Anwendung der Papierchromatographie auf lebensmittelchemische Probleme. 1. Mitteilung, Grundlagen und Methodik

Autor(en): **Sulser, H.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **42 (1951)**

Heft 4

PDF erstellt am: **31.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982463

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Anwendung der Papierchromatographie auf lebensmittelchemische Probleme

1. Mitteilung

Grundlagen und Methodik

Von *H. Sulser*

(Aus dem Laboratorium des Eidg. Gesundheitsamtes, Bern)

A. Grundlagen

Die Papierchromatographie wurde zuerst von *Consden, Gordon* und *Martin* (1944) [1]) beschrieben und auf die Trennung und Identifizierung von Aminosäuren angewendet. Seither ist die Methode in rascher Folge auf die Analyse anderer, untereinander chemisch und physikalisch nahe verwandter Verbindungen, speziell in biologischem Material, ausgedehnt worden. Vom Umfang, den das Gebiet bereits angenommen hat, gibt die Übersicht von *D. L. Clegg* [2]) einen Begriff, wo 230 Arbeiten aufgeführt sind. Die Anwendung erstreckt sich bis jetzt u. a. auf folgende Verbindungen: Zucker [3])[4]), mehrwertige Alkohole [5]), Phosphorsäure-Ester [6]), organische Säuren [7]), Anthocyane [8]), Sterine [9]), Vitamin B_{12} und Nucleoside [10]), Penicilline [11]), Enzyme [12]), Vitamine [13]), anorganische Kationen [14])[15]), anorganische Anionen [16]).

Mit dieser Methode, die, in der Ausführung verhältnismässig einfach, mit ausserordentlich wenig Material auskommt, lässt sich rasch eine Orientierung über ein grosses Material gewinnen, da sie für Reihenuntersuchungen sehr geeignet ist. Zur vollständigen Auswertung der erhaltenen Ergebnisse können dann die gewöhnlichen analytischen Methoden herangezogen werden. Die Ausgestaltung der Papierchromatographie zu einer exakt-quantitativen Methode ist zwar in gewissen Fällen schon gelungen, doch ist die Ausführung wegen der sehr geringen Mengen etwas schwierig und vorläufig für die Praxis weniger geeignet. Immerhin lassen die Papierchromatogramme unmittelbar schon einen Schluss auf die ungefähr vorhandenen Mengen zu (vgl. auch S. 391). Es liegt auf der Hand, dass sich auch auf dem Gebiet der Lebensmittelchemie, wo oft verwickelte Systeme vorliegen, eine solche Methode vorteilhaft anwenden lässt. Wir werden in einer weitern Mitteilung über einige spezielle Anwendungen auf Lebensmittel berichten.

Die als Papierchromatographie bezeichnete Technik ist eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Verteilungs-Chromatographie (partition chromatography), welche 1939 von *Synge* aufgefunden worden ist. *Martin* und *Synge* [17]) haben dieses Prinzip zuerst auf die Trennung der Aminosäuren in Form ihrer Acetylderivate an Säulen aus Silikagel angewendet. Die Verteilungs-

Chromatographie ähnelt zwar in der Ausführung der chromatographischen Adsorptionsanalyse, beruht jedoch auf einem ganz andern Prinzip. Nicht die verschiedene Adsorbierbarkeit am Säulenmaterial wird zur Trennung benutzt, sondern die Unterschiede im Löslichkeits-Verteilungskoeffizienten zwischen einem organischen Lösungsmittel und Wasser, welcher Vorgang ja vom Ausschütteln im Scheidetrichter her bekannt ist. Bei diesen Verteilungs-Chromatogrammen läuft das mehr oder weniger polare organische Lösungsmittel (bewegliche Phase) durch Silikagel-Partikel, die etwa 40 % ihres Gewichtes an Wasser enthalten (stationäre Phase) und lediglich als Träger dieser Phase dienen sollen. Dabei werden die Substanzen, welche im organischen Lösungsmittel am besten löslich sind, in der Säule am weitesten nach unten gelangen, während die im Wasser besser löslichen weiter oben Zonen bilden. Sind diese Zonen schmal und oben und unten scharf begrenzt, so kann man annehmen, dass Adsorption gar nicht oder nur in geringem Mass stattgefunden hat. Näheres über die Theorie der Verteilungschromatographie siehe z. B. *L. C. Craig* [18]).

Beim Versuch, die freien Aminosäuren auf diese Weise zu trennen, ergaben sich aber nicht schmale Zonen, sondern es bildeten sich lange Streifen, die eine gute Trennung unmöglich machten. Man suchte nach einem Trägermaterial, für die wässerige Phase, das weniger stark adsorbieren würde, und fand, dass an wässeriger Kartoffelstärke mit Butanol als beweglicher Phase die Trennungen gut gelangen. Auf diese Weise konnte die Acetylierung der Aminosäuren vermieden werden, wodurch die Unterschiede verwischt und die Trennung wegen nahezu gleicher Löslichkeit sehr erschwert worden war.

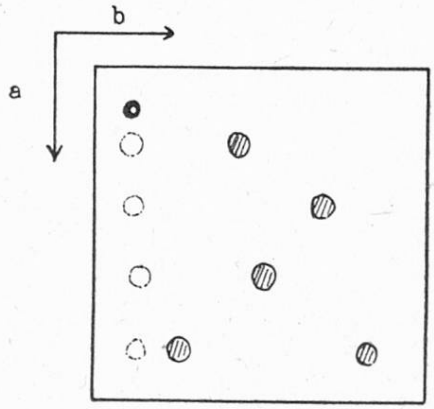
Kurze Zeit später zog man ein weiteres natürliches Polysaccharid als Fixierungsmittel heran, nämlich die Cellulose des Papiers.

Mit der Einführung von Filterpapier als Träger der wässerigen Phase hatte man die Papier-Verteilungschromatographie, kurz Papierchromatographie, geschaffen. Damit war es einerseits möglich, noch viel kleinere Substanzmengen zu trennen und auf dem Papier sichtbar zu machen (Ultra-Mikromethode). Anderseits liess sich die Methode zu einer 2-dimensionalen Trennung ausgestalten, indem man nach dem Entwickeln in einer Richtung (a) den Papierbogen um 90° drehte und mit einem andern Lösungsmittel (b) behandelte (Figur 1).

Auf diese Weise war man auf Umwegen und in weitgehend veränderter Form auf eine Methode zurückgekommen, mit der sich *Goppelsröder* schon im Jahre 1861 beschäftigt hatte (Kapillaranalyse).

Die Papierchromatographie besteht in der Kombination von Chromatographie und Tüpfelanalyse. Das Substanzgemisch wird zuerst auf dem Papier mit geeigneten Lösungsmitteln in die Komponenten zerlegt und hierauf die Lage derselben durch Besprühen mit gewissen Reagenzien sichtbar gemacht. Infolge der eingetretenen Trennung der Substanzen kann dabei auf die Verwendung von spezifischen Nachweisreaktionen vielfach verzichtet werden. Aus der Variation der Lösungsmittel zum Entwickeln der Chromatogramme sowie ihres gegenseitigen Mischungsverhältnisses ergeben sich ausserordentlich viele Möglich-

Fig.1 Zweidimensionale Papierchromatographie



keiten, die Methode auf einen bestimmten Fall anzuwenden. Als stationäre Phase diente bis jetzt ausschliesslich Wasser, doch sucht man auch in dieser Hinsicht, das Verfahren zu erweitern.

