

stärkere Erwärmung der Hb-Lösungen zu vermeiden und wenn möglich zum Zentrifugieren eine Kühlzentrifuge zu verwenden.

Summary. A simple apparatus for starch block electrophoresis is described. The cooling element consists of a commercially available cold plate in metal.

If oxyhaemoglobin is used, an error in measurement by the instability of the haemoglobin solutions can be re-

duced by adding small amounts of KCN, not only to the initial haemolysate, but also to the haemoglobin fractions which were eluted.

H. R. MARTI⁹

Medizinische Universitätspoliklinik Basel, 28. Februar 1961.

⁹ Wir danken Fr. L. BARGETZI für ihre technische Hilfe bei allen Untersuchungen.

Durchlaufende Dünnschicht-Chromatographie

Bei kleinen Unterschieden von Rf-Werten muss zur vollständigen chromatographischen Trennung eines Substanzpaares die Laufstrecke vergrößert werden. Diese Forderung ist für langsam wandernde Substanzen leicht erfüllbar, indem man die mobile Phase über den Bereich der stationären Phase hinausströmen lässt. In der Papierchromatographie ist dieses als Durchlaufmethode bezeichnete Verfahren in besonders einfacher Weise realisierbar¹. Wir beschreiben im folgenden eine Form, die sich bei Dünnschicht-Chromatogrammen bewährt hat.

Als erster hat unseres Wissens MOTTIER² die Dünnschicht-Chromatographie mit einem Durchlaufverfahren kombiniert. Seine Methode ist indessen auf die Verwendung von relativ schwerflüchtigen Lösungsmitteln wie Wasser und *n*-Butanol beschränkt. Unser Prinzip (Fig. 5) ist demgegenüber vielseitig anwendbar. Die mobile Phase wird dabei durch die Kapillarwirkung von Filterpapier auf die horizontal liegende Dünnschicht übertragen und kann nach Durchlaufen der Trennstrecke, die oben durch eine Deckplatte geschützt ist, verdampfen. Zwei längsseits zwischen Dünnschicht- und Deckplatte angebrachte Glas- oder Polyäthylensäulen dienen als Dichtung und gewährleisten genügend Abstand von Schicht zu Deckplatte, um das Eindringen von mobiler Phase in den Zwischenraum zu verhindern. Diese Anordnung lässt sich auch für «normale» Dünnschicht-Chromatogramme verwenden und erübrigt die sonst übliche Benützung von Trennkammern³.

A) Benötigte Einzelteile

1. Ein Behälter B aus rostfreiem Stahl (Fig. 1). Er besitzt eine plangeschliffene Oberseite und dient als Gefäß für die mobile Phase. Durch die beiden Löcher L in der Seitenwand werden 2 etwa 7 cm lange Polyäthylensäulen R gesteckt und nach Figur 1 aufwärts gebogen. Durch eines wird später die mobile Phase eingefüllt, das andere ermöglicht den Druckausgleich (s. u.).

2. Ein Filterpapier F (Fig. 2). Es überträgt die mobile Phase auf die Schicht. Der Teil *efgh* ist dem Innenprofil des Behälters B anzupassen. Bei Verwendung einer leichtflüchtigen mobilen Phase kann dasselbe Filterpapier mehrmals benutzt werden.

3. Eine Trägerplatte T, 200 × 200 mm (Fig. 3). Sie trägt die Dünnschicht, zum Beispiel Kieselgel. An 2 gegenüberliegenden Rändern wird mit dem Finger soviel von der Schicht abgestreift, dass etwa 6 mm breite, völlig blanke Streifen entstehen. Auf der Vorderseite (Fig. 3) werden die Substanzen in gewohnter Weise 15 mm vom Plattenrand entfernt aufgetragen. Es ist empfehlenswert, im rechten Winkel zur Streichrichtung zu chromatographieren.

4. Eine Deckplatte D, 200 × 200 mm, mit «Kufen» (Fig. 4). Als Kufen werden auf 2 gegenüberliegenden Seiten einer planen Glasplatte (zum Beispiel blanke

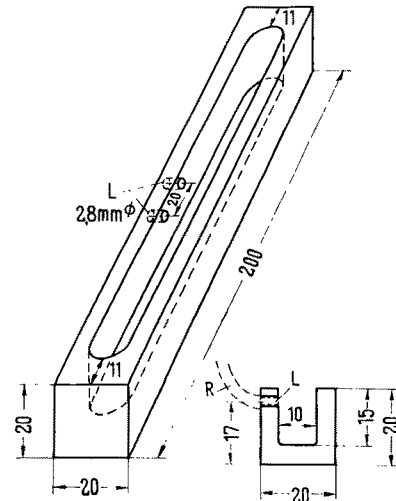


Fig. 1. Behälter aus V4A-Stahl für die mobile Phase. Längsmasse in mm.

