

176. Ein Beitrag zur Theorie der Papier- und Dünnschicht-chromatographie

von M. Brenner und G. Pataki

(16. VI. 61)

Die Grundprinzipien der Chromatographie wurden von WILSON¹⁾, MARTIN & SYNGE²⁾, DE WAULT³⁾ und SMIT⁴⁾ formuliert. CONSDEN *et al.*⁵⁾ leiteten aus solchen Überlegungen die folgende bekannte Beziehung zwischen Rf-Wert und Verteilungskoeffizient ab:

$$\alpha = \frac{q_m}{q_s} \cdot \left(\frac{1}{Rf} - 1 \right). \quad (1)$$

Hierin ist

$$q_m = V_m/V \quad (1a); \quad q_s = V_s/V \quad (1b)$$

V_m : Volumen der mobilen Phase,

$V = V_m + V_s$: Gesamtvolumen,

V_s : Volumen der stationären Phase,

α : Verteilungskoeffizient.

Ähnlicher Verteilungskoeffizient und ähnliches chromatographisches Verhalten chemisch ähnlicher Stoffe liess rein empirisch vermuten, dass zwischen Rf-Wert und Struktur ein Zusammenhang bestehe. OPIENSKA-BLAUTH *et al.*⁶⁾ versuchten in diesem Sinne, den Rf-Wert additiv aus Beiträgen der einzelnen Gruppen zusammensetzen, wobei z. B. die Verlängerung der Kohlenstoffkette um ein C-Atom den Rf-Wert um 0,10 erhöhen, die Einführung einer OH-Gruppe um 0,22 vermindern sollte. Da aber Rf für das Intervall: $1 \geq Rf \geq 0$ definiert ist, führt diese Betrachtungsweise *ad absurdum*. Wenn überhaupt eine Additivität besteht, dann kann sie nicht direkt für den Rf-Wert, sondern nur für eine abgeleitete Funktion desselben existieren. Eine solche Beziehung hat MARTIN⁷⁾ aufgestellt:

$$2,3 RT \log \frac{q_m}{q_s} \left(\frac{1}{Rf} - 1 \right) = \Delta F_0 + m \Delta F_x + n \Delta F_y + \dots \quad (2)$$

R : Gaskonstante; T : abs. Temp.;

ΔF_0 : Freie Energie, die unter Standardbedingungen zur Überführung von 1 Mol einer bestimmten Substanz S_0 aus der stationären in die mobile Phase erforderlich ist;

ΔF_x bzw. ΔF_y : Änderung der Freien Überführungsenergie ΔF_0 infolge der Einführung des Substituenten x bzw. y in S_0 ;

m bzw. n : Anzahl der Substituenten x bzw. y , die bei der Substitution von S_0 eingeführt werden.

¹⁾ J. N. WILSON, J. Amer. chem. Soc. **62**, 1583 (1940).

²⁾ A. J. P. MARTIN & R. L. M. SYNGE, Biochem. J. **35**, 1358 (1941).

³⁾ D. DE WAULT, J. Amer. chem. Soc. **65**, 532 (1943).

⁴⁾ W. M. SMIT, Discuss. Faraday Soc. **7**, 38 (1949).

⁵⁾ R. CONSDEN, A. H. GORDAS & A. J. P. MARTIN, Biochem. J. **38**, 224 (1944).

⁶⁾ J. OPIENSKA-BLAUTH, O. SAKLAWSKA-SZYMONOVA & M. KAŃSKI, Nature **168**, 511 (1951).

⁷⁾ A. J. P. MARTIN, Biochem. Soc. Symp. **3**, 4 (1948).

