

## 187. Einfluss der Kammersättigung in der Dünnschichtchromatographie

von C. G. Honegger

Zum 70. Geburtstag von Herrn Professor F. GEORGI

(6. VI. 63)

Die wesentlichen Faktoren, welche in der Dünnschichtchromatographie den Rf-Wert einer Substanz beeinflussen, sind nach BRENNER *et al.*<sup>1)</sup>: Adsorbens, Aktivitätsgrad<sup>2)</sup>, Schichtdicke, Fließmittel, Sättigungsgrad der Kammer, Technik (auf-absteigend, horizontal), Eintauchspiegel, Laufstrecke, Substanzmenge und Temperatur. Im Hinblick auf die vermehrte Verwendung neuer Trennkammern schien eine eingehendere Untersuchung des Faktors Kammersättigungsgrad angezeigt.

Der Einfluss des Grades der Kammersättigung wurde von DEMOLE<sup>3)</sup> und vor allem von STAHL<sup>4)</sup> untersucht. Aus diesen Arbeiten geht hervor, dass bei unvollständiger Sättigung während der Auftrennung ein Teil des Laufmittels von der Adsorptionsschicht verdunstet. Das hat zur Folge, dass Störungen wie Randphänomene, Verlängerung der Laufzeit, Vergrößerung der Wanderungswerte und z. T. der Diffusion auftreten. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muss die Kammersättigung möglichst vollständig sein. Mit Trennkammern, welche zwischen Adsorptionsschicht und Kammerwand einen Abstand von ca. 0,8–1,8 mm aufweisen (Schmalkammer), soll die Sättigung gegenüber den üblichen Kammersystemen besser erreicht werden<sup>5)</sup>. Dadurch wird eine Verringerung a) der Verdunstung von Fließmittel von der Adsorptionsschicht, b) der Trennzeit und c) der Diffusion erreicht. Das führt zu kleineren Flecken und einer Erhöhung der Erfassungsgrenze<sup>6)</sup>. Diese Art Trennkammer nach dem Prinzip der bedeckten Platte<sup>7)</sup> wurde von BRENNER & NIEDERWIESER<sup>8)</sup> speziell zur horizontalen Durchlauf-Dünnschichtchromatographie geschaffen und von STAHL<sup>5)</sup> für eine aufsteigende Variante, die sogenannte S-Kammer, angewandt. Sie besteht aus: a) einer Rahmenplatte, der auf drei Seiten plangeschliffene 2 mm dicke Glasstreifen aufgeschmolzen sind, b) der Trägerplatte, c) starken Klammern, mit deren Hilfe die 2 Platten zusammengehalten werden

1) M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI & A. R. FAHMY, *Experientia* 78, 101 (1962); M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI & R. WEBER in «Dünnschichtchromatographie» von E. STAHL, Springer Verlag, 1962, p. 108.

2) Nach einer eben erschienenen Arbeit von F. GEISS & H. SCHLITT, *Naturw.* 50, 350 (1963), ist die relative Feuchte der Raumtemperatur während des Auftragens der Substanzen und diejenige in der Trennkammer während der Auftrennung für die Rf-Werte von grosser Bedeutung.

3) E. DEMOLE, *J. Chromatogr.* 1, 30 (1958).

4) E. STAHL, *Arch. Pharmaz.* 292/64, 411 (1959); *Pharmaz. Rdsch.* 1, 1 (1959).

5) E. STAHL, in «Dünnschichtchromatographie» von E. STAHL, Springer Verlag 1962, p. 20.

6) E. STAHL & H. JORK in «Dünnschichtchromatographie» von E. STAHL, Springer Verlag 1962, p. 213; H. JORK, *Deutsch. Apotheker-Ztg.* 102, 1263 (1962).

7) Vorläufer dieses Prinzips wurden für die Platten-Chromatographie auf losen Adsorptionsschichten schon von T. I. WILLIAMS, *Introduction to Chromatography*, Blackie & Son, Glasgow, 1947, beschrieben.

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

können, und d) einem Lösungsmitteltank aus 2 verstellbaren Hülsen, durch deren Verschieben der Raum zwischen Glasplatten und Tank verschlossen werden kann. Angesichts der beschränkten Trennkapazität des S-Kammersystems (1 bis 2 Platten von  $20 \times 20$  cm pro Lauf), suchten wir nach einer leistungsfähigeren Anordnung, welche zudem eine weitmögliche Verwendung der Grundausrüstung erlaubt.