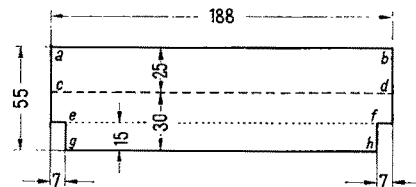


Fig. 2. Filterpapier Whatman No. 1 (Schnittbogen). Längsmasse in mm.

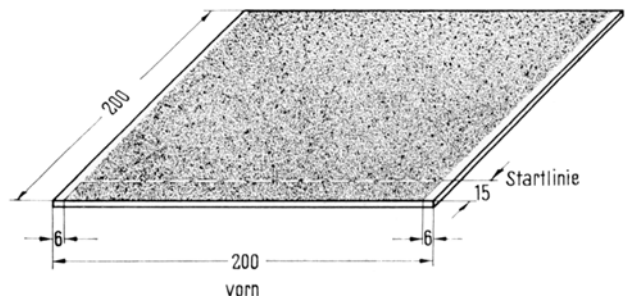


Fig. 3. Trägerplatte mit Dünnschicht und blanken Rändern. Längsmasse in mm.

¹ F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 4. Aufl. (Verlag Chemie GmbH, Weinheim an der Bergstrasse 1958), p. 49.

² M. MOTTIER, *Mittlg. Lebensmittelunters. u. Hygiene (Bern)* 49, 454 (1958).

³ Vgl. E. STAHL, *Chemiker Ztg.* 82, 323 (1958).

Dünnschichtplatte) 2 Glasbänder G ($180 \times 4 \times 1$ mm) aufgeschweisst und plangeschliffen⁴. Die Kufen garantieren den notwendigen minimalen Abstand zwischen Schicht und Deckplatte (s.u.) und wirken zugleich als Dichtung. Die Glasbänder können behelfsmässig durch Polyäthylenstreifen ersetzt werden, die man sich selber aus 1 mm dicker Polyäthylenfolie schneidet. Polyäthylen verzieht sich aber je nach dem Charakter der mobilen Phase; solche Streifen können deshalb nicht gut auf die Deckplatte geklebt werden.

5. *Sechs kräftige Papierklammern*. 2 grosse Klammern GK (Öffnungsweite ca. 3 cm) und 4 mittlere Klammern MK (Öffnungsweite ca. 1,5 cm) dienen dazu, den Behälter B und die Trägerplatte T gegen die Deckplatte D zu pressen (Fig. 5).

6. *Eine Unterlage*. Am einfachsten verwendet man einen Korkring (Durchmesser ca. 12 cm).

B) Montage und Betrieb

Die Deckplatte liegt mit den Kufen nach oben auf dem Korkring K. Man faltet das Filterpapier längs der Linie *cd* (Fig. 2) und legt es mit dem Stück *abcd* nach unten auf die Vorderseite der Deckplatte (Fig. 4). Das Papier soll die Kufen nicht berühren und der Abstand der Kante *ab* vom Vorderrand der Deckplatte soll 1–3 mm betragen. Diese Lage wird provisorisch mit einer grossen Papierklammer fixiert. Man legt jetzt die Trägerplatte so auf die Deckplatte, dass ihre blanken Streifen auf die Kufen zu liegen kommen und ihr Vorderrand genau mit den vorderen Kufenkanten zusammenfällt. Träger- und Deckplatte werden nun durch die 4 mittleren Papierklammern zusammengedrückt und die überflüssig gewordene grosse Klammer am Filterpapier wird wieder entfernt. Man biegt den oberen Teil des Filterpapiers längs der Linie *ef* (Fig. 2) in vertikale Lage und stülpt die zusammengeklebten Platten um, so dass sich das Filterpapier nunmehr auf der Unterseite befindet. Nach Figur 5 wird der Behälter B mit den zwei grossen Klammern in solcher Weise unter die Deckplatte geklemmt, dass der vertikal stehende Teil des Filterpapiers auf den Grund von B reicht und der horizontal liegende Teil als Dichtung zwischen Deckplatte und Oberseite von B wirkt. Der Behälter soll dicht gegen die Trägerplatte stossen. Man füllt durch ein Polyäthylenröhrchen R 15 ± 5 ml mobile Phase ein, erreicht durch leichtes Schwenken eine momentan gleichmässige Benetzung des Filterpapiers und kann jetzt die Anordnung sich selbst überlassen. Die mobile Phase verdampft nach Durchlaufen der von der Deckplatte geschützten Schicht auf dem noch verbleibenden Streifen (Fig. 5) genügend rasch, um die Chromatographie stundenlang in Gang zu halten (vgl. ⁵).

