

STAND DER REPRODUZIERBARKEIT IN DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

EINFÜHRUNGSREFERAT

F. GEISS

Euratom, 21020 Ispra (Italien)

SUMMARY

Reproducibility in thin-layer chromatography. Introduction.

The R_F values for several commercial thin-layer chromatography aluminas and silicas are compared under identical conditions. Differences up to 50% have been observed. Considerations are made on the dependence of R_F on layer thickness and on applied quantity, on R_F definitions and their consequences for the chromatography in different types of chambers, and on "true" R_F values. Finally, a diagram is presented with an estimation of the importance of parameters for the R_F values.

Es ist nicht zu leugnen, dass es in der Anfangszeit der Dünnschichtchromatographie (DC) um ihre Reproduzierbarkeit nicht immer zum besten bestellt war. Dies ist angesichts der Anwendungsbreite der Methode und der Vielfalt der Techniken nicht weiter verwunderlich. Nach und nach wurden Fehlerquellen entdeckt und wichtige Parameter beherrschen gelernt. Von den neuen Schlüsselbegriffen seien nur "richtige Kammerform", "Feuchtekontrolle", "Fließmitteldurchsatz" genannt. Berücksichtigt man sie, so verliert die DC nur wenig von ihrer genialen Einfachheit, gewinnt aber entscheidend an qualitativer Zuverlässigkeit. Sie kann sich heute auch bezüglich der Vergleichbarkeit der R_F durchaus mit der Papierchromatographie messen. Ich beschränke meine Ausführungen auf Erscheinungen der Adsorptions-DC.

EINFLUSS DER SCHICHT

Bei dem Bemühen um die Publikation chromatographischer Kenngrößen oder, allgemein, um die Standardisierung der Methode kommt man um die Tatsache nicht herum, dass eine zweistellige Zahl von Kieselgelen und Aluminiumoxiden verschiedenster Firmen auf dem Markt ist und auch gekauft und verwendet wird. Sehen wir uns an, wie sich diese Adsorbenzien unter streng identischen Bedingungen bei der Chromatographie des erweiterten Desaga-Testgemisches, das die Brockmann'schen Testfarbstoffe enthält, verhalten (Fig. 1).

Wir haben willkürlich Kieselgel G (standardisiert n. STAHL) herausgegriffen und dafür zur Trennung der vorliegenden Mischung die optimale rel. Feuchte von

63% gefunden. Bei derselben Feuchte wurde dann auch auf allen anderen Kieselgele chromatographiert. Einige Materialien sind für diese spezielle Aufgabe unter den gegebenen Bedingungen nicht mehr brauchbar, weil die Substanzen entweder an der Front laufen oder stark verschmiert sind. Die maximalen R_F -Unterschiede bei

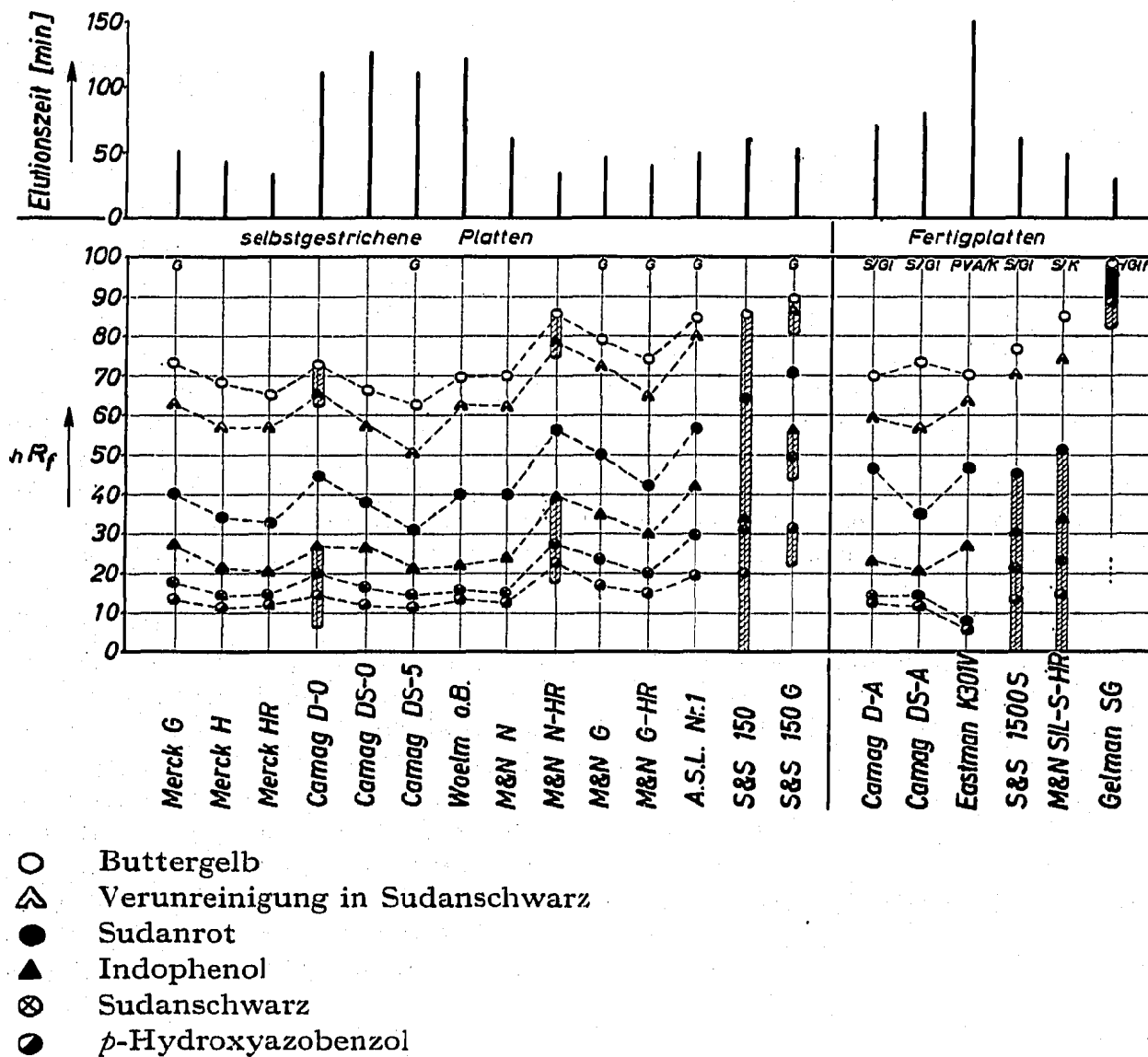


Fig. 1. Kieselgele bei 63% r.f.; Vergleich der R_F -Werte. Benzol; Desaga-Testgemisch, GS-Kammer (Schmalkammer). G = mit Gips; S/Gl = mit Stärke auf Glas; PVA/K = Polyvinylalkohol auf Kunststoff; S/K = mit Stärke auf Kunststoff; Gf = Glasfaser.

den anderen liegen bei 50%. Erhöht man die rel. Feuchte auf 79% (Fig. 2), so fallen schon ca. 40% der untersuchten Materialien aus. Diese Feststellung *soll* und *kann* keine wertmässige Diskriminierung solcher Adsorbentien sein, weil sie höchstwahrscheinlich mit weniger polaren Fließmitteln und/oder niedrigerer rel. Feuchte ebenso brauchbare Ergebnisse ermöglichen werden. Sie zeigt aber, wohin der gelegentlich

