

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN ERGEBNISSEN UND DER TRENNFÄHIGKEIT VON ZELLOSESÄULEN*

O.-E. SCHULTZ UND R. COMBERG

*Pharmazeutisches Institut der Universität Kiel (Deutschland)***

(Eingegangen den 7. Februar 1967; modifiziert den 31. Juli 1967)

EINFÜHRUNG

In der Analytik und präparativen Darstellung von Naturstoffen ist die Chromatographie nach wie vor eines der wichtigsten Verfahren. Dient die Papier- und Dünnschichtchromatographie im allgemeinen dem Nachweis der Substanzen, verwendet man die Säulenchromatographie beispielsweise zur präparativen Darstellung der analytisch nachgewiesenen Stoffe.

Die orientierenden Papierchromatogramme werden in diesem Zusammenhang als "Pilot"-Chromatogramme¹ bezeichnet.

Es stellte sich die Frage, ob einfache Beziehungen existieren, die es ermöglichen, chromatographische Ergebnisse der Papierchromatographie auf Zellosensäulen zu übertragen.

Über die Theorie der Verteilungschromatographie an Säulen gibt es eine grosse Zahl von Arbeiten. MARTIN UND SYNGE², MAYER UND TOMPKINS³, VERZELE UND ALDERWEIRELDT⁴ legten ihrer Betrachtungsweise einen stufenweisen Transport der Substanz in der Flüssigkeitssäule zugrunde, wobei die letztgenannten Autoren, angeregt durch die Arbeiten von CRAIG⁵ die Übertragbarkeit der Theorie der Counter Current Distribution auf die Säulenchromatographie experimentell bestätigen konnten. Die Klärung dieser Zusammenhänge ergab weiterhin die Möglichkeit, eine Funktion zur Trennung zweier Substanzen zu beschreiben. Die Ableitung der sog. Trennfunktion geht zurück auf Arbeiten von STENE⁶, die später von HECKER⁷ vervollkommen wurden.

Aus der Vorstellung eines stufenweisen Transportes der Substanz in der Flüssigkeitssäule leitet sich der von MARTIN UND SYNGE² in die Theorie der Chromatographie eingeführte Begriff des HETP (height equivalent of a theoretical plate) ab. Die Länge der Säule, dividiert durch die Höhe eines theoretischen Bodens ergibt die Bodenzahl B , die ein Mass für die Trennleistung der Säule ist. Aus der Höhe des Maximums einer Elutionskurve, oder aus der Bandbreite, jeweils bezogen auf die Retentionsvolumina, bzw. Retentionszeiten oder aus dem Trennungsgrad zweier Substanzen kann die theoretische Bodenzahl ermittelt werden.

BÜCHI UND SOLIVA⁸ veröffentlichten eine Arbeit, in der die Papier- und Säulenchromatographie nebeneinander untersucht wurden. Die Autoren prüften in unterschiedlich gepufferten Systemen die Möglichkeit einer direkten Übertragung von Re-

* Teil der Dissertation von R. COMBERG, Kiel, 1963.

** Direktor Prof. Dr. O.-E. SCHULTZ.

sultaten beider Methoden, ohne jedoch allgemein gültige Aussagen zu machen. Sie stellten fest, dass für eine direkte Übertragung unbedingt vorausgesetzt werden muss, dass beiden chromatographischen Verfahren Verteilungsprozesse zugrunde liegen.

Ziel dieser Arbeit war es, an Hand von Experimenten die Allgemeingültigkeit einer Übertragungsformel zu untersuchen, um, wie eingangs erwähnt, die Möglichkeit zu besitzen, Ergebnisse der Papierchromatographie direkt auf die Säule zu übertragen.

