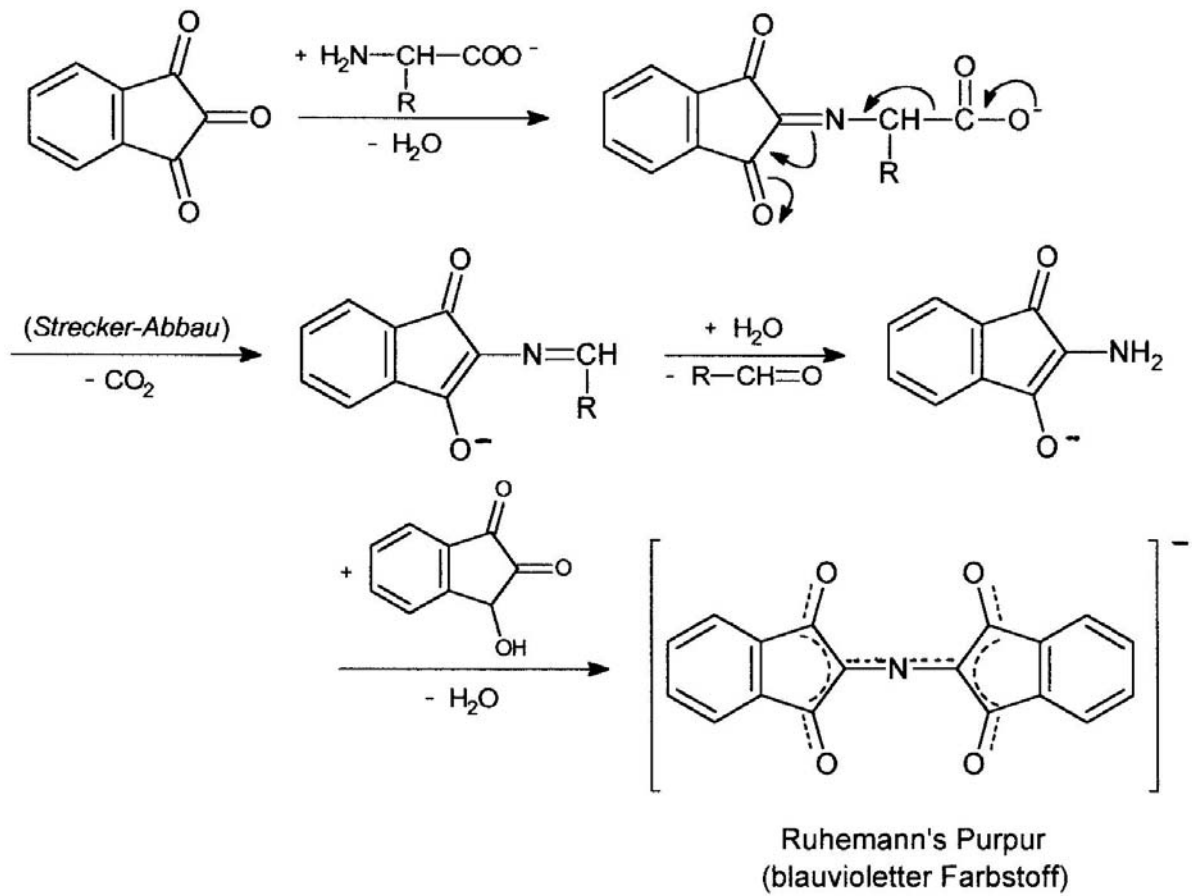


Abb. 12. Mechanismus der Ninhydrin-Aminosäure-Farbreaktion [Römpp 99]



4.6 Fotodokumentation

Das entwickelte und derivatisierte Chromatogramm ist bereits ein Dokument. Allerdings ist die Haltbarkeit der Information, wie Lage der spots, Farbe, Kontur, Farbwechsel und Erkennbarkeit unter normalem Tageslicht und UV-Beleuchtung usw., oft nur für wenige Stunden tatsächlich gegeben. Versuche, die Platten in Kunstharz oder flüssigem Paraffin zu tränken und so dauerhaft haltbar zu machen, wird abgeraten.

Der bessere Weg ist die fotografische Dokumentation. Das kann in altbewährter Weise mit der Analogkamera am Reprogestell erfolgen. Die Belichtung erfolgt mit Normalkunstlicht oder UV-Lampen. Hier gelten alle Regeln der Mikrophotographie. Wichtig ist die gleichmässige Ausleuchtung der DC-Platte und bei UV-Aufnahmen die Verwendung eines schwachen Gelbfilters. Begleitend zum Foto sollte möglichst auch auf dem Negativ die Nummerierung der Probenauftragung und eine kurze Legende über die Plattenbelegung festhalten. Das kann durch ein entsprechend gefertigtes und beschriftetes Blatt Papier, das gleichzeitig als Fotountergrund dient, geschehen. Bei den Normallichtaufnahmen hat sich ein rein weisser Untergrund bewährt; die UV-Aufnahmen stört ein weisser Hintergrund. Hier sollten die weissen Platten auf schwarzem Hintergrund fotografiert werden. Der Bezug zur Normallichtaufnahme kann durch ein schmales Label am Bildrand hergestellt werden. In der folgenden Abbildung 13 ist Platz gelassen; hier können Sie jetzt am selbstgewählten Beispiel den Einfluss von Normal- und UV-Licht mit eigenen Fotos „dokumentieren“.



Abb. 13. Fotodokumentation der DC-Trennung von

Die Fotodokumentation ist Teil der abschließenden Interpretation der Analysenergebnisse und soll auch später die Analysenergebnisse nachvollziehbar und verständlich machen. Deshalb ist ein begleitendes Versuchsprotokoll zur durchgeführten DC-Trennung erforderlich.