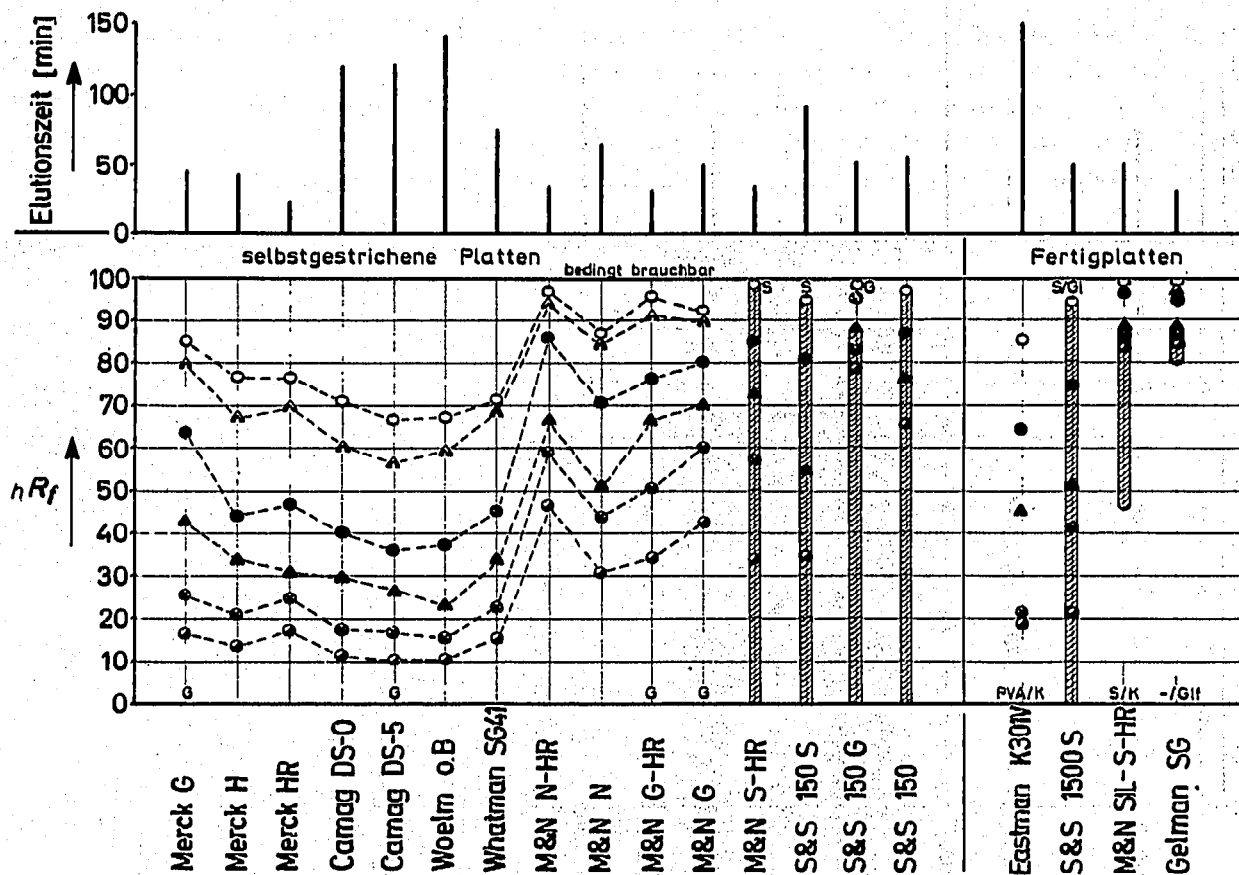


Fig. 2. Kieselgele bei 79% r.f.; Vergleich der R_F -Werte. Bedingt brauchbar: Flecke schon sehr diffus ohne starke Schwanzbildung. Für Zeichenerklärungen, siehe Fig. 1.

gemachte Vorschlag führen würde, bei nur *einer Standardfeuchte* zu chromatographieren*.

Nach den vorliegenden Ergebnissen besteht — zumindest für die Trennung der Testfarbstoffe — keine praktische Notwendigkeit zu einer derartigen Vielfalt der Sorbenzien, denn die Trennungen sind auf allen Materialien — sofern sie überhaupt trennen, und auch von der Fleckenschärfe einmal abgesehen, essentiell dieselben. PATAKI⁸ kam für Aminosäuren zu ähnlichen Feststellungen. Bei den *Aluminiumoxiden* liegen die maximalen R_F -Unterschiede in der Größenordnung derjenigen der Kieselgele (Fig. 3). Unter den gegebenen Bedingungen trennen alle untersuchten Materialien einwandfrei.

Offen muss die Frage bleiben, wie weit die Lieferchargen desselben Herstellers untereinander gleich bleiben. Uns ist der Fall eines Wiederverkäufers von DC-Adsorbentien bekannt, der Materialien von *verschiedenen* Herstellern bezieht, sie aber unter derselben Handelsbezeichnung verkauft. DALLAS¹ untersuchte drei verschiedene Chargen von Kieselgel G und fand bei vergleichsweise geringen Abweichungen der R_F (max. 10%) Elutionszeiten, die von 18–33 Min. schwankten. Er nimmt als Ursache Unterschiede der Korngrößenverteilungen an. Wir haben solche

* Abgesehen davon, dass es wegen der Verschiedenheit der chromatographischen Aufgaben keine generelle "optimale" Feuchte geben kann.

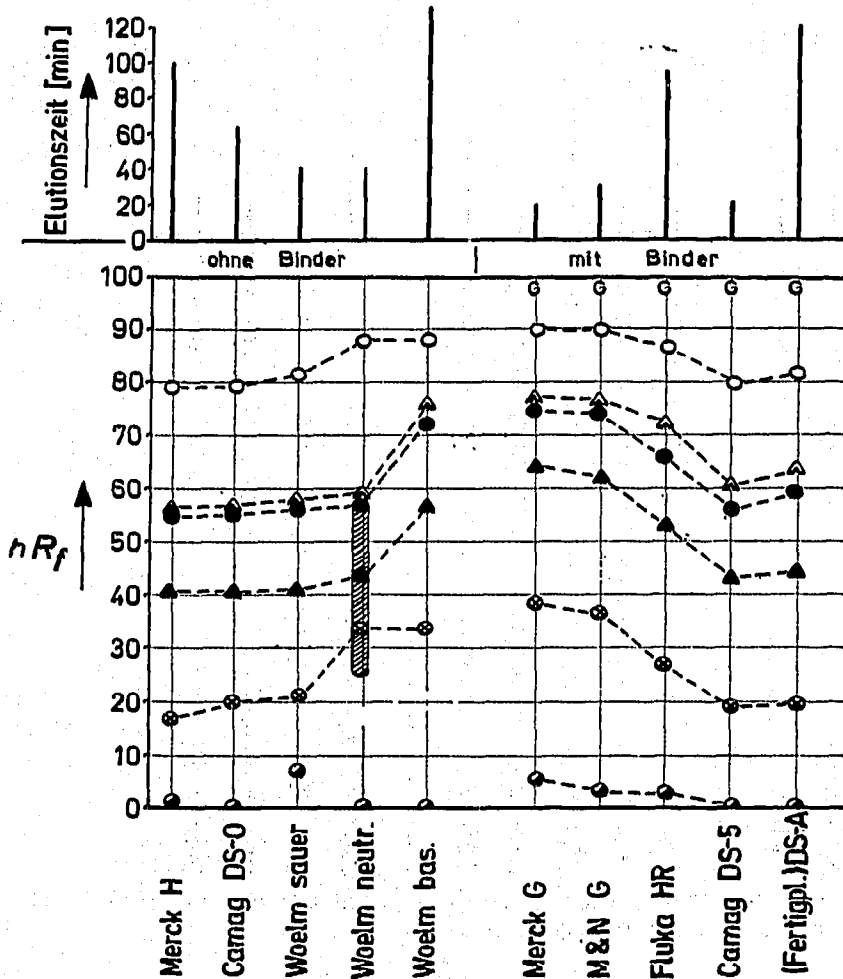


Fig. 3. Aluminiumoxide bei 47% r.F.; Vergleich der R_F -Werte. Benzol; S-Kammer. Für Zeichen-erklärungen, siehe Fig. 1.

Differenzen in der *Laufzeit* selbst bei Material aus der gleichen Flasche beobachtet und zwar dann, wenn sie längere Zeit angebrochen war und wenn das Adsorbens Gips enthielt. Damit wird das Problem der Plattenvorbereitung berührt.