DIE RETENTIONSFAKTOREN UND DER ÜBERTRAGUNGSFAKTOR

Papierchromatographie (PC)

Der R_F -Wert wird nach MARTIN UND SYNGE² definiert als:

$$R_F = \frac{A_i}{A_i + \alpha A_s} \tag{1}$$

A_i = Volumen der mobilen Phase,

A_s = Volumen der stationären Phase,

α = Verteilungskoeffizient (Konzentration in der stationären Phase/Konzentration in der mobilen Phase).

Säulenchromatographie (SC)

Der Retentionsfaktor R wird um den Summand $A_i/(A_i + \alpha A_s)$ erweitert.

A_i = Volumen der inaktiven festen Phase.

Der Retentionsfaktor R erhält die Form:

$$R = \frac{A_i + A_s + A_i}{A_i + \alpha A_s} \tag{2}$$

Die Kenntnis des als konstant vorausgesetzten Verteilungskoeffizienten α und der als konstant anzusehenden Grössen A_i , A_s und A_i ermöglicht die Berechnung der R_F - und R -Werte. Dabei treten eine Reihe von störenden Faktoren auf, die, wenn sie im Experiment nicht ausgeschaltet werden, die Ergebnisse beeinflussen. Tabelle I zeigt einen Überblick über die Beeinflussung möglicher Fehlerquellen.

TABELLE I

<i>Beeinflussung durch Änderung der</i>	<i>PC</i>	<i>Gemindert durch</i>	<i>SC</i>	<i>Gemindert durch</i>
Kapillarität	nur bei unterschiedl. Papier-sorten	Standardisierung	unterschiedl. Zellulosesorten	Standardisierung
Arbeitstemperatur	geringer Einfluss	Thermokonstanz	grosser Einfluss	Thermokonstanz
Lösungsmittel- [*] zusammensetzung	grosser Einfluss	absteigend. Methode	wenig Einfluss	längeres Waschen
Substanzmenge	grosser Einfluss	geringe Mengen	wie PC	wie PC
Phasenverhältnis	grosser Einfluss, besonders in Extrembereichen	Wahl eines mittl. Arbeitsbereiches	wie PC	wie PC

* Unter Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung soll die Änderung während des Chromatographieprozesses verstanden werden.

Es wird deutlich, dass die quantitative Erfassung der beeinflussenden Faktoren sehr kompliziert ist. Daher lag die Möglichkeit nahe, das Verhalten einer Substanz dadurch zu normieren, dass nach einer Konventionsmethode gearbeitet wird. Es wurden somit, nachdem bestimmte Voraussetzungen gemacht wurden, die ursprünglichen Definitionen der R_F - bzw. R -Werte beibehalten.

Für die Säulenchromatographie gelten darüberhinaus folgende Formulierungen:

$$R = \frac{B}{N_{\max}} \quad (3)$$

B = Bodenzahl (Trennstufenzahl) einer Säule

N_{\max} = Anzahl der Verteilungsschritte, bis das Konzentrationsmaximum des Stoffes austritt.

$$N_{\max} = \frac{V_{\max}}{V_{\text{HETP}}} \quad (4)$$

V_{\max} = Volumen des Eluates vom Start bis zum Konzentrationsmaximum der Elutionskurve,

V_{HETP} = Volumen der mobilen Phase eines theoretischen Bodens

somit:

$$V_{\text{HETP}} = \frac{V_0}{B}; V_0 = V_{\text{HETP}} \cdot B \quad (5)$$

darin ist:

V_0 = Volumen der mobilen Phase der Säule.

Aus (3), (4), (5) folgt:

$$R = \frac{V_0}{V_{\max}} \quad (6)$$

Führt man anstelle des Verteilungskoeffizienten α die Verteilungszahl K ein, wobei:

$$K = \frac{\alpha A_s}{A_l} = \frac{1}{R \text{ (bzw. } R_F)} - 1 \quad (7)$$

erhält man eine volumenabhängige Kennzahl, die die Unterschiede zwischen den R_F und R -Werten deutlich macht.