B. Methodik

I. Allgemeines

Bei der Papierchromatographie trägt man das zu trennende Stoffgemisch an einem Punkt des Papierbogens auf. Hierauf entwickelt man das Chromatogramm, entweder mit absteigendem Lösungsmittel nach *Consden, Gordon* und *Martin* [1]) oder nach der neuern Technik mit aufsteigender beweglicher Phase (*Williams* und *Kirby* [19]), eindimensional oder zweidimensional.

Absteigendes Lösungsmittel

In Anlehnung an die Säulentechnik fliesst hier die bewegliche Phase längs des Papierstreifens nach abwärts. Das eine Ende des Papiers wird in einen Trog aus Glas oder rostfreiem Stahl gesteckt und dort mit einer schmalen Glasplatte fixiert und der Papierstreifen oder -bogen senkrecht über den Rand herabhängen gelassen. Der Trog befindet sich in einem gasdichten Behälter, dessen Atmosphäre an Wasser und der jeweils verwendeten beweglichen Phase gesättigt ist. Vgl. Figur 2 und 3.

Das wasserhaltige bzw. wassergesättigte Lösungsmittel (Phenol, Butanol u. a.) wird in den Trog gegeben und wandert nun mit scharfer Frontlinie am Papier herab. Eine Verdunstung und ein Ausfallen von Substanz wie bei der Kapillaranalyse kann dabei nicht eintreten. Je nachdem, wie weit man die Substanzen trennen will und wie gut sich das Gemisch mit dem betreffenden Lösungsmittel trennen lässt, wird man das Lösungsmittel mehr oder weniger weit abwärts wandern oder auch längere Zeit unten abtropfen lassen.

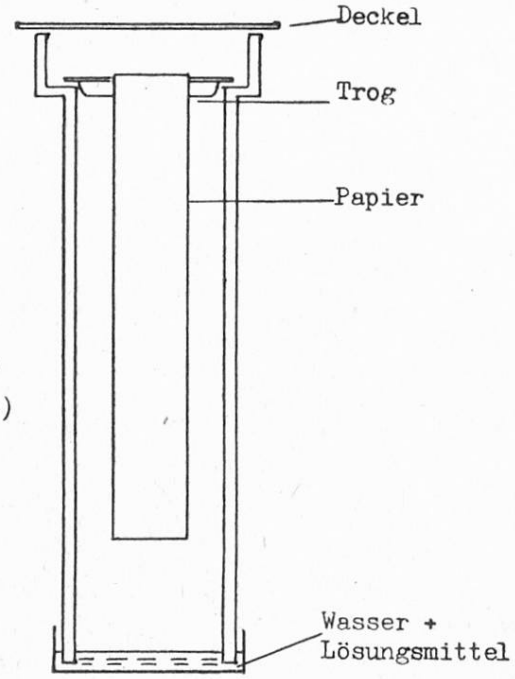
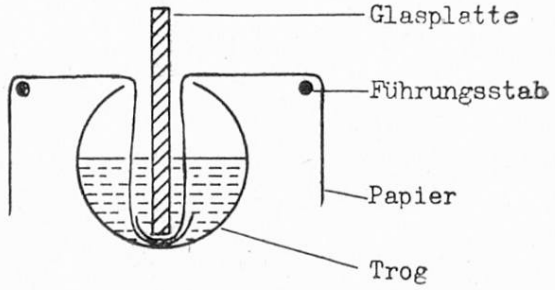


Fig. 2
Gesamtansicht
(Längsschnitt)

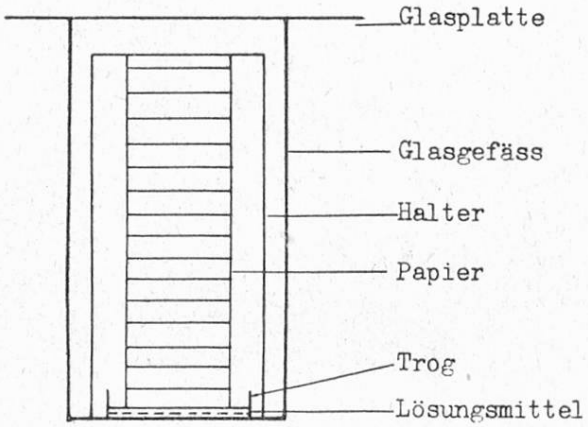
Fig. 3 Querschnitt durch den Trog



Aufsteigendes Lösungsmittel

Für unsere Versuche verwendeten wir fast ausschliesslich diese Form der Papierchromatographie. Die Apparatur ist etwas einfacher, ohne dass sich in den von uns behandelten Fällen Nachteile zeigten, im Gegenteil, die Fleckenränder waren eher etwas schärfer ausgebildet. Sie besteht aus dem verschliessbaren gasdichten Behälter, dem Trog am Boden desselben (Petrischale, Kristallisierschale usw.) und einem einfachen Gestell zum Aufhängen des Papierstreifens, das man sich aus Glasstäbchen leicht selbst herstellen kann, vgl. Figur 4.

Fig. 4 Gesamtapparatur. Längsschnitt



Das eine Ende des Papierstreifens wird in den Trog mit der wasserhaltigen beweglichen Phase getaucht und diese steigt nun infolge Kapillarität mit scharfer Frontlinie nach aufwärts.

Zur Ausführung von grössern Reihenversuchen, sowie für die zweidimensionale Papierchromatographie, ferner für Versuche zur quantitativen Papierchromatographie (vgl. Seite 390) dient uns der in Abbildung 1 wiedergegebene grössere Glaskasten. Er besitzt eine Grundfläche von 25×72 cm und ist 62 cm hoch. Die Glasplatten sind mit einem gegen Dämpfe von organischen Lösungsmitteln, von Säuren und Ammoniak möglichst indifferenten Kitt (Glaserkitt ist ungeeignet, wir verwendeten Nitrocellulose-Spachtelkitt) in einen verzinkten Eisenrahmen eingesetzt *). Auf den obern Teil des Rahmens ist ein Gummistreifen aufgeklebt, so dass die Platte aus dickem Glas gut schliesst. Das Metallgestell innerhalb des Kastens dient als Halter für die Tröge und zum Aufspannen der Papierbogen. Die Fixierung der Papiere im Trog erfolgt gleich wie auf Seite 378 beschrieben wurde. Die Tröge, deren Fassungsvermögen etwa 50 cm^3 beträgt, bestehen aus zirka 60 cm langen, an beiden Enden zugeschweissten Röhren aus Chromnickelstahl. Sie haben einen innern Durchmesser von 13 mm

