

" 4 x 4 " HPTLC

door

H.F. De Brabander

Laboratorium voor Chemische Analyse der Voedingswaren van Dierlijke Oorsprong

Faculteit Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit Gent

1. Inleiding

In vergelijking met GC en LC is HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) niet zo eenvoudig te automatiseren wat monster aanbreng en integratie betreft. Nochtans biedt HPTLC voor de analyse van complexe mengsels en voor residu analyse in het bijzonder perspectieven welke andere methodes niet bieden: de (relatief) grotere monsteropbreng, de bi-of meer dimensionale ontwikkeling, de eenvoudige mogelijkheid van co-chromatografie zijn bij GC en LC niet zo eenvoudig te realiseren. HPTLC kan tevens zeer eenvoudig als een zgn. 'shelf' methode worden gebruikt. Daarmee wordt bedoeld dat op gelijk welk ogenblik de methode kan worden opgestart en dat het niet nodig is kostbare apparatuur te immobiliseren in afwachting van een "eventuele" aanbieding van een staal.

Het voornaamste negatieve punt bij HPTLC is de tijdrovende monsteraanbreng of het 'spotten' van een plaat. Bij residu analyse is het nodig 5 tot 15 μ l van ca 50-100 μ l extract op een HPTLC plaat aan te brengen [e.g. methoden voor analyse van thyreostatica (1) en anabolica (2)]. Zo bedraagt de tijdsduur van het 'spotten' van één monster ca 10-15 minuten. Bij co-chromatografie neemt het spotten dus ca 20-30 minuten per analyse in beslag.

Om deze spottijd en de kostprijs van een HPTLC analyse drastisch te drukken werd een nieuwe chromatografische aanpak en bijhorende apparatuur ontwikkeld. Deze "4 x 4" HPTLC techniek laat toe om met één plaat vier extracten te analyseren. Bovendien kan de opbreng van de standaarden met de helft worden gereduceerd. Met gebruik van het door ons gebouwde apparaat kunnen deze vier extracten in één handeling worden gespot. Deze techniek is al enige tijd in gebruik bij enkele Belgische laboratoria betrokken bij het thyreostatica en anabolica onderzoek (3)

2. Apparatuur en reagentia

2.1. HPTLC plaatjes (10 x 10 cm) (e.g. Merck nr.5547 of 5631)

2.2. Injectiespuitjes van 10 μ l

(Hamilton 701; met afgeslepen punt)

2.3. Repeating dispenser (Hamilton PB-600)

2.4. Eventueel "4 x 4" spotter (zie punt 4).

2.5. Eventueel lineaire HPTLC ontwikkelingskamer : Camag 28510

3. Werkwijze

Een HPTLC plaat van 10 x 10 cm wordt met een potlood verdeeld in 4 monsterzones en 4 standaardzones zoals weergegeven in fig. 1.

