

PRO EXPERIMENTIS

Polyzonale Dünnschichtchromatographie. Chromatographische Fließmittelmischung und ihre Anwendung zur Trennung von Substanzgemischen

II. Teil: Polyzonale Dünnschichtchromatographie*

Ersetzt man den polarerer Anteil eines zweikomponentigen Fließmittels durch eine Mischung mehrerer Lösungsmittel ähnlicher Polarität, wie sie etwa in einer homologen Reihe gegeben sind, so wird die Unstetigkeit in der Elutionskraft der mobilen Phase in mehrere, kleinere Stufen zerlegt, da die einzelnen Komponenten zwar ähnliche, aber doch nicht gleiche Adsorptionskoeffizienten aufweisen und deshalb vom Adsorbens verschieden stark festgehalten werden. Die bei zweikomponentigen Fließmitteln häufig mit bloßem Auge oder im UV-Licht sichtbare Entmischungslinie splittert auf; die einzelnen Zonengrenzen sind in der Regel nicht mehr ohne weiteres erkennbar. Ein aus n Komponenten bestehendes Fließmittel liefert insgesamt n Zonen (α , β , γ ... ω -Zone), die durch $(n-1)$ -Fronten (β , γ ... ω -Front) voneinander getrennt sind. Substanzpaare, welche sich im zwei- oder dreikomponentigen Fließmittel mit einer Entmischungslinie bewegten und daher nicht getrennt wurden, haben jetzt eher Gelegenheit, auseinanderzuwandern (Figur 6 und 7).

Substanzpaare mit sehr ähnlichen Rf-Werten in der α - und β -Zone können auf eine γ -, δ - oder ω -Zone stossen, in der sich die Rf-Werte soweit unterscheiden, dass eine Trennung erfolgt (Figur 9 und 10). Wie im übrigen mehrere Beispiele zeigen (Figur 6–11), wandern bei polyzonaler Dünnschichtchromatographie mit ansteigender Startlinie einzelne Substanzen einer Mischung in günstigen Fällen auf einzelnen Parallelen zur Fließmittelfront. Dies beruht auf Verdrängung. Die Flecken sind quer zur Fließrichtung schmal, weisen somit eine hohe Substanzdichte auf und sind deshalb besonders leicht sichtbar. Die polyzonale Technik ist daher sowohl in der Analytik vorteilhaft, da die Nachweisempfindlichkeit gegenüber der herkömmlichen Arbeitsweise beträchtlich zunehmen kann, als auch bei halbpräparativen Arbeiten (dicke Schichten), weil die zu eluierenden Substanzen auf kleinstem Raum zusammengedrängt sind²³. – Auch bei vielkomponentigen Fließmitteln bewahrt die ansteigende Startlinie ihren Wert. Figur 8 und 10 illustrieren dies besonders deutlich.

Zur Wahl des Fließmittels. Im allgemeinen eignen sich Mischungen aus äquimolaren Mengen der ersten Glieder homologer Reihen besser für Fließmittel zur polyzonalen Chromatographie als solche höherer Glieder (vgl. Tabelle I*). Zwei Komponenten, die vom Adsorbens fast gleich stark festgehalten werden, wirken praktisch ebenso wie Konzentrationsverdoppelung der einen und Weglassung der anderen Komponente. Mischungen von Isomeren bringen daher als Fließmittelkomponenten in der Regel keinen Vorteil. Andererseits schaden sie auch nicht. Es wäre also unvernünftig, für polyzonale Chromatographie nur äusserst reine Lösungsmittel zu verwenden. Unter der Voraussetzung, dass die chemische Zusammensetzung bei verschiedenen Lieferungen konstant bleibt, können unter Umständen auch sogenannte technische Lösungsmittel Verwendung finden.

