

## FEHLERMÖGLICHKEITEN BEI DER PAPIERCHROMATOGRAPHIE, REPRODUZIERBARKEIT DER $R_F$ -WERTE

A. GRÜNE

*C. Schleicher und Schüll, Dassel (Deutschland)*

### SUMMARY

*The possibility of errors in paper chromatography, reproducibility of  $R_F$  values*

The  $R_F$  value is an approximate numerical expression for indicating the position of a substance on a chromatogram. It represents the ratio of the distance travelled by the substance to the distance travelled by the solvent. Nowadays the  $hR_F$  value is usually calculated, *i.e.* a hundred times the fractional  $R_F$  value.

In paper chromatography the frequently occurring elongated spots make it difficult to estimate the true mass centres of the different substances. The more circular spots on thin-layer chromatograms give less difficulty. Band-wise application gives chromatographic bands after resolution, the quantitation of which is simpler still. The  $R_F$  value is prone to disturbances; it can therefore only be a guide for predicting the possibilities of separation among a group of substances. It is influenced, among other things, by temperature, tank saturation, "demixing" effects, the age of the solvent system, the amounts applied, and the presence of foreign substances. The tank volume also has an effect on the  $R_F$  value. Conversion reactions during the chromatographic procedure, the presence of isomers, multiple spots with polybasic acids, etc., may give the impression of substances with deviating  $R_F$  values.

In the determination of adenosine phosphates, for example, HCl extracts of paper should be taken as a control.

Excessive heating of the chromatograms charged with the substances for separation may lead to the binding of amino acids to the fibres and thus to chromatographic losses. Through such interference, erroneous  $R_F$  values may be given.

Finally, one wonders whether a simpler, standardised system could not be used for expressing volume ratios in solvent systems (*e.g.* decimal ratios).

Sowohl die Papierchromatographie, als auch die Dünnschichtchromatographie benötigen eines wenigstens annähernden Wertes zur Identifizierung der Lage chromatographisch getrennter Substanzen. Als solcher hat sich nach den ersten Autoren<sup>1</sup> bekanntlich der  $R_F$ -Wert eingebürgert:

$$R_F = \frac{\text{Entfernung des Fleckenmittelpunktes vom Startpunkt}}{\text{Entfernung Fliessmittelfront von der Startlinie}}$$

Bei der Dünnschichtchromatographie ist die Bestimmung des Fleckenmittelpunktes wegen der mehr rundlichen Fleckenform nicht ganz so unsicher wie bei der Papierchromatographie. Bei letzterer ist sie oft eine Gefühlssache, wobei man den kompak-

ten Fleckenteil schätzungsweise in Bezug auf sein Zentrum sicherstellt. Es ist dabei zu beachten, dass bei der Papierchromatographie meistens die Fleckenspitze die grösste Stoffkonzentration zeigt, die Rückseite, der "Schwanz" die geringste.

Es wurde von verschiedenen Autoren versucht, die Messung bei der Papierchromatographie genauer zu gestalten. TERRES *et al.*<sup>2</sup> nahmen Bezug auf die Fleckenspitze, sie schufen den Begriff des  $R_L$ -Wertes, diese Messform hat sich jedoch nicht durchsetzen können. In der richtigen Erkenntnis, dass bereits die zweite Stelle hinter dem Komma unsicher ist, und dass es zweckmässiger ist, ganze Zahlen statt Bruchzahlen anzugeben, bedient man sich heute meistens des  $hR_F$ -Wertes =  $R_F \times 100$ .

Feststeht, dass  $R_F$ -Werte nur "Richtzahlen" sind, ihre wichtigste Anwendung ist die Vororientierung, ob bei genügendem Unterschied der  $R_F$ -Werte der einzelnen Komponenten eines Analysengemisches diese Unterschiede zur einwandfreien Trennung ausreichen.  $R_F$ -Werttabellen sind daher vor allem unter diesem Gesichtspunkt zu betrachten.

