

UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER DÜNNSCHEICH-
CHROMATOGRAPHIE VON AMINOSÄUREN AUF KIESELGEL*

J. PEKER, R. GEYER UND G. EPPERT

Hautklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**, Lehrkollektiv für Analytische Chemie der Technischen Hochschule für Chemie "Carl Schorlemmer" Leuna-Merseburg und VEB Leuna-Werke "Walter Ulbricht" (D.D.R.)

(Eingegangen am 3. September 1971; geänderte Fassung am 24. Januar 1972)

SUMMARY

A study on kinetics of thin-layer chromatography of amino acids on silica gel

The contribution of different mechanisms to the spreading of chromatographic zones is investigated in the separation of amino acids on silica layers. For that purpose the flow pattern of the solvent in the thin layer and the two-dimensional spreading of zones have to be considered. Molecular diffusion in the mobile phase and a retarded mass transfer to the stationary phase have been found to be predominant spreading mechanisms. The procedure offers a method to select suitable separation conditions.

EINLEITUNG

Die Qualität einer chromatographischen Trennung hängt wesentlich vom Ausmass der Spreizung ab, die die Substanzzonen während der Chromatographie erfahren. Für die Beurteilung und Auswahl geeigneter Trennbedingungen sind Informationen über die Herkunft dieser Spreizung von Bedeutung.

Als Mass für die Zonenspreizung gilt σ^2 , die Varianz der Substanzwanderstrecke in Gauss-Verteilung. Dabei ist von höheren statistischen Momenten—Schiefe und Exzess der Verteilung—abgesehen¹. Für die auf die mittlere Substanzwanderstrecke z_0 bezogene Spreizung, formell identisch mit der theoretischen Bodenhöhe H , fasst die modifizierte^{2,3} Van Deemter-Gleichung die verschiedenen Spreizungsmechanismen zusammen:

$$H = \frac{\sigma^2}{z_0} = B \frac{I}{v} + C_m v + C_s v + C_k v + C(v) v$$

* Auszugswise vorgetragen auf dem III. Symposium, *Chromatographie in der klinischen Biochemie*, Leipzig, 13-14. Mai 1971.

** Ernst-Kromayer-Str. 5-8 402 Halle, Saale, D.D.R.

- v = Fliessgeschwindigkeit der mobilen Phase
 B = Term der isotropen Molekulardiffusion
 C = Terme für kinetisch, d.h. durch verzögerte Gleichgewichtseinstellung bedingte Spreizung
 C_m = träge Diffusion in der mobilen Phase
 C_s = träge Diffusion in der stationären Phase
 C_k = verzögerte Desorptionskinetik bei Sorptionschromatographie³
 $C(v)$ = konvektive Wirbeldiffusion und Querdiffusion in der mobilen Phase, entsprechend dem GIDDINGSchen Kopplungsglied¹

Diese Darstellung der Wirksamkeit verschiedener Spreizungsmechanismen basst auf einer allgemeinen Kontinuitätsgleichung⁴ und ist unabhängig von Trenntechnik und Trennmechanismus für alle chromatographischen Prozesse gültig.

Bei der Dünnschichtchromatographie findet eine zweidimensionale Substanzverteilung in der Schicht sowohl in Laufrichtung der mobilen Phase als auch quer dazu statt. Die Querspreizung σ_x^2 ist ausschliesslich durch Diffusionsvorgänge in der mobilen und in der stationären Phase nach Massgabe der Verweilzeiten Rt bzw. $(1-R)t$ der Substanz in beiden Phasen bestimmt und linear von der Retentionsrate R abhängig:

$$\sigma_x^2(R) = 2t[\gamma_m D_m R + \gamma_s D_s (1-R)]$$

wobei

γ = Tortuositätsfaktor

D = Diffusionskoeffizient

Diese Diffusionsspreizung lässt sich ausserdem auch in einer Anordnung darstellen, bei der das Fliessmittel so in die Schicht eindringt, dass die Substanz liegen bleibt, d.h. keinem chromatographischen Prozess unterworfen wird⁶.

In Fliessrichtung kommen zusätzlich die Spreizungsmechanismen zur Wirkung, die durch die C -Terme ausgedrückt werden und aus der Längsspreizung σ_y^2 zugänglich sind:

$$\frac{\sigma_y^2 - \sigma_x^2}{z_0} = \sum C v + C(v)v$$

Die Zuordnung zu einzelnen Verzögerungsmechanismen ist durch die spezifische Abhängigkeit der C -Terme von der Retentionsrate möglich³. Während nämlich C_k und C_s zu $R(1-R)$ proportional sind, also bei $R = 0.5$ ein Maximum zeigen, fällt C_m mit zunehmendem R proportional zu $(1-R)^2$. Das Kopplungsglied ist vorwiegend durch die Fliessgeschwindigkeit charakterisiert und von R weitgehend unabhängig.

