

MACHEREY-NAGEL

TLC Mikro-Sets / TLC micro-sets



Gebrauchsanleitung / User manual

So erreichen Sie uns / How to contact us

Wir beraten Sie gerne

Wenn Sie Fragen im Zusammenhang mit den TLC Mikro-Sets oder zu weiteren DC- oder Chromatographie-Produkten haben, wenden Sie sich an uns.

We Meet your Needs

If you have any questions concerning TLC micro-sets or further TLC or chromatography products, please contact us.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG

	Deutschland und International /	Tel.:	+49 24 21 969-0
		E-mail:	info@mn-net.com
	USA	Tel.:	+1 888 321 62 64
		E-mail:	sales-us@mn-net.com
	Frankreich / France	Tel.:	+33 388 68 22 68
		E-mail:	sales-fr@mn-net.com
	Schweiz / Switzerland	Tel.:	+41 62 388 55 00
		E-mail:	sales-ch@mn-net.com

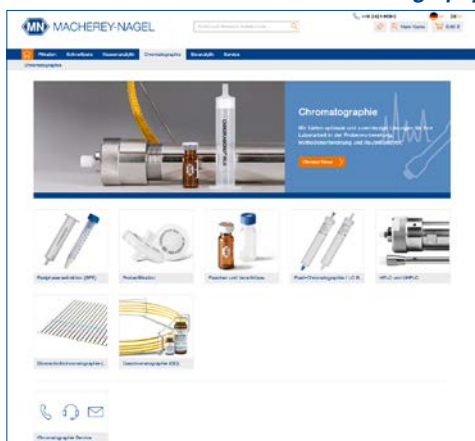
Besuchen Sie unsere Chromatographie-Seiten!

- Service und Produktinformationen zu DC-Produkten
- Informationen zu weiteren Produkten (SPE, HPLC, GC, DC, Flaschen und Verschlüsse etc.)
- Kostenlose Applikationsdatenbank

Visit our chromatography website!

- Service and product information about TLC products
- Information about further products (SPE, HPLC, GC, TLC, Vials and caps and more)
- Free application database

www.mn-net.com/chromatography



Gebrauchsanleitung deutsch	
Einleitung	2
Prinzip und Durchführung der DC	3
Vorbereiten der Probe · Auftragen der Probe	3
Entwicklung eines Chromatogramms · Sichtbarmachung der getrennten Substanzen	4
Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen	5
TLC Mikro-Sets	6
TLC Mikro-Sets für die Dünnschicht-Chromatographie	6
TLC Mikro-Set A	7
Beschreibung des TLC Mikro-Sets A für Anfänger · Bestellinformation	7
Trennbeispiele des TLC Mikro-Set A	8
Auftrennung einer Mischung von fettlöslichen / lipophilen Farbstoffen	8
Auftrennung eines Gemisches von Anthrachinonfarbstoffen	9
Auftrennung eines Gemisches von Lebensmittelfarbstoffen	10
Auftrennung von Filzschreiberfarben	11
TLC Mikro-Set F1	12
Beschreibung des TLC Mikro-Set F1 · Bestellinformation	13
Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F1	14
Trennung von Aminosäuren (Modellmischung und Urin)	14
Trennung von Schwermetallkationen	16
TLC Mikro-Set F2	18
Beschreibung des TLC Mikro-Set F2 · Bestellinformation	19
Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F2	20
Analyse von Speisefetten	20
Analyse von Fetten und Cholesterin im Blut	22
TLC Mikro-Set F3	24
Beschreibung des TLC Mikro-Set F3 · Bestellinformation	25
Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F3	26
Trennung von Analgetika (Schmerzmittel)	26
Drogenanalyse am Beispiel der Chinarinde	28
TLC Mikro-Set M	30
Beschreibung des TLC Mikro-Set M · Bestellinformation	31
Weitere DC-Produkte	32
Bestellinformation	32
MN-Schichten für die DC	33
Literatur	34
Sicherheitsanweisungen	36
Gebrauchsanleitung englisch	39

Einleitung

Die chemische Analytik von Rohstoffen, die Kontrolle während der Produktion, die abschließende Qualitäts- und Reinheitsprüfung der hergestellten Produkte, wie auch die Pharma-, Lebensmittel- und Umweltanalytik haben in den letzten Jahrzehnten ständig an Bedeutung gewonnen.

Einen festen Platz unter den Verfahren, die diese Probleme zu lösen vermögen, hat die Dünnschicht-Chromatographie (DC) – in der englischen Sprache Thin Layer Chromatography (TLC) – erobert. Sie ist eine effiziente analytische und präparative Trennmethode und hat die ursprüngliche Papier-Chromatographie nahezu vollständig abgelöst. Auf vielen Gebieten ist sie zum Standardverfahren bei Routineanalysen geworden. Sie zeichnet sich dabei nicht nur durch Schnelligkeit, Genauigkeit und eine hohe Empfindlichkeit, sondern vor allem auch durch Wirtschaftlichkeit aus.

MACHEREY-NAGEL hat die DC seit ihren Anfängen, also seit den sechziger Jahren, durch Entwicklung und Produktion zahlreicher Sorptionsmittel und innovativer Bindersysteme begleitet. Dazu zählen vor allem Kieselgel, Cellulose, Aluminiumoxid und Polyamid bzw. entsprechend modifizierte Materialien für spezielle Trennprobleme.

Mit diesen praxisbewährten Sorptionsmitteln werden in unserem Hause nicht nur Glasplatten als DC-Fertigplatten maschinell beschichtet, sondern auch Polyester- und Aluminiumfolien als DC-Fertigfolien. Dadurch ersparen wir dem Analytiker das zeitraubende und kostspielige Herstellen von handbeschichteten DC-Platten und DC-Fertigfolien; gleichzeitig garantiert die maschinelle Fertigung eine größere Gleichmäßigkeit der Schichten.



Insbesondere für die Ausbildung in Schulen und Betrieben, haben wir TLC-Mikro-Sets zusammengestellt, die sowohl die Schnelligkeit des Verfahrens als auch die Leistungsfähigkeit unserer POLYGRAM® DC-Fertigfolien nutzen. Nicht nur dafür eignen sich die DC-Fertigfolien, sondern auch für eine schnelle Produktkontrolle noch während der Herstellungsphase in wissenschaftlichen und industriellen Laboratorien. Gleichzeitig wollen wir mit den TLC-Mikro-Sets Anregungen geben zur Lösung weiterer Probleme und zu eigenen Forschungen.

Das Anfängersset (TLC Mikro-Set A, siehe Seite 7–11) zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass es mit einfachen Laufmitteln Proben auftrennt, die eine Eigenfarbe besitzen, so dass eine Anfärbung entfällt. Alle erforderlichen Utensilien sind im Set enthalten.

Die Fortgeschrittenensets (TLC Mikro-Sets F1, F2, F3, siehe Seite 12–29) eignen sich für den schon geübten Anwender, da bereits etwas mehr Fingerspitzengefühl erwartet wird. So wird ein Teil der Proben selbst aufgearbeitet und zur Identifizierung der Substanzen werden Sprühreagenzien angewandt. Jedes Fortgeschrittenenset wurde für spezielle Gruppen von Trennungen aus der physiologischen und pharmazeutischen Analytik entwickelt.

Aufbauend auf einem Materialset (TLC Mikro-Set M, siehe Seite 30–31), das auch selbstständiges dünnschicht-chromatographisches Arbeiten ermöglicht, können die einzelnen Versuche der Fortgeschrittenensets durchgeführt werden.

Zusätzlich zum Materialset wird die im Labor üblicherweise vorhandene Ausrüstung vorausgesetzt (z.B. Abzug, Schutzhandschuhe, Föhn, Trockenschrank, Mörser).

Damit bietet diese Erweiterung die konsequente Weiterführung in ein interessantes Gebiet der analytischen Chemie. Gemeinsam ist den Mikro-Set-Typen, dass alle Trennungen auf POLYGRAM® DC-Fertigfolien des Formates 4 x 8 cm durchgeführt werden, die oftmals auch Anwendungen in der Routineanalytik finden.

Bei der Dünnschicht-Chromatographie (DC) handelt es sich um einen mehrstufigen Verteilungsprozess. An diesem Prozess sind Lösemittel oder Lösemittelgemische, Probenmoleküle und ein geeignetes Sorptionsmittel beteiligt. Bei der DC besteht dieses Sorptionsmittel aus einer dünnen Schicht – für analytische Zwecke üblicherweise 0,1 bis 0,25 mm dick – aufgebracht auf einen Träger (Glasplatte, Polyesterfolie oder Alufolie).

Bei den Versuchen der vorliegenden Sets wird das zu trennende Substanzgemisch auf eine DC-Polyesterfolie aufgetragen und in eine mit Laufmittel befüllte Trennkammer gestellt. In vielen Fällen ist nach wenigen Minuten bereits die chromatographische Trennung beendet. Substanzen mit Eigenfärbung sind sofort sichtbar, ungefärbte Substanzen werden durch Besprühen mit geeigneten Nachweisreagenzien sichtbar gemacht (Bildung gefärbter Verbindungen).

Steht eine UV-Lampe zur Verfügung und enthält die Sorptionsmittelschicht einen geeigneten Fluoreszenzindikator, so können häufig die Substanzen durch Betrachten der Chromatogramme im UV-Licht lokalisiert werden.

Zum besseren Verständnis einer dünnschicht-chromatographischen Trennung beschreiben wir nachstehend fünf durchzuführende Schritte:

1. Vorbereiten der Probe

Die für eine chromatographische Trennung vorgesehene Probe muss mehrere Voraussetzungen erfüllen, wenn man eine gute Trennung erreichen will. Es ist nicht möglich, an dieser Stelle auf Einzelheiten einzugehen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass eventuell mehrere Arbeitsgänge zur Anreicherung oder Vorreinigung der zu trennenden Substanzen erforderlich sind.

Im Anfängersetz sind die Trennbeispiele so gewählt, dass komplizierte Arbeitsgänge entfallen. Es handelt sich um gezielt zusammengestellte Farbstoffe bzw. deren Gemische, die ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt werden können. Zum Abschluss wird noch ein Beispiel aus der täglichen Praxis angeführt (Trennung von Filzschreiberfarben), wobei die Probe jedoch ebenfalls ohne Aufarbeitung aufgetragen werden kann.

Bei den Fortgeschrittenensets müssen einige dieser Arbeitsschritte bereits eigenständig von Ihnen durchgeführt werden. Dazu zählt die mechanische Zerkleinerung einer Probe, Extraktionsschritte, Filtration und Anreicherung sowie Probennahme. Durch diese Eigenleistung bei der Vorbehandlung der Proben wird dem Anwender ein kleiner Einblick in industriell übliche Arbeitstechniken vermittelt, die

wiederum Voraussetzung sind für eine erfolgreiche dünnschicht-chromatographische Trennung.

Im Gegensatz zum Anfängersetz, welches Proben abgestimmter Zusammensetzung enthält, bearbeiten die Fortgeschrittenensets praxisnahe Aufgabenstellungen. Auf Einzelheiten wird bei dem jeweiligen Beispiel eingegangen.

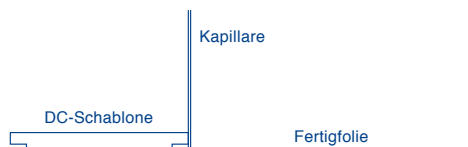
2. Auftragen der Probe

Wie man die zu trennenden Proben aufträgt, richtet sich nach dem Ziel der chromatographischen Trennung. Für analytische Trennungen mit anschließender qualitativer Auswertung trägt man punktförmig mit Kapillare oder Mikropipette auf, für quantitative Auswertungen entweder punkt- oder strichförmig (meist 1 cm). Für präparative Trennungen wird bandförmiges Auftragen über die ganze Plattenbreite empfohlen.

Bei den nachfolgenden Trennbeispielen trägt man das zu trennende Gemisch bzw. die Vergleichslösungen punktförmig mit Hilfe von Glaskapillaren auf die DC-Fertigfolien auf. Diese Kapillaren sollten beim Auftragen verschiedener Proben nur einmal benutzt werden, weil sonst Probenreste zur nächsten Probe verschleppt werden.

Die Kapillaren füllen sich bei organischen Probelösungen beim Eintauchen sehr schnell von selbst, bei wässrigen Lösungen erfolgt das Aufsteigen der Lösung deutlich langsamer; eventuell muss ein Pipettenhütchen zur Hilfe genommen werden. Zur Entleerung der Kapillare setzt man sie senkrecht und vorsichtig mit dem Ende auf die Schicht. Senkrecht deshalb, damit die Kapillare sich selbstständig entleert und vorsichtig, damit die Schicht nicht beschädigt wird. Defekte Schichten führen zu ungleichmäßig geformten Flecken. Um die Auftragflecken möglichst klein und kompakt zu halten, muss man unter Umständen in mehreren Portionen mit Zwischentrocknen (Föhnen mit kalter oder warmer Luft, Trockenschrank) auftragen. Dies gilt besonders für wässrige Probelösungen.

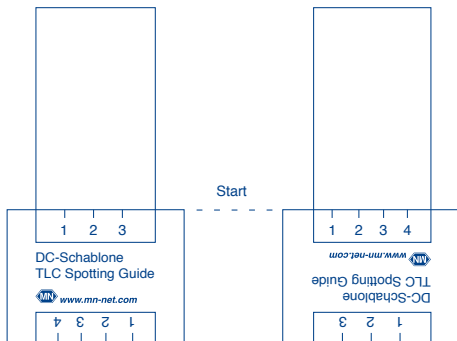
Zur Erleichterung des Auftragens empfehlen wir eine Auftragschablone (DC-Schablone), die speziell auf unsere DC-Fertigfolien abgestimmt ist. Die nachfolgenden Abbildungen demonstrieren einen einwandfreien Probenauftrag mit der erwähnten Schablone.



Prinzip und Durchführung der DC

Je nachdem ob man drei oder vier Substanzen auftragen will, fügt man die Fertigfolie in den dafür vorgesehenen Rahmen der Schablone rutschfest auf eine Unterlage. Damit sind Startlinie und Auftragpunkte in den richtigen Abständen festgelegt. Zusätzlich ist die Unterseite der Schablone entlang der Startlinie eingefräst, so dass beim Aufsaugen der Lösungen durch die Sorbensschicht der Fertigfolie keine Störungen auftreten können.

Bei den Versuchen zum Anfängersset wird grundsätzlich nur die Einteilung für drei Startpunkte benötigt. Bei den Fortgeschrittenen-Versuchen kommt auch die Einteilung für vier Startpunkte auf der Schablone zur Anwendung.



Für eine spätere Auswertung der Dünnschicht-Chromatogramme werden vor dem Auftragen der Proben die Startpunkte und -linie mit einem weichen Bleistift auf der DC-Schicht markiert.

3. Entwicklung eines Chromatogramms

Nach dem Auftragen lässt man das Lösemittel der Proben vollständig abdunsten (etwa 10 min) oder hilft mit einem Föhn nach. Danach stellt man die DC-Fertigfolie in die mit etwa 10 mL Laufmittel befüllte Trennkammer (Glas mit Schraubverschluss) und schraubt den Deckel vorsichtig zu, indem man das Glas mit einer Hand festhält und gleichzeitig fest auf den Auflagetisch drückt.



Der Flüssigkeitsspiegel des Laufmittels sollte sich während dieses Vorganges nicht bewegen. Das Laufmittel darf auf keinen Fall die Startflecken ungleichmäßig berühren oder überstreichen. Durch Kapillarwirkung steigt das Laufmittel in der Schicht hoch und bewirkt die Substanztrennung.

Hat das Laufmittel die gewünschte Höhe (etwa 6 bis 7 cm) erreicht, bricht man den Trennvorgang ab. Man nimmt die DC-Fertigfolie aus der Trennkammer und markiert sofort die Laufmittelfront mit dem Bleistift.

Bei allen aufgeführten Beispielen kommt man ohne eine Kammersättigung aus. Sind jedoch reproduzierbare Laufstrecken erforderlich, so ist in vielen Fällen die Sättigung der Kammeratmosphäre mit Laufmitteldampf vorteilhaft. Dazu kleidet man die Trennkammer innen mit einem gut saugenden Chromatographie-Papier (MN 260, REF 814030) aus und befüllt die Trennkammer mit 15 mL Laufmittel anstelle der sonst ausreichenden 10 mL.

4. Sichtbarmachung der getrennten Substanzen

Nach der chromatographischen Entwicklung müssen die getrennten Substanzen sichtbar gemacht werden, sofern sie keine Eigenfärbung aufweisen. Zur unspezifischen Sichtbarmachung dient die Betrachtung im UV-Licht, wenn die Schicht einen Fluoreszenzindikator enthält, oder die Anfärbung in der Iod-Kammer.

Spezifischere Farbreaktionen können durch Besprühen mit entsprechenden Nachweisreagenzien erzielt werden. Es kann auch eine Kombination der angeführten Verfahren angewendet werden. Alternativ zu Sprühtechniken kann die DC-Fertigfolie auch kurz in das Nachweisreagenz eingetaucht werden.

Bei den Trennbeispielen im Anfängersset handelt es sich stets um Farbstoffe, d.h. um Substanzen, die ohne Anfärbung erkannt werden können.

Im Fortgeschrittenenset werden Substanzen getrennt, die farblos sind, wie es in der Praxis die Regel ist. Zur Sichtbarmachung werden geeignete Sprühreagenzien (z.B. Sprühreagenz nach Dragendorff-Munier, Molybdätosphorsäure, Ninhydrin, Rubeanwasserstoff) eingesetzt.

Das *Sprühreagenz nach Dragendorff-Munier* wird allgemein zum Nachweis von stickstoffhaltigen Verbindungen, wie Alkaloiden und tertiären Aminen verwendet. Es setzt sich zusammen aus basischem Bismutnitrat, Weinsäure und Kaliumiodid und bildet einen Kalium-Tetraiodobismutat-Komplex. Die nachzuweisenden stickstoffhaltigen Verbindungen werden durch die Weinsäure protoniert und bilden orangefarbende (teils gelbe bzw. rote bis braune) Ionenpaare der Form $[Bi_4]^- [HNR_3]^+$.

Prinzip und Durchführung der DC

Molybdätosphorsäure, gelöst in Ethanol, findet Anwendung als Sprühreagenz zum Nachweis von reduzierenden Substanzen (z.B. Fetten, Fettsäuren, Alkoholen). Durch Erwärmen auf 120 °C (Heißluftföhn oder Trockenschrank) nach Besprühen der entwickelten DC-Fertigfolie, erfolgt eine dunkelblaue Färbung der Substanzflecken, auch »Molybdänblau« genannt.

Zum Nachweis von Aminosäuren, Aminen und Aminozuckern kann eine ethanolische Ninhydrin-Lösung verwendet werden, die rötliche Farbflecken mit den Analyten nach Erwärmen auf 110 °C bildet.

Schwermetalle können durch die Anwendung von *Rubeanwasserstoff* sichtbar gemacht werden. Im Anschluss der Trennung werden die DC-Platten mit Rubeanwasserstoff in Ethanol besprüht. Erst durch anschließende Bedampfung mit Ammoniak-Gas (25% Ammoniak-Lösung auf Uhr- oder im Becherglas) werden die Schwermetalle sichtbar.



Weitere Details zu den Sprühreagenzien werden in den Versuchsbeschreibungen der Mikro-Sets gegeben. Zur Sprühtechnik ist aber anzumerken, dass Sprühreagenzien grundsätzlich nur im Abzug anzuwenden sind. Die DC-Fertigfolie legt man zum Besprühen auf einen Bogen Filtrierpapier. Meist genügt es, 5–10 mL Lösung in den Sprüher einzufüllen. Das Besprühen erfolgt aus ca. 15 cm Entfernung mit Hilfe des Gummiballes oder - falls vorhanden - mit Druckluft. Es ist grundsätzlich besser, die Schicht zweimal sehr dünn und gleichmäßig zu besprühen (mit Zwischentrocknung), als gleich beim ersten Mal die Schicht durch und durch zu benetzen. Bei zu starkem Besprühen verlaufen die Flecken. In der Regel wird die DC-Fertigfolie nach dem Besprühen getrocknet.

Nach der Sichtbarmachung werden die Zonen mit einem Bleistift umrandet, um auch später nach dem Verblässen der Flecken deren Lage noch erkennen zu können.

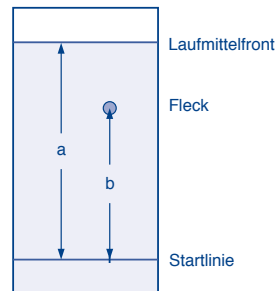
5. Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen

Die Auswertung richtet sich nach dem Ziel der Chromatographie. Bei qualitativen Bestimmungen genügt oft die Lokalisierung der nachzuweisenden Substanzen. Dies geschieht sehr einfach durch mitlaufen lassen von Vergleichssubstanzen.

Eine häufig verwendete Größe bei der Auswertung ist der R_f -Wert (Retention-Faktor) oder sein 100-facher Wert hR_f . Der R_f -Wert ist wie folgt definiert:

$$R_f = \frac{\text{Abstand Startlinie} - \text{Fleckenschwerpunkt}}{\text{Abstand Startlinie} - \text{Laufmittelfront}} = \frac{b}{a}$$

d. h. die R_f -Werte liegen zwischen 0 und 1, am günstigsten zwischen 0,1 und 0,8 bzw. 10–80 für hR_f .



