

199. Neue Hilfsmittel für die Papierchromatographie

von E. von Arx und R. Neher.

(8. VIII. 56.)

Mit der ständig steigenden Anwendung der Papierchromatographie stellt sich häufig das Problem, wie eine grosse Anzahl von analytischen und präparativen Chromatogrammen rationell bewältigt werden kann. Zu diesem Zweck haben wir im Laufe der letzten Jahre verschiedene einfache Hilfsmittel entwickelt, die sich besonders für die präparative Papierchromatographie als sehr nützlich erwiesen haben und die im folgenden kurz beschrieben werden.

1. Chromatographie.

Für die bevorzugt angewandte absteigende Chromatographie benützen wir neben den konventionellen Trögen sogenannte Schlitz-Tröge aus rostfreiem Blech (Fig. 1), die eine wesentlich bessere Ausnützung der Chromatographiegefässe gestatten.

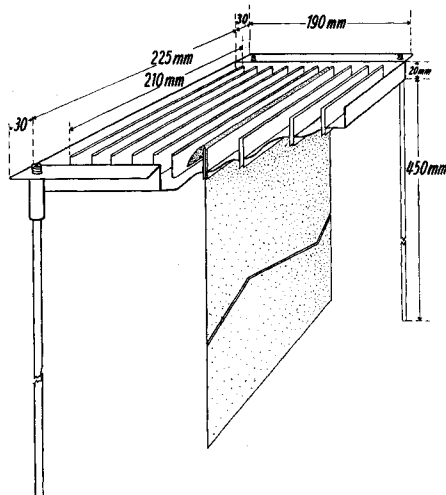


Fig. 1.

Schlitztrug, aufgeschnitten.

In das, den Trog bildende, zugeschnittene Blech von 1,0 mm Dicke werden Schlitzte von 3,5 mm gefräst; dann wird das Blech zum Trog gefaltet und an den 4 Ecken hartgelötet. Separat werden 30 mm breite und 0,6 mm dicke Blechstreifen über ein den Schlitzten entsprechendes Flacheisen geformt und ebenfalls hartgelötet. Schliesslich werden sie bündig mit dem Trogrand in die ausgefrästen Schlitzte auf der ganzen Länge von der Unterseite her dicht eingelötet (Weichlot). Die innere Spaltbreite beträgt entsprechend ca. 2,3 mm. Die an den Ecken der Tröge befindlichen, mit Gewinden ver-

sehenen Muffen nehmen die im oberen Teil als Schrauben ausgebildeten Trogstützen auf. Dadurch kann gleichzeitig der Trog im Gefäss horizontalisiert werden.

Die Dimensionen richten sich vorteilhaft nach den standardisierten Blättern oder Streifen, wie sie sich am rationellsten aus den Originalbögen, z. B. von *Whatman*, stanzen lassen [Dimensionen der ausgestanzten Papiere, vgl. z. B.¹⁾]. Jede Lamelle kann so z. B. einen 19 cm breiten Bogen oder bis zu 10 1,5 cm breite, am Kopf zusammenhängende Streifen [nach *Zaffaroni*²⁾] aufnehmen, die 23 mm vom oberen Rand mit Hilfe einer Schablone nach Auftragen der Substanz gefalzt werden. Der umgebogene Rand soll ungefähr die in Abb. 1 gezeigte Stellung einnehmen und keinesfalls der äusseren Spaltwand anliegen, da dadurch das Lösungsmittel zu schnell angesaugt würde.

Diese Tröge eignen sich sowohl für die üblichen wässrigen Lösungsmittelsysteme als auch für diejenigen von *Zaffaroni*²⁾3), *Bush*⁴⁾ oder *Eberlein & Bongiovanni*⁵⁾. Eine Füllung von 350 ml mobiler Phase reicht für die mehrstündige Chromatographie von 10 Blättern; bei mehr als 12stündiger Entwicklung verwendet man am besten eine Nachfüllvorrichtung.