Der Quotient aus den Verteilungszahlen einer Substanz in zwei verschiedenen Systemen wird als Übertragungsfaktor F bezeichnet.

$$\frac{K_{\text{Säule}}}{K_{\text{Papier}}} = \frac{\frac{\alpha A_s}{A_l} \text{ (Säule)}}{\frac{\alpha A_s}{A_l} \text{ (Papier)}} = F \quad (8)$$

Durch Einsetzen von (6) und (7) erhält (8) die Form (Übertragungsgleichung):

$$F = \frac{\frac{V_{\max}}{V_0} - 1}{\frac{1}{R_F} - 1} \quad (9)$$

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Übertragungsgleichung (9) wurde mit Hilfe von Reihenexperimenten überprüft.

Es wurden mehrere Substanzen ausgesucht, die in den gewählten Lösungsmittelsystemen möglichst unterschiedliche R_F -Werte besaßen. Die R_F -Werte wurden unter gleichen Bedingungen absteigend bestimmt: gleiche Papiersorte, gleiches Lösungsmittelsystem, gleiche Laufstrecke, gleiche Klimatisierungsdauer. Ausserdem wurde in einem thermokonstanten Raum gearbeitet. Die ausgewählten Substanzen wurden danach in einzelnen Versuchen auf der Verteilungssäule chromatographiert. Als V_{\max} wurden die Mittelpunkte der Elutionskurven gemessen. Zur Bestimmung der mobilen Phase wurde mit jeder Testsubstanz ein Farbstoff, der mit der Lösungsmittelfront wanderte, mitgestartet. Die Überprüfung der Ergebnisse konnte nach zwei Gesichtspunkten vorgenommen werden:

(1) Die Berechnung von F wurde nach (9) mit allen V_{\max} -Werten einzeln durchgeführt. Als Volumen der mobilen Phase wurde wegen der Abweichungen, die sich auf einer Verteilungssäule für die Phasenverhältnisse ergeben, ein Mittelwert gewählt.

(2) Zur Gegenüberstellung der Retentionswerte vom Papier- und vom Säulenchromatogramm war für F der Mittelwert aller paarweise berechneter Einzelwerte benutzt worden. Der Kurvenverlauf wurde rechnerisch ermittelt.

F gibt demnach die Abweichung vom 1 über einen bestimmten, noch zu definierenden Gültigkeitsbereich an. Trägt man die R -Werte gegen die R_F -Werte auf, erhält man den Verlauf der theoretischen F -Kurven (Fig. 1).

Für Beispiele 1-4, siehe Tabellen II-V und Fig. 2-5.

Bei den bisher aufgeführten Übertragungsbeispielen handelte es sich stets um zweiphasige Lösungsmittelsysteme. In der Chromatographie werden aber auch gute Ergebnisse mit einfachen, wassermischbaren Lösungsmitteln erzielt. Die Verteilung des Stoffes muss hierbei zwischen dem strömenden und dem fest eingelagerten Lösungsmittel erfolgen. Die Übertragung papierchromatographischer Ergebnisse auf die Säule war in derartigen Systemen nicht von vornherein sicher. Deshalb wurde