Die  $R_F$ -Werte sind nämlich keine "Konstanten" im engen Sinne, sondern durch zahlreiche Momente in ihrer Reproduzierbarkeit zu beeinflussen.

Hierüber und über Fehlermöglichkeiten bei der Papierchromatographie generell sei im folgenden kurz berichtet.

Störmomente im papierchromatographischen Geschehen, welche auch den  $R_F$ -Wert zu beeinflussen vermögen, sind unter anderen folgende:

- (1) Temperaturunterschiede.
- (2) Mangelnde Kammersättigung dort, wo die Aufgabenstellung sie erfordert.
- (3) Entmischungseffekte der Fließmittel, Veränderung durch chemischen Umsatz und Alterung.
- (4) Auftragsmenge bzw. Überladung des Trägers mit Analysensubstanz.
- (5) Anwesenheit von Fremdsubstanzen organischer und anorganischer Natur, im Papier und durch ungenügende Vorreinigung der zur Trennung gelangenden Substanzen.
- (6) Zu hohe Erhitzung der aufgetragenen Substanzen beim Trocknen vor der Chromatographie.
- (7) Kammervolumen, d.h. unzureichende Kammerausmasse.
- (8) Zu geringe Entfernung zwischen Startlinie und Eintauchzone.
- (9) Entstehung von Umwandlungsprodukten, Artefactbildung.

#### (1) TEMPERATURUNTERSCHIEDE

STAHL<sup>3</sup> gibt an, dass gewisse dünn-schichtchromatographische Trennungen nur bei tiefer Temperatur erfolgen können, da nur bei Beachtung dieser Versuchsbedingungen die  $R_F$ -Werte genügend weit auseinander liegen und ausreichende Konstanz zeigen, um Trennungen zu ermöglichen.

Über die Temperaturabhängigkeit der  $R_F$ -Werte bei der Papierchromatographie der Zucker einerseits, der Aminosäuren andererseits haben COUNSELL *et al.*<sup>4</sup>, sowie BURMA<sup>5</sup> berichtet.

#### (2) MANGELNDE KAMMERSÄTTIGUNG DORT, WO DIE AUFGABENSTELLUNG SIE ERFORDERT

Mangelnde oder ausreichende Kammersättigung ist mit Sicherheit als erheb-

licher Faktor bei der Reproduzierbarkeit von  $R_F$ -Werten anzusehen. Über den Einfluss der Kammersättigung bei dünnenschichtchromatographischen Arbeiten berichtet STAHL<sup>3</sup>. Bei papierchromatographischen Arbeiten wasserlöslicher Substanzen ist in der Mehrzahl der Fälle eine ausreichende Sättigung der Kammer mit Wasser- und Fließmitteldampf erforderlich.

Über die Fälle der schwer löslichen und der wasserunlöslichen Analysengemische sei an dieser Stelle nicht berichtet.

### (3) ENTMISCHUNGSEFFEKTE DER FLIESSMITTEL, VERÄNDERUNGEN DURCH CHEMISCHEN UMSATZ UND ALTERUNG

Es seien zunächst wenige Worte zur Fließmittelzusammensetzung grundsätzlich gesagt.

Die Literatur gibt Volumverhältnisse mit oft sehr gebrochenen Zahlen an, die sicherlich in der Praxis oft begründet werden könnten. Es sollte untersucht werden, ob eine derartige Abrundung nicht in vielen Fällen keine oder nur eine sehr geringe Abänderung der  $R_F$ -Werte verursacht. Auch wäre zu überlegen, ob man nicht generell ein Gesamtvolumverhältnis von 100, also Volumprozent, anstreben sollte, wobei vielleicht auf eintretende Volumkontraktionen z.B. bei Vermischung aliphatischer Alkohole mit Wasser Rücksicht zu nehmen wäre.

