

## VERGLEICH DER REPRODUZIERBARKEIT IN DER PAPIER- UND DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

## EINFÜHRUNGSREFERAT

KAREL MACEK

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

## SUMMARY

*Comparison of the reproducibility in paper and thin-layer chromatography*

In this introductory lecture the reproducibility in paper and thin-layer chromatography is examined. The factors that are responsible for non-reproducibility are discussed and possibilities of increasing the reproducibility are indicated.

Die Reproduzierbarkeit des chromatographischen Verhaltens in der Papier- und Dünnschichtchromatographie ist eng mit der Frage verbunden, wie man die relative Beweglichkeit in dem chromatographischen System ausdrücken soll, welche bei den beiden Methoden ein heikles Problem darstellt. Abgesehen von der Struktur der Analysensubstanz ist die Beweglichkeit des Stoffes durch die Zusammensetzung und relativen Querschnitt des Phasensystems in allen Teilen des Chromatogrammes gegeben<sup>1</sup>. Diese Zusammensetzung sollte im idealen Falle längs des ganzen Chromatogrammes konstant sein. Da aber bei der Papier- und Dünnschichtchromatographie die Lösungsmittelfront meistens mit der stationären Phase in Kontakt kommt, mit der sie bisher nicht im Gleichgewicht gewesen war, wird während der Entwicklung nicht nur die Zusammensetzung der stationären und der mobilen Phase ständig geändert, sondern auch deren Querschnitt<sup>2</sup>. Die Beweglichkeit des Stoffes wird bei den Methoden in der Flächenanordnung allgemein durch die  $R_F$ -Werte ausgedrückt, die jedoch keine veränderlichen Grössen einschliessen, welche für die Bildung der Gradienten verantwortlich sind. Und gerade hier muss der Hauptgrund für die unvollkommene Reproduzierbarkeit der  $R_F$ -Werte gesucht werden.

Die Faktoren, welche die Gradientenbildung verursachen oder welche sich in anderer Weise an der Nichtreproduzierbarkeit der  $R_F$ -Werte beteiligen, sind sowohl in der Papier- als auch in der Dünnschichtchromatographie genügend bekannt (siehe z.B. Lit. 3-10). Es wird ihnen jedoch in der täglichen chromatographischen Praxis meistens nicht hinreichende Aufmerksamkeit gewidmet. Zu den Vorteilen der Methoden in Flächenanordnung gehört nämlich die Tatsache, dass für die Identifikation eines bekannten Stoffes seine absolute Beweglichkeit nicht erforderlich ist und einen gewissen Mangel an Reproduzierbarkeit die Identifikation nicht beeinträchtigt. Neben der Analysensubstanz wird auf das gleiche Chromatogramm die Standardsub-

stanz aufgetragen, sodass der Gradient des Lösungsmittelsystems die Beweglichkeit der beiden Substanzen in gleichem Masse beeinflusst. Die meisten Chromatographie-Praktiker nützen diese Tatsache aus und beschäftigen sich nicht mit den angeführten Faktoren, leider auch nicht bei der Veröffentlichung von chromatographischen Daten. Es ist aber eindeutig klar, dass man sich in vielen Fällen mit einem einfachen Vergleich der Analysesubstanz mit dem Standard nicht zufriedenstellen kann, sondern dass man die Beweglichkeit des Stoffes mit einer Grösse ausdrücken muss, die als eine Konstante angesehen werden kann. Ich meine damit die Ausnützung der Beziehung zwischen Struktur und chromatographischem Verhalten bei der Lösung der Strukturfragen, den systematischen Analysengang und allgemein alle Arten der Erfassung einer grösseren Anzahl von chromatographischen Daten und deren Rückausnützung, besonders bei Anwendung von Rechenmaschinen<sup>11</sup>.