Aus (2) erhält man:

$$\log \left(\frac{1}{Rf} - 1 \right) = G_0 + m G_x + n G_y + \dots + G, \quad \left. \begin{array}{l} G_0 = \Delta F_{0/2,3} RT: \text{Konstante der Grundgruppe } S_0^8), \\ G_\mu = \Delta F_{\mu/2,3} RT: \text{Konstante der Gruppe } \mu (\mu = x, y \dots)^8), \\ G = \log (q_s/q_m): \text{Grundkonstante}^9). \end{array} \right\} \quad (3)$$

BATE-SMITH & WESTALL¹⁰⁾ führten folgende Bezeichnung ein¹¹⁾:

$$\log \left(\frac{1}{Rf} - 1 \right) = Rm. \quad (4)$$

Nach (3) und (4) ist somit:

$$Rm = G_0 + m G_x + n G_y + \dots + G. \quad (5)$$

Der Rm-Wert ist also nach (5) eine lineare Funktion der Anzahl gleicher Gruppen bei konstanter Anzahl der übrigen Gruppen. Der Beitrag einer bestimmten Gruppe zum Rm-Wert einer gegebenen Substanz wäre danach unabhängig vom Molekelrest und von der Stellung der Gruppe in der Molekel. Dies kann natürlich nur näherungsweise richtig sein. Trotzdem konnte die nach (5) geforderte Additivität experimentell oft bestätigt werden^{10) 13) 14) 15)}. Bei systematischer Auswertung von (5) lassen sich empirische Konstanten ermitteln, deren Kenntnis die Berechnung vom Rm- bzw. Rf-Werten ermöglicht. REICHL¹²⁾, PARDEE¹³⁾ und MOORE & BAKER¹⁶⁾ fanden zwischen berechneten und gefundenen Rf-Werten sehr gute Übereinstimmung. SCHAUER & BULIRSCH^{17) 18)} schliesslich bestimmten aus der Umkehrfunktion der Gleichung (5) unter einigen praktischen Vorbehalten die Art und die Anzahl funktioneller Gruppen in unbekanntem Verbindungen mit bekannten Rf-Werten. – Bei aromatischen Verbindungen besteht die Additivität nur für Substituenten im Kern; die Abweichungen bei Kettensubstitution konnten für den Fall polarer stationärer Phasen von FRANC & JOKL¹⁹⁾ empirisch durch Einführung von Dipolmomenten in die MARTIN'sche Rela-

⁸⁾ Ist z. B. S_0 = Benzol und $x = Cl$, die substituierte Verbindung demnach Chlorbenzol, so ist die Grundgruppe S_0 = Benzol bzw. Phenyl. Benzol und Phenyl werden nicht voneinander unterschieden.

⁹⁾ In der Praxis ist die Grundkonstante vom Fließmittel und vom Papier oder von der Schicht abhängig. Man braucht deshalb in der Papierchromatographie auch den Ausdruck Papierkonstante; für die Dünnschichtchromatographie schlagen wir Schichtkonstante vor.

¹⁰⁾ E. C. BATE-SMITH & R. G. WESTALL, *Biochem. biophys. Acta* **4**, 427 (1950).

¹¹⁾ REICHL¹²⁾ führte die Bezeichnung: $-\log (1/Rf - 1) = Rm$ ein.

¹²⁾ E. R. REICHL, *Mh. Chem.* **86**, 69 (1955).

¹³⁾ A. B. PARDEE, *J. biol. Chemistry* **190**, 757 (1951).

¹⁴⁾ J. GASPARIČ & M. VEČEŘA, *Coll. czech. chem. Comm.* **22**, 1426 (1957).

¹⁵⁾ J. BORECKÝ, J. GASPARIČ & M. VEČEŘA, *Coll. czech. chem. Comm.* **24**, 1822 (1959); D. G. ROUX & S. R. EVELYN, *J. Chromatography* **1**, 537 (1958).

¹⁶⁾ T. B. MOORE & C. G. BAKER, *J. Chromatography* **1**, 513 (1958).

¹⁷⁾ H. K. SCHAUER & R. BULIRSCH, *Z. Naturforsch.* **10b**, 683 (1955); *Naturwiss.* **43**, 34 (1956).

¹⁸⁾ H. K. SCHAUER & R. BULIRSCH, *Z. Naturforsch.* **13b**, 327 (1958).

