

CHROM. 4456

ERWEITERUNG DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHEN  
TECHNIK DURCH FERTIGPRÄPARATIONEN IN ROLLENFORM

H. HALPAAP UND H. BAUSCH

*Chemische Forschung, E. Merck AG, Darmstadt (B.R.D.)*

## SUMMARY

*Extension of the thin-layer chromatography technique using prefabricated roll preparations*

Prefabricated thin-layer chromatography (TLC) roll preparations are "ready-for-use" layers of inorganic or organic adsorbents on a flexible support of passivated aluminium or sealed polyester. They are available in rolls of 5 m by 20 cm. In addition to the current methods, separations can be carried out on these ready-made products by ascending development as well as by development on a rolled up foil of up to a length of 1 m. The TLC technique with longer running distances offers advantages for the separation of multiple mixtures, particularly of biochemical complexes, for the quantitative determination and for the preparative isolation of the components.

Um die jeweiligen Vorzüge der beiden zunächst getrennt voneinander entwickelten Chromatographieformen an einer Fläche, nämlich der PC mit ihrem sofort einsatzbereiten qualitativ hochwertigem Trägermaterial, das sich beschriften, imprägnieren, schneiden und abheften lässt und das die Möglichkeit zu vielseitiger, dabei einfacher, auch absteigender Technik mit längeren Laufstrecken gibt, und der DC mit grösserer Auswahl an Adsorbentien, höherer Konzentrierung der Substanzen in einem Fleck durch feinteiligeres Sorptionsmittel, mit der Widerstandsfähigkeit der anorganischen Sorptionsschicht gegen aggressive Reagenzien, dadurch erhöhter und vielseitigerer Nachweisempfindlichkeit, kürzeren Entwicklungszeiten und grösserer Variationsmöglichkeit hinsichtlich der verschiedenen Trennprinzipien miteinander zu kombinieren, wurden zwei getrennte Wege beschritten. Von den Erfahrungen der PC ausgehend wurden selbsttragende Schichten in Bogen-, Folien- oder Rollenform entwickelt, bei denen ein anorganisches Sorptionsmittel in Konzentrationen bis zu 60% bzw. bis zu 80% einem Gerüstmaterial aus Cellulose<sup>1-10</sup> oder Glasfasern<sup>11-14</sup> eingelagert ist, während von den Erfahrungen der DC ausgehend ein Sortiment an Fertigbeschichtungen anorganischer und organischer Sorptionsmittel in fast reiner Form auf flexiblem Aluminium- oder Plastikmaterial in Folien- oder Rollenform eingeführt wurde.

Bei den DC-Alurollen bzw. den DC-Plastikrollen\* handelt es sich um gebrauchts-

\* Lieferanten: Anderman and Company Ltd., Tooley Street, London S.E. 1, Great Britain; Brinckmann Instruments Inc., Westbury, N.Y. 11590, U.S.A.; E. Merck AG, 61 Darmstadt, Postfach 4119, B.R.D.



Fig. 1. Schneiden der DC-Alurolle bzw. der DC-Plastikrolle in Stücke gewünschter Grösse.

fertige maschinell hergestellte Beschichtungen bewährter anorganischer und organischer Sorptionsmittel auf einem  $80\ \mu$  starkem Band von passiviertem Aluminium bzw. auf einem  $190\ \mu$  starkem Polyesterband mit polymerer anorganischer Versiegelung<sup>15</sup>.

Die 20 cm breite Rolle mit einer Nutzlänge von 5 m befindet sich in einer staubdichten Papp-Faltschachtel. Zum Gebrauch zieht man die Einstecklasche aus dem Bodenteil heraus, wobei das Ende der beschichteten Rolle 2–3 cm breit sichtbar wird, die Rolle selbst aber noch fest in der Schachtel verschlossen ist. Zum Gebrauch hat man nur das zur Chromatographie jeweils benötigte Stück herauszuziehen—es lässt sich sehr leicht abrollen—und mit einer Schere mit möglichst scharfen Schneiden von mindestens 10 cm Länge abzuschneiden (Fig. 1). Im Falle der Alurolle kann man die bei der Lagerung gebogene Folie bereits während des Abrollens durch einen leichten Druck nach unten in eine plane Form bringen, ohne dass die Schicht verletzt wird. Man kann dies aber auch nach dem Abschneiden durch leichtes Biegen über die Kante eines Labortisches erreichen. Nach Entnahme des gewünschten Streifens schiebt man als Schutz für das Rollenende die Einstecklasche wieder in den Bodenteil der Schachtel.

Die Fertigbeschichtung in Rollenform erlaubt wie die PC vielseitige Trennmöglichkeiten; neben den bisher bewährten Methoden können auch selten angewandte und selbst neue DC-Techniken durchgeführt werden. In der Besprechung verschiedener Trenntechniken möchten wir uns auf eindimensionale Trennungen beschränken, wobei nur ein einheitliches Sorptionsmittel, also keine Gradientenschicht<sup>16–20</sup> zugrundegelegt ist und auch Fragen der Kammertypen<sup>21–23</sup>, der Kammersättigung<sup>22–27</sup>, der Schichtvorbelastung<sup>22,28–32</sup> und der Fließmittelentmischung<sup>33</sup> unberücksichtigt bleiben sollen.

Der Vorzug der mehrfach aufsteigenden Entwicklung, wobei man das gleiche oder auch ein variierendes Fliessmittel verwendet, gegenüber der einfachen Entwicklung ist unbestritten<sup>14,34-40</sup>. Für die analytische Dünnschichtchromatographie ist sie heute eine vielfach angewandte Methode, für die präparative Schichtchromatographie eine zwingende Notwendigkeit<sup>41,42</sup>. Es erfolgt eine indirekte Vergrößerung der Laufstrecke, bei der aber die Diffusion der Substanz in das Sorptionsmittel nicht zunimmt, im Gegenteil sogar eine Kontraktion eintritt. Bei der Mehrfachentwicklung ist die Trennwirkung von Substanzen mit tieferen  $R_F$ -Werten begünstigt. Die Verbesserung der Trennwirkung durch Vergrößerung der Laufstrecke wird bei aufsteigender Technik auch dadurch erreicht, dass man das Fliessmittel in kontinuierlicher Entwicklung am oberen Rand abdunsten oder von einer lockeren Sorptionsschicht aufsaugen lässt<sup>43-48</sup>.

Eine kontinuierliche DC lässt sich für die Plattenformate 20 cm × 20 cm besonders leicht auch in horizontaler Entwicklung<sup>47</sup> in Schmalkammern, z.B. der BN-Kammer (Desaga)<sup>49-51</sup> und der Vario-KS-Kammer (Camag)<sup>52,53</sup> durchführen, indem man die Flüssigkeit am Plattenende kontinuierlich evtl. unter Zuhilfenahme eines Heizblockes abdampfen lässt. Man erreicht für Substanzen mit geringeren  $R_F$ -Werten oft eine bessere Trennung als durch mehrmaliges Entwickeln, wenn auch die Flecken diffuser ausgebildet sind und die Nachweisgrenze infolgedessen höher liegt.

Die DC in absteigender Entwicklung wird wohl in den Firmenschriften einiger Gerätehersteller mit angeführt, in der Praxis wird sie aber wegen der Schwierigkeit der Fliessmittelübertragung kaum angewendet. BIRKOFER *et al.*<sup>54</sup> trennten in absteigender Durchlauf-DC in einer selbst entwickelten Versuchsanordnung an Polyacrylnitril-Perlon-Schichten auf Glasplatten in 6-stdg. Laufzeit mit gutem Erfolg Anthocyanidine. HEIDEMANN *et al.*<sup>55</sup> konnten in absteigender Arbeitsweise in der BN-Kammer in 7-stdg. Laufzeit an Kieselgel ein Extrakt aus Nylon 6.6 und in 36-stdg. Laufzeit Cyclo-octa- $\epsilon$ -aminocaproyl und Cyclo-hepta- $\epsilon$ -aminocaproyl trennen. MEHLITZ UND MINAS<sup>56</sup> trennten in einer selbst entwickelten Anordnung in absteigender Durchlauf-DC an Kieselgel Terpene, wobei sie die Fraktionen unmittelbar auffingen, also nicht abzukratzen und zu eluieren brauchten. In Kombination mit anschliessender Gaschromatographie erzielten sie ausgezeichnete Trennungen. MISTRYUKOV<sup>57</sup> führte einige Trennungen an losem Aluminiumoxid auf einer schwach geneigten Glasplatte in absteigender Richtung durch. In ähnlicher Weise trennten REISERT UND SCHUMACHER<sup>58</sup> 17-Ketosteroide aus Harn, indem sie an gipshaltigem Kieselgel auf Glasplatten von 20 cm × 55 cm in schwach geneigter Stellung entwickelten. Sie erzielten bessere Trennungen als nach dem Durchlaufverfahren in der BN-Kammer.

