

## EINIGE BETRACHTUNGEN BEI DEM VERGLEICH VERSCHIEDENER FOLIENARTEN

V. RÁBEK

*Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie, Prag (Tschechoslowakei)*

---

### SUMMARY

#### *Some observations on the comparison of different types of sheets*

The various silica gel sheets Chromagram (Eastman), Polygram (Macherey-Nagel), Silufol (Kavalier) as well as Merck and Schleicher & Schüll ready-for-use thin-layer plates, were compared by using them for the separation of water-soluble vitamins. The influence of the origin of the different silica gels, as well as the effect of the binders they contain (calcium sulphate, starch, vinyl compounds, etc.) on the separation under uniform conditions of chamber saturation, was demonstrated. In these experiments the vinyl compounds (polyvinyl alcohol) used as binder had the greatest effect, which was manifested even by reversal of the  $R_F$  values. The solvent mixture used probably also plays a role in producing this phenomenon, since it was not observed when the same sheet with polyvinyl alcohol as binder was used with another solvent mixture, as was the case in the separation of cholesterol, cholesterol esters and glycerides. For the last-mentioned group of substances, the well-known effect of chamber saturation was also demonstrated. The present experiments show that the optimum conditions for separation of a given mixture must be adapted to the conditions required by the particular sheet.

---

Die Bemühungen, die Reproduzierbarkeit der dünnschicht-chromatographischen Methodik zu erhöhen, führten in den letzten Jahren zur Entwicklung einer neuen Applikationsform der Sorbenten, welche direkt vom Hersteller entweder auf flexible inerte Folien oder auf dünne Glassplatten, die sogenannten Fertigplatten, aufgetragen sind. Die Vorteile dieser homogenen Schichten, deren konstante Zusammensetzung vom Hersteller garantiert ist, sind schon genügend bekannt. Die Anforderungen an die unbeschädigte Lieferung steigerte jedoch die Ansprüche an die vollkommene Haftfestigkeit der Schicht zur Unterlage. Gips als klassisches Bindemittel wurde von Stärke verdrängt und auch diese wird teilweise durch organische Bindemittel ersetzt, welche eine universelle Detektion mittels konzentrierter Schwefelsäure ermöglichen.

Eine Reihe von Faktoren, unter diesen selbstredend die Natur des Sorbens und nun auch der verwendeten neuen Bindemittel, beeinflusst die dünnschicht-chromatographische Trennung der Substanzen. Wir hatten Gelegenheit, eine Reihe kommerzieller Folien und Fertigplatten zu vergleichen; über einige interessante Beobachtungen bei der Trennung von wasserlöslichen Vitaminen, Glyceriden und Cholesterinestern wird nun kurz berichtet.

Bei der Trennung von Vitaminen wurde in einer gesättigten N-Kammer (vgl. GEISS<sup>1</sup>) das von GÄNSHIRT UND MALZACHER<sup>2</sup> empfohlene Fließmittelgemisch benützt. Die Detektion wurde in kurzwelligem U.V.-Licht mit nachträglichem Chlor-Tolidin-Test<sup>3</sup> durchgeführt.

Zum Vergleich wurden selbstbeschichtete Platten verwendet, einerseits mit Merck's Kieselgel GF<sub>254</sub> und HF<sub>254</sub> nach STAHL, andererseits mit dem tschechoslowakischen Kieselgel nach PITRA ohne und mit Gips als Bindemittel (Fig. 1). Kieselgel GF<sub>254</sub> ergibt zwar eine vollkommene Abtrennung der Vitamine B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> und C, aber eine nur ungenügende Separation des Nicotinsäureamides (NA) von Natrium-Pantothenat (PS). Der gleiche Trenneffekt, der an Kieselgel HF<sub>254</sub> erzielt wurde—also auf demselben Sorbent ohne Bindemittel—beweist, dass Gips als Bindemittel inert ist. Diese Tatsache wurde auch mittels Kieselgel nach PITRA bestätigt, nur mit dem Unterschied, dass sich hier eine andere Art des Kieselgels (sein Kieselgel ist nämlich weitporig) günstiger in Bezug auf die Trennung von Pantothenat und Nicotinsäureamid erwies, dagegen aber eine unvollständigere Trennung von Vitamin B<sub>2</sub> und B<sub>6</sub> zur Folge hatte. Die tschechoslowakische Silufol-Folie (Glasshütten Kavalier), zu deren Herstellung das gleiche weitporige Kieselgel mit Stärke als Bindemittel verwendet wurde, ergab eine vollkommene Separation aller 7 Komponenten, wobei die Laufstrecke sogar um 3 cm gekürzt wurde.