¹⁹⁾ J. FRANC & J. JOKL, *Coll. czech. chem. Comm.* **27**, 1161 (1956).

tion beseitigt werden. Die gleichen Autoren^{20) 21)} beobachteten ferner und bestätigten an Hand vieler Rf-Wert-Tabellen der Literatur, dass der Beitrag einer Gruppe zum Rm-Wert von der Molekelgröße abhängig ist, und dass dabei in vielen Fällen eine logarithmische Beziehung besteht²⁰⁾. Auch diese Beziehung ist vorderhand nicht theoretisch begründet.

In der Ableitung der MARTIN'schen Relation wird nicht berücksichtigt, dass organische Verbindungen häufig assoziiert sind. Nimmt man an, dass ein Monomeres A in der stationären Phase als A_σ , in der mobilen Phase als A_λ vorliegt, wobei σ und λ den Grad der Assoziation ausdrücken, dann existiert nach SCHAUER & BULIRSCH¹⁸⁾ für den Verteilungskoeffizienten α die Beziehung:

$$\alpha = c^{1/\sigma - 1/\lambda} \cdot \frac{q_m^{1/\lambda}}{q_s^{1/\sigma}} \cdot \frac{(1 - Rf)^{1/\sigma}}{Rf^{1/\lambda}}, \quad (6)$$

c : analytische Konzentration im Fleck.

Danach ist der Verteilungskoeffizient abhängig:

a) von der Konzentration der Substanz im Fleck, wenn $\sigma \neq \lambda$,

b) vom reduzierten Phasenverhältnis ($q_m^{1/\lambda}/q_s^{1/\sigma}$), d. h. vom Phasenverhältnis und vom Grad der Assoziation.

Wird nun:

$$\log [(1 - Rf)^{1/\sigma}/Rf^{1/\lambda}] = Ra^{22)} \quad (7)$$

gesetzt²³⁾, so kann man analog zu (5) schreiben:

$$Ra = G'_0 + m G'_x + n G'_y + \dots + G'. \quad (8)$$

Im Fall einer Assoziation ist also der Ra-Wert und nicht der Rm-Wert eine lineare Funktion der Anzahl gleicher Gruppen bei konstanter Anzahl der übrigen Gruppen.

Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen Papier- und Dünnschichtchromatographie in bezug auf die MARTIN'sche Relation existiert natürlich nicht. Diese enthält keine Aussage über die Art der Verteilung und ist deshalb ohne weiteres auf die Dünnschichtchromatographie übertragbar. Auch in der Gas- und Ionenaustausch-Chromatographie sollte sie gelten. In der Dünnschichtchromatographie ist ihre Anwendung besonders zu empfehlen, weil diese Technik einfach ist, die Substanzen hierbei wenig diffundieren und deshalb die Rf-Werte besonders gut definiert sind²⁴⁾. Wir werden in einer folgenden Arbeit zeigen, dass das dünnschichtchromatographische Verhalten der α -Aminosäuren in sämtlichen untersuchten Fließmitteln durch Rm- oder Ra-Werte befriedigend ausgedrückt werden kann. Die Kenntnis der zugehörigen Konstanten gestattet damit die Vorausberechnung von Rf-Werten oder, bei bekannten Rf-Werten, die Klärung konstitutiver Fragen.

²⁰⁾ J. FRANC & J. JOKL, *J. Chromatography* 2, 423 (1959).

²¹⁾ Vgl. auch J. FRANC *et al.*, *Coll. Czech. chem. Comm.* 24, 2102 (1959); 26, 1313 (1961).

²²⁾ Ra bedeutet Rm-Wert bei Assoziation.

²³⁾ SCHAUER & BULIRSCH¹⁸⁾ führten die Bezeichnung: $\log [Rf^{1/\lambda}/(1 - Rf)^{1/\sigma}] = R_N$ ein. Wir nahmen eine Vorzeichenänderung vor, um mit BATE-SMITH & WESTALL¹⁹⁾ in Übereinstimmung zu bleiben. Folglich ist: $Ra = -R_N$.