Absteigende DC-Trennungen auf beschichteten Folien, also der der absteigenden PC analoge Vorgang wurden bisher nur ganz vereinzelt beschrieben. KOSS UND JERCHEL<sup>59</sup> verwendeten eine 0.1 mm starke, zuvor mit silikathaltigem Scheuermittel hydrophil gemachte Aluminiumfolie mit einer Kieselgel-Stärke-Schicht zur Trennung von Gallensäuren in absteigender Entwicklung bei einer Laufzeit von 3 Std., in der das Fliessmittel 45 cm weit gewandert war. QUESENBERRY *et al.*<sup>60</sup> trennten an mit Kieselgel beschichteten nicht handelsüblichen Polyesterfolien der Eastman Kodak Company im Format 20 cm × 46 cm, die vor dem Gebrauch 2 Tage vorgewaschen worden waren, in absteigender Entwicklung Dichlormethan-Leberextrakte von weiblichen Mäusen, denen zwölf verschiedene Steroide zugesetzt worden waren. Sie erzielten ausgezeichnete Ergebnisse; zwischen aufsteigender und absteigender Tech-

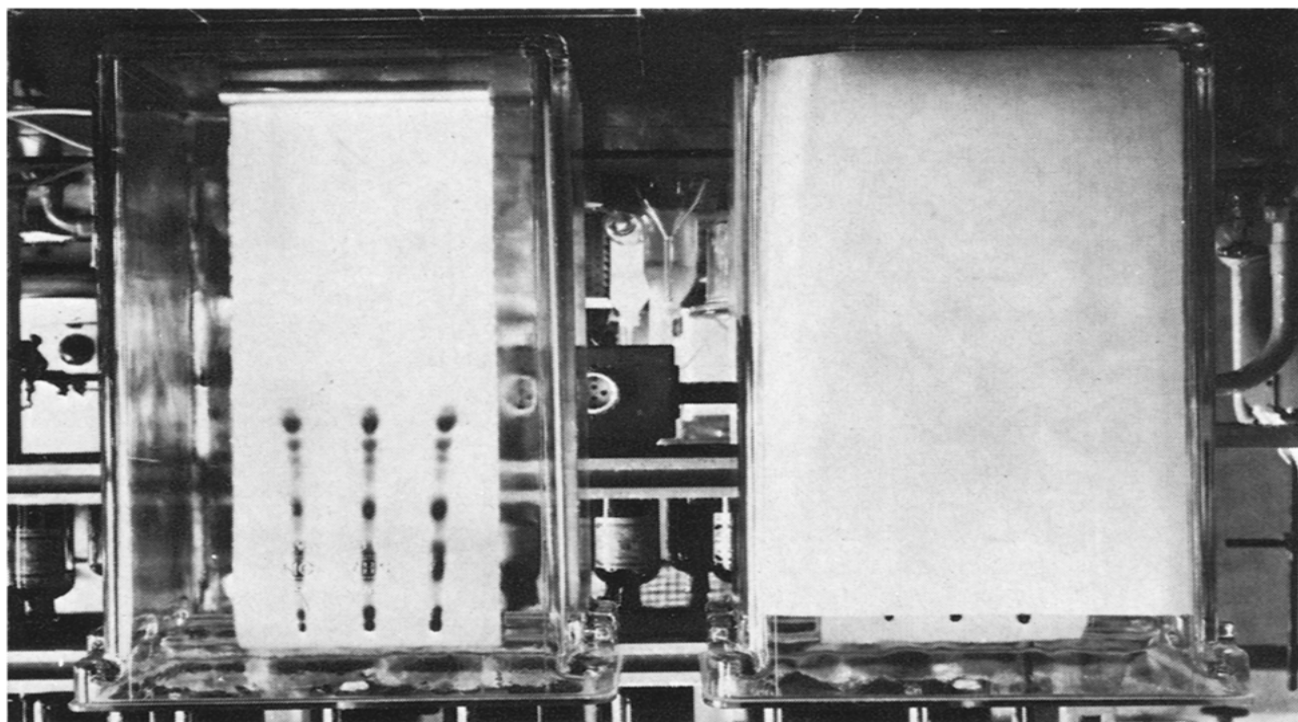


Fig. 2. DC in absteigender Entwicklungstechnik ("Panglas"-Chromatank Typ 300 der Firma Shandon).

nik stellten sie in den  $R_F$ -Werten keine Unterschiede fest. RANDEATH UND RANDEATH<sup>61</sup> führten an selbst hergestellten PEI-Cellulose-Schichten auf Hart-PVC-Folien in absteigender Technik Trennungen von nahe verwandten Nucleotiden mit einem Borax-Borsäure-Äthylenglykol-Wasser-Gemisch in 20 Std. durch. Die Trennung dieser Nucleotide in absteigender kontinuierlicher Entwicklung an Papier würde Laufzeiten von 3-7 Tagen erfordern.

Wie aus Fig. 2 ersichtlich, können zur absteigenden DC bis zu einer Länge von 40-50 cm normale Ausrüstungen für die absteigende PC benutzt werden. Wir selbst verwenden mit gutem Erfolg einen 60 cm langen Chromatank der Firma Shandon, wobei wir das Gefäß meist mit Filterpapier auskleiden und unter Sättigung arbeiten. Man erkennt, dass die Alurolle unten etwas aufgerollt bleibt, so lässt sich die wirksame Laufstrecke über die Länge des Gefäßes hinaus noch verlängern. In Fig. 3 ist rechts eine absteigende Chromatographie in einem Glasrohr von 10 cm Durchmesser und von 1 m Länge zu sehen, in das in den Deckel der Behälter für das Fließmittel eingearbeitet ist. Der Folienstreifen ist mit einer Metallklammer nach unten gehalten. Zur besseren Sättigung wurde auch in den Boden des Gefäßes die Fließmittelmischung gegeben und während der Chromatographie mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Daneben verwenden wir auch entsprechende Glasrohre von 60 cm und 80 cm Länge. Papierchromatographische Trennungen in extralangen Tanks wurden von KIMBALL *et al.*<sup>62</sup> zur Trennung von Corticosteroiden in 16-stdg. Laufzeit benutzt. Sie benutzten zylindrische Behälter von 30 cm Durchmesser und 120 cm Höhe, wobei sie zur Tanksättigung ein besonderes System der Fließmittelzirkulation einbauten. Fig. 4 zeigt einen Blick von oben in den Chromatank. Sowohl die Alufolie als auch die