Obwohl häufig untersucht, ist der *Einfluss der Schichtdicke* auf die R_F immer noch strittig. STAHL² fand keinen Unterschied bei 2 und 3 mm dicken Schichten. PATAKI UND KELLER³ beobachteten eine *Zunahme* der R_F oberhalb 0.5 mm, HONEGGER⁴ dagegen konnte beim Desaga-Testgemisch auf einer kontinuierlich ansteigenden Schicht unterhalb 1.5 mm praktisch noch keine Veränderungen feststellen; *darüber* stiegen sie an. DALLAS¹ beobachtete keine Abhängigkeit zwischen 0.1–0.5 mm. Wir können nur die implizite Aussage hinzufügen, dass die R_F zwischen 0.1 und 2 mm durch ein Minimum von etwa 10% gehen. Eine Feststellung der Breite des Plateaus scheiterte an der Nichtreproduzierbarkeit des Streichgerätes. Zu einem genaueren Bild wird man nur mit maschinengestrichenen Platten verlässlicher Schichtdicke kommen. Doch wird bei geringen Dicken eine Unsicherheit bleiben, weil irgendwo die substanz- und sorbensspezifische Überladung beginnt, d.h. der Adsorptionskoeffizient konzentrationsabhängig wird; womit wir bei der Frage nach der *Mengenabhängigkeit* der R_F angekommen wären. Sie kann nicht allgemeingültig beantwortet

werden, weil ihre Grösse und Richtung von der Form der Adsorptionsisotherme bestimmt werden: Adsorbate mit zur x-Achse konkaver Isotherme haben einen Schwanz unterhalb des Fleckschwerpunktes (z.B. Indophenol auf Kieselgel H (Fig. 4), bei solchen mit konvexer Isotherme wandert der "Schwanz" voraus (z.B. Sudanrot).

Verbindungen der ersten Art reagieren bei Konzentrationsüberhöhung mit R_F -

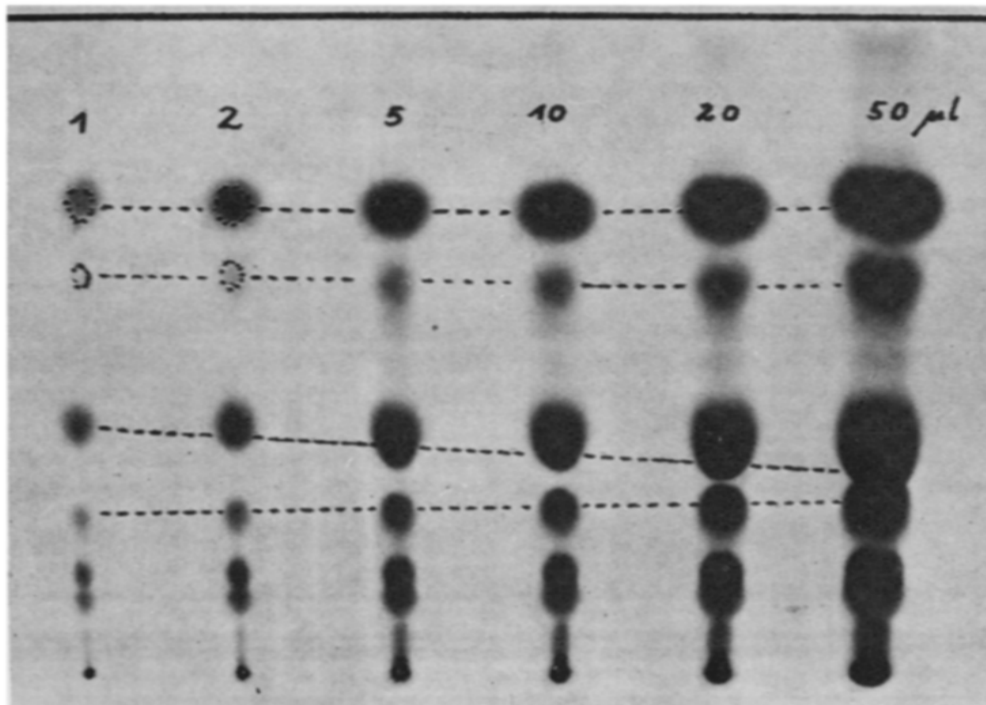


Fig. 4. Abhängigkeit der R_F von der aufgetragenen Menge. Desaga-Testgemisch: v.o.n.u.: Buttergelb, Verunreinigung in Sudanschwarz, Sudanrot (mit "Schwanz" voran), Indophenol (mit Schwanz hinten), Sudanschwarz. Kieselgel H; r.F. 63%; Benzol.

Erhöhung, solche der zweiten Art mit R_F -Erniedrigung; solche mit einer langen geraden Isotherme sind bis zu hohen Konzentrationen mengenunabhängig. Als Faustregel kann man angeben, dass bei der Standardschichtdicke 0.25 mm bis etwa 5 μg noch mit keiner stärkeren Abhängigkeit zu rechnen ist. Von merklichem Einfluss können auch Art, Konzentration und R_F -Abstand anderer Mischungskomponenten sein, die durchweg zu einer R_F -Erhöhung führen. Davon sind insbesondere Flecken mit sehr kleinen R_F (< 0.05) betroffen, sie "reiten" während der Entwicklung ein Stück auf ihren Vorgängern mit und zeigen dann wesentlich grössere R_F , als wenn man sie separat aufgebracht hätte.

WECHSELWIRKUNG GASRAUM-SCHICHT

Wasser, das von Adsorbentien unterhalb von ca. 200° festgehalten wird, ist "physikalisch gebunden". Dabei setzt sich das Adsorbens in ein reversibles Gleichgewicht mit der Feuchtigkeit der umgebenden Atmosphäre. Die Lage des Gleichgewichts wird bestimmt durch die Wasserdampfsättigung der Atmosphäre—vulgo "relative Feuchte"—und durch die Temperatur⁵. Aluminiumoxide können im chromatographisch wichtigen Bereich ($\leq 80\%$ r.F.) Wasser bis zu ca. 20% und Kieselgele

bis zu ca. 80% ihres Trockengewichtes aufnehmen. Dieses physikalisch gebundene Wasser der Schicht bestimmt im ternären System Adsorbens-Wasser-Fliessmittel die chromatographische Aktivität gegenüber den zu chromatographierenden Adsorbaten. Die relative Feuchte ist somit—wenn man die anderen Komponenten unverändert lässt—ein zuverlässiger und praktischer Aktivitätsregulator. Die ersten Veröffentlichungen über die Bedeutung der relativen Feuchte liegen schon einige Jahre zurück^{6,7}. Nach einer gewissen Inkubationszeit erscheinen nun immer häufiger Arbeiten, die ihre Bedeutung für die verschiedenartigsten Trennungen vermelden. Ihr Einfluss ist am stärksten für lipophile Systeme und geht graduell mit zunehmender Hydrophilie des Fliessmittels zurück, um für solche Systeme wieder stark anzusteigen, bei denen eine grössere stationäre Wasserkonzentration erforderlich ist, z.B. für die Trennung anorganischer Ionen⁸⁻¹⁰. Im letztgenannten Falle nehmen die R_F mit steigendem Wassergehalt ab. Doch nicht allein die absoluten R_F werden von der Feuchte beeinflusst, sondern auch ihr Verhältnis zueinander, d.h. der Trenneffekt ändert sich; bei der polyzonalen DC¹¹ mit Fliessmittelgemischen verschiebt sich mit ihr die Lage der Entmischungsfrenen wobei die Richtung der Verschiebung von der Art der Fliessmittelkomponenten abhängt. Dies kann für das Eluens Benzol-Methanol zu dem Paradoxon führen, dass die R_F von hydrophoben Stoffen mit zunehmendem Wassergehalt der Schicht kleiner werden, weil die elutionskräftige β -Zone sich zurückzieht¹².

Die Geschwindigkeit der Aktivitätsverschiebung bei Klimaänderungen wird weithin unterschätzt.