4.7 Analysenergebnis

Zur Fotokumentation gehört **unbedingt** ein kurzes Protokoll, das neben den Angaben zur Probe (Objekt, Entnahme, Probenvorbereitung!, Referenzmaterialien) die für die Reproduzierbarkeit der DC-Trennung wesentlichen Parameter (Schichtmaterial, Fließmittel, Vorbehandlung der Platte, Zwischentrocknen, Mehrfachentwicklung, Kammersättigung und Kammertyp sowie Detektion (welche Nachweisreagentien und wie aufgebracht)) festhält. Hier sollten auch eigene Beobachtungen (z.B. Auftreten farbiger Eigenfluoreszenz, Farbänderungen bei nachfolgenden Behandlungen (Wärme, weiteres Nachweisreagenz usw.)) eingetragen werden. Oft ist es hilfreich –gerade wenn mit der Analogfotografie dokumentiert wird– die spots durch Auflegen einer Overheadfolie vorsichtig mit einem feinen Folienstift auf die Folie zu übertragen, von der Folie eine s/w-Kopie zu erstellen und diese 1:1-Papiervorlage zu colorieren und mit Kommentaren zu versehen. In Abb. 14 ist Platz gelassen für Ihr eigenes Protokoll, das natürlich Text und Foto zeigen kann. Was gehört unbedingt in den Text, welche Angaben sind für eine spätere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wichtig?



Abb. 14. Musterprotokoll für eine vergleichende DC-Trennung von

Das gleiche Vorgehen gilt beim Einsatz einer Digitalkamera. Hier bietet die Digitaltechnik durch die direkte Verbindung von Bild- und Textverarbeitung zusätzliche Möglichkeiten der Kommentierung und Bildbeschriftung. Aber auch hier muss das Protokoll die spätere Reproduzierbarkeit der DC-Trennung gewährleisten. Ausschnittsvergrößerungen, Farbinversionen, Farbretuschen etc. sind möglich und –richtig kommentiert und protokolliert– sehr hilfreich. Man hüte sich vor dem unkommentierten „Schönen“ der Bilddateien.



5. Ausgewählte Bindemittel

Die Bindemittel wurden nach den Arbeitsprotokollen des workshops vom Februar 1994 am Getty Conservation Institute (GCI) ausgewählt. Der Kurs wurde im Projekt „Wissenschaftliche Untersuchungsmethoden an Kunstwerken: Dünnschichtchromatographie“ entwickelt und liegt als Buchpublikation vor [Striegl96]. Die abgehandelten Bindemittelgruppen sind: Wachse, Harze, pflanzliche und tierische Leime. Die Versuchsdurchführung ist in sogenannten Protokolle in Form von Step-by-Step-Anleitungen vorgegeben. Diese Protokolle haben sich in den vorangegangenen Kursen in Hildesheim und Bern bewährt, so dass wir diese Protokolle im praktischen Teil unseres eigenen workshops weitgehend übernehmen werden. Natürlich werden manchmal Veränderungen und Improvisationen notwendig sein. Gerade diese Möglichkeiten bieten die Protokolle und es hat sich wiederholt gezeigt, dass Änderungen oft zur Verbesserung der DC-Trennung führen oder zumindest zum Experimentieren mit den Protokollen anregen. So haben wir die Entwicklung der Aminosäuren und Detektion mit Ninhydrin um eine Farbreaktion mit Zinkionen erweitert, die insbesondere für die relevanten Aminosäuren **Prolin** und **Hydroxyprolin** von Interesse ist [Jork90b]. **Aus Sicherheitsgründen ist das studentische Arbeiten mit Antimon(III)- und Antimon(V)chlorid im Kunsttechnologischen Labor verboten.** Als Alternative wird das Reagenz nach MORGAN und ELSON (vergl. Tab. 3) eingesetzt. Die Bewertung dieser und der als Demonstration unter dem Abzug durchgeführten Derivatisierung mit **Antimon(III)chlorid** (vergl. auch Tab. 4) ist ebenfalls eine interessante Variation der Protokolle. Zur Probenvorbereitung der **Proteine** und **Kohlenhydrate** (tierische und pflanzliche Leime) wird die erforderliche saure Hydrolyse unter Stickstoffatmosphäre (Schutzgas) im Exsikkator ausgeführt. Das Auftragen erfolgt linienförmig und punktförmig. Durch den Einsatz des automatischen Auftragegerätes werden Angaben von Volumen und Konzentration besser verständlich. Der Vergleich zwischen punktförmig und linienförmig aufgetragenen Substanzen soll die Vorteile der linienförmigen Auftragung bei gering konzentrierten Lösungen aufzeigen. Die Bindemittel werden als Feststoff vereinzelt, dann auf der Analysenwaage abgewogen und in verschliessbaren, konisch zulaufenden Plastikröhrchen (sogenannten tubes) mit Lösemittel versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Vor der Auftragung wird aufgeschüttelt und gegebenenfalls kurz zentrifugiert. Das Plattenmaterial ist Kieselgel. Nur für die Aminosäuretrennung wird als Schichtmaterial Cellulose verwendet.



5.1 Wachse

Wachse sind Produkte tierischer, pflanzlicher, mineralischer oder synthetischer Herkunft. Chemisch gesehen sind es, den Fettsäureestern ähnlich, einwertige gesättigte hochmolekulare Alkohole, oft auch freie Fettsäuren sowie deren Ester. Die Wachse unterscheiden sich von den echten Fetten u.a. dadurch, dass ihnen das Glycerin fehlt. Sie sind chemisch weitgehend stabil. Sie werden nicht ranzig und lassen sich nicht oder nur sehr schwer verseifen. Wichtige Vertreter sind das Bienenwachs und das pflanzliche Carnaubawachs.

Bienenwachs

Knetbares Ausscheidungsprodukt aus Drüsen der Honig-Biene, aus dem die Honigwaben aufgebaut werden. Man schmilzt die vom Honig durch Ausschleudern befreiten Waben, trennt die Schmelze (Schmp. 61–68°C) von festen Verunreinigungen u. läßt das so erhaltene gelbe (*cera flava*), braune od. rote Rohwachs erstarren. Das Rohwachs kann durch Behandlung mit Oxidationsmitteln vollkommen weiß gebleicht werden (*cera alba*). Bienenwachs ist in Wasser unlöslich, in heißem Alkohol, in heißen Fetten und etherischen Ölen, Ether, Chloroform u. Terpentinöl löslich. Bienenwachs besteht aus einem Gemisch von komplexen Wachsestern (ca. 70%), normalen Fettsäuren u. Hydroxyfettsäuren (13–14%) sowie Kohlenwasserstoffen (10–14%). Die Wachsester enthalten als Alkohol-Komponente vor allem 1-Triacontanol, das insbesondere mit Palmitin- und Cerotinsäure verestert ist. Als Wachsester von Hydroxyfettsäuren ist v.a. Ceryl-hydroxypalmitat (8–9%) im Bienenwachs vorhanden. 14-Hydroxypalmitin- sowie 16-Hydroxy- und 17-Hydroxystearinsäure sind ebenfalls Bestandteile von Bienenwachs; als freie Wachssäuren kommen v.a. Lignocerin, Cerotin- und Triacontansäure vor.

