

## 96. Gradienten-Elution in der Dünnschicht-Chromatographie

von A. Niederwieser<sup>1)</sup> und C. G. Honegger

(25. III. 65)

Komplizierte Naturstoffgemische trennt man säulenchromatographisch schon seit langem mit Hilfe eines kontinuierlichen Konzentrationsgradienten im Elutionsmittel. Die Anwendung des Gradientenprinzips erlaubt, unpolare und polare Substanzen in nahezu beliebig rascher Folge als schmale Banden durch die Säule wandern zu lassen. Neben dem Gewinn an Übersicht, Zeit und Automatisierung ist eine Qualitätsverbesserung des Chromatogramms unverkennbar.

Im Gegensatz zur Säulenchromatographie lässt sich bei der üblichen Schichtchromatographie (Dünnschicht- und Papierchromatographie) das Elutionsmittel während des Trennprozesses nicht ändern. Ein Wechsel des Fließmittels ist fast gleichbedeutend mit dem Ansatz eines neuen Chromatogramms. So ist es nicht verwunderlich, dass eindimensionale Schichtchromatographie viele Substanzgemische nur recht unvollständig auftrennt: ein grosser Teil der Substanzen bleibt entweder am Startpunkt zurück oder wandert mit der Fließmittelfront. Wir halten daher die Anwendung der Gradienten-Elutionstechnik in der Schichtchromatographie für dringlich und sind überzeugt, dass zumindest die dünnschichtchromatographischen Erfolge der Zukunft auf diesem Gebiet liegen werden. Wir beschäftigen uns seit längerer Zeit mit diesem Problem [1] [2] [3] und werden in einer Reihe weiterer Publikationen verschiedene Gradienten-Techniken darstellen, mit dem Ziel, die gegenwärtigen chromatographischen Möglichkeiten zu erweitern und die Trennung eines Naturstoffgemisches in Substanzklassen auch dann zu ermöglichen, wenn nur eine für ein einziges Chromatogramm ausreichende Menge [4] zur Verfügung steht.

Unseres Wissens hat LEDERER [5] als Erster die Änderung der Fließmittelzusammensetzung während einer Papierchromatographie beschrieben. Bei aufsteigender Chromatographiertechnik liess er jedesmal, wenn die Fließmittelfront um 1 cm weitergewandert war, eine bestimmte Menge einer polaren Komponente unter Rühren in das vorgelegte Fließmittel tropfen und erreichte so eine genau definierte, diskontinuierliche Gradienten-Elution. Ebenfalls diskontinuierlich arbeiteten MUIĆ *et al.* [6], indem sie den Fließmitteltrog öfters während der Chromatographie austauschten.

Wir sind auf die Vorzüge der diskontinuierlichen Dünnschicht-Chromatographie an anderer Stelle [3] näher eingegangen und werden uns im folgenden nur mit kontinuierlicher Gradienten-Elution beschäftigen. Diese Arbeitsweise wurde von FRANKS [7] in die Papierchromatographie wie folgt eingeführt: Ein Ende des horizontal zwischen zwei Glasplatten gelagerten Papier-Streifens taucht in ein Mischgefäss mit Überlauf, und die Zugabe der polaren Komponente erfolgt mit konstanter Geschwindigkeit aus einem Tropftrichter unter Zwischenschaltung eines Überlaufgefässes. WIELAND & DETERMANN [8] beschrieben eine im Prinzip ähnliche Anordnung für die aufsteigende

<sup>1)</sup> Neue Adresse: Forschungslaboratorium für Medizinische Akustik, Medizinische Akademie, D 4 Düsseldorf, Moorenstraße 5.

Dünnschichtchromatographie: Der untere Teil einer zylindrischen Trennkammer ist als Mischgefäss ausgebildet, in welches durch ein seitlich angesetztes Rohr eine Fließmittelkomponente aus einer Bürette oder mit Hilfe einer Pumpe zugeführt wird. Die Mischung steigt durch eine Filterplatte nach oben, kommt dort mit der Schicht in Berührung und kann durch einen Überlauf abfließen. Hingegen liess RYBICKA [9] die polare Komponente einfach aus einer Bürette in die übliche Trogkammer tropfen, musste aber darauf achten, dass der Flüssigkeitsmeniskus nicht bis zur Höhe der Startlinie auf der Dünnschichtplatte anstieg. STICKLAND [10] benützte zur Gradienten-Elution auf Dünnschicht eine Anordnung ähnlich der von BRENNER & NIEDERWIESER [11] zur horizontalen Durchlaufchromatographie beschriebenen Vorrichtung, wobei aber der Fließmitteltrog durch eine Längswand in zwei Räume geteilt ist, welche verschiedene Fließmittel aufnehmen. Während der Chromatographie wird der Inhalt jeder Troghälfte magnetisch gerührt und die Komponenten können sich durch ein Loch in der Trennwand langsam mischen. Nach einer bestimmten Zeit muss der Mischvorgang durch Vergrössern des Lochdurchmessers beschleunigt werden.

Die meisten der genannten, zum Teil sehr einfachen Anordnungen zur Schichtchromatographie mit kontinuierlicher Gradienten-Elution bieten keine Gewähr auf Reproduzierbarkeit des erzeugten Gradienten. Noch weniger besteht die Möglichkeit einer klaren Korrelation zwischen momentaner Fließmittelzusammensetzung am Eintauchspiegel und der von der Schicht aufgenommenen Flüssigkeitsmenge. So wird die Fließmittelzusammensetzung oft linear in Bezug auf die Zeit geändert; bei den betreffenden Versuchsanordnungen ist aber die von der Schicht aufgenommene Flüssigkeitsmenge proportional zu  $\sqrt{t}$ , wobei der Proportionalitätsfaktor grösseren Schwankungen unterworfen ist und insbesondere von der Fließmittel-Viskosität und -Oberflächenspannung abhängt<sup>2)</sup>, welche sich ja mit den Konzentrationsgradienten erheblich ändern können. Daraus ergibt sich, dass die ursprünglich beabsichtigte Form des Elutionsgradienten verzerrt wird und kein grösserer Anspruch auf Reproduzierbarkeit gestellt werden darf. Ausserdem fixieren die erwähnten Versuchsanordnungen weitgehend den Verlauf des Konzentrationsgradienten: Graphisch in Funktion des aufgenommenen Volumens dargestellt, bleibt er in der Regel konvex in Bezug auf die Volumenachse. Die Notwendigkeit, ein grösseres Volumen eines Fließmittels vorlegen zu müssen, stellt überhaupt eine beträchtliche Beschränkung in der allgemeinen Anwendbarkeit des Verfahrens dar, denn die Konzentration einer vorgelegten Komponente kann bei Verwendung der einfachen Zweikammernmischsysteme nicht auf Null absinken, wenn nicht unwirtschaftlich grosse Fließmittelmengen durchgesetzt werden sollen.

Ein Verfahren, welches keine dieser Einschränkungen aufweist, besteht darin, dass man eine definierte Menge Elutionsmittel mit dem gewünschten Konzentrationsgradienten in eine zweckmässig zu einer Schraube mit vertikaler Achse geschlungene Kapillare (enger Teflonschlauch) füllt und daraus der Schicht über einen Kapillarfilm zuführt, wobei der Schicht jeweils nur so viel Flüssigkeit angeboten wird, als sie gerade aufzunehmen imstande ist (Schema vgl. Fig. 1). Durch die Verwendung einer gra-

<sup>2)</sup> Es wurde mehrfach gezeigt, dass diese Abhängigkeit für den vom Fließmittel auf dem Chromatogramm zurückgelegten Weg besteht [12] [13]. Da aber bei konstanter Schichtdicke Wanderungsstrecke der Fließmittelfront und von der Schicht aufgenommenes Volumen einander proportional sind (vgl. auch unten, Fig. 10), gilt auch das oben Ausgeführte.

duierbaren Kapillare als Fließmittelbehälter sowie durch die Trennung von Gradienten-Mischbatterie und Chromatographieranordnung ergeben sich im wesentlichen folgende 5 Vorteile:

1. Messbarkeit des von der Schicht aufgenommenen Fließmittelvolumens.
2. Unabhängigkeit von der Art der Gradienten-Mischbatterie und damit völlig freie Wahl des Konzentrationsverlaufes.
3. Reproduzierbarer Gradientenverlauf.
4. Direkte Korrelation zwischen dem von der Schicht aufgenommenen Volumen des Fließmittels und dessen jeweiliger Zusammensetzung am Eintauchspiegel.
5. Zeitlicher Spielraum zwischen Gradientenerzeugung und Chromatographie.