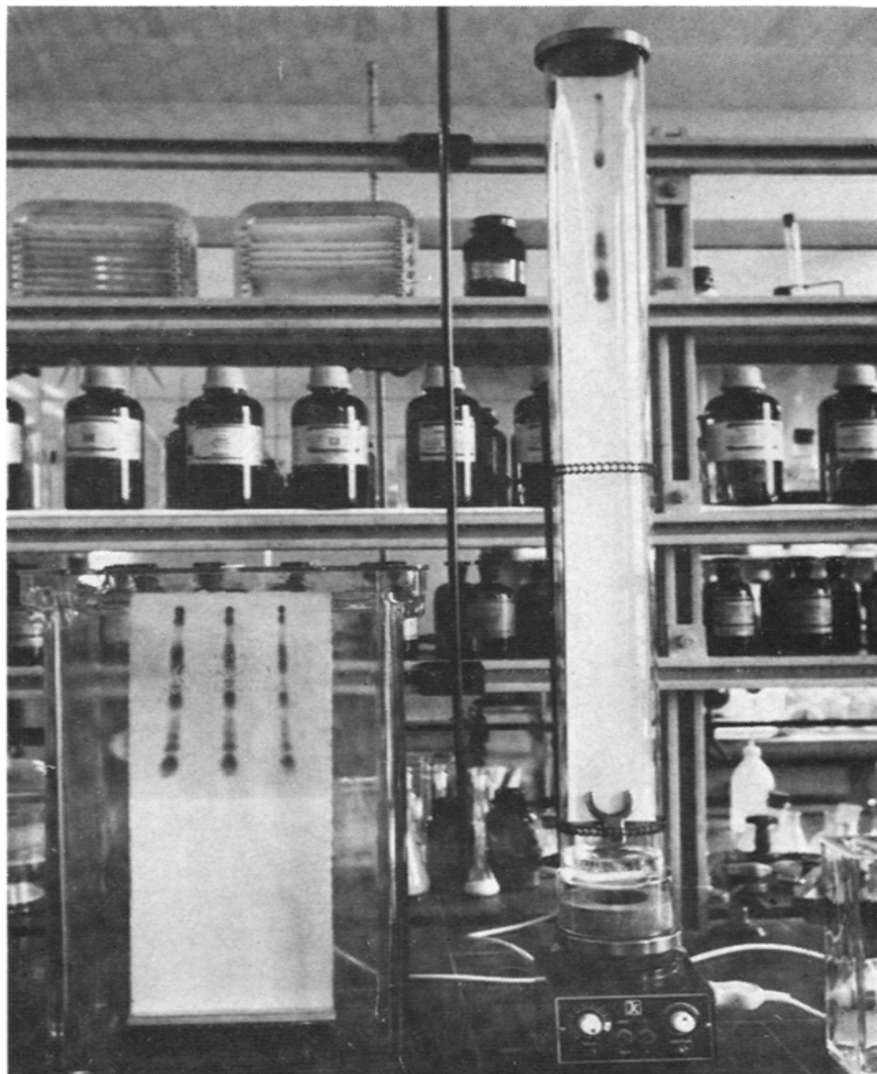


Fig. 3. DC in absteigender Entwicklungstechnik; linke Seite Chromatank von 60 cm Länge; rechte Seite Glasrohr von 1 m Länge.

Plastikfolie lassen sich ausgezeichnet biegen und so in den Flüssigkeitstrog einhängen. Es besteht nicht die geringste Gefahr einer Beschädigung der Schicht. Ein gewisser Vorzug der Alufolie ist in diesem Falle darin zu sehen, dass die Alufolie die einmal geformte Biegung beibehält, so dass man auf einen zusätzlichen Halt sogar verzichten kann.

Fig. 5 zeigt weitere Entwicklungstechniken. Neben einmaliger oder mehrmaliger aufsteigender Entwicklung von 20 cm  $\times$  20 cm Folien in ungesättigten oder gesättigten N- oder S-Kammern wurde in einer rechteckigen Trennkammer entwickelt, wie man sie auch zur präparativen Schichtchromatographie mit einem Einsatz für die Plattenformate 20 cm  $\times$  40 cm verwendet; und zwar im Winkel von etwa 30° schräg aufsteigend auf etwa 40 cm Länge. Dazu wurde ein Stück einer Alurolle über eine Glasplatte gelegt, oben und unten umgebogen und in das Gefäß eingestellt.

Daneben wird noch eine besonders einfache DC-Technik, nämlich eine rollen-

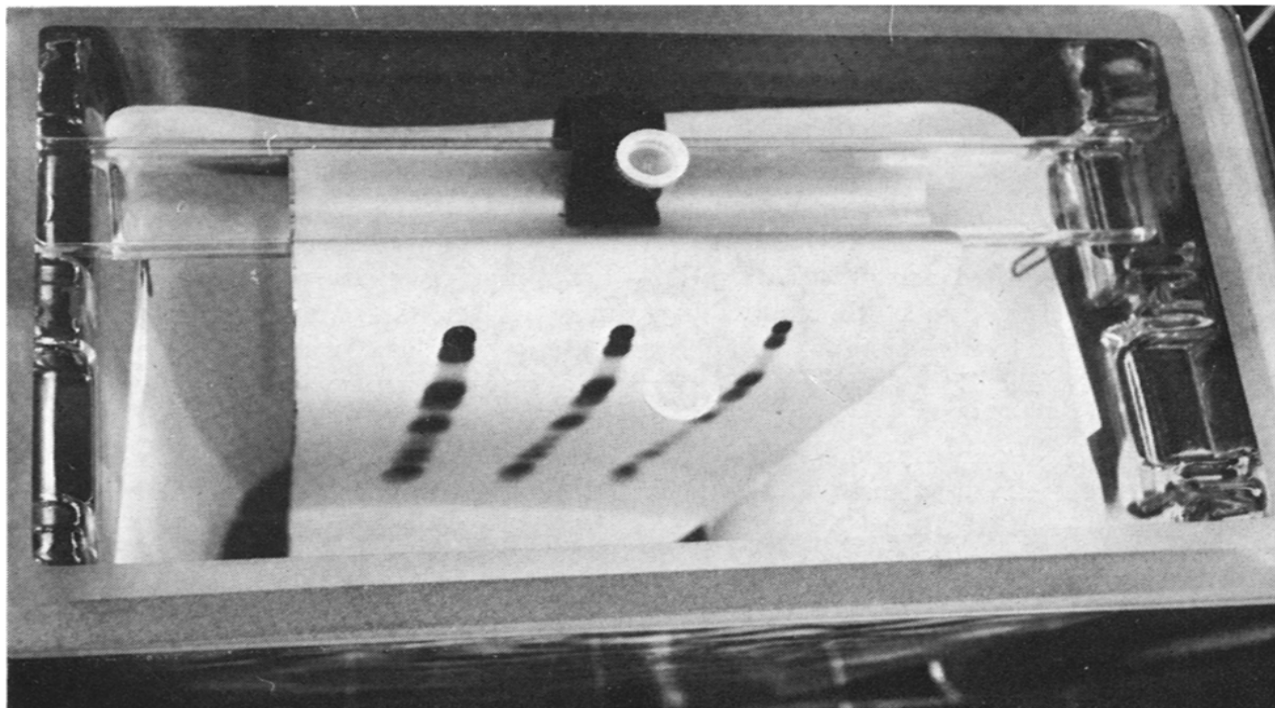


Fig. 4. DC in absteigender Entwicklungstechnik; Blick von oben in den Chromatank mit Fließmitteltrog und DC-Alurolle.



Fig. 5. Weitere DC-Entwicklungstechniken; linke Seite rollenförmige Entwicklung an einer DC-Alurolle; in der Mitte rollenförmige Entwicklung an einer DC-Plastikrolle; rechte Seite schräg aufsteigende Entwicklung von 40 cm Länge an einer DC-Alurolle.



förmige Entwicklung gezeigt, links an einer Alurolle, in der Mitte an einer Plastikrolle. Dazu wird ein 30 cm bis 100 cm langes Stück benutzt; das Auftragen der Substanzen erfolgt in etwa 12 cm Höhe. Dann wird das Stück mit der Schicht nach innen wie ein Film eng aufgerollt, wobei die Rolle von zwei aufgeschnittenen Kunststoff- oder Glasringen im Durchmesser von 4 cm bis 8 cm gehalten wird, die an einer Seite evtl. mit einer Stütze versehen sind. Das aus der Rolle herausragende Ende des Streifens wird nun in ein gesättigtes oder ungesättigtes Normalgefäß eingestellt oder eingehängt, wo es in das Fließmittel eintaucht. Es scheint am günstigsten zu sein, wenn die Startpunkte im 1. Viertel der Rolle zu liegen kommen. Bei dieser rollenförmigen Entwicklung wird eine grosse Sorptionsfläche auf kleinstem Raum gut gesättigt untergebracht. Der Nachteil, dass man während der Entwicklung die Fließmittelfront nicht erkennen kann, lässt sich bei der transparenten Plastikfolie dadurch beheben, dass man mit der Lösungsmittelfront einen Farbstoff mitlaufen lässt. Die Technik der rollenförmigen Entwicklung war von der PC her bekannt und vereinzelt beschrie-