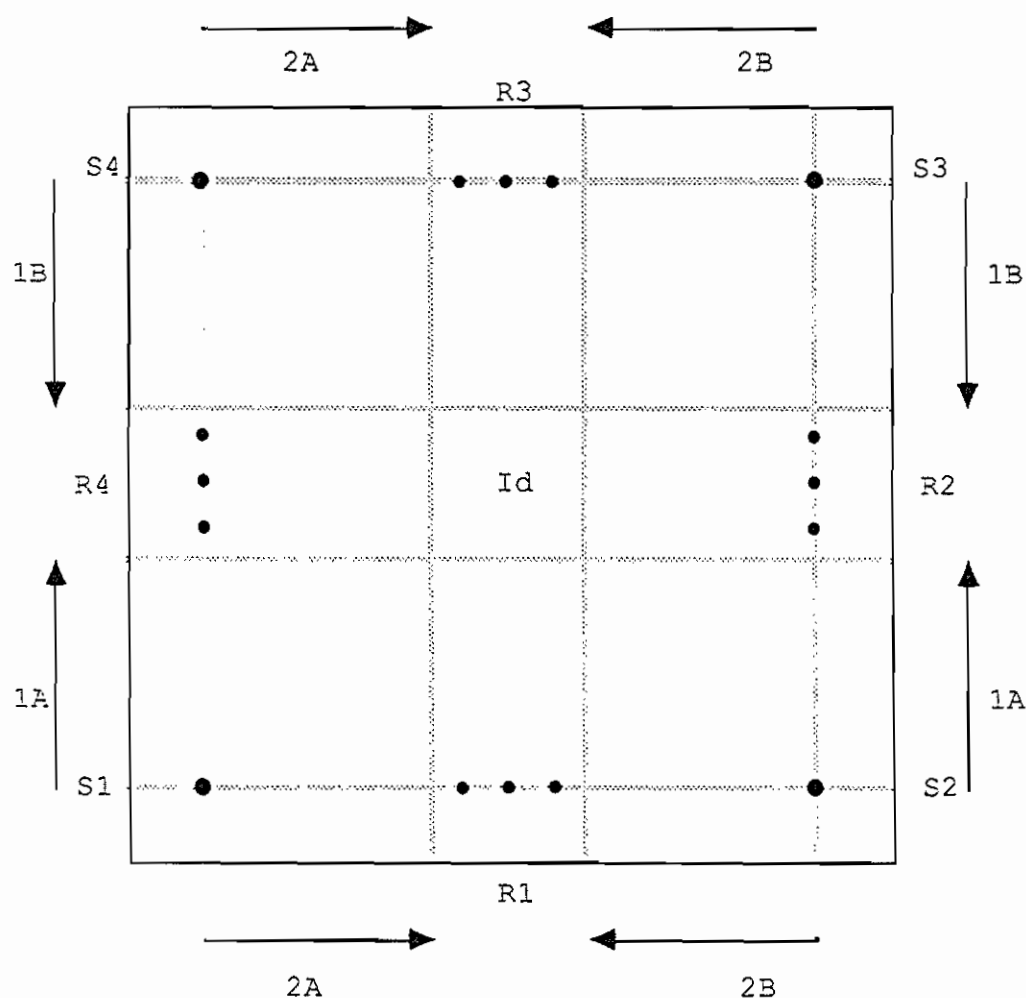


Fig. 1. Verdeling van een HPTLC plaat in 4 monsterzones en 4 standaardzones.

Op de hoeken van de plaat worden 4 monsters aangebracht (punten S1, S2, S3 en S4). De standaarden of referenties worden aangebracht op de 4 middenzones (punten R1, R2, R3 en R4). De identificatie van de monsters wordt weergegeven op de overblijvende middenzone (Id).

Daarna wordt de HPTLC plaat ontwikkeld met solvent 1 in de richting 1A. Wanneer het solventfront de zone R2- R4 bereikt wordt de plaat uit de tank genomen. Na licht drogen (met een haardroger) wordt de plaat gedraaid over 180° en ontwikkeld met solvent 1 (zelfde tank) in de richting 1B. Wanneer het solventfront de zone R2-R4 bereikt, wordt de plaat uit de tank genomen en grondig gedroogd.

Daarna wordt de plaat op analoge wijze ontwikkeld in de richting 2A en 2B met solvent 2.

De HPTLC plaat kan in 2 beurten (ipv in 4 beurten) ontwikkeld worden door gebruik te maken van een lineaire ontwikkelingskamer. Daarbij worden richtingen 1A en 1B / 2A en 2B gelijktijdig ontwikkeld. Voor de onderzochte produkten en solventia (anabolica onderzoek) gaf dit echter nog geen goede resultaten.

Daarna wordt de plaat gereleveerd door gebruik te maken van een geschikt sproei- of dipmiddel.