Für die sehr ausgiebig benützte, absteigende präparative Papierchromatographie, besonders von Steroidgemischen, wobei in erster Linie *Zaffaroni*-Systeme zur Verwendung gelangen, haben wir eine Vorrichtung entwickelt, die wir im Unterschied zu den für andere Zwecke geeigneten Anordnungen wie Chromatopile⁶⁾, Chromatopack⁷⁾, Isolierpack⁸⁾, Papierrolle⁹⁾ oder Rundfilter-Papierpack¹⁰⁾, Chromatoblock nennen wollen (Fig. 2). Mit seiner Hilfe können z. B. 0,05–2,0 g Steroid-Gemische oder -Extrakte an 50–500 Blättern besser und schneller aufgetrennt werden als mit der Säulenchromatographie.

Am oberen Ende rund ausgeschnittene oder gestanzte Papierblätter P (*Whatman* Nr. 1) werden durch eine 20-proz. acetonische Lösung des Imprägniermittels (Propylen-glykol oder Formamid) gezogen und 5–10 Min. im Abzug hängen gelassen. Dann trägt man auf jedem einzelnen Blatt das zu trennende Gemisch mit einer Mikropipette (s. unten) gleichmässig über die Startlinie auf (0,1 ml Lösung pro 17 cm Startlinie), stapelt 50–125 Blätter genau auf den Rückenteil 1 der Klemmvorrichtung aus rostfreiem Stahl und presst schliesslich mit den Flügelmuttern den Vorderteil 2 ohne Schlüssel so fest als möglich an, ohne dass sich die durch aufgeschweisste Rippen verstärkten Platten verziehen. Die Bereitung eines solchen Chromatoblocks von 100 Blatt wird von einer geübten Dreier-Equipe in 40–50 Minuten bewältigt. Das oben dicht zusammengepresste und unten relativ lose

¹⁾ R. Neher & A. Wettstein, *J. Clin. Investig.* **35**, 800 (1956).

²⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, *Science* **111**, 6 (1950).

³⁾ A. Zaffaroni, *Recent Progr. in Hormone Res.* **8**, 51 (1953).

⁴⁾ I. E. Bush, *Biochem. J.* **50**, 370 (1952).

⁵⁾ W. R. Eberlein & A. M. Bongiovanni, *Arch. Biochemistry* **59**, 90 (1955).

⁶⁾ H. K. Mitchell & F. A. Haskins, *Science* **110**, 278 (1949).

⁷⁾ W. L. Porter, *Anal. Chemistry* **23**, 412 (1951).

⁸⁾ A. Fischer & M. Behrens, *Z. physiol. Chem.* **291**, 14 (1952).

⁹⁾ L. Hagdahl & C. E. Danielson, *Nature* **174**, 1062 (1954).

¹⁰⁾ H. Brockmann & P. Patt, *Naturwiss.* **40**, 221 (1953).

Papierbündel wird auf einem geeigneten Gestell in das, wie üblich mit mobiler Phase gesättigte Chromatographiegefäß gehängt. Man verschliesst dieses gasdicht mit einer Glasplatte, durch welche ein Tropftrichter in die als Trog dienenden Papierausschnitte führt, beginnt mit dem Einfüllen der mobilen Phase und reguliert dann den Zufluss auf ein bestimmtes Niveau ein. Es soll nicht zu hoch steigen, damit das Lösungsmittel nicht seitlich über den Papierrand absteigen kann; sicherheitshalber ist in die vordere Pressplatte 2 ein Überlaufrohr 3 angebracht. Mit dieser Anordnung entwickeln sich völlig horizontale Banden, während z. B. rechteckige Papierausschnitte konvexe Banden verursachen. Für einen gleichmässigen Lauf ist aber vor allem die Oberfläche der Papiere von Bedeutung.

