

DER EINFLUSS VON TEMPERATUR UND FEUCHTE WÄHREND DER DIMETHYLFORMAMIDIMPRÄGNIERUNG AUF DEN  $R_F$ -WERT

## 12. MITTEILUNG ÜBER FUROCUMARINE\*

TH. BEYRICH

*Pharmazeutisches Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald (D.D.R.)*

UND

H. POSER

*Biostatistische Abteilung der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald (D.D.R.)*

(Eingegangen den 7. Juli 1967)

Bei serienmässig durchgeführten papierchromatographischen Versuchen zur Bestimmung von Furocumarinen nach dem früher angegebenen Verfahren<sup>1</sup> beobachteten wir trotz im übrigen konstanter Bedingungen (einheitliche Papiersorte, gleichbleibende Temperatur während der Entwicklung, gleiche Imprägnierung, gleiches Laufmittel) eine erhebliche Streuung der  $R_F$ -Werte. Dass die Schwankung der  $R_F$ -Werte bei imprägnierten Papieren im allgemeinen höher liegt als bei unbehandelten Papieren, wurde schon früher festgestellt<sup>2</sup>.

Diese Erscheinung ist auf unterschiedlichen Gehalt des Papierees an stationärer Phase zurückzuführen. Er ist abhängig von der Konzentration des verwendeten Imprägnierungsbades<sup>3</sup> und wird wesentlich beeinflusst durch die Art des Abpressens bzw. des nachfolgenden Abdunsten des flüchtigen Lösungsmittels. Im Falle der schwer flüchtigen Substanzen Formamid, Paraffinöl oder 1-Bromnaphthalin bleibt nach dem Abdampfen des flüchtigen Lösungsmittels die Konzentration der stationären Phase konstant; bei dem leichter flüchtigen Dimethylformamid ist jedoch der Zeitpunkt, an dem das Lösungsmittel restlos verdampft ist, nicht exakt festlegbar, da die Verdunstung von Lösungsmittel und Dimethylformamid ein kontinuierlicher Vorgang ist, der schliesslich zur restlosen Verflüchtigung des Dimethylformamids führt<sup>2</sup>. Bei diesem Vorgang spielt unter sonst konstanten Bedingungen die im Raum herrschende Temperatur und Luftfeuchtigkeit die entscheidende Rolle. Der Prüfung dieser Annahme ist die folgende Studie gewidmet.

## ARBEITSWEISE

Auf Papier S&S 2043 bMgl, 30 × 30 cm, werden mehrfach etwa 10  $\mu$ l einer 0.1%igen Lösung der Substanzen Imperatorin, Bergapten und Xanthotoxin in Toluol aufgetragen. Anschliessend werden die Bogen bis etwa 1 cm oberhalb der Startlinie durch das Imprägnierbad gezogen (Dimethylformamid-Äthanol, 4:6). Der Bogen wird zwischen Filtrierpapier abgepresst und die nichtimprägnierte Zone mit der Dimethylformamidlösung besprüht. Man lässt die Bogen 10 min an der Luft

\* 11. Mitt.: TH. BEYRICH, *Pharmazie*, 22 (1967) 662.

hängen, heftet zu einem Zylinder und entwickelt ohne vorherige Sättigung mit Heptan-Benzol (7:3) bei einer Temperatur von  $16^\circ \pm 1^\circ$ .

## BERECHNUNGEN

Es soll gelten:

$$y = R_F \cdot 100; x_1 = \text{Feuchte}; x_2 = \text{Temperatur.}$$

Bei vorgegebener Feuchte und Temperatur liegen die Mittelwerte der  $R_F$ -Werte jeweils auf einer Ebene<sup>4, 5</sup>:

$$Y = a + b_1x_1 + b_2x_2$$

mit

$$a = \bar{y} - b_1\bar{x}_1 - b_2\bar{x}_2$$

Die beiden Regressionskoeffizienten  $b_1$  und  $b_2$  erhält man aus den Gleichungen:

$$S_{11}b_1 + S_{12}b_2 = S_{1y}$$

$$S_{12}b_1 + S_{22}b_2 = S_{2y}$$

Die Streuung der Beobachtungswerte um die Regressionsebene wird durch die Standardabweichung  $s$  gemessen:

$$s = \sqrt{\frac{S_{yy} - b_1S_{1y} - b_2S_{2y}}{n - 3}}$$

Für die einzelnen Substanzen wurden danach die Werte ermittelt wie in Tabelle I angegeben:

TABELLE I

	<i>Imperatorin</i>	<i>Bergapten</i>	<i>Xanthotoxin</i>
$n$	314	451	429
$\Sigma y$	19,138	15,991	8,717
$\bar{y}$	60.9	35.4	20.3
$(\Sigma y)^2$	366,263,044	255,712,081	76,370,121
$\Sigma y^2$	1,210,392	592,291	191,857
$\Sigma x_1$	24,880	35,720	33,903
$\bar{x}_1$	79.2	79.2	79.0
$(\Sigma x_1)^2$	619,014,400	1,275,918,400	1,149,413,409
$\Sigma x_1^2$	2,001,546	2,872,280	2,719,843
$\Sigma x_2$	6,794	9,808	9,311
$\bar{x}_2$	21.6	21.7	21.7
$(\Sigma x_2)^2$	46,158,436	96,196,864	86,694,721
$\Sigma x_2^2$	148,368	215,292	202,943
$\Sigma x_1y$	1,532,832	1,278,899	696,554
$\Sigma x_2y$	417,758	349,956	190,365
$\Sigma x_1x_2$	541,304	778,419	737,193
$S_{yy} = \Sigma y^2 - \bar{y} \cdot \Sigma y$	43,950	25,302	13,838
$S_{11} = \Sigma x_1^2 - \bar{x}_1 \cdot \Sigma x_1$	30,163	43,193	40,558
$S_{22} = \Sigma x_2^2 - \bar{x}_2 \cdot \Sigma x_2$	1,367	1,996	1,857
$S_{1y} = \Sigma x_1y - \bar{x}_1 \cdot \Sigma y$	16,420	12,384	7,667
$S_{2y} = \Sigma x_2y - \bar{x}_2 \cdot \Sigma y$	3,671	2,197	1,172
$S_{12} = \Sigma x_1x_2 - \bar{x}_1 \cdot \Sigma x_2$	2,977	1,609	1,364
$b_1$	0.36	0.25	0.17
$b_2$	1.91	0.90	0.50
$a = \bar{y} - b_1\bar{x}_1 - b_2\bar{x}_2$	-8.6	-4.1	-4.5
$s$	10.0	6.71	5.28

Die gesuchten Regressionsgleichungen für  $p = 2$  unabhängige Variable lauten:

$$\text{Imperatorin: } Y = -8.6 + 0.36 x_1 + 1.91 x_2,$$

$$\text{Bergapten: } Y = -4.1 + 0.25 x_1 + 0.90 x_2,$$

$$\text{Xanthotoxin: } Y = -4.5 + 0.17 x_1 + 0.50 x_2.$$

VERGLEICH DER STREUUNGEN DER BEOBACHTETEN WERTE  $y_i$  UM DIE REGRESSIONSWERTE  $Y_i$

Als Prüfquotient gilt:

$$F = \frac{s^2}{s'^2}$$

(F-Tabelle; Freiheitsgrade  $f_1 = n - 1$ ;  $f_2 = n' - 1$ ;  $s > s'$ ).

Die erhaltenen Werte Imperatorin/Bergapten 2.2 (Tafelwert 1.26 für  $P = 0.01$ ) und Bergapten/Xanthotoxin 1.6 (Tafelwert 1.26 für  $P = 0.01$ ) zeigen die gesicherte Verschiedenheit der Varianzen.

PRÜFUNG DER FRAGE, OB DIE ZWEIFACHE LINEARE REGRESSION GESICHERT IST

Als Prüfquotient gilt:

$$F = \frac{n - p - 1}{p} \cdot \frac{b_1 S_{1y} + b_2 S_{2y}}{S_{yy} - b_1 S_{1y} - b_2 S_{2y}}$$

(F-Tabelle; Freiheitsgrade  $f_1 = p = 2$ ;  $f_2 = n - p - 1$ ).