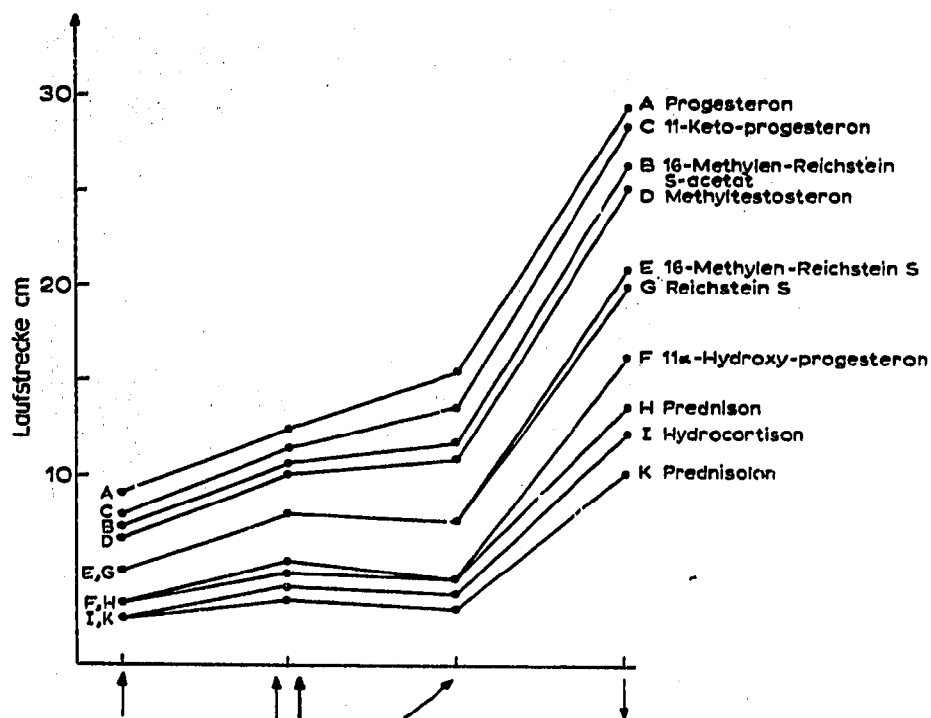


Fig. 6. Steroid-Trennung bei verschiedenen DC-Entwicklungstechniken. Kieselgel F<sub>254</sub>.

ben worden<sup>63-65</sup>. Allen Beschreibungen gemeinsam waren kleine Spezialgefäße ("Chromatocoil", "Chromatobox"), bei denen die Papierstreifen in einem Gestell aus Aluminium, Stahl oder Kunststoff spiralförmig zum Teil unter Zwischenlegen einer Folie zum Schutz vor gegenseitiger Berührung der einzelnen Windungen eingelegt waren. Die DC-Beschichtung in Rollenform bietet sich für diese rollenförmige Entwicklung geradezu an. Daneben können die flexiblen Alurollen oder Plastikrollen natürlich auch wie eine Manschette zusammengehalten und in eckigen oder runden

Gefässen aufsteigend entwickelt werden. Durch die Innenbeschichtung ergibt sich so eine besonders gute Sättigung.

Einige Trennbeispiele sollen die Leistungsfähigkeit der verschiedenen DC-Techniken erläutern und gegenseitig abgrenzen. Fig. 6 zeigt in masstabgetreuer Darstellung die Trennung eines Gemisches von zehn Steroiden. Auf mit Kieselgel F<sub>254</sub> beschichteten Aluminium- oder Polyesterfolien wurde mit Benzol-Methyläthylketon (40:60) entwickelt, und zwar:

- (I) Einmalige Entwicklung aufsteigend 20 cm hoch,
- (II) Zweimalige Entwicklung aufsteigend je 20 cm hoch,
- (III) Einmalige Entwicklung schräg aufsteigend 40 cm hoch,
- (IV) Einmalige Entwicklung absteigend im Chromatank.

Man erkennt, dass der jeweilige Abstand zwischen dem am stärksten hydrophilen und dem am stärksten lipophilen Steroid bei den verschiedenen Entwicklungstechniken

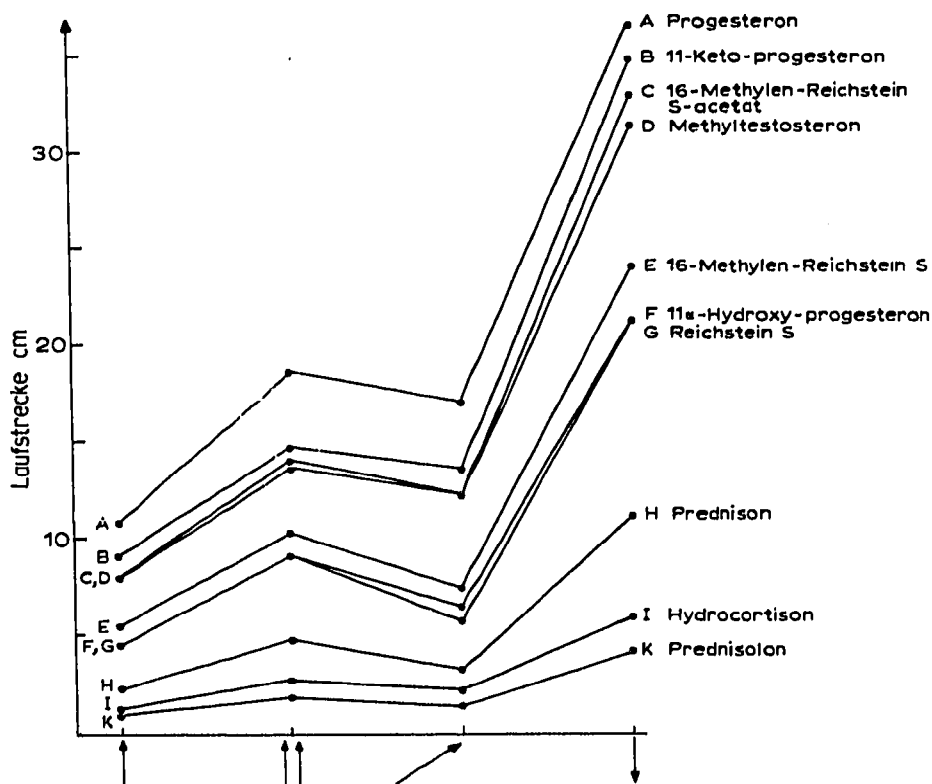


Fig. 7. Steroid-Trennung bei verschiedenen DC-Entwicklungstechniken. Kieselgel F<sub>254</sub>, schnell laufend (Kieselgel/Kieselgur).

zunimmt und zwar von 6.6 cm auf 9.0 cm, auf 12.5 cm und schliesslich auf 19.3 cm. Nur in dem absteigenden Chromatogramm IV ist die Trennung der vier hydrophilen Steroide erreicht und die der zwei Steroide mittlerer Polarität angedeutet. Dagegen ist die Trennung der vier lipophilen Steroide in dem Chromatogramm IV deutlich ungünstiger als im Chromatogramm II und besonders im Chromatogramm III.

Die Trennung des gleichen Steroidgemisches auf Kieselgel F<sub>254</sub> schnell laufend (Kieselgel/Kieselgur) mit Chloroform-Methanol (98:2) lässt bei den vier Entwick-



lungsarten (I) Einmalige Entwicklung aufsteigend 20 cm hoch, (II) Zweimalige Entwicklung aufsteigend je 20 cm hoch, (III) Einmalige Entwicklung schräg aufsteigend 40 cm hoch, (IV) Einmalige Entwicklung absteigend im Chromatank, die Steroide weiter auseinanderlaufen (Fig. 7). Die Abstände zwischen dem Progesteron- und dem Prednisolonfleck steigen bei den verschiedenen Entwicklungstechniken von 9.9 cm auf 13.8 cm, auf 15.7 cm und schliesslich auf 32.5 cm an. Man erkennt bei der absteigenden Entwicklung die grösseren Abstände zwischen den hydrophilen Steroiden Prednisolon, Hydrocortison und Prednison. Auch die Trennung der lipophilen Steroide Progesteron, 11-Keto-progesteron, 16-Methylen-Reichstein S-acetat und Methyltestosteron ist begünstigt. Die schräg aufsteigende Entwicklung bietet mit Ausnahme der besseren Abtrennung des Progesterons keinen Vorteil vor der zweimaligen Entwicklung je 20 cm hoch.

