

Zonentrennverfahren

Das Zonentrennverfahren ist eine arbeitssparende Methode zur dünnenschichtchromatographischen Identifizierung von Arzneistoffen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nicht alle in Betracht kommenden Vergleichssubstanzen aufgetragen werden müssen, sondern nur eine Auswahl dieser Stoffe. Bei diesem Verfahren wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit zwei Referenzsubstanzen chromatographiert. Durch die beiden Referenz-Substanzen wird das Chromatogramm in folgende drei Zonen eingeteilt:

Zone I : Start	bis Referenz-Substanz 1
Zone II : Referenz-Substanz 1	bis Referenz-Substanz 2
Zone III : Referenz-Substanz 2	bis zur Laufmittelfront.

Ist die Zone ermittelt, in der sich die zu identifizierende Base befindet, so wird diese mit den zugehörigen Vergleichs-Substanzen dieser Zone in einem zweiten, "Zonen-spezifischen" Laufmittel chromatographiert.

Besonders empfehlenswert ist diese Methode für basische Wirkstoffe: Anders als bei sauren Arzneistoffen ist eine Bildung von Untergruppen, etwa geordnet nach „Basenstärke“ hier unpraktikabel.

Arbeitsvorschrift

Herstellen der Vergleichslösungen

Viele Alkaloide liegen in Form ihrer Salze vor, die so nicht direkt auf Kieselgel chromatographiert werden können. Zur DC müssen aus Salzen die Basen erst freigesetzt werden. Dies wird erreicht durch die Verwendung von Fließmitteln, die basische Zusätze wie NH₃ oder Diethylamin enthalten.

Die Vergleichslösungen werden hergestellt, indem man 10 bis 20 mg eines Alkaloidsalzes in 5 bis 10 ml Methanol löst; **diese DC-Lösungen müssen wegen möglicher Zersetzung wöchentlich erneuert werden.**

Herstellen der Analysenlösung

Wie bei den Vergleichslösungen. Die Lösung muß jedoch klar sein, störende Begleitstoffe werden durch Filtrieren bzw. Zentrifugieren abgetrennt.

Chromatographie

Die Lösung des zu identifizierenden BII-Stoffes wird zusammen mit den Lösungen der zwei Referenzsubstanzen Propranolol-HCl und Imipramin-HCl auf einer Kieselgelplatte bzw. -folie über eine Laufstrecke von 10 cm entwickelt.

Laufmittel : 160 ml Methylenchlorid werden mit 40 ml konz. Ammoniak im Schütteltrichter (Vorsicht) geschüttelt. Die untere Phase wird kurz über wenig Natriumsulfat getrocknet, filtriert und als Laufmittel benutzt (maximal zwei-bis dreimal). Keine Kammersättigung.

Das entwickelte Chromatogramm wird unter dem Abzug solange mit dem Fön getrocknet, bis kein Ammoniakgeruch mehr wahrzunehmen ist.

Auswertung : Die zu identifizierende Substanz liegt zwischen

Start und Propranololbase	= Zone 1
Propranololbase und Imipraminbase	= Zone 2
Imipraminbase und Laufmittelfront	= Zone 3

Anschließend wird die unbekannte Substanz mit den Vergleichssubstanzen der entsprechenden Zone im geeigneten Laufmittel chromatographiert.

Zone 1 : geeignetes Laufmittel Dichlormethan / Diethylamin 92 + 8
(Hierzu ist Kammersättigung erforderlich, mindestens zweimal entwickeln).

Hier findet man z. B. :

Atenolol, Atropin, Chinin, Chinidin, Codein, Dihydrocodein, Ephedrin, Propranolol, Scopolamin, Tramadol, Trimethoprim.

Zone 2 : geeignetes Laufmittel: Dichlormethan / Diethylamin 98 + 2
(Hierzu ist Kammersättigung erforderlich, mindestens zweimal entwickeln).

Hier findet man z. B. :

Chloroquin, Diphenhydramin^{a)}, Fluoxetin, Papaverin, Procain, Strychnin, Tetracain.

Zone 3 : geeignetes Laufmittel : Cyclohexan / Diethylamin 97 + 3

Hier z. B. :

Amantadin, Chlorpromazin^{a)}, Chlorprothixen^{a)}, Diphenhydramin^{a)}, Doxepin, Imipramin^{a)}, Levomepromazin^{a)}, Lidocain, Papaverin, Promethazin^{a)}

Detektion :

1. Immer: UV-Licht bei 254nm (Fluoreszenzlösung) und 366nm (hier evtl. Eigenfluoreszenz)
Dann wahlweise (= alternativ, pro Chromatogramm nur ein Reagenz anwenden!):

2. Dragendorff - Reagenz (Chromatogramm muß absolut trocken sein):
Lsg. A: 0.85g Bi(NO₃) + 10ml Eisessig + 40ml Wasser
Lsg. B: 20.0g KI + 50ml Wasser
Diese Vorratslösungen werden getrennt aufbewahrt.
Sprühlösung : 1ml Lsg.A + 1ml Lsg.B + 4ml Eisessig + 20ml Wasser.
Mehrfach sprühen, zwischendurch trocknen (Warmluft, aber keine Heissluft!).
Einige Alkaloide reagieren nur schwach, Ephedrin gar nicht!

oder:

3. Konzentrierte Schwefelsäure / Heissluftbehandlung
Bei allen mit ^{a)} bezeichneten Substanzen sinnvoll. Vorsicht. Handschuhe sind Pflicht.
Sprühkabinett und Abzug anschließend reinigen.

oder:

4. Ninhydrin-Reagenz
Z.B. geeignet zur Detektion von Ephedrin, das sich mit Dragendorff - Reagenz nicht anfärbt!
Sprühlösung : 0.3g Ninhydrin + 100ml Butanol + 3ml Eisessig.
Nachbehandlung : Vorsichtig mit dem Heissluftfön.

Bitte beachten Sie :

- **Alle Sprühreagentien sind toxisch. Einatmen und Hautkontakt vermeiden!**
-
- **Ein Entwickeln besprühter Chromatogramme im Trockenschrank ist aus Sicherheitsgründen nicht erlaubt!**