Geben wir nun zu, dass in diesem Fall die Stärke als Bindemittel die Trennung positiv beeinflusst hatte, vor allem in Bezug auf die Trennung der Gruppe schneller wandernden Komponenten Nicotinsäure (NS), Nicotinsäureamid und Pantothenat, so können wir deren Einfluss möglicherweise auch zwei weiteren Sorbenten, mit Stärke als Bindemittel, zuschreiben (Fig. 2): An Selecta-Fertigplatte Nr. 1500 S

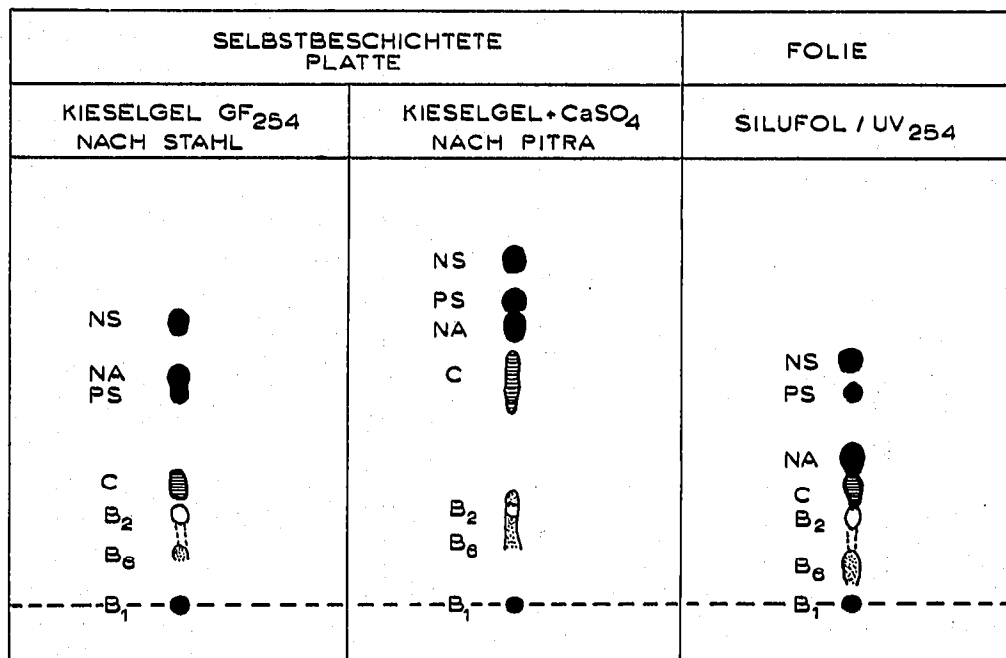


Fig. 1. Trennung einiger wasserlöslichen Vitamine an verschiedenen Kieselgelsorten. Lösungsmittelsystem: Benzol-Äthylalkohol-Aceton-Eisessig (70:20:5:5, v/v). Gesättigte N-Trennkammer. Laufstrecke 16 cm (an Silufol nur 13 cm). Abkürzungen: PS = Natrium-Pantothenat, NA = Nikotinsäureamid, NS = Nikotinsäure.





















SELECTA-FERTIGPLATTE Nr. 1500S	MN - POLYGRAM	
	SIL S - HR / UV <sub>254</sub>	SIL N - HR / UV <sub>254</sub>
NS ?  PS  C  NA  B <sub>2</sub>  B <sub>6</sub>  B <sub>1</sub> 	NS  PS  NA  B <sub>2</sub> +C  B <sub>6</sub>  B <sub>1</sub> 	NS  PS  NA  C  B <sub>2</sub>  B <sub>6</sub>  B <sub>1</sub> 

Fig. 2. Trennung desselben Gemisches wie in Fig. 1 an Fertigplatten und Folien.