Fließmittel ändern sich im Verlauf des kapillaren Aufstieges, da auch sie einer Art chromatographischer Trennung unterliegen. Vor allem Wasser und wässrige Lösungen werden stark an die Faser gebunden, was umsomehr der Fall ist, wenn die Papierfaser nicht vorher genügend mit Wasser gesättigt wurde. Wie eigene Versuche ergaben, kann diese Entmischung so weit gehen, dass der obere Teil des Chromatogramms nur noch organisches Fließmittel enthält<sup>6</sup>. Beim Trocknen eines Papierchromatogramms lässt sich fast immer beobachten, dass der obere Teil, bzw. die äussere Zone im Horizontalchromatogramm am schnellsten abtrocknen, falls das Fließmittel aus organischen und wässrigen Lösungsmitteln zusammengesetzt wurde. Durch eine Versuchsreihe konnte festgestellt werden, dass Gemische aus *n*-Butanol, Eisessig und Wasser bereits nach einem Tag eine merkliche Veresterung zeigten, was an der Abnahme der sauren Reaktion kontrolliert werden konnte. Die stärkste Veresterung zeigen Gemische aus *n*-Butanol, Ameisensäure und Wasser, sie sind bei Normaltemperatur oft bereits nach wenigen Stunden nicht mehr brauchbar, da sich zwei Schichten bilden. Im ersteren Falle wird oft empfohlen, das Gemisch solange altern zu lassen, bis sich das Estergleichgewicht eingestellt hat, es erscheint jedoch zweifelhaft, ob es nicht um der klareren Volumverhältnisse halber besser ist, gleich zu Anfang von einem Esterhaltigen Gemisch auszugehen. Die Versuche von SOMMER<sup>7</sup> erscheinen uns abwegig, da sich Gemische aus Methanol und Salzsäure bei gutem Verschluss, der eine Verdunstung hindert, kaum verändern können. Eine Esterbildung findet mit Sicherheit nicht statt.

In allen Fällen sollte man nur die Fließmittelmenge ansetzen, die jeweils benötigt wird. Aufbewahrung fertiger Gemische birgt immer einen Unsicherheitsfaktor in sich. Guter Verschluss der chromatographischen Kammer während des Arbeitsprozesses ist natürlich Voraussetzung, damit keine leicht flüchtige Komponente entweicht und sich die Zusammensetzung ändert.

## (4) AUFTRAGSMENGE BZW. ÜBERLADUNG DES TRÄGERS AN ANALYSENSUBSTANZ

Es ist ein häufig zu beobachtender Fehler, die Auftragsmengen zu gross zu gestalten. Die Folge davon ist, dass sich die Substanzen nur ungenügend im Fließmittel lösen und infolge starker Schwanzbildung schwer trennbar sind.

Als "Faustregel" kann man bei der qualitativen Papierchromatographie beim Vorliegen 0.5–2%iger Analysenlösungen einen Fleckendurchmesser von 3–7 mm als richtig ansehen, bei der qualitativen Dünnschichtchromatographie einen solchen von 2–3 mm.

Oft empfiehlt es sich, die Substanzen in Strichform aufzutragen, was eine Auftrennung in Banden zur Folge hat. Die Trennungen haben das mit der Horizontalchromatographie und den Zuschnitten, etwa nach MATHIAS<sup>8</sup> gemeinsam, dass die Flecken nicht rundlich, sondern bandenförmig sind, also bei gleicher Entfernung der Fleckenzentren bereits scharf getrennt sein können, wenn rundliche Flecken bei gleicher Entfernung der Mittelpunkte sich noch überlagern.

## (5) ANWESENHEIT VON FREMDSUBSTANZEN ORGANISCHER UND ANORGANISCHER NATUR, IM PAPIER UND DURCH UNGENÜGENDE VORREINIGUNG DER ZUR TRENNUNG GELANGENDEN SUBSTANZEN

Fremdsubstanzen finden sich in geringer Menge im chromatographischen Träger, auch im Linterspapier für die Chromatographie. Sie können organischer und anorganischer Natur sein.