Carnaubawachs

(Karnaubawachs, Brazil wax, E 903). Pflanzenwachs, gelbliche, grünliche od. dunkelgraue Masse, Schmp. 83–86 °C. In organischen Lösemitteln mäßig, in Wasser kaum löslich; im geschmolzenen Zustand strenger, charakteristischer, jedoch nicht unangenehmer Geruch. Wird in verschiedenen durch Auslese gewonnenen Qualitäten aus den Blättern der brasilian. Fächerpalme *Copernicia prunifera* oder Carnaubapalme (*C. cerifera*) gewonnen.

Carnaubawachs enthält ca. 85% Ester (von Wachssäuren, ω -Hydroxycarbonsäuren und Zimtsäuren mit Wachsalkoholen u. Diolen), jeweils etwa 2–3% freie Wachssäuren (Carnauba-, Behen-, Lignocerin-, Triacontan- u. Cerotinsäure, meist 20–30 C-Atome), langkettige Alkohole, Diole u. gesättigte Kohlenwasserstoffe. Carnaubawachs ist schwer verseifbar; beim Kochen mit Laugen entstehen keine Seifen, sondern Emulsionen von Wachsalkoholen und Kohlenwasserstoffen [Römpp 99].



5.2 Harze

Harze sind nichtflüchtige Stoffwechselprodukte vieler Pflanzen, besonders der Nadelholzgewächse. Für den europäischen Raum ist die Gattung der Kieferngewächse *Pinaceae*, insbesondere die Fichten- und Kiefernarten, zur Gewinnung von Terpentinöl und Kolophonium von Interesse. Die leicht flüchtigen Pflanzeninhaltsstoffe werden aufgrund ihrer sensorischen Eigenschaften als etherische Öle bezeichnet. Sie sind ebenfalls Produkte dissimilatorischer Stoffwechselvorgänge, von ölartiger Konsistenz und zeichnen sich durch einen charakteristischen Geruch und Geschmack aus. Chemisch gesehen sind es weitgehend Mono- und Sesquiterpene. Der Begriff **Balsame** steht für Lösungen von Harzen in etherischen Ölen. Bekanntes Beispiel ist **Elemi**.

Pflanzliche Harze

Die aus der Rinde und dem Holz von Bäumen und Sträuchern gewonnenen Harze können nach ihren chemischen Hauptkomponenten unterteilt werden in:

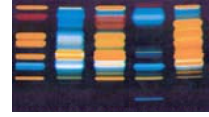
Terpenharze: Diterpen- und Triterpen-Säuren sowie Triterpen-Alkohole. Alle Naturharze zeigen eine mehr oder minder stark ausgeprägten Säurecharakter, der auf die sogenannten Harzsäuren zurückzuführen ist. So besteht beispielsweise Kolophonium hauptsächlich aus **Abietinsäure**. Interessant für die Identifizierung ist der Umstand, dass Di- und Triterpene nicht gleichzeitig in einem Harz auftreten. In Mono- und Diterpenen (Terpentin und Kolophonium) überwiegt der ungesättigte Charakter. Diese Harze neigen leicht zu Oxidation und vernetzender Polymerisation. Das Ergebnis sind Vergilbung und Versprödung. Die Triterpenharze sind teilweise ungesättigte alicyclische Verbindungen, mit ausgeprägten Enol-Keto-Strukturen, die jedoch nicht polymerisieren bzw. kondensieren [Mills87]. Die Oxidierbarkeit der Doppelbindungen führt zusätzliche Hydroxylgruppen ein, die in Nachbarschaft zu Carbonyl die Polarität erhöhen, die Alkohollöslichkeit bewirken und für die Photostabilität der Harze verantwortlich sind. Die Triterpenharze *Dammar* und *Mastix* werden deshalb als Gemäldefirniss besonders geschätzt.

Benzharze: Den Benzharzen liegt die Struktur des 1-Phenylpropen zugrunde; beispielsweise Benzoessäureconiferylester in Benzoe und Cinnamin in Perubalsam [Franz92].

Gummiharze: Gemische, die neben Terpenharzen (30-60%) und etherischen Ölen (5-10%) auch merkliche Mengen an Polysacchariden enthalten, die sich deshalb nur teilweise in lipophilen Lösemitteln lösen und mit Wasser Suspensionen ergeben. Als Beispiel **Myrrhe**: 25-40 % Harz, 2-10% etherisches Öl und 50-60% Scheimpolysaccharide [Franz92].

Insektenharze

Der Schellack wird aus den ausgeschiedenen Sekreten (*Lac*) der weiblichen Lackschildlaus (*Kerria lacca*) gewonnen. Die Bildung von Schellack (*Stocklack*) auf den Blättern von Bäumen (besonders der asiatischen Palasabaumarten) wird durch Saugstich der Weibchen in die Zweige von Bäumen ausgelöst. Schellack besteht neben Wachs- und färbenden Komponenten (hauptsächlich Erythrolaccain) aus Polyestern verschiedener Fettalkohole mit



Polyhydroxycarbonsäuren, z.B. Aleuritinsäure (9,10,16-Trihydroxypalmitinsäure) und terpenoide Shellolsäure.

Pflanzliche Leime

Pflanzliche Leime zählen chemisch gesehen zu den **Kohlenhydraten**. Pflanzenleime werden auf der Grundlage von pflanzlichen Rohstoffen, wie Stärke und Cellulose, hergestellt. Aber auch eine Reihe von wasserlöslichen Bestandteilen der Gummiharze, die sogenannten **Gummen**, zählen hierzu. Zu den pflanzlichen Leimen zählt man auch die pektinartigen Schleimsaccharide des *Carrageenmooses*, des irischen oder isländischen *Perlmooses* und das *Agar-Agar* der pazifischen Rotalgenarten. Die schleimigen Abkochungen des Carrageen bilden den besten Grund zur Herstellung türkischer Papiere (*Marmorpapiere*).