Man bereitet sich z.B. folgende Mischungen (in Mol-verhältnissen!). (1) *Kohlenwasserstoffe*: Petroläther, Benzol, Toluol. (2) *Chlorierte Kohlenwasserstoffe*²⁴: Methylen-

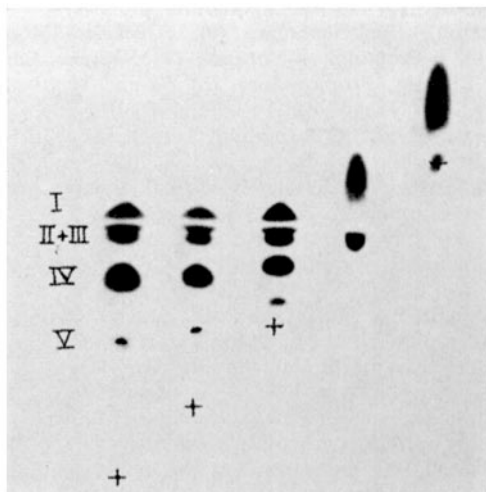


Fig. 6

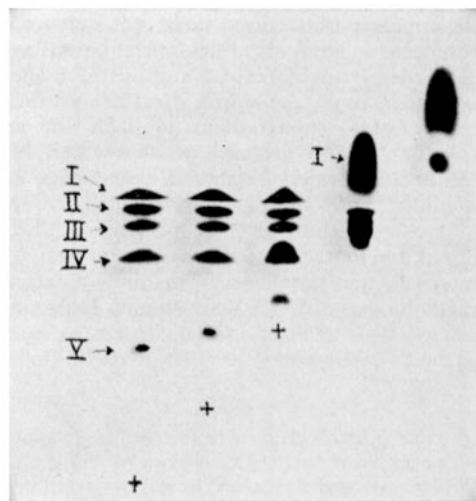


Fig. 7 polyzonal

Verbesserung des Trenneffektes durch polyzonale Arbeitsweise. Chromatogramme von Mischungen, enthaltend in 0,5 μ l je 1 μ g 2,4-Dinitrophenol (I), DNP-Valin (II), DNP-Alanin (III), DNP-Glycin (IV) und Di-DNP-Histidin (V). Kieselgel G, aktivierte Schichten (30 min bei 110°). BN-Kammer¹⁹, oberes Drittel mit α -Front in der UV-Photokopie weggeschnitten. + Startpunkte. **Fließmittel.** Figur 6: Chloroform/Methanol/Eisessig (95:5:1 v/v). Figur 7: Chloroform/*n*-Butanol/*n*-Propanol/Äthanol/Methanol/Propionsäure/Eisessig/Ameisensäure (95:1,25:1,25:1,25:1,25:0,33:0,33:0,33 v/v).

* I. Teil, siehe Exper. 21, fasc. 1, 50 (1965).

¹⁻²³ Siehe Exper. 21, fasc. 1, 50 (1965).

²³ Das hier Ausgeführte gilt fast ohne Einschränkung auch für die «Fuchs-Säule». Die horizontale Säulenchromatographie nach H. DAHN und H. FUCHS (Helv. chim. Acta 45, 261 (1962)) arbeitet bekanntlich unserem Verfahren¹⁹ genau analog.

²⁴ Beachte: chlorierte Kohlenwasserstoffe sind meistens mit einigen Prozenten Alkohol stabilisiert, welcher durch einfaches Destillieren nicht entfernt werden kann!

chlorid, Äthylenchlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff. (3) *Äther*: Dioxan, Diäthyläther, Isopropyläther. (4) *Ester*: Methylacetat, Äthylacetat, *n*-Propylacetat, *n*-Butylacetat. (5) *Ketone*: Aceton, Methyläthylketon, Diäthylketon, Cyclohexanon. (6) *Alkohole*: Methanol, Äthanol, *n*-Propanol, *n*-Butanol. (7) *Säuren*: Ameisensäure, Eisessig, Propionsäure. (8) *Basen*: Triäthylamin, Dibutylamin, Pyrrolidin, Piperidin, Pyridin. (9) «*Polare Mischung*»: Dimethylformamid, Dimethylacetamid, Dimethylsulfoxid.