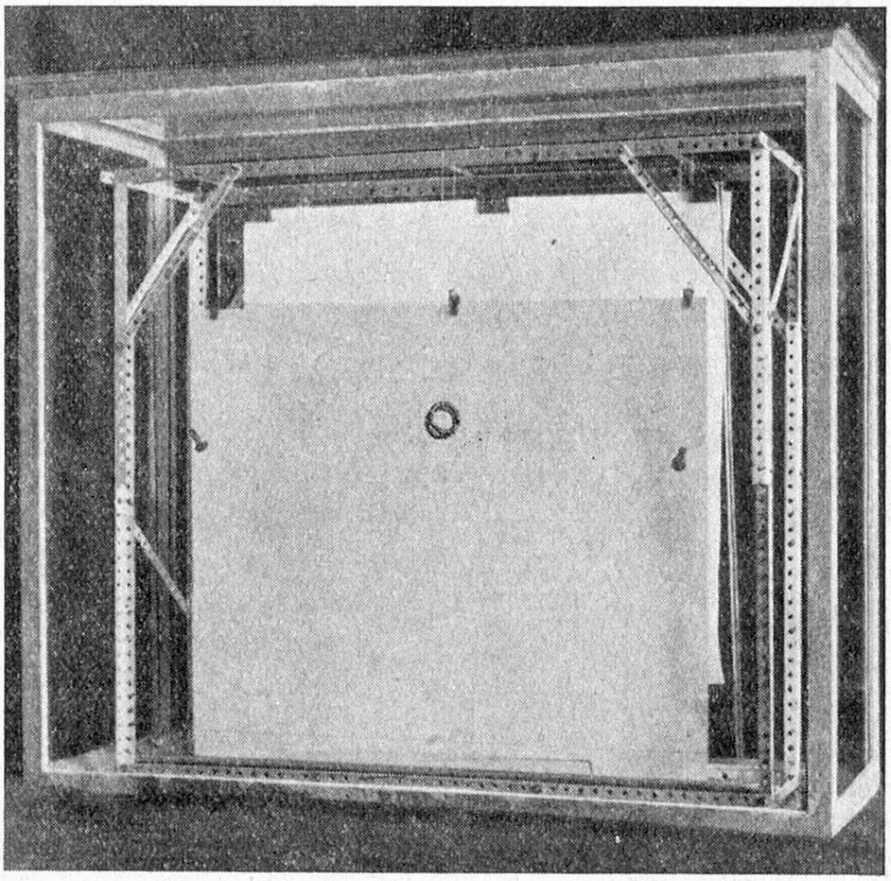


Abbildung 1

*) Firma A. Giesbrecht, Helvetiastrasse 17, Bern.

und sind der ganzen Länge nach mit einem 9 mm breiten Schlitz versehen. Die Kosten zur Herstellung solcher Tröge belaufen sich je nach Länge (7—60 cm) auf zirka Fr. 10.— bis 25.— *).

Diese Vorrichtung kann ebenso gut auch zur Papierchromatographie mit absteigendem Lösungsmittel dienen, wobei die Tröge und Führungsstäbe (vgl. Figur 2 und 3) in gewünschter Höhe auf dem Gestell befestigt werden. Sie erlaubt das Arbeiten mit 57×46 cm grossen Papierbogen.

Das Entwickeln

Die Geschwindigkeit, mit der sich das Lösungsmittel nach abwärts bzw. aufwärts bewegt, hängt ab einerseits von der Viskosität desselben, anderseits von der Art des Papiers. In einer Versuchsreihe haben wir verschiedene Papiere in bezug auf die Wanderungsgeschwindigkeit eines bestimmten Lösungsmittels miteinander verglichen. Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Als Lösungsmittel wurde verwendet: Butanol, Aethanol, Wasser = 4 : 1,1 : 1,9 (v/v) und zwar in der aufsteigenden Technik. Temperatur: zirka 20° C. Dauer der Entwicklung: 7 1/2 Stunden.

Tabelle 1

Filterpapier	Steighöhe des Lösungsmittels
Schleicher-Schüll, weiche Qualität	27,6 cm
Schleicher-Schüll Nr. 595	26,0 cm
Schleicher-Schüll Nr. 597	25,8 cm
Whatman Nr. 4	24,8 cm
Whatman Nr. 1	23,8 cm

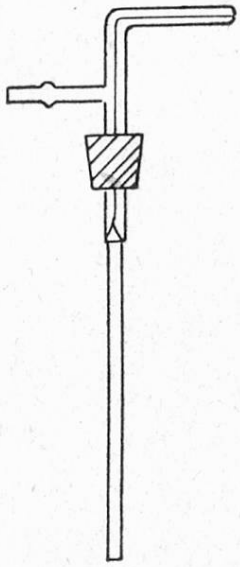
Für die meisten der von uns ausgeführten Untersuchungen erwies sich ein längeres Entwickeln als unnötig. Bei Gemischen, die sich gut trennen liessen, benötigte man sogar nur 3—4 h. Je länger man entwickeln liess, um so weniger scharf wurden die Chromatogramme. Die Geschwindigkeit der Aufwärtsbewegung nimmt natürlich im Verlauf der Zeit ständig ab und im gleichen Mass macht sich das Auseinanderdiffundieren der Substanzen auf dem Papier immer stärker bemerkbar. Dies ist bei absteigendem Lösungsmittel nicht im gleichen Mass der Fall, so dass hier das Entwickeln länger fortgesetzt werden kann, mit entsprechend besserer Trennungsmöglichkeit. Nur in Ausnahmefällen erwies sich dies jedoch als notwendig, meist genügte es, das geeignete Lösungsmittel zu wählen und es in der aufsteigenden Art zu verwenden.

*) Firma Utz AG., Engehaldenstrasse 18, Bern.

Das Sichtbarmachen der Chromatogramme

Arbeitet man nicht mit an sich farbigen Substanzen, so müssen die Positionen, bis zu denen die Komponenten gewandert sind, auf dem Papier sichtbar gemacht werden. Entsprechend den geringen Substanzmengen, die getrennt worden sind, kommen dabei nur ausserordentlich empfindliche Methoden in Betracht. Man besprüht den ganzen Streifen oder Bogen rasch und gleichmässig mit dem geeigneten Reagens und erhitzt in der Regel im Trockenschrank, worauf einzelne runde Flecken erscheinen (siehe Abbildung 2 und 3), von denen jeder einer bestimmten Substanz entspricht. Zum Besprühen kann irgend ein kleiner Zerstäuber dienen. Für unsere Arbeiten hat sich das in Figur 5 dargestellte Gerät bewährt *), das mit Gummistopfen in Reagensgläser eingesetzt wird. Man kann entweder mit dem Mund oder Gummiballon blasen oder komprimierte Luft oder Stickstoff zu Hilfe nehmen.

Fig. 5 Zerstäuber



Beim Besprühen achte man darauf, dass das Papier nicht zu nass wird, weil sonst eventuell getrennte Substanzen wieder zusammenfliessen können. Vorteilhaft verwendet man dazu Lösungsmittel, in denen die Verbindungen wenig löslich sind.

Im Unterschied zur qualitativen organischen Analyse werden am häufigsten solche Reagenzien verwendet, die mit einer möglichst grossen Zahl von Verbindungen reagieren, da es sich nicht darum handelt, eine einzelne Substanz im Gemisch mit andern nachzuweisen und eine gegenseitige Störung ausgeschlossen ist. Man kann auf diese Weise gewisse Farbreaktionen, z. B. mit Ninhydrin, quantitativ auswerten (vgl. S. 390), während sonst die kolorimetrische Bestimmung von Aminosäuren mit Ninhydrin wegen ihrer Unspezifität als unsicher

*) Carl Kirchner AG., Freiestrasse 12, Bern.

gilt. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht von häufig verwendeten Reagenzien zum Sichtbarmachen der Papierchromatogramme.

Tabelle 2

Nr.	Reagens	Reagierende Verbindungen	Reaktions-Temp.
1	Ammoniakal. $AgNO_3$ - Lösung (gleicheTeile $AgNO_3$-Lösung 0,1 n u. Ammoniak-Lösung 5 n) [3]	Red. Zucker, mehrwertige Alkohole (Sorbit, Inosit, Glycerin, Glykole)	105°
2	Ninhydrin-Lösung (0,1 %ig in n-Butanol) [20]	Aminosäuren, Aminoalkohole, Amine	105°
3	Naphthoresorcin in Trichloressigsäure (10 mg Naphthoresorcin in 1 cm^3 Alkohol lösen, dazu 9 cm^3 20 %ige wässrige Trichloressigsäure) [21]	Nichtred. Zucker, Furfurol-Derivate, Pentosen, Ketosen, Uronsäuren	90—100°
4	m-Phenylendiamin (0,2 m in 76 % Äthylalkohol) [20]	Red. Zucker	105°
5	Jod-Dämpfe [22]	Sehr viele organ. und anorgan. Verbindungen	Zimmertemp.