Vom Standpunkte der Reproduzierbarkeit wurde dem Vergleich zwischen papier- und dünn-schichtchromatographischer Methode bisher in der Literatur nicht viel Aufmerksamkeit gewidmet. Die Autoren machen meistens auf Grund der empirischen Erkenntnis die Feststellung, dass die Papierchromatographie mehr reproduzierbare Ergebnisse liefert als die Dünnschichtchromatographie (z.B. Lit. 12-15). Diese aus täglicher Praxis resultierenden Ergebnisse, bei welchen dem chromatographischen Prozess keine besondere Aufmerksamkeit gewidmet wird, sind zwar gut begreiflich, jedoch nicht immer berechtigt. Man muss unterscheiden, wie weit sich die gewählte Separationsfunktion an der Reproduzierbarkeit beteiligt, und was für einen Einfluss die experimentelle Anordnung aufweist. Wenn man annimmt, dass die Reproduzierbarkeit grösstenteils eine Frage der Gradienten und des Phasenquerschnittes darstellt, dann kann die ganze Problematik in zwei Gruppen eingeteilt werden:

1. In wie fern sich die Bedingungen gestalten liessen, dass es nicht zur Gradientenbildung kommt, und somit die Phasenzusammensetzung und der Phasenquerschnitt längs des Chromatogrammes konstant bliebe;
2. Wie die Bedingungen sicherzustellen, um die Reproduzierbarkeit der Gradienten oder Querschnittsveränderungen zu ermöglichen.

Erwägen wir in der *ersten Gruppe* zuerst die Distributionsisotherme Flüssigkeit-Flüssigkeit, dann wurden die besten Resultate auf dem mit verankertem polarem<sup>16</sup> oder nichtpolarem<sup>17</sup> organischem Lösungsmittel imprägniertem Papier erhalten, bzw. in einer Anordnung zwischen zwei Platten<sup>17</sup>. Es besteht grundsätzlich kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Papier und z.B. einer Celluloseschicht. Eine gewisse Verminderung der Reproduzierbarkeit kann jedoch in Hinsicht auf die manuelle Schichtbereitung erwartet werden. Die Reproduzierbarkeit beträgt nach unseren Erfahrungen etwa 5-10% und wird durch Verankerung von ungleicher Menge der stationären Phase verursacht. Dieser Fehler könnte herabgesetzt werden, und zwar meistens durch die Art der Imprägnierung. Kleinere Fehler sind bei der Dünnschichtchromatographie zu erwarten, falls man Cellulose mit z.B. Formamid vor dem Streichen mischt. Nach GREEN UND MARCINKIEWICZ<sup>17</sup> können bei der Papierchromatographie die Bedingungen so gestaltet werden, dass die Reproduzierbarkeit besser als 0.01 des  $R_F$ -Wertes ist. Bei Wassersystemen kann nach MACEK<sup>18</sup> der Gradient der stationären Phase durch die Imprägnierung des Papiers mit der wässrigen Phase herabgesetzt werden, oder noch besser durch Auftragen der Probe auf den Start des schon laufenden Chromatogrammes: Hier ist schon die stationäre Phase in Gleichgewicht mit der mobilen Phase, und die Situation ähnelt der bei der Säulenchromato-

graphie. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kam später auch DALLAS<sup>19</sup> bei der Dünnschichtchromatographie auf einer Kieselgelschicht mit Benzol als Laufmittel. Wenn man von technischen Schwierigkeiten absieht, so ist leider bei dem Auftragen auf einen feuchten Blatt das Lösungsmittelvolumen der Probe begrenzt, was bei Extrakten aus biologischem Material die Anwendbarkeit herabsetzt.