Diese fertigen Mischungen lassen sich beliebig zu Fließmitteln kombinieren. Man legt zweckmässig eine unpolare, reine Komponente vor, in welcher sich nur wenige Substanzen der zu trennenden Probe chromatographieren lassen, und fügt nur kleine Anteile der obigen Mischungen hinzu. Jede neu hinzukommende polare Komponente verdrängt nämlich bei der Chromatographie die weniger polaren Fließmittelkomponenten teilweise, so dass die Entmischungslinien, welche deren Ausbreitung nach vorn begrenzen, immer näher an die vorderste Fließmittelfront gedrängt werden. Anzustreben ist aber gewöhnlich ein Fließmittel, bei welchem sich die Entmischungslinien regelmässig über die ganze Laufstrecke verteilen. Je verschiedenartiger die zu trennende Substanzprobe zusammengesetzt ist, desto grösser muss der Polaritätsumfang der verwendeten Fließmittelkomponente werden: Sehr polare Fließmittelkomponenten sind nötig, um stark adsorbierte Substanzen vom Startpunkt zu lösen; sollen trotzdem unpolare Substanzen nicht mit der vordersten Front wandern, so kann als «Fließmittel-Grundlage» nur ein entsprechend unpolares Lösungsmittel dienen. Im Gegensatz dazu muss der durch die Fließmittelzusammensetzung festgelegte Gradient so flach wie möglich werden, wenn Isomere getrennt werden sollen: Flecken solcher Substanzen müssen daher in eine einzige Zone zu liegen kommen. Falls nicht gleichzeitig noch andere Substanzen anwesend sind, ist hier polyzonale Chromatographie fehl am Platz. Isomere werden am besten durch Elution, polare und unpolare Verbindungen enthaltende Mischungen hingegen durch Verdrängung (polyzonal) getrennt.

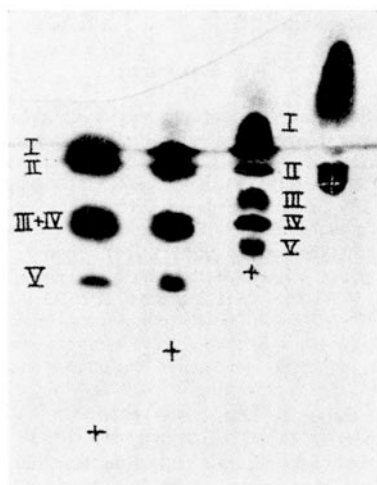
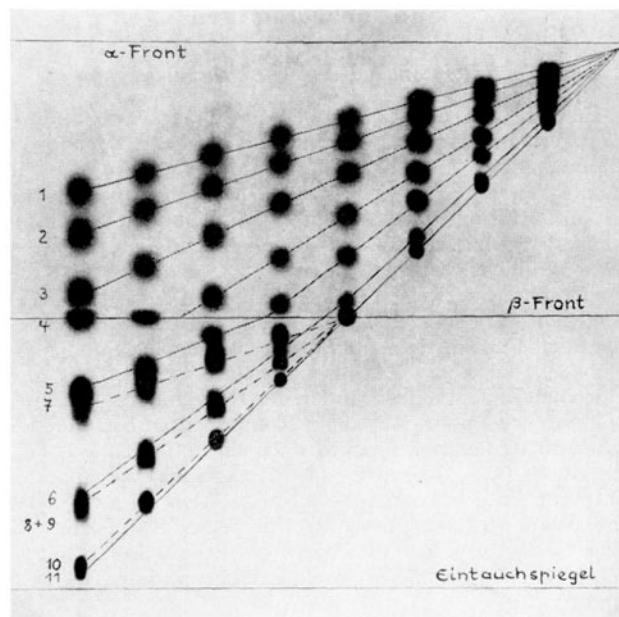
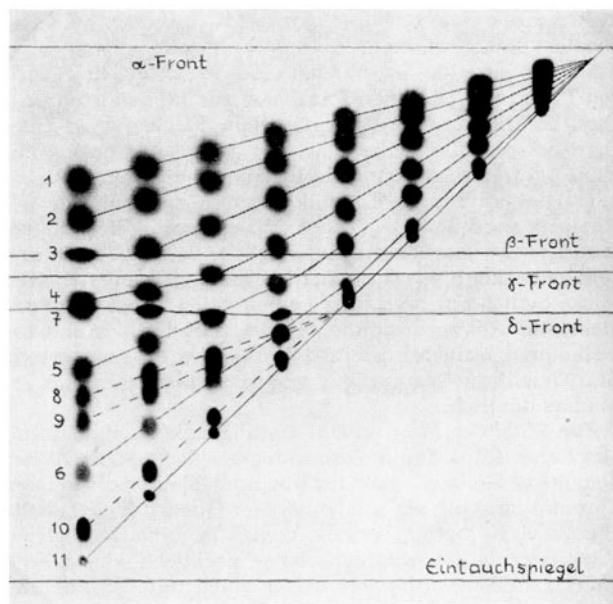