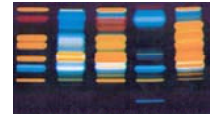
Gummen (**Pentosen**)

Hauptbestandteil der Gummen oder Gummileime sind neben den Uronsäuren oder **Zuckersäuren** die Aldopentosen (Ribose, Arabinose, Xylose). Gummen werden vor allem in der Buchmalerei und zur Bereitung von Aquarellfarben verwandt. Typische Vertreter sind: **Gummi arabicum**, Kirschgummi und Tragant. Seltener in Gebrauch: Aloe, Catechu, Myrrhe und Olibanum (Weihrauch).

Stärke und Dextrine (polymere **Hexosen**)

Stärke (Amylose) ist ein helixartiges Polyglucosid, das z.B. mit Iod charakteristisch tiefblau gefärbte Einschlussverbindungen bildet. Diese Farbreaktion ist ein sehr empfindlicher Nachweis für Stärke und kann zur Unterscheidung der Stärkeabbauprodukte, den sogenannten Dextrinen, herangezogen werden. Die Iod-Einschluss-Verbindungen von Dextrinen sind rötlich-braun bis violett gefärbt. Nach der Art des Stärkeabbaus teilt man die Dextrine in *Röstdextrin* (thermischer Abbau), *Säuredextrin* (hydrolytischer Abbau) und *Fermentdextrin* (enzymatischer Abbau) ein. Röstdextrin wurde im 19. Jhd. als „Malerbraun“ bezeichnet. Säuredextrin diente als Ersatz für Gummi arabicum. Es wird heute kaum noch verwandt, es sei denn für kleine Malereien auf Papier.

Baustein und Hydrolyseprodukt von Stärke und faserartiger Cellulose ist Glucose, eine Aldohexose. Zwischen Gummen und Stärke kann mit Hilfe eines einfachen Bindemitteltests (**BIALsche Reaktion** oder Reaktion nach TOLLENS) unterschieden werden. Beim Erhitzen von Pentosen mit Säuren wird Wasser abgespalten und Furfural gebildet. Hexosen ergeben unter gleichen Bedingungen 5-Hydroxymethylfurfural. Beide Verbindungen bilden mit Phenolen wie Phloroglucin, Orcin und Resorcin Farbstoffe, die zum indirekten Nachweis von Pentosen bzw. Hexosen herangezogen werden können.



5.3 Tierische Leime

Tierische Leime gehören chemisch gesehen in die große Naturstoffgruppe der **Proteine**. Hautleim enthält **Glutin**, einen löslichen Eiweissstoff. Hautleim wird aus Tierhäuten durch Auskochen mit Wasser gewonnen. Gelatine ist ein eiweisshaltiges Produkt aus tierischen Abfällen und reiner als Glutin. Gelatine dient als dünnflüssiger Leim zum Ankleben von Papierfolien und Blattgold. Fischleim wird aus Fischgräten oder aus der Schwimmblase des Störs (Hausen) gewonnen und wurde besonders in der griechisch-byzantinischen Ikonenmalerei als Vergolderleim verwandt. Albumine sind die bekanntesten Eiweisskörper. Albumine sind Hauptbestandteil des Hühnereiweisses und u.a. auch im Blut und in der Milch enthalten. Albumine finden als Bindemittel für Aquarellfarben Verwendung. Mit Formaldehyd ergeben Albumine einen hornartigen Kunststoff. Kasein, auch als Käsestoff bezeichnet, wird durch natürliche Milchsäurebildung oder künstlich durch Mineralsäuren aus fettfreier Kuhmilch ausgefällt. Kaseine sind ihrer Struktur nach Phosphoglyceroproteine. Kasein ist in Alkalien gut löslich, wird jedoch von Calciumsalzen gefällt. Kaseinleime sind als Außenanstrich nur auf frischem Kalkputz geeignet. Sie wandeln sich dabei mit dem noch nicht karbonatisierten Kalk zu wetterbeständigem Kalkkasein um. Eigelb (Eidotter, Vitellus oder Lecithus) besteht neben Eiweiss aus Fetten, Kohlenhydraten und Lipiden, insbesondere dem Glycerophosphatid Lecithin. Eigelb ist Grundlage zahlreicher Bindemittelgemische, die allgemein als Tempera bezeichnet werden (von lat. *temperare*, mischen). Die Tempera ist eine Emulsion aus lipophilen und hydrophilen Bindemitteln. Das Lecithin fungiert als Emulgator.

(↗ siehe dazu auch Vorlesungsskripte unter www.archaeometrielabor.com)



6. Literatur

Im Internet finden Sie u.a. unter www.camag.ch interessante Links zur Dünnschicht-Chromatographie. Die freundlichen Leute von CAMAG helfen gern. CAMAG ist führend auf dem Gebiet der instrumentellen HPTLC. CBS, der Referate-Dienst von CAMAG, recherchiert weltweit Literatur zur Dünnschicht-Chromatographie. CBS gibt es auch auf CD-ROM. Allerdings ist die „restauratorische Literatur“ etwas lückenhaft. Eine gute Ergänzung ist CHIN, das Canadian Heritage Information Network. Die Datenbank BCIN ist unter www.chin.gc.ca/Resources/Research_Ref/Reference_Info/e_reference.html zugänglich. Und dort sind auch die bekannten AATA (Art and Archaeology Technical Abstracts) abrufbar. Die Suchmaschine ist sehr gut und man wird schnell fündig. Während der Erstellung des Skriptes fand ich an der Hamburger Uni bei den Botaniker ein chromatographisches Praktikum; natürlich über Blattfarbstoffe. Mal reinschauen.