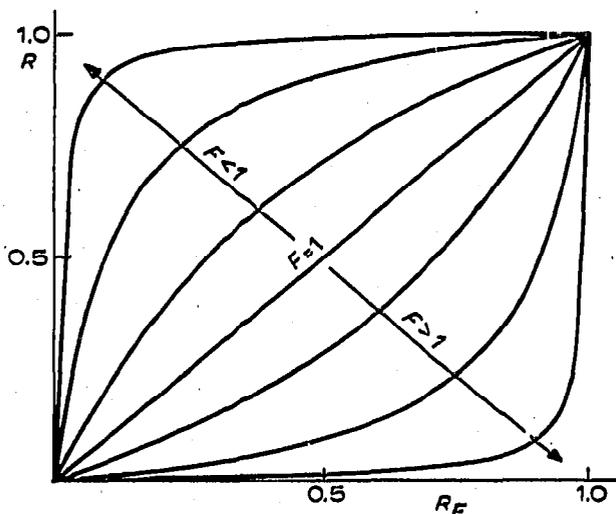


Fig. 1. F erfasst als empirische Grösse alle Faktoren, die eine Abweichung von 1 verursachen. Man findet allgemein, dass der relative Anteil der mobilen Phase in einer Zellsäule um so grösser (kleiner) ist, je kleiner (grösser) die Werte von F werden.

TABELLE II

BEISPIEL 1

Lösungsmittel: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5, VT).

Frontstoff: Dichlorphenolindophenol.

Mittelwert V_0 : 364 ml.

Säulendurchmesser: 3.1 cm.

Trägersubstanz: 200.0 Cellulosepulver.

Substanz	V_{max} (ml)	R_F	R	F
Ciba rot	1448	0.1	0.25	0.334
Glucose	913	0.22	0.40	0.424
Xylose	780	0.27	0.467	0.423
Rhamnose	630	0.37	0.58	0.43

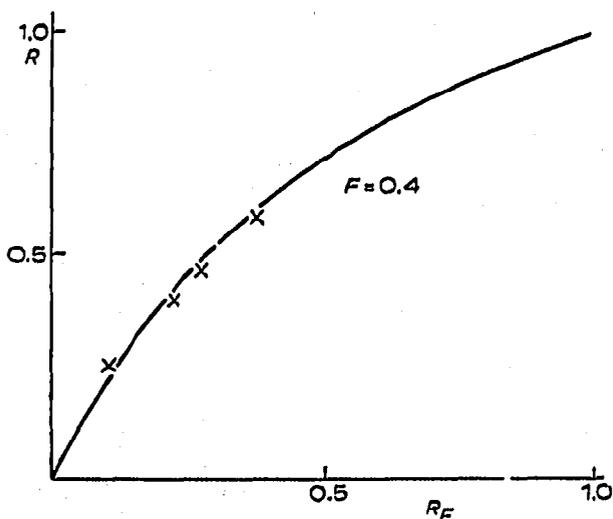
Mittelwert von $F = 0.40$.

Fig. 2. Kurvenbild bei Beispiel 1.

TABELLE III

BEISPIEL 2

Lösungsmittel: Essigester-Eisessig-Wasser (3:1:3, VT).

Frontstoff: Nachtblau.

Mittelwert V_0 : 191 ml.

Säulendurchmesser: 2.6 cm.

Trägersubstanz: 100.0 Cellulosepulver.

Substanz	V_{max} (ml)	R_F	R	F
Ciba grün	1440	0.11	0.133	0.81
Rhamnose	860	0.20	0.22	0.87
Methylenblau	455	0.38	0.42	0.85

Mittelwert von $F = 0.84$.

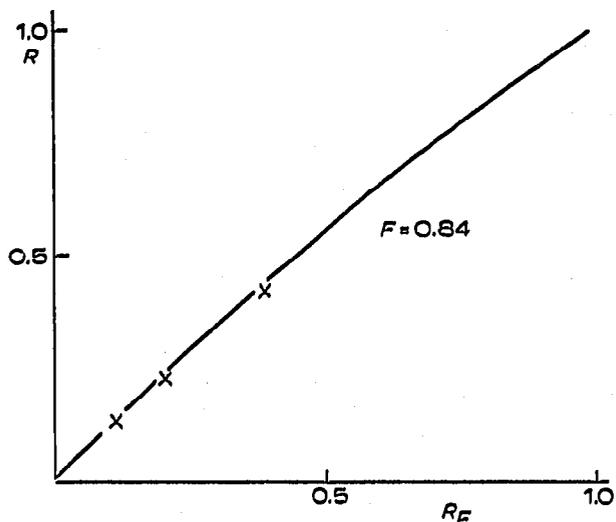


Fig. 3. Kurvenbild bei Beispiel 2.