(Schleicher & Schüll) und Polygram-Folie Sil S-HR (Macherey-Nagel) ist die Distanz dieser Stoffe sehr ähnlich derjenigen an der Silufol-Folie; leider wird an beiden Folien die Separation durch Vitamin C gestört, welches sich an Selecta mit Nicotinsäureamid und an Polygram mit Vitamin B<sub>2</sub> mischt. Es ist bekannt, dass die Natur des Kieselgels, bzw. der perzentuelle Anteil von einzelnen Korngrößen (in dem meist verwendeten






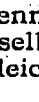











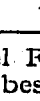

SELBSTBESCHICHTETE PLATTE	DC-FERTIGPLATTE	FOLIE
KIESELGEL GF <sub>254</sub> „MERCK“	KIESELGEL F <sub>254</sub> „MERCK“	EASTMAN CHROMAGRAM K 301 R
NS  NA  PS  C  B <sub>2</sub>  B <sub>6</sub>  B <sub>1</sub> 	NS+NA  PS  B <sub>6</sub>  C  B <sub>2</sub>  B <sub>1</sub> 	NS+NA  PS  B <sub>6</sub>  B <sub>2</sub>  C  B <sub>1</sub> 

Fig. 3. Trennung der Vitamine (siehe Fig. 1) an Kieselgel F<sub>254</sub> und Chromagram K301 R, bei denen derselbe Typ des Bindemittels vermutet wird. Selbstbeschichtete Platte mit Kieselgel GF<sub>254</sub> zum Vergleich.

Bereich von 5–40  $\mu$ ) oft die wichtigste Rolle spielt; auch in dem letztangeführten Beispiel könnte dies der Fall sein.

Der Einfluss des Bindemittels auf die dünnschicht-chromatographische Trennung—eine Frage, die bisher in der Literatur nicht näher erwähnt wurde—erweist sich jedoch bei dem Vergleich der Polygram-Folie S mit der Polygram-Folie N, welche ein unbekanntes Bindemittel enthält, als evident. Trotzdem die Chromatographie an beiden Folien gleichzeitig in derselben Trennkammer durchgeführt wurde, ist die Trennung an der Folie N eindeutig besser (Fig. 2).

Ganz anomal erschien uns die Selecta-Fertigplatte Nr. 1500-säurestabil (auch hier gibt der Hersteller die Natur des Bindemittels nicht an); dies war das einzige Material, an welchem die Chlorierung vollkommen versagt hat; an dem hellgelben Untergrund erschien nur ein einziger oranger Fleck in der Lage des Pantothenats.

Zum Abschluss dieser vergleichenden Versuchsreihe kehren wir nochmals zu der am Anfang erwähnten, mit Merck's Kieselgel GF<sub>254</sub> selbstbeschichteten Platte zurück (Fig. 3); in der Mitte sieht man die Trennung an der Kieselgel-Fertigplatte derselben Firma; das Ergebnis stellte eine recht unerwartete Überraschung vor, da hier—zum Unterschied von allen bisher angeführten Beispielen—eine Umkehrung der  $R_F$ -Werte der B<sub>2</sub>- und B<sub>6</sub>-Vitaminen eintrat und ausserdem zeigten sich erstmalig auch die Nicotinsäure und Nicotinsäureamid ungetrennt, im Gegensatz zu dem Pantothenat, das eine perfekte Abtrennung aufwies. Ein so deutlicher Unterschied zwischen den beiden Typen desselben Herstellers kann kaum in der Natur des verwendeten Kieselgels liegen, umso mehr, wenn wir dies mit der Trennung an der Eastman-Chromagram-Folie K 301 R vergleichen. Die beiden Resultate sind nämlich grundsätzlich identisch. Beachten wir aber die Art der verwendeten Bindemittel: Eastman führt Polyvinylalkohol an und von Merck wurden u.a. die Vinylverbindungen patentiert. Wurden diese Vinylverbindungen tatsächlich angewendet, so ist die augenscheinliche Analogie des Trennbildes erklärlich und der Einfluss des Bindemittels vollkommen evident.

Der zweite Teil dieses Beitrages soll den Vergleich einzelner Folienarten unter verschiedenen Sättigungsbedingungen während der Chromatographie zeigen. Als Beispiel wurde die Trennung der Glyceride mit Cholesterinestern gewählt.