Um gut reproduzierbare R_f -Werte zu erhalten, bedarf es jedoch einer sorgfältigen Kammersättigung und der Konstanzhaltung weiterer Parameter wie Laufmittelzusammensetzung, Temperatur etc.

Auch eine quantitative Auswertung über entsprechende Kalibriermessungen ist möglich. Dazu wird entweder die Fläche der Substanzflecken herangezogen oder eine densitometrische Auswertung direkt auf der Schicht durchgeführt. Bei letzterem Verfahren ist jedoch ein hoher apparativer Aufwand erforderlich.

Bitte beachten Sie vor jeder Versuchsdurchführung die Sicherheitshinweise auf den Etiketten und die Sicherheitsanweisungen in dieser Arbeitsanleitung (siehe Seite 36–38). Führen Sie verbrauchte Chemikalien gemäß den landesspezifischen Umweltrichtlinien einer fachgerechten Entsorgung zu.

TLC Mikro-Sets für die Dünnschicht-Chromatographie

Bei den TLC Mikro-Sets handelt es sich um Material- und Chemikaliensammlungen zur Durchführung von einfachen Trennungen mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie (DC). Besonders empfohlen werden diese Sets zur Einführung in die DC für Schüler, Studenten und Auszubildende. Jedes Set enthält ausführliche Erläuterungen und Arbeitsanleitungen zur Durchführung der aufgeführten Trennbeispiele.

● Anfängersset (TLC Mikro-Set A)

Dieses Set eignet sich besonders für Anfänger.

Die Trennungen werden mit einfachen Laufmitteln und Proben mit Eigenfarbe durchgeführt. Eine Anfärbung ist daher nicht notwendig.

Alle erforderlichen Utensilien sind im Set enthalten.

● Fortgeschrittenensets (TLC Mikro-Sets F1, F2, F3)

Fortgeschrittenensets erfordern etwas mehr Fingerspitzengefühl und experimentelles Geschick. Ein Teil der Proben muss aufgearbeitet werden.

Zur Identifizierung der Substanzen müssen Sprühreagenzien angewandt werden.

Für die Trennungen mit Set F1 bis F3 wird das Materialset TLC Mikro-Set M benötigt.

● Materialset (TLC Mikro-Set M)

Dieses Set ist Voraussetzung, um die Trennungen der Sets F1 bis F3 durchführen zu können.

Gleichzeitig dient es als Grundausrüstung zur selbstständigen Erarbeitung weiterer dünn-schicht-chromatographischer Versuche.



TLC Mikro-Set A

Beschreibung des TLC Mikro-Set A für Anfänger

Dieses Set enthält alle Chemikalien, Hilfsmittel und eine Anleitung zur Durchführung der folgenden Versuche:

- ✓ Trennung einer Mischung von fettlöslichen/lipophilen Farbstoffen (Testfarbstoffgemisch 1): Buttergelb, Indophenol, Sudanblau II, Sudanrot G
- ✓ Trennung einer Mischung von Anthrachinonfarbstoffen (Testfarbstoffgemisch 2): Blau 1, Blau 3, Grün, Grünblau, Rot, Violett 1, Violett 2
- ✓ Trennung einer Mischung von Lebensmittelfarbstoffen (Testfarbstoffgemisch 3): Brillantschwarz BN (E151), Echtrot E, Erythrosin (E127), Gelborange S (E110), Naphtholrot S, Ponceau 4 R (E124), Tartrazin (E102)
- ✓ Trennung von Filzschreiberfarben

Inhalt des TLC Mikro-Set A für Anfänger

- 1 Arbeitsanleitung (auch als Download verfügbar)
- 3 Trennkammern, 1 Messzylinder 10 mL
- 50 Glaskapillaren 1 μ L, 1 Auftragschablone (DC-Schablone)
- je 50 Polyesterfolien POLYGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄, Alox N/UV₂₅₄ und CEL 300, 4 x 8 cm
- je 8 mL Testfarbstoffgemisch 1 (4 lipophile Farbstoffe), Einzel-Testfarbstoffe Sudanblau II (A) und Sudanrot G (B) (jeweils in Toluol)*
- je 8 mL Testfarbstoffgemisch 2 (7 Anthrachinonfarbstoffe), Einzel-Testfarbstoffe Blau 1 (C) und Violett 2 (D) (jeweils in Toluol – Cyclohexan (2:1, v/v))*
- je 8 mL Testfarbstoffgemisch 3 (7 Lebensmittelfarbstoffe), Einzel-Testfarbstoffe Gelborange S (E) und Brillantschwarz BN (F) (jeweils in Wasser)
- je 100 mL Toluol, Toluol – Cyclohexan (2:1, v/v), Ethanol, 25 % Ammoniak-Lösung – 2-Propanol (5:3, v/v)* und 2,5 % Natriumcitrat-Lösung, 2 Filzschreiber

Bestellinformation

Bezeichnung	Packungs-einheit	REF
TLC Mikro-Set A für Anfänger*	1 Set	814000
Ersatzteile für TLC Mikro-Set A		
Testfarbstoffgemisch 1*, Lösung von 4 lipophilen Farbstoffen in Toluol (Komponenten s. oben)	8 mL	814001
Testfarbstoffgemisch 2*, Lösung von 7 Anthrachinonfarbstoffen in Toluol – Cyclohexan (2:1, v/v) (Komponenten s. oben)	8 mL	814002
Testfarbstoffgemisch 3, wässrige Lösung von 7 Lebensmittelfarbstoffen (Komponenten s. oben)	8 mL	814003
Kollektion der 4 Einzelkomponenten von Testfarbstoffgemisch 1*	4 x 8 mL	814011
Kollektion der 7 Einzelkomponenten von Testfarbstoffgemisch 2*	7 x 8 mL	814012
Kollektion der 7 Einzelkomponenten von Testfarbstoffgemisch 3	7 x 8 mL	814013
Natriumcitrat, 2,5 g in 100 mL Flaschen zum Auffüllen mit destilliertem Wasser	2,5 g	814029
DC-Polyesterfolien POLYGRAM [®] , 4 x 8 cm: 100 x SIL G/UV ₂₅₄ ; 50 x Alox N/UV ₂₅₄ ; 50 x CEL 300	1 Set	814028

* Diese Produkte enthalten kennzeichnungspflichtige Gefahrstoffe. Für detaillierte Informationen bitte die Sicherheitsanweisungen (siehe Seite 36–38) oder das Sicherheitsdatenblatt (www.mn-net.com/sds) beachten. Unsere TLC Mikro-Sets werden sorgfältig zusammengestellt und kontrolliert, bevor sie unser Haus verlassen. Sollte trotzdem bei Anlieferung Ihres TLC Mikro-Sets in einer oder mehreren Ampullen des Testfarbstoffgemisches das (leicht siedende) Lösemittel verdampft sein, können Sie dieses ganz einfach selbst wieder auffüllen. (Testfarbstoffgemisch 1: je 8 mL Toluol, Testfarbstoffgemisch 2: je 8 mL Toluol – Cyclohexan (2:1, v/v))

Weiteres Zubehör auf Seite 31.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set A

Auftrennung einer Mischung von fettlöslichen / lipophilen Farbstoffen

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Fettlösliche / lipophile Farbstoffe finden Verwendung bei der Anfärbung von natürlichen und synthetischen Ölen, Fetten und Wachsen, von Benzenen, Mineralölen sowie zur transparenten Anfärbung von Kunststoffen. Buttergelb war früher als Lebensmittelfarbstoff zugelassen.

Chemisch betrachtet sind diese Substanzen Vertreter einer ganzen Reihe von Farbstoffklassen: Azofarbstoffe, Azine, Indophenole und Anthraquinone.

Materialien:

1 x POLYGRAM® Alox N/UV₂₅₄, 1 x Trennkammer, 3 x Glaskapillaren, 1 x Messzylinder, 1 x Auftragschablone

Probelösung:

Testfarbstoffgemisch 1 (bestehend aus Buttergelb, Sudanblau II, Sudanrot G und Indophenol, bereits in Toluol gelöst)

Vergleichslösungen A und B:

2 Einzelkomponenten (Sudanblau II (A) und Sudanrot G (B), jeweils bereits in Toluol gelöst)

Laufmittel:

Toluol (ca. 6 mL)

Trennzeit:

ca. 7 min

Sichtbarmachung:

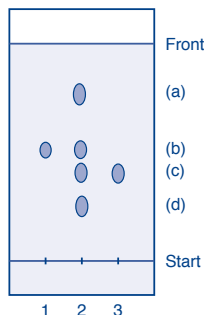
erfordert keinen besonderen Nachweis – Substanzen besitzen Eigenfarbe

Durchführung:

- Jeweils eine gefüllte (1 µL) Glaskapillare verwenden und wie folgt mittels Schablone auftragen (siehe Seite 3: 2. Auftragen der Probe):
Startpunkt 1: Vergleichslösung A (Sudanblau II)
Startpunkt 2: Testfarbstoffgemisch 1
Startpunkt 3: Vergleichslösung B (Sudanrot G)
- Aufgetragene Farblösungen für 5 min an der Luft trocknen lassen.
- Trennkammer aufschrauben und mit Hilfe des Messzylinders ca. 6 mL Toluol einfüllen.

- DC-Fertigfolie in die Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
- Trennung abwarten (ca. 7 min), danach die Trennkammer unter dem Abzug aufschrauben, DC-Fertigfolie entnehmen und das Laufmittel abdampfen lassen.

Chromatogramm:



Legende:

(a) Buttergelb, (b) Sudanblau II, (c) Sudanrot G, (d) Indophenol

Anmerkung:

Die Trennung gelingt auch auf einer Kieselgelschicht, z. B. POLYGRAM® SIL G/ UV₂₅₄. Als Laufmittel wird ebenfalls Toluol eingesetzt.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set A

Auftrennung eines Gemisches von Anthrachinonfarbstoffen

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Anthrachinonfarbstoffe sind wichtige Farbstoffe in der Textil- und Lederindustrie. Sie zeichnen sich durch besondere Brillanz und Lichtechtheit aus. Sie leiten sich vom Anthrachinon durch entsprechende Substitution des Grundgerüsts oder durch Anbindung weiterer Ringsysteme ab.

Materialien:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x Trennkammer, 3 x Glaskapillaren, 1 x Messzylinder, 1 x Auftragschablone

Probelösung:

Testfarbstoffgemisch 2 (bestehend aus 7 Anthrachinonfarbstoffen: Blau 1, Blau 3, Grün, Grünblau, Rot, Violett 1 und Violett 2, bereits in Toluol – Cyclohexan (2:1, v/v) gelöst)

Vergleichslösungen C und D:

2 Einzelkomponenten (Blau 1 (C) und Violett 2 (D), jeweils bereits in Toluol – Cyclohexan (2:1, v/v) gelöst)

Laufmittel:

Toluol – Cyclohexan (2:1, v/v) (ca. 10 mL)

Trennzeit:

ca. 2 x 12 min + 10 min Zwischentrocknung

Sichtbarmachung:

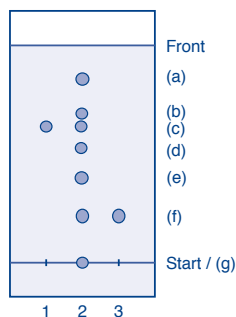
erfordert keinen besonderen Nachweis – Substanzen besitzen Eigenfarbe

Durchführung:

1. Jeweils eine Glaskapillare verwenden und wie folgt mittels Schablone $\frac{3}{4}$ Inhalt der Glaskapillare auftragen (siehe Seite 3: 2. Auftragen der Probe):
Startpunkt 1: Vergleichslösung C (Blau 1)
Startpunkt 2: Testfarbstoffgemisch 2 (7 Anthrachinonfarbstoffe)
Startpunkt 3: Vergleichslösung D (Violett 2)
2. Aufgetragene Farblösungen für 5 min an der Luft trocknen lassen.
3. Trennkammer aufschrauben und mit Hilfe des Messzylinders ca. 10 mL Toluol – Cyclohexan einfüllen.

4. DC-Fertigfolie in die Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
5. Trennung abwarten (ca. 12 min bzw. Laufstrecke von 65–70 mm).
6. Trennkammer aufschrauben, DC-Fertigfolie entnehmen und Trennkammer wieder verschließen.
7. Das Laufmittel der DC-Fertigfolie unter dem Abzug abdampfen lassen.
8. Die getrocknete DC-Fertigfolie wieder in die Trennkammer stellen und Trennung wiederholen.

Chromatogramm:



Legende:

(a) Violett 1, (b) Grünblau, (c) Blau 1, (d) Grün, (e) Rot 1, (f) Violett 2, (g) Blau 3

Anmerkungen:

Hierbei handelt es sich um eine so genannte Zweifachentwicklung ohne Laufmitteländerung. Dies ist immer dann angebracht, wenn zahlreiche Substanzen getrennt werden sollen, aber eine Einfachentwicklung noch nicht zum Ziel führt. Dabei kann man zur Erzielung bestimmter Gruppentrennungen bei der zweiten Entwicklung durchaus auch ein anderes Laufmittel wählen. Es ist in jedem Fall darauf zu achten, dass eine sorgfältige Zwischentrocknung vorgenommen wird (Abzug!).

Um chromatographische Zusammenhänge zu erkennen, ist es auch hier wertvoll, andere Trennschichten wie POLYGRAM® Alox N/UV₂₅₄ (Aluminiumoxid) oder POLYGRAM® CEL 300 (Cellulose) einzusetzen, oder auch die Laufmittel nach eigenen Überlegungen zu variieren.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set A

Auftrennung eines Gemisches von
Lebensmittelfarbstoffen

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Farbenvielfalt herrscht nicht nur in der Chromatographie, sondern auch in unserer täglichen Nahrung. Es gibt sogar Nahrungsmittel, deren Qualität vom Verbraucher nach ihrer Farbe bewertet wird. Dies ist mit ein Grund, weshalb auch heute noch Lebensmittel gefärbt werden.

Nahrungsmittelzusätze, also auch Lebensmittelfarbstoffe, unterliegen in den meisten Ländern gesetzlichen Regelungen. Bevor ein Farbstoff (natürlich oder synthetisch) darin aufgenommen wird, muss eine toxikologische Beurteilung erstellt und durch wissenschaftliche Belege die cancerogene Unbedenklichkeit nachgewiesen werden.

Unser Testgemisch enthält sieben Farbstoffe, davon sind nicht alle zur Lebensmittelfärbung zugelassen. Man erkennt daraus gleich die Bedeutung einer Trennung und Identifizierung solcher Substanzen.

Materialien:

1 x POLYGRAM® CEL 300, 1 x Trennkammer,
3 x Glaskapillaren, Messzylinder und die
Auftragschablone

Probelösung:

Testfarbstoffgemisch 3
(bestehend aus Brillantschwarz BN, Echtrot E,
Erythrosin, Gelborange S, Naphtholrot S,
Ponceau 4R und Tartrazin, bereits in Wasser
gelöst)

Vergleichslösungen E und F:

2 Einzelkomponenten (Gelborange S (E) und
Brillantschwarz BN (F), jeweils bereits in Wasser
gelöst)

Laufmittel:

2,5 % Natriumcitrat-Lösung – 25 % Ammoniak-
Lösung – 2-Propanol (20:5:3, v/v/v),
hergestellt durch Mischen von 10 mL 2,5 %
Natriumcitrat-Lösung und 4 mL des fertigen
Ammoniak – 2-Propanol - Gemisches.

Trennzeit:

20–25 min (Laufstrecke von ca. 65 mm)

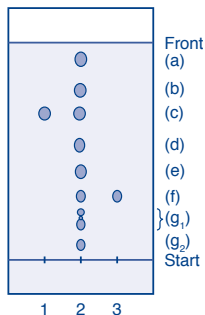
Sichtbarmachung:

erfordert keinen besonderen Nachweis –
Substanzen besitzen Eigenfarbe

Durchführung:

1. Jeweils eine Glaskapillare verwenden und wie folgt mittels Schablone $\frac{1}{4}$ Inhalt der Glaskapillare auftragen
(siehe Seite 3: 2. Auftragen der Probe):
Startpunkt 1: Vergleichslösung E
(Gelborange S)
Startpunkt 2: Testfarbstoffgemisch 3
Startpunkt 3: Vergleichslösung F
(Brillantschwarz BN)
2. Aufgetragene Farblösungen für 5 min an der Luft trocknen lassen.
3. Trennkammer aufschrauben und Laufmittel einfüllen (siehe oben).
4. DC-Fertigfolie in die Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
5. Trennung abwarten (ca. 20–25 min bzw. Laufstrecke von 65 mm).
6. Trennkammer aufschrauben, DC-Fertigfolie entnehmen und das Laufmittel von der DC-Fertigfolie unter dem Abzug abdampfen lassen.

Chromatogramm:



Legende:

(a) Tartrazin, (b) Ponceau 4R, (c) Gelborange S,
(d) Naphtholrot S, (e) Echtrot E, (f) Brillant-
schwarz BN, (g₁) Erythrosin (Nebenflecken),
(g₂) Erythrosin (Hauptfleck)

Anmerkungen:

Das Laufmittel muss vor jeder Trennung frisch an-
gesetzt werden. Lässt man das Laufmittel längere
Zeit stehen, ändert es seine Zusammensetzung
und damit seine Trenneigenschaften.
Erythrosin zeigt im Chromatogramm drei Flecken,
einen stärkeren Hauptfleck (g₂) und zwei schwä-
chere Nebenflecken (g₁). Unter Umständen kann man
bei dieser Verbindung sogar einen weiteren schwa-
chen Nebenfleck erkennen.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set A

Auftrennung von Filzschreiberfarben

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Die vorangegangenen Beispiele enthielten von uns gezielt zusammengesetzte Farbstoffmischungen. Dieser Versuch – die Auftrennung von Filzschreiberfarben – zeigt, dass industrielle Farbstoffkompositionen komplexere Gemische darstellen und damit wesentlich schwieriger zu trennen sind. Besonders dankbare Versuchsobjekte sind schwarze Filzstifte, da sie häufig besonders schöne Farbzusammensetzungen zeigen. Ein roter Strich bedeutet noch lange nicht, dass nur eine einzige Rotkomponente darin enthalten ist.

Die fertigen Chromatogramme können auch zur Qualitätskontrolle (Farbbrillanz) und vor allem zur Produktidentifizierung herangezogen werden. Neben den beiden mitgelieferten Filzschreibern können auch eigene Proben untersucht werden. Tinten können zum Vergleich gegenübergestellt werden.

Materialien:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x Trennkammer, 3 x Glaskapillaren, 1 x Messzylinder, 1 x Auftragschablone

Proben:

2 käuflich erhältliche Filzschreiber

Laufmittel:

Ethanol (ca. 10 mL)

Trennzeit:

ca. 20 min

Sichtbarmachung:

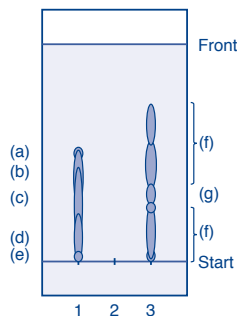
erfordert keinen besonderen Nachweis – Substanzen besitzen Eigenfarbe

Durchführung:

1. Direkte Auftragung mit dem jeweiligen Filzschreiber – schwach aufgedrückter Punkt:
Startpunkt 1: schwarzer Filzschreiber
Startpunkt 3: roter Filzschreiber
Der Startpunkt 2 kann z.B. auch für eine Tinte (eine Glaskapillare voll) oder einen eigenen Filzschreiber verwendet werden.
2. Aufgetragene Punkte für 3 min an der Luft trocknen lassen.
3. Trennkammer aufschrauben und Laufmittel (siehe oben) einfüllen.

4. DC-Fertigfolie in die Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
5. Trennung abwarten (ca. 20 min).
6. Trennkammer aufschrauben, DC-Fertigfolie entnehmen und das Laufmittel unter dem Abzug abdampfen lassen.

Chromatogramm:



Legende:

(a) violett, (b) hellrot, (c) gelb, (d) grün, (e) schwarz, (f) rötliche Färbung, (g) gelborange

Anmerkungen:

Das Trennergebnis wird von der Auftragemenge beeinflusst. Daher nicht zu viel (zu dicker Punkt) auftragen und darauf achten, dass die Schicht nicht verletzt wird. Hat man zu viel aufgetragen, kann eine Zweifachentwicklung im gleichen Laufmittel die Trennung noch etwas verbessern.

Für den schwarzen Filzschreiber ergibt sich ein besonders eindrucksvolles Trennmuster bei strichförmiger Auftragung entlang der Startlinie (Lineal oder DC-Schablone zur Hilfe nehmen).

Im vorgeschlagenen Laufmittel werden Tinten (z. B. Königsblau, Pelikan 4001) nicht aufgetrennt. Dies gelingt jedoch, wenn man als Laufmittel ein Gemisch aus *n*-Butanol – Eisessig – Wasser (12:3:5, v/v/v) bei gleicher Trennschicht verwendet (Trennzeit ca. 25 min). Gleichzeitig ergibt sich auch ein anderes Chromatogramm für die Filzschreiberfarben (Ausprobieren!).



TLC Mikro-Set F1

Beschreibung des TLC Mikro-Set F1

Dieses Set enthält alle erforderlichen Chemikalien zur Trennung von:

- ✓ Aminosäuren (Testgemisch, bestehend aus Alanin, Arginin, Tryptophan und Valin)
- ✓ Aminosäuren im Urin
- ✓ Schwermetallkationen Kupfer(II) und Mangan(II)

Für die Trennungen mit Set F1 wird das Materialset TLC Mikro-Set M benötigt. (Eine detaillierte Beschreibung befindet sich auf Seite 31.)