Bei der Auswertung dünnschichtchromatographischer Zonen ist zu berücksichtigen, dass die elliptoide Substanzverteilung durch Überladung und Schwanzbildung ebenso gestört werden kann wie durch die Entmischung von Fliessmittelsystemen unter Ausbildung mehrerer Fronten. Ferner ist die S-förmige Konzentrationsabnahme der mobilen Phase längs der Laufstrecke zu erfassen. In Abhängigkeit von diesem Fliessmittelprofil, von der Startposition und von der Laufstrecke liegen die beobachteten R_f -Werte unter den tatsächlichen Retentionsraten und sind entsprechend den Laufeigenschaften zu korrigieren⁶. Da die Fliessgeschwindigkeit mit fortschreitender Chromatographie ständig abnimmt, sind für v und $1/v$ mittlere

Werte einzusetzen⁵. Der exakten Messung von Länge und Breite der elliptoiden Flecken wie auch der genauen Bestimmung der Maximal- und Grenzkonzentration⁷ stehen erhebliche Schwierigkeiten entgegen. Die direkte Densitometrie liefert zwar glockenförmige Kurven, die aber wegen der zweidimensionalen Ausdehnung nicht direkt, sondern unter Berücksichtigung der inhomogenen Substanzverteilung über die gemessene Fläche auszuwerten sind.

METHODIK

Aminosäuren (Gly, Ala, Leu, Lys, Try) werden in wassergesättigtem *n*-Butanol auf verschiedenen Kieselgelen (Supergele, VEB Chemiewerk Coswig und VEB Farbenfabrik Wolfen) dünnenschichtchromatographiert (20×20 cm, Schichtdicke 0,5 mm, standardisierte Normalkammer). Die Startflecken ($1 \mu\text{l}$ mit $3 \cdot 10^{-8}$ Mol jeder Aminosäure) liegen in abgestufter Höhe über dem Fliessmittelspiegel, so dass die Zonenspreizung nach unterschiedlichen Laufstrecken und -zeiten bis zur Fronthöhe (110 mm) gemessen werden kann. Nach quantitativer Ninhydrinfärbung⁸ erfolgt direkte Densitometrie der Zonen im Durchlicht (Universal-Photometer UFD Viatron, 545 nm). Die Densitometerkurven werden numerisch auf das Spreizungsmass σ umgerechnet⁹. Neben chromatographierten Zonen werden Startflecken auf äquilibrierten Platten zur Bestimmung der initialen Verteilung sowie auch solche Zonen vermessen, die das Fliessmittel in horizontalen Platten von zwei Seiten gleichzeitig erreicht und die damit lediglich der Diffusion in der durchfeuchten Schicht unterliegen. Die Laufeigenschaften der verwendeten Gele werden durch den Geschwindigkeitskoeffizienten des Fliessmittelvorschubs und durch gravimetrische Bestimmung des Fliessmittelprofils charakterisiert und zur Überführung der aktuellen R_f -Werte in die Retentionsrate $R = R_f^0$ benutzt¹⁰.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die aus den Mittelwerten der Diffusionsmessungen durch lineare Approximation errechneten Geraden $\sigma^2_{\text{diff}}(R)$ liefern für alle Gele einen negativen Ordinatenabschnitt. Damit ist von einem wesentlichen Beitrag der stationären Phase zur Diffusionsspreizung abzusehen. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen nach Lit. 11 berechneten Diffusionskoeffizienten D_m der verwendeten Aminosäuren und der Diffusionszeit sind die Geraden $\sigma^2_{\text{diff}}/D_m t = 2\gamma_m R$ in Fig. 1 dargestellt. Sie schneiden die Bereiche der Standardabweichungen sämtlicher Messwerte, was als ausreichendes Kriterium für die Brauchbarkeit der Darstellung anzusehen ist¹².

Aus dem Anstieg dieser Geraden lassen sich die Werte für γ_m berechnen. Zwischen diesen Werten ist kein Unterschied zu sichern, so dass ein (gewogenes) Mittel für die verwendeten Gele angegeben werden kann (Tabelle I). Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von dem für Cellulosepulver angegebenen Tortuositätsfaktor $\gamma_m = 0.39 \pm 0.06$ (Lit. 5) und liegt etwa doppelt so hoch.