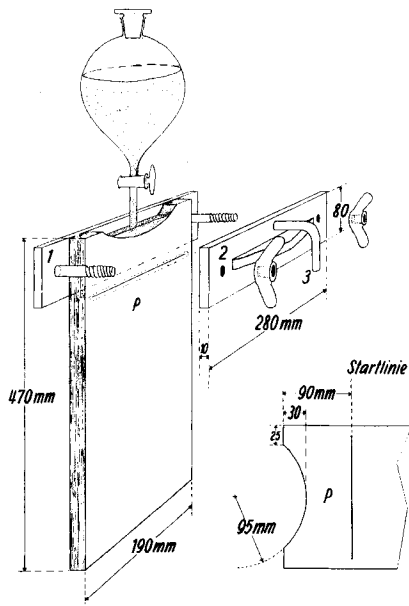


Fig. 2.

Chromatoblock für präparative Papierchromatographie; P = Papierblätter, 1 und 2 Klemmvorrichtung, 3 Überlaufrohr.

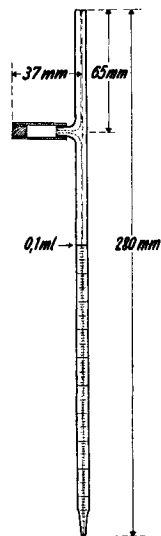


Fig. 3.

Mikropipette mit Füllvorrichtung.

Es ist unbedingt darauf zu achten, dass jeweils eine glatte Seite einer rauhen gegenüberliegt, wie es im Originalpaket der Fall ist. Liegen 2 Blätter mit ihren glatten Oberflächen gegeneinander, so werden die Chromatogramme dieser beiden Blätter völlig verwaschen. Auch die bei der präparativen Chromatographie sonst übliche Vorwaschung der Blätter mit feuchtem Methanol und Chloroform in Soxhlet-Apparaten verändert die Papieroberfläche so stark, dass im Chromatoblock nur ungewaschene Papiere verwendet werden können. Die mobile Phase lässt man vorteilhaft nur bis zum unteren Papierrand absteigen. Bei längerdauernden Durchlauf-Chromatogrammen können Verwaschungen auftreten. Nach beendetem Lauf nimmt man den Block auseinander und lässt die Blätter einzeln auf speziellen Hängevorrichtungen im Abzug in der Dunkelheit 12—24 Std. trocknen.

Für das Auftragen der Lösung auf die Startlinie vieler Blätter (Breite 19 cm) verwenden wir Mikropipetten mit 0,1 ml Fassungsvermögen (Fig. 3), die einen seitlichen Ansatz mit einem kurzen verschlossenen Gummistutzen besitzen. Man verschliesst das obere Pipettenende mit dem Finger und saugt mit dem Ansatz die Lösung

in die Pipette, lässt den Überschuss wieder abtropfen und fährt nun mit dem abgeschliffenen Pipettenspitz gleichmässig über die 17 cm lange Startlinie hin und her, bis der Pipetteninhalt (0,1 ml) ausgelaufen ist.

2. Auswertung der Chromatogramme.

Normalerweise werden alle Chromatogramme vor der allfälligen Behandlung mit Indikatoren auf die Anwesenheit UV.-absorbierender Stoffe untersucht. Bei den analytischen Chromatogrammen (Streifen) geschieht dies durch Photokopie mit kurzwelligem Licht (253,7 m μ , vgl. ¹⁾¹¹⁾¹²⁾), bei den präparativen (Blätter) häufig durch Auswertung mit dem Fluoreszenzschirm ¹¹⁾. Die in Fig. 4 wiedergegebene Vorrichtung gestattet es, eine grosse Anzahl von Blättern in kurzer Zeit zu prüfen und gleichzeitig die UV.-absorbierenden Zonen direkt auf dem Chromatogramm anzuzeichnen; sie erscheinen als vertikale, dunkelblaue Banden auf hellgrünem bis hellblauem Grund.