Fig. 5 zeigt, dass eine Aluminiumoxidplatte schon nach wenigen Sekunden an feuchter Luft in ihrer Aktivität kräftig abfällt. Deshalb sind alle Kompromissver-

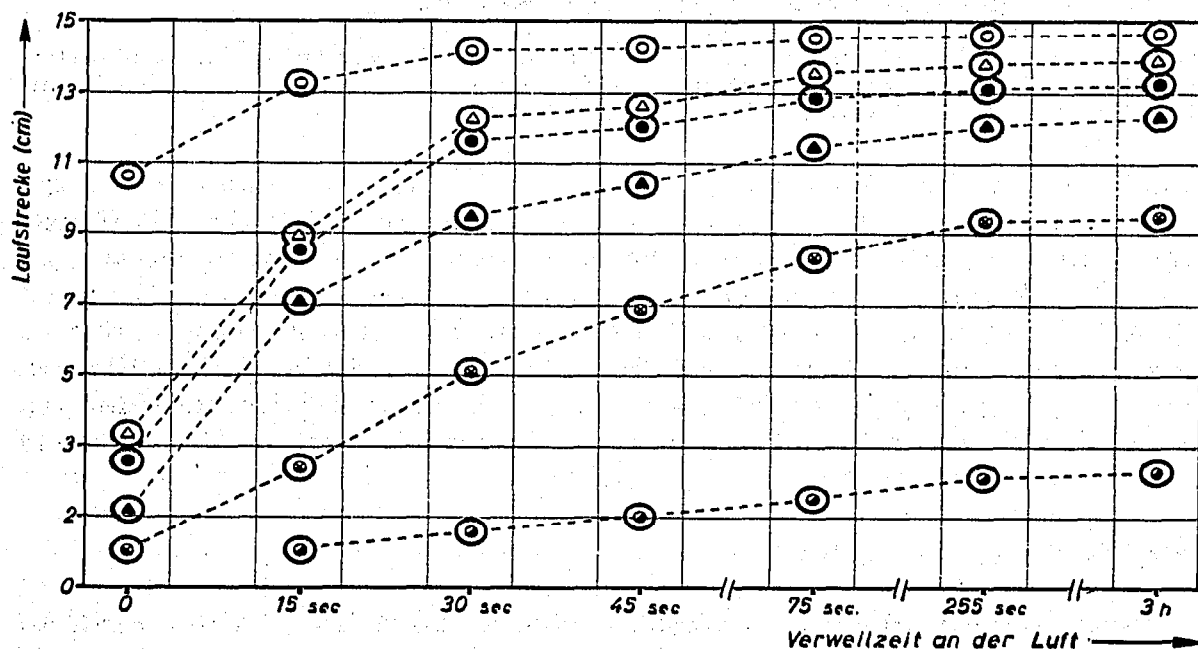


Fig. 5. Desaktivierungsgeschwindigkeit von Aluminiumoxid. Umklimatisierung von 15 auf 80% r.F.; Testfarbstoffe. Die Platten wurden aus dem Gefäss mit niedriger r.F. entnommen, die angegebene Zeit an der Luft bei 80% r.F. belassen und dann in der S-Kammer entwickelt. Nach spätestens 4 Min. ist die neue Aktivität erreicht. Δ = Verunreinigung in Sudanschwarz. Für weitere Zeichenerklärungen, siehe Fig. 1.

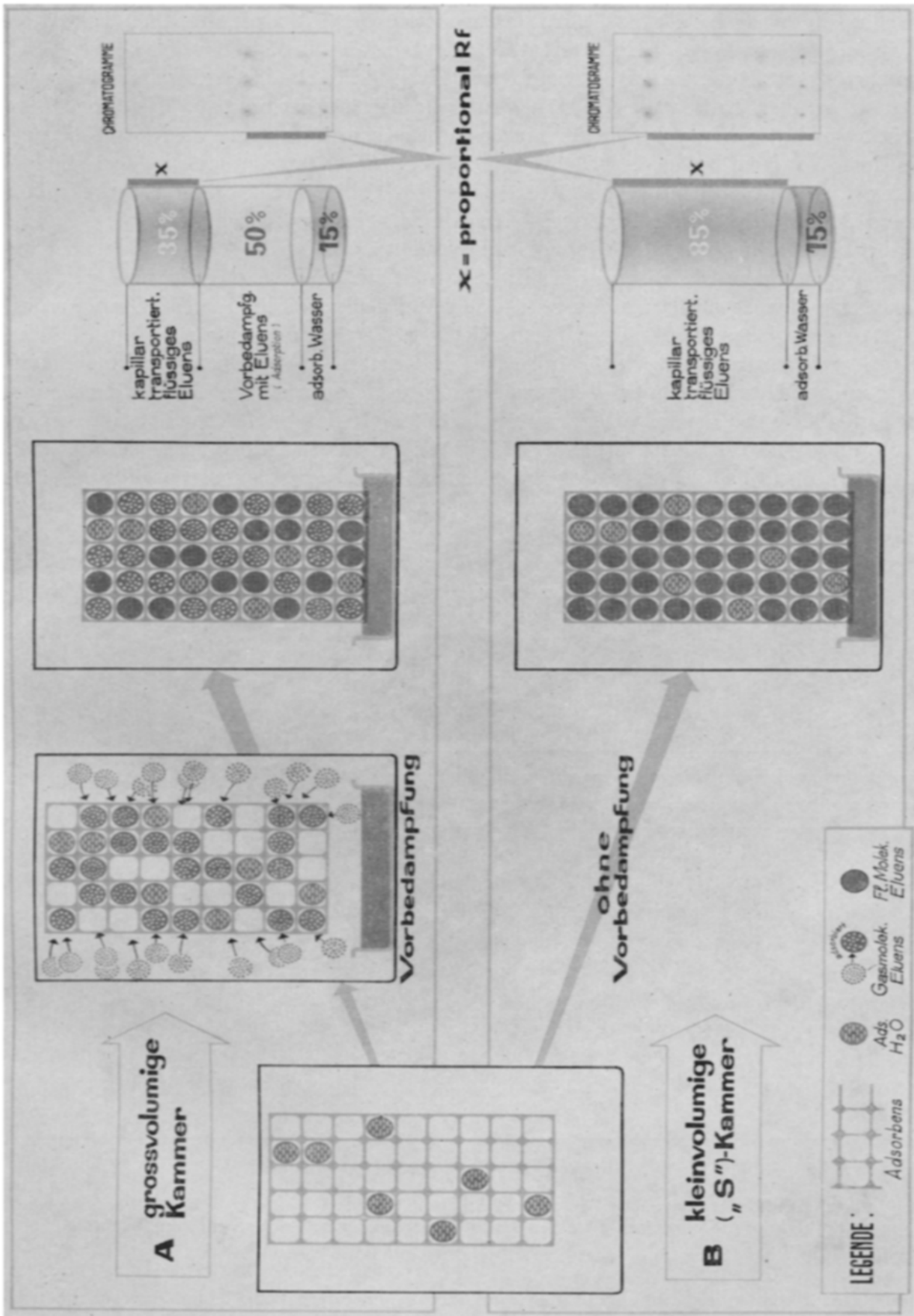


Fig. 6. Schematische Darstellung des Vorbedampfungseffekts.

fahren, die Platten in *einem* Gefäss klimatisieren, sie dann durch die Luft transportieren und in *einem anderen*, klimatisierten oder nicht klimatisierten, Gefäss entwickeln, mit grösster Reserve zu betrachten. Eine zeitliche Standardisierung der Manipulationen an der Luft umgeht das Problem nur scheinbar, da die Umklimatisierungsgeschwindigkeit von der Differenz zwischen Arbeitsfeuchte und Umgebungsfeuchte abhängt; man müsste also für jeden Einzelfall anders normen. Von diesem Vorbehalt kann auch die innenbeschichtete Desaga-Röhre nicht ausgenommen werden, weil zum Auftragen der Flecken die Kappe abgenommen werden muss*.

Fast alle Hersteller von DC-Adsorptionsmitteln und -geräten schreiben in ihren Gebrauchsanweisungen noch immer vor, die Platten *in jedem Falle* bei 110° zu aktivieren und wiegen damit den weniger belesenen Verbraucher in der falschen Sicherheit, der Platte eine besonders dauerhafte Aktivität imprägniert zu haben. Es soll an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, dass ein solches Erhitzen nur zu einem schnelleren Trocknen der streichnassen Platten nütze ist—und zu sonst gar nichts! Eine bei 110° erzeugte Aktivität hat wegen der perfekten Reversibilität des Wassergleichgewichtes keine innere Beziehung zu der späteren Arbeitsaktivität.