²⁴⁾ Siehe z. B. M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 16, 378 (1960); M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, *ibid.* 17, 145 (1961).

Auf eine wichtige Frage der analytischen Chemie, jene der Isomerentrennung, gibt die MARTIN'sche Beziehung in ihrer ursprünglichen Form keine Antwort. Die D- und die L-Form eines Antipodenpaares besitzen die gleichen Bauelemente; dies ist auch der Fall bei *cis*- und *trans*-Isomeren, bei epimeren Verbindungen und bei Stellungsisomeren, z. B. isomeren Peptiden. Es ist wohlbekannt, dass solche Isomere in geeigneten Fließmitteln trennbar sind, obschon die rechte Seite der Beziehung (5) bzw. (8) bei gleichen Bauelementen keine Unterschiede aufweist. Als Beispiel dafür seien genannt:

1. 2,5-Dihydroxy-D-phenylalanin und 2,5-Dihydroxy-L-phenylalanin weisen in n-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5) auf Papier verschiedene Rf-Werte auf²⁵⁾.

2. *cis*- und *trans*-Form von Fural-2,4-dinitrophenylhydrazon sind in Cyclohexan, gesättigt mit Dimethylformamid, papierchromatographisch trennbar²⁴⁾.

3. Cholesten-(4)-ol-(3 β) und Cholesten-(4)-ol-(3 α) unterscheiden sich nur durch die räumliche Lage der C-3-Hydroxyl-Gruppe, lassen sich aber in Benzol-Äther (4:1) dünnschichtchromatographisch²⁶⁾ trennen.

4. Isomere Dipeptide (Tabelle) und Dipeptidamide²⁷⁾ sind in manchen Fließmitteln dünnschichtchromatographisch trennbar.

Um der Trennbarkeit der erwähnten Isomeren Rechnung zu tragen, ist es offensichtlich nötig, die MARTIN'sche Relation durch zusätzliche additive Glieder zu ergänzen. Man kann den Unterschied im Verteilungsverhalten zweier Isomeren durch die Energiedifferenz berücksichtigen, welche zwischen ihren Überführungsenergien besteht. Wir schreiben also z. B. im Falle des Paares Glycyl-alanin und Alanyl-glycin:

$$Rm_{\text{Ala-Gly}} = G_0 + m G_x + n G_y + \dots + G \quad (5a)$$

$$Rm_{\text{Gly-Ala}} = G_0 + m G_x + n G_y + \dots + G + G_I^{\text{Ala-Gly/Gly-Ala}} \quad (5b)$$

$G_I^{\text{Ala-Gly/Gly-Ala}}$ ist die *Isomeriekonstante* dieses Substanzpaares. Im gleichen Sinne kann man für jedes Isomerenpaar AB/BA eine Isomeriekonstante $G_I^{AB/BA}$ definieren und experimentell bestimmen.

Die physikalische Deutung von $G_I^{AB/BA}$ ist speziell bei den Peptiden von besonderem Interesse. Bestimmend für den Verteilungskoeffizienten eines Peptids sind nämlich neben Ladung und Molekelgrösse die Molekelgestalt und die Solvataion. Ist ein Isomerenpaar AB/BA in einem gegebenen Fließmittel untrennbar, so besteht zwischen AB und BA offensichtlich kein Unterschied in der Wechselwirkung mit dem umgebenden Medium. Man darf annehmen, dass die solvatisierten Molekeln AB und BA ausser gleicher Ladung und Molekelgrösse auch identische Gestalt besitzen. Sind die Isomeren trennbar, so darf umgekehrt auf einen Gestaltunterschied geschlossen werden. Es wird nun interessant sein, die Fließmittel, in welchen ein gegebenes Isomerenpaar AB/BA trennbar ist, mit jenen zu vergleichen, welche diese Isomeren nicht zu trennen vermögen, diesen Vergleich für eine grössere Anzahl isomerer Peptide durchzuführen, und das Ergebnis anhand der Isomeriekonstanten zu diskutieren.

²⁵⁾ C. E. DALGLIESH, J. chem. Soc. 1952, 3940.