Weitere Hilfsmittel zum Sichtbarmachen der Chromatogramme: Betrachten im UV-Licht [23] [24], Besprühen mit acidimetrischen Indikatoren [7], Anwendung von mikrobiologischen Testmethoden [10] usw. Vergleiche die Übersicht bei *H. H. Strain* [39].

Die R_f-Werte

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Stoffes wird durch seinen sogenannten R_f-Wert (retention factor) charakterisiert. Es gilt die Definition:

$$R_f = \frac{\text{vom Stoff zurückgelegter Weg}}{\text{vom Lösungsmittel zurückgelegter Weg}}$$

Je kleiner also dieser Wert, um so mehr bleibt eine Verbindung auf dem Chromatogramm hinter dem vorrückenden Lösungsmittel zurück. Der R_f-Wert ist für eine bestimmte Substanz und ein bestimmtes Lösungsmittel ziemlich konstant und wenig abhängig von der absoluten Grösse der Wegstrecken. *Consden, Gordon* und *Martin* [1] haben experimentell gezeigt, dass die R_f-Werte von Aminosäuren recht genau in Beziehung stehen zu ihren Verteilungs-Koeffizienten, wie sie mit direkten Methoden gemessen werden. Je grösser die Löslichkeit einer Substanz in Wasser im Verhältnis zur Löslichkeit in der beweglichen Phase ist, um so kleiner ihr R_f-Wert und umgekehrt.

Die R_f-Werte sind meist um so höher, je grösser der Wassergehalt der beweglichen Phase ist. Da bei Lösungsmitteln, die nur beschränkt mischbar mit Wasser sind, die Sättigungskonzentration des Wassers von der Temperatur abhängt, sind die Beweglichkeiten um so höher, je näher die Temperatur der Kammer der kritischen Lösungstemperatur (homogene Lösung) des Lösungsmittels ist. So bewirkt z. B. bei Phenol eine Temperaturerhöhung ein Ansteigen der R_f-Werte, bei s-Collidin ist es umgekehrt. (Die untere kritische Temperatur des Collidins liegt bei 5^0.) Die Temperatureinflüsse sind jedoch gering bei einer Arbeitstemperatur weit unterhalb des kritischen Punktes. Die Temperatur im Arbeitsraum soll zwischen 18 und 31^0 liegen und die Apparatur möglichst weit vom Fenster aufgestellt sein. Die Temperaturdifferenzen zwischen Sommer und Winter beeinflussen die R_f-Werte gleichmässig. Nach *Partridge* [3]) kann man einen Standard-Zucker, z. B. Glucose, auf den Chromatogrammen mitlaufen lassen, und alle R_f-Werte bei Temperatur t^0 multiplizieren mit einem Faktor a_t, wobei

$$a_t = \frac{R_f\text{-Wert für Glucose bei } 20^0}{R_f\text{-Wert für Glucose bei } t^0}$$

Die so korrigierten R_f-Werte sind dann bei gleichen übrigen Bedingungen bemerkenswert konstant.

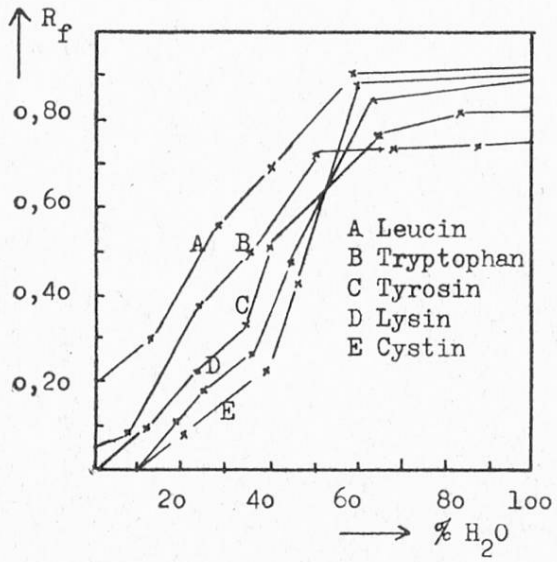
Bei Verwendung von mit Wasser nur teilweise mischbaren Lösungsmitteln können die R_f-Werte beeinflusst werden durch Zusatz einer kleinen Menge eines mit beiden Phasen vollständig mischbaren Lösungsmittels. Dies erhöht dann die Löslichkeit von Wasser in der neuen beweglichen Phase und damit bei vielen Substanzen die R_f-Werte. Die folgende Zusammenstellung zeigt dies an einem Beispiel.

Tabelle 3

Substanz	R_f-Werte in [5])	
	n-Butanol gesättigt mit Wasser (20 % Wasser)	n-Butanol 4,0, Aethanol 1,1, Wasser 1,9 (v/v) (27 % Wasser)
Äthylen-Glykol	0,51	0,54
Glycerin	0,30	0,43
α-Methyl-Galaktosid	0,13	0,31
Sorbit	0,06	0,21
Dulcit	0,05	0,21
Mannit	0,05	0,22
Inosit	0,00	0,10
Saccharose	0,00	0,15

Die R_f-Werte der einzelnen Substanzen ändern sich mit steigendem Wasserzusatz nicht ganz gleichartig, es treten gelegentlich Überkreuzungen auf, siehe Figur 6 [25]).

Fig. 6 R_f-Werte in Jsobutylalkohol-Wasser



Die R_f-Werte werden praktisch nicht beeinflusst durch die Anwesenheit ähnlicher Verbindungen, bei vergleichbaren Konzentrationen. Man kann z. B. gleichzeitig 20 verschiedene Aminosäuren auf einem Papierchromatogramm trennen. *Dent* [26]) gibt einen genauen Lageplan für über 60 α-Aminosäuren, wobei eine leichte Ablesung der R_f-Werte möglich ist.

Ferner lässt sich keine systematische Veränderung der R_f-Werte in Abhängigkeit der angewendeten Substanzmenge feststellen. *Partridge* [3]) verwendete z. B. von einer wässrigen Lösung, die je 1 % (Gew/Vol) Glucose und Xylose enthielt, Mengen von 4,0—0,5 μ l *), entsprechend 40—5 γ Substanz für ein Chromatogramm und konnte keine Variation der R_f-Werte feststellen (Messung der Zentren der Tüpfel). Für spezielle Zwecke lassen sich auch noch grössere Mengen chromatographieren.

Die R_f-Werte sind beim aufsteigenden Chromatogramm etwas niedriger als beim absteigenden, doch sind die Unterschiede nicht bedeutend.

Zum Nachweis der Komponenten eines Gemisches wird man sich nicht nur auf die R_f-Werte in der Literatur stützen, sondern nebeneinander auf dem gleichen Papier die Analysenprobe, eine Vergleichslösung der gesuchten Stoffe (Leitchromatogramm) und Mischproben (Analysenprobe plus gesuchter Stoff) entwickeln, um auch den Einfluss von Nebenbestandteilen und andere spezielle Verhältnisse (wechselnde Papierqualität, Temperatur usw.) zu berücksichtigen. Liegen dann auf dem fertigen Chromatogramm die entsprechenden Flecken auf

*) = 1 mm^3.

gleicher Höhe, so ist der gesuchte Stoff mit grösster Wahrscheinlichkeit identifiziert.

Die folgende Tabelle gibt einen Vergleich von R_f-Werten der Literatur [5]) mit eigenen Bestimmungen bei zwei verschiedenen Steighöhen des Lösungsmittels. Volumteile Butanol-Äthanol-Wasser = 4,0 : 1,1 : 1,9.