Befindet sich eine DC-Platte vor der Elution in einer Fließmitteldämpfe enthaltenden Gasatmosphäre, so adsorbiert sie daraus Dämpfe. Diese "Vorbedampfung" füllt je nach Dampfsättigung bei Kieselgel bis zu 50% des kapillaren Schichtvolumens¹². Was sich schon auf der Schicht befindet, braucht später nicht mehr aus der aufsteigenden Flüssigkeit entnommen zu werden; der integrale Flüssigkeitsdurch-

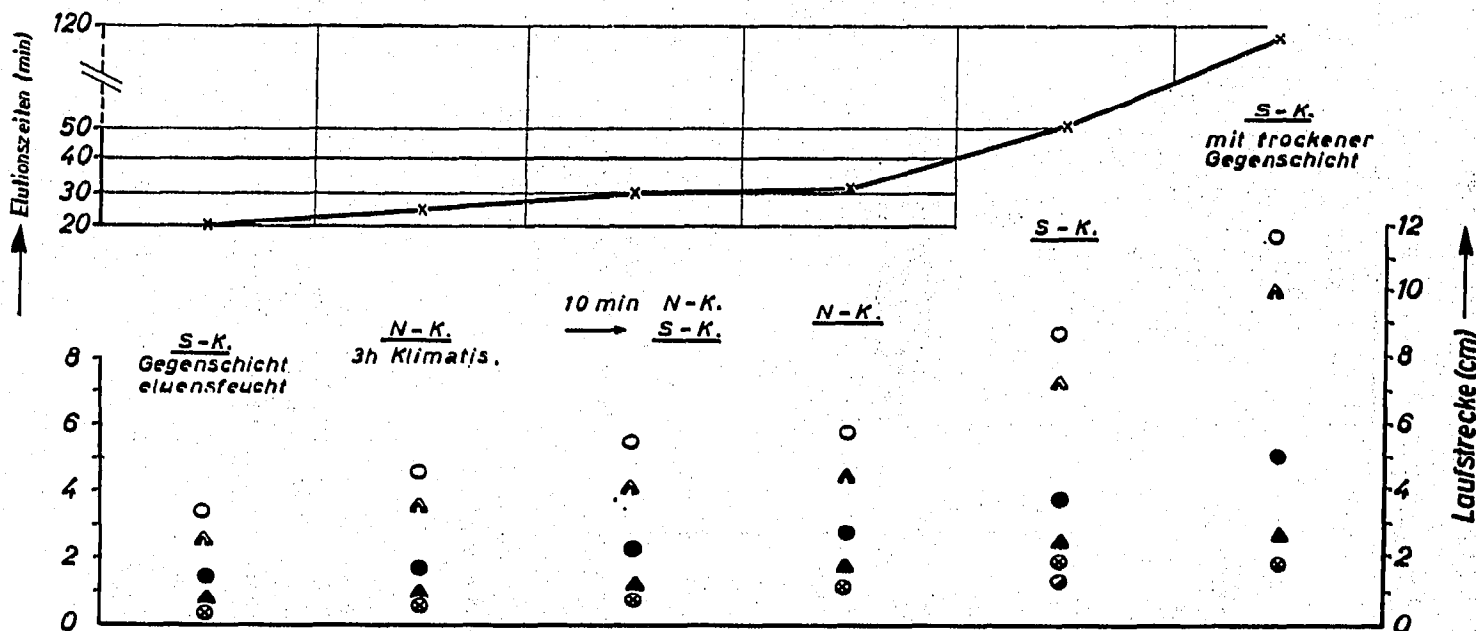


Fig. 7. Einfluss der Kammerform auf den R_F -Wert. Kieselgel H; 60% r.F.; Benzol. 1. v.l.: Gegenschicht in der S-Kammer fließmittelfeucht = Sättigungsvorbedampfung. 2. v.l.: Platte 2 h in der papiergesättigten N-Kammer vorbedampft, dann darin entwickelt; 1. v.r.: S-Kammer mit trockener Gegenschicht = maximaler Fließmitteldurchsatz durch chromatogr. Platte. Für Zeichenerklärungen, siehe Fig. 1.

* Ganz abgesehen davon, dass sich die vom Hersteller eingestellte Aktivität nicht über längere Zeiten halten kann, weil Gummi wasserdampfdurchlässig ist; ausserdem absorbiert die Schicht Gummibestandteile, z.B. die rote Farbe der Verschlusskappe.

TABELLE I

 R_F -DEFINITIONEN UND DAMIT ZU ERWARTENDE NUMERISCHE WERTE FÜR DIE R_F

R_F Definition ^a	Damit bestimmter R_F -Wert in der	
	N-Kammer ^b	S-Kammer ^c ($B > A$)
(1) $\frac{\text{Laufstrecke der Substanz}}{\text{Laufstrecke Startlinie-Front}}$	A	B
(2) $\frac{\text{Wanderungsgeschwindigkeit der Substanz}}{\text{Wanderungsgeschwindigkeit der Front}}$	A	B
(3) $\frac{\text{Wanderungsgeschwindigk. d. Substanz a. d. Stelle z}}{\text{Wanderungsgeschwindigk. d. Eluens a. d. Stelle z}}$	B	B
(4) $\frac{\text{Effekt. Totvolumend d. "trockenen" Schicht, } V_d}{\text{Bruttoretentionsvolumen der Substanz, } V_{dr}}$	A	B
(5) $R_F = \frac{1}{1 + K \cdot \frac{V_{stat}}{V_{mob}}}$ ($K = \text{Adsorpt.-koeff.};$ $V_{stat}/V_{mob} = \text{"Phasen-"}verhältnis')$	— ^e	B
(6) Wahrscheinlichkeit d. Aufenthalts d. Substanzmoleküle i. d. mobilen Phase (im Gleichgewicht)	B	B
(7) Bruchteil d. Zeit während der ein Substanzmolekül sich i. d. mobilen Phase aufhält (im Gleichgewicht)	B	B
(8) Bruchteil d. Substanzmoleküle i. d. mobilen Phase (im Gleichgewicht)	B	B

^a Unter Vernachlässigung des Fließmittelprofils in Elutionsrichtung.

^b Grossvolumige Kammer, die Gleichgewichtsvorbedampfung ermöglicht.

^c Schmalkammer ohne Vorbedampfung über die Gasphase.

^d Noch freies Schichtvolumen nach eventueller Vorbedampfung.

^e Definition für N-Kammer nicht anwendbar; s. Text.

satz, dem die Laufstrecken der Flecken proportional sind, ist also in der grossen N-Kammer kleiner als in der ideal ungesättigten Schmalkammer, ebenso verhalten sich die R_F . Die Zusammenhänge verdeutlicht schematisch die Fig. 6.

DALLAS¹ und wir¹³ berichteten unabhängig voneinander von dieser Erkenntnis. Fig. 7 zeigt noch einmal deren praktische Bedeutung.

EINFLUSS DER KAMMERFORM

Wir stehen hier vor der bemerkenswerten Tatsache, dass zwei Kammer-systeme, deren beider Verwendung durchaus legitim ist, zu zwei *verschiedenen* R_F -Werten führen *müssen*^{*}, wenn man die gleiche R_F -Definition benützt, nämlich die der Beziehung (1) in der Tabelle I.

^{*} Hier soll nicht die zusätzliche Komplikation diskutiert werden, die dadurch entsteht, dass die Fließmittelvorbedampfung zu einer Wasserverdrängung und mithin zu einer Aktivierung der Schicht führt¹³.

Auch nach Definition (2) sind die Werte verschieden, weil die Wanderungsgeschwindigkeit der Front in der N-Kammer grösser ist; sie sind gleich nach (3), weil die Wanderungsgeschwindigkeit des Fließmittels unterhalb der Front in beiden Kammern dieselbe ist.

Gegen die Definitionen (2) und (3) ist prinzipiell einzuwenden, dass sie von der mechanistisch falschen Vorstellung ausgehen, dass sich Substanzen mit verschiedenen R_F auch mit verschiedener Geschwindigkeit bewegen. In Wirklichkeit haben alle die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit und zwar die des Fließmittels; nur die Aufenthaltszeiten am Adsorbens unterscheiden sich¹⁴. Man kann also nur von einer *scheinbaren* Wanderungsgeschwindigkeit sprechen.