In der *zweiten Gruppe* setzen wir den gebildeten Gradienten voraus, wobei es aber notwendig ist ihn zu standardisieren. Aus der Praxis ist bekannt, dass je grösser die Gradienten desto schwieriger ist die Reproduzierbarkeit. Die grösste Rolle werden sie deshalb in der Dünnschichtchromatographie vom Typ fester Stoff-Flüssigkeit ausüben: Die Bestandteile des Mehrkomponenten-Gemisches werden bei der Entwicklung durch ein trockenes Sorbent der Frontalanalyse unterworfen, was sogar zur Bildung von mehreren Fronten führen kann<sup>20,2</sup>. Vorteilhafter sind, mit Rücksicht auf die Reproduzierbarkeit, die Systeme Flüssigkeit-Flüssigkeit mit verankerter Wasserphase. Von dem Standpunkt der experimentellen Anordnung aus betrachtet, kann auf dem Papier verhältnismässig leichter eine höhere Reproduzierbarkeit erzielt werden. Nach einer Studie von BRODASKY<sup>21</sup>, der die Reproduzierbarkeit auf dem Papier mit der auf Cellulose- oder Kieselgelschicht in der Gruppe von Antibiotika verglichen hat, variierte die Standardabweichung auf dem Papier von 0.003 bis 0.01, wogegen bei der Dünnschichtchromatographie auf Cellulose- oder Kieselgelschicht von 0.004 bis 0.03. BRODASKY verfolgte in seiner Studie sowohl die signifikante Abweichung während eines Tages, als auch von einem Tage zu dem anderen. Eine der Hauptquellen von Fehlern sieht er in der gleichzeitiger Zubereitung von einer begrenzten Anzahl von Platten, die eine Charge vorstellen, wobei die Variationen bei dem Übergang von einer Charge zu der anderen grösser sind als bei der Arbeit auf einer Charge. Das kann gewissermassen durch Benützung von Folien und besonders Fertigplatten vermieden werden, jedoch auch bei diesen Schichten beträgt die Variabilität etwa 5%. Ähnliche Resultate gehen auch aus einer Reihe von anderen Arbeiten hervor (z.B. Lit. 17,22,23). Zu einem anderen Resultat kamen nur BRENNER und Mitarbeiter<sup>3</sup>, nach denen die mittlere Standardabweichung bei der Papier- und Dünnschichtchromatographie ungefähr diegleiche ist und 0.014–0.018 beträgt. Diese und auch andere<sup>19</sup> Versuche wurden jedoch mit einer Kieselgelcharge durchgeführt.

Eine gewisse Lösung beruht bei dieser Gruppe auch in den Versuchen, die Beweglichkeit der Stoffe mit einer anderen Grösse als  $R_F$ -Wert auszudrücken, die die veränderlichen Faktoren einschliessen würde, welche für die Gradientenbildung verantwortlich sind. Die einfachste Lösung, auch wenn sie die Problematik nicht ganz löst, ist die Ausdrucksweise der relativen Beweglichkeit zu einer oder besser mehreren Leitsubstanzen. RACHINSKII<sup>24</sup> leitete ab, dass das Verhältnis der  $R_F$ -Werte zweier Stoffe, und dadurch auch der relative  $R_X$ -Wert in der Papierchromatographie bei einer niedrigen Beweglichkeit unabhängig von dem Verhältnis des Querschnittes der stationären und mobilen Phase  $A_S/A_M$  ist, und dass also die  $R_X$ -Werte im Bereich von niedrigen Beweglichkeiten besser reproduzierbar sind. DECKER<sup>25</sup> schlug vor, die Gradienten mit Hilfe von Substanzen einer homologen Referenzreihe zu eichen. Auf das gleiche Chromatogramm trägt er die Analysesubstanz und als Leitgemisch die homologe Reihe auf, deren einzelnen Gliedern er positive ganze Zahlen nach der Anzahl der Inkremente  $-\text{CH}_2-$  zuordnete. Dadurch entsteht ein  $R_c$ -Masstab, der gut die Änderungen des Querschnittes und der Zusammensetzung beider Phasen vom Start zur Fließmittelfront erfasst. Es handelt sich um eine Analogie der Kováts-Indexe

in der Gaschromatographie. Es ist jedoch fraglich, ob diese Ausdrucksweise der Beweglichkeit eine Lösung für die extremempfindlichen nichtwässrigen Systeme in der Dünnschichtchromatographie wäre, da es nach GEISS<sup>4</sup> durch die Änderung der Relativfeuchtigkeit in diesen Fällen zu einem anderen Mechanismus kommen kann, und sogar zur Inversion der Wanderung. Auch die Mehrkomponentensysteme wären wegen der Frontalanalyse einzelner Komponente nicht gerade geeignet.