Tabelle 4

Substanz	R_f-Werte		
	Literatur	Steighöhe 14,2 cm (4 1/2 Stunden)	Steighöhe 25,2 cm (13 Stunden)
Inosit	0,10	0,08	0,12
Mannit	0,22	0,20	0,24
Sorbit	0,21	0,19	0,23
Glycerin	0,43	0,43	0,43

Das Papiermaterial

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass weitaus am meisten die englischen Whatman-Papiere Nr. 1 und 4 für die Papierchromatographie verwendet werden. Benützt man gewöhnliches Filterpapier, so erfolgt zwar eine Trennung in ähnlicher Weise, aber es zeigt sich, dass die Intensität der Flecken erheblich geringer ist, besonders wenn man weiches und dickes Papier verwendet. In diesem Falle sind eben die Substanzverluste durch Adsorption, Diffusion usw. im Papier selbst nicht mehr zu vernachlässigen. Die folgende Abbildung gibt einen Vergleich verschiedener Filterpapiersorten. Die auf dem Papier getrennten Substanzen (aufsteigendes Lösungsmittel) sind (von unten nach oben): Inosit, Sorbit, Glycerin, je 40 γ. Lösungsmittel: Butanol-Äthanol-Wasser (4,0 : 1,1 : 1,9). Steighöhe der Lösungsmittelfronten: 18—23 cm. Reagens zum Sichtbarmachen: ammoniakalische $AgNO_3$-Lösung (Tabelle 2).

Seit einiger Zeit können die Whatman-Papiere (Format 57 × 46 cm) auch in der Schweiz bezogen werden *). Neuerdings bringt ebenfalls die Firma Schleicher & Schüll eine Anzahl Papiere aus besonders einheitlichen und reinen Rohstoffen heraus, z. B. die Sorten 2043 B, 604, 597, LS 14, LS 16, 989/2, doch haben wir damit noch keine eigenen Erfahrungen gemacht. Für unsere Versuche brauchten wir fast ausschliesslich Whatman-Papier Nr. 1. Bei Whatman Nr. 4 wurde beobachtet, dass nach dem Entwickeln mit Butanol-Äthanol-Wasser und besprühen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung bisweilen ein Teil des Papiers sich sehr dunkel färbte. Dies trat bei Whatman Nr. 1 kaum je ein. Dieses Papier enthält offenbar weniger reduzierende Stoffe, so dass auf eine spezielle Vorreinigung verzichtet werden konnte.

*) Dr. Bender und Dr. Hohbein, Riedtlistrasse 15, Zürich.

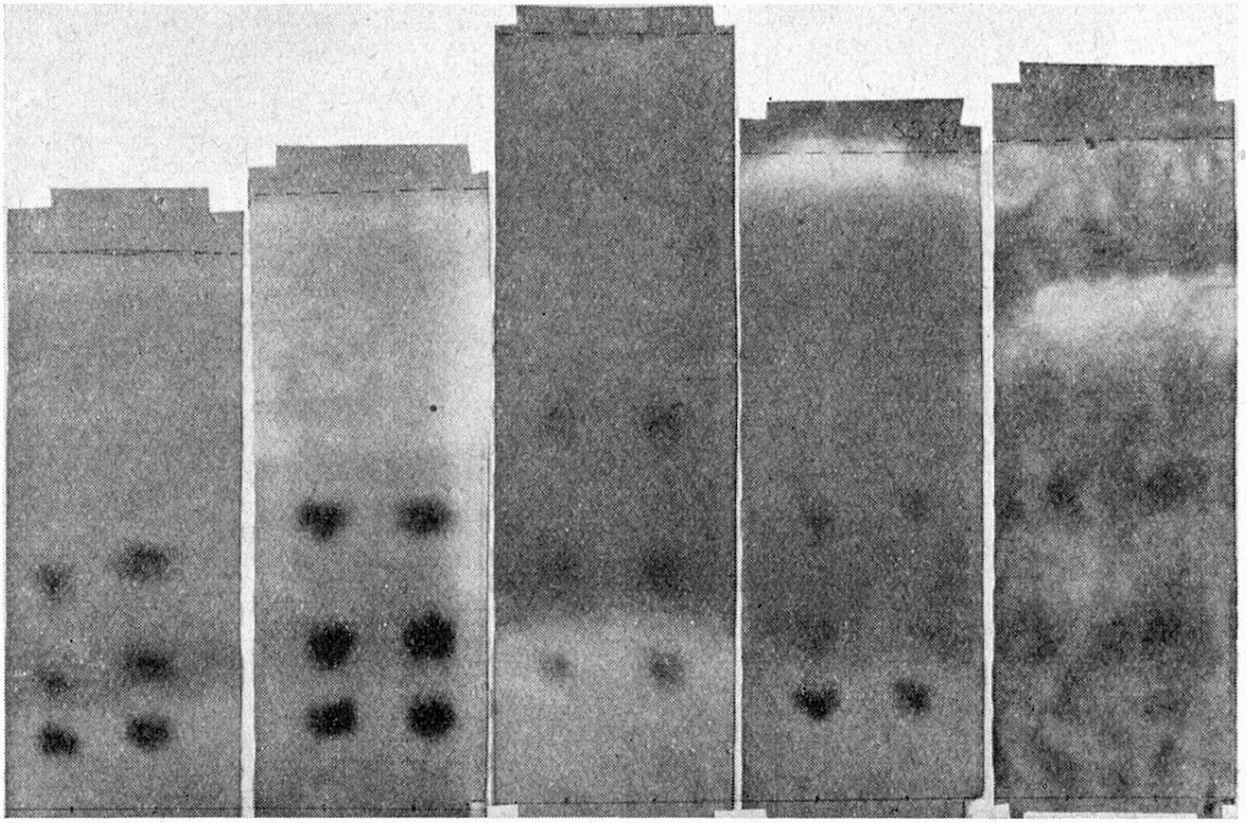


Abbildung 2

Die Lösungsmittel

Alle Lösungsmittel geben ohne Wasserzusatz entweder überhaupt keine Wanderung der Substanzen oder langgestreckte Streifen. Durch einen geeigneten Wasserzusatz lassen sich immer Lösungsmittel-Gemische herstellen, mit denen gut ausgebildete runde oder schwach ovale Flecken erhalten werden [40]). Das Wasser in den Gemischen kann teilweise durch konz. Ammoniak oder durch Eisessig ersetzt werden, wodurch insbesondere die Rf-Werte der basischen und sauren Aminosäuren beeinflusst werden [25]).

Die ersten papierchromatographischen Arbeiten wurden fast ausschliesslich mit der wassergesättigten Phase von mit Wasser nur teilweise mischbaren Lösungsmitteln (Phenol, s-Collidin usw.) ausgeführt. Später zeigte sich, dass grundsätzlich alle mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, insbesondere Alkohole, Pyridin und Homologe, Carbonsäuren, Aceton, Tetrahydrofuran usw. mit einem geeigneten Wassergehalt verwendbar sind [25]). Dadurch eröffnen sich der Papierchromatographie vielfältige Möglichkeiten, indem eine viel grössere Auswahl zur Verfügung steht, der Wassergehalt je nach den besondern Erfordernissen variiert werden kann, die Gemische und damit die Rf-Werte besser reproduziert werden können. (Der Wassergehalt und damit die Rf-Werte der beschränkt mischbaren Phasen sind mehr oder weniger stark von der Temperatur und von zufälligen Beimengungen abhängig, vgl. S. 384.)

In der folgenden Tabelle sind einige von uns verwendete Lösungsmittel zusammengestellt.