**Versuchsordnung.** – a) *Neue Variante der S-Trennkammer:* Anstelle des Lösungsmitteltanks aus verstellbaren Hülsen wird eine normale Trennkammer ( $21 \times 21 \times 9$  cm), statt der Rahmenplatte mit aufgeschmolzenen Glasstreifen werden eine Dünnschichtchromatographie-Glasplatte ( $20 \times 20$  cm) und lose Streifen aus Glas ( $20 \times 0,5 \times 0,1$  cm) oder anderem Material verwendet. Zur Chromatographie wird von der Adsorptionsschicht am linken und rechten Rand 0,75–1 cm Schicht vollständig entfernt. Auf diese Glasfläche legt man vorsichtig die losen Glasstreifen, wobei zu beachten ist, dass die Streifen von der Adsorptionsschicht durch einen Zwischenraum (0,2–0,5 cm) getrennt sind, da sonst Fließmittel, seitlich durch Kapillarkwirkung angezogen, von den Streifen auf die Schicht gelangen kann. Die Trägerplatte wird nun mit der gereinigten Glasplatte bedeckt und diese durch je 2 seitlich anzubringende Klammern festgehalten. Damit dieses System in die gebräuchlichen Wannen hineinpasst, müssen Klammern verwendet werden, welche seitlich praktisch keinen Raum beanspruchen (z. B. Veloklammern). Für die Auftrennung ist es wesentlich, dass beide Glasplatten in das Laufmittel eintauchen. In einer Wanne können gleichzeitig 2–3 Platten aufgetrennt werden. Die Immersionslinie ist speziell bei kleinem Abstand der 2 Platten durch Kapillarkwirkung höher als das Niveau des Fließmittels in der Wanne. Die Verwendung loser Glasstreifen hat den Vorteil, dass der Abstand der 2 Platten der Schichtdicke angepasst werden kann.

b) *Verwendete Kammersysteme und Versuchsbedingungen:* Zur Untersuchung wurden 4 verschiedene Trennkammern unterschiedlichen Sättigungsgrades verwendet: 1. Normaler Sättigungsgrad (KN); 2. Kammersättigung (K) durch lückenloses Ausschlagen der Seitenwände mit Filterpapier – Kammerdimension bei 1. und 2.:  $21 \times 21 \times 9$  cm; 3. Schmalkammer (SN) ohne besondere Sättigungsmassnahmen, wie oben beschrieben, wobei der Abstand zwischen Adsorptionsschicht und Deckplatte ca. 0,75 mm beträgt; 4. gesättigte Schmalkammer (SK). Zur Sättigung der Atmosphäre der letzteren wird die Deckplatte an der der Adsorptionsschicht zugekehrten Seite mit einem Filterpapier versehen, das vor dem Chromatographieren mit Laufmittel benetzt wird. Zur Trennung der Farbstoffmischung: Buttergelb (B), Sudanrot G (S) und Indophenol (I) wurden vom Testgemisch DESAGA je  $10 \text{ mm}^3$  auf 1,5 cm Breite strichförmig auf 0,25 mm dicke Schichten von Kieselgel G (MERCK) (Streichgerät DESAGA) aufgetragen. Diese waren während 30 Min. bei  $110^\circ$  aktiviert und anschließend 110 Min. an der Luft liegen gelassen worden. Die chromatographische Auftrennung erfolgte bei Zimmertemperatur aufsteigend in den Laufmitteln Chloroform, Benzol und Petroläther:n-Butanol = 8:1 (Laufstrecke 10 cm). Als Laufmittel wurden analysenreine dest. Lösungsmittel (MERCK) verwendet, wobei jede Wanne mit 120 ml beschickt war<sup>9)</sup>.