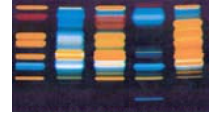
Hier die URL: http://www.rrz.uni-hamburg.de/biologie/b_online/dv01/1_06.htm

Weitere Links zum Thema Chromatographie auch unter: www.archaeometrielabor.com

- [Franz 92] G.Franz und H.Koehler, Drogen und Naturstoffe, Grundlagen und Praxis der chemischen Analyse, Springer, 1992
- [Gros 89] L.Gros, K.Bauer und W.Sauer: Dünnschicht-Chromatographie, Eine Einführung, Merck(Darmstadt), 1989, S.6
- [Hahn-Deinstrop 98] E.Hahn-Deinstrop; Dünnschicht-Chromatographie, VCH, 1998, S.17
[Hahn-Deinstrop 98a] ebenda. S.70
[Hahn-Deinstrop 98b] ebenda. S.242
[Hahn-Deinstrop 98c] ebenda. S.39
[Hahn-Deinstrop 98d] ebenda. S.92
- [Hauptmann 76] S.Hauptmann, J.Graefe und H.Remane: Lehrbuch der Organischen Chemie, Leipzig, 1976, S.702
- [Jork 90] H.Jork, W.Funk, W.Fischer und H.Wimmer: Dünnschicht-Chromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden, Bd.1a, VCH, 1990, S.12
[Jork 90a] ebenda; S.46
[Jork 90b] ebenda, S.325
- [Jork 93] H.Jork, W.Funk, W.Fischer und H.Wimmer: Dünnschicht-Chromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden, Bd.1b, VCH, 1993
- [Keller 98] R.Keller, J.-M.Mermet, M.Otto und H.M.Widmer (Herg.): Analytical Chemistry, Wiley-VCH, 1998, S.159

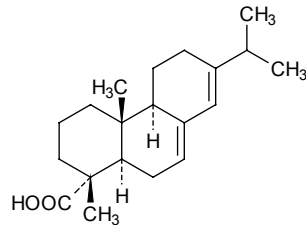


- [Koch 95] A.Koch, L.Kraus und S.Hoffstetter-Kühn,
Dünnschichtchromatographie, Springer, 1995, S.120
- [Koch 95a] ebenda, S.76
- [Koch 95b] ebenda, S.91
- [Morlock 97] DC-CATS-Kurs, Kursmaterial, CAMAG, Sonnenmattstr. 11, CH
4132 Muttenz, Schweiz
- [Macherey 88] Macherey-Nagel, Anleitung zum TLC-Mikro-Sets, Düren (BRD),
1988, , S.10
- [Mills 87] J.S.Mills und R.White: The Organic Chemistry of Museum Objects,
Series in Conservation and Museology, Butterworths, 1987
- [Otto 95] M.Otto: Analytische Chemie, VCH, 1995, S.415
- [Pötsch 87] W.R.Pötsch (Herg.): Lexikon bedeutender Chemiker, Leipzig, 1987,
S.104
- [Römpp 99] Römpp, Chemielexikon, 10. Auflage, CD-ROM, 1999
- [Striegl 96] M.Striegl und J.Hill: Thin-Layer Chromatography for Binding Media
Analysis, Scientific Tools for Conservation Series, Getty
Conservation Institute, Marina del Rey, 1996
- [Wintermeyer 89] U.Wintermeyer: Die Wurzeln der Chromatographie, GIT-Verlag,
Darmstadt, 1989
- [Zollinger 99] Zollinger,H.: Color A Multidisciplinary Approach, VCH, 1999, S.42



7. Glossar

Abietinsäure auch: Sylvinsäure, zu den Diterpenoiden gehörende Harzsäure, kommt v.a.



in Pinus- u. Abies-Arten (Kiefern u. Tannen) vor ; wichtigster Bestandteil des Kolophoniums, gut lösl. in Alkohol, Ether, unlösl. in Wasser, leicht autoxidabel. In Form von Estern, Seifen, Metallseifen (Harzseifen aus Abietinsäure heißen Abietaten) Lackbestandteil.

| | |
|-----------------------|--|
| Adsorbat | Komplex aus →Adsorbens und →Adsorpt |
| Adsorbens | Adsorptionsmittel, die kondensierte Phase, an deren Grenzfläche die Adsorption erfolgt. Typische Adsorbentien sind: Aktivkohle, Kieselgel, Aluminiumoxid, Zeolithe, Ionenaustauscher und Polyamide. |
| Adsorpt | Adsorbierter Stoff, der an der Grenzfläche einer kondensierten Phase adsorbierte Stoff |
| Adsorptiv | svw. →Adsorbens |
| Adsorption | →Sorption an einer Grenzfläche einer kondensierten Phase. Der Prozess kann in der Form Adsorptiv + Adsorpt = Adsorbat wie eine chemische Reaktion betrachtet werden. Die reversible physikalische Adsorption (Physisorption) und die irreversible chemische Adsorption (Chemisorption) sind begrifflich getrennt, jedoch im realen oft nebeneinander existent. |
| Aktivierung | in Bezug auf die DC-Trennschicht: Aufheben der Adsorbat-Komplexe, z.B. von Stoffen der Umgebungsluft, Feuchte usw., durch Ausheizen und Vorbereiten der Neueinstellung eines Adsorptionsgleichgewichtes durch →Konditionierung |
| Antimonchloride | Antimon(III)-chlorid (Antimonbutter), $SbCl_3$. Reines $SbCl_3$ ist bei $20^\circ C$ eine weiche, farblose, hygroskopische, die Haut stark reizende, rauchende Masse. $SbCl_3$ ist in wenig Wasser ohne Hydrolyse löslich, ferner in Alkohol, Ether, Benzol, Dioxan, Chloroform und Aceton. Antimon(V)-chlorid (Antimonpentachlorid) $SbCl_5$. Gelbliche, rauchende, Haut u. Schleimhäute ätzende Flüssigkeit. Wird durch Wasser hydrolysiert. |
| aprotische Lösemittel | Bez. für nichtwäßrige Lösemittel, die kein ionisierbares Proton im Molekül enthalten. Apolare aprotische Lösemittel sind aliphatisch u. aromatisch sowie halogenierte Kohlenwasserstoffe und tertiäre Amine. Dipolare aprotische Lösemittel sind Ketone, N,N-disubstituierte Amide, Nitroalkane, Nitrile, Sulfoxide und Sulfone. Die wichtigsten dipolaren aprotischen Lösemittel sind: Aceton, Acetonitril, N,N-Dimethylacetamid, N,N-Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid. Vergl. auch →protische Lösemittel |