Störungen: Schwankungen der Raumtemperatur können gelegentlich (besonders bei starker Luftbewegung) dazu führen, dass mobile Phase an der Deckplatte kondensiert. In solchen Fällen genügt es aber, die Deckplatte durch kurzes Auflegen der Hand etwas zu erwärmen. – Randeffekte sind bei sorgfältiger Montage praktisch vermeidbar.

C) Anwendung

Wir haben die beschriebene Methode am Testgemisch von STAHL (Buttergelb, Sudanrot G und Indophenol) ausprobiert und mit Erfolg zur Trennung innerhalb nachstehender Gruppen angewendet⁶:

1. Leucin + Isoleucin. 2. N-(2,4-Dinitrophenyl)-leucin + N-(2,4-Dinitrophenyl)-isoleucin + N-(2,4-Dinitrophenyl)-norleucin. 3. N-(2,4-Dinitrophenyl)-valin + N-(2,4-Dinitrophenyl)-norvalin. 4. O,N-Di-(2,4-dinitrophenyl)-tyrosin + N,N'-Di-(2,4-dinitrophenyl)-lysin⁶.

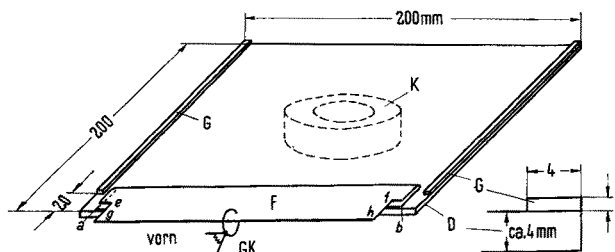


Fig. 4. Deckplatte mit montiertem Filterpapier. Längensmassen in mm.

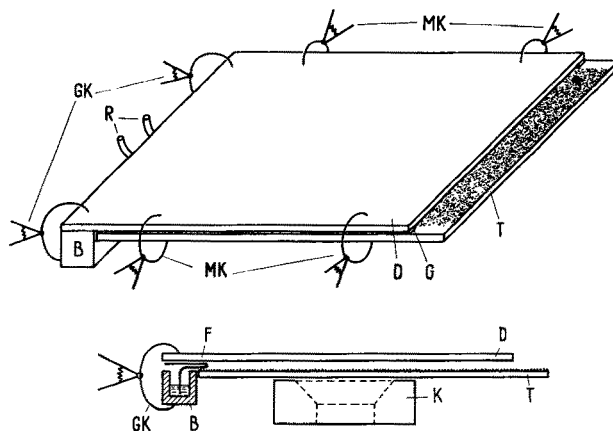


Fig. 5. Apparatur für durchlaufende Dünnschicht-Chromatographie: Querschnitt und Aufsicht. Klammern (GK und MK) schematisch.

Natürlich ist sie nicht auf diese Stoffklassen beschränkt, sondern ebenso universal anwendbar wie die durchlaufende Papierchromatographie.

Die bei der aufsteigenden Methode so überaus wichtige⁷ Kammersättigung ist hier ohne Bedeutung. Man wird deshalb diese Apparatur unter Umständen auch dann benutzen, wenn man zur Trennung nicht auf den Durchlauf angewiesen ist.

Summary. The scope of thin layer chromatography has been extended by developing a simple arrangement which forces solvent fronts to run over. The method was successfully applied to the separation of closely interrelated and otherwise hardly separable materials⁵.

M. BRENNER und A. NIEDERWIESER⁸

Institut für organische Chemie der Universität Basel, 1. März 1961.

⁴ Ausführung durch die Küvettenfabrik Hellma GmbH & Co., Glas-technische-Optische Werkstätten, Müllheim (Baden).

⁵ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, Exper. 17, 145 (1961).

⁶ Di-DNP-Tyr und Di-DNP-Lys sind im verwendeten Lösungsmittelsystem durch normale Dünnschicht-Chromatographie nicht trennbar⁵.

⁷ E. STAHL, Arch. Pharm. 292/64, 411 (1959).

⁸ Wir danken den Herren E. LÜSCHER und A. MANZETTI für wertvolle Anregungen und ihr reges Interesse an dieser Arbeit. Im übrigen danken wir für eine Unterstützung durch Arbeitsbeschäftigungskredite des Bundes und eine Studienbeihilfe vom Kultusministerium Baden-Württemberg.