Inhalt von TLC Mikro-Set F1

- 1 Arbeitsanleitung (auch als Download verfügbar)
- 50 Glaskapillaren 1 µL
- je 50 Polyesterfolien POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄ und CEL 300, 4 x 8 cm
- je 100 mL *n*-Butanol, Ninhydrin-Sprühreagenz (in Ethanol), Aceton, 25 % Ammoniak-Lösung, Rubeanwasserstoff-Sprühreagenz (in Ethanol)*
- je 50 mL 50 % Essigsäure, 18 % Salzsäure*
- je 8 mL Aminosäuren-Testgemisch (siehe oben), Arginin-Vergleichslösung (A) und Tryptophan-Vergleichslösung (B) (jeweils in Wasser)
- je 8 mL Schwermetallkationen-Testgemisch (siehe oben), Mn²⁺-Vergleichslösung (C) und Cu²⁺-Vergleichslösung (D) (jeweils in Wasser)

Bestellinformation

Bezeichnung	Packungs-einheit	REF
TLC Mikro-Set F1*	1 Set	814200
Ersatzteile für TLC Mikro-Set F1		
Aminosäuren-Testgemisch (Komponenten siehe oben)	8 mL	814201
Kollektion der 4 Einzelkomponenten des Aminosäuren-Testgemisches	4 x 8 mL	814202
Ninhydrin-Sprühreagenz (in Ethanol)*	100 mL	814203
Schwermetallkationen-Testgemisch (Cu ²⁺ , Mn ²⁺)	8 mL	814204
Kollektion der 2 Einzelkomponenten (Cu ²⁺ , Mn ²⁺) des Kationen-Testgemisches	2 x 8 mL	814205
Rubeanwasserstoff-Sprühreagenz (in Ethanol)*	100 mL	814206
DC-Polyesterfolien POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 8 cm	4 x 50	814025
DC-Polyesterfolien POLYGRAM® CEL 300, 4 x 8 cm	4 x 50	814027
TLC Mikro-Set M (Materialset)	1 Set	814100

* Diese Produkte enthalten kennzeichnungspflichtige Gefahrstoffe. Für detaillierte Informationen bitte die Sicherheitsanweisungen (siehe Seite 36–38) oder das Sicherheitsdatenblatt (www.mn-net.com/sds) beachten.

Weiteres Zubehör auf Seite 31.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F1

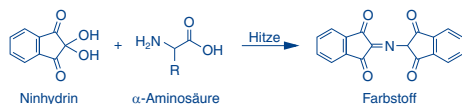
Trennung von Aminosäuren
(Modellmischung und Urin)

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Aminosäuren sind für alle Lebewesen von übertragender physiologischer Bedeutung. Sie sind mitverantwortlich für das Zellwachstum, den Leberstoffwechsel, die Blutgerinnung, die Hämoglobininbildung, Funktionen des Nervensystems und viele weitere physiologische Funktionen. Schließlich sind sie zu größeren Einheiten verknüpfte Bausteine der Eiweißstoffe (Peptide). Zum Teil werden sie im Körper aufgebaut (nicht-essentielle Aminosäuren), zum Teil müssen sie mit der Nahrung dem Körper zugeführt werden (essentielle Aminosäuren). Ihre Trennung und Identifizierung ist daher von großem analytischem Interesse.

Die natürlichen Aminosäuren kommen teilweise frei vor (Blutserum, Urin), oder man erhält sie durch Spalten von Eiweißstoffen. Dies geschieht durch Einwirkung von Enzymen oder durch saure Hydrolyse eiweißhaltiger Substanzen (z.B. Hühnerweiß). Der menschliche Körper scheidet täglich etwa 1,1 g freie Aminosäuren aus.

Da Aminosäuren farblose Verbindungen sind, müssen nach erfolgter DC-Trennung die Flecken sichtbar gemacht werden. Dazu dient ein Sprühreagenz von hoher Empfindlichkeit auf Basis der Ninhydrin-Reaktion. Es entstehen während der Erhitzung gefärbte Produkte nach einem komplizierten Mechanismus (Desaminierung, Decarboxylierung) etwa nach folgendem Reaktionsschema:



Materialien:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x Trennkammer, 3–4 x Glaskapillaren, 1 x Messzylinder, 1 x Auftragschablone, 1 x Laborsprüher

Probelösungen:

Modellmischung Aminosäuren
(wässrige Lösung bestehend aus Alanin, Arginin, Tryptophan und Valin)

Urinprobe (optional)

Vergleichslösungen A und B:

2 Einzelkomponenten (Arginin (A) und Tryptophan (B), jeweils bereits in Wasser gelöst)

Laufmittel:

n-Butanol – Eisessig – Wasser (3:1:1, v/v/v)
Frisch ansetzen! – durch Mischung von 6 mL *n*-Butanol und 4 mL 50% Essigsäure (Zusammensetzung des Laufmittels ändert sich im Laufe der Zeit – kann daher nicht auf Vorrat angesetzt werden.)

Trennzeit:

ca. 60 min bzw. bis zu einer Laufstrecke von 60 mm

Sichtbarmachung:

Sprühreagenz: ethanologische Ninhydrinlösung; anschließende Erhitzung im Trockenschrank (ca. 5 min bei 110 °C)

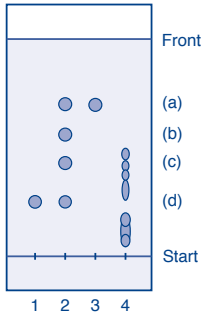
Durchführung:

- Jeweils eine Glaskapillare verwenden und wie folgt mittels Schablone ½ Inhalt der Glaskapillare auftragen (siehe Seite 3: 2. Auftragen der Probe):
Startpunkt 1: Vergleichslösung A (Argininlösung)
Startpunkt 2: Modellmischung Aminosäuren
Startpunkt 3: Vergleichslösung B (Tryptophanlösung)
Startpunkt 4: einen ganzen Inhalt der Glaskapillare – Urinprobe (optional)
- Aufgetragene Proben mit einem Föhn trocknen.
- Trennkammer aufschrauben und mit Hilfe des Messzylinders das Laufmittel (siehe oben) einfüllen.
- DC-Fertigfolie in die Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
- Trennung abwarten (ca. 60 min), danach Trennkammer unter dem Abzug aufschrauben, DC-Fertigfolie entnehmen und die Laufmittelfront mit einem Bleistift markieren.
- DC-Fertigfolie mit dem Föhn trocknen – bis kein Essigsäuregeruch mehr wahrgenommen wird.
- Sprüher mit 5–10 mL Sprühreagenz (siehe oben) befüllen und die DC-Fertigfolie auf einer Filterpapierunterlage gleichmäßig besprühen, so dass sie leicht durchgefuechtet ist.
- DC-Fertigfolie mit dem Föhn trocknen und diese erneut besprühen.
- DC-Fertigfolie für etwa 5 min bei 110 °C in den Trockenschrank legen (orangerote bzw. braunrote Farbflecken werden sichtbar).
- Flecken mit einem Bleistift umranden und *R_f*-Werte ermitteln

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F1

(siehe Seite 5: 5. Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen).

Chromatogramm:



Legende:

(a) Tryptophan, (b) Valin, (c) Alanin, (d) Arginin

Anmerkungen:

Die Proben trägt man zweckmäßigerweise in mehreren Portionen mit Zwischentrocknung auf, damit der Startfleck möglichst klein und kompakt bleibt. Dies ist deshalb wichtig, weil sich bei der langen Laufzeit (ca. 60 min) schon eine Zonenverbreiterung durch Diffusion bemerkbar machen kann, was eine Verschlechterung der Trennung bedeutet. Die Trocknungsschritte sind sorgfältig einzuhalten. Die Trockenschranktemperatur darf 130 °C nicht überschreiten.

Interessant ist die gleiche Trennung auf einer Cellulose-Fertigfolie (POLYGRAM® CEL 300). Nicht nur die Farbe der Flecken ist etwas anders (violett), sondern die Zonen sind auch nicht so schön kompakt. Die Laufzeit beträgt zwar nur 40 min, aber Valin und Tryptophan können nicht voneinander getrennt werden. Außerdem ist deren Reihenfolge gegenüber der Kieselgelschicht vertauscht.

Auf Aluminiumoxid erhält man für dieses System keine brauchbare Trennung.

Urinproben zeigen eine Vielzahl ineinander übergreifender Substanzen, also ein ganzes Spektrum von Aminosäuren. Das Ergebnis ist auch abhängig vom Spender, der Tageszeit und der Art der Nahrungsaufnahme. Eine eindeutige Zuordnung einzelner Aminosäuren ist bei dieser Versuchsanordnung nicht möglich. Eventuell kann jedoch eine Verbesserung der Trennung durch eine Zweifachentwicklung erreicht werden (sorgfältig zwischentrocknen).

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F1

Trennung von Schwermetallkationen

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Die überwiegende Zahl analytischer Trennprobleme in Industrie, Forschung und Entwicklung erstreckt sich auf organische Substanzen. Aber auch zur Trennung anorganischer Substanzen eignet sich die Dünnschicht-Chromatographie als analytische Methode.

Unser Beispiel beschäftigt sich mit der Trennung und Identifizierung der Schwermetalle Kupfer und Mangan. Da viele Schwermetalle nicht nur in elementarer Form (z. B. als Staub), sondern auch in Form ihrer löslichen Salze stark toxisch wirken, wird deren Anreicherung in der Natur, aber auch im menschlichen Körper erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt. Dabei spielt die Konzentration eine entscheidende Rolle. Viele der Schwermetalle sind nämlich als Spurenelemente für Lebewesen unbedingt erforderlich, während sie in höheren Konzentrationen zahlreiche negative Folgen für die Gesundheit mit sich bringen.

Der Nachweis der Schwermetallkationen auf der DC-Fertigfolie erfolgt mit Rubeanwasserstoff als Sprühreagenz.



Dabei entstehen mit einer Reihe von Metallkationen farbige Innerkomplexe (ungeladene Chelatkomplexe), deren Bildung auch abhängig vom pH-Wert ist. Deshalb muss in unserem Versuch die DC-Fertigfolie nach dem Besprühen zusätzlich mit Ammoniak bedampft werden.

Materialien:

1 x POLYGRAM® CEL 300, 1 x Trennkammer,
3 x Glaskapillaren, 1 x Messzylinder,
1 x Auftragschablone, 1 x Laborsprüher

Probelösung:

Gemisch aus 2 Schwermetallsalzen (Kationen Cu^{2+} , Mn^{2+}), bereits in Wasser gelöst

Vergleichslösungen C und D:

2 Einzelsalze (Kationen Mn^{2+} (C) und Cu^{2+} (D)), jeweils bereits in Wasser gelöst

Laufmittel:

Aceton – 18 % Salzsäure (4:1, v/v)
Frisch ansetzen! – durch Mischung von 10 mL
Aceton und 2,5 mL Salzsäure

Trennzeit:

bis zu einer Laufstrecke von ca. 7 cm – Trennzeit (ca. 10 min) kann schwanken

Sichtbarmachung:

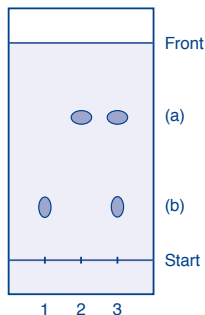
Sprühreagenz: Rubeanwasserstoff (Lösung in Ethanol) und Bedampfen mit 25 % Ammoniak-Lösung

Durchführung:

- Jeweils eine Glaskapillare verwenden und wie folgt mittels Schablone den Inhalt einer Glaskapillare auftragen (siehe Seite 3: 2. Auftragen der Probe):
Startpunkt 1: Vergleichslösung C (Mn^{2+})
Startpunkt 2: Vergleichslösung D (Cu^{2+})
Startpunkt 3: Probelösung (Cu^{2+} , Mn^{2+})
Hinweis: Um die Flecken möglichst klein zu halten, trägt man in mehreren Portionen auf und trocknet zwischendurch mit einem Föhn.
- Nach Auftragung nochmals sorgfältig trocknen.
- Trennkammer aufschrauben und mit Hilfe des Messzylinders das Laufmittel (siehe oben) einfüllen.
- DC-Fertigfolie in die Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
- Trennung abwarten, danach Trennkammer unter dem Abzug aufschrauben, die DC-Fertigfolie entnehmen und Laufmittelfront markieren.
- DC-Fertigfolie mit einem Föhn trocknen.
- Sprüher mit 5 mL Sprühreagenz (siehe oben) befüllen und die DC-Fertigfolie auf einer Filterpapierunterlage gleichmäßig besprühen, so dass sie leicht durchgefuechtet ist.
- DC-Fertigfolie mit dem Föhn trocknen und diese erneut besprühen.
- Einige Milliliter einer 25 % Ammoniak-Lösung auf ein Uhrglas oder in eine Petrischale geben und DC-Fertigfolie (mit der Schicht nach unten) über die Lösung halten, so dass die Schicht vollständig bedampft wird.
- Sichtbar gewordene Flecken mit einem Bleistift umranden.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F1

Chromatogramm:



Legende:

(a) Cu^{2+} (schwarzbraun), (b) Mn^{2+} (braun)

Aus den Zonenschwerpunkten und dem Abstand Start-Laufmittelfront erhält man die charakteristischen R_f -Werte.

Anmerkungen:

Auch hierbei ist es wichtig, durch portionsweises Auftragen die Startflecken möglichst klein und kompakt zu halten. Im Gegensatz zum Kupfer-Fleck erscheint der Mangan-Fleck erst nach Bedampfen mit Ammoniak-Lösung. Nach ca. 30 min verschwindet die Farbe wieder. Durch teilweise Entmischung des Laufmittels kann auch eine hauchdünne Sekundärfront vor dem Kupfer-Fleck erkannt werden. Während der Trennung kann man die gelbe Farbzone des $(\text{CuCl}_4)^{2-}$ -Komplexes verfolgen.

Bitte beachten Sie, dass die Salzsäurevorratsflasche gut verschlossen bleiben muss, um reproduzierbare Trennergebnisse zu erhalten! Schon geringe Schwankungen in der Salzsäurekonzentration verändern die R_f -Werte.

TLC Mikro-Set F2

Beschreibung des TLC Mikro-Set F2

Dieses Set enthält alle erforderlichen Chemikalien zur Analyse von:

- ✓ Speisefetten
- ✓ Fetten und Cholesterin in Blut

Für die Trennungen mit Set F2 wird das Materialset TLC Mikro-Set M benötigt. (Eine detaillierte Beschreibung befindet sich auf Seite 31.) Gemäß Richtlinie 93/42/EWG müssen Medizinprodukte das CE-Zeichen tragen. Daher legen wir unseren TLC Mikro-Sets keine Blutlanzetten und Alkoholpads bei. Diese können Sie jedoch problemlos in Ihrer Apotheke beziehen.

Inhalt von TLC Mikro-Set F2

- 1 Arbeitsanleitung (auch als Download verfügbar)
- 50 Glaskapillaren 1 µL
- 50 Polyesterfolien POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 4 x 8 cm
- 5 Einwegpipetten 25 µL
- 5 Probengläser N 11, 1,5 mL, mit PE-Kappen und Dichtscheiben
- 3 Probengläser 30 mL (für Butter, Margarine und Speiseöl)
- je 100 mL Cyclohexan und Molybdato-phosphorsäure-Sprühreagenz (in Ethanol)*
- 2 x 50 mL Aceton mit kalibrierter Pipette (1 x beiliegend)*
- 25 mL Butan-2-on (Ethylmethylketon)*
- 8 mL Cholesterin-Vergleichslösung (in Aceton)*

Bestellinformation

Bezeichnung	Packungs-einheit	REF
TLC Mikro-Set F2*	1 Set	814300
Ersatzteile für TLC Mikro-Set F2		
Cholesterin-Vergleichslösung (in Aceton)*	8 mL	814301
Molybdato-phosphorsäure-Sprühreagenz (in Ethanol)*	100 mL	814302
DC-Polyesterfolien POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 8 cm	4 x 50	814025
TLC Mikro-Set M (Materialset)	1 Set	814100

* Diese Produkte enthalten kennzeichnungspflichtige Gefahrstoffe. Für detaillierte Informationen bitte die Sicherheitsanweisungen (siehe Seite 36–38) oder das Sicherheitsdatenblatt (www.mn-net.com/sds) beachten.

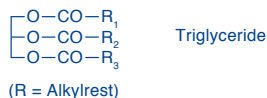
Weiteres Zubehör auf Seite 31.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F2

Analyse von Speisefetten

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Im engeren Sinne sind Fette Glycerinester höherer Fettsäuren (z.B. Palmitin-, Stearin-, Ölsäure). Ungesättigte Fettsäuren enthalten Doppelbindungen, die als Glycerinester von besonderer Bedeutung für die menschliche Ernährung sind. Neben diesen Estern (den so genannten Triglyceriden) weisen natürliche und künstliche Fette und fette Öle weitere Bestandteile auf. Dazu zählen Cholesterin, Cholesterinester, freie Fettsäuren und Phospholipide. Durch Zutritt von Licht und Luft entstehen Hydroxyfettsäuren bzw. deren Triglyceride; das Fett wird »ranzig«.



In unserer Nahrung sind diese Bestandteile vor allem in Butter, Margarine und Speiseöl enthalten. Ein Teil dieser Lipide kann auch im Blut nachgewiesen werden, wobei vor medizinischen Standpunkt aus vor allem der Cholesteringehalt von Bedeutung ist (siehe nächstes Trennbeispiel).

Bei dem zunächst aufgeführten Versuch geht es um handelsübliche Fette, die in ihre wichtigsten Bestandteile aufgetrennt werden. Je nach Handelsprodukt können kleinere Abweichungen auftreten.

Der Nachweis der Substanzen erfolgt mit dem Sprühreagenz Molybdätosphorsäure. Mit reduzierenden Verbindungen entstehen dunkelblaue bis grauschwarze Flecken (Molybdänblau).

Materialien:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x Trennkammer,
4 x Glaskapillaren, 3 x Probengläser 30 mL,
1 x Aceton Flasche mit kalibrierter Pipette
1 x Messzylinder, 1 x Auftragschablone,
1 x Laborsprüher

Probenvorbereitung:

Je 1 g Butter, Margarine bzw. Speiseöl werden in die dafür vorgesehenen Probengläser eingewogen, mit 10 mL Aceton versetzt und das gut verschlossene Glas durchgeschüttelt. In einigen Fetten (z.B. der Butter) entstehen lediglich trübe Flüssigkeiten (Emulsionen). Sie können aber trotzdem direkt als Proben eingesetzt werden.

Vergleichslösung:

Lösung von Cholesterin in Aceton (1 mg/mL); Probe immer gut verschlossen halten!

Laufmittel:

Cyclohexan – Butan-2-on (10:1, v/v)
Frisch ansetzen (direkt in der Trennkammer)! – durch Mischung von 10 mL Cyclohexan und 1 mL Butan-2-on

Trennzeit:

ca. 12 min bzw. bis zu einer Laufstrecke von 60–65 mm

Sichtbarmachung:

mit Sprühreagenz Molybdätosphorsäure (gelöst in Ethanol)

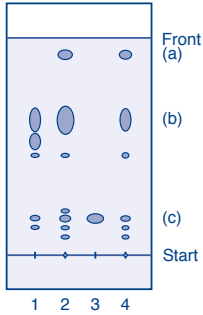
Durchführung:

Vorab: Proben entsprechend vorbereiten (siehe Probenvorbereitung)

1. Jeweils eine Glaskapillare verwenden und wie folgt mittels Schablone den Inhalt einer Glaskapillare auftragen (siehe Seite 3: 2. Auftragen der Probe):
Startpunkt 1: Butter
Startpunkt 2: Speiseöl
Startpunkt 3: Vergleichslösung (Cholesterin in Aceton)
Startpunkt 4: Margarine
2. Aufgetragene Punkte trocknen lassen (ca. 3 min)
3. Trennkammer aufschrauben und mit Hilfe des Messzylinders das Laufmittel (siehe oben) einfüllen.
4. DC-Fertigfolie in die Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
5. Trennung abwarten (ca. 12 min), danach Trennkammer unter dem Abzug aufschrauben und die Laufmittelfront markieren sowie das Laufmittel unter dem Abzug (mit Hilfe eines Föhns) abdampfen lassen.
6. Sprüher mit 5 mL Sprühreagenz (siehe oben) befüllen und die DC-Fertigfolie auf einer Filterpapierunterlage gleichmäßig besprühen, so dass sie leicht durchgefuechtet ist.
7. DC-Fertigfolie mit einem Föhn trocknen und weitere 3–4 min im Trockenschrank bei 120 °C erhitzen (oder mit einem Heißluftföhn).
8. Dunkelblaue Flecken (Molybdänblau) auf hellgelbem Untergrund mit einem Bleistift umranden.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F2

Chromatogramm:



Legende:

(a) Cholesterinester, (b) Triglyceride,
(c) Cholesterin

Anmerkungen:

Als Hauptbestandteil der Fette erkennt man die Triglyceride. Unmittelbar oberhalb des Cholesterins können eventuell noch freie Fettsäuren auftreten. Einen kleineren R_f -Wert besitzen die Hydroxyfettsäuren bzw. ihre Triglyceride, und am Start verbleiben die Phospholipide. Die schwachen Flecken verschwinden nach einiger Zeit wieder, so dass eine baldige Markierung sinnvoll ist.