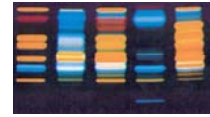
| | |
|-----------------|---|
| Azeotrop | Mischung von zwei od. mehreren verschiedenen Lösemitteln, deren Dampf dieselbe Zusammensetzung wie die flüssige Phase hat. Ein Azeotrop verhält sich wie ein reiner Stoff, d.h. das Azeotrop hat einen eigenen →Siedepunkt, der von den einzelnen Komponenten verschieden ist. |
| Balsame | Oleoresine, die in merklicher Menge Benzoe- u. Zimtsäure bzw. deren Derivate (Ester) enthalten u. sich durch einen charakterist. Geruch auszeichnen, der durch die Kombination von Benzoe- u. Zimtsäureestern mit etwas Vanillin entsteht. Typ. B. sind Perubalsam, Tolubalsam u. Benzoecharz. Als biblisches Balsam von Gilead (Mekka-Balsam) wurde bes. im Mittelalter das Harz aus <i>Commiphora opobalsamum</i> (<i>Burseraceae</i>) bezeichnet . |
| Bials Reagenz | Eine Lsg. von 1 g Orcin in 500 ml 30%iger HCl unter Zusatz von 25 Tropfen 10%iger Eisen(III)-chlorid-Lösung. Beim Erwärmen mit Pentosen gibt Bials Reagenz eine grüne, in Pentanol ausschüttelbare Färbung. |
| Chemisorption | irreversible →Adsorption |
| Chromatogramm | Fixierung der mittels →Chromatographie getrennten Komponenten innerhalb der Trennsäule oder der Trennschicht (inneres Chromatogramm) oder graphische Darstellung des Detektorsignals der getrennten Komponenten als Konzentrationsmass gegen die Zeit (äußeres Chromatogramm), →Retentionszeit |
| Chromatographie | Physikalisch-chemisches Trennverfahren zur analytischen und präparativen Trennung eines Stoffgemisches zwischen zwei miteinander nichtmischbaren Phasen |
| Derivatisierung | Chemische Umsetzung der Probe vor (→prächromatographische Derivatisierung) oder nach (→postchromatographische Derivatisierung) der Entwicklung auf der DC-Platte, meist unter Bildung von farbigen Verbindungen der zu trennenden Substanzen (den so gebildeten →Derivaten) |
| Desorption | Regenerierung des Sorbens durch Entfernen der sorbierten Komponenten , Umkehrung der →Adsorption |
| Detektor | Gerät oder Bauteil zum Nachweis und zur Messung von Stoffeigenschaften (meist physikalische Größen wie Lichtintensität, Leitfähigkeit, Brechungsindex) |
| Diffusion | (von latein.: diffundere = ausbreiten, sich zerstreuen). Unter D. versteht man die Durchmischung von verschiedenen miteinander in Berührung befindlichen gasf., flüssigen od. festen Stoffen. Ursachen hierfür sind u.a Konzentrationsunterschiede (gewöhnliche od. Konzentrationsdiffusion). |
| Dünnschicht- | innere →Chromatographie, Abk. DC, TLC (thin-layer chromatography) oder |



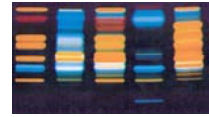
| | |
|------------------------------|--|
| chromatographie | HPTLC (high performance thin-layer chromatography), nicht mit HPLC verwechseln (→Säulenchromatographie) |
| Elemi | Sammelbegriff für Harze u. Öle aus der tropischen Pflanzenfamilie <i>Burseraceae</i> (→Balsame). Das Harz enthält sog. Elemisäuren (Harzsäuren). Das Öl hat einen frisch-würzigen Duft mit balsam. Nachgeruch u. wird wie das schwächer duftende Resin in der Parfüm-Ind. verwendet. |
| Eluent | Elutionsmittel, →mobile Phase |
| Elution | Chromatographische Technik, bei der das Elutionsmittel (→mobile Phase) kontinuierlich die chromatographische Trennstrecke (→stationäre Phase) passiert. |
| Elutions- chromatographie | äußere →Chromatographie, Säulenchromatographie |
| Elutionsmittel | →mobile Phase, allgemeiner, übergeordneter Begriff für →Fließmittel |
| Elutrope Reihe | Empirische Anordnung von Lsösemitteln nach ihrer Elutionswirkung bei der →Adsorptionschromatographie. Eine elutrope Reihe wird auf ein bestimmtes Adsorbens bezogen und folgt im wesentlichen dem Verlauf der Polarität. |
| Entwicklung | Auftrennung eines komplexen Stoffgemisches entlang der →stationären Phase |
| Exsikkatoren | (von latein.: exsiccare = austrocknen). Geräte zum Austrocknen od. trockenen Aufbewahren von Chemikalien. |
| Extraktion | Verteilung eines Stoffes in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, mit dem Ziel, durch wiederholte Gleichgewichtseinstellung den Stoff in einer der beiden Phasen anzureichern →Festphasenextraktion |
| Festphasenextraktion | fest/flüssig →Extraktion, Methode zur Probenaufarbeitung (Clean-up), kommerzielle Produkte der Miniatur-Elutionschromatographie, engl. Solid Phase Extraction (SPE) |
| Fließmittel | spezieller Begriff für das →Elutionsmittel in der Dünnschicht-Chromatographie |
| Fluoreszenz | energiereichere →Lumineszenz |
| fronting | Asymmetrie des Substanzflecks, Peakform weicht von der Gausskurve ab, der startseitige Anstieg des Peaks ist steiler als der frontseitige Abfall des Peaks. Gegensatz: →tailing |
| Funktionalität | Gesamtheit der →funktionellen Gruppen in einem Molekül unter besonderer Berücksichtigung räumlicher (sterischer) Bedingungen. Hierzu zählt u.a. auch die Zahl an Doppelbindungen, Alkylresten usw. |