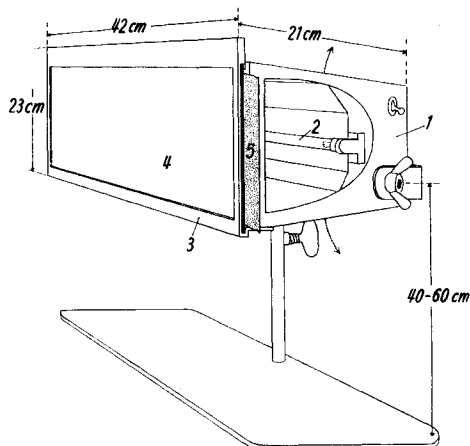


Fig. 4.

Fluoreszenzschirm zur Auswertung von Papierchromatogrammen; 1 Lampengehäuse, 2 Leuchtrohr, 3 Rahmen mit 4 Fluoreszenzschirm, 5 Chromatogramm.

Am unteren Rand eines nach allen Seiten schwenkbaren Gehäuses 1 mit der Lichtquelle 2 (keimtötende Fluoreszenzlampe z. B. von *General Electric* oder *Philips*, Hauptstrahlung bei 253,7 m μ) ist der Rahmen 3 mit einem auswechselbaren Fluoreszenzschirm 4 so angebracht, dass das Blatt-Chromatogramm 5 zwischen Schirm und Lampengehäuse leicht von oben eingeführt und seitlich beliebig verschoben werden kann. An der rechten Seite des Gehäuses 1 befindet sich eine Aussparung, durch welche man mit einem Bleistift die UV.-absorbierenden Zonen von hinten direkt auf dem Chromatogramm 5 anzeichnet.

Ist die Anwendung zusätzlicher Indikatoren erwünscht oder sind keine UV.-absorbierenden Banden feststellbar, schneidet man gewöhnlich dünne Streifen aus dem Blatt-Chromatogramm und be-

¹¹⁾ W. J. Haines & N. A. Drake, Fed. Proc. **9**, 180 (1950).

¹²⁾ R. Marckham & J. D. Smith, Biochem. J. **45**, 294 (1949).

handelt sie mit geeigneten Indikatoren, wie z. B. alkalische Blautetrazoliumlösung. Um die gewünschten Banden über die ganze Breite der Blätter genau festlegen zu können, müssen bei sehr sorgfältiger Auswertung oft 2–3 Streifen pro Blatt ausgeschnitten und behandelt werden, was schon bei 50 Blatt eine beträchtliche Arbeit erfordert. Sie kann wesentlich vereinfacht werden, wenn man die Indikatorlösung, in einen handelsüblichen Tuschefüllhalter gefüllt, mit 1,0–1,6 mm breiten Linierfedern (z. B. Pelikan Graphos) strichförmig auf das Chromatogramm aufträgt. Beim Ausschneiden der dadurch festgelegten Zonen werden dann auch die mit Indikator benetzten Streifen entfernt.

Bei der Applikation von Indikatoren verwenden wir aus Gründen der Einfachheit und Hygiene wenn immer möglich Lösungen, durch welche die Chromatogramme rasch durchgezogen werden. Wenn jedoch das Aufsprühen eines Indikators zur Erzielung guter Flecken erforderlich ist, benützen wir eine in Fig. 5 dargestellte Spritzkabine.

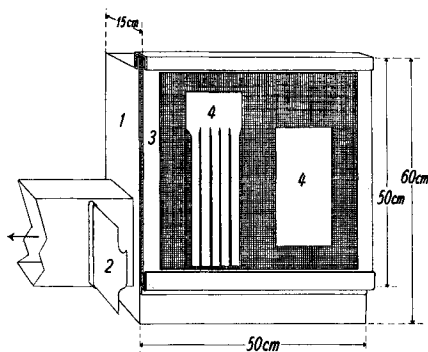


Fig. 5.

Spritzkabine; 1 Blechkasten, 2 Schieber, 3 Rahmen mit Drahtnetz, 4 Chromatogramme.