Fig. 8. Einfluss von ϕ auf die Trenngüte. Gleiche Chromatogramme wie in Figur 7, jedoch lufttrockene Schicht (rel. Luftfeuchtigkeit 65%). + Startpunkt. Optimale Trennung im Chromatogramm mit dem drittuntersten Startpunkt, wobei $\phi = 0,27$.

Rf-Wert-Angaben. Da das Verhältnis $R_f = \text{Laufstrecke der Substanz} / \text{Strecke Start-vorderste Fließmittelfront}$ bei polyzonaler Dünnschichtchromatographie keine Konstante mehr ist, sondern in der Regel stark von ϕ abhängt,



duozonal



polyzoal

Fig. 9 und 10. Vergleich duozonaler und polyzonaler Dünnschichtchromatogramme. Chromatogramme von Mischungen, enthaltend in $0,5 \mu\text{l}$ je $1 \mu\text{g}$ der 2,4-Dinitrophenyl-Derivate folgender Amine bzw. Aminosäuren: *n*-Amylamin (1), *n*-Butylamin (2), *n*-Propylamin (3), Äthylamin (4), Methylamin (5), Tyramin (6), Leucin (7), Methionin (8), Prolin (9), Hydroxyprolin (10) und Glutamin (11). Kieselgel G «Merck», lufttrockene Schichten (rel. Luftfeuchtigkeit 50%). BN-Kammer¹⁹, UV-Photokopie. Fließmittel. Figur 9: Isopropyläther/Eisessig (100:2 v/v). Figur 10: Isopropyläther/Propionsäure/Eisessig/Ameisensäure (100:0,66:0,66:0,66 v/v/v).

ist es nötig, ausser Rf-Werten auch φ anzugeben, und zweckmässig, bei Routineanalysen φ zu standardisieren, z. B. mit Hilfe einer Schablone. Dem indirekten Vergleich über Rf-Werte ist ein direkter chromatographischer Vergleich zweier Substanzen in jedem Fall vorzuziehen. Im Interesse der Reproduzierbarkeit sollten auch nur Platten verwendet werden, die unter gleichen Bedingungen getrocknet sind (Luftfeuchtigkeit bzw. Ofentemperatur und Erhitzungsdauer sowie Aufbewahrung beachten!).