| | |
|----------------------|---|
| funktionelle Gruppen | Organ. Kohlenwasserstoffe sind in der Regel reaktionsträge u. oft nur an den Stellen, die polare Atom-Bindungen besitzen, angreifbar. Solche Stellen bezeichnet man daher als funktionelle Gruppen, da sie die Reaktivität einer Stoffklasse bestimmen |
| Glutin | Aus dem Collagen des tierischen Bindegewebes u. durch Kochen von Knochen erhältliches leimartiges Protein-Gemisch (daher der Name von: latein.: gluten = Leim) von ähnlicher Zusammensetzung, jedoch geringerer Reinheit als Gelatine. Glutin wird als Leim verwendet. |
| Gummen | Die Gummen (Singular: das Gummi). Sammelbez. für pflanzliche Exsudate (Ausschwitzungen), die nach Verletzungen von unterschiedlichen Pflanzenteilen ausfließen u. an der Luft erstarren. Polymerbestandteile der Gummen sind Heteropolysaccharide auf Basis von u.a. Arabinose, Galactose, Glucuronsäure, Mannose, Rhamnose u. Xylose, die mit Wasser hochviskose u. klebrige Lsg. bilden. |
| Gummi arabicum | Die älteste bekannte Gummi-Art (altägypt. Bez. „Kami“), getrocknetes Exsudat verschiedener Akazienarten der trop. u. subtrop. Regionen. Schwach saures Produkt, welches in natürlicher Form als neutrales od. schwach saures K-, Ca- od. Mg-Salz vorkommt. Die Hauptbestandteile sind L-Arabinose, L-Rhamnose, D-Galactose u. D-Glucuronsäure. Gummi arabicum ist säureempfindlich, schon im schwach sauren Bereich tritt ein Abbau ein, gibt mit Gelatine und anderen Proteinen (z.B. Casein) wasserunlös. Komplexe (Koercervate). |
| Hexosen | Bezeichnung. für offenkettige Aldosen mit 6 Kohlenstoff-Atomen wie Glucose, Galactose, Mannose, →Kohlenhydrate, →Pentosen |
| HLB-System | (für engl. <i>hydrophilic-lipophilic balance</i>). Der HLB-Wert ist ein von Griffin (1950) eingeführtes Maß für die Wasser- bzw. Öl-Löslichkeit von vorwiegend nichtionischen Tensiden. Hier allgemein für die Modifizierung von Oberflächen verwendet. |
| Hydrolyse | (von Hydro... u. ...lyse). Unter H. versteht man eine chem. Reaktion, bei der eine Verb. durch Einwirkung von Wasser gespalten wird, gemäß der formalen Gleichung: $A-B + H-OH \rightarrow A-H + B-OH$. |
| hydrophil | (von Hydro... u. ...phil, wörtlich: Wasser-liebend). Bez. für den Molekülteil von amphiphilen Verb., der eine ausgeprägte Wechselwirkung mit polaren Lsm., bes. Wasser, zeigt. Diese Eigenschaft bewirkt beispielsweise die Löslichkeit von Tensiden in Wasser. Synonym zu hydrophil: lipophob, Gegensatz: hydrophob, lipophil od. apolar. Hydrophile Gruppen sind Carboxylat-, Sulfat- u. Sulfonat- sowie ggf. substituierte Ammonium-Funktionen od. Polyether-Ketten. |
| hydrophob | (von Hydro... u. ...phob, wörtlich: Wasser-meidend). Bez. für den Molekülteil von amphiphilen Verb., der beispielsweise für die Micellbildung u. orientierte Adsorption an Grenzflächen verantwortlich ist. Synonym zu hydrophob: lipophil, Gegensatz: hydrophil, lipophob od. polar. Hydrophobe Gruppen sind langkettige od. arom. Kohlenwasserstoff-Reste |



| | |
|-----------------|--|
| Hydroxyprolin | 4-Hydroxypyrrrolidin-2-carbonsäure; Kurzzeichen Hyp. Leicht wasserlöslich. Hyp stellt eine seltenere, am Aufbau von bestimmten Proteinen beteiligte nichtessentielle Hydroxyaminosäure dar. Die Herst. erfolgt weitgehend durch Extraktion von Gelatine-Hydrolysaten, denn Hyp ist ein wesentlicher Bestandteil der Collagene. |
| Kohlenhydrate | Zucker, Sammelbez. für die als Naturstoffe sehr verbreiteten Polyhydroxyaldehyde (Aldosen) u. Polyhydroxyketone (Ketosen), auch als Saccharide |
| Konditionierung | reproduzierbare Beladung einer zuvor →aktivierten Oberfläche |
| lipophil | →hydrophob |
| Lipide | (von griech.: lípos = Fett, Öl). Sammelbez. für strukturell sehr unterschiedliche, in allen Zellen vorkommende Stoffe mit übereinstimmenden Lsg.-Eigenschaften: L. sind im allg. in Wasser unlösl., amphiphile L. können jedoch Kolloide, Micellen od. flüssig-krist. Phasen bilden; mit wenig polaren organ. Lsm. wie Benzol, Ether, Chloroform od. Chloroform-Methanol sind sie aus tier. od. pflanzlichem Gewebe extrahierbar. Zu den L. gehören die eigentlichen Fette u. die fettähnlichen Stoffe. |
| Lumineszenz | Emission von Licht im sichtbaren, UV- u. IR-Spektralbereich nach Energiezufuhr. Oft wird noch zwischen Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterschieden. Hierzu sind jedoch streng genommen photochemische und kinetische Angaben nötig. |
| mobile Phase | die gegenüber der →stationären Phase fließende, strömende oder wandernde Phase. Verantwortlich für die sich wiederholenden Gleichgewichtseinstellungen an der Grenzfläche mobile/stationäre Phase, die die Effizienz der chromatographischen Stofftrennung wesentlich beeinflussen. |
| Myrrhe | Die Myrrhe sind Baumharze (Gummen), die ebenso wie Opopanax von alters her in Somalia u. in Südarabien von verschiedenen kleinen Bäumen aus der Familie der Burseraceae gesammelt werden. Sie enthalten 57–61% Gummen u. 7–17% ether. Öle mit überwiegend Sesquiterpenen (Myrrhenöl), ferner 20–25% Harze u. Harzsäuren sowie Derivate langkettiger Alkantanole. |
| Oligomere | von griech.: olígos = wenig u. méros = Teil). Bez. für Verb., in deren Mol. nur wenige Atome od. Atom-Gruppen (konstitutionelle Einheiten) gleicher od. verschiedener Art wiederholt miteinander verknüpft sind u. deren physikal. Eigenschaften sich bei Änderung der Mol.-Größe durch Hinzufügen od. Wegnahme einer od. mehrerer der konstitutionellen Einheiten <u>deutlich ändern</u> . In diesem letzten Aspekt unterscheiden sich damit die Oligomere von einem chem. ansonsten gleich aufgebauten Polymeren. →Oligosaccharide, →Peptide |
| Orcin | (Orcinol, 5-Methylresorcin, 3,5-Dihydroxytoluol; kommt in Flechten und niederen Pilzen (<i>Aspergillus fumigatus</i>) u. als Bestandteil von Flechten-Farbstoffen (Lackmus, Orseille, vgl. Orcein) natürlich vor. Orcin wird als Reagenz auf Pentosen (→Bials Reagenz), Lignin, Saccharose, Arabinose, Diastase genutzt. |