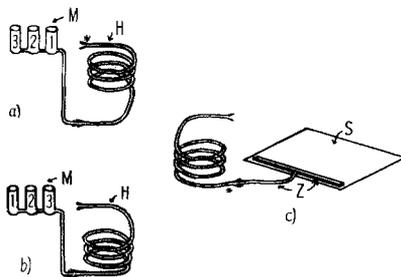


Fig. 1. Anordnung zur Gradienten-Elution in der Dünnschicht-Chromatographie (schematisch), bestehend aus Mischbatterie M, Schraube H (Fließmittelreservoir mit Auslauf(\*)), Zuleitung Z und Adsorbens-Schicht S

Das Füllen der Fließmittel-Schraube kann auf zwei Arten geschehen (Fig. 1a und b), wobei zueinander spiegelbildlich verlaufende Konzentrationskurven erhalten werden. c) Anordnung zur Chromatographie

Punkt 1 bietet vor allem in theoretischer Hinsicht weitere wesentliche Vorteile, da bisher das Volumen der mobilen Phase bei Schichtchromatographie höchstens indirekt bestimmt werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit kann auf die sich dadurch bietenden neuen Möglichkeiten nicht näher eingegangen werden; erwähnt sei lediglich, dass sich ein auf Grund des Fließmittelprofils [14] gegenüber idealen Verhältnissen vorhandenes Fließmitteldefizit [15] messen lässt, und dass unter Umständen sogar die in der Trennkammer von der Schicht verdampfende Flüssigkeitsmenge bestimmt werden kann. Der grösste Nutzen des beschriebenen Verfahrens dürfte aber – von der Gradienten-Elution abgesehen – darin liegen, dass nun im Durchlauf-Verfahren Verteilungskoeffizienten bestimmt werden können. Damit werden Fehler und Unsicherheit bei der Bestimmung der  $R_f$ -Werte ausgeschaltet, welche der Anwendung der MARTIN-Beziehung [16] in der Schicht-Chromatographie wegen Fließmittelprofil [15] und chromatographischer Fließmittelentmischung [15] bisher Grenzen setzten.

**I. Die Mischbatterie** – Von den zahlreichen Vorrichtungen zur Herstellung kontinuierlicher Konzentrationsgradienten [17] ist die von PETERSON & SOBER [18] beschriebene gegenwärtig wohl die vielseitigste. Eine Reihe von Lösungen in Mischgefässen gleicher Geometrie stehen dabei in hydrostatischem Gleichgewicht miteinander. Mit dieser Anordnung lassen sich Konzentrationsgradienten ausbilden, die sowohl einfache konvexe, lineare oder konkave Funktionen des aufgenommenen Volumens, wie auch deren Kombination zu mehrfach gekrümmten Funktionen

darstellen können. Leider erweist sich das Verfahren beim Arbeiten mit organischen Lösungsmitteln als äusserst unpraktisch, da eventuelle grössere Dichteunterschiede der eingesetzten Lösungen unbedingt berücksichtigt werden müssen, und der hohe Dampfdruck solcher Flüssigkeiten stören kann. Bei einer Mikroausführung des Verfahrens besteht zudem die Gefahr, dass Luftbläschen in den Auslauf gelangen. Sieht man von den aufwendigeren Mischsystemen ab, welche mit Pumpen betrieben werden, deren Fördermenge sich kontinuierlich ändert, so erreicht man Unabhängigkeit von der Dichte der eingesetzten Flüssigkeit am einfachsten durch Verwendung von geschlossenen und ganz gefüllten Mischgefässen<sup>3)</sup>. Eine Kette geschlossener Mischgefässe erlaubt ausserdem die Erzielung konstanter Ausflussgeschwindigkeit durch Anwendung des Prinzips der MARIOTTESchen Flasche. Das Schema einer solchen Kette in Fig. 2 macht deutlich, dass sich dabei die Mischgefässe nacheinander leeren, wobei nach aussen das Flüssigkeitsniveau konstant bleibt.

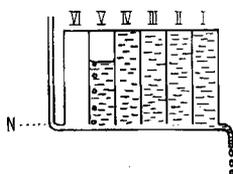


Fig. 2. Schema einer Mischbatterie mit geschlossenen Kammern und mit konstanter Ausflussgeschwindigkeit

Das nach aussen massgebliche Flüssigkeitsniveau N ist durch die Lage der Lufteintrittsöffnung festgelegt

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Elutionsgradienten wurden in einer solchen Mischbatterie hergestellt. Sie liefert ähnlich differenzierte Gradienten wie die Mischbatterie nach PETERSON & SOBER, ist aber einfacher zu bedienen, da beispielsweise die einzelnen Lösungsvolumina durch den Gefässinhalt definiert werden und beim Füllen nicht abgemessen zu werden brauchen. Ausserdem besteht keine Gefahr, dass Luft eingeührt wird. Nachstehend geben wir die technischen Daten unserer bisherigen Ausführungsform wieder (Fig. 3).

Mehrere – 7 im Beispiel der Fig. 3. – zylindrische Glasgefässe (Innendurchmesser: 7 mm; Innenhöhe: 40 mm) mit Schliffstopfen und zwei an entgegengesetzten Seiten knapp über dem Gefässboden angesetzten Kapillarstücken (Innendurchmesser: 1 mm; Länge: 15 mm) sind über die Kapillaren durch kurze Polyäthylen-Schläuche zu einer an beiden Enden offenen Batterie miteinander verbunden. Kapillaren und Schläuche sind nach aussen gebogen, so dass alle Gefässe auf einen Kreis mit etwa 4,5 cm Durchmesser zu stehen kommen (Fig. 3). Der Schlauch am einen Ende der Mischbatterie ist etwa 8 cm lang, nach oben gebogen und fungiert als Steigrohr. Der Schlauch am anderen Ende der Batterie dient als Auslauf und ist zu einer etwa 15 cm langen Zuleitungskapillare ausgezogen. In jedem Gefäss steht als Rührer ein Magnetstab (3×18 mm, Schweissdraht in Polyäthylenschlauch eingeschmolzen). Mit einem geeigneten Magnetrührer<sup>4)</sup> lassen sich alle Rührer gleichzeitig betätigen. Der Inhalt der Gefässe beträgt je 1,3 ml, der Inhalt der einzelnen Verbindungsstücke zwischen den Gefässen 0,05 ml.

Zum Füllen wird der Auslauf der Batterie z. B. mit einem passenden Glasstab oder Draht verschlossen und das erste Gefäss mit Lösung 1 fast randvoll gefüllt. Der rasch eingesetzte Schliff-

<sup>3)</sup> Eine andere Möglichkeit wurde von WREN beschrieben [19].

<sup>4)</sup> Z. B. Magnetrührer Typ E 349 der Firma МЕТРОНМ, Herisau (Schweiz). Einige andere Magnetrührer eignen sich erfahrungsgemäss nicht.

stopfen drückt die überschüssige Flüssigkeit nach oben ins Freie<sup>5)</sup> und nach unten in das zweite Gefäß und ermöglicht so mühelos ein blasenfreies Füllen. Die in das zweite Gefäß übergelaufene Flüssigkeit wird abgesaugt und Gefäß Nr. 2 mit Lösung 2 gefüllt und so fort. An das letzte Gefäß kann über das Steigrohr ein beliebig grosses Vorratsgefäß angeschlossen werden.