Der gesamte Mineralstoffgehalt beträgt bei diesen Papieren etwa 0.06–0.07%, oft auch weniger.

Darin sind anteilig enthalten:

Si	20–30%
Ca-, Mg-Salze	etwa 40%
Alkalisalze	20–30%
Eisen	1–2%
Al, Cu, Pb	in Spuren

Der Gehalt an Alkalisalzen kann allerdings auch höher sein, auf Kosten der anderen Bestandteile.

Da der Kalkgehalt bei Phosphattrennungen erheblich stören kann, empfiehlt es sich, für diese chromatographischen Aufgaben die säuregewaschenen Papiere und Pulver des Handels zu benutzen. An organischen Bestandteilen finden sich in Linterspapieren Aminosäuren und Zucker, erstere als Hydrolysenprodukte des Protoplasmas der Faser, letztere als solche von Hemicellulosen<sup>9,10</sup>. Nach CARTIER *et al.*<sup>11</sup> konnten salzsaure Papierextrakte die quantitative Bestimmung von Adenosinphosphaten im U.V.-Licht erheblich stören.

Die weitaus grösste Gefahr für die Anwesenheit störender Fremdsubstanzen in den zu analysierenden Stoffgemischen bilden naturgemäss—meist anorganische—Fremdstoffe, welche durch Aufschluss aus Naturprodukten oder höheren Polymeren zurückblieben. Störende Salze lassen sich auf verschiedene Art entfernen, z.B.:

- durch Elektrodialyse nach CONSDEN *et al.*<sup>12</sup>,
- durch Behandlung mit Ionenaustauschern,
- durch kurzfristige Papierelektrophorese<sup>13</sup>,

durch Herauslösen der zu chromatographierenden Substanzen aus dem Gemisch mit Hilfe eines geeigneten Lösungsmittels, beispielsweise Pyridin.

(6) ZU HOHE ERHITZUNG DER AUFGETRAGENEN SUBSTANZEN BEIM TROCKNEN VOR DER CHROMATOGRAPHIE

Es empfiehlt sich immer, die aufgetragenen Substanzen schonend, etwa durch Verhängen an warmer Luft, zu trocknen, oder auch durch strömende Warmluft, z.B. eines Föhns, vor allem natürlich dann, wenn eine gewisse Flüchtigkeit oder chemische Unbeständigkeit zu erwarten ist.

Jedoch können auch Veränderungen am Papier durch die chemischen Eigenschaften des letzteren eintreten.

WOIWOD<sup>14</sup> stellte fest, dass Aminosäuren, welche nach dem Auftragen auf Papier auf diesem unter Erhitzen getrocknet wurden, teilweise am Startpunkt liegen blieben, da sie sich mit den Aldehydgruppen der Cellulose zu Schiffischen Basen verbunden hatten. Auch die Fluoreszenz auf dem Papier erhitzter Aminosäuren führt man auf diese Tatsache zurück.

(7) KAMMERVOLUMEN, d.h. UNZWECKMÄSSIGE KAMMERAUSMASSE

CLAYTON<sup>15</sup> konnte bei papierchromatographischen Untersuchungen zeigen, dass das Kammervolumen einen relativ starken Einfluss auf den  $R_F$ -Wert haben kann. Dieser nimmt mit steigender Kammergrösse zu. Bei gegebener Kammergrösse beeinflusst das Fließmittelvolumen den  $R_F$ -Wert. CLAYTON konstatierte, dass die  $R_F$ -Werte konstant bei einem Maximum lagen, wenn das Fließmittel bis zu 300 ml betrug, jedoch bei einem Minimum von 375 ml aufwärts. Das Fließmittelvolumen, oberhalb dessen der  $R_F$ -Wert ein Minimum und unterhalb dessen ein Maximum verzeichnete, nannte CLAYTON das "kritische Volumen".