TABELLE IV

BEISPIEL 3

Lösungsmittel: Chloroform-Eisessig (2:2.5, VT, wassergesättigt).

Frontstoff: Nachtblau.

Mittelwert V_0 : 95 ml.

Säulendurchmesser: 2.2 cm.

Trägersubstanz: 50.0 Cellulosepulver.

Substanz	V_{max} (ml)	R_F	R	F
Glucose	321	0.21	0.30	0.635
Xylose	266	0.29	0.34	0.735
Rhamnose	202	0.40	0.47	0.75
Ciba grün	125	0.68	0.76	0.68

Mittelwert von $F = 0.70$.

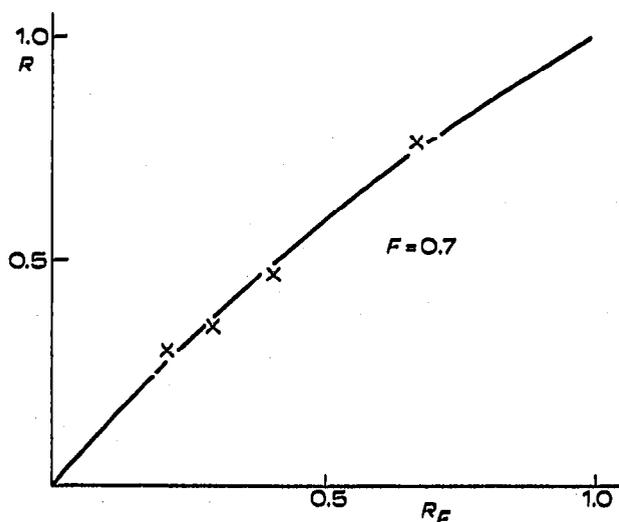


Fig. 4. Kurvenbild bei Beispiel 3.

TABELLE V

BEISPIEL 4

Lösungsmittel: Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5, VT).

Frontstoff: fettlöslich Braun.

Mittelwert V_0 : 116 ml.

Säulendurchmesser: 2.2 cm.

Trägersubstanz: 60.0 Cellulose.

Substanz	V_{max} (ml)	R_F	R	F
Glucose	319	0.19	0.37	0.41
Xylose	269	0.26	0.43	0.465
Rhamnose	204	0.36	0.57	0.41
Ciba grün	169	0.4	0.69	0.31

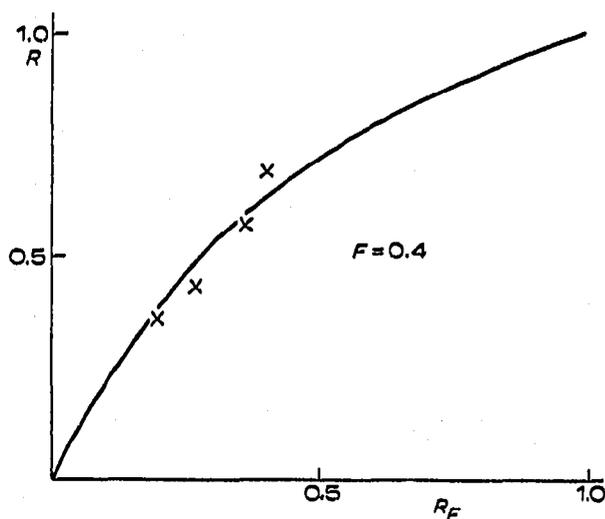
Mittelwert von $F = 0.4$.

Fig. 5. Kurvenbild bei Beispiel 4.

TABELLE VI

BEISPIEL 5

Lösungsmittel: Isopropanol-Äthylacetat-Wasser (4:4:1.2, VT).

Frontstoff: fettlöslich Braun.

Mittelwert V_0 : 90 ml.