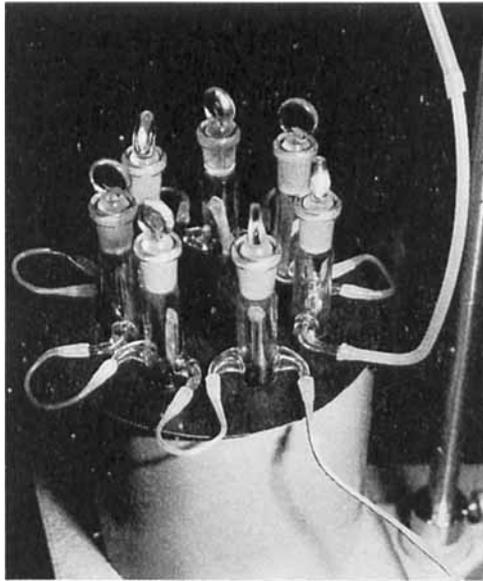


Fig. 3. *Einfache Ausführungsform einer Mischbatterie mit 7 geschlossenen Kammern und einem Fassungsvermögen von  $7 \times 1,3$  ml, gefertigt aus Glas und Polyäthylen*

Alle in den Kammern stehenden (polyäthylenüberzogene) Rührstäbe werden durch einen einzigen Magnetrührer (Metrohm, Typ E 349) bewegt. Die Art ihrer Anordnung vermeidet Strudelbildung weitgehend

Der Konzentrationsverlauf in einer Mischbatterie mit geschlossenen Gefässen ist dadurch festgelegt, dass in jedem Gefäß genau so viel Flüssigkeit einläuft wie ausläuft. In einer Kette offener Gefässe nach PETERSON & SOBER [18] hingegen läuft in jedes Gefäß nur halb so viel hinein wie heraus. Bei gleichen Startbedingungen wird also der Konzentrationsverlauf in beiden Systemen ganz verschieden ausfallen. Er setzt sich additiv aus den Konzentrationsbeiträgen der einzelnen Mischkammern zusammen. Diese Beiträge lassen sich ermitteln, indem man das betreffende Gefäß mit einer Lösung der Konzentration 1 und alle anderen Gefässe mit reinem Lösungsmittel füllt und die Konzentration im Auslauf berechnet oder experimentell bestimmt. Trägt man die Konzentration  $c$  auf gegen das Verhältnis: ausgelaufenes Volumen  $v$ /Anfangsvolumen  $V_0$ , so erhält man bei einer Mischbatterie nach PETERSON & SOBER mit einer geraden Zahl von Kammern jeweils zwei Kurven spiegelbildlich zu einer Geraden, welche parallel zur  $c$ -Achse verläuft und die  $v/V_0$ -Achse bei 0,5 schneidet. Im entsprechenden Kurvenbild der Mischbatterie mit geschlossenen Mischgefässen fehlt diese Spiegelachse. Die Figuren 4 und 5 zeigen die experimentell auf Grund von Leitfähigkeitsmessungen mit einer Mikromesszelle ermittelten Resultate aus der

<sup>5)</sup> Alufolie als resistente Mischbatterie-Unterlage schützt den Lack des Magnetrührers.

oben beschriebenen Mischbatterie mit 4 bzw. 6 Kammern. Daraus ist ersichtlich, dass sich mit zunehmender Kammerzahl differenziertere Gradienten ausbilden, dass aber gleichzeitig das Konzentrationsmaximum der Lösung in der letzten Kammer abnimmt. Ausserdem wird die Konzentration gegen Ende des Mischvorganges ( $v/V_0 \rightarrow 1$ ) konstant: der Gradient ist erschöpft, sobald Gefäss Nr. 2 leer gelaufen ist.

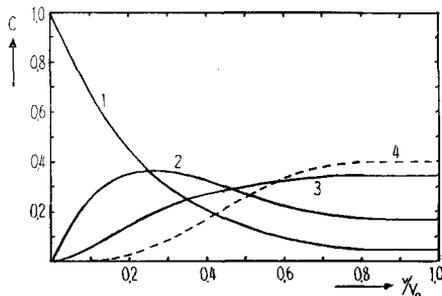


Fig. 4. Konzentrationsverlauf im Auslauf der Mischbatterie nach Fig. 3 mit 4 geschlossenen Kammern (Anfangsvolumen  $V_0 = 4 \times 1,3$  ml)

Konzentrationen bestimmt durch Leitfähigkeitsmessungen an KCl-Lösungen mit Hilfe einer selbstverfertigten Durchfluss-Mikromesszelle (0,06 ml Inhalt) und dem LKB-Conductolyzer. Die Zahlen an den Kurven bezeichnen die Nummer der Kammer, welche mit Lösung der Konzentration 1 beschickt ist; in allen übrigen Kammern befindet sich jeweils reines Lösungsmittel. Werden mehrere Kammern mit Lösung gefüllt, so lässt sich der entstehende Gradient durch Superposition der betreffenden Kurven darstellen (vgl. Fig. 12b)

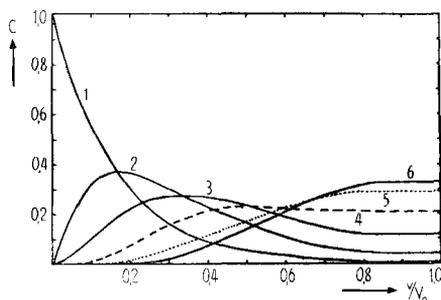


Fig. 5. Konzentrationsverlauf im Auslauf der Mischbatterie nach Fig. 3 mit 6 geschlossenen Kammern (Anfangsvolumen  $6 \times 1,3$  ml); im übrigen vgl. Legende zu Fig. 4

Die Kombination dieser Mischbatterie mit dem schlauchförmigen Fließmittelbehälter ergibt nun ein äusserst flexibles Instrument zur Herstellung der verschiedensten Elutionsgradienten: Aus den in Fig. 4 und 5 wiedergegebenen «Elementarkurven» entstehen kompliziertere Funktionen durch einfache Superposition. Die  $v/V_0$ -Achse kann beliebig verkürzt werden, indem man nur einen Teil des in die Mischbatterie eingesetzten Volumens verwendet<sup>6)</sup>. Ausserdem lassen sich Konzentrationskurven er-

<sup>6)</sup> Praktisch zum gleichen Resultat kommt man auch dadurch, dass die Substanzprobe in mehr oder weniger grossem Abstand vom Eintauchspiegel auf die Schicht aufgetragen wird. Bei Versuchsabbruch ist ja der Konzentrationsverlauf in der mobilen Phase hinter dem Startpunkt für das Chromatogramm belanglos.

halten, die spiegelbildlich zu den in Fig. 4 und 5 gezeigten verlaufen. Dazu füllt man die Mischbatterie in umgekehrter Reihenfolge (z. B. polarstes Elutionsmittel in Kammer 1 statt in die letzte Kammer) und füllt die als Fliessmittelbehälter dienende Schraube ebenfalls in umgekehrter Richtung, so dass die Mischung durch das während der Chromatographie als Auslauf dienende Schlauchende in die Schraube einfließt (Fig. 1b).

**II. Das Fliessmittelreservoir («SCHRAUBE»).** – Wie schon erwähnt, dient in unserem Verfahren ein zweckmässig schraubenförmig gewundener, enger Schlauch (Kapillare) als Fliessmittelreservoir. Wenn dieser auf Auslauf graduiert wird, kann die im Verlauf der Chromatographie auf die Schicht geflossene Menge Elutionsmittel am Stand des Flüssigkeitsmeniskus in der Kapillare abgelesen werden.

Der Innendurchmesser der Kapillare soll möglichst klein sein, um eine unerwünschte Durchmischung des örtlich verschieden dichten Inhalts zu verhindern. Andererseits nimmt die Strömungsgeschwindigkeit beim Auslaufen einer konstanten Flüssigkeitsmenge pro Zeiteinheit mit kleiner werdendem Kapillardurchmesser zu. Es wächst damit die Gefahr, dass dabei der Flüssigkeitsfaden abreisst und mehrere kleine Tröpfchen hinter dem Fadenende herlaufen. Dieser Vorgang hätte eine erhebliche Vergrößerung des Kapillarwiderstandes zur Folge und würde das Abfließen stören. Es ist daher ein Kompromiss anzustreben, ausgehend vom maximal erforderlichen Fliessmitteldurchsatz unter den betreffenden Experimentierbedingungen. Der Durchsatz ist abhängig von der Chromatographiertechnik, vom Querschnitt und von der Porosität der Schicht, vom Fliessmittel und von der Temperatur. Für eine 18 cm breite Schicht aus Kieselgel G («MERCK», Streichdicke: 0,25 mm) und einseitige Fliessmittelausbreitung bei 10–25° haben sich Kapillaren mit 1–1,5 mm Innendurchmesser als optimal erwiesen.