| | |
|----------------------------|--|
| Papier- chromatographie | Stationäre Phase und Träger sind gleich, wird heute nicht mehr angewandt, durch die Dünnschicht-Chromatographie verdrängt |
| Pentosen | Sammelbez. für Monosaccharide mit 5 C-Atomen, z.B. die Aldopentosen (Arabinose, Ribose u. Xylose). Pentosen lassen sich an ihren Reaktionen mit 4-Nitrophenylhydrazin u. mit →Bials Reagenz von →Hexosen unterscheiden; beim Erhitzen von Pentosen in verd. wäss. Schwefel- od. Salzsäure entsteht Furfural, das bei Zugabe von Anilin eine Rotfärbung gibt (Bindemittelgruppentest), →Kohlenhydrate |
| Phosphoreszenz | energiearme →Lumineszenz |
| Physisorption | reversible →Adsorption |
| Planar- chromatographie | Flachbettchromatographie, →Dünnschicht-Chromatographie |
| protische Lösemittel | Nicht scharf definierte Gruppe von Lösemitteln, die Protonen enthalten od. freisetzen u./od. Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden können, z.B. Wasser, Alkohole, Amine usw.; die protischen Lösemittel werden unterteilt in protogene, protophile u. neutrale Lsm.; vgl. auch →aprotische u. nichtwäßrige Lösemittel. |
| Prolin | Pyrrolidin-2-carbonsäure, zählt zu den nichtessentiellen Aminosäuren, in Wasser sehr gut, in Alkohol gut (im Gegensatz zu anderen Aminosäuren), in Aceton u. Benzol wenig u. in Ether nicht löslich. Kommt in Casein (6,7%) u. Collagen bzw. seinem Abbauprodukt Gelatine (bis zu 26,7%) zusammen mit →Hydroxyprolin (Hyp) vor |
| Proteine | Eiweiße, Eiweißstoffe, Eiweißkörper, aus Aminosäuren aufgebaute Naturpolymere. |
| Reflexion | (von latein.: reflectere = rückwärts biegen, zurückwenden). Phys. Vorgang, bei dem eine einlaufende Welle (z.B. Licht) aus einem Medium auf die Grenzfläche zu einem anderen Medium auftrifft, und teilweise in das erstere Medium zurückgeworfen (reflektiert) wird. Ist die R. gerichtet, dann spricht man von spekularer Reflexion; ist die Reflexion gestreut bzw. ungerichtet, dann spricht man von diffuser Reflexion. |
| Remission | (latein.: remissio = Zurücksendung) allgemein für diffuse →Reflexion |
| Reproduzierbarkeit | Nachvollziehbarkeit der Methode und Bestätigung der Analysenergebnisse bei Wiederholung der DC-Trennung |
| Retention | Das durch →Adsorption und →Verteilung verursachte >Zurückhalten< bzw. >Verweilen< einer Substanz auf der chromatographischen Trennstrecke. |
| Retentionszeit | >Verweildauer<, →Säulenchromatographie. Zeit t_r , die nach Proben-aufgabe ($t = 0$) vergeht, bis die retardierende Substanz am Säulenende austritt und ein Detektorsignal verursacht (→Chromatogramm). |



| | |
|-----------------------|--|
| Säulenchromatographie | äußere →Chromatographie, Elutionschromatographie (z.B. HPLC, high performance liquid chromatography) |
| Siedepunkt | Temperatur der Flüssigkeit, bei der der Dampfdruck der verdampften Flüssigkeitsteilchen gleich dem äusseren Atmosphärendruck ist. |
| Sorption | Aufnahme eines geeigneten Stoffes entweder an der Oberfläche (→Adsorption) oder im inneren eines Sorptionsmittels (→Absorption, →Extraktion). |
| spot | Substanzfleck, Bereich oder Zone auf der chromatographischen Trennstrecke, Anreicherung der betreffenden, getrennten Substanz |
| stationäre Phase | Trennstrecke, gegenüber der →mobilen Phase fixierter Füllkörper oder auf einem Füllkörper fixierte Flüssigkeit. Hier können sowohl die Oberfläche als auch der grenzflächennahe Porenraum an der wiederholten Gleichgewichtseinstellung an der Phasengrenze beteiligt sein. |
| tailing | Asymmetrie des Substanzfleckes, Peakform weicht von der Gaussskurve ab, der startseitige Anstieg des Peaks ist kleiner als der frontseitige Abfall des Peaks. Gegensatz: →fronting |
| Terpene | Terpene sich formal als →Oligomere des Kohlenwasserstoffs Isopren auffassen. Nach der Anzahl der Isopren-Reste unterscheidet man Monoterpene (C10), Sesquiterpene (C15), Diterpenoide (C20), Sesterterpene (C25), Triterpene (C30), Tetraterpene (C40) u. Polyterpene. Die Steroide leiten sich von einer Gruppe von Triterpenen, den Methylsterinen ab. |
| Verweilzeit | Zeit, die ein Stoff vom Aufbringen bis zum Wiederverlassen der Trensäule benötigt. →Retentionszeit |
| Zuckersäuren | Bez. für Carbonsäuren der allg. Formel $O=CH-[CH(OH)]_n-COOH$ ($n > 2$), die im Vgl. zu Aldosen eine $COOH$ - statt CH_2OH -Endgruppe haben |



Eigene Notizen