Säulendurchmesser: 2.2 cm.

Trägersubstanz: 50.0 Cellulosepulver.

Substanz	V_{max} (ml)	R_F	R	F
Glucose	449	0.14	0.20	0.65
Mannose	343	0.19	0.26	0.66
Xylose	285	0.24	0.32	0.69
Rhamnose	180	0.37	0.50	0.59

Mittelwert von $F = 0.65$.

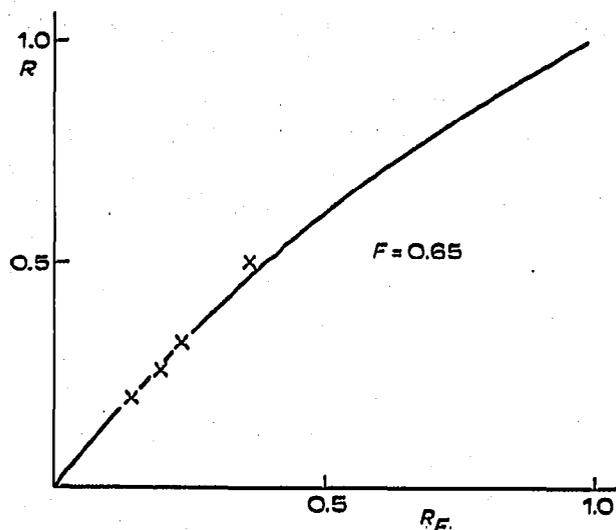


Fig. 6. Kurvenbild bei Beispiel 5.

TABELLE VII

Nr.	Papiersorte	R_F -Werte			\bar{F}
I	2043b	0.15	0.43	0.31	0.745
	2040a	0.19	0.50	0.38	
	F	0.75	0.75	0.735	
II	2040bM	0.55	0.20	0.68	0.83
	2040a	0.60	0.23	0.72	
	F	0.82	0.835	0.835	
III	2040bM	0.20	0.51	0.41	0.695
	2043a	0.15	0.42	0.32	
	F	0.705	0.695	0.68	

hierfür ebenfalls eine Versuchsreihe angesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Anwendbarkeit der Übertragungsgleichung auch hierfür möglich ist (Beispiel 5, siehe Tabelle VI und die dazu gehörende Kurve, Fig. 6).

Abhängigkeit des Faktors F vom Trägerstoff

Je nach Art der Trägersubstanzen wird die Wasseraufnahme und damit die stationäre Phase verschieden gross sein. Von dem Mengenverhältnis der stationären zu der mobilen Phase hängt der Faktor F ab. In Analogie zur Übertragung von papierchromatographischen R_F -Werten auf die Säule ist eine Übertragung von R_F -Werten auf unterschiedliche Papiere möglich.

Der Übertragungsfaktor (9) erhält danach folgende Form:

$$F = \frac{\frac{1}{R_{F1}} - 1}{\frac{1}{R_{F2}} - 1} \tag{10}$$

Durch die Kenntnis dieser quantitativen Zusammenhänge ist es möglich, R_F -Werte zu objektivieren.

Auf verschiedenen Papiersorten der Fa. Schleicher & Schüll wurden jeweils gleiche Substanzen mit dem gleichen Fließmittel chromatographiert. Die R_F -Werte, die sich dabei ergaben, wurden in Tabelle VII paarweise zusammengestellt und zur Berechnung des dazugehörigen Übertragungsfaktors (10) herangezogen.

DISKUSSION

Die experimentellen Beispiele zeigen, dass es möglich ist, Retentionswerte aus zwei verschiedenen Systemen miteinander zu vergleichen, denn es kann angenommen werden, dass der empirisch abgeleitete Retentionsfaktor für den gesamten Bereich Gültigkeit besitzt.