Aus der Zonenspreizung in Laufrichtung während der Chromatographie wird nach Abzug der Diffusionsspreizung unter Berücksichtigung der Wanderstrecken, der Fliessgeschwindigkeit und der Laufzeit der Term C berechnet, der mit zunehmendem R_f -Wert deutlich abnimmt. Den Zusammenhang der wiederum um D_m korrigierten Werte mit $(1-R)^2$ zeigt Fig. 2. Die durch den Nullpunkt gelegten Ge-

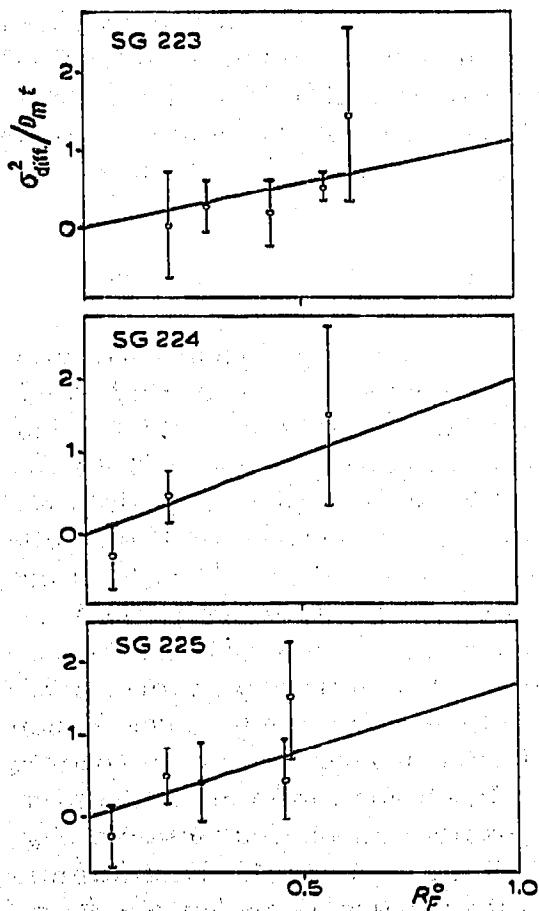


Fig. 1. Korrigierte Diffusionsspreizung von Aminosäuren auf verschiedenen Kieselgelen als Funktion von R .

raden schneiden die 90%-Wahrscheinlichkeitsbereiche aller Mittelwerte, so dass eine Reduzierung von C auf ausschliesslich C_m unter Vernachlässigung zusätzlicher Mechanismen zulässig erscheint. In Tabelle II sind die Werte für $C_m D_m / (1 - R)^2 = 0.01 d_p^2$ sowie die nach dieser Beziehung zugänglichen effektiven Partikelgrössen d_p zusammengefasst. Der Vergleich mit den nach Lit. 13 gemessenen Partikelgrössen (Tabelle II) zeigt, dass die effektiven Durchmesser ca. 50fach grösser als die der ursprünglichen Körner sind. Vermutlich ist diese Diskrepanz durch eine Verklumpung der Gelkörner verursacht, wie sie ähnlich bei Cellulosepulver⁵ und Papier¹² anzunehmen ist.

Es stehen somit bei der chromatographischen Spreizung von Aminosäuren auf

TABELLE I

TORTUOSITÄTSFAKTOREN BEI DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE AUF KIESELGEL (FÜR $\gamma_m = 0$)

Kieselgel	γ_m
SG 223	0.53 ± 0.31
SG 224	0.99 ± 0.61
SG 225	0.83 ± 0.52
Mittelwert	0.75 ± 0.47

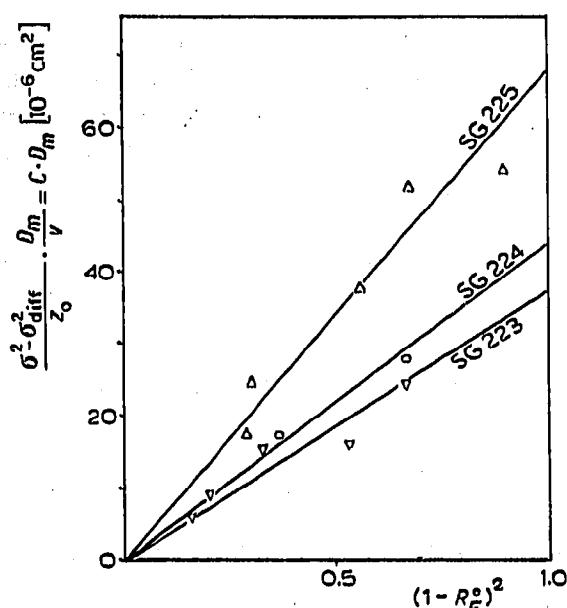


Fig. 2. Korrigierter C-Term der Van Deemter-Gleichung für Aminosäuren auf verschiedenen Kieselgelen als Funktion von $(1 - R)^2$.