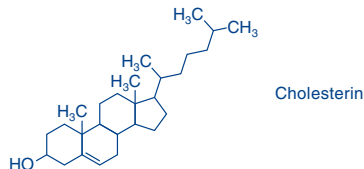
Bei käuflichen Produkten von Margarine wird oft mit dem Hinweis »cholesterinfrei« geworben. In Margarine kann aber Cholesterin enthalten sein, wenn Milhfett (max. 2 %) verarbeitet wurde.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F2

Analyse von Fetten und Cholesterin im Blut

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Können Sie Blut sehen? – Auch Ihr Blut enthält Lipidanteile, die man dünnenschicht-chromatographisch trennen kann. In unserem Versuch soll neben der Trennung auch eine halbquantitative Bestimmung des Cholesterins erfolgen.



Cholesterin ist das am längsten bekannte Steroid. Es kommt in freier oder veresterter Form in menschlichen und tierischen Organen und Flüssigkeiten vor. Es bildet den Hauptbestandteil der Gallensteine, aus denen es auch erstmals isoliert wurde.

Die Rolle und vor allem die gesundheitliche Bedeutung der Konzentration an Cholesterin im Blut des Menschen ist nicht ganz unumstritten. Sicher ist, dass es sich um einen lebensnotwendigen Stoff handelt, den der Körper in einer Menge von 6–8 g täglich selbst produziert. Bei fettarmer Ernährung werden noch zusätzlich täglich 0,04–0,1 g aufgenommen, bei fettreicher Kost bis zu 1,4 g, und zwar in Form des freien Cholesterins und seiner Ester. Bei zu hoher Konzentration im Blut wird eine Ablagerung in den Adern befürchtet (Arteriosklerose), so dass es zu einer erhöhten Infarktgefahr kommt. Daher ist eine Cholesterinbestimmung im Blut von großer medizinisch-diagnostischer Bedeutung.

Unser Versuch soll dazu beitragen, Lipidbestandteile im Blut zu identifizieren und eine halbquantitative Abschätzung des Gehaltes an freiem Cholesterin zu ermöglichen. Aus der bekannten Konzentration der Vergleichslösung (1 mg Cholesterin/mL Aceton) und dem Chromatogramm der Blutprobe werden die Cholesterinflecken bezüglich Fleckengröße und Intensität miteinander verglichen.

Materialien:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x Trennkammer,
4 x Glaskapillaren, 1 x Probengläser, 1,5 mL,
1 x Einwegpipette; 1 x Messzylinder,
1 x Auftragschablone, 1 x Laborsprüher

Probenvorbereitung:

Zunächst gibt man in das dafür vorgesehene 1,5 mL Gläschen mit Hilfe der kalibrierten Pipette 0,5 mL

Aceton und verschließt es bis zum Gebrauch. Dann reinigt man mit einem Alkoholtupfer eine Fingerkuppe des »Blutspenders« und drückt mit dem Daumen die Kuppe hoch. Mit einer sterilen Blutlanzette sticht man in die Kuppe. Gemäß Richtlinie 93/42/EWG müssen Medizinprodukte das CE-Zeichen tragen. Daher legen wir unseren TLC Mikro-Sets keine Blutlanzeten und Alkoholpads bei. Diese können Sie jedoch problemlos in Ihrer Apotheke beziehen. Durch mehrmaliges Drücken mit dem Daumen erhält man schließlich einen ausreichend großen Blutstropfen, von dem mit der vorgesehenen Einwegpipette 25 µL aufgesaugt werden (evtl. Gummihütchen benutzen). Das Blut wird sofort in das vorbereitete Gläschen mit Aceton gegeben, fest verschlossen und geschüttelt. Man lässt die Blutprobe absitzen und hält sie bis zum unmittelbaren Gebrauch gut verschlossen. Die überstehende klare Lösung (Serum) enthält die Lipidbestandteile und dient später als Probe.

Vergleichslösung:

Lösung von 1 mg Cholesterin in 1 mL Aceton;
Probe immer gut verschlossen halten!

Laufmittel:

Cyclohexan – Butan-2-on (10:1, v/v)
Direkt in der Trennkammer frisch ansetzen! – durch Mischung von 10 mL Cyclohexan und 1 mL Butan-2-on

Trennzeit:

ca. 15 min bzw. bis zu einer Laufstrecke von 60–65 mm

Sichtbarmachung:

mit Sprühreagenz Molybdätdiäthylphosphorsäure (gelöst in Ethanol)

Durchführung:

Vorab: Proben entsprechend vorbereiten (siehe Probenvorbereitung)

1. Jeweils eine Glaskapillare verwenden und wie folgt mittels Schablone den Inhalt der Glaskapillare auftragen (siehe Seite 3: 2. Auftragen der Probe):

Startpunkt 1: klare Serumlösung

Startpunkt 2: zweifacher Inhalt der Glaskapillare – klare Serumlösung

Startpunkt 3: dreifacher Inhalt der Glaskapillare – klare Serumlösung

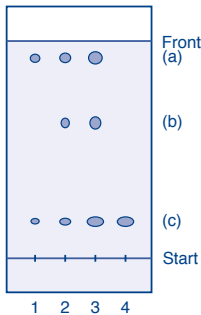
Startpunkt 4: Vergleichslösung

2. Aufgetragene Punkte trocknen lassen (ca. 3 min).

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F2

3. Trennkammer aufschrauben und mit Hilfe des Messzylinders das Laufmittel (siehe oben) einfüllen.
4. DC-Fertigfolie in die Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
5. Trennung abwarten (ca. 15 min), danach Trennkammer unter dem Abzug aufschrauben und die Laufmittelfront markieren sowie das Laufmittel unter dem Abzug (mit Hilfe eines Föhns) abdampfen lassen.
6. Sprüher mit 5 mL Sprühreagenz (siehe oben) befüllen und die DC-Fertigfolie auf einer Filterpapierunterlage gleichmäßig besprühen, so dass sie leicht durchgefuechtet ist.
7. DC-Fertigfolie mit einem Föhn trocknen und weitere 3–4 min im Trockenschrank bei 120 °C erhitzen (oder mit einem Heißluftföhn).
8. Substanzflecken mit einem Bleistift umranden.

Chromatogramm:



Legende:

- (a) Cholesterinester, (b) Triglyceride,
(c) Cholesterin

Anmerkungen:

Als lipide Bestandteile enthält Blut nicht nur Cholesterin, sondern auch Triglyceride und Cholesterinester (siehe auch vorherigen Versuch).

Das Chromatogramm ist natürlich individuell verschieden. Bei der Auftragung von 1 µL des Blutserums kann, wie beispielsweise die vorstehende Abbildung zeigt, die Konzentration der Triglyceride so gering sein, dass sie nicht nachweisbar sind.

Außerdem hängt die Konzentration der nachzuweisenden Substanzen vom Alter des »Blutspenders« ab und vom momentanen Ernährungszustand, also ob er nüchtern ist oder erst wenige Stunden zuvor gegessen hat.

Nach Rückrechnung aus Vergleichsfleck und Probeflecken des freien Cholesterins kann der Experimentator das Ergebnis noch verfeinern, indem er das Auftragsvolumen an Blutserum weiter variiert und den Versuch wiederholt. Da die Probe in dem leicht flüchtigen Aceton gelöst ist, lassen sich müheelos auch 4 µL, 5 µL oder mehr Serumlösung auftragen.

Rechenbeispiel für den Gehalt an freiem Cholesterin in Blut:

Üblicherweise gibt man den Wert in mg Cholesterin pro 100 mL Blut an. Zu berücksichtigen ist, dass der Verdünnungsfaktor der 25 µL Blutlösung in 0,5 mL (500 µL) Aceton 500/25, also 20 betrug.

Angenommen, der Cholesterinfleck unserer 3 µL Serumlösung zeigt die gleiche Intensität und Größe wie unsere 1 µL Vergleichslösung der Konzentration 1 mg/mL, dann war die Probe 1/3 der Konzentration der Vergleichslösung. Man erhält dann:

$$\frac{1}{3} \cdot \frac{500}{25} \cdot 100 = 667$$

In 100 mL Blut waren also 667 mg freies Cholesterin enthalten.

Interessant ist zum Abschluss noch folgendes Rechenbeispiel aus unserem Versuch: Welche Absolutmenge Cholesterin lässt sich auf der DC-Fertigfolie noch eindeutig nachweisen? Man erhält so einen guten Eindruck von der Empfindlichkeit des Verfahrens.



TLC Mikro-Set F3

Beschreibung des TLC Mikro-Set F3

Dieses Set enthält alle erforderlichen Chemikalien zur:

- ✓ Trennung von Analgetika (Schmerzmittel)
- ✓ Drogenanalyse am Beispiel von Chinarinde

Für die Trennungen mit Set F3 wird das Materialset TLC Mikro-Set M benötigt.
(Eine detaillierte Beschreibung befindet sich auf Seite 31.)

Inhalt von TLC Mikro-Set F3

- 1 Arbeitsanleitung (auch als Download verfügbar)
- 50 Glaskapillaren 1 μ L
- 50 Polyesterfolien POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 4 x 8 cm
- je 5 Aspirin® und Thomapyrin® Tabletten
- 20 Faltenfilter MN 615 1/4, Ø 11 cm
- 3 Probengläser 8 mL (für Aspirin® Probe, Thomapyrin® Probe und Chinarindenextrakt)
- 5 g Chinarinde
- je 100 mL Ethanol, 2-Propanol, Toluol – Diethylether (61:39, v/v)*, Sprühreagenz für Coffein (in wässriger Aceton-Lösung)* und Sprühreagenz nach Dragendorff-Munier (in Wasser)
- je 50 mL Eisen(III)chlorid-Lösung* und Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung (jeweils in Wasser)
- 30 mL Essigsäureethylester (Ethylacetat)*
- je 25 mL 12,5% Ammoniak-Lösung und Diethylamin*
- je 8 mL Coffein- (A), Paracetamol- (B), Chinin-Vergleichslösung (C) (jeweils in Ethanol)*

Bestellinformation

Bezeichnung	Packungseinheit	REF
TLC Mikro-Set F3*	1 Set	814400
Ersatzteile für TLC Mikro-Set F3		
Coffein-Vergleichslösung (in Ethanol)*	8 mL	814407
Paracetamol-Vergleichslösung (in Ethanol)*	8 mL	814406
Chinin-Vergleichslösung (in Ethanol)*	8 mL	814405
Sprühreagenz für Coffein (in wässriger Aceton-Lösung)*	100 mL	814401
Sprühreagenz nach Dragendorff-Munier (in Wasser)	100 mL	814402
Eisen(III)chlorid-Lösung (in Wasser)*	100 mL	814403
Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung (in Wasser)	100 mL	814404
DC-Polyesterfolien POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 8 cm	4 x 50	814025
TLC Mikro-Set M (Materialset)	1 Set	814100

* Diese Produkte enthalten kennzeichnungspflichtige Gefahrstoffe. Für detaillierte Informationen bitte die Sicherheitsanweisungen (siehe Seite 36–38) oder das Sicherheitsdatenblatt (www.mn-net.com/sds) beachten.

Weiteres Zubehör auf Seite 31.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F3

Trennung von Analgetika (Schmerzmittel)

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Analgetika (Schmerzmittel) sind Medikamente, die sehr häufig Anwendung finden. Zu den bekanntesten Wirkstoffen zählt die Acetylsalicylsäure, die sich seit über 100 Jahren bewährt hat.

Neben Acetylsalicylsäure wird noch eine ganze Reihe weiterer Wirkstoffe als Analgetika eingesetzt, so dass die Gesamtmenge an produzierten Schmerzmitteln schwer abzuschätzen ist. Viele dieser Präparate werden als Kombi-Präparate (z. B. mit Coffein) vertrieben.

In unserem Trennbeispiel haben wir aus dem großen Angebot an Analgetika die beiden Handelspräparate Aspirin® und Thomapyrin® ausgesucht. Der Nachweis der enthaltenen Wirkstoffe ist etwas aufwendiger als üblich, da es kein Sprühreagenz gibt, das uns alle Komponenten gleichzeitig anzeigt. Es werden daher zwei Chromatogramme parallel angefertigt.

Materialien:

2 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 2 x Trennkammern, 4 x Glaskapillaren, 2 x Probengläser, 8 mL, 1 x Becherglas, 2 x Faltenfilter, 1 x Messzylinder, 1 x Auftragsschablone, 1 x Laborsprüher

Probenvorbereitung:

- 1 Tablette Aspirin® im Mörser pulverisieren und mit 8 mL Ethanol verrühren. Die entstandene Suspension wird durch ein Faltenfilter MN 615 1/4 in ein Becherglas filtriert und mit weiteren 8 mL Ethanol nachgewaschen. Das klare Filtrat wird in das vorgesehene Probefläschchen als Aspirin® Probe überführt. Der verbleibende Rückstand wird verworfen.
- 1 Tablette Thomapyrin® wird im Mörser zerkleinert, mit 5 mL 2-Propanol aufgeschlämmt und durch ein Faltenfilter in ein Becherglas filtriert. Mit 5 mL 2-Propanol wird nachgewaschen und das klare Filtrat als Thomapyrin® Probe in das entsprechende Fläschchen überführt.

Vergleichslösungen A und B:

Coffein, gelöst in Ethanol (A)

Paracetamol, gelöst in Ethanol (B)

Laufmittel:

Essigsäureethylester – Ethanol (98:2, v/v), hergestellt aus 9,8 mL Ethylacetat und 0,2 mL Ethanol.

Trennzeit:

ca. 10 min

Sichtbarmachung:

Coffein wird mit einem Spezialsprühreagenz sichtbar gemacht.

Zum Nachweis von Acetylsalicylsäure und Paracetamol verwendet man eine Mischung zweier Eisensalzlösungen (FeCl₃ bzw. K₃[Fe(CN)₆]), die jeweils kurz vor der Anwendung direkt im Laborsprüher gemischt werden (siehe 5. Sichtbarmachung).

Durchführung:

Vorab: Proben entsprechend vorbereiten (siehe Probenvorbereitung)

- Jeweils eine Glaskapillare verwenden und wie folgt mittels Schablone den Inhalt einer Glaskapillare auftragen.
(siehe Seite 3: 2. Auftragen der Probe)
Diese Auftragungen nimmt man auf zwei DC-Fertigfolien parallel vor:

Startpunkt 1: Thomapyrin® Probe

Startpunkt 2: Paracetamol-Lösung (B)

Startpunkt 3: Aspirin® Probe

Startpunkt 4: Coffein-Lösung (A)

Hinweis: Um Verwechslungen zu vermeiden – DC-Fertigfolien mit I und II kennzeichnen.

- Trennkammern aufschrauben und mit Hilfe des Messzylinders das Laufmittel (siehe oben) einfüllen.
- Je eine DC-Fertigfolie in jeweils eine Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
- Trennung abwarten (ca. 10 min), danach Trennkammer unter dem Abzug aufschrauben, DC-Fertigfolie entnehmen und die Laufmittelfront markieren sowie das Laufmittel unter dem Abzug (mit Hilfe eines Föhns) abdampfen lassen.

5. Sichtbarmachung:

DC-Fertigfolie I (Abzug!)

Hauchdünn mit dem Spezialreagenz für Coffein besprühen.

Kurz trocknen (Kaltluft) – wieder besprühen und erneut mit Kaltluft trocknen.

→ braune Coffein-Flecken mit einem Bleistift markieren.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F3

DC-Fertigfolie II (Trockenschrank bei 110 °C; 5 min)
Sprüher mit 3 mL $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung und anschließend mit 3 mL $FeCl_3$ -Lösung befüllen (Ausfällungen sind zu vernachlässigen).
Im Abzug die zuvor erhitze DC-Fertigfolie leicht mit dem Sprühreagenz befeuchten und anschließend fönen.

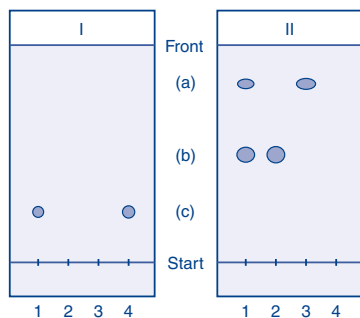
→ Substanzflecken mit Bleistift markieren
(blau: Paracetamol; graubraun bis violett: Acetylsalicylsäure)

Sprühreagenzien nur unter einem gut funktionierenden Abzug angewendet werden dürfen.

Steht eine UV-Lampe zur Verfügung, so kann die komplette Trennung auf einer einzigen DC-Fertigfolie bei kurzwelligem UV-Licht (254 nm) beobachtet werden.

Aspirin® Warenzeichen der Bayer AG, Deutschland
Thomapyrin® Warenzeichen der Boehringer Ingelheim, Deutschland

Chromatogramm:



Legende:

(a) Acetylsalicylsäure, (b) Paracetamol, (c) Coffein

Anmerkungen:

Während Aspirin® (Startpunkt 3) als Wirkstoff nur Acetylsalicylsäure enthält, besteht Thomapyrin® (Startpunkt 1) aus Acetylsalicylsäure, Paracetamol und Coffein (Kombinationspräparat). Beim Coffeinnachweis darf nicht heiß gefönt werden, weil sonst die Fleckenfärbung sofort wieder verschwindet. Eventuell kann durch eine geringe Iod-Adsorption auch bei Paracetamol und Acetylsalicylsäure eine leichte Gelbfärbung auftreten.

Beim Nachweis auf DC-Fertigfolie II darf die Trockenschrankbehandlung nicht zu lange dauern, weil sonst diffuse und rein blaue Flecken der Acetylsalicylsäure erscheinen. Tritt eventuell noch ein weiterer kleiner Fleck vor der Acetylsalicylsäure auf, so handelt es sich um Salicylsäure (Hydrolyseprodukt bei älteren Proben). Wichtig bei diesem Nachweis ist auch die Sauberkeit des Sprüher vor dem Einfüllen der Sprühreagenzien. Ist bereits eine blaue Farbe im Sprüher erkennbar (»Berliner Blau«), so wird er zunächst gründlich mit verdünnter Natronlauge gereinigt. Bei zu starkem Besprühen färbt sich die ganze DC-Fertigfolie kurze Zeit später blau. Nach längerer Zeit entsteht durch Reduktion von Fe^{3+} grundsätzlich »Berliner Blau« und damit ein blauer Untergrund. An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass

Drogenanalyse am Beispiel der Chinarinde

Bitte machen Sie sich mit den allgemeinen Arbeitsweisen (Seite 3–5) und den Sicherheitshinweisen (Seite 36–38) der DC vertraut!

Wie bereits erwähnt, hat die Dünnschicht-Chromatographie bei der Analyse von Stoffgemischen eine sehr breite Anwendung gefunden. Auch für die Analyse von Drogen ist sie ein schnelles und informatives Verfahren.

Im heutigen Sprachgebrauch werden unter dem Begriff »Drogen« häufig die Rauschdrogen verstanden. Unter Drogen im eigentlichen Sinne versteht man jedoch getrocknete Stoffe pflanzlichen Ursprungs mit therapeutisch wirksamen Inhaltsstoffen. Sie finden direkt oder in Form ihrer Extrakte Anwendung als Arzneimittel.

In unserem Beispiel handelt es sich um die Droge Chinarinde (*Cortex chinæ succirubrae*). Ihre Inhaltsstoffe sind bestimmte Alkaloide, die wir zunächst extrahieren und dann dünn-schicht-chromatographisch trennen. Alkaloide wiederum sind eine Gruppe von stickstoffhaltigen, basischen Naturstoffen und stellen pharmakologisch hochwirksame Substanzen dar. Je nach Gehalt unterscheidet man Haupt- und Nebenalkaloide. Man kennt etwa 35 Chinaalkaloide, darunter die 4 Hauptalkaloide Chinin, Chinidin, Cinchonin und Cinchonidin.

Zu den pharmazeutisch wichtigsten gehören Chinin und Chinidin. Chinin ist ein Mittel gegen Malaria und wirkt fiebersenkend. Chinidin hat eine entspannende Wirkung und hilft bei Herzrhythmusstörungen.

Zur Sichtbarmachung der getrennten Substanzen dient das Sprühreagenz nach Dragendorff-Munier als allgemeiner Nachweis für stickstoffhaltige Verbindungen, wie Alkaloide.

Materialien:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x Trennkammer, 3 x Glaskapillaren, 1 x Becherglas, 1 x Faltenfilter, 1 x Probenglas, 8 mL, 1 x Messzylinder, 1 x Auftragschablone

Probenvorbereitung:

Ca. 1 g Chinarinde wird im Mörser pulverisiert. Das zerkleinerte Material gibt man in ein Becherglas und fügt ca. 1 mL 12,5 % Ammoniak-Lösung und 5 mL 2-Propanol hinzu. Unter gelegentlichem Umrühren oder Schütteln wird die Droge ca. 10 min warm extrahiert (Wasserbad 50–60 °C). Die Suspension wird über ein Faltenfilter MN 615 1/4 filtriert, mit 2 mL 2-Propanol nachgewaschen und anschließend in das vorgesehene Probegläschen überführt. Das anfangs klare, rot-braune Filtrat kann später Ausfällungen zeigen, die das Trennergebnis jedoch nicht beeinflussen.