Bei Beziehung (4) ist das Bruttoretentionsvolumen V_{dr} für beide Kammern gleich, da die Laufstrecken proportional dem *bewegten* Flüssigkeitsvolumen sind; nur das Totvolumen, V_d , die Saugkapazität, ist in der N-Kammer durch Vorbedampfung reduziert. Die Martin-Syngé-Beziehung (5) darf nur für die S-Kammer angewendet werden. Sie setzt nämlich voraus, dass das gesamte V_d^{max} auch tatsächlich durch die Schicht bewegt worden ist*.

Die drei letzten Definitionen gehen vom Begriff der Trennstufe aus, sind aber kaum praktisch anzuwenden. Sie müssen für beide Kammern wegen des unterhalb der Front gleichbleibenden Phasenverhältnisses V_{stat}/V_{mob} zum selben Wert B führen.

Aus der Tabelle I sehen wir nun, dass für die S-Kammer der R_F -Wert nach *allen* Definitionen derselbe ist, und zwar B, und dass er für die N-Kammer sowohl A wie B sein kann. Daraus könnte man den Schluss ziehen, grundsätzlich nur noch

TABELLE II

REPRODUZIERBARKEIT DER R_F EINES FARBSTOFFGEMISCHES IN VERSCHIEDENEN KAMMERN

Fließmittel Benzol. $21 \pm 2^\circ$. In der N-Kammer: Aluminiumoxid H Merck; in den anderen Kammern Aluminiumoxid DS-5 Camag; handgestrichene Platten; Desaga-Streichgerät; S-Kammern mit Teflondichtungen.

$\bar{h}R_F^b$ = Mittelwert aus 5 Platten mit je 7 Flecken $\times 100$.

σ_b = Streuung dieses Mittelwertes (Näh.-St.a.).

$\bar{\sigma}_E$ = Mittlere Streuung längs der Einzelplatten (Näh.-St.a.).

Kammertyp	Rel. Feuchte [%]	Buttergelb			Verunreinigung Sudanrot in Sudanschwarz			Indophenol					
		$\bar{h}R_F^b$	σ_b	$\bar{\sigma}_E$	$\bar{h}R_F^b$	σ_b	$\bar{\sigma}_E$	$\bar{h}R_F^b$	σ_b	$\bar{\sigma}_E$			
BN-Kammer ^a	47 ± 1^d	82.7 ± 0.7	0.8	0.8	66.6 ± 1.5	0.5	0.5	57.8 ± 0.8	0.2	0.2	45.7 ± 1.1	0.5	0.5
S-K 1 mm Tiefe ^b	47 ± 3	79.9 ± 0.2	0.2	0.2	59.9 ± 1.0	0.3	0.3	52.5 ± 1.1	0.2	0.2	39.9 ± 0.5	0.3	0.3
S-K 3 mm Tiefe ^b	47 ± 3	82.9 ± 0.5	0.4	0.4	61.6 ± 0.9	0.3	0.3	54.6 ± 1.0	0.5	0.5	41.6 ± 1.2	0.4	0.4
GS-Klimakammer	47 ± 1^d	81.6 ± 0.4	0.4	0.4	62.3 ± 0.5	0.3	0.3	55.2 ± 0.3	0.2	0.2	43.0 ± 0.6	0.4	0.4
N-Kammer Desaga ^c	~ 55	56.0 ± 1.7	0.5	0.5	45.4 ± 1.8	0.6	0.6	41.0 ± 1.5	0.5	0.5	32.5 ± 1.2	0.4	0.4

^a In speziellem Klimakasten.

^b Klimaschrank.

^c Ohne Klimakontrolle; kurz hintereinander.

^d Über ges. NH_4SCN -Lösung.

* Würde für V_{mob} das in der N-Kammer—um die Vorbedampfung—verringerte integral durchgesetzte Flüssigkeitsvolumen V_d eingesetzt werden, so wäre dies gleichbedeutend mit einer Änderung des Phasenverhältnisses V_{stat}/V_{mob} und gäbe—im Gegensatz zur Realität—eine nicht-lineare Beziehung zwischen Durchsatz und R_F .

Schmalkammern zu verwenden. Doch muss zu Gunsten der ursprünglichen Stahl'schen N-Kammer festgestellt werden, dass sie bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit längs einer Platte ($\bar{\sigma}_b$) durchaus mit den anderen Kammern konkurrieren kann (Tab. II). Wer keine R_F -Werte veröffentlichen oder von Platte zu Platte vergleichen will, wird in vielen Fällen zufriedenstellend mit ihr arbeiten, insbesondere wenn sie nach BADING¹⁵ klimatisierbar gemacht wird. Ihr systematischer Nachteil liegt darin, dass die Vorbedampfung während der Elution stattfindet und damit von Platte zu Platte unreproduzierbar wird.*

Die Chromatographie in Schmalkammern—speziell in vertikalen—reagiert sehr empfindlich auf konstruktive Mängel, falsche Handhabung und scheinbare Belanglosigkeiten. Besonders gefährdet sind Chromatogramme auf langsam laufenden Schichten. Temperaturunterschiede von 0.5° zwischen Deckplatte und Schicht** führen z.B. zu einer derart starken Kondensation auf der Deckplatte, dass die Front nicht mehr wandert, wohl aber die Flecken. Ungelöst ist noch das Problem der Abdichtung solcher Kammern. Alle Anstrengungen, Randeffekte und sonstige Unregelmässigkeiten durch hermetische Abdichtung der gesamten Kammer zu beseitigen, müssen in eine Sackgasse führen, weil in einer solchen Kammer die Elution schnell zum Stehen kommt: Der durch den Partialdruck des Fließmittels erhöhte Innendruck steigt allmählich an, drückt die Tankflüssigkeit aus der Kammer heraus und unterbricht so den kapillaren Kontakt mit der Schicht. S-Kammern *müssen* also—und zwar an der richtigen Stelle—undicht sein.

Randeffekte verschwinden dagegen völlig, wenn man die Dichtfläche der Kammer auf beiden Seiten mit Wasserglas verklebt***. Oben kann sie dabei völlig offen bleiben. Ein solches Vorgehen ist allerdings praktisch viel zu umständlich. Unsere Bitte geht daher an die Hersteller, für vertikale wie für horizontale Kammern Dichtungen zu entwickeln, die beide Seiten bis in den Tank hinein absolut abdichten.

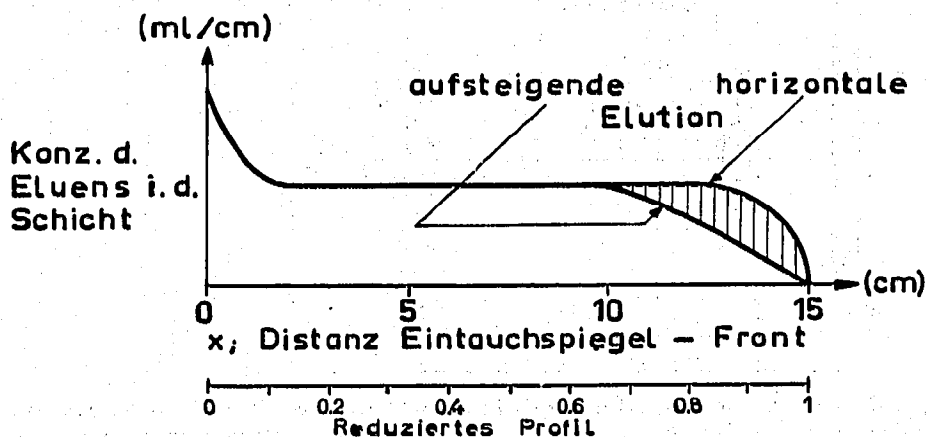


Fig. 8. Elutionsprofile für aufsteigende und horizontale Chromatographie (schematisch). Beim Anstossen der Front ist bei aufsteigender Elution ein um die schraffierte Fläche kleineres Volumen in der Schicht als bei horizontaler Elution. Dieser Durchsatzunterschied bewirkt kleinere R_F bei der aufsteigenden Chromatographie. Reduziertes Profil = x_i /Laufstrecke Front.

* Sie hat auch den Nachteil, dass die Vorbedampfung die "Bodenzahl" der Schicht verringert.