²⁶⁾ G. JUHÁSZ, Dissertation, Universität Basel 1961, p. 17 ff. (im Druck); daselbst weitere Beispiele zur dünnschichtchromatographischen Trennung epimerer Verbindungen.

²⁷⁾ A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, Chimia 14, 378 (1960).

²⁸⁾ M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, Experientia 17, 237 (1961).

Wir erwarten von einer solchen Studie einen ersten Einblick in das Gestaltproblem der Peptidchemie und werden in einer späteren Arbeit auch darauf zurückkommen. Vorläufig sei nur auf die in der Tabelle zusammengestellten Ergebnisse verwiesen. Von 9 Dipeptidpaaren sind deren 5 nur in *einem* der beiden zur Dünnschichtchromatographie gewählten Fließmittel leicht trennbar. Im andern Fließmittel sind die Rf-Wertunterschiede so gering ($\Delta R_f < 0,05$), dass eine Trennung nicht mehr oder nur noch mittels der Durchlaufmethode²⁸⁾ möglich scheint. In zwei Fällen ergibt das eine, in drei Fällen das andere Fließmittel keine Trennung, und in vier Fällen versagen beide Fließmittel. Die Wechselwirkung zwischen Substanz und Fließmittel kommt also dünn-schichtchromatographisch sehr individuell zum Ausdruck.

Rf-Werte^{a) b)} von Paaren isomerer Dipeptide auf Dünnschichtchromatogrammen (Kieselgel G) in zwei Fließmitteln

Dipeptidpaar ^{c)} Präfix = H, Suffix = OH	n-BuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1 (v/v)	n-PrOH-H ₂ O 7:3 (v/v)
Ala-Gly/Gly-Ala	0,15–0,16	0,15–0,14
Gly-Hypro/Hypro-Gly . .	0,08 / 0,13	0,12–0,13
Gly-Leu/Leu-Gly	0,37–0,35	0,27 / 0,33
Ala-Leu/Leu-Ala	0,45 / 0,37	0,30–0,31
Gly-Phe/Phe-Gly	0,36–0,38	0,32 / 0,37
Gly-Pro/Pro-Gly	0,08–0,09	0,08–0,07
Gly-Ser/Ser-Gly	0,12–0,14	0,12–0,14
Phe-Ala/Ala-Phe	0,48–0,45	0,42–0,40
Gly-Val/Val-Gly	0,32 / 0,27	0,22–0,24

a) Nach STAHL (Arch. Pharm. 292/64, 411 (1959)) mit «Kammerübersättigung» bestimmt.
 b) Durch einen Bindestrich verbundene Rf-Werte sind zwar im Parallelversuch unterscheidbar, ihre Differenz gestattet aber im üblichen Verfahren²⁴⁾ keine Trennung.
 c) Schreibweise nach M. GOODMAN & G. W. KENNER, Adv. Protein Chemistry 12, 552 ff. (1957).

Wir danken den Herren Dr. G. W. ANDERSON (Pearl River, N. Y., USA), PD. Dr. R. A. BOISSONNAS (Basel), Dr. A. JÖHL (Basel), Ing. K. PODUŠKA (Prag), Dr. J. RUDINGER (Prag), Prof. Dr. R. SCHWYZER (Basel), Prof. Dr. TH. WIELAND (Frankfurt a. M.), Dr. E. WÜNSCH (München), Dr. G. T. YOUNG (Oxford) bestens für die freundliche Überlassung von Peptiden, welche bei der vorliegenden Studie benützt worden sind. Ferner danken wir den Herren Dr. R. WEBER, cand. math. F. FRICKER und cand. chem. A. NIEDERWIESER für wertvolle Ratschläge. Die Mittel zur Durchführung dieser Arbeit verdanken wir Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes (M. B.), Herrn Prof. Dr. M. GEIGER-HUBER und der Ungarnhilfe der Doktoranden des Botanischen Instituts der Universität Basel, der Kommission für ungarische Flüchtlingsstudenten an der Universität Basel und einem persönlichen Beitrag der Familie M. BERNASCONI-HEISSERER, Münchenstein (BL), (G. P.).