*Ergebnisse und Diskussion.* Der Einfluss des Kammersättigungsgrades wurde beurteilt durch Bestimmung der Laufzeit, Dimension der Flecke vor und nach der Auftrennung (Mass der Diffusion) und der Rf-Werte. Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefasst und zeigen folgende Regelmässigkeiten:

a) *Laufzeit:* Beim Vergleich der Systeme Kammer mit Normalsättigung (KN, geringster Sättigungsgrad) und gesättigte Schmalkammer (SK, höchster Sättigungsgrad) weist erstere in allen untersuchten Laufmitteln die längste und letztere die kürzeste Laufzeit auf, was einer Verkürzung mit zunehmendem Sättigungsgrad entspricht. Mit den Fließmitteln Benzol und Chloroform ist bei Kammersättigung (K) eine kürzere Laufzeit als in der ungesättigten Schmalkammer (SN) zu beobachten, was im Widerspruch zu den Befunden von STAHL<sup>5) 6)</sup> steht<sup>10)</sup>. Dabei ist es in unserer

<sup>9)</sup> Frl. M. BERNHARDT danke ich für ihre geschickte experimentelle Mithilfe.

<sup>10)</sup> Dies gilt auch für das Fließmittel Benzol:Chloroform (1:1).

Anordnung ohne Einfluss, ob das Schmalkammersystem nach oben offen oder abgeschlossen ist. Mit dem Laufmittel Petroläther:*n*-Butanol (8:1) verhalten sich hingegen in diesen Kammern die Laufzeiten gerade umgekehrt: kürzere Laufzeit im Schmalkammersystem (SN), längere Laufzeit bei Kammersättigung (K), wie dies von STAHL<sup>5)</sup>6) beschrieben wurde (für Laufmittel Benzol:Methanol = 95:5). Komponenten und Polarität des Laufmittels haben in diesen beiden Systemen auf Kammersättigung und Laufzeit einen wesentlichen Einfluss.

b) *Dimensionen der Flecke* (Höhe  $\times$  Breite): Substanzen mit höheren Rf-Werten weisen in der Regel gegenüber solchen mit kleineren Wanderungswerten eine grössere Fleckenausdehnung auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Substanzen mit höheren Rf-Werten einerseits nach dem Auftragen der Lösung am Startpunkt sich stärker ausbreiten (Zirkularchromatographieeffekt des Lösungsmittels) und andererseits eine höhere Diffusion während des längeren Wanderungsweges erleiden. Der Siedepunkt der Laufmittel hat ebenfalls einen Einfluss: im schwerflüchtigeren Benzol z. B. sind gegenüber Chloroform und Petroläther:*n*-Butanol kleinere Flecke festzustellen. Bei Normalsättigung ist im Chloroform wie auch in Petroläther:*n*-Butanol der bekannte Effekt einer Verschärfung der Banden<sup>11)</sup> unter gleichzeitiger Verbreiterung zu beobachten. Im ungesättigten Schmalkammersystem tritt mit Chloroform eine Verschärfung des Flecks Indophenol ein, worauf wir noch zurückkommen werden.

c) *Rf-Werte*: Als Regel würde man erwarten, dass die Rf-Werte mit Zunahme der Laufzeit, d. h. weniger gesättigter Kammer, steigen. Dies gilt für alle Systeme, ausser für die ungesättigte Schmalkammer, in welcher z. T. Abweichungen auftreten. Die kleineren Rf-Werte in Benzol bei Kammersättigung (K) gegenüber denjenigen in der gesättigten Schmalkammer (SK) sind darauf zurückzuführen, dass die Immersionslinie im Schmalkammersystem höher liegt als in der gesättigten Normalkammer. Abweichungen in den Rf-Werten in der ungesättigten Schmalkammer (SN), wurden in den Laufmitteln Chloroform und Petroläther:*n*-Butanol beobachtet. Im Lauf Chloroform liegen diese Werte durchwegs tiefer. Ein Teil von diesem relativ leichtflüchtigen Laufmittel verdampft, und dessen Dämpfe von hohem spezifischen Gewicht sinken in der engen Kammer entgegengesetzt der Laufrichtung (rückläufiger Gradient). Dadurch werden die Rf-Werte erniedrigt, und man beobachtet eine Verschärfung der Flecke. (Durch Zuleitung von Chloroformdämpfen von der oberen Kante her konnte man diesen Effekt noch verstärken.) Im Lauf Petroläther:*n*-Butanol ist, im Gegensatz zu den übrigen Kammern, in der ungesättigten Schmalkammer (SN) überhaupt keine Auftrennung der 3 Farbstoffe zu erzielen<sup>12)</sup>. Diese komplexen Verhältnisse wurden nicht weiter verfolgt.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor: 1. Für die meisten Probleme wird das System Kammersättigung Verwendung finden, während die N-Kammer oft unbefriedigende Trennungen ergibt. 2. Die SN-Kammer kann nicht als ein besonders