** Verursacht z.B. durch Zugluft. Siehe dazu auch E. STAHL¹⁰.

*** 30-minütiges Erhitzen auf 80° .

Sie dürfen weder selbst Fließmittel hochziehen noch das kapillare Hochkriechen eines Flüssigkeitsfilms (wie z.B. bei Glas-Glas) erlauben. Beides würde zur seitlichen Vorbedampfung und somit zu Randeffekten führen. Ausserdem sollten S-Kammern nicht mehr als 1 mm Gasraumtiefe haben, wenn man Konvektionen vermeiden will.

In Tabelle II fällt auf, dass die R_F in der BN-Kammer um ca. 10% höher sind als in der vergleichbaren 1-mm-Schmalkammer, was auf höheren Fließmitteldurchsatz schliessen lässt.* Dies steht im Einklang mit den unterschiedlichen Elutionsprofilen für horizontale und vertikale Entwicklung. Im ersteren Falle ist es steiler, was bedeutet, dass sich beim Anstossen der Front mehr Fließmittel auf der Schicht befindet als bei der aufsteigend entwickelten Platte¹⁷ (Fig. 8).

Um den Gradienten auszuebnen, empfiehlt DALLAS¹ ein "Überziehen" der Entwicklung nach dem Anstossen der Front, bis die Schicht gleichmässig durchscheinend ist. Allerdings ist dieser Zeitpunkt nicht so scharf zu bestimmen wie das Anstossen der Front; dazu kommt, dass die Substanzen in aufsteigender Chromatographie auch danach noch weiterwandern; in Horizontalkammern ist eine Verfolgung der Transparenz optisch nicht möglich. Wir meinen deshalb, dass es für die annähernde Ermittlung "wahrer" R_F ** einfacher und nicht ungenauer sei, die auf üblichem Wege gefundenen R_F je nach System mit jeweiligen empirischen Faktoren zu multiplizieren. Die Werte werden darüber hinaus noch unrichtig, wenn die Substanzen nicht in der Plateauzone des (während der Elution unveränderten) reduzierten Profils, d.h.

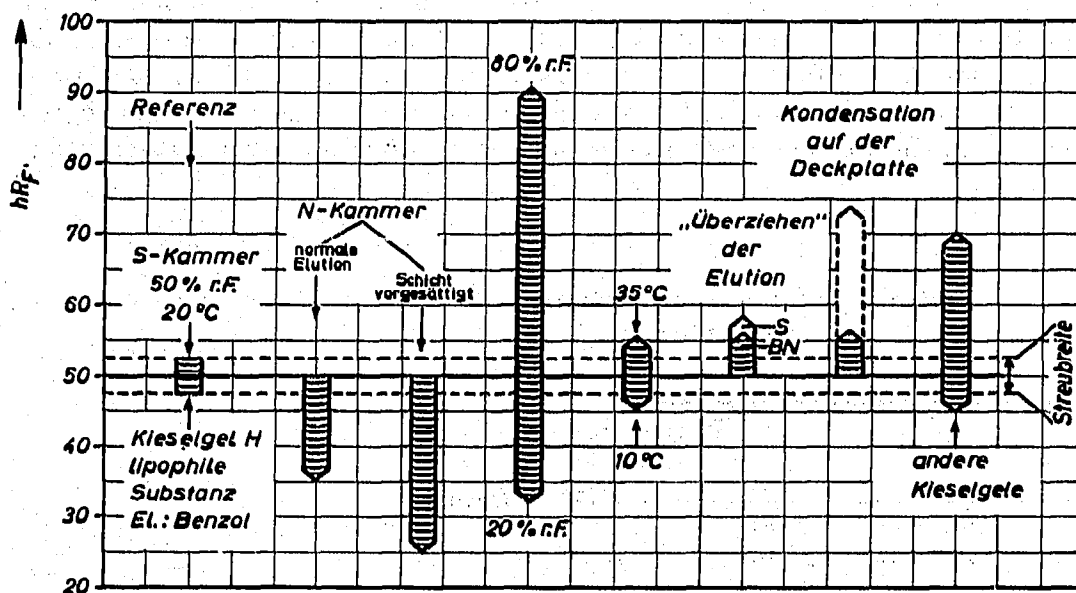


Fig. 9. Gewicht der Parameter auf die Änderung der R_F (Durchschnittswerte). Die Referenzbedingungen links sind willkürlich festgelegt. S-Kammer steht für alle Schmalkammern. Für Al_2O_3 sinkt für die vorgesättigte Schicht in der N-Kammer der hR_F nur auf ca. 45 statt auf 25 ab. Für hydrophile Systeme ist die Feuchteabhängigkeit wesentlich geringer.

* Die 3-mm-Schmalkammer und die 3-mm-GS-Klimakammer haben einen grösseren Gasraum und einen dementsprechend grösseren Durchsatz. Ihre Mittelwerte sind fast gleich.

** Die verlässlichste, aber auch die aufwendigste, Bestimmung des wahren R_F kann man nach Vorschlag von M. BRENNER vornehmen, indem man in der durchlaufenden BN-Kammer die scheinbare Wanderungsgeschwindigkeit der Substanz und gleichzeitig die (echte) des Fließmittels durch Eingabe einer radioaktiven Probe desselben ($hR_F = 100$) misst.

zwischen *ca.* hR_F 10–80 wandern, weil ausserhalb davon das Phasenverhältnis W_a/V_M verschoben ist.

Zum Schluss soll noch der Versuch unternommen werden, den quantitativen Einfluss der wichtigsten Parameter auf den R_F -Wert abzuschätzen (Fig. 9). Der Bezug ist eine willkürlich gewählte Substanz mit hR_F 50 in einer S-Kammer unter den ganz links aufgeführten Bedingungen. Für die anderen Fälle wurde jeweils nur ein Parameter geändert. Die Faktoren, die mit dem Durchsatz zusammenhängen, wie Vorbedampfung in der N-Kammer, Überziehen, Kondensation an der Front, wirken nur *anteilig* auf die R_F ; Feuchte und Temperatur verändern meistens auch das Trennbild. Die Darstellung gilt nur für *eine* Substanz und Kieselgel.

Bei Aluminiumoxid würde z.B. der hR_F -Wert in der N-Kammer (3. v.l.) nur auf *ca.* 45 statt auf 25 fallen, weil es eine wesentlich geringere Adsorptionskapazität für Gase hat. Seine Feuchteempfindlichkeit ist allerdings eher noch grösser.

Nach dem heutigen Stand des Wissens sollte es möglich sein, eine Reproduzierbarkeitsmarge der R_F von $\pm 5\%$ von Platte zu Platte, selbst von Labor zu Labor einzuhalten, wenn man

- (1) in einer Schmalkammer arbeitet, die nur auf beiden Seiten gedichtet ist,
- (2) nicht mehr als 1 mm Gasraumtiefe zulässt,
- (3) die Feuchte auf $\pm 2\%$ abs. kontrolliert,
- (4) bei der aufsteigenden Technik keine Schichten mit Laufzeiten > 45 min verwendet,
- (5) die Temperatur auf $20 \pm 4^\circ$ konstant hält,
- (6) Kondensation auf der Deckplatte verhindert,
- (7) die Randpartien des Chromatogramms vernachlässigt,
- (8) nur hR_F zwischen 20 und 80 berücksichtigt und
- (9) dasselbe, möglichst gipsfreie, Adsorbens verwendet.

Die Angabe von nicht nur reproduzierbaren sondern auch "richtigen" oder "wahren" R_F läuft auf eine Definitionsfrage hinaus; ihre Bedeutung ist weitgehend auf theoretische Betrachtungen beschränkt. Den Praktiker interessiert naturgemäss mehr die *Trennung* und *deren* Reproduzierbarkeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Die R_F -Werte für mehrere kommerzielle Dünnschichtchromatographie-Aluminiumoxide und Kieselgele werden unter identischen Bedingungen verglichen. Unterschiede bis 50% wurden beobachtet. Es folgen Betrachtungen über Schichtdicken- und Mengenabhängigkeit der R_F , R_F -Definitionen und ihre Konsequenzen für die Chromatographie in verschiedenen Kammertypen und über "wahre" R_F . Abschliessend wird in einem Diagramm der Einfluss der einzelnen Parameter auf die R_F abgeschätzt.

LITERATUR

- 1 M. S. J. DALLAS, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 267.
- 2 E. STAHL, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 411.
- 3 G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 580.