Apparatives. Es ist leicht einzusehen, dass eine mit Fließmitteldampf gleichmässig gesättigte Trennkammeratmosphäre der Fließmittelentmischung entgegenwirken muss²⁵. Die Grenzen zwischen den entstandenen Zonen verschiedener Zusammensetzung werden durch Diffusion aus dem Gasraum verwischt, und auch die polarste Komponente kann aus dem Dampfraum in die vorderste, unpolarste Zone gelangen. Der Konzentrationsausgleich aus der Dampfphase wird um so stärker, je leichter flüchtig die polare Komponente, je grösser der Gasraum über der Dünnschicht und je länger die Schicht der Einwirkung der Dampfphase ausgesetzt ist. Konvektion infolge schwankender Raumtemperatur oder vertikaler Dichtegradienten (stehende Platten) wirkt in derselben Richtung. *Voraussetzung für eine gezielte Ausnutzung der Fließmittelentmischung ist also, dass die Versuchsanordnung den störenden Einfluss der Trennkammeratmosphäre möglichst weitgehend zurückdrängt. Wir benützen daher für unsere*

Versuche die ursprünglich zur horizontalen Durchlaufchromatographie entwickelte «bedeckte Platte»¹⁸. Deren Leistungsfähigkeit gegenüber der aufsteigenden Technik in der Desaga-Trennkammer (200 × 200 mm) ergibt sich aus Figur 12 und 13²⁶.

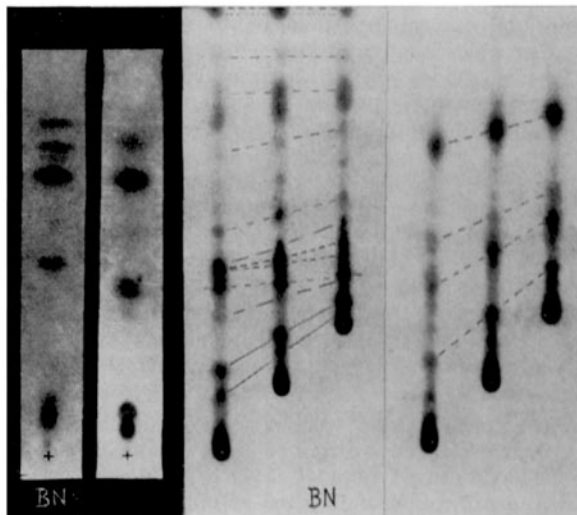


Fig. 12

Fig. 13

Fig. 12. Ein Reaktionsgemisch (Peptid-Derivate, Nachweis mit Chlor/Tolidin). Fig. 13. Tinctura valerianae conc. (Nachweis mit 10% SbCl₅ in Chloroform).