4. Aangepast spotapparaat

Een aangepast "4 x 4" spotapparaat werd vervaardigd in de werkplaats van de Faculteit Diergeneeskunde. De basis van het apparaat is een oude microscoop. Een foto van een prototype van het apparaat is weergegeven in fig. 2. Zowel de tafel (horizontale verplaatsing) als de grof- en fijnregeling (vertikale verplaatsing) werden optimaal benut. De microscoopkop werd vervangen door een metalen houder waarin 4 Hamilton PB-600 dispensers met 4 Hamilton 701 spuitjes kunnen geschoven worden. Deze dispensers zijn zo geplaatst dat de positie van de spotnaalden overeenkomt met de monsterpunten S1 tot S4 (fig. 1).

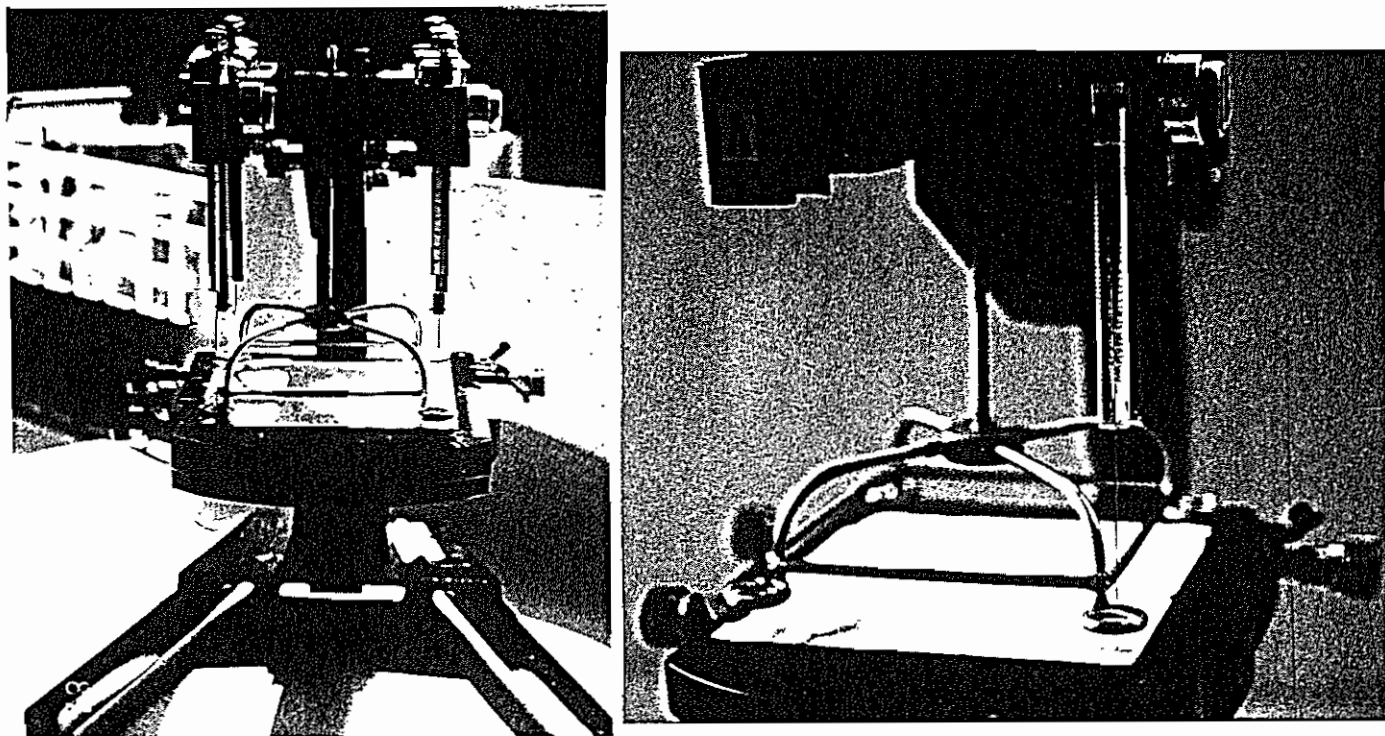


Fig. 2 : Een prototype van een "4 x 4" HPTLC spotter.

De hoogte van elke dispensers boven de HPTLC plaat kan individueel worden geregeld door middel van een schroef. Deze regeling is noodzakelijk om de verschillende naaldlengte van de hamiltonspuiten na slijpen op te vangen.