Vergleichslösung C:

Chinin, gelöst in Ethanol (C)

Laufmittel:

Toluol – Diethylether – Diethylamin
(durch Zugabe von 1 mL Diethylamin zu 9 mL des Gemisches Toluol – Diethylether (61:39, v/v))

Trennzeit:

ca. 2 x 10 min mit Zwischentrocknung

Sichtbarmachung:

Sprühreagenz nach Dragendorff-Munier (5 mL), das im wesentlichen basisches Bismut(III) nitrat, Weinsäure und Kaliumiodid enthält. Geringe Ausfällungen sind ohne Bedeutung.

Durchführung:

Vorab: Proben entsprechend vorbereiten
(siehe Probenvorbereitung)

1. Jeweils eine Glaskapillare verwenden und wie folgt mittels Schablone auftragen
(siehe Seite 3: 2. Auftragen der Probe):

Startpunkt 1: Inhalt der Glaskapillare – Extrakt

Startpunkt 2: ½ Inhalt der Glaskapillare – Chinin-Lösung (C)

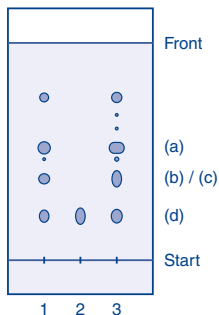
Startpunkt 3: zweifacher Inhalt der Glaskapillare – Extrakt

Hinweis: Um die Flecken möglichst klein zu halten, trägt man in mehreren Portionen auf und trocknet zwischendurch mit einem Föhn.

2. Nach Auftragung nochmals sorgfältig trocknen.
3. Trennkammer aufschrauben und mit Hilfe des Messzylinders das Laufmittel (siehe oben) einfüllen.
4. DC-Fertigfolie in die Trennkammer stellen, dabei das untere Ende der DC-Fertigfolie möglichst an den Rand der Trennkammer stellen und Trennkammer zuschrauben (vgl. Bild S. 4).
5. Trennung abwarten (ca. 10 min), danach Trennkammer unter dem Abzug aufschrauben, DC-Fertigfolie entnehmen und die Laufmittelfront markieren; DC-Fertigfolie trocknen und erneut für 10 min in die Trennkammer (selbe Laufmittel) stellen.
6. DC-Fertigfolie trocknen und Sprüher mit 5 mL Sprühreagenz (siehe oben) befüllen.
7. DC-Fertigfolie auf einer Filterpapierunterlage gleichmäßig kurz besprühen, trocknen lassen und erneut kurz (hauchdünn) besprühen.
8. Orangefarbene Zonen mit einem Bleistift markieren.

Trennbeispiele des TLC Mikro-Set F3

Chromatogramm:



Legende:

(a) Cinchonin, (b) Chinidin, (c) Cinchonidin,
(d) Chinin

Anmerkungen:

Die größten Substanzflecken gehören zu den Hauptalkaloiden, wobei Chinidin und Cinchonidin nicht voneinander getrennt werden. Die kleineren Flecken sind den zahlreichen Nebenalkaloiden zuzuordnen. Substanzen mit Eigenfarbe (rotbraun) wie z. B. Harze, verbleiben am Start.

Der Nachweis mit dem Sprühreagenz kann bereits nach einer Einmal-Entwicklung vorgenommen werden.

Steht eine UV-Lampe zur Verfügung (254 nm), so kann die Trennung auch ohne die Verwendung eines Sprühreagenzes erkannt werden.

TLC Mikro-Set M

Beschreibung des TLC Mikro-Set M

Dieses Set ist Voraussetzung für die Durchführung der Trennungen mit F1 bis F3. Gleichzeitig dient es als Grundausrüstung zur selbstständigen Erarbeitung weiterer dünn-schicht-chromatographischer Versuche.

Inhalt des TLC Mikro-Set M (Materialset)

- 2 x 50 Glaskapillaren 1 μ L
- 2 Auftragschablonen (DC-Schablonen)
- 1 Gummihütchen für Kapillaren
- 1 Messzylinder 10 mL
- 1 Becherglas 25 mL
- 2 Trennkammern
- 1 Laborsprüher aus Glas mit Gummiball
- 1 Plastikspritze 1 mL
- 20 Bogen Filtrierpapier MN 713, 15 x 21 cm
- je 50 Polyesterfolien POLYGRAM[®], 4 x 8 cm
SIL G/UV₂₅₄, Alox N/UV₂₅₄ und CEL 300

Bestellinformation

Bezeichnung	Packungs- einheit	REF
TLC Mikro-Set M (Materialset)	1 Set	814100
Ersatzteile für TLC Mikro-Set M		
Trennkammern für TLC Mikro-Sets	4	814021
Laborsprüher aus Glas mit Gummiball	1	814101
Glaskapillaren, 1 μ L	3 x 50	814022
Gummihütchen für Kapillaren	2	814102
Plastikspritze mit Graduierung, 1 mL	1	814104
Auftragschablonen (DC-Schablonen)	2	814023
Messzylinder (Glas), 10 mL	2	814024
Filtrierpapier MN 713, 15 x 21 cm	100	814103
DC-Polyesterfolien POLYGRAM [®] , 4 x 8 cm: 100 x SIL G/UV ₂₅₄ ; 50 x Alox N/UV ₂₅₄ ; 50 x CEL 300	1 Set	814028

Weitere DC-Produkte

MACHEREY-NAGEL bietet als Hersteller von DC-Platten und -Adsorbentien ein umfangreiches Produktsortiment für die professionelle DC. Eine kleine Auswahl wichtiger Produkte ist im Folgenden zusammengestellt. Alle weiteren DC-Produkte sind auf www.mn-net.com beschrieben.

● DC-Polyesterfolien POLYGRAM®

Die in den TLC Mikro-Sets angewendeten, unzerbrechlichen, leicht handhabbaren Polyesterfolien werden auch in weiteren Größen und mit weiteren Sorbentien beschichtet.

● DC-Aluminiumfolien ALUGRAM® Xtra

ALUGRAM® Xtra sind moderne, gut schneidbare und mit bis zu 100 % Wasser benetzbare Kieselgelschichten auf Aluminiumfolien, die sich durch eine hohe Trenneffizienz auszeichnen.

● DC-Glasplatten ADAMANT / HPTLC-Glasplatten Nano-ADAMANT

Für hohe Trennansprüche, wie z. B. in der Pharma- und Lebensmittelanalytik bieten wir die DC-Glasplatten ADAMANT und die HPTLC-Glasplatten Nano-ADAMANT an.

● DC-Trennkammern und Zubehör

Der fortgeschrittene und professionelle Anwender kann aus dem Sortiment an DC-Trennkammern und weiterem Zubehör individuell auswählen.



Bestellinformation

Bezeichnung	Packungs- einheit	REF
Weitere DC-Produkte (Auswahl)		
DC-Polyesterfolien POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 20 x 20 cm	25	805023
DC-Aluminiumfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV ₂₅₄ , 20 x 20 cm	25	818333
DC-Glasplatten ADAMANT UV ₂₅₄ , 20 x 20 cm	25	821030
DC-Glasplatten ADAMANT UV ₂₅₄ , 5 x 10 cm	50	821010
HPTLC-Glasplatten Nano-ADAMANT UV ₂₅₄ , 10 x 10 cm	25	821110
DC-Simultan-Entwicklungskammer für bis zu 5 Platten bis 20 x 20 cm	1	814019
DC-Simultan-Entwicklungskammer für bis zu 2 Platten bis 10 x 10 cm	1	814018
MN ALUGRAM® Schere, geschliffene Schneide, schwarzer Griff	1	818666
Chromatographie-Papier MN 260, 7,5 cm x 17 cm (zur Kammersättigung)	100	814030

Phase	Schicht
Standard-Kieselgel	
ADAMANT	Kieselgel 60, verbessertes Bindemittelsystem, optimierte Korngrößenverteilung
SIL G	Kieselgel 60, Standardqualität, Partikelgröße 5–17 µm
SILGUR	Kieselgel 60 mit Konzentrierungszone aus Kieselgur
Unmodifiziertes Kieselgel für die HPTLC	
Nano-ADAMANT	Nano-Kieselgel 60, verbessertes Bindemittelsystem, optimierte Korngrößenverteilung
Nano-SIL	Nano-Kieselgel 60, Standardqualität, Partikelgröße 2–10 µm
Modifiziertes Kieselgel für die HPTLC	
RP-18 W/UV ₂₅₄	Nano-Kieselgel mit partieller Octadecylmodifizierung, wasserbenetzbar
RP-2/UV ₂₅₄	silanisiertes Kieselgel = dimethyl-modifiziertes Kieselgel 60
Nano-SIL CN	cyano-modifiziertes Nano-Kieselgel
Nano-SIL NH ₂	amino-modifiziertes Nano-Kieselgel
Nano-SIL DIOL	diol-modifiziertes Nano-Kieselgel
Aluminiumoxid	
Alox N	Aluminiumoxid
Cellulose, unmodifiziert und modifiziert	
CEL 300	native faserförmige Cellulose MN 300
CEL 400	mikrokristalline Cellulose MN 400 (AVICEL®)
CEL 300 PEI	polyethylenimin-impregnierter Celluloseionenaustauscher
Schichten für spezielle Trennungen	
POLYAMIDE-6	Perlon = ε-Polycaprolactam
CHIRALPLATE	RP-Kieselgel mit Cu ²⁺ Ionen und chiralem Reagenz, für die Enantiomerentrennung von Aminosäuren
SIL G-25 HR	hochreines Kieselgel 60 mit Gips, empfohlen für Aflatoxintrennungen
SIL G-25 Tenside	Kieselgel G mit Ammoniumsulfat für die Trennung von Tensiden
Nano-SIL PAH	Nano-Kieselgel mit spezieller Imprägnierung zur PAH-Analytik

Verzeichnis weiterführender deutschsprachiger Literatur für Theorie und Praxis der Dünnschicht-Chromatographie

- E. Hahn-Deinstrop
Dünnschicht-Chromatographie:
Praktische Durchführung und Fehlervermeidung
Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, 1998
- R. E. Kaiser
Dünnschicht-Chromatographie:
In Memoriam Prof. Dr. Hellmut Jork
InCom Bureau, Düsseldorf, Deutschland, 1996
- L. Kraus, A. Koch,
S. Hoffstetter-Kuhn
Dünnschichtchromatographie
Springer-Verlag, Berlin, Deutschland, 1996
- G. Schwedt
Chromatographische Trennmethoden:
Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische
Anwendungen
Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, 1994
- H.-P. Frey, K. Zieloff
Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie:
Grundlagen und Praxis
Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, 1992
- H. Jork
Dünnschicht-Chromatographie:
Reagenzien und Nachweismethoden
Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, 1990
- H. Jork, W. Funk,
W. Fischer, H. Winner
Dünnschicht-Chromatographie
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1989
- R. E. Kaiser
Einführung in die HPTLC
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1987
- G. Schwedt
Dünnschicht-Chromatographie
PHYWE Systeme, Göttingen, Deutschland, 1985
- K. Randerath
Dünnschicht-Chromatographie
2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1975
- F. Geiss
Die Parameter der Dünnschichtchromatographie
Vieweg, Braunschweig, Deutschland, 1972
- E. Stahl
Dünnschicht-Chromatographie
2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Deutschland, 1967

Verzeichnis weiterführender englischsprachiger Literatur für Theorie und Praxis der Dünnschicht-Chromatographie

- E. Hahn-Deinstrop Applied Thin-Layer Chromatography
2nd edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006
- P. E. Wall Thin-Layer Chromatography:
A Modern Practical Approach
Royal Society of Chemistry, London, UK, 2005
- J. Sherma, B. Fried Handbook of Thin-Layer Chromatography
3rd edition, CRC Press, Boca Raton, USA, 2003
- B. Fried, J. Sherma Thin-Layer Chromatography
4th edition, CRC Press, Boca Raton, USA, 1999
- B. Fried, J. Sherma Practical Thin-Layer Chromatography:
A Multidisciplinary Approach
CRC Press, Boca Raton, USA, 1996
- J. C. Touchstone Practice of Thin Layer Chromatography
Wiley-Interscience, New York, USA, 1992
- N. Grinberg Modern Thin-Layer Chromatography
Marcel Dekker, New York, USA, 1990
- F. Geiss Fundamentals of Thin Layer Chromatography /
Planar Chromatography
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, Germany, 1987
- R. E. Kaiser (Editor) Planar Chromatography, Volume 1
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, Germany, 1986
- J. G. Kirchner Thin Layer Chromatography
2nd edition, Wiley-Interscience, New York, USA, 1973
- J. C. Touchstone Quantitative Thin Layer Chromatography
Wiley-Interscience, New York, USA, 1973
- E. Stahl Thin Layer Chromatography
1st edition, Springer-Verlag, Berlin, Germany /
Academic Press, New York, USA, 1965
- G. B. Marini-Bettòlo Scientific Reports of the Istituto Superiore di Sanita:
Thin-Layer Chromatography
Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Netherlands, 1964





















Sicherheitsanweisungen

Sicherheitsanweisungen




























Die nachfolgende Tabelle zeigt alle Set-Bestandteile, von denen Gefahren ausgehen können.

Nach CLP Verordnung (Regulation on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures; EU/1278/2008) müssen Innenverpackungen nur mit dem Symbol und dem Produktidentifikator gekennzeichnet werden. Mindergefährliche Stoffe/Gemische mit Signalwort ACHTUNG und leicht entzündbare Stoffe/Gemische müssen bis 125 mL oder 125 g nicht mit H- und P-Sätzen (Hazard Statements/Precautionary Statements) gekennzeichnet werden. Diese Kennzeichnungserleichterung gilt NICHT für sensibilisierende Stoffe. Bestandteile in Lösungen mit einem Gehalt von <1 % sind nicht gesondert deklariert, so lange keine besondere Gefährdung hiervon ausgeht.

Entsprechende Sicherheitsdatenblätter zu den TLC Mikro-Sets sind unter www.mn-net.com/SDS erhältlich.

Gefahrstoff	Gefahrensymbole + Signalwort
TLC Mikro-Set A, REF 814000	
Ammoniak-Lösung 16 % / 2-Propanol 35 % /Wasser 49 % (25 % Ammoniak-Lösung – 2-Propanol (5:3, v/v))	   GEFAHR
Ethanol > 90 %	 GEFAHR
Toluol	   GEFAHR
Toluol 69 % / Cyclohexan 31 % (Toluol – Cyclohexan (2:1, v/v))	   GEFAHR
TLC Mikro-Set F1, REF 814200	
Aceton	  GEFAHR
Ammoniak-Lösung 25 %	  GEFAHR
n-Butanol	   GEFAHR
Essigsäure 50 %	 GEFAHR
Ethanol > 90 %	 GEFAHR
Salzsäure 18 %	 ACHTUNG

Sicherheitsanweisungen

Gefahrstoff	Gefahrensymbole + Signalwort
TLC Mikro-Set F2, REF 814300	
Aceton	  GEFAHR
Butan-2-on (Ethylmethylketon)	  GEFAHR
Cyclohexan	   GEFAHR
Ethanol > 90 %	 GEFAHR
Molybdätosphor- säure < 5 % + Ethanol > 90 %	   GEFAHR
TLC Mikro-Set F3, REF 814400	
Aceton < 40 % + Iod < 2,5 % + Eisen(III)-chlorid < 5 %	  GEFAHR
Ammoniak-Lösung 12,5 %	  GEFAHR
Diethylamin	   GEFAHR
Eisen(III)-chlorid < 5 %	 ACHTUNG
Essigsäureethylester (Ethylacetat)	  GEFAHR
Ethanol > 90 %	 GEFAHR
2-Propanol	  GEFAHR
Toluol 66 % + Diethylether 34 % (Toluol – Diethylether (61:39, v/v))	   GEFAHR



Contents

German instructions	1
English instructions	
Introduction	40
Principles and basic steps of TLC	41
Sample preparation · Sample application	41
Development of a chromatogram · Visualization of separated substances	42
Evaluation of thin layer chromatograms	43
TLC micro-sets	44
TLC micro-sets for thin layer chromatography	44
TLC micro-set A	45
Description of TLC micro-set A for beginners · Ordering information	45
Experiments with TLC micro-set A	46
Separation of a mixture of fat soluble / lipophilic dyes	46
Separation of a mixture of anthraquinone dyes	47
Separation of a mixture of food dyes	48
Separation of dyes from felt tip pens	49
TLC micro-set F1	50
Description of TLC micro-set F1 · Ordering information	51
Experiments with TLC micro-set F1	52
Separation of amino acids (test mixture and urine)	52
Separation of heavy metal cations	54
TLC micro-set F2	56
Description of TLC micro-set F2 · Ordering information	57
Experiments with TLC micro-set F2	58
Analysis of edible fats	58
Analysis of fats and cholesterol in blood	60
TLC micro-set F3	62
Description of TLC micro-set F3 · Ordering information	63
Experiments with TLC micro-set F3	64
Separation of analgetics (pain relievers)	64
Analysis of drugs using the example of cinchona bark	66
TLC micro-set M	68
Description of TLC micro-set M · Ordering information	69
Further TLC products	70
Ordering information	70
MN layers for TLC	71
Literature	72
Safety instructions	73

Introduction

The chemical analyses of raw materials, the control during production, the final quality and purity control of manufactured products, as well as pharmaceutical, food and environmental analyses have become increasingly important in the last decades.

One important method to solve these problems is thin layer chromatography (TLC). It is an efficient method for analytical as well as for preparative separations and has almost completely replaced historic paper chromatography. In many fields it has been developed into a standard procedure for routine analyses. Besides speed, accuracy and high sensitivity another important advantage is its economy.

From its beginnings in the sixties, MACHEREY-NAGEL has actively supported TLC by developing and manufacturing numerous adsorbents and innovative binder systems. These include mainly silica gel, cellulose, aluminum oxide and polyamide as well as materials modified for special applications.

With these well-proven adsorbents we manufacture machine-coated TLC glass plates as well as polyester or aluminum pre-coated sheets. This eliminates the need for time-consuming and costly hand-coating of TLC plates or sheets, and in addition mechanical production guarantees better uniformity of the layers.

Especially for the education in schools and industry, we have assembled TLC micro-sets, which demonstrate both the speed of the method and the high performance of our POLYGRAM® pre-coated sheets. For this purpose as well as for rapid product control during manufacturing processes in scientific and industrial laboratories pre-coated sheets are particularly suited. Furthermore, we wish to encourage further research and help find solutions to individual problems.

The beginner's set (TLC micro-set A, see page 45–49) features separations with simple developing solvents, samples that are colored thus eliminating the need for visualization and the advantage that all equipment needed is contained in the set.

The advanced sets (TLC micro-sets F1, F2, F3, see page 50–67) are suitable for the more advanced user, because some experience and skill is required. For these sets, some of the samples have to be prepared before separation, and for the identification of substances spray reagents have to be used. Each advanced TLC micro-set is designed for specific groups of separations from physiological and pharmaceutical analysis.

Prerequisite for all advanced experiments is a materials kit (TLC micro-sets M, see page 68–69), which can also be used as basic equipment for individual TLC experiments.

The additional equipment required for the advanced experiments is usually present in any laboratory (e.g., fume hood, safety gloves, hairdryer, drying oven, mortar).

This extension of our programme leads you further into an interesting area of analytical chemistry. All types of TLC micro-sets make use of pre-coated POLYGRAM® sheets, size 4 x 8 cm, which also are used in routine analysis.



Thin layer chromatography (TLC) is a multi-stage distribution process. This process involves solvents or solvent mixtures, sample molecules and a suitable adsorbent. For TLC this adsorbent is applied to a suitable support (a glass plate, polyester or aluminum sheet) in a thin layer – for analytical purposes usually 0.1 to 0.25 mm thick.

For the experiments with our TLC micro-sets the mixture of substances to be separated is applied to a pre-coated polyester sheet and placed into a developing chamber containing the developing solvent. In many cases the separation is completed in a few minutes. Colored substances are visible immediately, colorless substances are visualized by spraying with suitable reagents (formation of colored compounds).

If a UV lamp is available and the adsorbent layer is provided with a fluorescent indicator, substances can often be localized by viewing the chromatogram under UV radiation.

To illustrate how a thin layer chromatographic separation is made, we describe below five basic steps:

1. Sample preparation

A sample for chromatographic separation has to meet several conditions, if good separations are to be achieved. It is not possible to go into exact details here. It should be mentioned, however, that in some cases several steps for concentration or pre-cleaning of a sample are necessary.

The examples in our beginner's set do not require complicated procedures. The dyes or dye mixtures chosen for this set can be applied without further preparation. The last example (dyes from felt tip pens) demonstrates the application of TLC to a product in every-day-life, but in this case, too, the sample can be applied without prior preparation.

The advanced sets require the user to carry out some additional steps such as crushing of a sample, extraction, filtration, and concentration as well as sampling. These individual steps in sample preparation introduce the user to techniques often performed in industrial laboratories. Thorough preparation is an important prerequisite for the success of a thin layer chromatographic separation.

Contrary to the beginner's set, which contains samples of selected compositions, the advanced sets have examples relating to practical tasks. For details, please refer to the individual experiments.

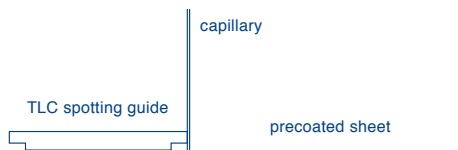
2. Sample application

The aim of a chromatographic separation determines how the sample should be applied to the TLC plate or sheet. For analytical separations with qualitative evaluation samples are spotted with a capillary or micro pipette, for quantitative evaluation the sample is applied as spots or short streaks (mostly 1 cm). A streak covering the whole width of the plate is recommended for preparative separations.