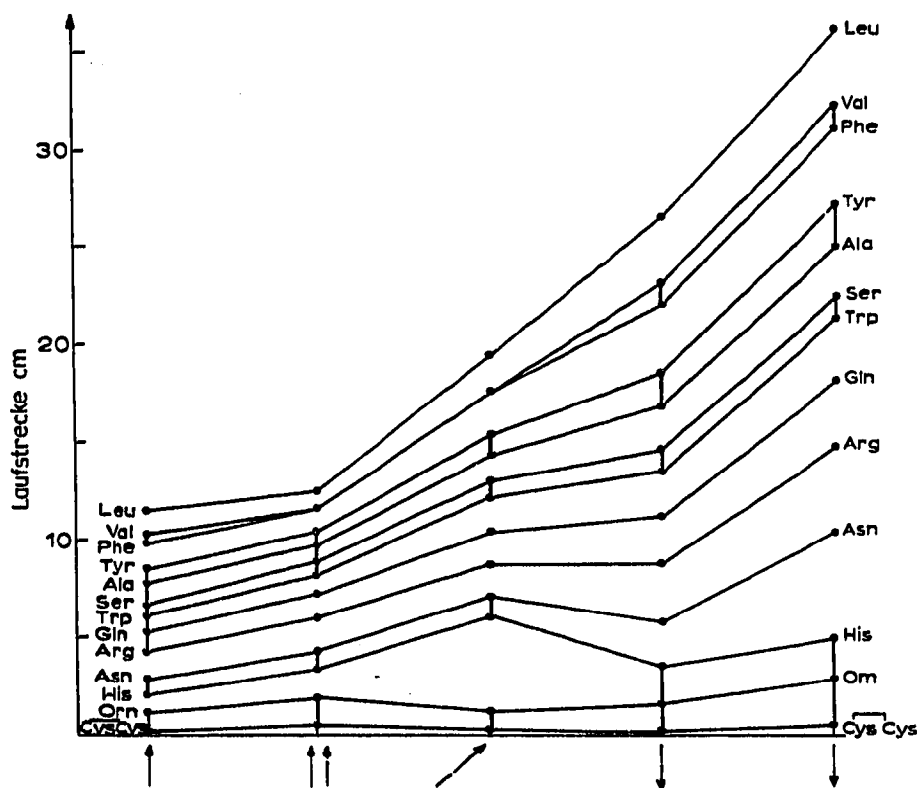


Fig. 8. Aminosäure-Trennung bei verschiedenen DC-Entwicklungstechniken. Cellulose.

Auch bei der Trennung von Aminosäuren werden bei absteigender DC-Technik grössere Substanzabstände erzielt, wie aus der masstabgetreuen Darstellung der Fig. 8 hervorgeht. Es wurde auf Celluloseschichten mit Äthanol-Wasser (75:25) entwickelt. Die Chromatogramme sind unter folgenden Bedingungen hergestellt:

- (I) Einmalige Entwicklung aufsteigend 20 cm hoch,
- (II) Zweimalige Entwicklung aufsteigend je 20 cm hoch,
- (III) Einmalige Entwicklung schräg aufsteigend 40 cm hoch,
- (IV) Einmalige Entwicklung absteigend im Chromatank,
- (V) Einmalige Entwicklung absteigend im Glasrohr.

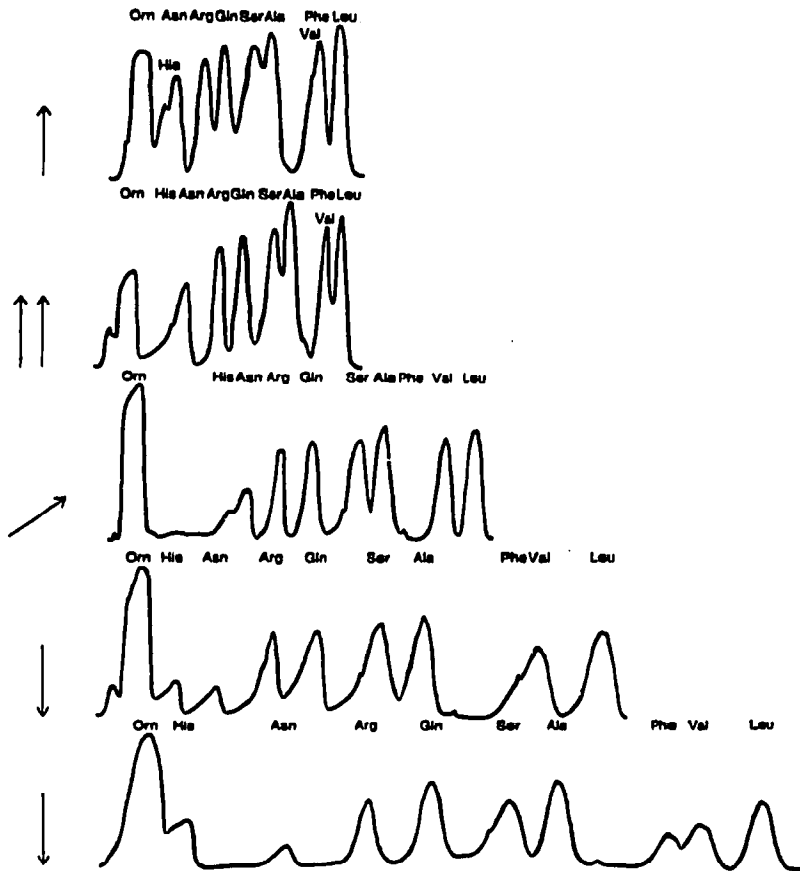


Fig. 9. Spektralphotometrische Auswertung der Aminosäure-Trennung bei verschiedenen DC-Entwicklungstechniken.

Die Abstände zwischen dem Cystin- und dem Leucinfleck betragen bei den verschiedenen Entwicklungsarten 11.3 cm bzw. 12.0 cm bzw. 19.1 cm bzw. 26.3 cm bzw. 35.8 cm. Die absteigende Entwicklung im Glasrohr führt zu noch weiteren Abständen als im Chromatank. Der Vorteil grösserer Substanzabstände zeigt sich besonders deutlich bei der Auswertung der fünf Chromatogramme im Chromatogramm-Spektralphotometer durch Remissionsmessung bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$  (Fig. 9). Nur bei absteigender Entwicklung sind im Diagramm die Peaks der meisten Aminosäuren vollständig voneinander getrennt und daher gut messbar. Zur qualitativen Bestimmung einzelner Aminosäuren genügt allerdings häufig eine einfache aufsteigende Entwicklung.

Als letztes Beispiel mag die Trennung von achtzehn lipophilen Farbstoffen auf Kieselgel F<sub>264</sub> schnell laufend (Kieselgel/Kieselgur) mit Benzol-Chloroform (75:25) angeführt werden. Die in Fig. 10 gezeigten sechs Originalchromatogramme—bis zu 80 cm lang—sind unter folgenden Bedingungen hergestellt:

- (I) Einmalige Entwicklung aufsteigend 20 cm hoch,
- (II) Zweimalige Entwicklung aufsteigend je 20 cm hoch,
- (III) Einmalige Entwicklung schräg aufsteigend 40 cm hoch,
- (IV) Einmalige Entwicklung absteigend im Chromatank,
- (V) Einmalige Entwicklung absteigend im Glasrohr mit Stau am Folienende,
- (VI) Rollenförmige Entwicklung.