Die Berechnung liefert für Imperatorin 34.4 (Tafelwert 4.68 für  $P = 0.01$ ), Bergapten 55.8 (Tafelwert 4.66 für  $P = 0.01$ ) und Xanthotoxin 65.2 (Tafelwert 4.66 für  $P = 0.01$ ).

Da die Quotienten die Prüfschranke signifikant überschreiten, ist die zweifache lineare Regression für alle drei Substanzen hoch gesichert.

VERGLEICH DER PARTIELLEN REGRESSIONSKOEFFIZIENTEN  $b_1$  UND  $b_2$  EINER FLÄCHE

Als Prüfquotient gilt:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{s \cdot \sqrt{c_{11} - 2c_{12} + c_{22}}}$$

$$c_{11} = \frac{S_{22}}{D}$$

$$c_{22} = \frac{S_{11}}{D}$$

$$c_{12} = -\frac{S_{12}}{D}$$

(t-Tabelle;  $f = n - p - 1$ ).

dabei gilt:

$$D = S_{11}S_{22} - S_{12}^2$$

Für  $P = 0.01$  beträgt der Tafelwert 2.58. Die errechneten Werte für Imperatorin 4.56, Bergapten 4.04 und Xanthotoxin 2.65 zeigen, dass signifikante Unterschiede zwischen dem partiellen Regressionskoeffizienten aus ein und derselben Regressionsgleichung vorhanden sind.

VERGLEICH ENTSPRECHENDER PARTIELLER REGRESSIONSKOEFFIZIENTEN  $b_1$  UND  $b_1'$  BZW.  $b_2$  UND  $b_2'$  ZWEIER VERSCHIEDENER FLÄCHEN

Als Prüfquotient gilt:

$$u = \frac{b_1 - b_1'}{\sqrt{s^2 c_{11} + s'^2 c'_{11}}}$$

( $u$ -Tabelle;  $P = 0.01$ ).

Für  $P = 0.01$  beträgt der Tafelwert 2.58. Die Berechnung liefert beim Vergleich der Koeffizienten  $b_1$  für Imperatorin/Bergapten 1.5, Bergapten/Xanthotoxin 1.9, Imperatorin/Xanthotoxin 2.7 und für die Koeffizienten  $b_2$  Imperatorin/Bergapten 2.9, Bergapten/Xanthotoxin 1.9, Imperatorin/Xanthotoxin 4.2. Signifikante Unterschiede bestehen daher zwischen den Regressionskoeffizienten nur in den Fällen Imperatorin/Xanthotoxin und bei  $b_2$  Imperatorin/Bergapten. Die anderen sind nicht gesichert verschieden.

#### DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die für die Prüfung in Frage kommenden Bereiche liegen bei der Temperatur zwischen 17 und 27° und bei der relativen Feuchte zwischen 60 und 100%. In Anbetracht dieser engen Grenzen wurde daher zunächst postuliert, dass eine lineare Abhängigkeit bestehe. Die Mittelwerte der  $R_F$ -Werte ( $R_F = y$ ) jedes der drei in die Untersuchung einbezogenen Furocumarine Imperatorin, Bergapten und Xanthotoxin sind durch die jeweils herrschende Feuchte ( $= x_1$ ) und Temperatur ( $= x_2$ ) bestimmt und liegen auf einer Ebene:

$$Y = a + b_1 x_1 + b_2 x_2.$$

Die Bestimmung des konstanten Gliedes  $a$  und der partiellen Regressionskoeffizienten  $b_1$  und  $b_2$  unter Heranziehung der mehr als 400  $R_F$ -Werte sowie der jeweiligen Feuchte und Temperatur jeder der drei Substanzen führt zu dem in Fig. 1 skizzierten Bild dreier, übereinander liegender Ebenen. Die Streuung der beobachteten Werte um die einzelnen Ebenen beträgt dabei: Imperatorin  $s = 10.0$ , Bergapten  $s = 6.7$ , Xanthotoxin  $s = 5.3$ . Auf Grund der Lage der  $R_F$ -Werte-Ebenen lassen sich folgende Aussagen machen:

(1) Wie man aus der gesicherten Verschiedenheit der Standardabweichungen  $s$  ersieht, sind die  $R_F$ -Werte mit umso grösserer Streuung behaftet, je mehr sich die Substanzen zu Gunsten der mobilen Phase verteilen. Da sich beim Aufhängen der Bogen naturgemäss die stationäre Phase im unteren Bereich anreichert, kann eine

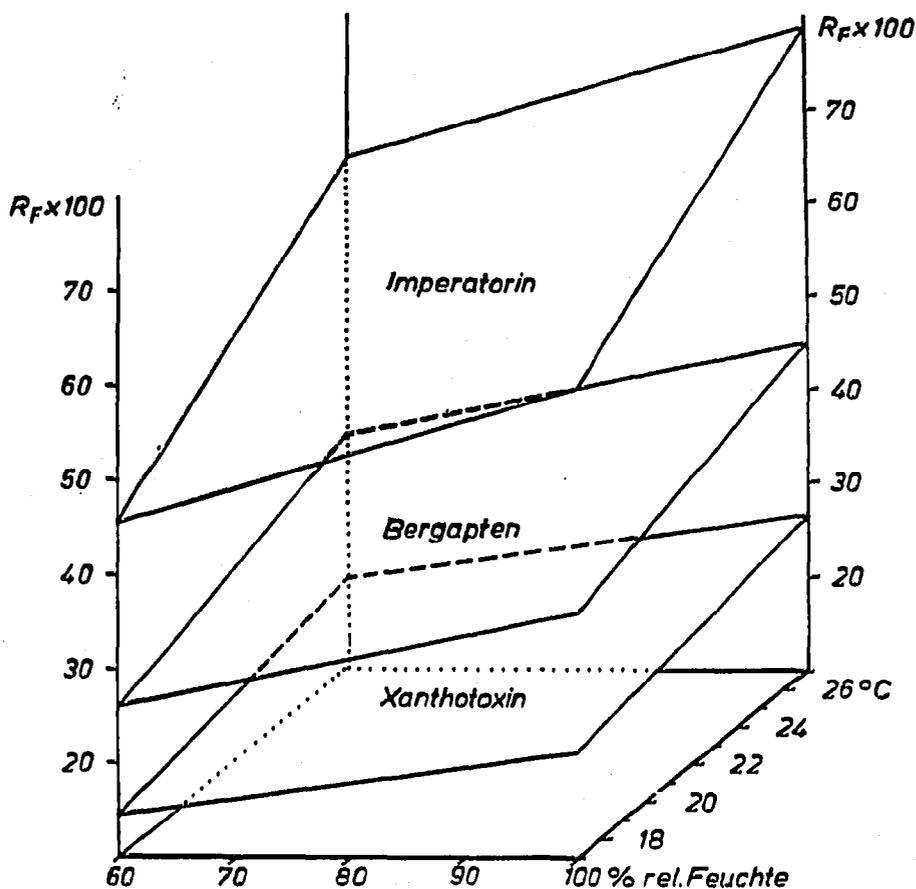


Fig. 1. Regressionsebenen der  $R_F$ -Werte für die drei Furocoumarine Imperatorin, Bergapten und Xanthotoxin in Abhängigkeit von Temperatur und Feuchte.

unterschiedliche Temperatur und Feuchte die ohnehin schwächere Imprägnierung im oberen Teil des Bogens besonders leicht beeinflussen.

(2) Wären Temperatur und Feuchte ohne Einfluss auf den  $R_F$ -Wert, so müssten die Ebenen mit der Grundebene parallel laufen,  $b_1$  und  $b_2$  also Null ergeben. Da beide Regressionskoeffizienten aber eine gesicherte positive Abweichung von Null zeigen, ist zunächst eine Erhöhung des  $R_F$ -Wertes sowohl für steigende Temperatur als auch für steigende Feuchte zu konstatieren.