For the separations described in this manual the separation mixtures or reference solutions are applied to a pre-coated sheet as spots by means of glass capillaries. Use each capillary for one sample only to avoid contamination of the following samples.

The capillaries fill themselves quickly when dipped into organic test solutions, for aqueous solutions filling will be much slower; in some cases it may be necessary to use a rubber cap. For emptying the capillaries, place the end of the capillary on the layer vertically and carefully; vertically so that the capillary empties itself, and carefully to avoid damage to the layer. Damaged layers result in unevenly shaped spots. To keep spots as small and compact as possible, it is advisable to apply a solution in several portions with intermediate drying (blow with cold or hot air, cabinet dryer). This is especially important for aqueous solutions.

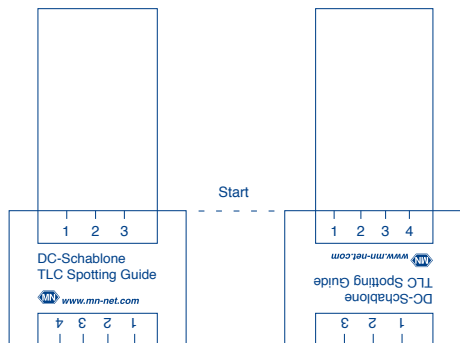
To facilitate application we recommend a spotting guide designed especially for our pre-coated sheets. The following figures demonstrate the clean and easy application of samples with the above-mentioned spotting guide.



Principles and basic steps of TLC

Depending on whether three or four substances are to be applied, place the pre-coated sheet under the appropriate frame of the spotting guide on a plain anti-glide surface. Thus the starting line and spotting points are fixed at the right distances. Additionally, the spotting guide has a groove on the lower edges to prevent solutions smearing under the guide during application.

For the experiments of the beginner's set only three starting points are needed, whereas some of the advanced experiments require four starting points.



For a later evaluation of thin layer chromatograms, starting points and line are marked with a weak pencil on the TLC layer before sample application.

3. Development of a chromatogram

After application of a sample solution allow the solvent to evaporate completely (about 10 min) or blow dry with cold or hot air. Subsequently place the pre-coated sheet into the developing chamber (glass bottle with screw cap) containing approximately 10 mL of developing solvent. Screw the cap on to the bottle while you hold the glass firmly on the table, so that the surface of the developing solvent is not disturbed.



Please take care that the solvent does not unevenly touch, or splash over the applied spots. The solvent ascends through the layer by capillary action and causes the substances to separate.

When the solvent front has reached the desired height (about 6 to 7 cm) stop the separation by removing the sheet from the developing chamber. Immediately mark the solvent front with a soft pencil.

The atmosphere in the developing chamber should be given some thought. For the examples chosen for our TLC micro-sets saturation of the chamber with developing solvent vapor is not necessary. If, however, you want to achieve reproducible retention, saturation of the chamber with solvent vapor is in many cases advantageous. To obtain saturation, line the developing chamber with an absorptive chromatography paper (MN 260, REF 814030). In this case use 15 mL of solvent instead of the 10 mL mentioned above.

4. Visualization of separated substances

After chromatographic separation all colorless substances have to be made visible. If the adsorbent layer contains a fluorescent indicator, viewing under UV light results in non-specific visualization. Another non-specific identification method is staining in an iodine chamber.

You can obtain more specific color reactions by spraying with suitable spray reagents. Combinations of these methods can also be used. Alternatively, TLC sheets can also be dipped shortly into the reagent solution.

For our beginner's set we have chosen dyes, i.e. colored substances which can be recognized without further treatment.

The substances separated with the advanced sets are colorless as is usually the case in practice. For visualization spray reagents are used (e.g., spray reagent according to Dragendorff-Munier, molybdato-phosphoric acid, ninhydrin, rubenic acid).

Spray reagent according to Dragendorff-Munier is generally used for detection of nitrogen compounds like alkaloids and tertiary amines. It is composed of basic bismuth nitrate, tartaric acid and potassium iodide and forms a potassium tetraiodo bismutate complex. Nitrogen compounds, which are to be analysed, are protonated by tartaric acid and form orange colored (in some cases yellow or red to brown) ion pairs of the formula $[BiI_4]^-[HNR_3]^+$.

Principles and basic steps of TLC

Molybdatophosphoric acid, dissolved in ethanol, is applied as spray reagent for the detection of reducing substances (e.g., fats, fatty acids, alcohols). A dark blue coloration of the substance spots, also called »molybdenum blue«, results by heating to 120 °C (heat gun, drying oven) after spraying onto the developed TLC sheet.

For detection of amino acids, amines and amino-sugars an ethanolic ninhydrin solution can be used, which forms reddish spots with the analytes after heating to 110 °C.

Heavy metals can be visualized by the utilization of *rubeanic acid*. Subsequent to the separation rubeanic acid in ethanol is sprayed onto the TLC plates. After a following vaporization with ammonia (vapor of 25% ammonia solution from watchglass or in beaker) the heavy metals will be visible.



More details about spray reagents are described in the experimental part of the micro-sets. But here are some general remarks concerning spraying. Use all spray reagents under a fume hood. For spraying, place the TLC foil on a sheet of filter paper. In most cases it is sufficient to fill the sprayer with 5–10 mL of reagent solution. Spray the sheets from a distance of about 15 cm with the aid of a rubber bulb or compressed air if available. It is always better to spray a layer twice very thinly and evenly (with intermediate drying) than to saturate the layer with excessive spray reagent. In the latter case spots tend to become diffuse. After visualization mark the outlines of color zones with a pencil, because some spots tend to fade after a while.

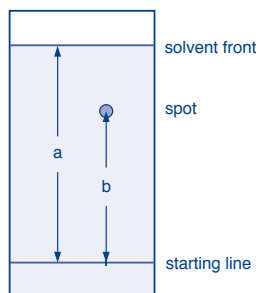
5. Evaluation of thin layer chromatograms

The evaluation depends on the purpose of a chromatographic separation. For qualitative determinations often localization of a substance is sufficient. This can be achieved by parallel runs with reference substances.

The value often used for evaluation is the R_f value (retention factor) or the hundred fold value hR_f . The R_f value is defined as follows:

$$R_f = \frac{\text{distance starting line} - \text{middle of spot}}{\text{distance starting line} - \text{solvent front}} = \frac{b}{a}$$

i.e. R_f values are between 0 and 1, best between 0.1 and 0.8, corresponding to 10–80 for hR_f .



If reproducible R_f values are to be obtained. However, it is essential that several parameters such as saturation of the development chamber with solvent vapor, constant composition of solvent mixtures, constant temperature etc. are strictly controlled.

Quantitative evaluations are possible by comparison with suitable standards. For this purpose either the areas of spots are measured or substances are measured photometrically directly on the layer. The latter procedure, however, requires complex instrumentation.

Note the safety instructions on labels and in this manual (see page 73–75) before every experimental procedure. The disposal of used chemicals must follow international, national and local environmental protection guidelines.

TLC micro-sets for thin layer chromatography

The TLC micro-sets are assemblies of materials and chemicals for easy separations with thin layer chromatography. They are especially recommended as introduction to TLC for pupils, students and trainees. Each set contains detailed explanations and instructions for the respective separations.

● Beginner's set (TLC micro-set A)

This set features separations with simple developing solvents and colored samples. Thus, a visualization is not necessary.

All equipment needed is contained in the set.

● Advanced sets (TLC micro-sets F1, F2, F3)

Advanced sets require some experience and skill from the user.

Some of the samples have to be pretreated before separation.

For identification of substances spray reagents have to be used.

For separations with kits F1 to F3 the materials kit TLC micro-set M is required.

● Materials kit (TLC micro-set M)

This kit is prerequisite for the separations with kits F1 to F3.

In addition, it serves as basic equipment for the individual study of further thin layer chromatographic experiments.



TLC micro-set A

Description of TLC micro-set A for beginners

This kit contains all chemicals, accessories and instructions for the following experiments:

- ✓ Separation of a mixture of fat-soluble/lipophilic dyes (test dye mixture 1): butter yellow, indophenol, sudan blue II, sudan red G
- ✓ Separation of a mixture of anthraquinone dyes (test dye mixture 2): blue 1, blue 3, green, green blue, red, violet 1, violet 2
- ✓ Separation of a mixture of food dyes (test dye mixture 3): brilliant black BN (E151), fast red E, erythrosine (E127), yellow orange S (sunset yellow CFC, E110), naphthol red S, ponceau 4 R (E124), tartrazine (E102)
- ✓ Separation of dyes from felt tip pens

Contents of TLC micro-set A for beginners

- 1 manual (available also as download)
- 3 developing chambers, 1 measuring cylinder 10 mL
- 50 glass capillaries 1 μL , 1 spotting guide
- 50 polyester sheets each of POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, Alox N/UV₂₅₄ and CEL 300, 4 x 8 cm
- 8 mL each of test dye mixture 1 (4 lipophilic dyes), test dyes sudan blue II (A), and sudan red G (B) (each in toluene)*
- 8 mL each of test dye mixture 2 (7 anthraquinone dyes), test dyes blue 1 (C) and violet 2 (D) (each in toluene – cyclohexane (2:1, v/v))*
- 8 mL each of test dye mixture 3 (7 food dyes), test dyes yellow orange S (E), and brilliant black BN (F) (each in water)
- 100 mL each of toluene, toluene – cyclohexane (2:1, v/v), ethanol, 25 % ammonia solution – 2-propanol (5:3, v/v)* and 2.5 % sodium citrate solution
- 2 felt tip pens

Ordering information

Designation	Pack of	REF
TLC micro-set A for beginners*	1 kit	814000
Replacement parts for TLC micro-set A		
Test dye mixture 1*, solution of 4 lipophilic dyes in toluene (components see above)	8 mL	814001
Test dye mixture 2*, solution of 7 anthraquinone dyes in toluene – cyclohexane (2:1, v/v) (components see above)	8 mL	814002
Test dye mixture 3, aqueous solution of 7 food dyes (components see above)	8 mL	814003
Collection of 4 individual components of test dye mixture 1*	4 x 8 mL	814011
Collection of 7 individual components of test dye mixture 2*	7 x 8 mL	814012
Collection of 7 individual components of test dye mixture 3	7 x 8 mL	814013
Sodium citrate, 2.5 g in 100 mL bottles to fill up with distilled water	2.5 g	814029
TLC polyester sheets POLYGRAM®, 4 x 8 cm: 100 x SIL G/UV ₂₅₄ ; 50 x Alox N/UV ₂₅₄ ; 50 x CEL 300	1 set	814028

* These products contain harmful substances which must be specially labeled as hazardous. For detailed information please see safety instructions (see page 73–75) or MSDS (www.mn-net.com/msds). Our TLC micro-sets are carefully assembled and controlled before leaving our manufactory. In the unlikely case, that by delivery the low boiling solvent in the test dye mixtures should be vaporised, you can refill the vial easily by yourself with the fitting solvent.

- ✓ Test dye mixture 1: 8 mL toluene each
- ✓ Test dye mixture 2: 8 mL toluene – cyclohexane (2:1, v/v) each

Further accessories see page 69.

Experiments with TLC micro-set A

Separation of a mixture of fat soluble /lipophilic dyes

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

Fat soluble /lipophilic dyes are used for coloration of natural and synthetic oils, fats and waxes, benzines, mineral oils as well as for the transparent coloration of plastics. Butter yellow was formerly permitted as food dye.

Chemically these dyes belong to several different classes of substances: azo dyes, azines, indophenols and anthraquinones.

Equipment:

1 x POLYGRAM® Alox N/UV₂₅₄, 1 x developing chamber, 3 x glass capillaries, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide

Sample solution:

test dye mixture 1
(consisting of butter yellow, sudan blue II, sudan red G, indophenol, already dissolved in toluene)

Reference solutions A and B:

2 individual components (sudan blue II (A) and sudan red G (B), each already dissolved in toluene)

Developing solvent:

toluene (approx. 6 mL)

Separation time:

approx. 7 min

Visualization:

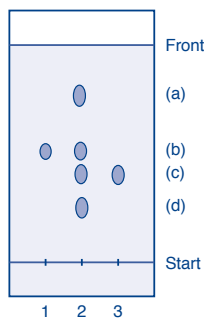
no further visualization required – substances are colored

Procedure:

1. Use one filled (1 µL) glass capillary each and apply as follows using the spotting guide (see page 41: 2. Sample application):
starting point 1: reference solution A (sudan blue II)
starting point 2: test dye mixture 1
starting point 3: reference solution B (sudan red G)
2. Applied dye solutions are air-dried for 5 min.
3. Open the developing chamber and fill in approx. 6 mL toluene using the measuring cylinder.
4. Place the TLC sheet into the developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chamber (see image page 42).

5. Wait for separation (approx. 7 min), then open the chamber in the fume hood, remove TLC sheet and evaporate the solvent.

Chromatogram:



Legend:

(a) butter yellow, (b) sudan blue II,
(c) sudan red G, (d) indophenol

Remarks:

Separation can also be achieved on a silica gel layer, e.g., POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄. Also use toluene as developing solvent.

Experiments with TLC micro-set A

Separation of a mixture of anthraquinone dyes

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

Anthraquinone dyes are important dyestuffs for the textile and leather industries. Their coloration is very bright and light-fast. They are derived from anthraquinone by substitution of the basic structure or condensation of further ring systems.

Equipment:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x developing chamber, 3 x glass capillaries, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide

Sample solution:

test dye mixture 2
(consisting of 7 anthraquinone dyes: blue 1, blue 3, green, green blue, red, violet 1 and violet 2, already dissolved in toluene – cyclohexane (2:1, v/v))

Reference solutions C and D:

2 individual components (blue 1 (C) and violet 2 (D), each already dissolved in toluene – cyclohexane (2:1, v/v))

Developing solvent:

toluene – cyclohexane (2:1, v/v)

Separation time:

approx. 2 x 12 min + 10 min intermediate drying

Visualization:

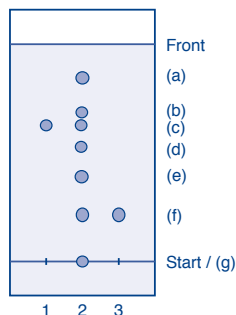
no further visualization required – substances are colored

Procedure:

1. Use one glass capillary each, and apply as follows $\frac{3}{4}$ of capillary volume using the spotting guide (see page 41: 2. Sample application):
starting point 1: reference solution C (blue 1)
starting point 2: test dye mixture 2
(7 anthraquinone dyes)
starting point 3: reference solution D (violet 2)
2. Applied dye solutions are air-dried for 5 min.
3. Open the developing chamber and fill in approx. 10 mL toluene – cyclohexane using the measuring cylinder.
4. Place the TLC sheet into the developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chamber (see image page 42).
5. Wait for separation (approx. 12 min or development height of 65–70 mm).

6. Open the separation chamber, remove TLC sheet and close chamber again.
7. Evaporate the developing solvent from the TLC sheet in the fume hood.
8. Again place the dried TLC sheet into the developing chamber and repeat the separation.

Chromatogram:



Legend:

(a) violet 1, (b) green blue, (c) blue 1, (d) green, (e) red, (f) violet 2, (g) blue 3

Remarks:

In this experiment we used a double development without changing the solvent. This procedure is recommended whenever numerous substances have to be separated, and a single development does not give satisfactory results. For the second development another solvent or solvent system may be chosen. Thorough intermediate drying in a fume hood is, however, essential in all these cases.

Use of the different adsorbent layers POLYGRAM® Alox N/UV₂₅₄ (aluminum oxide) or POLYGRAM® CEL 300 (cellulose), as well as variation of the developing solvent provide interesting information on chromatographic relations. Further experiments can be carried out at the discretion of the user.

Experiments with TLC micro-set A

Separation of a mixture of food dyes

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

A multiplicity of colors is not only found in chromatography, but also in our everyday food. Consumers sometimes even judge the quality of foods by their color. This is why even today colors are added to some foods.

Food additives are subject to government regulations in most countries. Before any dye (whether natural or synthetic) is permitted for food use, it has to be proven that it is non-toxic and non-carcinogenic.

Our test mixture contains seven dyes, from which not all are permitted for use in food. Thus, the importance of the separation and identification of such substances is evident.

Equipment:

1 x POLYGRAM® CEL 300, 1 x developing chamber, 3 x glass capillaries, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide

Sample solution:

test dye mixture 3
(consisting of brilliant black BN, erythrosine, fast red E, naphthol red S, ponceau 4R, tartrazine, yellow orange S, already dissolved in water)

Reference solution E and F:

2 individual components (yellow orange S (E) and brilliant black BN (F), each already dissolved in water)

Developing solvent:

2.5% sodium citrate solution – 25% ammonia solution – 2-propanol (20:5:3, v/v/v), prepared by mixing 10 mL of 2.5% sodium citrate solution with 4 mL of ready-mixed ammonia – 2-propanol solution

Separation time:

20–25 min (development height of approx. 65 mm)

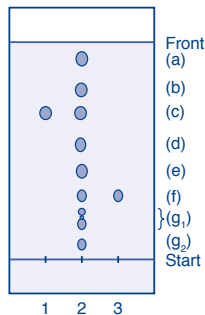
Visualization:

no further visualization required – substances are colored

Procedure:

1. Use one glass capillary each, and apply as follows $\frac{1}{4}$ of capillary volume using the spotting guide (see page 41: 2. Sample application):
starting point 1: reference solution E (yellow orange S)
starting point 2: test dye mixture 3
starting point 3: reference solution F (brilliant black BN)
2. Applied dye solutions are air-dried for 5 min.
3. Open the developing chamber and fill in the solvent (see above).
4. Place the TLC sheet into the developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chamber (see image page 42).
5. Wait for separation (approx. 20–25 min or development height of 65 mm).
6. Open the separation chamber, remove TLC sheet and evaporate the developing solvent from TLC sheet in the fume hood.

Chromatogram:



Legend:

(a) tartrazine, (b) ponceau 4R, (c) yellow orange S, (d) naphthol red S, (e) fast red E, (f) brilliant black BN, (g₁) erythrosine (secondary spots), (g₂) erythrosine (main spot)

Remarks:

The solvent mixture has to be prepared fresh for every separation. When it stands for a while, it will alter its composition and thus its separating properties.

Erythrosine shows three spots on the chromatogram: one stronger spot (g₂) and two weaker secondary spots (g₁). Eventually another weak spot may appear for this compound.

Separation of dyes from felt tip pens

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

In the previous examples test mixtures prepared specifically for this application were separated. This experiment – the separation of colors from felt tip pens – shows, that industrial dye composition are more complex mixtures and thus more difficult to separate. Black felt tip pens are especially suitable, because they are often composed of many different colors. A red line does by no means indicate that it contains only one red dye.

The chromatograms can be used for quality control (brilliance of color) as well as for product identification. Apart from the two pens supplied with the set other samples can be separated. It is interesting to compare the chromatographic behaviour of colors from felt tip pens to inks, for example.

Equipment:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x developing chamber, 3 x glass capillaries, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide

Samples:

2 commercial felt tip pens

Developing solvent:

ethanol (approx. 10 mL)

Separation time:

approx. 20 min

Visualization:

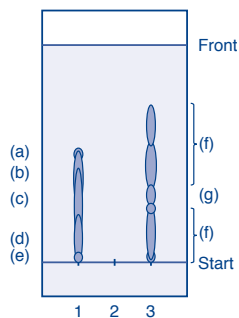
no further visualization required – substances are colored

Procedure:

1. Apply directly with each of the felt tip pens – weakly impressed dot
starting point 1: black felt tip pen
starting point 3: red felt tip pen
The starting point 2 can be used for e.g., ink (one filled glass capillary) or for an own felt tip pen.
2. Applied dots are air-dried for 3 min.
3. Open the developing chamber and fill in the solvent (see above).
4. Place the TLC sheet into the developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chamber (see image page 42).
5. Wait for separation (approx. 20 min).

6. Open the separation chamber, remove TLC sheet and evaporate the developing solvent in the fume hood.

Chromatogram:



Legend:

(a) purple, (b) light red, (c) yellow, (d) green, (e) black, (f) red, (g) yellow orange

Remarks:

The results depend on the amount of sample applied. Make sure that the dots are not too big (too much sample) and the layer is not damaged. If too much of the dye mixture has been applied, a double development with the same solvent may improve the separation.

For the black felt tip pen an impressive separation pattern can be obtained, when the color is applied as a streak along the starting line (use a ruler or the spotting guide).

The solvent mixture suggested for this separation will not separate inks. These can be separated, if a mixture of *n*-butanol – glacial acetic acid – water (12:3:5, v/v/v) is used with the same adsorbent layer (development time approx. 25 min). Note how the chromatograms from the felt tip pens change in this solvent mixture.



TLC micro-set F1

Description of TLC micro-set F1

This kit contains all chemicals required for the separation of:

- ✓ amino acids (test mixture, consisting of alanine, arginine, tryptophan and valine)
- ✓ amino acids in urine
- ✓ the heavy metal cations copper(II) and manganese(II)

For the separations with kit F1, the materials kit TLC micro-set M is prerequisite. (A detailed description is provided on page 69.)