Sie besteht aus einem einfachen, an einem guten Abzug angeschlossenen Blechkasten 1 mit einem Schieber 2 zur Regulierung des Soges. An der Vorderseite befindet sich ein gerahmtes, auswechselbares und rostfreies Drahtnetz 3 (Maschenweite 2 mm), auf dem die Chromatogramme 4 durch den Sog haften und durch das der überschüssige Indikatornebel abgesaugt wird. Um die Beurteilung des Benetzungsgrades oder der auf den Chromatogrammen erscheinenden Flecken zu erleichtern, ist die Rückwand der Kabine mit einer weissen, nötigenfalls von hinten beleuchtbaren Glasplatte versehen.

Zur Auswertung von Chromatogrammen von Nebennierensteroiden verwenden wir routinemässig UV.-Photokopie (253,7 m μ), alkalische Blautetrazoliumlösung (Reduktionsvermögen und Natronlauge-Fluoreszenz) und Phosphorsäure¹³). Mit letzterer erhält man hauptsächlich im UV.-Licht (360 m μ -Region) starke Fluoreszenzfarben. Ergänzend sei bemerkt, dass sowohl ihre Intensität als auch

¹³) R. Neher & A. Wettstein, Helv. 34, 2278 (1951).

ihre Qualität etwas von den bei der Chromatographie benutzten Lösungsmittelsystemen abhängt, auch wenn die Chromatogramme vorher gut getrocknet wurden; besonders bei Formamid-haltigen Systemen ist auf eine sorgfältige Trocknung zu achten. Qualitativ gleichwertige Farbreaktionen wie mit 20-proz. Phosphorsäure erhält man auch mit 20-proz. p-Toluolsulfonsäure in Äthanol und nachfolgender 2-minütiger Trocknung bei 90°; dagegen ist die relative Empfindlichkeit für einzelne Steroide deutlich verschieden. So ist z. B. die UV.-Fluoreszenz von Hydrocortison mit Phosphorsäure stärker als mit p-Toluolsulfonsäure, während bei 11-Dehydro-corticosteron das Gegenteil der Fall ist.

Alle aus den analytischen Chromatogrammen physikalisch, chemisch oder biologisch verwertbaren Ergebnisse wie Rf-Werte, Fleckengröße, UV.-Absorption, Farbreaktionen oder biologische Aktivität werden auf vorgedruckten Formularen registriert, um einen dauerhaften Beleg herzustellen. Um dies rasch und genau zu bewerkstelligen, verwenden wir seit Jahren ein sehr nützliches Gerät, das nach dem Prinzip eines Pantographen gehandhabt wird (Fig. 6–8).

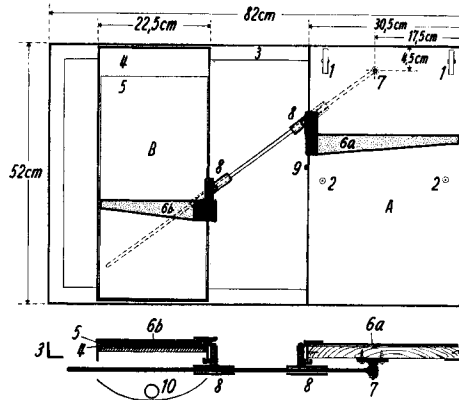


Fig. 6.

Pantograph zur Auswertung von Papierchromatogrammen; A unbeweglicher Teil, B beweglicher Teil, 1 Klammern, 2 Nägel, 3 Metallrahmen, 4 Mattscheibe, 5 Plexiglasdeckel, 6a und b Plexiglaszeiger, 7 Drehpunkt und 8 Führungen der Verbindungsstange, 9 Anschlag, 10 Lampe.

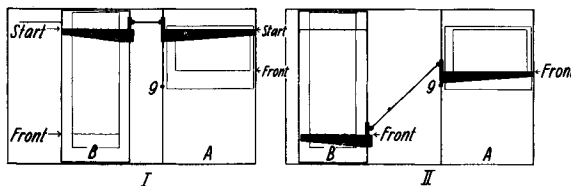


Fig. 7.

Stellungen des Pantographen; I auf Startlinie, II auf Lösungsmittelfront.