Die Auslaufgeschwindigkeit lässt sich durch die Röhrenanordnung regulieren und genau dem jeweiligen Aufnahmevermögen der Schicht anpassen. Der zeitliche Verlauf des Fliessmittelbedarfs hängt von der Chromatographiertechnik ab. Wir beschreiben dies eingehend am Beispiel der beiden wichtigsten Techniken, der punktförmigen, zentralen Fliessmittelzufuhr in eine kreisförmige Schicht (Radialchromatographie) und der linienförmigen, seitlichen Zufuhr in eine rechteckige Schicht.

*Anordnung der Kapillare zur Radialchromatographie.* Theoretisch sollte bei horizontaler Radialchromatographie das von der Schicht pro Zeiteinheit aufgenommene Fliessmittel-Volumen konstant bleiben. Dies ergibt sich einerseits aus dem bekannten Bewegungsgesetz einer Flüssigkeit in einer trockenen Schicht porösen Materials [12] [13] [20], wonach

$$s^2 = a_1 t + a_2, \quad (1)$$

wobei  $s$ : der von der Fliessmittelfront zurückgelegte Weg,

$t$ : Zeit,

$a_1, a_2, \dots$ : Konstanten;  $a_2 \geq 0$ .

Da andererseits das in die Schicht eingedrungene Flüssigkeitsvolumen  $v$ :

$$v = a_3 \pi s^2 \quad (2)$$

ist, erhält man durch Einsetzen von (1) in (2) und Vereinigung der Konstanten die Linearbeziehung:

$$v = a_4 t + a_5. \quad (3)$$

Erfolgte das Strömen des Fliessmittels in unserem Fliessmittelreservoir (Kapillare) und in der Zuführung zur Schicht ohne Reibungswiderstände, so müsste die Fliessmittel-Vorratsröhre horizontal und niveaugleich mit der horizontal gelagerten Schicht angebracht werden. In der Zuleitung zwischen Vorratsröhre und Schicht auftretende Widerstände machen aber eine Niveauerhöhung der Kapillare gegenüber der Schicht notwendig. Der Reibungswiderstand in der Kapillare selbst ist proportional der Länge des Flüssigkeitsfadens und nimmt daher während des Ausströmens kontinuierlich ab. Eine konstante Ausflussgeschwindigkeit lässt sich durch eine angemessene, gleichmässige Neigung der Kapillare gegen den Horizont erzielen.

Zweckmässig wird daher ein Stück Teflonschlauch mit einem Fassungsvermögen, das dem totalen Flüssigkeitsbedarf des Chromatogramms entspricht, in einer engen Schraube mit konstanter Steigung um einen senkrecht stehenden Zylinder gewickelt, wobei Zylinderdurchmesser und Niveaudifferenz zwischen den einzelnen Windungen vom Innendurchmesser der Kapillare abhängen (Eigenwiderstand). Wird ein Schlauch benützt, dessen Innendurchmesser  $> 1,5$  mm (für Gradienten-Elution nicht zu empfehlen!), so ist der Reibungswiderstand bei kleineren Fliessmittelmengen (3 ml) so gering, dass die Schraube durch eine horizontale Spirale ersetzt werden muss.

Fig. 6 zeigt nun, dass die Linearbeziehung (3) in der Praxis nicht immer zutrifft. Der Grund dafür ist uns noch nicht mit Sicherheit bekannt. Die Abweichung von der erwarteten Geraden ist aber relativ gering, so dass ohne Schwierigkeiten eine auf konstante Ausflussgeschwindigkeit eingestellte Kapillare verwendet werden kann.

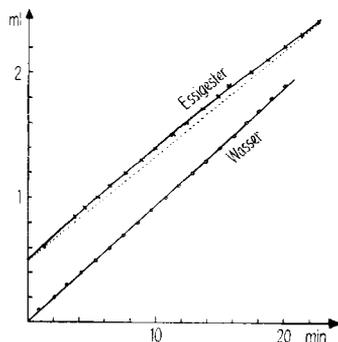


Fig. 6. Zeitlicher Verlauf der Fliessmittelaufnahme der Schicht bei Radialchromatographie in einer Sandwichkammer

Lufttrockenes Kieselgel G (MERCK, Streichdicke 0,25 mm), rel. Luftfeuchtigkeit 30%; Durchmesser des Kapillarfildes («Docht»): 5 mm. Der Übersichtlichkeit wegen wurde die im Fall von Essigester als Fliessmittel erhaltene Kurve um 0,5 ml versetzt aufgezeichnet und durch den ersten und letzten Messpunkt eine Sekante gelegt (punktirt)

*Anordnung der Kapillare zur Chromatographie mit einseitiger Fliessmittelausbreitung (rechteckige Schicht).* Bei dieser heute am meisten verwendeten Chromatographiertechnik nimmt der Fliessmittelbedarf der Schicht kontinuierlich ab: Das in die Schicht eingedrungene Flüssigkeitsvolumen ist bei gleichbleibender Schichtdicke und Schichtbreite proportional dem von der Fliessmittelfront zurückgelegten Weg; unter Berücksichtigung von (1) ergibt sich daher der zeitliche Verlauf der Fliessmittelaufnahme zu

$$v^2 = a_6 t + a_7 \quad (a_6 \text{ und } a_7: \text{Konstanten}). \quad (4)$$

Einem derartigen Verlauf des Fließmittelbedarfs der Schicht wird durch eine geringfügige Änderung in der oben beschriebenen Anordnung der Kapillare Rechnung getragen. Die Fließmittelzufuhr lässt sich der Konstanten  $a_7$  in Gleichung (4) anpassen, indem man das Niveau zwischen Fließmittelschraube und Schicht verändert; die zeitliche Abnahme des Fließmitteldurchsatzes kann, der Konstanten  $a_6$  entsprechend, durch Variieren der Neigung der Kapillare eingestellt werden.

Eine Anordnung, mit deren Hilfe dem Fließmittelbedarf nach Gleichung (4) in jedem speziellen Fall genügt werden kann, besteht demnach aus einer hochelastischen Kapillare in Form einer Schraubenfeder mit senkrecht stehender Achse, deren unteres Niveau sich durch Heben und Senken in der Achsenrichtung und deren Windungsdichte (Neigung) sich durch Zusammenpressen und Dehnen in Achsenrichtung beliebig variieren lässt. Da die Fließmittelzufuhr nicht punktförmig, sondern linear, längs einer ganzen Schichtseite erfolgen soll, muss der Kapillarfilm, welcher den Kontakt zur Schicht vermittelt (siehe unten), zu Beginn der Chromatographie so rasch wie möglich ausgebildet werden, um eine sofortige, gleichmässige Benetzung längs des ganzen «Eintauchspiegels» sicherzustellen. Man muss daher dafür sorgen, dass anfangs eine etwa dem doppelten Kapillarfilm-Volumen entsprechende Menge Fließmittel rasch aus der Kapillare strömt. Man erreicht dies, indem ein entsprechend langes Stück vom oberen Ende der gefüllten Kapillare senkrecht gestellt und damit ein grösseres Druckgefälle von kurzer Dauer erzeugt wird. Auf ähnliche Weise kann man auch die zu Beginn der Chromatographie in der Praxis zu beobachtende [21] Abweichung der Fließmittelbewegung von Gleichung (1) berücksichtigen.