Contents of TLC micro-set F1

- 1 manual (available also as download)
- 50 glass capillaries 1 μ L
- 50 polyester sheets each of POLYGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄ and CEL 300, 4 x 8 cm
- 100 mL each of *n*-butanol, ninhydrin spray reagent (in ethanol), acetone, 25 % ammonia solution, rubeanic acid spray reagent (in ethanol)*
- 50 mL each of 50 % acetic acid, 18 % hydrochloric acid*
- 8 mL each of the amino acid test mixture (see above), arginine reference solution (A) and tryptophan reference solution (B) (each in water)
- 8 mL each of the heavy metal cation test mixture (see above), Mn²⁺ reference solution (C) and Cu²⁺ reference solution (D) (each in water)

Ordering information

Designation	Pack of	REF
TLC micro-set F1*	1 kit	814200
Replacement parts for TLC micro-set F1		
Amino acid test mixture (components see above)	8 mL	814201
Collection of 4 individual components of the amino acid test mixture	4 x 8 mL	814202
Ninhydrin spray reagent (in ethanol)*	100 mL	814203
Heavy metal cation test mixture (Cu ²⁺ , Mn ²⁺)	8 mL	814204
Collection of 2 individual components (Cu ²⁺ , Mn ²⁺) of the cation test mixture	2 x 8 mL	814205
Rubeanic acid spray reagent (in ethanol)*	100 mL	814206
TLC polyester sheets POLYGRAM [®] SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 8 cm	4 x 50	814025
TLC polyester sheets POLYGRAM [®] CEL 300, 4 x 8 cm	4 x 50	814027
TLC micro-set M (materials kit)	1 kit	814100
* These products contain harmful substances which must be specially labeled as hazardous. For detailed information please see safety instructions (see page 73–75) or MSDS (www.mn-net.com/msds). Further accessories see page 69.		

Experiments with TLC micro-set F1

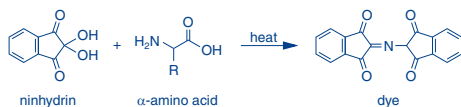
Separation of amino acids (test mixture and urine)

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

Amino acids are essential for the physiology of all living things. They are important for, e.g., cell growth, liver metabolism, blood coagulation, formation of haemoglobin, function of the nervous system and others. Finally – combined to larger units (peptides) – they are the basic units of proteins. Some can be synthesized by animals or humans (non-essential amino acids), some have to be supplied with the food (essential amino acids). Their separation and identification are thus important analytical tasks.

Natural amino acids can occur free (e.g., in blood serum, urine) or they can be obtained by cleavage of proteins, either by action of enzymes or by acid hydrolysis of substances containing proteins (e.g., hen's egg white). The human body secretes about 1.1 g of free amino acids per day.

Since amino acids are colorless, the spots have to be visualized after separation. This is achieved by spraying with the highly sensitive spray reagent ninhydrin. During heating, colored compounds are formed in a complex reaction (deamination, decarboxylation):



Equipment:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x developing chamber, 3–4 x glass capillaries, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide, 1 x laboratory sprayer

Sample solution:

test mixture of amino acids
(aqueous solution of alanine, arginine, tryptophan, valine)

urine sample (optional)

Reference solutions A and B:

2 individual components (arginine (A) and tryptophan (B), each already dissolved in water)

Developing solvent:

n-butanol – glacial acetic acid – water (3:1:1, v/v/v)
prepared freshly by mixing 6 mL *n*-butanol with 4 mL 50% acetic acid (mixture alters its composition with time thus it cannot be prepared for stock)

Separation time:

approx. 60 min for a development height of 60 mm

Visualization:

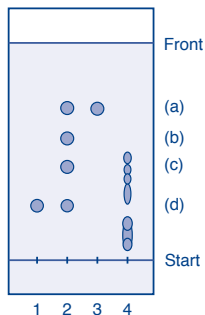
spray reagent: ethanolic solution of ninhydrin;
subsequent heating in a drying oven
(approx. 5 min at 110 °C)

Procedure:

1. Use one glass capillary each, and apply as follows ½ of capillary volume using the spotting guide (see page 41: 2. Sample application):
starting point 1: reference solution A
(solution of arginine)
starting point 2: test mixture of amino acids
starting point 3: reference solution B
(solution of tryptophan)
starting point 4: one complete content of glass capillary – urine sample (optional)
2. Applied samples are dried with a hairdryer.
3. Open the developing chamber and fill in the solvent (see above) using the measuring cylinder.
4. Place the TLC sheet into the developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chamber (see image page 42).
5. Wait for separation (approx. 60 min), then open the chamber in the fume hood, remove TLC sheet and mark the solvent front with a pencil.
6. Dry TLC sheet with the hairdryer – until acetic acid can no longer be smelled.
7. Fill the sprayer with 5–10 mL spray reagent (see above) and spray the TLC sheet, lying on a pad of filter paper, so that it is slightly moistened.
8. Dry the TLC sheet with the hairdryer and spray it again.
9. Place the TLC sheet for approx. 5 min at 110 °C into the drying oven (orange-red to brown-red spots will appear).
10. Outline the spots with a pencil and determine the R_f values (see page 43: 5. Evaluation of thin layer chromatograms).

Experiments with TLC micro-set F1

Chromatogram:



Legend:

(a) tryptophan, (b) valine, (c) alanine, (d) arginine

Remarks:

It is recommended that the samples are applied in portions – with intermediate drying – to keep spots small and compact. This is very important because during the long developing time (approx. 60 min) zones may broaden by diffusion thus deteriorating the separation. The drying steps are essential for good results. The temperature of the drying cabinet must not exceed 130 °C.

It is interesting to run the same separation on a cellulose pre-coated TLC sheet (POLYGRAM® CEL 300). The color of the spots changes to violet, but spots are not as compact as on silica gel. The developing time is only 40 min, but valine and tryptophan cannot be separated. Furthermore, the sequence of the acids is changed as compared to silica gel.

With aluminum oxide useful separations cannot be obtained for this system.

Urine samples show a large number of substances, i.e. a broad spectrum of different amino acids. The result depends on the donor, the time of day and the type of food previously eaten. A defined correlation of single amino acids is not possible with this test arrangement. A double development can improve separation in some cases (do not forget thorough intermediate drying).

Experiments with TLC micro-set F1

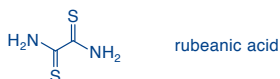
Separation of heavy metal cations

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

In most cases in industry as well as in research and development, organic substances have to be separated. But thin layer chromatography is suited for the analyses of inorganic compounds, too.

In this example the heavy metals copper and manganese will be separated and identified. Since many heavy metals are very toxic, not only as elements (e.g., dust), but also as soluble salts, it is important to monitor their accumulation in nature as well as in human bodies. Their concentration plays an important role. Many of the heavy metals are essential to living organisms in traces, but higher concentrations result in numerous negative effects on health.

The heavy metal cations are visualized by spraying with rubeanic acid:



Several metal cations form colored inner complexes (neutral chelate complexes) with rubeanic acid. The complex formation depends on the hydrogen ion concentration. This is why in this experiment the TLC sheet has to be treated with ammonia vapor after spraying.

Equipment:

1 x POLYGRAM® CEL 300, 1 x developing chamber, 3 x glass capillaries, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide, 1 x laboratory sprayer

Sample solution:

mixture of 2 heavy metal salts (cations Cu^{2+} , Mn^{2+}), already dissolved in water

Reference solutions C and D:

2 individual salts (cations Mn^{2+} (C) and Cu^{2+} (D)), each already dissolved in water

Developing solvent:

acetone – 18 % hydrochloric acid (4:1, v/v)
freshly prepared by mixing 10 mL acetone with 2.5 mL hydrochloric acid

Separation time:

up to a height of approx. 7 cm – possible fluctuation of separation time (approx. 10 min)

Visualization:

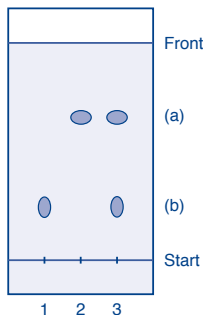
spray reagent: rubeanic acid (solution in ethanol) and treatment with vapor of 25 % ammonia solution

Procedure:

1. Use one filled glass capillary each and apply as follows using the spotting guide (see page 41: 2. Sample application):
starting point 1: reference solution C (Mn^{2+})
starting point 2: reference solution D (Cu^{2+})
starting point 3: sample solution (Cu^{2+} , Mn^{2+})
Note: To keep spots small apply the solutions in several portions and dry intermediately with hairdryer.
2. After applying dry again carefully.
3. Open the developing chamber and fill in the solvent (see above) using the measuring cylinder.
4. Place the TLC sheet into the developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chamber (see image page 42).
5. Wait for separation, then open the chamber in the fume hood, remove TLC sheet and mark the solvent front with a pencil.
6. Dry TLC sheet with a hairdryer.
7. Fill the sprayer with 5 mL spray reagent (see above) and spray the TLC sheet, lying on a pad of filter paper, until it is slightly moistened.
8. Dry the TLC sheet with a hairdryer and spray it again.
9. Place some milliliters of 25 % ammonia solution on a watch glass or in a Petri dish and hold TLC sheet (with the layer bottom-side) in the vapor of the solution.
10. Outline the visualized spots with a pencil.

Experiments with TLC micro-set F1

Chromatogram:



Legend:

(a) Cu^{2+} (black-brown), (b) Mn^{2+} (brown)

From the centers of the spots and the distance starting line – solvent front the characteristic R_f values can be calculated.

Remarks:

In this experiment, too, it is important to keep spots small and compact, by applying them in portions. Contrary to the copper spot the spot for manganese will only appear after treatment with ammonia. After about 30 min the color will disappear again. Because of partial separation of the solvent mixture a very thin secondary front can be seen in front of the copper spot. During separation the yellow $(\text{CuCl}_4)^{2-}$ complex zones can be observed.

Please note: It is important to keep the hydrochloric acid bottle closed for reproducible results! Even slight changes in the acid concentration will alter the R_f values.



TLC micro-set F2

Description of TLC micro-set F2

This kit contains all chemicals required for the analysis of:

- ✓ edible fats
- ✓ fats and cholesterol in blood

For the separations with kit F2, the materials kit TLC micro-set M is prerequisite (a detailed description is provided on page 69). Because of the directive 93/42/EWG clinical products have to be CE marked. For this reason, we do not add blood lancets and alcohol pads to the TLC micro-sets. Nevertheless, these can be obtained easily at any dispensing chemist's / pharmacy.

Contents of TLC micro-set F2

- 1 manual (available also as download)
- 50 glass capillaries 1 µL
- 50 polyester sheets POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 4 x 8 cm
- 5 disposable pipettes 25 µL
- 5 sample vials N 11, 1.5 mL, with PE caps and seals
- 3 sample vials 30 mL (for butter, margarine and edible oil)
- 100 mL each of cyclohexane and molybdato-phosphoric acid spray reagent (in ethanol)*
- 2 x 50 mL acetone with calibrated pipette (1 x enclosed)*
- 25 mL butan-2-one (ethyl methyl ketone)*
- 8 mL cholesterol reference solution (in acetone)*

Ordering information

Designation	Pack of	REF
TLC micro-set F2*	1 kit	814300
Replacement parts for TLC micro-set F2		
Cholesterol reference solution (in acetone)*	8 mL	814301
Molybdato-phosphoric acid spray reagent (in ethanol)*	100 mL	814302
TLC polyester sheets POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 8 cm	4 x 50	814025
TLC micro-set M (materials kit)	1 kit	814100

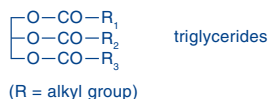
* These products contain harmful substances which must be specially labeled as hazardous. For detailed information please see safety instructions (see page 73–75) or MSDS (www.mn-net.com/msds). Further accessories see page 69.

Experiments with TLC micro-set F2

Analysis of edible fats

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

Chemically speaking fats are glycerol esters of higher fatty acids (e.g., palmitic, stearic, oleic acids). Unsaturated fatty acids contain double bonds, and their glycerol esters are especially important for human nutrition. Besides these esters (the so-called triglycerides) natural and synthetic fats and oils contain other components. These include cholesterol, cholesterol esters, free fatty acids and phospholipids. Exposure to light and air result in the formation of hydroxy fatty acids or their triglycerides, the fat turns »rancid«.



In food, these substances are mainly found in butter, margarine and edible oils. Some of these lipids can also be found in blood; from a medical point of view the determination of cholesterol concentrations in blood is of great importance (see next experiment).

This experiment deals with commercial fats, which are separated into their main components. Depending on brands minor differences may occur.

Substances are made visible by spraying with molybdato-phosphoric acid. With reducing compounds dark blue to greyish-black spots are formed (molybdenum blue).

Equipment:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x developing chamber, 4 x glass capillaries, 3 x sample vials, 30 mL, 1 x acetone vial with calibrated pipette, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide, 1 x laboratory sprayer

Sample preparation:

Weigh 1 g each of butter, margarine and edible oil in the provided sample vials, add 10 mL acetone each and shake the well-closed vials. Some fats (e.g., butter) form only turbid liquids (emulsions). Nevertheless they can be used as samples without further treatment.

Reference solution:

solution of cholesterol in acetone (1 mg/mL); keep sample well closed!

Developing solvent:

cyclohexane – butan-2-one (10:1, v/v)
freshly mix (directly in the developing chamber)
10 mL cyclohexane with 1 mL butan-2-one

Separation time:

approx. 12 min for a height of 60–65 mm

Visualization:

with spray reagent molybdato-phosphoric acid (dissolved in ethanol)

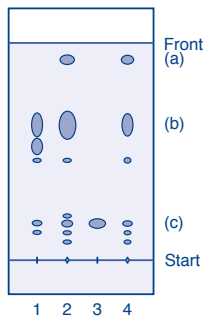
Procedure:

in advance: Prepare samples as described under sample preparation

1. Use one filled glass capillary each and apply as follows using the spotting guide (see page 41: 2. Sample application):
starting point 1: butter
starting point 2: edible oil
starting point 3: reference solution (cholesterol in acetone)
starting point 4: margarine
2. Let the applied spots dry (about 3 min).
3. Open the developing chamber and fill in the solvent (see above) using the measuring cylinder.
4. Place the TLC sheet into the developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chamber (see image page 42).
5. Wait for separation (approx. 12 min), then open the chamber in the fume hood, remove TLC sheet, mark the solvent front with a pencil and evaporate the solvent in the fume hood (with a hairdryer).
6. Fill the sprayer with 5 mL spray reagent (see above) and spray the TLC sheet, lying on a pad of filter paper, until it is slightly moistured.
7. Dry the TLC sheet with a hairdryer and heat it for another 3–4 min in a drying oven at 120 °C (or with a hot air gun).
8. Outline the dark blue spots (molybdenum blue) on a light yellow background with a pencil.

Experiments with TLC micro-set F2

Chromatogram:



Legend:

(a) cholesterol esters, (b) triglycerides,
(c) cholesterol

Remarks:

The main components of fats are the triglycerides. Immediately above the cholesterol free fatty acids may appear. Hydroxy fatty acids or their triglycerides have lower R_f values, and phospholipids will remain at the starting line. The weak spots will disappear after some time, thus early marking is advisable.

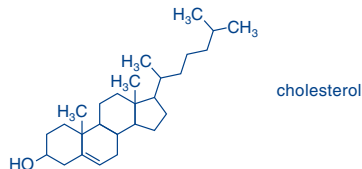
Commercial brands of margarine are often promoted with the label »free of cholesterol«. But margarine can contain cholesterol, if butterfat (max. 2%) was processed.

Experiments with TLC micro-set F2

Analysis of fats and cholesterol in blood

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

Can you see blood? – Blood, too, contains lipids, which can be separated by TLC. In this experiment they will be separated and the cholesterol concentration will be determined semi-quantitatively.



Cholesterol is the oldest known steroid. It occurs free or as esters in human or animal organs and liquids. It is the main constituent of gall stones, from which it was isolated for the first time.

The role and significance of the blood cholesterol concentration to human health is not undisputed. It is certain, that it is an essential material produced by the organism in amounts of about 6–8 g per day. With a low-fat diet an additional 0.04–0.1 g, with fatty foods up to 1.4 g are consumed daily as free cholesterol or its esters. If the blood cholesterol concentration is too high, cholesterol can be deposited in veins causing arteriosclerosis and a resultant risk of heart attack. For this reason the determination of cholesterol in blood is diagnostically important.

This experiment is to identify lipid components in blood and to semi-quantitatively estimate the content of free cholesterol. From the known concentration of the reference solution (1 mg cholesterol/mL acetone) and the chromatogram of the blood sample spot sizes and intensities of the cholesterol spots are compared.

Equipment:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 1 x developing chamber, 4 x glass capillaries, 1 x sample vials, 1.5 mL, 1 x disposable pipette, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide, 1 x laboratory sprayer

Sample preparation:

With the calibrating pipette measure 0.5 mL acetone into a 1.5 mL sample vial and close until needed. Then, with an alcohol pad, clean the top of one of the donor's fingers. Press the tip with the thumb and prick with a sterile lancet. Because of the directive 93/42/EWG clinical products have to be CE marked. For this reason, we do not add blood lancets and alcohol pads to the TLC micro-sets.

Nevertheless, these can be obtained easily at any dispensing chemist's/pharmacy. Press further with the thumb to obtain a sufficiently large drop of blood, from which 25 µL is withdrawn with the disposable pipette (use a rubber cap if needed). Immediately release the blood into the sample vial with acetone, close well and shake. Allow the blood sample to deposit and keep well closed until further use. The supernatant clear solution (serum) contains the lipid components and serves as sample.

Reference solution:

Solution of 1 mg cholesterol in 1 mL acetone. Keep sample well closed!

Developing solvent:

cyclohexane – butan-2-one (10:1, v/v)
freshly mix (directly in the developing chamber)
10 mL cyclohexane with 1 mL butan-2-one

Separation time:

approx. 15 min for a height of 60–65 mm

Visualization:

with spray reagent molybdatophosphoric acid (dissolved in ethanol)

Procedure:

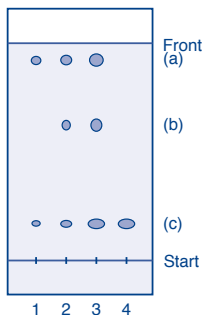
in advance: Prepare samples as described under sample preparation

1. Use one filled glass capillary each and apply as follows using the spotting guide (see page 41: 2. Sample application):
starting point 1: clear serum solution
starting point 2: twofold content of the glass capillary – clear serum solution
starting point 3: threefold content of the glass capillary – clear serum solution
starting point 4: reference solution
2. Let the applied spots dry (approx. 3 min).
3. Open the developing chamber and fill in the solvent (see above).
4. Place the TLC sheet into the developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chamber (see image page 42).
5. Wait for separation (approx. 15 min), then open the chamber in the fume hood, remove TLC sheet, mark the solvent front with a pencil and evaporate the solvent in the fume hood (with a hairdryer).

Experiments with TLC micro-set F2

- Fill the sprayer with 5 mL spray reagent (see above) and spray the TLC sheet, lying on a pad of filter paper, until it is slightly moistened.
- Dry the TLC sheet with a hairdryer and heat it for another 3–4 min in a drying oven at 120 °C (or with a hot air gun).
- Outline the substance spots with a pencil.

Chromatogram:



Legend:

- (a) cholesterol esters, (b) triglycerides,
(c) cholesterol

Remarks:

Blood contains not only cholesterol, but also triglycerides and cholesterol esters as lipid components (also see previous experiment).

The chromatograms will of course show individual differences. When 1 mL is applied, the concentration of triglycerides may be so small that they cannot be detected, as shown in the above figure.

Additionally, the concentration of lipids depends on the age of the »blood donor« as well as on his nutrition, i.e. whether the donor is fasting or has eaten just a few hours before.

After comparing spot sizes and calculating the cholesterol concentration, the result can be further improved by repeating the experiment with different volumes of blood serum. Since the sample is dissolved in the volatile solvent acetone, it is possible to apply 4 µL, 5 µL or more of the serum solution.

Example for the calculation of free cholesterol contents in blood:

Usually the concentration is given as mg cholesterol per 100 mL blood. The dilution factor of 25 µL blood in 0.5 mL (500 µL) acetone equals 500/25, i.e. 20.

If the cholesterol spot of the 3 µL serum sample shows the same intensity and size as the spot of the 1 µL reference sample (with 1 mg/mL), then the sample had 1/3 of the concentration of the reference solution. This gives:

$$\frac{1}{3} \cdot \frac{500}{25} \cdot 100 = 667$$

i.e. 100 mL blood contained 667 mg free cholesterol.

Here is another interesting calculation for the experiment: Which absolute amount of cholesterol can still be accurately determined on the TLC sheet? This gives a good impression of the sensitivity of this method.

TLC micro-set F3

Description of TLC micro-set F3

This kit contains all chemicals required for:

- ✓ separation of analgetics (pain relievers)
- ✓ drug analysis as shown for cinchona bark

For the separations with kit F3, the materials kit TLC micro-set M is prerequisite.
(A detailed description is provided on page 69.)