Tabelle 5

Lösungsmittel (v/v)	Chromatographie von
n-Butanol-Äthanol-Wasser (4,0 : 1,1 : 1,9)	Kohlenhydraten
n-Butanol gesättigt mit Wasser	Kohlenhydraten
n-Butanol gesättigt mit 4 n-Essigsäure	Carbonsäuren
n-Butanol-Pyridin (4 : 1) gesätt. mit Wasser	N-haltigen Lipoid-Bestandteilen

Verhinderung von Störungen

Das Volumen der Analysenlösung, in Form eines Tüpfels auf das Papier gebracht, sollte 4—5 μ l nicht überschreiten, weil sonst die Flecken nach dem Entwickeln zu gross werden und sich überlagern. Da die Methode im Mittel etwa 40 γ für eine Substanz erfordert, sollte die Konzentration einer Komponente in der Analysenlösung nicht geringer als etwa 1 %ig sein. Vielfach ist es daher nötig, Hydrolysate usw. einzudampfen, wodurch aber auch gleichzeitig die Konzentration von anorganischen Salzen und andern Fremdstoffen erhöht wird. Diese müssen oft entfernt werden.

In welcher Weise sich Salze störend bemerkbar machen können, ist aus der folgenden Versuchsreihe ersichtlich (Tabelle 6 und Abb. 3):

Tabelle 6

Versuch	Testlösung	Salzzusatz	Menge (μ l)
1	Wässr. Lösung von Serin, Colamin, Cholin, je 1 % (50 mg/5 cm³)	—	3—5
2	do.	—	3—5
3	do.	970 γ NaCl / 0,10 cm³ Testlösung	3—5
4	do.	do.	3—5
5	do.	do.	3—5
6	do.	1200 γ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ / 0,10 cm³ Testl.	3—5
7	do.	—	3—5
8	do.	1200 γ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ / 0,10 cm³ Testl.	3—5
9	do.	620 γ $Ca(NO_3)_2$ / 0,10 cm³ Testlösung	3—5
10	do.	do.	3—5
11	Alle 3 Salztestlösungen gemischt		3—5
12	do.		3—5

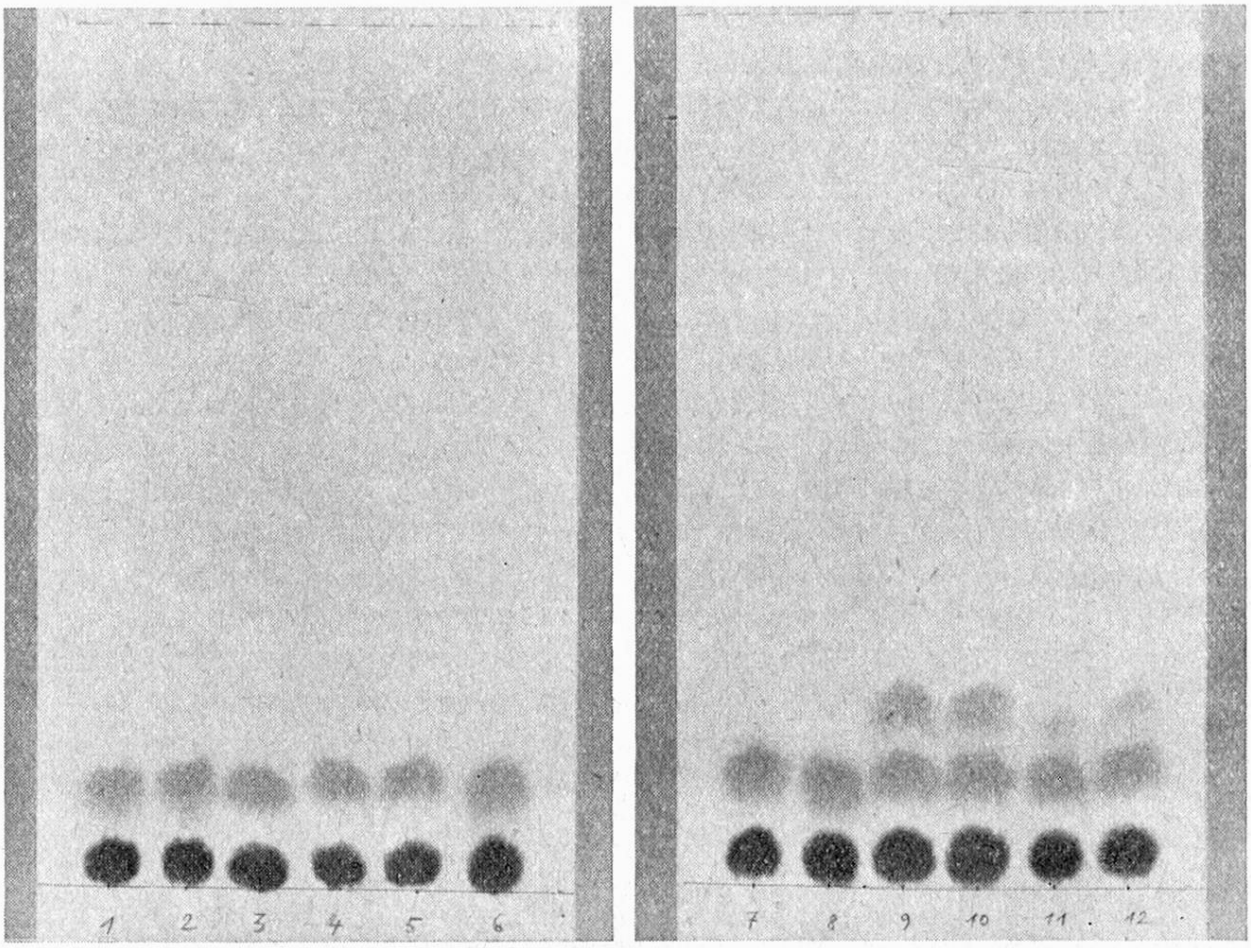


Abbildung 3

Erklärung zu Abbildung 3:

Lösungsmittel für das Papierchromatogramm: Butanol-Pyridin = 4 : 1, gesättigt mit Wasser (vgl. Tabelle 5). Dauer: 14 h. Oberer Fleck: Colamin, unterer Fleck: Serin. Sprühreagens: Ninhydrin (vgl. Tabelle 2).

Abbildung 3 zeigt, dass ein Zusatz von NaCl und $MgSO_4$ zur Testlösung wenig Einfluss auf das Chromatogramm hat. Im Unterschied dazu bewirkt $Ca(NO_3)_2$, dass das Colamin in zwei getrennte Flecken aufgespalten wird. In andern Fällen äussert sich die Störung durch Salze im Auftreten von langgestreckten Streifen an Stelle der runden Tüpfel, wodurch eine sichere Identifizierung verunmöglicht werden kann.

Zur schnellen Entfernung von Elektrolyten aus Aminosäure-Lösungen, die der Papierchromatographie unterzogen werden sollen, haben *Consden, Gordon* und *Martin* [28]) einen Apparat entwickelt. Er beruht auf dem Prinzip, dass Kationen, insbesondere auch Alkali-Ionen, durch den elektrischen Strom an einer Hg-Kathode unter Amalgam-Bildung entladen werden. Das Amalgam wird an einer andern Stelle des Apparates durch Waschen mit Wasser zersetzt und das Quecksilber im Kreislauf zurückgeführt. *Decker* [29]) hat eine vereinfachte Aus-

führungsform angegeben, die mit einfachen Hilfsmitteln in jedem Laboratorium zusammengestellt werden kann.