Voor het drogen van de spot werden 4 ringvormige N-jets gebruikt. Door deze apparaatjes wordt stikstof rondom de spotnaald naar de spuitplaats toe geblazen. Deze 4 jets worden tov elkaar in positie gehouden door een onderlinge verbinding. De naald van de Hamilton spuit wordt gecentreerd op de monsterspotplaatsen via een vizier. Deze vizieren werden gemonteerd op de 4 N-jets (zie fig. 2).

Door middel van dit apparaat kunnen 4 monsters simultaan worden aangebracht op een HPTLC plaat in ca 10 minuten.

5. Resultaten en bespreking

Bij het gebruik van HPTLC platen bedraagt de optimale loopafstand van het solvent ca 3-4 cm. Het is daarom in vele laboratoria gebruikelijk om een 10 x 10 cm plaat in vier te verdelen. Deze 5 x 5 plaatjes kunnen dan in serie in speciale rekjes worden ontwikkeld (4). Voor het analyseren van één enkel monster wordt ook in ons laboratorium een 5 x 5 cm plaat gebruikt. Bij de analyse van grotere reeksen (3 of meer) is het veel handiger de "4 x 4" techniek te gebruiken. Snijwerk geeft immers steeds kans op breuk (voor de analyse van 2 monsters kan eventueel een 5 x 10 cm plaatje worden gebruikt).

Door 5 x 5 cm plaatjes of de "4 x 4" techniek toe te passen wordt het oppervlak van een HPTLC plaat meer economisch benut. Door gebruik te maken van de "4 x 4" techniek wordt daarenboven tijd gespaard bij het spotten van standaarden. Bij "4 x 4" heeft men immers maar 1 standaardreeks nodig per monster ipv 2 bij de klassieke bi-dimensionele techniek. "4 x 4" HPTLC heeft ook voordelen bij co-chromatografie. Het chromatogram en het co-chromatogram verlopen immers in meer identieke omstandigheden. Nadeel is dan weer dat links en rechts (e.g. S1 en S2) spiegelbeelden worden verkregen.

Optimale benutting van "4 x 4" HPTLC wordt echter alleen verkregen wanneer de 4 monsters simultaan kunnen worden aangebracht. Dit kan door gebruik te maken van een aangepast spotapparaat zoals beschreven onder 4. Door het simultaan aanbrengen van 4 monsterzones, wordt de spot-tijd teruggebracht van ca 10 - 15 minuten tot ca 2,5 - 3 minuten per monster. Deze optie is in geen enkel ons bekend spotapparaat voorhanden.

Het prototype van de "4 x 4" spotter vertoonde echter nog enkele nadelen. Deze nadelen worden hoofdzakelijk veroorzaakt door de niet - reproduceerbare montage van de spuit in de repeating dispenser. Een verbeterd, meer geautomatiseerd model van de "4 x 4" spotter is momenteel in ontwikkeling.

6. Besluit

Door gebruik te maken van de hierboven beschreven "4 x 4" techniek kan de tijdsduur van een HPTLC analyse gevoelig worden ingekort. Naast deze besparing in tijd wordt bovendien een besparing in kostprijs van HPTLC plaatjes verwezenlijkt. Met "4 x 4" techniek kan HPTLC op gebied van snelheid en kostprijs beter concurreren met de andere chromatografische technieken.

7. Referenties

- (1) H.F. De Brabander en R.Verbeke
J. Chromatogr. 108 (1975) 141-151.
- (2) R. Verbeke, J. Chromatogr. 177 (1979) 69 - 84.
- (3) G. Pottie, persoonlijke mededeling
- (4) R. Stephany , persoonlijke mededeling

DANKWOORD

De auteur wenst een speciaal woord van dank en waardering te richten tot G. RASSCHAERT (centrale werkplaats Faculteit Diergeneeskunde), welke de praktische uitvoering van de "4 x 4" spotter verzorgde.