<sup>11)</sup> H. K. MANGOLD, J. Amer. Oil Chem. Soc. 38, 708 (1961). - B. P. LISBOA & E. DICZFALUSY, Acta endocrinologica 40, 60 (1962), erzielten mit der K- und der N-Kammer eine gute Reproduzierbarkeit, jedoch teilweise eine bessere Auftrennung in der N-Kammer ohne Auftreten grösserer Randeefekte.

<sup>12)</sup> Die Lipidauftrennung im gebräuchlichen Laufmittel Chloroform:Methanol:H<sub>2</sub>O = 65:25:4 führt ebenfalls zu unbrauchbaren Resultaten.

Mittelwerte aus Laufzeiten, Dimension der Flecke und Rf-Werten von *Indophenol* (I), *Sudanrot G* (S) und *Butylgelb* (B) in den verschiedenen Laufmitteln und Kammerensystemen

Laufmittel und Anzahl Versuche	Trennkammer	Laufzeit	Dimension der Bande (Breite × Höhe) vor der Auftrennung						Rf-Werte		
			1,56 × 0,61 ± 0,07 × 0,08								
			Nach der Auftrennung						I	S	B
Benzol 4 Ver- suche	KN	35'56" ± 1'50"	1,38 × 0,45 ± 0,05 × 0,05	1,56 × 0,63 ± 0,05 × 0,15	1,69 × 0,69 ± 0,08 × 0,08	0,09 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,63 ± 0,03			
	SN	24'54" ± 1'30"	1,38 × 0,43 ± 0,05 × 0,1	1,51 × 0,71 ± 0,03 × 0,1	1,69 × 0,85 ± 0,1 × 0,1	0,09 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,56 ± 0,03			
	K	22'30" ± 3'07"	1,36 × 0,38 ± 0,03 × 0,1	1,49 × 0,60 ± 0,08 × 0,1	1,59 × 0,73 ± 0,1 × 0,05	0,05 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,37 ± 0,01			
	SK	18'22" ± 1'00"	1,30 × 0,43 ± 0 × 0,05	1,48 × 0,65 ± 0,05 × 0,05	1,60 × 0,70 ± 0,1 × 0,1	0,06 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,40 ± 0,01			
Chloro- form 5 Ver- suche	KN	39'32" ± 2'18"	1,70 × 0,39 ± 0,25 × 0,1	1,94 × 0,35 ± 0,1 × 0,1	1,94 × 0,26 ± 0,25 × 0,08	0,84 ± 0,08	0,88 ± 0,03	0,93 ± 0,01			
	SN	24'22" ± 1'10"	1,36 × 0,13 ± 0,15 × 0,05	1,56 × 0,68 ± 0,05 × 0,1	1,58 × 0,77 ± 0,13 × 0,05	0,16 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,50 ± 0,04			
	K	23'03" ± 1'50"	1,43 × 0,52 ± 0,15 × 0,13	1,69 × 0,74 ± 0,08 × 0,13	1,70 × 0,65 ± 0,1 × 0,05	0,53 ± 0,07	0,59 ± 0,05	0,70 ± 0,04			
	SK	18'47" ± 0'35"	1,44 × 0,48 ± 0,11 × 0,1	1,64 × 0,60 ± 0,1 × 0,18	1,61 × 0,65 ± 0,13 × 0,15	0,25 ± 0,04	0,38 ± 0,04	0,53 ± 0,05			
Petrol- äther: <i>n</i> -Buta- nol = 8:1 3 Ver- suche	KN	43'02" ± 2'38"	2,00 × 0,33 ± 0,15 × 0,13	2,03 × 0,28 ± 0,23 × 0,08	2,07 × 0,12 ± 0,15 × 0,03	0,89 ± 0,03	0,86 ± 0,02	0,90 ± 0,03			
	SN	21'28" ± 1'39"	2,10 × 0,10 ± 0 × 0	2,10 × 0,10 ± 0 × 0	2,10 × 0,10 ± 0 × 0	0,47 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,47 ± 0,03			
	K	25'15" ± 3'43"	1,62 × 0,45 ± 0,08 × 0,05	1,78 × 0,62 ± 0,01 × 0,08	1,83 × 0,48 ± 0,08 × 0,18	0,66 ± 0,07	0,60 ± 0,05	0,72 ± 0,09			
	SK	16'51" ± 0'55"	1,72 × 0,45 ± 0,13 × 0,05	1,88 × 0,68 ± 0,13 × 0,08	2,00 × 0,63 ± 0,1 × 0,05	0,53 ± 0,05	0,49 ± 0,05	0,59 ± 0,05			