Bei der Papierchromatographie von Zuckern (und ander nichtionisierten organischen Molekülen) werden die Ionen am besten durch Ionenaustauscher entfernt. Geeignet sind z. B. Wofatit KS (Kationenaustauscher) und Wofatit M (Anionenaustauscher), welche ja zum Entsäuern und Entsalzen von Obstsäften und Konzentraten herangezogen werden (vgl. z. B. *H. Hadorn* [30]). Das Kunstharz wird über Nacht in Wasser gequollen, dann mit 7 %iger Salzsäure bzw. 7 %iger Sodalösung 30 Minuten aktiviert und hierauf so lange gewaschen, bis das Waschwasser neutral reagiert. Die zu entsalzende Lösung wird in einem kleinen Gefäss (Mikrobecher) mit so viel Wofatit versetzt, dass sein Volumen 1/4 bis 1/3 des Flüssigkeitsvolumens einnimmt. Die Lösung wird 30—40 Minuten gerührt und dann filtriert. Vor dem Aufbringen auf das Papier muss sie oft noch konzentriert werden.

Bei der papierchromatographischen Untersuchung gewisser Lebensmittel, z. B. Wein, erwies sich indessen eine solche Reinigung als unnötig, da die Konzentration der störenden Stoffe im Verhältnis zu den gesuchten nicht gross war. Dies erleichtert natürlich die Anwendung der Methode in der Praxis, speziell bei Serienversuchen.

Fixierung der Ergebnisse

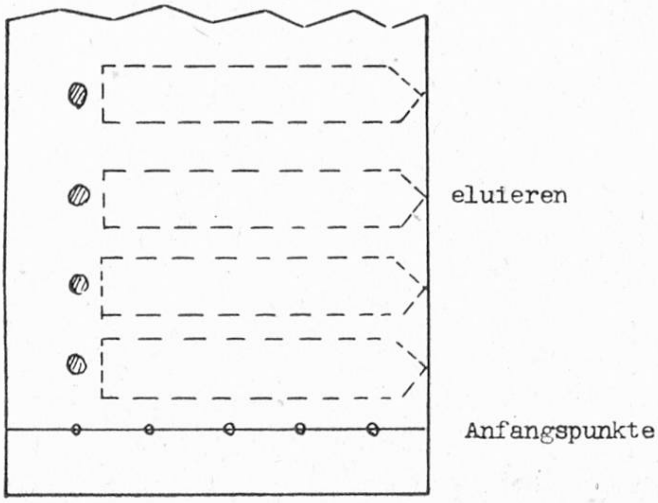
Das fertige Papierchromatogramm erleidet je nach dem verwendeten Reagens eine mehr oder weniger rasche Veränderung. Gewisse Farbreaktionen (z. B. mit Naphthoresorcin) sind nur 1—2 Stunden unverändert haltbar. Wünscht man einen dauernden Beleg, so müssen die Chromatogramme haltbar gemacht oder dann kopiert werden. So kann man mit Pauspapier eine Kopie herstellen, wobei mit Pastellfarben die verschiedenen Farbtöne reproduziert werden. Vielfach wird man auch eine photographische Reproduktion vornehmen. In andern Fällen genügt ein genaues Markieren mit Bleistift und Ausmessen auf dem Original.

Quantitative Papierchromatographie

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass sowohl die Aminosäure- wie die Zucker-Bestimmung im Anschluss an das Papierchromatogramm auch quantitativ möglich ist [31]) [32]). Man entwickelt auf einem breitern Streifen (Abbildung 1 und Figur 7) gleichzeitig mehrere Chromatogramme des gleichen Gemisches nebeneinander. Eines davon wird dann ausgeschnitten und sichtbar gemacht. Danach wird die Lage der übrigen Substanzen bestimmt und die entsprechenden Querstreifen ausgeschnitten und ausgewaschen (eluiert).

Zum Auswaschen wendet man das Prinzip der Papierchromatographie mit absteigendem Lösungsmittel an und lässt dieses längere Zeit abtropfen [33]). Im Eluat können die Aminosäuren kolorimetrisch mit Ninhydrin bestimmt werden, die Zucker mit Somogyis Kupfer-Reagens[34]) oder kolorimetrisch durch Erfassung des bei der Oxydation mit Perjodat gebildeten Formaldehyd [35]) bzw. Titration

Fig.7 Quantitative Papierchromatographie



der gebildeten Ameisensäure [36]). Auch die Anwendung der Titration nach *Willstätter-Schudel* im Mikromasstab ist sehr geeignet [37]).

Es ist evident, dass die Flecken auf dem Papier um so grösser sind, je mehr Substanz zum Chromatographieren verwendet wurde. Zwischen der Grösse des Fleckens und dem Logarithmus der Konzentration besteht nach *Fisher* und Mitarbeiter eine Proportionalität, so dass man aus der Fleckengrösse die Konzentration der einzelnen Komponenten eines Gemisches abschätzen kann *(Fisher, Parson, Morrison* [38]), Nature 161 [1948] 764, 164 [1949] 183). Die Genauigkeit des Verfahrens ist jedoch durch die Unschärfe der Fleckenränder begrenzt. Wie am Anfang gesagt wurde, liegt der Wert der Methode für die Praxis in der raschen Orientierung. Zur genauern Auswertung der Befunde müssen dann die üblichen analytischen Methoden herangezogen werden.

Die Anwendung auf lebensmittelchemische Probleme ist neu. Die in unserem Laboratorium angestellten Versuche ergaben jedoch sehr befriedigende Resultate.

II. Ausführung eines Papierchromatogramms

(Eindimensional, aufsteigendes Lösungsmittel)

Apparatur

Gasdichter Behälter (im einfachsten Fall: zylindrisches Glasgefäss mit Glasplatte bedeckt)
Trog aus Glas oder rostfreiem Stahl (Petrischale, Kristallisierschale)
Gestell aus Glas oder Metall zum Aufhängen der Papiere
Sahli-Pipette (für Blutanalyse)
Infrarot-Lampen
Zerstäuber
Trockenschrank

Reagenzien

Filterpapiere: Whatman Nr. 1 und 4, oder sonstige geeignete Sorten.

Lösungsmittel, gesättigt an Wasser bzw. Lösungsmittelgemische mit bestimmtem Wassergehalt (siehe Tabelle 5).

Reagenzien zum Sichtbarmachen der Chromatogramme (siehe Tabelle 2).

Gang der Untersuchung

Das zu trennende Substanzgemisch soll als eine Lösung vorliegen, welche etwa 1 % von jeder Komponente enthält. 3—4 cm vom Rande eines Papierstreifens oder Bogens wird mit Bleistift eine waagrechte «Startlinie» gezogen. Darauf werden in regelmässigen Abständen einzelne Punkte markiert und auf diese je etwa 4 µl der Analysenlösung gebracht, was einer gelösten Substanzmenge von ungefähr 40 γ einer Komponente entsprechen soll. Man beachte, dass die äussersten Punkte nicht zu nahe an den Rand des Papiers zu liegen kommen. Zum Aufbringen der Lösung auf das Papier haben sich die sogenannten Sahlipipetten bewährt. Dies sind dickwandige Kapillarpipetten mit einer Graduierung von 1, 2, 2 1/2, 3, 4, 5 µl *). Man hält die gefüllten Pipetten etwas schräg auf das Papier, worauf die Lösung herausgesogen wird.

Dann lässt man etwa 30 Minuten an der Luft eintrocknen, so dass das Papier überall den gleichen Feuchtigkeitsgehalt aufweist.

Zum Entwickeln des Chromatogramms wird hierauf das Papier in den gasdichten Behälter gebracht, dessen Atmosphäre schon vorher mit Wasser und der beweglichen Phase gesättigt worden war. Arbeitet man mit grossen Papierbogen, so werden diese zuerst im Gestell (Abbildung 1) aufgespannt und im Trog mit der Glasplatte fixiert, worauf die ganze Vorrichtung in den Glaskasten eingesetzt und die Glasplatte aufgelegt wird.