ZUSAMMENFASSUNG

Der Begriff des Rm-Wertes wird in Anlehnung an Gedankengänge von SCHAUER & BULIRSCH¹⁸⁾ durch den Begriff des Ra-Wertes (d. h. Rm-Wert im Falle von Assoziation) erweitert, und es werden in die betreffenden Gleichungen weitere Konstanten eingeführt, um Isomerieverhältnisse zu berücksichtigen. Diese experimentell

bestimmbaren Isomeriekonstanten können bei der Beurteilung sterischer Probleme nützlich sein. Wie an isomeren Dipeptidpaaren gezeigt wird, kommt die Wechselwirkung zwischen Substanz und Fließmittel dünn-schichtchromatographisch sehr individuell zum Ausdruck. Die Anwendung der Theorie auf die Dünnschichtchromatographie empfiehlt sich auch wegen der übrigen bekannten Vorzüge dieser Methode.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

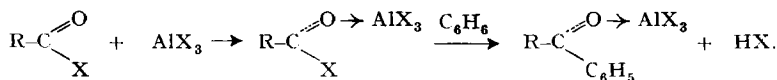
177. Étude de composés d'addition des acides de LEWIS
XVII. Synthèse cétonique de FRIEDEL & CRAFTS en présence de
chlorure d'aluminium radioactif marqué par $^{36}\text{Cl}^1$)

par **G. Oulevey** et **B.-P. Susz**

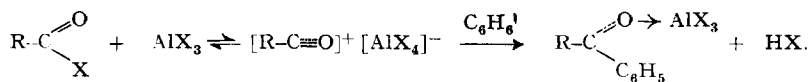
(29 VI 61)

Lors des synthèses cétoniques selon FRIEDEL & CRAFTS, on utilise une masse stoechiométrique de chlorure d'aluminium monomère par rapport à celle de l'halogénure d'acide. Or, ces deux espèces chimiques peuvent réagir pour former des composés d'addition de composition stoechiométrique déterminée et dont un certain nombre ont été isolés et étudiés à l'état solide²⁾. Il n'est cependant pas certain que ces composés soient les intermédiaires actifs de la synthèse, et de nombreuses études ont été publiées sur le mécanisme de réaction, dont on peut distinguer deux types, selon que l'on admet pour l'intermédiaire actif une structure dative ou ionisée.

D'après BOESEKEN³⁾, il se forme un complexe non-ionisé et la réaction se poursuit par un mécanisme de substitution faisant préalablement intervenir la formation d'une liaison dative entre le chlorure d'acide donneur et l'acide de LEWIS.



MEERWEIN⁴⁾ et HÜCKEL⁵⁾ pensent au contraire que la cinétique de la réaction est déterminée par la formation d'un ion carboxonium formé par rupture de la liaison covalente C–X.



¹⁾ XVI^e communication: P. GAGNAUX & B.-P. SUSZ, *Helv.* **44**, 1132 (1961).

²⁾ B.-P. SUSZ & J.-J. WUHRMANN, *Helv.* **40**, 971 (1957); D. CASSIMATIS, P. GAGNAUX & B.-P. SUSZ, *Helv.* **43**, 424 (1960); D. CASSIMATIS & B.-P. SUSZ, *Helv.* **44**, 395 et 943 (1961).

³⁾ J. BOESEKEN, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **19**, 19 (1900); *ibid.* **20**, 102 (1901); voir aussi: THOMAS, « Anhydrous Aluminium Chloride in Organic Chemistry », Reinhold Publishing Corp., New York 1941.

⁴⁾ H. MEERWEIN, *Liebigs Ann. Chem.* **455**, 227 (1927); *Ber. deutsch. chem. Ges.* **61**, 1840 (1928).

⁵⁾ W. HÜCKEL, « Theoretische Grundlagen der organischen Chemie », 8^e éd., Leipzig 1956, I, p. 697.