Es hat sich nun gezeigt, dass eine für eine bestimmte Schicht und ein bestimmtes Fließmittel geformte Schraube unverändert auch für andere Fließmittel gebraucht werden kann. Als Beispiel seien hier nur die Daten unserer 4-ml-Fließmittel-Schraube aufgeführt:

Ein 240 cm langer Teflonschlauch (Innendurchmesser: 1,45 mm, Aussendurchmesser: 2 mm) ist in 5,2 engen Windungen um einen Zylinder mit 13 cm Durchmesser gewickelt. Der oben verbleibende Schlauchrest (0,5 Windung) ist steil in die Höhe gebogen und so gekrümmt, dass sich das obere Ende 20 cm über dem unteren befindet. Letzteres ist niveaugleich mit der (horizontal liegenden) Schicht, d. h. beim Arbeiten mit der BN-Kammer<sup>7)</sup> (siehe unten) 47 mm über dem Labortisch. Die gleiche Schraube eignet sich als Behälter für so unterschiedliche Fließmittel wie Heptan, Chloroform, Essigester, Methanol und Wasser zur Chromatographie auf einer 18 cm breiten Schicht von Kieselgel G (Streichdicke 0,25 mm).

*Füllen der Kapillare (Schraube).* Beim Füllen der Kapillare mit dem Auslauf einer Gradienten-Mischbatterie sind gewisse Vorsichtsmassnahmen einzuhalten, damit sich die Form des Gradienten nicht verändert.

Wird die Kapillare etwa zur Hälfte mit einem Lösungsmittel A gefüllt und wird anschliessend ohne Einschluss einer trennenden Luftblase ein Lösungsmittel B sehr rasch eingespritzt, so kann man eine weitgehende Durchmischung beider Flüssigkeiten feststellen. Im Prinzip kann man diese Durchmischungserscheinung ausnützen, um auf einfachste Weise rasch einen Elutionsgradienten herzustellen. Bei Verwendung derselben Kapillare ist lediglich auf Reproduzierbarkeit der Einspritzgeschwindigkeit und auf Luftausschluss zu achten. Fliesst andererseits das Lösungsmittel B sehr langsam ein, so ist nur eine Vermischung im Grenzbereich beider Komponenten zu er-

<sup>7)</sup> Firma C. DESAGA, Heidelberg.

warten. Eine noch geringere Konzentrationsverschiebung tritt auf, wenn sich die Zusammensetzung des Kapillareninhaltes nicht sprunghaft ändert, wie im obigen Beispiel, sondern langsam, wie im Fall eines Gradienten. In Fig. 7 sind zwei praktische Beispiele dargestellt. Die beim Durchströmen der Fließmittel-Schraube erfolgende Veränderung des Gradienten kann vernachlässigt werden, solange man die Füllgeschwindigkeit unter einem bestimmten Grenzwert hält. In unserem Fall liegt dieser bei etwa 0,5 ml/min. Zweckmässig bremst man daher den Auslauf aus der Mischbatterie z. B. durch Zwischenschalten einer etwa 5 cm langen Stahlkapillare von 0,5 mm Innendurchmesser und füllt die Schraube so, dass das Flüssigkeitsniveau der Mischbatterie auf der Höhe des oberen Endes der Schraube liegt. Auf diese Weise erfolgt das Füllen praktisch wartungsfrei. Die gefüllte Schraube wird bis zur Chromatographie z. B. durch Einschieben eines Polyäthylen- oder Glasstabes an einer Öffnung verschlossen.

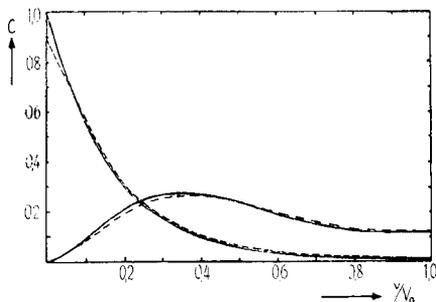


Fig. 7. Beim Durchströmen einer 7,8-ml-Fließmittel-Schraube auftretende Veränderung eines Gradienten

— Konzentration am Schrauben-Einlauf, --- Konzentration am Schrauben-Auslauf. Strömungsgeschwindigkeit 0,3 ml/min, Durchmesser der Kapillare 1,3 mm. Leitfähigkeitsmessungen über Durchfluss-Mikromesszelle

Besitzt man mehrere, vollkommen gleich gewickelte Kapillaren, so kann man gleichzeitig mehr als eine füllen, indem man den Auslauf der Mischbatterie mit einem entsprechenden Verzweigungsstück (einfache Herstellungsmethode siehe unter Fließmittelzuleitung) verbindet.

Mit Nachdruck sei darauf hingewiesen, dass alle Verbindungsstücke vollkommen luftdicht schliessen müssen, um das Einschleppen von Luftbläschen in die Schraube oder die Zuleitung zur Schicht zu vermeiden. Jede Luftblase bedeutet eine Störquelle, die das reibungslose Abfließen des Fließmittels aus der Schraube in Frage stellt. Kupplungsstückchen aus Polyäthylen oder Teflon müssen daher nach einer gewissen Zeit erneuert werden. Am besten eignen sich als Kupplungsstücke ineinandergeschliffene, dickwandige Stahlkapillaren, welche durch eine Feder zusammengehalten werden.

Wie schon unter «Mischbatterie» ausgeführt, kann die Schraube auch in umgekehrter Richtung gefüllt werden (Fig. 1b) und damit eine spiegelbildlich verlaufende Gradientenkurve erhalten werden.

**III. Zuleitung.** – Die Zuleitung hat die Aufgabe, Fließmittel-Schraube und Schicht miteinander zu verbinden und dafür zu sorgen, dass das Fließmittel durch

Kapillarkräfte von der Schicht aufgesogen wird. Man erreicht dies, indem man das in eine Röhre gefasste Fließmittel an der Kontaktstelle mit der Schicht durch eine geeignete Vorrichtung in einen Kapillarfilm formt, dessen Ausdehnung durch die Vorrichtung definiert ist und durch Kapillarkräfte erhalten bleibt. Der Kapillarfilm übt daher eine gewisse regulatorische Tätigkeit aus, indem er bis zu einem gewissen Grade fähig ist, Flüssigkeit aus der Schraube anzusaugen und der Schicht anzubieten. Seine Saugkraft steigt mit abnehmender Filmdicke. Gleichzeitig vergrößert sich aber auch seine Tendenz, die angesogene Flüssigkeit festzuhalten. Die Dicke des Filmes darf daher nicht kleiner werden als der mittlere Porendurchmesser des Schichtmaterials. Bei der Feinkörnigkeit des in der Schicht-Chromatographie eingesetzten Absorbens bleibt zwischen dieser unteren Grenze der erlaubten Filmdicke ein weiterer Spielraum bis zur oberen Grenze, welche bei gewünschter Durchführung von Gradienten-Elution dadurch gegeben ist, dass merkliche Konzentrationsverschiebungen im Raum des Kapillarfilms nicht auftreten sollten.

*Für punktförmige Fließmittelzufuhr (Radialchromatographie).* Man chromatographiert horizontal zwischen zwei Glasplatten (200×200 mm). Die Deckplatte weist im Zentrum eine Bohrung auf ( $\varnothing$  3 mm), durch welche ein genau passendes, dickwandiges Schlauchstück aus Polyäthylen gepresst wird. Man schneidet mit einer Rasierklinge – auf der gegenüberliegenden Glasoberfläche gleitend – das herausragende Schlauchzipfelchen ab und schafft so ein zur Glasplatte planparalleles Schlauchende. Nun wird auf eine zweite Glasplatte als Distanzstück ein 1 mm dicker, z. B. aus Pappe oder Teflon geschnittener Rahmen (200×200 mm, Rahmenbreite 7 mm) gelegt und die Deckplatte darüber geschoben. Man presst den Schlauch durch die Bohrung, bis er auf die unten liegende Glasplatte stößt. Das oben herausragende Schlauchstück wird etwa 4 cm über der Glasplatte etwas ausgezogen, abgeschnitten, rechtwinklig abgebogen und mit einer 15 cm langen Stahlkapillare (Innendurchmesser: 0,7 mm) verbunden, welche an ihrem Ende ein in die Fließmittel-Schraube passendes Kupplungsstück trägt.