Sobald sich das Dampfdruckgleichgewicht eingestellt und das Papier genügend Feuchtigkeit aufgenommen hat, wird das Lösungsmittel in den Trog gegeben. Dies geschieht mit Hilfe einer Pipette bzw. dem in Abbildung 1 auf der rechten Seite sichtbaren dünnen Glasrohr. Der in Abbildung 1 hinten aufgehängte zweite Papierbogen wird mit dem Lösungsmittel befeuchtet und dient zur raschen Sättigung der Atmosphäre. Man kann auch gleichzeitig zwei Papierbogen chromatographieren und einen dritten dazwischen aufhängen.

Der Kasten wird nun gut verschlossen (Gewicht auf der Glasplatte) und die Entwicklung des Chromatogramms vor sich gehen gelassen, zweckmässig über Nacht (gleichmässige Raumtemperatur).

Nachdem das Lösungsmittel genügend weit gewandert ist, werden die Papiere herausgenommen und mit Bleistift die Lage der Flüssigkeitsfront markiert, worauf man die Papiere trocknet. Dazu bedienen wir uns zweier Infrarot-Lampen (Philips-Trockenstrahler) **), mit denen die Papiere bestrahlt werden,

*) Firma H. Schaerer, Neubrückstrasse 2, Bern.

**) Philips-Lampen AG., Manessestrasse 192, Zürich.

bis der Geruch des Lösungsmittels verschwunden ist (30—60 Min.). Am besten geschieht dies in einem Abzug mit guter Ventilation, so dass die Dämpfe im Laboratorium nicht störend auftreten.

Jetzt kann das Chromatogramm sichtbar gemacht werden. Man besprüht entweder die ganze Papierfläche mit einem geeigneten Reagens, oder schneidet einzelne Streifen heraus und führt verschiedene Farbenreaktionen aus. Dazu muss meist erwärmt werden (vgl. Tabelle 2). Hierzu verbringt man die Papiere für 5—10 Minuten in einen Trockenschrank, worauf die farbigen Flecken erscheinen. Je nach Veränderlichkeit derselben wird man das Chromatogramm sofort oder nach einiger Zeit auswerten.

Zusammenfassung

Es wird zunächst der Entwicklungsgang und das Prinzip der Papierchromatographie dargelegt und hierauf die Methodik dieses neuen, allgemein anwendbaren analytischen Verfahrens auseinandergesetzt, nämlich die verschiedene Art und Weise der apparativen Anordnung, die unterschiedlichen Einflüsse, welche bei der praktischen Anwendung berücksichtigt werden müssen, die Möglichkeiten zur quantitativen Ausgestaltung der Methode. Zum Schluss folgt noch im Detail die Anleitung zur Ausführung eines Papierchromatogramms mit der in unserem Laboratorium verwendeten Apparatur.

Die Vorzüge dieser Methode liegen in der Leichtigkeit, mit der viele Trennungen ausgeführt werden können; in der grossen Zahl gelöster Substanzen, die man gleichzeitig in einer Mischung auffinden kann; in der Möglichkeit, sehr geringe Mengen zu trennen; in der Leichtigkeit, die R_f-Werte zu bestimmen; in den vielfältigen Möglichkeiten, farblose Substanzen nach der Trennung auf dem Papier zu lokalisieren.

Résumé

On décrit tout d'abord l'historique et le principe de la chromatographie de partage sur papier. Puis on passe en revue les modes opératoires de cette nouvelle méthode analytique d'application générale, ainsi que l'appareillage nécessaire. On examine les divers facteurs dont il faut tenir compte dans l'application pratique de ce procédé et également ses possibilités d'emploi dans l'analyse quantitative. Pour conclure on décrit en détail la marche suivie dans notre laboratoire pour la chromatographie sur papier ainsi que l'appareillage utilisé.

Les avantages de cette méthode sont: la facilité avec laquelle beaucoup de séparations peuvent être effectuées; le grand nombre de substances que l'on peut déceler dans un mélange; la possibilité de séparer de très petites quantités de substances; la facilité de déterminer les facteurs R_f; les nombreuses possibilités de localiser sur le papier des substances incolores après leur séparation.

Literatur

[1]) *Consden, Gordon* and *Martin:* Biochem. J. 38, 224 (1944).
[2]) *D. L. Clegg:* Analyt. Chemistry 22, 48 (1950).
[3]) *Partridge:* Biochem. J. 42, 238 (1948).
[4]) *Jermyn, Isherwood:* ibid. 44, 402 (1949).
[5]) *Hough:* Nature 165, 400 (1950).
[6]) *Hanes, Isherwood:* ibid. 164, 1107 (1949).
[7]) *Lugg, Overell:* ibid. 160, 87 (1947).
[8]) *Bate-Smith,* ibid. 161, 835 (1948).
[9]) *Zaffaroni, Burton:* J. Biol. Chem. 177, 109 (1949).
[10]) *Kocher, Karrer, Müller:* Int. Zeitschr. f. Vitaminforschg. 21, 403 (1950).
[11]) *Goodall* und *Levi:* Nature 158, 674 (1946).
[12]) *Mitchell, Gordon* and *Haskins:* J. Biol. Chem. 180, 1071 (1949).
[13]) *Yakovitz, Norrik* und *Heuser:* Z. angew. Chemie 62, 33 (1950).
[14]) *Lederer:* Nature 162, 776 (1948).
[15]) *Osborne:* ibid. 164, 443 (1949).
[16]) *Dent:* Biochem. J. 41, 240 (1947).
[17]) *Martin* and *Synge:* ibid. 35, 1358 (1941).
[18]) *L. C. Craig:* Analyt. Chemistry 22, 1346 (1950).
[19]) *Williams* and *Kirby:* Science 107, 481 (1948).
[20]) *Chargaff, Levine, Green:* J. Biol. Chem. 175, 67 (1948).
[21]) *W. G. C. Forsyth:* Nature 161, 239 (1948).
[22]) *G. B. Marini* und Mitarbeiter: Experientia 6, 309 (1950).
[23]) *D. M. Philips:* Nature 161, 53 (1948).
[24]) *Patton:* Science 110, 593 (1949).
[25]) *P. Decker* und *W. Riffart:* Chem. Zeitg. 74 (1950).
[26]) *C. E. Dent:* Biochem. J. 43, 169 (1948).
[27]) *Bentley* and *Whitehead:* Nature 164, 182 (1949).
[28]) *Consden, Gordon* and *Martin:* Biochem. J. 39, 46 (1945); 41, 590 (1947).
[29]) *P. Decker:* Chem. Zeitg. 74 (1950).
[30]) *H. Hadorn:* diese Mitt. 37, 114 (1946).
[31]) *Boissonnas:* Chimia 4, 236 (1950); Helv. 33, 1975 (1950).
[32]) *Flood, Hirst, Jones:* Nature 160, 86 (1947); J. Chem. Soc. (London) 1679 (1948).
[33]) *C. E. Dent:* Biochem. J. 41, 240 (1947).
[34]) *M. Somogyi:* J. Biol. Chem. 160, 61 (1948).
[35]) *P. Desnuell* und *M. Naudet:* Bull. Soc. Chim. 12, 871 (1945).
[36]) *E. Hirst, J. Jones:* J. Chem. Soc. (London) 1659 (1949).
[37]) *J. R. Hawtorn:* Nature 160, 714 (1947).
[38]) *Fisher, Parson, Morrison:* ibid. 161, 764 (1948); 164, 183 (1949).
[39]) *H. H. Strain:* Analyt. Chemistry 22, 47 (1950).
[40]) *K. G. Bergner* und *H. Sperlich:* Deutsche Lebensm.-Rundschau 47, 134 (1951).