Kieselgelschichten zwei Mechanismen im Vordergrund, Diffusion in der mobilen Phase und eine diffusionsbedingte Verzögerung des Substanzübergangs von der mobilen zur stationären Phase:

$$\frac{\sigma^2}{z_0} = 2\gamma_m D_m \overline{\left(\frac{1}{v}\right)} + C_m \bar{v}$$

Das Zusammenwirken dieser Mechanismen wird wesentlich durch die Fliessgeschwindigkeit und durch die Retentionsrate bestimmt. Für hohe R_F -Werte ist $C_m \bar{v}$ gering, die Spreizung ist fast ausschliesslich durch die Molekulardiffusion gegeben, wobei schnellaufende Gele eine geringere Spreizung zeigen. Mit sinkendem R_F -Wert fällt die Gleichgewichtsverzögerung in der mobilen Phase immer mehr ins Gewicht und ist bei hohen Laufgeschwindigkeiten besonders deutlich, verursacht jedoch bis hinab zu $R_F = 0.2$ nie mehr als die Hälfte der Gesamtspreizung.

TABELLE II

TRÄGE DIFFUSION IN DER MOBILEN PHASE BEI DÜNNSCHEITCHROMATOGRAPHIE AUF KIESELGEL

Kieselgel	$C_m D_m / (1 - R)^2$ (10^{-6} cm^2)	d_p (effektiv) (10^{-3} cm)	\bar{d}_p (gemessen) (10^{-3} cm)
SG 223	37.27 ± 6.69	6.08 ± 0.55	0.15
SG 224	43.56 ± 10.26	6.55 ± 0.78	0.12
SG 225	68.23 ± 10.03	8.24 ± 0.61	0.17

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ausmass, mit dem verschiedene Mechanismen zur Spreizung chromatographischer Zonen beiträgt, wird für die Trennung von Aminosäuren auf Kieselgel-

schichten ermittelt. Dazu sind die Laufeigenschaften des Fliessmittels in der Dünn- schicht sowie die zweidimensionale Ausdehnung der Zonen zu berücksichtigen. Als wesentlicher Spreizungsmechanismus wurden die Molekulardiffusion in der mobilen Phase sowie ein verzögerter Übergang zur stationären Phase festgestellt. Das Ver- fahren bietet eine Grundlage zur Auswahl geeigneter Trennbedingungen.

LITERATUR

- 1 J. C. GIDDINGS, *J. Chromatogr.*, 13 (1964) 301.
- 2 S. T. SIE UND G. W. A. RIJNDERS, *Anal. Chim. Acta*, 38 (1967) 3.
- 3 J. C. GIDDINGS UND R. A. KELLER, *Dynamics of Chromatography, Part. I, Principles and Theory* Arnold, London and Marcel Dekker, New York, 1965.
- 4 G. SCHAY, *Abh. Deut. Akad. Wiss.*, Nr. 2, 3 (1966).
- 5 C. L. DE LIGNY UND A. G. REMIJNSE, *J. Chromatogr.*, 33 (1968) 242.
- 6 J. C. GIDDINGS, G. H. STEWART UND A. L. ROUFF, *J. Chromatogr.*, 3 (1960) 239.
- 7 K. L. MALLIK UND J. C. GIDDINGS, *Anal. Chem.*, 34 (1962) 760.
- 8 S. HARA, H. TANAKA UND M. TAKEUCHI, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 12 (1964) 626.
- 9 G. BERGER, persönliche Mitteilung.
- 10 J. PEKER, *Dissertation*, T. H. Leuna-Merseburg, 1971.
- 11 C. L. DE LIGNY UND D. BAX, *Z. Anal. Chem.*, 205 (1964) 333.
- 12 C. L. DE LIGNY UND A. G. REMIJNSE, *J. Chromatogr.*, 35 (1968) 257.
- 13 I. SHAPIRO UND I. M. KOLTHOFF, *J. Phys. Colloid Chem.*, 52 (1948) 1020.

J. Chromatogr., 67 (1972) 329-334