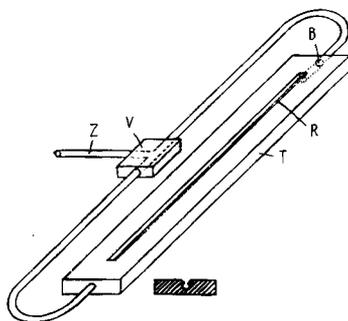


Fig. 8. Zuleitungstreifen für einseitige Fließmittelausbreitung in eine rechteckige Schicht

Das Fließmittel strömt aus der Schraube durch die Zuleitung Z und das Verzweigungsstück V durch Stahlkapillaren, welche in Bohrungen B des Teflonstreifens T stecken, in die keilförmige Verteilerrinne R. Masse siehe Text

*Für streifenförmige Fließmittelzufuhr (Fig. 8).* Ein Teflonstreifen (180×10×1 mm) ist an beiden Enden längs der Mittellinie 6 mm tief angebohrt ( $\varnothing$  0,8 mm). An der aufgerauhten Oberseite des Streifens ist längs seiner Mittellinie von Bohrungsende zu Bohrungsende eine 0,5 mm tiefe, 1 mm breite und 170 mm lange, keilförmige Verteilerrinne eingeritzt, welche beide Bohrungen miteinander verbindet. In den Bohrungen stecken zwei 13 cm lange und 0,9 mm starke Stahlkapillaren (Innendurchmesser: 0,7 mm), die unmittelbar ausserhalb des Streifens um 180° gebogen sind und sich in einem Verzweigungsstück aus Polyäthylen (12×12×5 mm) treffen, das

T-förmig durchbohrt ist ( $\varnothing$  0,8 mm). Im durchgehenden Röhrenteil stecken die vom Teflonstreifen kommenden Stahlkapillaren und in der verbleibenden Öffnung eine 5 cm lange Stahlkapillare mit einem Kupplungsstück, das in die Vorratsröhre (Schraube) passt.

**IV. Trennkammer.** – Für Gradienten-Elution mit Fließmittelkomponenten, die einen merklichen Dampfdruck besitzen, eignet sich nur eine Trennkammer, in welcher der Einfluss der Trennkammeratmosphäre auf die Chromatographie zu vernachlässigen ist. Dies ist der Fall in einer Flachkammer (Sandwichkammer), in der die Höhe der Luftschicht über der Dünnschicht höchstens 1 mm beträgt [11] [22]. Es hat sich ausserdem gezeigt, dass die Resultate besser werden, wenn die während der Chromatographie frei werdende Adsorptionswärme abgeleitet, d. h. wenn die Schicht gekühlt wird. Die Adsorptionswärme tritt ja nicht gleichmässig über die ganze benetzte Schicht verteilt auf, sondern nur unmittelbar hinter der Fließmittelfront und vor allem hinter den «Entmischungslinien»<sup>8)</sup>, von denen ab jeweils eine weitere, polarere Fließmittelkomponente in der mobilen Phase erscheint. Wird die lokal auftretende Wärme nicht abgeleitet, so bewirkt sie eine partielle Verdampfung der mobilen Phase, welche zu ernsthaften Störungen Anlass geben kann.

Um Konvektion der über der Schicht lagernden, bei Gradienten-Elution örtlich verschieden dichten Gase zu vermeiden, ist horizontales Chromatographieren dringend anzuraten.

Alle chromatographischen Experimente dieser Arbeit wurden daher mit der BN-Kammer<sup>7)</sup> mit horizontal liegendem, metallenen Kühlblock durchgeführt, auf den die Sandwichkammer gedrückt wird (vgl. Schema in Fig. 9).

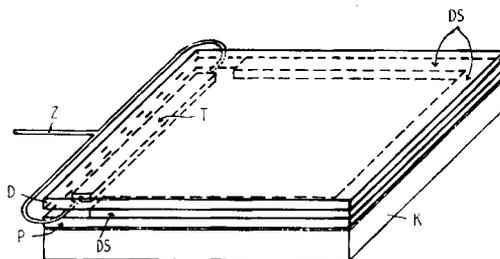


Fig. 9. Schematische Anordnung zur Chromatographie mit einseitiger Fließmittelausbreitung

Die Dünnschichtplatte P liegt mit der Schicht nach oben auf dem Kühlblock K. Die Deckplatte D schirmt die Schicht unter Mitwirkung des Distanzstückes DS ab und drückt gleichzeitig den Zuleitungstreifen T (mit der Verteilerrinne nach unten) gegen die Dünnschichtplatte, so dass das aus der Zuleitung Z in die Verteilerrinne (vgl. Fig. 8) strömende Fließmittel über einen Kapillarfilm auf die Schicht gelangt

**V. Durchführung der Chromatographie.** – Zur Chromatographie mit Gradienten-Elution dürfen nur gleichmässige Schichten benützt werden. Besondere Beachtung ist dem Auftragen der Substanzproben zu schenken, da der Trenneffekt bei Gradienten-Elution durch das Streckenverhältnis  $\varphi$

$$\varphi = \frac{\text{Distanz Eintauchspiegel} - \text{Startpunkt}}{\text{Distanz Eintauchspiegel} - \text{Fließmittelfront}}$$

<sup>8)</sup> Vgl. dazu [1]. Die «Entmischungslinien» lassen sich auch bei Gradienten-Elution nicht vermeiden.

ganz erheblich beeinflusst wird [1]. Legt man keinen Wert auf systematische Ausnützung [1] dieses Parameters, so ist  $\varphi$  möglichst konstant zu halten.

Zur *Radialchromatographie* werden die Substanzproben auf einer Kreislinie ( $\varnothing = 1,5$  cm) um das Plattenzentrum aufgetragen, so dicht, dass sich die einzelnen Startflecke berühren. Man entfernt die Schicht an den Rändern der Platte in 1 cm breiten Streifen, worauf der als Distanzstück dienende Rahmen (siehe unter «Zuleitung») gelegt wird. Man schliesst die Sandwichkammer durch Auflegen der Deckplatte mit zentraler Zuleitung (siehe oben) und fixiert die Anordnung mit Hilfe der Feststeller auf dem Kühlblock der BN-Kammer<sup>7</sup>).

Zur «normalen Dünnschichtchromatographie» (seitliche Fließmittelfuhr, vgl. Schema Fig. 9) wird die Dünnschichtplatte wie üblich für die BN-Kammer<sup>7</sup>) vorbereitet, jedoch trägt man die Substanzproben 3,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt auf und streift die Schicht 2 cm breit vom unteren Plattenrand ab. Man legt die BN-Deckplatte auf und schiebt den Teflon-Zuführungsstreifen mit der Verteillrinne nach unten zwischen Dünnschicht- und Deckplatte auf dem blankgewischtem Streifen so weit vor, dass er 1–2 mm über die Schicht ragt. Man fixiert die Anordnung mit Hilfe der Feststeller. Zweckmässig beschwert man die Deckplatte über dem Zuführungsstreifen, um das Kapillarfilmvolumen zu verringern.

Nun verbindet man das untere Ende der vollständig gefüllten und an ihrem oberen Ende verschlossenen Fließmittel-Schraube mit der Zuleitung und öffnet den Schrauben-Verschluss. Sogleich strömt das Fließmittel in die Zuleitung, bildet den Kapillarfilm zwischen Teflonstreifen und Dünnschichtplatte aus, und die Chromatographie beginnt. Wenn die Schraube richtig geformt ist, dann bleibt der Kapillarfilm während der ganzen Chromatographie in seiner ursprünglichen Ausdehnung sichtbar, trocknet weder ein noch weitet sich zu einem «See», und die Chromatographie verläuft wartungsfrei. Emulsionen und Luftblasen in Schraube oder Zuleitung können plötzliches Austrocknen bewirken.