Die Chromatographie wurde in einer üblichen ungesättigten N-Kammer, einer gesättigten N-Kammer und einer Sandwich-Kammer mit Hexan-Äther-Eisessig (80:20:1) durchgeführt. An dieser Stelle wird nur die Versuchsreihe gezeigt, bei der die gesättigte N-Kammer benutzt wurde (Fig. 4). Die selbstbeschichtete Platte mit Merck's Kieselgel G wurde auch hier zum Vergleich genommen. An der Eastman-Chromagram-Folie K 301 R 2 war die Trennung unbefriedigend; ungetrennt blieben die 1,2- von 1,3-Diglyceride, sowie die Gruppe Triglycerid, Cholesterinacetat und Cholesterinstearat. Mit der MN-Polygram-Folie Sil S-HR erzielten wir wenigstens schon die Abtrennung des Triglycerids mit Cholesterinacetat von Cholesterinstearat. Am Silufol (Kavalier) ist sogar die Trennung der beiden Diglyceride gelungen. Jedoch erst an der Merck'schen Fertigplatte Kieselgel F<sub>254</sub> ist die Separation aller anwesenden Komponenten erzielt worden. Beachtet sei, dass die erwähnte Fertigplatte bei dieser Substanzgruppe nicht die geringste Anomalie aufwies, die bei den Vitaminen an ihr so deutlich beobachtet wurde.

Wie übrigens schon bekannt, lässt sich auch hier die schlechteste Trennung durch die Änderung des Sättigungsgrades meistens vollkommen verbessern, wie an

SELBSTBESCHICHTETE PLATTE KIESELGEL G	CHROMAGRAM K 301 R2	POLYGRAM SIL S-HR	SILUFOL	FERTIGPLATTE KIESELGEL F <sub>254</sub>
CHS ○				
CHA TG ○				
FS ○				
1,3-DG ○				
1,2-DG ○				
MG ○				

Fig. 4. Trennung der Glyceride und Cholesterinestern an verschiedenen Kieselgelsorten. Lösungsmittelgemisch: Hexan-Äther-Eisessig (80:20:1). Gesättigte N-Trennkammer. Laufstrecke 10 cm. Abkürzungen: MG = Monoglycerid; DG = 1,2- und 1,3-Diglycerid; FS = Fettsäure (Palmitinsäure); TG = Triglycerid; CHA = Cholesterinacetat; CHS = Cholesterinstearat.

dem Beispiel mit der Chromagram-Folie gezeigt wird (Fig. 5); in der ungesättigten Trennkammer werden infolge des Verdunstens an der Fließmittelfront die langsam wandernden Substanzen vorzüglich getrennt, wobei diejenigen mit höheren  $R_F$ -Werten in der Flüssigkeitsfront konzentriert sind. Das allgemein beste Trennungsbild

CHROMAGRAM K 301 R 2		
GESÄTTIGTE K.	UNGESÄTTIGTE K.	DPI-SANDWICH K.
CHS+CHA+TG	CHS CHA TG	CHS
FS	FS	CHA TG
1,2-+1,3-DG	1,3-DG	FS 1,3-DG
MG	1,2-DG	1,2-DG
	MG	MG

Fig. 5. Trennung der Glyceride und Cholesterinestern an Chromagram K301 R2 bei verschiedener Kammersättigung.

SILUFOL		
GESÄTTIGTE K.	UNGESÄTTIGTE K.	DPI - SANDWICH K
○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○
-----	-----	-----

Fig. 6. Trennung der Glyceride und Cholesterinestern an Silufol bei verschiedener Kammer-sättigung.

ergab erst die Chromatographie in der Sandwich-Kammer, in der sich die Sättigungsverhältnisse mehr denen in der ungesättigten Trennkammer ähneln.

Das deutlich unterschiedliche Verhalten der Chromagram-, sowie der Polygram-Folie bei verschiedenen Sättigungsbedingungen wurde jedoch keinesfalls bei der Merck'schen Fertigplatte und Silufol-Folie beobachtet; diese Materialien ergaben fast das gleiche Trennungsbild bei allen benutzten Sättigungsgraden, wie es aus dem Beispiel mit Silufol-Folie ersichtlich ist (Fig. 6).