(8) ZU GERINGE ENTFERNUNG ZWISCHEN STARTLINIE UND EINTAUCHZONE

Wie bereits alte kapillaranalytische und eigene Erfahrungen zeigten<sup>16</sup>, weisen eintauchende Filtrierpapierstreifen eine maximale Belastung mit Fließmittel direkt oberhalb der Eintauchzone auf. Daran schliesst sich eine Zone relativ gleichmässiger mittlerer Belastung, während die obere Zone hingegen fließmittelarm ist. Daher ist zu erwarten, dass die  $R_F$ -Werte am gleichmässigsten reproduzierbar sind, wenn sie etwa zwischen  $hR_F$  10 und  $hR_F$  90 liegen.

(9) ENTSTEHUNG VON UMWANDLUNGSPRODUKTEN, ARTEFACTBILDUNG

Im Verlauf chromatographischen Arbeitens können aus den verschiedensten Gründen Sekundärprodukte gebildet werden, welche als selbständige Substanzen auf dem Chromatogramm erscheinen. Nur einige Beispiele seien angegeben:

Pflanzenextrakte soll man nie länger unter Äthanol stehen lassen, da sich aus den Aminosäuren leicht Aminosäureester bilden. *n*-Propanol hingegen verestert wesentlich langsamer, bzw. unter den vorliegenden Bedingungen überhaupt nicht<sup>17</sup>.

Mehrbasische organische und anorganische Säuren können in verschiedenen Ionisationsstufen auftreten.

Beim Reinigen von Zuckerextrakten über basische Austauschere kann sich Milchsäure bilden.

2,4-Dinitrophenylhydrazone treten oft als *cis-trans*-Isomere auf<sup>18</sup>.

Cadmiumacetat kann in ammoniakalischen Fließmitteln in Form dreier Cd-Komplexe auftreten<sup>19</sup>.

Asparaginsäure und Glutaminsäure bilden Ester beim Aufbewahren in Äthanol-Salzsäure<sup>20</sup>.

Die Vitamine B<sub>2</sub> und B<sub>12</sub> können bereits beim Auftragen in andere Verbindungen übergehen<sup>21</sup>.

*p*-Aminobenzoessäure kann in Fließmitteln aus Isobutanol, Salzsäure und Wasser mehrfache Flecken bilden<sup>22</sup>.

Mann kann sicher annehmen, dass eine Anzahl sogenannter "neuer Aminosäuren" in Wirklichkeit auf einer Artefactbildung beruhen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Der  $R_F$ -Wert ist ein annähernder zahlenmässiger Ausdruck zur Bestimmung der Lage von Substanzen im Chromatogramm. Er stellt das Verhältnis des Wanderungsweges einer Substanz zum Wanderungsweg des Fließmittels dar. Heute gibt man meistens den  $hR_F$ -Wert an, d.h. den hundertfachen Wert der an sich gebrochenen Zahl unter eins.

Beim Papierchromatogramm macht oft die langgestreckte Form der Flecken die Bestimmung der Massennittelpunkte der einzelnen Substanzen schwierig. Die mehr rundliche Form der Flecken im Dünnschichtchromatogramm bereitet weniger Schwierigkeiten. Auftrag in Banden ergibt streifenförmige chromatographische Flecken, die Bestimmung wird dadurch noch wesentlich einfacher.

Der  $R_F$ -Wert ist störungsanfällig, er kann also nur eine Art von "Richtzahl" in Bezug auf eine Voraussage der Trennmöglichkeit einer Substanzgruppe sein.

Er wird unter anderem beeinflusst von: Temperatur, Kammersättigung, Entmischungseffekten und Alter der Fließmittel, Auftragsmengen, Fremdstoffen. Das Kammervolumen hat ebenfalls Einfluss auf die Lage des  $R_F$ -Wertes. Umwandlungsreaktionen während des chromatographischen Geschehens, Auftreten von Isomeren, Mehrfachflecken bei mehrbasischen Säuren können Substanzen mit abwegigen  $R_F$ -Werten vortäuschen.