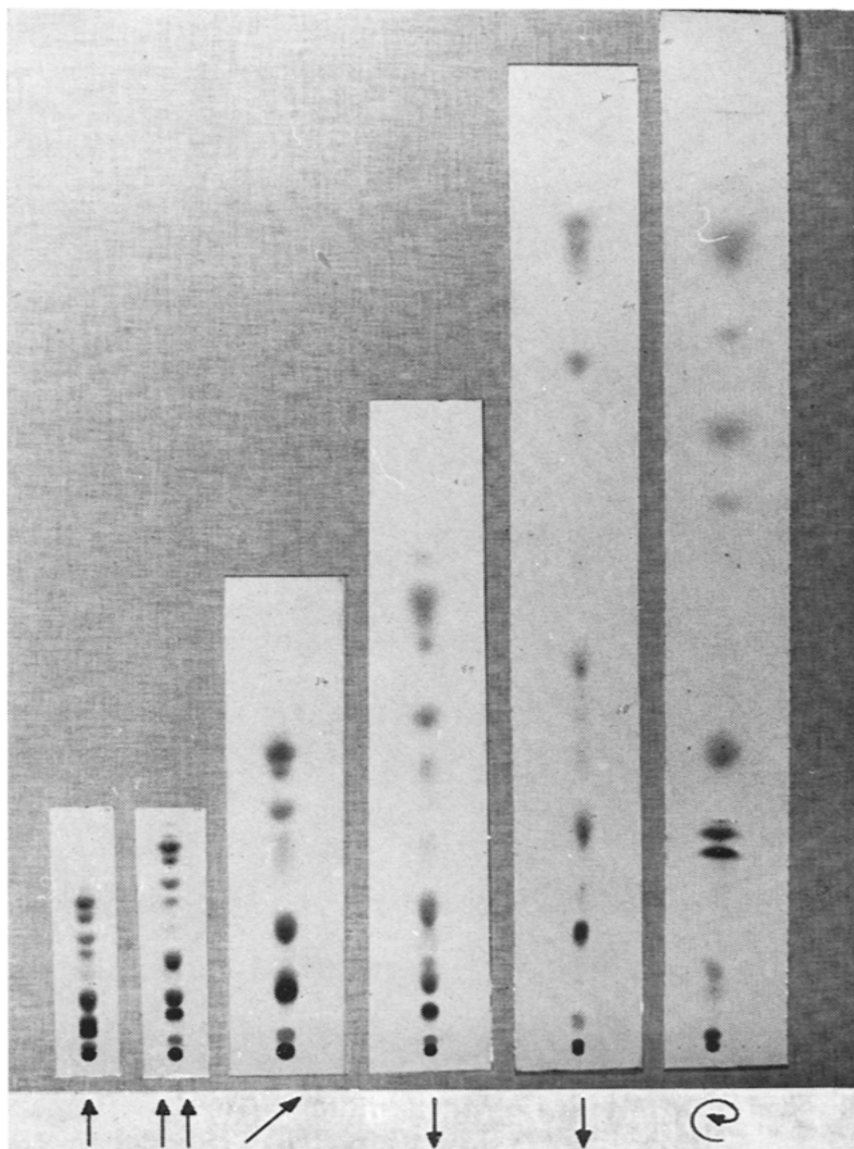


Fig. 10. Trennung lipophiler Farbstoffe bei verschiedenen DC-Entwicklungstechniken (Originalchromatogramme).

Auffällig ist bei der rollenförmigen Entwicklung im unteren Teil eine typische Verbreiterung einiger Flecke bei gleichzeitiger Konzentrierung. Da die Schwarz-Weiss-Wiedergabe nicht alle Farbstoffe erkennen lässt, sind die Trennverhältnisse aus der maßstabgetreuen Darstellung der Fig. 11 im einzelnen besser überschaubar. Während bei den ersten vier Entwicklungsarten mit zunehmenden Laufstrecken auch die Abstände zwischen den einzelnen Farbstoffen ansteigen, sind bei der absteigenden Entwicklung im Glasrohr und bei der rollenförmigen Entwicklung deutliche Abweichungen feststellbar. Die Abweichung im Chromatogramm V am Streifenende im Bereich der stark lipophilen Farbstoffe A-E erklärt sich aus einer Stauung des Fließmittels. Das Chromatogramm war über Nacht auf einem Streifen, der nicht lang genug war, entwickelt worden, daher das nachträgliche Zusammenschieben der betr.

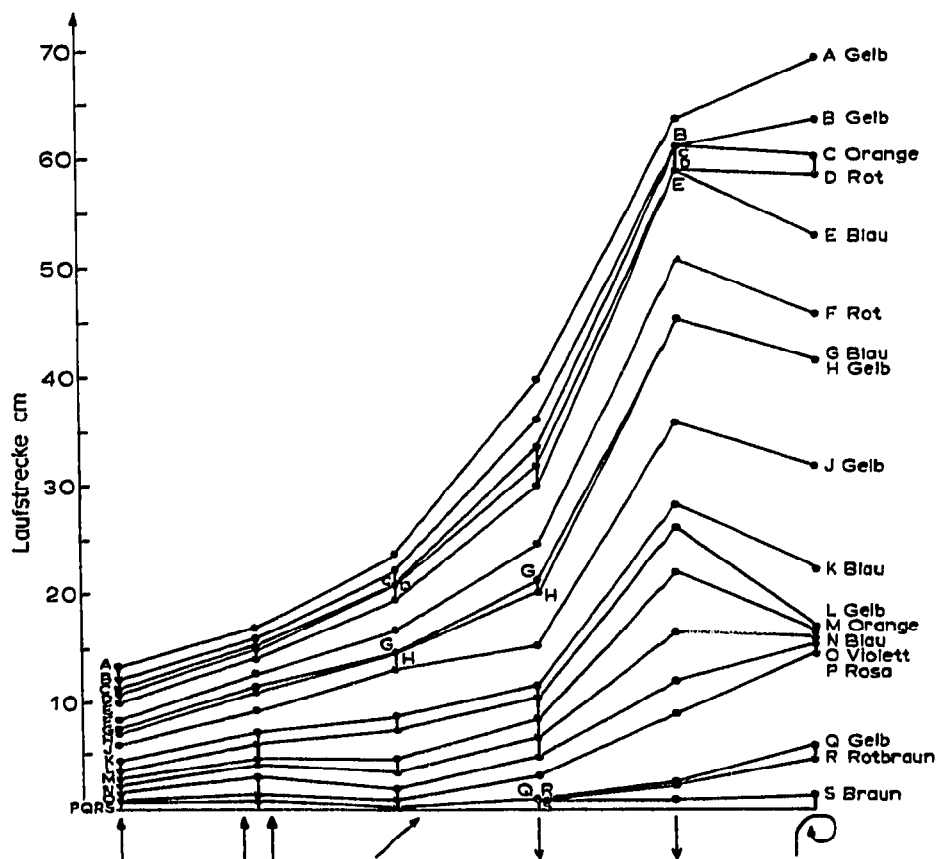


Fig. 11. Trennung von lipophilen Farbstoffen bei verschiedenen DC-Entwicklungstechniken.

Substanzen. In dem gleichen Chromatogramm ist die Trennung der Farbstoffe F–S wesentlich besser als bei den übrigen Chromatogrammen I–IV. Der bei der rollenförmigen Entwicklung im Bereich der Farbstoffe L–P aufgetretene Stau, der eine Verbreiterung, gleichzeitig aber eine Konzentrierung der Flecke an dieser Stelle bewirkt, trat bei unseren Versuchsbedingungen fast regelmässig in der zweitäusseren Windung auf. Die Gründe dafür sind uns noch nicht bekannt, sie müssen durch weitere Versuche, evtl. unter geringer Änderung der Bedingungen, ermittelt werden. Man erkennt, dass bei der rollenförmigen Entwicklung die Trennung aller Komponenten, also der stärker hydrophilen wie der stärker lipophilen ausgezeichnet ist, was nicht verwundert, wenn man bedenkt, dass die Chromatographie in ständig wechselnder Richtung auf- und absteigend vor sich geht.