(3) Der Einfluss der Temperatur auf den  $R_F$ -Wert ist unter den gegebenen Voraussetzungen bedeutungsvoller als der der Feuchte, was in dem stets gesichert höheren Wert von  $b_2$  gegenüber  $b_1$  zum Ausdruck kommt. Bekanntlich wächst mit dem Steigen der Temperatur der Dampfdruck einer Flüssigkeit, die Konzentration des Dimethylformamids im Papier nimmt daher ab. Daraus resultiert eine Zunahme des  $R_F$ -Wertes. Dass auch erhöhte Luftfeuchtigkeit eine Erhöhung des  $R_F$ -Wertes bewirkt, ist zunächst überraschend. Bei einer hohen Feuchte darf aber angenommen werden, dass nicht nur Lösungsmittel verdunstet, sondern dass das Papier auch gewisse Mengen Wasser aufzunehmen in der Lage ist. Dadurch vermindert sich die Konzentration der stationären Phase, wodurch die Verteilung zu Gunsten der mobilen Phase gefördert wird. Die bei hoher Feuchte zunehmende Neigung zur Schwanzbildung, die besonders typisch bei geringer Konzentration des polaren Lösungsmittels in der stationären Phase auftritt, unterstützt diese Vorstellung.

(4) Es zeigt sich weiter, dass bei Vergleich der Koeffizienten  $b_1$  von Fläche zu Fläche diese nur für Imperatorin/Xanthotoxin eine schwach gesicherte Unterschiedlichkeit haben. Etwas grössere Differenzen lassen die Koeffizienten  $b_2$  erkennen. Aber auch hier ist eine Unterschiedlichkeit Bergapten/Xanthotoxin nicht gesichert. Mithin müssen die Ebenen der Xanthotoxinwerte und der Bergaptenwerte als parallel erachtet werden. Die Variation der äusseren Bedingungen führt also in diesem Falle zu einer gleichmässigen Verlagerung der  $R_F$ -Werte in höhere oder tiefere Regionen ohne Änderung des Trenneffektes. Die Änderung der Feuchte ist nahezu bedeutungslos auf die Trennung; gleichwohl sollte sie nicht höher als 70% liegen, weil die Substanzen sonst zur Schwanzbildung neigen. Die Erhöhung der Temperatur dagegen kann zu einer geringfügigen Verbesserung der Abtrennung der weitwandernden Substanz führen.

#### DANK

Fräulein HELGA EGGERT sei für ihre fleissige und gewissenhafte Hilfe bei der Anfertigung der Chromatogramme herzlich gedankt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Einfluss von Temperatur und Feuchte während der Imprägnierung des Papiers mit Dimethylformamid auf den  $R_F$ -Wert statistisch untersucht. Es zeigt sich, dass die Streuung mit steigendem  $R_F$ -Wert zunimmt. Erhöhung der Temperatur wie auch der Feuchte erhöht den  $R_F$ -Wert. Die Zunahme der  $R_F$ -Werte ist am grössten für weit wandernde Substanzen.

#### SUMMARY

The influence of the temperature and humidity during the impregnation of the paper with dimethylformamide upon the  $R_F$  value was studied by a statistical method. It was shown that the variance increases with increasing  $R_F$  value. Increase in temperature and humidity also raises the  $R_F$  value. The increase in the  $R_F$  value is greatest for substances migrating with high  $R_F$  values.

#### LITERATUR

- 1 TH. BEYRICH, *J. Chromatog.*, 13 (1964) 181.
- 2 J. GASPARIC UND J. BORECKY, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 466.
- 3 R. B. BURTON, A. ZAFFARONI UND E. A. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 763.
- 4 A. LINDER, *Statistische Methoden*, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, 1960.
- 5 E. WEBER, *Grundriss der biologischen Statistik*, VEB Gustav Fischer Verlag, 5. Aufl., Jena, 1964.

*J. Chromatog.*, 32 (1968) 87-92