- 4 C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 46 (1963) 1772.
- 5 F. GEISS UND H. SCHLITT, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 208.
- 6 F. GEISS UND H. SCHLITT, *Naturwiss.*, 50 (1963) 350.
- 7 F. GEISS, H. SCHLITT, F. J. RITTER UND W. M. WEIMAR, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 469.
- 8 H. SEILER UND M. SEILER, *Helv. Chim. Acta*, 43 (1961) 1939.
- 9 F. GEISS, H. SCHLITT UND A. KLOSE, *Z. Anal. Chem.*, 213 (1965) 321.
- 10 A. TAKITANI, N. FUKUOKA, Y. IWASAKI UND H. HASEGAWA, *Japan Analyst*, 14 (1965) 652.
- 11 A. NIEDERWIESER UND M. BRENNER, *Experientia*, 21 (1965) 50 und 105.
- 12 H. W. PRINZLER UND H. TAUCHMANN, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 142.
- 13 F. GEISS, H. SCHLITT UND A. KLOSE, *Z. Anal. Chem.*, 213 (1965) 331.
- 14 E. CREMER UND R. MÜLLER, *Mikrochim. Acta*, 36/37 (1951) 553.
- 15 H. T. BADINGS, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 265.
- 16 E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg und Academic Press, New York, 1967, S. 69.
- 17 M. BRENNER, N. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND R. WEBER, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg und Academic Press, New York, 1962.

DISCUSSION

GÄNSHIRT: In the opinion of Dr. GEISS, if silica gels of different origin are used, each silica gel will need other relative humidity conditions to achieve best separation. Is it not possible to predict suitable conditions with regard to this by establishing the respective sorption isotherms?

GEISS: In practice, this is hardly possible since there are three parameters involved, *viz.* (1) the kind of the respective sorbate, (2) the adsorption isotherm of this sorbate, which again (3) depends on the water adsorption isotherm of the sorbent, *i.e.* on the relative humidity under the respective experimental conditions. For attempts at mathematical elimination of the influence of relative humidity for *one* adsorbent, using the course of the water isotherm, see H. W. PRINZLER AND H. TAUCHMANN, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 142.

WOLLENWEBER: I wonder whether it is not rather the heat of adsorption of the solvent which is responsible for the condensation on the cover plate, since, according to Dr. GEISS, external temperatures of $20 \pm 4^\circ$ are of no account?

JÄNCHEN: According to our experience, the condensation of the solvent onto the counterplate of an S chamber is in fact due to the heat of adsorption of the solvent. This is shown by the observation that in the case of the system Al_2O_3 -benzene condensation is stronger than with Al_2O_3 -petroleum ether. The formation of condensate in the system Al_2O_3 -benzene persists when the "sandwich" is inserted in a classical chamber.

GEISS: Of course, the heat of adsorption is always more or less present, causing, as a rule, weak to moderate condensation on the cover plate at the level of the front (*cf.* the paper I am going to read later). But, stronger and more interfering condensation can extend all over the layer in cases where the temperature distribution in the laboratory is not homogeneous, in other words if, owing to external influences, the cover plate is kept at a lower temperature than the layer. If the condensation is strongly depressed by translocation or simply by turning the chamber by 180° and if the front moves again more quickly, external temperature influences prevail.

BRENNER: Allow me a fundamental remark. The question is whether or not the subject of reproducibility of band position serves a useful purpose in the discussion of PC and TLC. Of course, there is no objection to the attempts at establishing and im-

proving reproducibility, but they should not lead to an unconscious and unjustified overestimation of the R_F concept.

With regard to their simplicity, PC and TLC yield unique opportunities for comparison in qualitative analysis. Yet the comparison must be based on the actual chromatographic behaviour of substances under identical conditions, *i.e.* on parallel and mixed runs on one and the same layer. R_F tables have the same character as the melting point tables: they contain orientative values (Richtwerte). Those who expect more ignore the real nature of PC and TLC and hunt for a phantom.

In the field of relations between the R_F values and the chemical structure we need not only R_F values which can be observed reproducibly*, but also true* and precisely measurable R_F values. At a corresponding cost we may succeed in achieving an ideal behaviour of the sorbates, yet the uncertainty in establishing and measuring the origin, spot centre and front does not allow precise determination of R_F differences below 0.01. A degree of accuracy as in the case of the steep peaks in GC cannot be achieved where it permits a fruitful exploitation of Martin's relation. The shortcomings are thus less in the reproducibility of the observed R_F values than in their definition* and in the mass distribution, which in PC and TLC is comparatively flat against GLC.

Thus do not let us indulge in *l'art pour l'art*. Reproducible R_F values do not improve PC and TLC, though they make them considerably more complicated.

GEISS: If you mean by *ars pro arte* the estimation and publication of the so-called true or correct R_F values, I agree with you; only I should like to point out that it was upon your initiative that such terms were introduced.

Perhaps the time is really not yet ripe for the estimation of more reproducible R_F values; recent knowledge must be first intimated to the practitioners and empiricists. In a few years the situation may have changed. We should not overgenerously overlook important and momentous influences and, at the same time, complain about bad reproducibility of the spot positions, or—worse—of the separation itself. If R_F values of separated spots are reproducible, the separation itself is reproducible as well!

DE ZEEUW (to Dr. GEISS): I have understood from your paper that you recommend S-chambers for reproducible results in TLC. I agree that with single-component solvents excellent results can be obtained, but in the case of TLC we use multi-component solvents to a very high extent and with these solvents the S-chamber can be fraught with severe difficulties. We have shown (*J. Chromatog.*, 32 (1968) 43) that TLC separations are highly dependent on the nature and amount of adsorbed vapour (vapour originating from the solvent). However, in the S-chamber the possibilities for vapour adsorption are limited and different from normal N-chambers. Hence, quite different separations will result in S-chambers and in many cases these separations will be insufficient, *e.g.* with systems like isopropyl alcohol–chloroform—ammonia or benzene–methanol (see also P. SCHWEDA, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1019).

So, in my opinion, the N-chambers are generally preferable because of their better separation possibilities, in spite of a somewhat decreased reproducibility. When working with N-chambers we have the advantage of vapour adsorption, which represents one of the most valuable features of the TLC technique. When we switch to the S-chamber, we may perhaps obtain higher reproducibility, yet this technique is a disadvantage when working with multi-component solvents. The S-chamber technique

* M. BRENNER u. Mitarb., in E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, 1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1962.

reminds of column chromatography, in which vapour adsorption is also impossible and we have seen that many TLC separations cannot be obtained on columns.

GEISS: It is quite possible that in special cases separations are achieved in N-chambers with solvent mixtures which do not succeed *a priori* in other systems; yet separations in N-chambers which only become possible through the effect of vapour conditioning are always subjected to chance: The amount of solvent taken up during the vapour conditioning by the layer which has not yet been wetted by the ascendent solvent depends, *i.a.*, on the migration rate of the front, and this varies from one plate to another, and especially from one layer material to another. Such improved separations are based on an activity gradient which is established on the layer during the development, owing to the fact that in the upper parts, where the layer remains dry for a longer time, more of the deactivating vapours (water, alcohol, etc.) are adsorbed than in the lower parts which are quickly irrigated. We exploited this phenomenon for especially difficult separation problems in the so-called "hot elution"*, which, however, we have abandoned, because of the fortuitousness of the results, in favour of the KS chamber*, in which a stationary and reproducible gradient can be achieved.

JÄNCHEN: It is possible to pre-saturate a sandwich chamber by using a coated plate as the counterplate and soak its layer with the solvent before assembling the sandwich. This way the saturation plate serves as a "wick" arranged in a short distance opposite the layer in which chromatography takes place.

DE ZEEUW: The use of an impregnated cover plate in the S-chamber can be successful in a few instances, for example with chloroform-isopropyl alcohol-ammonia, but in general it will be impossible to arrange the *same* vapour conditions as in the N-chamber by the impregnated cover plate and consequently the separations with this technique will still be different from those obtained in N-chambers.

* F. GEISS *et al.*, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 469; F. GEISS, H. SCHLITT AND A. KLOSE, *Z. Anal. Chem.*, 213 (1965) 333.

J. Chromatog., 33 (1968) 9-24