In den angeführten Beispielen wurde bisher nur die Trennung bei den verschiedenen Techniken bewertet, während Laufzeiten und Fleckengrösse unberücksichtigt blieben. Wie Tabelle I zeigt, erhöhen sich bei einmaliger Entwicklung mit zunehmender Laufstrecke des Fließmittels auch die Laufzeiten, wobei die Art der Entwicklung, also senkrecht oder schräg aufsteigend, absteigend oder rollenförmig weniger ausschlaggebend ist. Kurze Laufzeiten werden an Kieselgel schnell laufend (Kieselgel/Kieselgur) erreicht, während Celluloseschichten sehr lange Entwicklungszeiten erfordern. Laufzeiten von über 15 Std. sind im allgemeinen nicht hinderlich, da man

TABELLE I

LAUFZEITEN UND FLECKENGRÖSSE BEI VERSCHIEDENEN DC-ENTWICKLUNGSTECHNIKEN UND VERSCHIEDENEN SORPTIONSMITTELN

	Sorptionsschicht	Cellulose	Kieselgel	Kieselgel schnell laufend (Kieselgel/Kieselgur)		
		Fließmittel	Hydrophil	Lipophil	Lipophil	Flecken- grösse <sup>b</sup> (mm <sup>2</sup> )
		Laufzeit (Std.)	Laufzeit (Std.)	Laufzeit (Std.)	Laufstrecke <sup>a</sup> (cm)	
↑	Normal-Trennkammer einmalige Entwicklung 20 cm	4	1-1.5	1	8	20
↑↑	Normal-Trennkammer zweimalige Entwicklung je 20 cm	8	2-3	1-1.5	13	20
↗	Rechteckige Trennkammer Länge 43 cm; Breite 23 cm; Höhe 28 cm; einmalige Ent- wicklung 40 cm	14	5	3	18	80
↓	Rechteckige Trennkammer Länge 31 cm; Breite 21 cm; Höhe 60 cm; einmalige Ent- wicklung 50 cm	20	6	4	25	110
↓	Glasrohr Länge 100 cm; Durchmesser 10 cm; einmalige Entwicklung 80 cm	40	14	8	51	150
⊙	Normal-Trennkammer einmalige Entwicklung 40-100 cm	20-60	10-30	5-15	46	200 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Des roten Farbstoffes F.<sup>b</sup> Des roten Farbstoffes F bei jeweils gleicher Auftragsmenge.<sup>c</sup> Bei 15 stdg. Laufzeit.

sich den Vorteil der Entwicklung über Nacht zunutze machen kann. Mit der Laufzeit bzw. der Laufstrecke erhöht sich durch steigende Diffusion der Substanz in dem Sorptionsmittel auch die Fleckengröße, wodurch die Trennung und die Nachweisempfindlichkeit gemindert werden. Den Vorteil einer Fleckenkontraktion durch zwei- oder mehrmaliges Entwickeln kann man sich bei nur einmaliger Entwicklung nicht zunutze machen. Die bessere Trennwirkung durch längere Laufstrecken erklärt sich daraus, dass trotz steigender Fleckengröße die Substanzabstände stärker zunehmen, was in Fig. 9 aus den Diagrammen der gezeigten Aminosäurepeaks besonders deutlich hervorging.

Der Vorteil der DC auf längeren Laufstrecken zur PC durch die grössere Variationsbreite hinsichtlich der Adsorbentien und Trennprinzipien, durch die grössere Trennschärfe und Nachweisempfindlichkeit und zur DC auf normaler Laufstrecke durch bessere Trennung ohne langwierige Erprobung von Gradientenschichten oder Schichtvorbelastungen (der einzige Nachteil der längeren Laufzeit bleibt bestehen) zeigt sich besonders bei Vielkomponenten-Trennungen, bei denen man möglichst alle Bestandteile nebeneinander und nicht nur einige Komponenten unter Vernachlässigung der übrigen nachweisen will.

Die DC auf längeren Laufstrecken bietet sich in ihrer einfachen eindimensionalen Technik für alle Routineuntersuchungen von Vielstoffsystemen, besonders für die Bestimmung von komplexen biochemischen Materialien an. Die Methode sollte hierbei nicht nur für qualitative und semiquantitative Untersuchungen verwendet werden, sondern ein wichtiges Anwendungsgebiet bei der quantitativen Bestimmung durch direkte Auswertung finden. Nach den vielfältigen Arbeiten der letzten Jahre über die Direktauswertung von Papier- und Dünnschicht-Chromatogrammen durch Densitometrie<sup>10,66-69</sup>, spektral-photometrische Absorptionsmessungen<sup>67,70-76</sup>, Fluoreszenzmessungen<sup>67,76-82</sup> und die Bestimmung der Radioaktivität<sup>83-86</sup> sowie durch die Entwicklung geeigneter Chromatogramm-Messgeräte scheint die Herstellung von DC-Fertigpräparationen in Rollenform eine notwendige und zweckmässige Ergänzung, wenn nicht gar Voraussetzung zu sein.

In besonderem Masse regen die Arbeiten von BUSH<sup>87-90</sup> über die Automation von Steroidanalysen durch direkte photometrische Auswertung dazu an, anstelle von Papieren die DC-Fertigpräparationen in Rollenform zu verwenden. Nach dessen Angaben lässt sich in einem speziell entwickelten Messgerät bei einer Geschwindigkeit von 1 cm/sec ein kontinuierliches Band von mit Klebestreifen aneinander gefügten Chromatogrammen vollautomatisch auswerten, wobei eine Leistung von 80 Chromatographiestreifen von je 45 cm Länge je Stunde oder von 500-600 derartiger Streifen am Tage erreicht wird. Die Chromatogramme selbst können ohne grossen Aufwand in hoher Zahl parallel angesetzt werden. Damit sei eine derartige Methode zur Bestimmung von komplexen biochemischen Bestandteilen in der medizinischen Diagnostik in ihrer Leistung allen anderen Chromatographiemethoden überlegen.

Hinsichtlich der zwei unabhängig nebeneinander in Entwicklung befindlichen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Substanzgemischen durch Flüssigkeitschromatographie, nämlich einerseits der Säulenchromatographie an feinteiligen Adsorbentien unter Anwendung von hohen Drucken und der Registrierung der Komponenten nach Elution und andererseits der Dünnschichtchromatographie an feinteiligen Adsorbentien unter Standardbedingungen der Vorbelastung und der kapillaren Sättigung mit direkter Auswertung der Komponenten ohne Elution, können DC-Fertigpräparationen in Rollenform für die DC-Methode eine ausschlaggebende Bedeutung erlangen.

Ein weiterer interessanter Einsatz dieser Beschichtungsform scheint bei der Entwicklung einer kontinuierlichen DC-Trennanlage zur präparativen Gewinnung von hochwertigen Substanzen zu liegen.

Abschliessend lässt sich sagen, dass das Angebot an Fertigpräparationen in Rollenform der DC neue Techniken und Anwendungsgebiete erschliesst.

## DANK

Frl. G. KÖPPEN danken wir für die chromatographische Mitarbeit und Herrn R. KLAUS für die spektralphotometrischen Auswertungen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Bei den DC-Fertigpräparationen in Rollenform handelt es sich um gebrauchsfertige Beschichtungen anorganischer und organischer Sorptionsmittel auf flexibler Unterlage von passiviertem Aluminium bzw. von versiegeltem Polyester in 5 m langen und 20 cm breiten Rollen. Neben den bisher üblichen DC-Techniken lassen sich mit diesen Präparationen auch Trennungen in absteigender und in rollenförmiger Entwicklung bis zu 1 m Länge durchführen. Die DC auf längeren Laufstrecken bietet Vorteile bei der Trennung von Vielstoffsystemen, besonders von komplexen biochemischen Gemischen, bei der quantitativen Bestimmung und bei der präparativen Isolierung der Komponenten.

## LITERATUR

- 1 I. E. BUSH, *Biochem. J.*, 50 (1952) 370.
- 2 M. H. HACK, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 531.
- 3 Č. MICHALEC, Z. KOLMAN, M. ŠULC UND J. MĚŠTAN, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 237.
- 4 C. B. SCRIGNAR, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 189.
- 5 G. V. MARINETTI, in A. T. JAMES UND L. J. MORRIS (Herausgeber), *New Biochemical Separations*, Van Nostrand, London, 1964, S. 339-377.
- 6 D. B. GOWER, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 424.
- 7 J. BORECKÝ, in K. MACEK UND I. M. HÁIS (Herausgeber), *Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1965, S. 206-207.
- 8 G. V. MARINETTI, *J. Lipid Res.*, 6 (1965) 315.
- 9 V. C. WEAVER, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 49.
- 10 K. FIGGE, *Experientia*, 24 (1968) 525.
- 11 H.-J. PETROWITZ, *Z. Anal. Chem.*, 230 (1967) 250.
- 12 H.-J. PETROWITZ, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 515.
- 13 G. PASTUSKA, H.-J. PETROWITZ UND R. KRÜGER, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 333.
- 14 H.-J. PETROWITZ, *Chemiker-Ztg.*, 93 (1969) 329.
- 15 H. HALPAAP, K. KLATYK UND H. RÖSSLER, *J. Chromatog.*, 48 (1970) 163.
- 16 H. JORK, *Deut. Apotheker-Zg.*, 102 (1962) 1263.
- 17 E. STAHL, *Chem.-Ing.-Tech.*, 36 (1964) 941.
- 18 E. STAHL UND H. VOLLMANN, *Talanta*, 12 (1965) 525.
- 19 E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 3.
- 20 E. STAHL, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1967, S. 92-95.
- 21 E. STAHL, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1967, S. 66-72.
- 22 F. GEISS UND H. SCHLITT, *Chromatographia*, 1 (1968) 387.
- 23 R. A. DE ZEEUW, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 915.
- 24 R. A. DE ZEEUW, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 43.
- 25 M. BRENNER, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 199.
- 26 R. A. DE ZEEUW, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 222.
- 27 R. A. DE ZEEUW, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 227.
- 28 F. GEISS, H. SCHLITT UND A. KLOSE, *Z. Anal. Chem.*, 213 (1965) 321.
- 29 J. H. VAN DIJK UND W. J. MIJS, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 419.
- 30 S. SANDRONI UND F. GEISS, *Chromatographia*, 2 (1969) 165.
- 31 R. A. DE ZEEUW, in *Symp. Chromatog., Electrophorèse, V, Bruxelles, 1968*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1969, S. 432-436.
- 32 R. A. DE ZEEUW in *Symp. Chromatog., Electrophorèse, V, Bruxelles, 1968*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1969, S. 437-440.
- 33 H. ENGELHARDT UND B. ENGEL, *Chromatographia*, 1 (1968) 490.