Die mittels des Übertragungsfaktors mögliche Vorkalkulation von Retentionswerten spielt insbesondere bei der Berechnung von Retentionsvolumen in der Säulenchromatographie eine Rolle. Nach Bestimmung der R_F -Werte im Papierchromatogramm kann V_{\max} aus Gleichung (9) berechnet werden:

$$V_{\max} = \frac{[R_F + F(1 - R_F)]}{R_F}$$

Wird von der von anderen Stoffen zu trennenden Substanz ein bestimmter Reinheitsgrad verlangt, ist nicht nur die Kenntnis des Retentionsvolumens, sondern auch die der zu erwartenden Breite der Elutionskurve notwendig.

Wenn angenommen wird, dass der Papier- und Säulenchromatographie Verteilungsprozesse zugrunde liegen, können beide Verfahren mit dem Prozess einer "Craig"-Verteilung verglichen werden. Dabei ist Voraussetzung, dass sich nach jedem Einzelprozess ein Gleichgewicht einstellt, d.h., dass ein vollkommener Stoffaustausch stattfindet. Nach HECKER⁷ ist mit Hilfe des Binominalansatzes die Möglichkeit gegeben, den Trenneffekt für zwei Substanzen mit unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten zu berechnen. COMBERG⁹ zeigte, dass die für die "Craig"-Verteilung formulierte Trennfunktion auch für die Säulenchromatographie gilt. Somit können, nachdem die R_F -Werte bestimmt wurden, das Trennproblem berechnet und die Dimensionen der Säule entsprechend gewählt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

An Hand experimenteller Beispiele wird die Übertragung von papierchromatographischen Größen (R_F -Werten) auf die Cellulose-Flüssigkeits-Chromatographiesäule erörtert.

Die Bedeutung eines empirisch ermittelten Übertragungsfaktors wird diskutiert. Die Bestimmung dieses Übertragungsfaktors erfordert Testchromatogramme für beide Systeme. Da die Verteilungschromatographie in Cellulosesäulen einen erheblich höheren Arbeits- und Substanzaufwand erfordert als die Papierchromatographie, wird auf die Bedeutung der Vorkalkulation von Elutionskurven hingewiesen. Die Kenntnis des Übertragungsfaktors ermöglicht es weiterhin, die Dimensionen der Cellulosesäule, besonders im Hinblick auf die Trennprobleme, entsprechend zu wählen.

SUMMARY

The transfer of R_F values, obtained by paper chromatography, to large cellulose columns is discussed. An empirical transfer coefficient is introduced, using pilot chromatograms in both systems. Since chromatography in columns involves considerable experimental work and expenditure of substances, the significance of a transfer coefficient is indicated. With this transfer coefficient it is not only possible to calculate retention times (or volumes) of the elution curves, but also to select suitable dimensions of the cellulose columns, especially in view of the separation problem.

LITERATUR

- 1 H. BRINDLE, J. E. CARLESS UND H. B. WOODHEAD, *J. Pharm. Pharmacol.*, 3 (1951) 793.
- 2 A. J. P. MARTIN UND R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1358.
- 3 S. W. MAYER UND E. R. TOMPKINS, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 2866.
- 4 M. VERZELE UND F. ALDERWEIRELDT, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 64 (1955) 579.
- 5 L. C. CRAIG, *Anal. Chem.*, 22 (1950) 1346.
L. C. CRAIG, W. HAUSMANN, E. H. AHRENS, JR. UND E. J. HARFENIST, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1236.
- 6 S. STENE, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol. Ser. A*, 18 (1945) No. 18.
- 7 E. HECKER, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 77.
E. HECKER, *Verteilungsverfahren im Laboratorium*, Verlag Chemie, Weinheim, 1955.
- 8 J. BÜCHI UND M. SOLIVA, *Pharm. Acta Helv.*, 30 (1955) 168.
- 9 R. COMBERG, *Dissertation*, Kiel, 1963.

J. Chromatog., 32 (1968) 346-355