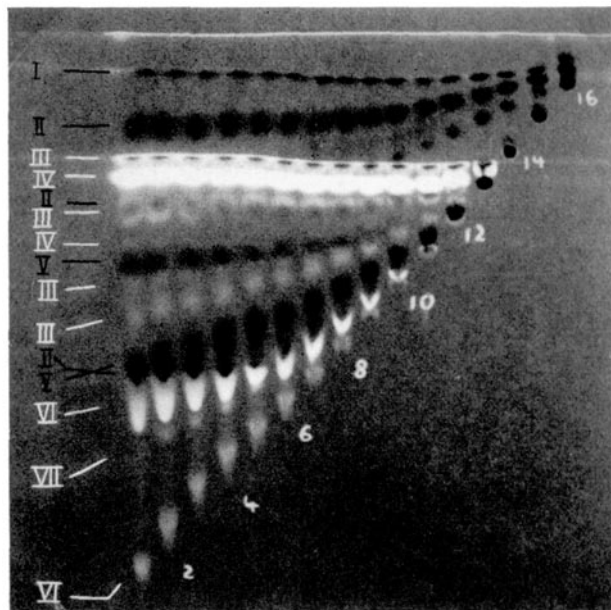


Fig. 11. Polyzonale Trennung eines Farbstoffgemisches. Jeweils 0,5–2 mg der folgenden Handelspräparate wurden gemischt und in 1 ml Aceton gelöst. Aufgetragen wurde jeweils 1 μ l dieser Lösung. I Sudanschwärz B (Merck), II Artisilblau BSQ (Ciba), III Eosin (Merck), IV Fluoreszein (Merck), V Artisilblaugrün (Ciba), VI Brillantcresylblau (Riedel) und VII Acridinorange (Fluka). Lufttrockene Kieselgel G-Schicht vor der Chromatographie 15 min bei 110° aktiviert. BN-Kammer¹⁸. Photographie: Doppelbelichtung in Tageslicht und UV (250 + 360 m μ). Fließmittel. CHCl₃/Diäthyläther/Ester/Alkohole/Säuren/ «Polare Mischung» (35:5:5:4:4:2 v/v); wobei Ester: Methylacetat/Äthylacetat/n-Butylacetat (40:49:66 v/v); Alkohole: Methanol/Äthanol/n-Propanol/n-Butanol (40:58:75:92 v/v); Säuren: Ameisensäure/Eisessig/Propionsäure (38:57:73 v/v); «Polare Mischung»: Dimethylformamid/Dimethylacetamid/Dimethylsulfoxid (1:1:1 v/v).

Polyzonale Dünnschichtchromatographie bei kleinem bzw. grossem Trennkammervolumen. Figur 12 und 13 zeigen jeweils links Chromatogramme in der BN-Kammer¹⁸ und rechts solche in der DESAGA-Trennkammer (21 × 21 × 9 cm, mit Kammersättigung). *Beachte Beeinträchtigung des Trenneffektes bei grossem Trennkammervolumen (jeweils rechts)! Fließmittel.* Figur 12: Chloroform/Essigester/t-Butanol/Methanol/Wasser (80:40:20:30:8 v/v). Figur 13: Petroläther/Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/Methylenchlorid/Isopropyläther/Essigester/Methanol/Aceton (20:10:10:10:40:20:10:5 v/v). Kieselgel G «Merck», aktivierte Schichten (30 min bei 110°).

Summary. A solvent mixture penetrating a dry column, e.g. a thin layer, of a polar adsorbent is subject to a chromatographic demixing process which is due to preferential adsorption of the more polar components from the solvent mixture. Zones of varying solvent composition are formed along the column.

The first part of this paper deals with the case of two component mixtures and presents a discussion of the influence of the demixing phenomenon on chromatographic substance migration. It is shown that substance separation is governed, inter alia, by a magnitude φ , which represents the ratio of the length of run of the solvent prior to substance migration to the total length of run of the solvent. There are cases where substance migration is due to a displacement rather than an elution mechanism. These are characterized by a typical spot deformation with concomitant high substance concentration at the site of the spot, and thus provide for a particularly low limit of substance detection.

²⁵ In der Papierchromatographie wurde dieser Vorgang schon eingehend untersucht⁸.

²⁶ Herrn Dr. H. R. BOLLIGER danken wir für die Ausführung der kombinierten UV/Tageslicht-Photographie (Figur 11), Herrn Dr. M. SCHERR für wertvolle Anregungen.

In the second part of the paper these principles are in practice extended to the use of multicomponent solvents, and the superiority of polyzonal over duozonal TLC is demonstrated. Polyzoal TLC is particularly useful for the direct chromatographic separation of mixtures comprising substances of highly different polarities. Chromatographic solvent demixing is counteracted by diffusion from and convection within the gas phase of the chromatographic chamber. Therefore, best results in polyzoal TLC are obtained when the horizontal covered plate technique¹⁰ is used. For preparative separations based on the

polyzonal principle, the use of the Fuchs column²³ is suggested.

A. NIEDERWIESER²⁷ und M. BRENNER

Institut für Organische Chemie der Universität Basel (Schweiz), 28. Mai 1964.

²⁷ Gegenwärtige Adresse: Forschungslabor der Neurologischen Universitätsklinik Basel (Schweiz).