Contents of TLC micro-set F3

- 1 manual (available also as download)
- 50 glass capillaries 1 μ L
- 50 polyester sheets POLYGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄, 4 x 8 cm
- 5 each of Aspirin[®] and Thomapyrin[®] tablets
- 20 folded filters MN 615 1/4, 11 cm diameter
- 3 sample vials 8 mL (for Aspirin[®] sample, Thomapyrin[®] sample and cinchona bark extract)
- 5 g cinchona bark
- 100 mL each of ethanol, 2-propanol, toluene – diethyl ether (61:39, v/v)*,
spray reagent for caffeine (in aqueous acetone solution)*
and spray reagent according to Dragendorff-Munier (in water)
- 50 mL each of iron(III) chloride solution* and potassium hexacyanoferrate(III) solution (each in water)
- 30 mL ethyl acetate*
- 25 mL each of 12.5 % ammonia solution and diethylamine*
- 8 mL each of caffeine (A), paracetamol (B), quinine (C) reference solutions (each in ethanol)*

Ordering information

Designation	Pack of	REF
TLC micro-set F3*	1 kit	814400
Replacement parts for TLC micro-set F3		
Caffeine reference solution (in ethanol)*	8 mL	814407
Paracetamol reference solution (in ethanol)*	8 mL	814406
Quinine reference solution (in ethanol)*	8 mL	814405
Spray reagent for caffeine (in aqueous acetone solution)*	100 mL	814401
Spray reagent according to Dragendorff-Munier (in water)	100 mL	814402
Iron(III) chloride solution (in water)*	100 mL	814403
Potassium hexacyanoferrate(III) solution (in water)	100 mL	814404
TLC polyester sheets POLYGRAM [®] SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 8 cm	4 x 50	814025
TLC micro-set M (materials kit)	1 kit	814100

* These products contain harmful substances which must be specially labeled as hazardous. For detailed information please see safety instructions (see page 73–75) or MSDS (www.mn-net.com/msds). Further accessories see page 69.

Experiments with TLC micro-set F3

Separation of analgetics (pain relievers)

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

Analgetics (pain relievers) are frequently used pharmaceuticals. One of the best known active components is acetylsalicylic acid, used for more than 100 years now.

Besides acetylsalicylic acid many other active compounds are used as analgetics. The total amount of analgetics produced is impossible to estimate. Many of these drugs are distributed as combination drugs (e.g., with caffeine).

For this experiment two brands have been chosen from the vast number of analgetics offered on the market: Aspirin® and Thomapyrin®. The detection of the active components is somewhat more complex than usual, because no spray reagent is known which visualizes all compounds at the same time. This is why two parallel chromatograms are prepared.

Equipment:

2 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 2 x developing chambers, 4 x glass capillaries, 2 x sample vials, 8 mL, 1 x beaker, 2 x folded filters, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide, 1 x laboratory sprayer

Sample preparation:

- Pulverize one tablet of Aspirin® in a mortar and suspend it in 8 mL ethanol. Filter the suspension through a folded filter MN 615 1/4 into a beaker and wash with 8 mL ethanol. Transfer the clear filtrate into a sample vial as Aspirin® sample. Discard the remaining residue.
- Crush one tablet of Thomapyrin® in a mortar, suspend with 5 mL 2-propanol and filter through a folded filter into a beaker. Wash with 5 mL 2-propanol and transfer the clear filtrate into a sample vial as Thomapyrin® sample.

Reference solutions:

caffeine, dissolved in ethanol (A)
paracetamol, dissolved in ethanol (B)

Developing solvent:

ethyl acetate – ethanol (98:2, v/v),
prepared from 9.8 mL acetyl acetate and 0.2 mL ethanol.

Separation time:

approx. 10 min

Visualization:

Caffeine is visualized with a special spray reagent. For the detection of acetylsalicylic acid and paracetamol a mixture of two iron salt solutions (FeCl_3 and $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) is used and mixed directly in the reagent sprayer just before use (see 5. Visualization).

Procedure:

in advance: Prepare samples as described under sample preparation

- Use one filled glass capillary each and apply as follows using the spotting guide (see page 41: 2. Sample application):
Do this application in parallel on two TLC sheets:
starting point 1: Thomapyrin® sample
starting point 2: paracetamol solution (B)
starting point 3: Aspirin® sample
starting point 4: caffeine solution (A)
Note: To prevent mistakes – mark TLC sheet with I and II.
- Open the developing chamber and fill in the solvent using the measuring cylinder (see above).
- Place one TLC sheet each into each developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chambers (see image page 42).
- Wait for separation (approx. 10 min), then open the chambers in the fume hood, remove TLC sheets, mark the solvent fronts with a pencil and evaporate the solvent in the fume hood (with a hairdryer).

5. Visualization:

TLC sheet I (fume hood!)

Spray very thinly with special spray reagent for caffeine.

Dry shortly (cold air) – spray again and dry again with cold air.

→ mark brown caffeine spots with a pencil

TLC sheet II (drying oven at 110 °C; 5 min)

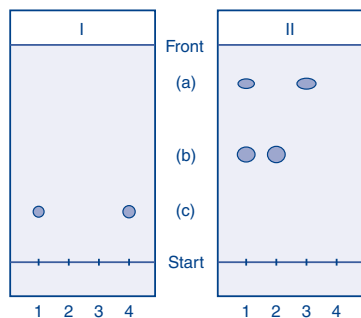
Fill 3 mL $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution and subsequently 3 mL FeCl_3 solution into sprayer (disregard precipitations).

Moisten the heated TLC sheet with spray reagent in fume hood and dry it with a hairdryer

→ mark substance spots with a pencil
(blue: paracetamol; greyish brown to violet: acetylsalicylic acid)

Experiments with TLC micro-set F3

Chromatograms:



Legend:

(a) acetylsalicylic acid, (b) paracetamol, (c) caffeine

Remarks:

Whereas Aspirin[®] (starting point 3) contains only acetylsalicylic acid as active component, Thomapyrin[®] (starting point 1) consists of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine (combined preparation). For the visualization of caffeine, do not dry with hot air, because in this case the stains will disappear immediately. In some cases a slight yellow coloration may be seen for paracetamol and acetylsalicylic acid due to adsorption of iodine.

For the visualization on sheet II, treatment in the drying cabinet should not last too long, because otherwise diffuse, blue spots will appear for acetylsalicylic acid. A smaller spot in front of the acetylsalicylic acid indicates salicylic acid (hydrolysis product in older samples). It is important for this test that the sprayer is clean before filling the reagents. If a blue color can be seen in the sprayer (»Berlin blue«), it has to be cleaned thoroughly with diluted sodium hydroxide solution. After excessive spraying, the whole sheet will turn blue after a short time. After a longer period of time the background will turn blue in any case due to the reduction of Fe^{3+} and the formation of »Berlin blue«. At this point it is important to emphasize again that all spray reagents be used under a well-functioning fume hood.

If a UV lamp is available, the whole separation can be seen on a single sheet under shortwave (254 nm) radiation.

Aspirin[®] Trademark of Bayer AG, Germany
Thomapyrin[®] Trademark of Boehringer Ingelheim, Germany

Experiments with TLC micro-set F3

Analysis of drugs using the example of cinchona bark

Please study the general principles of operation (page 41–43) and the safety instructions (page 73–75) for TLC!

As already mentioned, thin layer chromatography has found many applications for the analyses of substance mixtures. For the analysis of drugs, too, it is a rapid and informative method.

In present day language the term »drugs« is often used as meaning drugs of abuse. In the original sense drugs are dried materials of plant origin with therapeutically active ingredients. They are used as pharmaceuticals either in substance or as extracts.

For this experiment the drug cinchona bark (*Cortex chinæ succirubrae*) has been chosen. It contains certain alkaloids which will be extracted and then separated by thin layer chromatography. Alkaloids are a group of nitrogen containing basic natural substances and pharmacologically highly effective. Depending on the content, one differentiates between main and secondary alkaloids. About 35 cinchona alkaloids are known, among them the 4 main alkaloids quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine.

Pharmaceutically the most important cinchona alkaloids are quinine and quinidine. Quinine is a remedy against malaria and acts antipyretic. Quinidine has a relaxing effect and is used as cardiac depressant (antiarrhythmic).

For visualization of separated substances the spray reagent according to Dragendorff-Munier is used as a general test for nitrogen containing compounds like alkaloids.

Equipment:

1 x POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 2 x developing chambers, 3 x glass capillaries, 1 x beaker, 1 x folded filter, 1 x sample vial, 8 mL, 1 x measuring cylinder, 1 x spotting guide, 1 x laboratory sprayer

Sample preparation:

Pulverize approx. 1 g cinchona bark in a mortar. Fill the crushed material into a beaker and add about 1 mL 12.5% ammonia solution and 5 mL methanol. Stirring or shaking occasionally, extract for about 10 minutes at 50–60 °C (water bath). Filter the suspension through a folded filter MN 615 1/4, wash with 2 mL methanol and transfer into the provided sample vial. In the clear, reddish brown filtrate precipitations may appear later, but they do not interfere with the separation.

Reference solution C:

quinine dissolved in ethanol (C)

Developing solvent:

toluene – diethylether – diethylamine
(by addition of 1 mL diethylamine to 9 mL of the mixture toluene – diethylether (61:39, v/v))

Separation time:

approx. 2 x 10 min with intermediate drying

Visualization:

Spray reagent according to Dragendorff-Munier, consisting mainly of basic bismuth nitrate, tartaric acid and potassium iodide. Minor precipitates are without significance.

Procedure:

in advance: Prepare samples as described under sample preparation

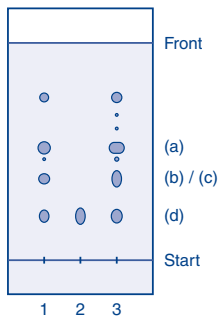
1. Use one glass capillary each and apply as follows using the spotting guide (see page 41: 2. Sample application):
starting point 1: content of glass capillary – extract
starting point 2: ½ content of glass capillary – quinine solution (C)
starting point 3: twofold content of glass capillary – extract

Note: To keep spots as small as possible, apply in several portions and dry intermediately with a hairdryer.

2. After applying dry again carefully.
3. Open the developing chamber and fill in the solvent using the measuring cylinder (see above).
4. Place the TLC sheet into the developing chamber, touching the wall of the chamber with the lower end of the TLC sheet. Close the developing chamber (see image page 42).
5. Wait for separation (approx. 10 min), then open the chamber in the fume hood, remove TLC sheet and mark the solvent front with a pencil; evaporate the solvent and place the TLC sheet once more into the developing chamber (same solvent) for 10 min.
6. Dry TLC sheet and fill the sprayer with 5 mL spray reagent (see above).
7. Briefly and evenly spray the TLC sheet, lying on a pad of filter paper, dry it and spray again briefly (very slightly).
8. Mark orange colored zones with a pencil.

Experiments with TLC micro-set F3

Chromatogram:



Legend:

(a) cinchonine, (b) quinidine, (c) cinchonidine,
(d) quinine

Remarks:

The largest spots are the main alkaloids. Quinidine and cinchonidine are not separated. The smaller spots can be assigned to the numerous secondary alkaloids. Colored (reddish brown) substances, e.g., resins remain at the starting line.

Visualization can be already made after a single development.

If a UV lamp (254 nm) is available, the separation can be evaluated without use of a spray reagent.



TLC micro-set M

Description of TLC micro-set M

This kit is prerequisite for the separations with kits F1 to F3. In addition, it serves as basic equipment for the individual study of further thin layer chromatographic experiments.

Contents of TLC micro-set M (materials kit)

2 x 50 glass capillaries 1 μ L
2 spotting guides
1 rubber cap for capillaries
1 measuring cylinder 10 mL
1 beaker 25 mL
2 developing chambers
1 glass laboratory sprayer with rubber bulb
1 plastic syringe 1 mL
20 sheets filter paper MN 713, 15 x 21 cm
50 polyester sheets each of POLYGRAM[®], 4 x 8 cm
SIL G/UV₂₅₄, Alox N/UV₂₅₄ and CEL 300

Ordering information

Designation	Pack of	REF
TLC micro-set M (materials kit)	1 kit	814100
Replacement parts for TLC micro-set M		
Developing chambers for TLC micro-sets	4	814021
Glass laboratory sprayer with rubber bulb	1	814101
Glass capillaries, 1 μ L	3 x 50	814022
Rubber caps for capillaries	2	814102
Plastic syringe with graduation, 1 mL	1	814104
Spotting guides	2	814023
Measuring cylinders (glass), 10 mL	2	814024
Filter paper MN 713, 15 x 21 cm	100	814103
TLC polyester sheets POLYGRAM [®] , 4 x 8 cm: 100 x SIL G/UV ₂₅₄ ; 50 x Alox N/UV ₂₅₄ ; 50 x CEL 300	1 set	814028

Further TLC products

As manufacturer of TLC plates and adsorbents MACHEREY-NAGEL offers a comprehensive product line for professional TLC. A small selection of important products is listed below. All other TLC products are described on the MN homepage www.mn-net.com.

● TLC polyester sheets POLYGRAM®

The same unbreakable and easy-to-handle polyester sheets as in TLC micro-sets are available in different sizes and coated with different adsorbents.

● TLC aluminum sheets ALUGRAM® Xtra

ALUGRAM® Xtra are state-of-the-art, easily cuttable aluminum sheets with silica layers, which show an outstanding wettability and are characterized by a high separation efficiency.

● TLC glass plates ADAMANT / HPTLC glass plates Nano-ADAMANT

For high demands in separation, as e.g., in pharmaceutical and food analysis, TLC glass plates ADAMANT and HPTLC glass plates Nano-ADAMANT are offered.

● TLC developing chambers and accessories

The advanced and professional user can individually select from the product range of TLC developing chambers and further accessories.



Ordering information

Designation	Pack of	REF
Further TLC products (selection)		
TLC polyester sheets POLYGRAM® SIL G/UV ₂₅₄ , 20 x 20 cm	25	805023
TLC aluminum sheets ALUGRAM® Xtra SIL G/UV ₂₅₄ , 20 x 20 cm	25	818333
TLC glass plates ADAMANT UV ₂₅₄ , 20 x 20 cm	25	821030
TLC glass plates ADAMANT UV ₂₅₄ , 5 x 10 cm	50	821010
HPTLC glass plates Nano-ADAMANT UV ₂₅₄ , 10 x 10 cm	25	821110
Simultaneous developing chamber for up to 5 TLC plates, up to 20 x 20 cm	1	814019
Simultaneous developing chamber for up to 2 TLC plates, up to 10 x 10 cm	1	814018
MN ALUGRAM® scissors, ground blade, black handle	1	818666
Chromatography paper MN 260, 7.5 cm x 17 cm (for chamber saturation)	100	814030

MN layers for TLC

Phase	Layer
Standard silica	
ADAMANT	silica 60, improved binder system, optimized particle size distribution
SIL G	silica 60, standard grade, particle size 5–17 µm
SILGUR	silica 60 with kieselguhr concentrating zone
Unmodified silica for HPTLC	
Nano-ADAMANT	nano silica 60, optimized binder system and particle size distribution
Nano-SIL	nano silica 60, standard grade, particle size 2–10 µm
Modified silica for HPTLC	
RP-18 W/UV ₂₅₄	nano silica with partial octadecyl modification, wettable with water
RP-2/UV ₂₅₄	silanized silica = dimethyl-modified silica 60
Nano-SIL CN	cyano-modified nano silica
Nano-SIL NH ₂	amino-modified nano silica
Nano-SIL DIOL	diol-modified nano silica
Aluminum oxide	
Alox N	aluminum oxide
Cellulose, unmodified and modified	
CEL 300	native fibrous cellulose MN 300
CEL 400	microcrystalline cellulose MN 400 (AVICEL®)
CEL 300 PEI	polyethyleneimine-impregnated cellulose ion exchanger
Layers for special separations	
POLYAMIDE-6	perlon = ε-polycaprolactame
CHIRALPLATE	RP silica with Cu ²⁺ ions and chiral reagent, for enantiomer separation
SIL G-25 HR	high purity silica 60 with gypsum, recommended for aflatoxin analysis
SIL G-25 Tenside	silica G with ammonium sulfate for separation of surfactants
Nano-SIL PAH	nano silica with special impregnation for PAH analysis

List of recommended textbooks for theory and practice of thin layer chromatography

- E. Hahn-Deinstrop Applied Thin-Layer Chromatography
2nd edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006
- P.E. Wall Thin-Layer Chromatography:
A Modern Practical Approach
Royal Society of Chemistry, London, UK, 2005
- J. Sherma, B. Fried Handbook of Thin-Layer Chromatography
3rd edition, CRC Press, Boca Raton, USA, 2003
- B. Fried, J. Sherma Thin-Layer Chromatography
4th edition, CRC Press, Boca Raton, USA, 1999
- B. Fried, J. Sherma Practical Thin-Layer Chromatography:
A Multidisciplinary Approach
CRC Press, Boca Raton, USA, 1996
- J. C. Touchstone Practice of Thin Layer Chromatography
Wiley-Interscience, New York, USA, 1992
- N. Grinberg Modern Thin-Layer Chromatography
Marcel Dekker, New York, USA, 1990
- F. Geiss Fundamentals of Thin Layer Chromatography /
Planar Chromatography
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, Germany, 1987
- R. E. Kaiser (Editor) Planar Chromatography, Volume 1
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, Germany, 1986
- J. G. Kirchner Thin Layer Chromatography
2nd edition, Wiley-Interscience, New York, USA, 1973
- J. C. Touchstone Quantitative Thin Layer Chromatography
Wiley-Interscience, New York, USA, 1973
- E. Stahl Thin Layer Chromatography
1st edition, Springer-Verlag, Berlin, Germany /
Academic Press, New York, USA, 1965
- G. B. Marini-Bettòlo Scientific Reports of the Istituto Superiore di Sanita:
Thin-Layer Chromatography
Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Netherlands, 1964











Safety instructions

Safety instructions














The following table shows all TLC micro-set components that may be hazardous. These are listed in the table.

In accordance with CLP regulation (Regulation on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures; EU/1278/2008) inner packings have to be labeled only with the symbol and the product identifier. Less hazardous substances / mixtures with signal word WARNING and flammable substances / mixtures up to 125 mL or 125 g have not to be labeled with H (Hazard) and P (Precautionary) statements. This easing of labeling is NOT valid for sensitizing substances. Components in solutions with a content of <1 % are not specially declared, if they do not endanger in particular.

Corresponding SDS (Safety Data Sheets) can be downloaded at www.mn-net.com/sds.

Hazardous component	GHS symbol + signal word
TLC micro-set A, REF 814000	
ammonia solution 16 % / 2-propanol 35 % / water 49 % (25 % ammonia solution – 2-propanol (5:3, v/v))	 DANGER
ethanol > 90 %	 DANGER
toluene	 DANGER
toluene 69 % / cyclohexane 31 % (toluene – cyclohexane (2:1, v/v))	 DANGER
TLC micro-set F1, REF 814200	
acetic acid 50 %	 DANGER
acetone	 DANGER
ammonia solution 25 %	 DANGER
<i>n</i> -butanol	 DANGER
ethanol > 90 %	 DANGER
hydrochloric acid 18 %	 WARNING

Safety instructions

Hazardous component	GHS symbol + signal word
TLC micro-set F2, REF 814300	
acetone	 DANGER
butan-2-one (ethyl methyl ketone)	 DANGER
cyclohexane	 DANGER
ethanol > 90 %	 DANGER
molybdato phosphoric acid < 5 % + ethanol > 90 %	 DANGER
TLC micro-set F3, REF 814400	
acetone < 40 % + iodine < 2,5 % + iron(III) chloride < 5 %	 DANGER
ammonia solution 12,5 %	 DANGER
diethylamine	 DANGER
ethanol > 90 %	 DANGER
ethyl acetate	 DANGER
iron(III) chloride < 5 %	 WARNING
2-propanol	 DANGER
toluene 66 % + diethyl ether 34 % (toluene – diethyl ether (61:39, v/v))	 DANGER

MN für Schulen / MN for schools

Wasseranalytik

Neben den TLC Mikro-Sets bietet MACHEREY-NAGEL den *VISOCOLOR*[®] School Analysenkoffer an. Dieser ist speziell für Schulen konzipiert und auf die Bedürfnisse von Schülern und Lehrern abgestimmt. Der Koffer enthält Tests zur kolorimetrischen und titrimetrischen Bestimmung der wichtigsten Wasserparameter.

Water analysis

Besides TLC micro-sets, MACHEREY-NAGEL offers the *VISOCOLOR*[®] School reagent case. It is especially designed for schools and caters to the needs of both students and teachers. The case contains colorimetric and titrimetric tests for the determination of the most important water parameters.

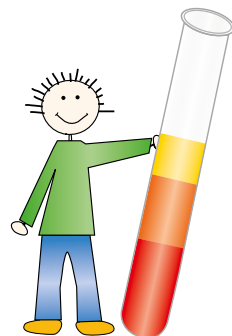


Analysenkoffer *VISOCOLOR*[®] School

- Kompaktes Minilabor
- Einfache Testdurchführungen
- Flexibel einsetzbar

VISOCOLOR[®] School reagent case

- Compact mini lab
- Easy test procedures
- Flexible applications



KATDE/EN2000089 TLC micro-sets manual de/en 0710.02/07.21.PD
Printed in Germany

www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennes Str. 11
52355 Düren · Germany

DE	Tel.: +49 24 21 969-0	info@mn-net.com
CH	Tel.: +41 62 388 55 00	sales-ch@mn-net.com
FR	Tel.: +33 388 68 22 68	sales-fr@mn-net.com
US	Tel.: +1 888 321 62 24	sales-us@mn-net.com