Bei der Bestimmung von Adenosinphosphaten müssen salzsaure Papierextrakte als Blindwerte berücksichtigt werden.

Zu hohes Erhitzen des mit den zu trennenden Substanzen beauftragten Chromatogramms kann zur Bindung von Aminosäuren an die Faser und damit zu Verlusten beim chromatographischen Arbeiten führen. Durch die angegebenen Störungen der  $R_F$ -Werte können Fehler beim chromatographischen Arbeiten auftreten.

Schliesslich ist zu erwägen, ob die oft abwegigen Volumverhältnisse bei Angabe der Fließmittelkombinationen nicht einfacher normiert oder auf dekadische Verhältnisse standardisiert werden könnten.

## LITERATUR

- 1 R. CONSDEN, A. H. GORDON UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- 2 E. TERRES, F. GEBERT, H. HÜLSEMANN, H. PETEREIT, H. TOEPSCH UND W. RUPPERT, *Brennstoff-Chem.*, 36 (1955) 67, 78, 228, 272, 275, 289, 359.
- 3 E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1967.
- 4 J. N. COUNSELL, L. HOUGH UND W. H. WADMAN, *Research (London)*, 4 (1950) 143.
- 5 D. P. BURMA, *Nature*, 168 (1951) 565.
- 6 A. GRÜNE, *Chimia (Aarau)*, 11 (1957) 173.
- 7 G. SOMMER, *Z. Anal. Chem.*, 147 (1955) 241.
- 8 W. MATHIAS, *Naturwiss.*, 41 (1954) 17.
- 9 V. WYNN, *Nature*, 164 (1949) 445.
- 10 M. S. CATLETT, M. S. R. GIUFFRIA, A. T. MOORE UND M. L. ROLLINS, *Textile Res.*, 21 (1951) 880.
- 11 F. CARTIER, J. CHEDRU UND P. BAUDEQUIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 525.
- 12 R. CONSDEN, A. H. GORDON UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 590.
- 13 I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, VEB-Verlag Gustav Fischer, Jena, 2. Aufl., 1963.
- 14 A. J. WOJWOD, *Nature*, 166 (1950) 272.
- 15 R. A. CLAYTON, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 904.
- 16 A. GRÜNE, *Österr. Chemiker-Ztg.*, 60 (1959) 301.
- 17 G. ZWEIG, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 821.
- 18 I. E. DE VAY, A. R. WEINHOLD UND G. ZWEIG, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 815.
- 19 B. ERDEM, *Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul*, 200 (1955) 332.
- 20 R. KOCH UND H. HANSON, *Z. Physiol. Chem.*, 292 (1953) 180.
- 21 I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, VEB-Verlag Gustav Fischer, Jena, 2. Aufl., 1963.
- 22 J. VACEK *et al.*, *Cesk. Farm.*, 2 (1953) 185.

## DISCUSSION

GEISS: Dr. GRÜNE mentioned that in layers which had not been presaturated through the gas phase ("unsaturated layers") substances run more slowly. This is at variance with our experience: The (apparent) migration velocity of the spots is independent of the "degree of saturation" of the layer with eluent vapour. The pretreatment with vapour only becomes manifest in the migration velocity of the *front*. The more saturated the layer, the more rapid the front and the lower the  $R_F$  values. In cellulose layers with a small capacity (about 10%) for the adsorption of the solvent from the gas phase these effects are naturally less pronounced.

GRÜNE: Cellulose used in paper manufacture still contains amorphous areas and hemicellulose, which is necessary for the wet strength. In the cellulose powders which are used for TLC the crystalline areas prevail markedly and the sorption capacity for water vapour is lower. Paper fibre still possesses fibrous structure which is present to a very small extent in cellulose powder or grain. As to the relation between the flow rate and the separation power, we may state, as far as paper manufacture is concerned: the less the paper fibre is comminuted, the faster the paper will run and the poorer the separation will be in most of the cases.