- 34 H. P. LENK, *Z. Anal. Chem.*, 184 (1961) 107.
- 35 J. A. THOMA, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 241.
- 36 L. STÁRKA UND R. HAMPL, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 347.
- 37 J. A. THOMA, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 441.
- 38 J. H. DHONT UND G. J. C. DIJKMAN, *Analyst*, 89 (1964) 681.
- 39 E. STAHL, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1967, S. 87.
- 40 E. SALA, in *Symp. Chromatog., Electrophorèse, V, Bruxelles, 1968*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1969, S. 146-152.
- 41 H. HALPAAP, *Chem.-Ing.-Tech.*, 35 (1963) 488.
- 42 H. HALPAAP, *Chemiker-Ztg.*, 89 (1965) 835.
- 43 N. ZÖLLNER UND G. WOLFRAM, *Klin. Wochschr.*, 40 (1962) 1098.
- 44 R. D. BENNETT UND E. HEFTMANN, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 245.
- 45 L. LÁBLER, in G. B. MARINI-BETTÒLO (Herausgeber), *Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1964, S. 32-44.
- 46 E. V. TRUTER, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 57.
- 47 T. M. LEES, M. J. LYNCH UND F. R. MOSHER, *J. Chromatog.*, 18 (1965) 595.
- 48 S. TURINA, V. MARJANOVIĆ-KRAJOVAN UND Z. SOLJIĆ, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 471.
- 49 M. BRENNER UND A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 17 (1961) 237.
- 50 M. LUISI, A. CARNICELLI, V. MARESCOTTI, M. GRIECO UND G. F. MENCHINI, *J. Chromatog.*, 35 (1968) 430.
- 51 K.-E. ROZUMEK, *J. Chromatog.*, 40 (1969) 97.
- 52 F. GEISS UND H. SCHLITT, *Chromatographia*, 1 (1968) 392.
- 53 F. GEISS UND H. SCHLITT, in *Symp. Chromatog., Electrophorèse, V, Bruxelles, 1968*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1969, S. 109-120.
- 54 L. BIRKOFER, CH. KAISER, H.-A. MEYER-STOLL UND F. SUPPAN, *Z. Naturforsch.*, 17b (1962) 352.
- 55 G. HEIDEMANN, P. KUSCH UND H.-J. NETTELBECK, *Z. Anal. Chem.*, 212 (1965) 401.
- 56 A. MEHLITZ UND TH. MINAS, *Chemiker-Ztg.*, 90 (1966) 67.
- 57 E. A. MISTRYUKOV, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 311.
- 58 P. M. REISERT UND D. SCHUMACHER, *Experientia*, 19 (1963) 84.
- 59 F. W. KOSS UND D. JERCHEL, *Naturwiss.*, 51 (1964) 382.
- 60 R. O. QUESENBERY, E. M. DONALDSON UND F. UNGAR, *Steroids*, 6 (1965) 167.
- 61 K. RANDEPATH UND E. RANDEPATH, *J. Chromatog.*, 22 (1966) 110.
- 62 H. L. KIMBALL, N. L. MCNIVEN UND SH. BURSTEIN, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 352.
- 63 V. SCHWARZ, *Biochem. J.*, 52 (1952) XIII.
- 64 M. ALCOCK UND J. S. CANNELL, *Analyst*, 79 (1954) 389.
- 65 J. BARROLLIER, *Naturwiss.*, 42 (1955) 486.
- 66 G. GORBACH UND C. WEBER, *Z. Anal. Chem.*, 222 (1966) 236.
- 67 H. JORK, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 310.
- 68 M. S. J. DALLAS, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 337.
- 69 E. J. SHELLARD UND M. Z. ALAM, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 347.
- 70 E. SAWICKI, T. W. STANLEY UND H. JOHNSON, *Microchem. J.*, 8 (1964) 257.
- 71 R. KLAUS, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 311.
- 72 R. KLAUS, *Pharm. Ztg.*, 112 (1966) 480.
- 73 H. JORK, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 297.
- 74 G. ACKERMANN UND H.-J. WIESNER, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 307.
- 75 R. KLAUS, *J. Chromatog.*, 40 (1969) 235.
- 76 K. KRAUS, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *J. Chromatog.*, 40 (1969) 244.
- 77 W. M. CONNORS UND W. K. BOAK, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 243.
- 78 G. PATAKI UND A. KUNZ, *J. Chromatog.*, 23 (1966) 465.
- 79 G. PATAKI UND A. NIEDERWIESER, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 133.
- 80 W. MESSERSCHMIDT UND W. WEISSER, *J. Chromatog.*, 38 (1968) 156.
- 81 D. E. JÄNCHEN, in *Symp. Chromatog., Electrophorèse, IV, Bruxelles, 1966*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1968, S. 194-198.
- 82 D. JÄNCHEN UND G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 391.
- 83 H. K. MANGOLD, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1967, S. 155-179.
- 84 G. ACKERMANN UND E. WEBER, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 328.
- 85 A. J. TOMISEK UND B. T. JOHNSON, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 329.
- 86 V. MOSES, in I. SMITH (Herausgeber), *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol. I, 3rd Ed., Heinemann, London, 1969, S. 643-692.
- 87 I. E. BUSH UND M. WILLOUGHBY, *Biochem. J.*, 67 (1957) 689.
- 88 I. E. BUSH, *Science*, 154 (1966) 77.

- 89 I. E. BUSH, *J. Chromatog.*, 23 (1966) 94.  
90 I. E. BUSH, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 157.

## DISCUSSION

**BRENNER:** Herr Dr. HALPAAP, wo bleiben die Vorteile der DC gegenüber der PC, wenn Sie zur absteigenden Technik mit extrem langen Laufstrecken zurückkehren?

**HALPAAP:** Bei der absteigenden Technik mit DC-Fertigpräparationen in Rollenform bleiben gegenüber der PC alle Vorteile der DC mit Ausnahme der kurzen Entwicklungszeiten bestehen, also (1) grössere Auswahl an Adsorbentien, (2) grössere Variationsmöglichkeit hinsichtlich der verschiedenen Trennprinzipien, (3) höhere Substanzkonzentrierung in einem Fleck durch feinteiligeres Sorptionsmittel, (4) Widerstandsfähigkeit der anorganischen Sorptionsmittel gegen aggressive Reagenzien und dadurch erhöhte und vielseitigere Nachweisempfindlichkeit.

**GEISS:** Zwei wichtige Vorteile der DC gegenüber der PC bleiben bei der von HALPAAP beschriebenen Technik der DC-Rollenpräparation bestehen: (1) Die geringere Fleckgrösserung auf der DC-Schicht wegen homogenerer Korngrössenverteilung und gleichmässigerer Packung. Gegenüber der PC werden die Van Deemter-Konstanten oft um eine Grössenordnung herabgesetzt. (2) Die Trennung ähnlicher Substanzen ist meist aus Adsorptionsschichten besser als bei Flüssig-Flüssig-Verteilung (grössere Unterschiede der freien Sorptionsenergien).

*J. Chromatog.*, 48 (1970) 144-160