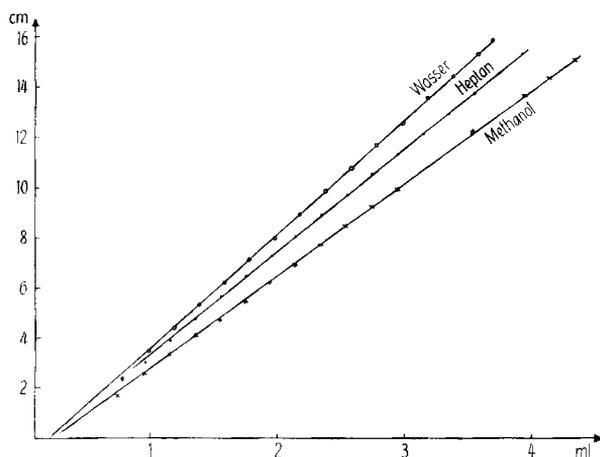


Fig. 10. Beziehung zwischen dem aus der Schraube gelaufenen Fließmittelvolumen und der Laufstrecke des Fließmittels bei einseitiger Fließmittelausbreitung in 17 cm breite Schichten aus Kieselgel G 15 min bei 110° aktivierte Schichten bei Heptan und Methanol; lufttrockene Schicht (rel. Luftfeuchtigkeit 30%) bei Wasser

Fig. 10 zeigt, dass ausgelaufenes Fließmittelvolumen und Laufstrecke auf dem Chromatogramm einander tatsächlich proportional sind. Im Proportionalitätsfaktor ist der Querschnitt der Schicht enthalten. Da sich die Schichtdicke vorläufig nicht sehr gut reproduzieren lässt ( $\sim \pm 15\%$ !), sind Vergleiche der Faktoren von Platte zu Platte mit erheblichen Fehlern belastet.

**VI. Anwendungsbeispiele.** – Fig. 11 illustriert die Trennwirkung der Gradienten-Elution bei Radialchromatographie dreier Gemische von unpolaren und polaren Farbstoffen. Obwohl eine derartige Chromatographie wesentlich einfacher auszuführen ist wie im Fall einer linearen Fließmittelzuführung, ist dies unseres Wissens bisher noch nie geschehen. Die Trennwirkung bei diesem Verfahren ist so hoch, dass eine drastische Laufstreckenverkürzung, welche bekanntlich enorme Vorteile mit sich bringt, möglich erscheint.

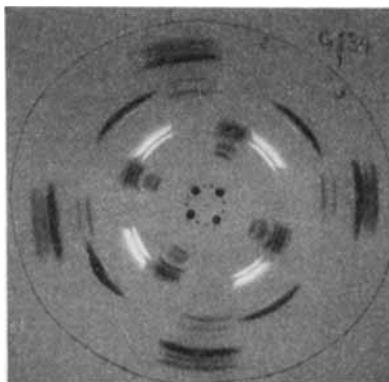


Fig. 11. Tageslicht/UV.-Photographie eines Radialchromatogramms von unpolaren und polaren Farbstoffen mit Gradienten-Elution auf Kieselgel G (MERCK, 10 min bei  $110^\circ$  aktiviert)

Farbstoffgemisch 1: Sudanschwarz B (MERCK), Cibacetrot B, Cibacetorange 2R, Artisilblau BSQ, Artisilblaugrün  $\text{\textcircled{S}}$

Farbstoffgemisch 2: Phenolrot (RIEDEL), Nilblausulfat (CHROMA), Malachitgrün (MERCK), Rhodamin B (MICHROME-BRAND), Kresylechtviolett (CHROMA).

Farbstoffgemisch 3: Methylrot (RIEDEL), Rhodamin 6G (MERCK), Naphtholgrün B (FLUKA).

Fließmittel: aus 4-Kammer-Mischbatterie, I und II: Chloroform/Methanol/Wasser (5:5:1 v/v); III: Essigsäuremethylester; IV: Benzol. 4-ml-Schraube gefüllt nach Fig. 1b. Laufradius 9 cm, wobei  $v/V_0 = 0,58$ .

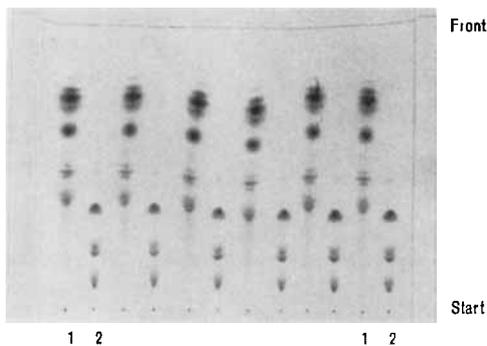


Fig. 12a. Reproduzierbarkeit der Gradienten-Elution zweier Farbstoffgemische längs einer 18 cm breiten Schicht aus Kieselgel G (10 min bei  $110^\circ$  aktiviert)

Farbstoffgemisch 1: Sudanschwarz B (MERCK), Cibacetrot B, Artisilblau BSQ, Artisilblaugrün  $\text{\textcircled{S}}$   
 Farbstoffgemisch 2: Methylrot (RIEDEL), Malachitgrün (MERCK), Brilliantcresylblau (RIEDEL)  
 Fließmittel siehe Fig. 12b.

Die gleichförmige Gradienten-Verteilung längs der ganzen Schicht bei linearer Fließmittelzufuhr wird in Fig. 12 demonstriert. Grössere Abweichungen in der Plattenmitte sind in der Regel auf verzogene Glasplatten und ungleichmässiges Anpressen des Zuführungstreifens (ungleichmässiges Kapillarfilmvolumen) zurückzuführen. Solche Chromatogramme kann man aber in vielen Fällen auch dann noch auswerten, da häufig Entmischungslinien sichtbar sind, die man als Leitlinien benutzen darf.

Um die Reproduzierbarkeit des Verfahrens zu belegen wurde ein und derselbe Versuch nacheinander dreimal durchgeführt. Ausschnitte der erhaltenen Chromatogramme (jeweils vom rechten Rand) sind in Fig. 13 zusammengestellt.

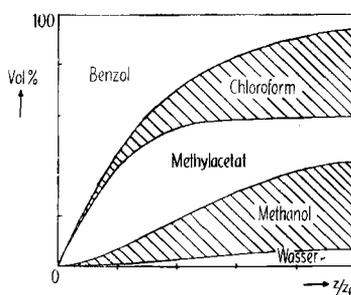


Fig. 12b. Fließmittelzusammensetzung am Eintauchspiegel der Chromatogramme von Fig. 12a und 13 in Abhängigkeit vom Verhältnis: momentane Fließmittellaufstrecke  $z$  / Gesamtlauflänge  $l$ . Gradient aus 4-Kammer-Mischbatterie: I: Benzol, II: Methylacetat, III und IV: Chloroform/Methanol/Wasser (5:5:1 v/v). 4-ml-Schraube, gefüllt nach Fig. 1a

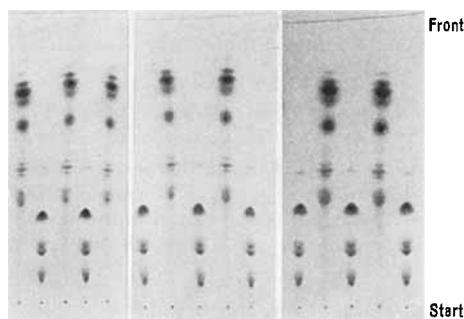


Fig. 13. Reproduzierbarkeit der Gradienten-Elution auf verschiedenen Platten. Ausschnitte jeweils vom rechten Rand dreier nacheinander hergestellter, 18 cm breiter Chromatogramme. Farbstoffe und übrige Daten wie in Fig. 12

Trennungen von Lipidgemischen zeigt Fig. 14. Eine ähnliche Trennwirkung wird bei Chromatographie ohne Gradienten-Elution auch nicht entfernt erreicht.

Weitere Anwendungen, z. B. Direkt-Chromatographie von Naturstoffgemischen aus Gewebsschnitten und Ionenaustauschchromatographie von Nucleotiden sind in Vorbereitung, und eine Vorrichtung für das beschriebene Verfahren wird demnächst im Handel<sup>7)</sup> erhältlich sein. – Die Methode lässt sich ohne Schwierigkeiten auch auf die Papierchromatographie übertragen.