gut gesättigtes System angesprochen werden. Mit gewissen Laufmitteln ist eine weitgehende Reproduzierbarkeit erreichbar, während mit anderen unbrauchbare Resultate erzielt werden. Die Laufzeit kann dabei kürzer oder länger als in der gesättigten Normalkammer sein und die Diffusion kleiner oder grösser. 3. Die gesättigte Schmalkammer wird ausser zur Untersuchung theoretischer Fragen kaum benützt werden. Für die Bestimmung absoluter Rf-Werte dürfte nach diesen Ergebnissen nur die horizontale Chromatographie in gesättigter Schmalkammer herangezogen werden, da in diesem System ein maximaler Sättigungsgrad vorliegt, jedoch im Gegensatz zu vertikaler Auftrennung kein rückläufiger Gradient auftritt.

Die Unterstützung dieser Arbeit durch den EMIL-BARELL-FONDS sei auch an dieser Stelle herzlichst verdankt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird eine neue, einfache Schmalkammer zur aufsteigenden Dünnschichtchromatographie beschrieben.

2. Der Einfluss der Kammersättigung in der Dünnschichtchromatographie wurde mit Hilfe von 4 verschiedenen Trennkammern unterschiedlichen Sättigungsgrades untersucht.

3. Es wurde u. a. festgestellt, dass ungesättigte Schmalkammern nicht für alle Trennprobleme benützlich sind.

Forschungslaboratorium der  
Neurologischen Universitätsklinik  
Basel, Socinstrasse 55

### 188. Regel zur Abschätzung der Aciditätskonstanten von Cyclohexancarbonsäuren<sup>1)2)</sup>

von P. F. Sommer<sup>3)</sup>, C. Pascual, V. P. Arya<sup>4)</sup> und W. Simon

(6. VI. 63)

Carboxylgruppen äquatorialer und axialer Lage von Cyclohexancarbonsäuren unterscheiden sich deutlich in ihrer Acidität<sup>1)5)6)7)8)</sup>. Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, beträgt die Differenz in der freien Energie zwischen Cyclohexancarbonsäure mit axialer und dem Epimeren mit äquatorialer Carboxylgruppe etwa 1,6 kcal/Mol und jene für das korrespondierende Anion rund 2,2 kcal/Mol<sup>5)6)8)</sup>. Die um 0,5 pK<sub>MCS</sub>\*

<sup>1)</sup> Vgl. auch P. F. SOMMER, V. P. ARYA & W. SIMON, *Tetrahedron Letters* Nr. 20, 18 (1960).

<sup>2)</sup> Vgl. auch P. F. SOMMER, *Diss. ETH, Zürich* 1961.

<sup>3)</sup> Gegenwärtige Adresse: Firma HOFFMANN-LA ROCHE & Co., AG., Basel.

<sup>4)</sup> Gegenwärtige Adresse: CIBA RESEARCH CENTER, GOREGAON, Bombay.

<sup>5)</sup> R. D. STOLOW, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 5806 (1959).

<sup>6)</sup> M. TICHÝ, J. JONÁŠ & J. SICHER, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* 24, 3434 (1959).

<sup>7)</sup> J. F. J. DIPPY, S. R. C. HUGHES & J. W. LAXTON, *J. chem. Soc.* 1954, 4102.

<sup>8)</sup> H. VAN BEKKUM, P. E. VERKADE & B. M. WEPSTER, *Kon. nederl. Akad. Wetensch. (Amsterdam), Proc. Ser. B*, 64, 161 (1961).