The Location of Microelectrode Tips in Nervous Tissues

In a previous paper we described the responses of cells in the cat cerebellar cortex to iontophoretically applied cholinergic drugs¹. Because of the difficulties associated with identification of the area within which units were recorded, it was necessary to have a technique for placing small lesions in the cerebellar cortex that could be identified at the end of the experiment.

When using multibarrelled micropipettes, one barrel can conveniently be set aside for a lesion-making substance or else the substance can be incorporated in the recording barrel. Selected units can be defined by passing out the marker after recording from them, thus forming a small but histologically detectable lesion. Although a variety of techniques for locating the position of microelectrode tips has been described, none of these has been widely accepted². We were unable to locate the position of electrode tips with any certainty after applying 90 V DC or 240 V AC to a barrel containing silver nitrate and treating the sections with ammonium sulphide³. Likewise attempts to pass silver nitrate by pressure were unsuccessful. A complex anion of copper and citrate is claimed to be superior to simple salts of heavy metals, such as lead and mercury, in causing lesions by the coagulation

of protein, since use of the latter is frequently associated with the formation of a 'cap' at the electrode tip and consequently an inhibition of current flow². We found, however, that in granule cell layer of cat cerebellum this solution produced lesions too large (300–800 μ) for our purposes, and in molecular layer or white matter it had little marking action.

A series of trials has led us to conclude that the iontophoretic application of hydrogen ion from a barrel containing hydrochloric acid invariably results in the formation, in granule cell or molecular layers, of discrete lesions, the diameter of which varies from 50 μ depending on the strength and duration of the current used for iontophoresis. Lesions in white matter were more diffuse. Acid-formed lesions do not 'cap' the electrode, and are little disturbed by further passage of the microelectrode, so that many marks can be left in one electrode track.

Figure A (i and ii) show columns of lesions in cat cerebellar cortex and indicate the relationship of lesion size to

¹ I. McCANCE and J. W. PHILLIS, *Exper.* 20, 217 (1964).

² Y. GALIFRET and T. SZABO, *Nature (Lond.)* 188, 1033 (1960).

³ T. OIKAWA, T. OGAWA, and K. MOTOKAWA, *J. Neurophysiol.* 22, 102 (1959).

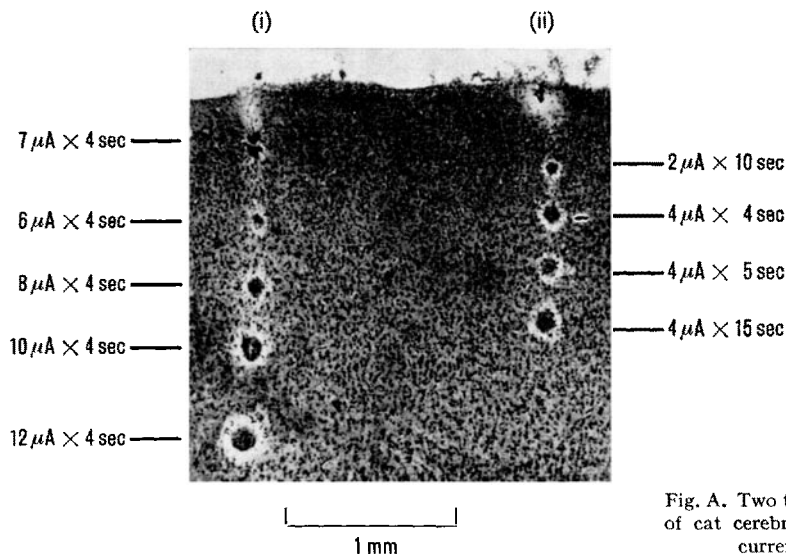


Fig. A. Two tracks, showing acid formed lesions, in the lateral gyrus of cat cerebral cortex. Strength and duration of electrophoretic currents indicated. Stained with Cresyl Fast Violet.