Aus den schon angeführten Beispielen ist ersichtlich, dass zwischen den einzelnen Folienarten manchmal eine auffällige Übereinstimmung, manchmal dagegen ein auffälliger Unterschied besteht, was hauptsächlich auf den Typ der chromatographierten Substanzen zurückzuführen ist. Die Art des Kieselgels und des benutzten Bindemittels sind allerdings nicht ohne Einfluss; deshalb sollte das Bestreben nach einer besseren Reproduzierbarkeit schon bei den Erzeugern durch Versuche bezüglich der Standardisierung von neuen Materialien beginnen, da bewiesen ist, dass bei der Papierchromatographie keine derart beträchtliche Variabilität der Resultate besteht. Es muss jedoch zugegeben werden, dass die Entwicklungsmöglichkeiten bei der Herstellung von dünn-schicht-chromatographischen Sorbenten reicher sind und verständlicherweise mehr zu einem Wettbewerb verlocken, als zu einer Vereinheitlichung. Bei diesem Stand der Dinge wird die Reproduzierbarkeit auch weiterhin nur im Rahmen einer bestimmten Folienart oder Fertigplattenart möglich sein.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Am Beispiel der wasserlöslichen Vitamine wurden die verschiedenen Kieselgel-Folien Chromagram (Eastman), Polygram (Macherey-Nagel), Silufol (Kavalier) und Kieselgel-Fertigplatten Merck, sowie Schleicher-Schüll verglichen. Der Einfluss der

Kieselgele verschiedener Herkunft, sowie der Einfluss der enthaltenden Bindemittel (Gips, Stärke, Vinylverbindungen u.a.) auf die Trennung bei gleichen Bedingungen der Kammer-Sättigung wurde demonstriert. In dem von uns angeführten Beispiel erwiesen die Vinylverbindungen (Polyvinylalkohol) als Bindemittel den deutlichsten Einfluss, denn es kam sogar zur Umkehrung der  $R_F$ -Werte; an dieser Erscheinung beteiligt sich höchstwahrscheinlich auch die Zusammensetzung des verwendeten Fließmittelgemisches, denn dieses Phänomen wurde an derselben Folie (mit Polyvinylalkohol als Bindemittel), jedoch bei der Verwendung eines anderen Fließmittelgemisches für die Trennung der Stoffgruppe Cholesterin, Cholesterinestern und Glyceride nicht bemerkt. Bei dieser Stoffgruppe wurde ausserdem der schon wohl bekannte, bedeutende Einfluss der Kammer-Sättigung auf die Trennung gezeigt. Aus bisherigen Versuchen ergibt sich die Tatsache, dass man für jede bestimmte Stoffgruppe die Trennungsbedingungen erst der Wahl der Kieselgel-Folie bzw. Kieselgel-Fertigplatte anpassen muss.

#### LITERATUR

- 1 F. GEISS, H. SCHLITT UND A. KLOSE, *Z. Anal. Chem.*, 213 (1965) 331.
- 2 H. GÄNSHIRT UND A. MALZACHER, *Naturwiss.*, 47 (1960) 279.
- 3 E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, 1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1962, S. 501.

#### DISCUSSION

DE ZEEUW: Which solvent did you use for the vitamins?

RÁBEK: The multiple-component system according to GÄNSHIRT, namely benzene-ethanol-acetone-acetic acid (70:20:5:5).

DE ZEEUW: It may then be possible that the changes in the sequence between vitamin  $B_2$  and  $B_6$  are due to a changed composition of the solvent and/or the vapour, for these conditions change if the binder or the adsorbent structure are changed.

RÁBEK: Your explanation seems likely to me. The degree of saturation also influences the separation. For example, the excellent resolution of nicotinamide from Na pantothenate, obtained on the Silufol foil in a saturated N-chamber, could not be achieved in the DPi sandwich chamber; nicotinamide and Na pantothenate remained unseparated in the latter.

HAIŠ: Dr. RÁBEK says that Kieselgel HF<sub>254</sub> is, except for the binder, identical with GF<sub>254</sub>. Any one who has seen both kinds under the microscope would hardly speak about identity, at least as far as the morphological appearance and size of the particles is concerned. On the other hand, I can confirm their essentially identical separation patterns in the case of urocanic acid in the presence of other tissue constituents, using butanol-acetic acid-water or 2-propanol-aqueous ammonia systems.