#### ZUSAMMENFASSUNG

In dem Einführungsreferat wird die Reproduzierbarkeit in der Papier- und Dünnschichtchromatographie erörtert. Es wurden die Faktoren diskutiert, die sich an der Nichtreproduzierbarkeit beteiligen und weiterhin die Möglichkeiten gezeigt, wie die Reproduzierbarkeit zu erhöhen.

#### LITERATUR

- 1 K. MACEK UND I. M. HAIS (Herausgeber), *Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1965.
- 2 A. NIEDERWIESER UND M. BRENNER, *Experientia*, 21 (1965) 50, 105.
- 3 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND A. R. FAHMY, *Experientia*, 18 (1962) 101.
- 4 F. GEISS, H. SCHLITT UND A. KLOSE, *Z. Anal. Chem.*, 213 (1965) 331.
- 5 C. S. HANES, C. K. HARRIS, M. A. MOSCARELLO UND E. TIGANE, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39 (1961) 163.
- 6 B. P. LISBOA, *Steroids*, 7 (1966) 41.
- 7 G. PATAKI, *Ergeb. Labor. Med.*, 2 (1965) 163.
- 8 E. J. SHELLARD, *Lab. Pract.*, 13 (1964) 290.
- 9 A. J. TOMISEK UND P. W. ALLAN, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 232.
- 10 G. ZIMMERMANN, *Z. Anal. Chem.*, 138 (1953) 321.
- 11 K. MACEK, *Ann. Ist. Super. Sanita*, 2 (1966) 133.
- 12 H. LEHNER UND J. SCHMUTZ, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 444.
- 13 K. SCHLÖGL, H. PELOUSEK UND A. MOHAR, *Monatsh. Chem.*, 92 (1961) 533.
- 14 E. G. WOLLISH, M. SCHMALL UND M. HAWRYLYSHYN, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 1138.
- 15 R. JASPERSEN-SCHIB, *Pharm. Acta Helv.*, 36 (1961) 141.
- 16 K. MACEK UND S. VANĚČEK, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 24 (1959) 723.
- 17 J. GREEN UND S. MARCINKIEWICZ, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 35.
- 18 K. MACEK, in K. MACEK UND I. M. HAIS (Herausgeber), *Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1965, S. 276.
- 19 M. S. J. DALLAS, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 267.
- 20 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND R. WEBER, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 1962, S. 79.
- 21 T. F. BRODASKY, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 996.
- 22 T. GOLAB UND D. S. LAYNE, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 321.
- 23 F. H. POLLARD, G. NICKLESS, K. BURTON UND J. HUBBARD, in G. PARISSAKIS (Herausgeber), *Chromatographie et Méthodes de Séparation Immédiate*, Tome II, Union des Chimistes Hellènes, Athen, 1965, S. 9.
- 24 V. V. RACHINSKII, in I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Some General Problems of Paper Chromatography*, Academia, Prag, 1962, S. 47.
- 25 P. DECKER, *Naturwiss.*, 45 (1958) 464.

#### DISCUSSION

BRENNER: The question arose how to visualize mobile phase movement when the medium is wetted before chromatography has been started. The best thing to do is to label the solvent.

HAIS: Prof. BRENNER has suggested\* adding isotopically labelled mobile phase

\* Compare M. BRENNER, in K. MACEK AND I. M. HAIS (Editors), *Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1965, p. 337.

solvent to the sample as a marker of the front. This is limited to cases in which the particular mobile phase component is not sorbed at all by the stationary phase. If it enters the stationary liquid or is adsorbed on the surface of the stationary phase it will lag behind the front and exhibit  $R_F$  values smaller than 1. This phenomenon has been shown experimentally, *e.g.*, by RACHINSKII *et al.* in columns, using water as the mobile solvent and tritiated water as the marker. Another substance, which is not sorbed at all, should be applied as a marker if the chromatographic solvent is sorbed.

*J. Chromatog.*, 33 (1968) 257-261