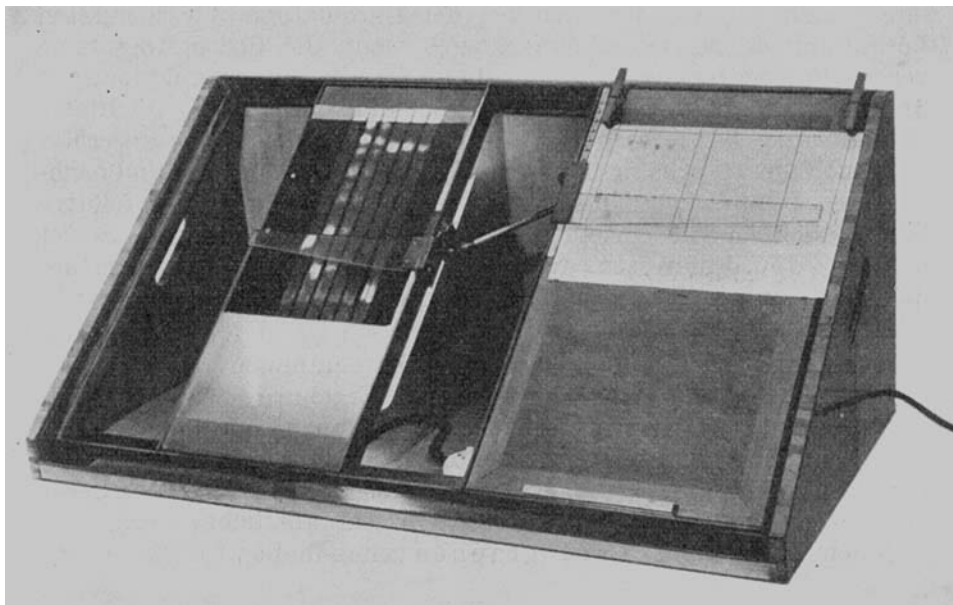


Fig. 8.

Auswertung eines Chromatogramms mit dem Pantographen.

Auf dem rechten, unbeweglichen Teil A (Fig. 6) fixiert man das Formular (Format A 4) mit den Klammern 1 und den Nägeln 2; auf dem linken, im Metallrahmen 3 beweglichen Teil B (von hinten durch Lampe 10 beleuchtet) legt man zwischen Mattscheibe 4 und Plexiglasdeckel 5 die UV.-Photokopie eines Chromatogrammes oder das mit Indikator behandelte Chromatogramm selbst, wobei die Startlinie mit dem oberen Rand des Deckels 5 übereinstimmen muss. Wenn somit die Plexiglaszeiger 6a und 6b, die durch eine im Drehpunkt 7 und in den Führungen 8 bewegliche Stange miteinander verbunden sind, in Stellung I (Fig. 7) gebracht werden, müssen beide auf die Startlinie sowohl des Chromatogramms oder seiner Photokopie (auf B) als auch des Formulars (auf A) weisen. Dann zieht man die Zeiger bis zum Anschlag 9 herunter, wobei Zeiger 6a auf die Frontlinie des Formulars zu stehen kommt (Stellung II, Fig. 7). Teil B wird nun seitlich verschoben, bis sich auch der Zeiger 6b mit der Frontlinie auf dem Chromatogramm deckt. Liess man das Lösungsmittel bei der Chromatographie über den unteren Papierrand abtropfen, wird der Zeiger 6b auf letzteren eingestellt. Nun hat man nur noch die Flecken auf dem Chromatogramm oder dessen Photokopie mit Hilfe der Zeiger 6a und b auf das Formular zu übertragen. Dabei werden die UV.-absorbierenden Flecken gewöhnlich als rote Striche eingezeichnet, die Farbreaktionen rechts und links davon mit Farbstiften markiert.

Herrn Dr. A. Wettstein danken wir bestens für die Förderung dieser Arbeit.

Zusammenfassung.

Es werden einige neue Hilfsmittel für die rationelle Durchführung und Auswertung von analytischen und insbesondere präparativen Papierchromatogrammen beschrieben.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.