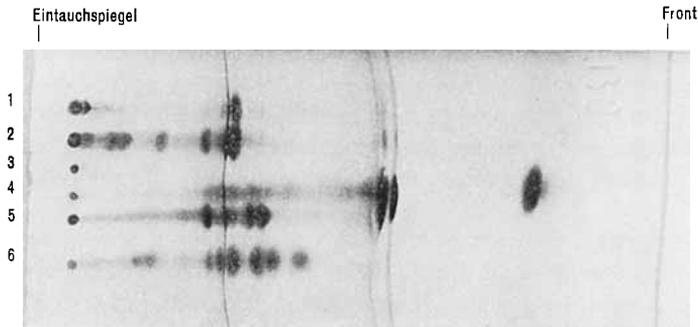


Fig. 14a. *Gradienten-Elution von Lipidgemischen auf Kieselgel G (MERCK, 15 min bei 110° aktiviert)*

Probe 1: Lipid-Extrakt von Maushirn

Probe 2: Lipid-Extrakt von weisser Substanz, Menschenhirn

Probe 3: Lecithin

Probe 4: Squalen, O-Stearylcholesterin, Ölsäure-Methylester

Probe 5: Tri-, Diolein (alle Isomere) und Monoolein

Probe 6: Testgemisch = Farbstoffgemisch 1 aus Fig. 11

Fließmittel siehe Fig. 14b; Laufstrecke  $z_f = 17$  cm, wobei  $v/V_0 = 0,77$

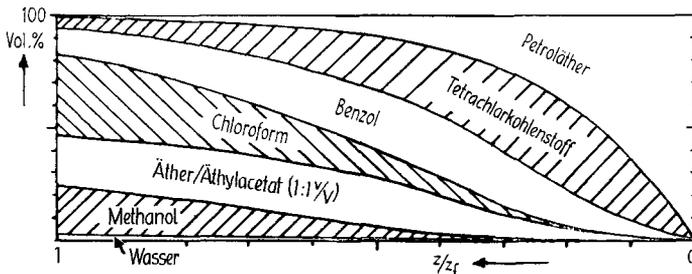


Fig. 14b. *Fließmittelzusammensetzung am Eintauchspiegel des Chromatogramms von Fig. 14a in Abhängigkeit vom Verhältnis: momentane Fließmittelaufstrecke  $z$  | Gesamtlaufstrecke  $z_f$*

Gradient aus 6-Kammer-Mischbatterie mit I: Petroläther (Sdp. 40–60°), II: Tetrachlorkohlenstoff, III: Benzol, IV: Diäthyläther/Äthylacetat (1:1 v/v), V: Chloroform/Methanol/Eisessig (75:25:1,5 v/v), VI: Chloroform/Methanol/Wasser (50:50:10 v/v). 6-ml-Schraube, gefüllt nach Fig. 1a. Bei dem in der Figur gewählten Maßstab ist die Konzentration des Eisessigs nicht sichtbar

#### SUMMARY

Sheet-chromatography (thin-layer- or paper-chromatography) with gradient-elution is easily performed by filling a capillary tubing solvent reservoir with effluent of a mixing battery (fig. 1a, b) and connecting the reservoir with a small solvent-distributor laying on the sheet (fig. 1c). Hydrostatic pressure as well as suction by capillary forces regulate the solvent flow into the sheet in such a way, that all liquid leaving the reservoir is immediately picked up by the adsorbens. A simple relation therefore exists between the distance travelled by the solvent front and the volume flown out of the reservoir (fig. 10). If the composition of the mixing battery effluent is given, the solvent composition at the «immersion line» is known any time during chromatography. A micro mixing battery with up to 7 closed chambers (fig. 3) has been proved useful to produce quickly concentration gradients of liquids differing in den-

sity. The gradient-elution is demonstrated to be reproducible on a thinlayer plate of  $200 \times 200$  mm along the starting line (fig. 12) as well as on different thin-layer plates (fig. 13). The method has been applied to mixtures of dyestuffs and mixtures of lipids and is able to separate e.g. squalen, O-stearyl cholesterol, tri-, di-, monoglycerides, cholesterol, and polar lipids as phospholipids (fig. 14). The separation power of a gradient-elution is highest in radial chromatography (fig. 11).

The technique is thought to be useful not only for gradient-elution but also for all chromatographic problems which can be resolved by measuring the volume of solvent sucked up by the adsorbens. In continuous flow technique, for instance, partition coefficients of substances may directly be measured.

Forschungslaboratorium der  
Neurologischen Universitätsklinik, Basel

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. NIEDERWIESER & M. BRENNER, *Experientia* 21, 50, 105 (1965).
- [2] C. G. HONEGGER, *Helv.* 47, 2384 (1964).
- [3] A. NIEDERWIESER & C. G. HONEGGER, in C. GIDDINGS & R. A. KELLER «Advances in Chromatography», Vol. II, Marcel Dekker Inc., New York 1965, im Druck.
- [4] Vgl. dazu C. G. HONEGGER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 22, C127 (1964).
- [5] M. LEDERER, *Nature* 172, 727 (1953).
- [6] N. MUIĆ, A. MENIGA & M. FLEŠ, *Arch. Biochemistry Biophysics* 77, 20 (1958); M. PIANTANIDA, A. MENIGA & N. MUIĆ, *ibid.* 57, 334 (1955); M. PIANTANIDA & N. MUIĆ, *ibid.* 46, 110 (1953); A. MENIGA & N. MUIĆ, *Analyt. Biochemistry* 7, 502 (1960).
- [7] F. FRANKS, *Analyst* 81, 384 (1956).
- [8] TH. WIELAND & H. DETERMANN, *Experientia* 18, 431 (1962).
- [9] S. M. RYBICKA, *Chemistry & Ind.* 1962, 308.
- [10] R. G. STICKLAND, *Analyt. Biochemistry* 10, 108 (1965).
- [11] M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 17, 237 (1961).
- [12] R. H. MÜLLER & D. L. CLEGG, *Analyt. Chemistry* 23, 396, 406, 408 (1951).
- [13] A. L. RUOFF & J. C. GIDDINGS, *J. Chromatogr.* 3, 438 (1960).
- [14] J. C. GIDDINGS, G. H. STEWART & A. L. RUOFF, *J. Chromatogr.* 3, 239 (1960).
- [15] M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI & R. WEBER, in E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», S. 110ff., Springer Verlag, Heidelberg 1962. »
- [16] A. J. P. MARTIN, *Biochem. Soc. Symposia (Cambridge)* 3, 4 (1950); *Ann. Rev. Biochemistry* 19, 518 (1950).
- [17] Vgl. z. B.: R. S. ALM, R. J. P. WILLIAMS & A. TISELIUS, *Acta chem. scand.* 6, 826 (1952); R. J. P. WILLIAMS, *Analyst* 77, 905 (1952); T. K. LAKSHMANAN & S. LIEBERMAN, *Arch. Biochemistry Biophysics* 53, 258 (1954); G. J. NELSON, *Analyt. Biochemistry* 5, 7 (1963); S. KATZ, *Analyt. Biochemistry* 5, 7 (1963); P. VESTERGAARD, *J. Chromatogr.* 3, 560 (1960); R. M. BOCK, N. S. LING, *Analyt. Chemistry* 26, 1543 (1954); J. J. WREN, *Nature* 184, 816 (1959); K. A. PIEZ, *Analyt. Chemistry* 28, 1451 (1956); D. F. HOELZL WALLACH & G. L. NORDBY, *Biochim. biophys. Acta* 70, 188 (1963); V. DERREUX, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 68, 789 (1949); C. C. CURTAIN, *J. Chromatogr.* 7, 24 (1962).
- [18] E. A. PETERSON & H. A. SOBER, *Analyt. Chemistry* 31, 857 (1959); E. A. PETERSON & J. ROWLAND, *J. Chromatogr.* 5, 330 (1961).
- [19] J. J. WREN, *J. Chromatogr.* 12, 32 (1963).
- [20] Siehe [15], Seite 109.
- [21] Siehe [12], Seite 402, 404.
- [22] E. STAHL «Dünnschichtchromatographie», S. 20, Springer Verlag, Heidelberg 1962.