

**MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW**  
Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek  
Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek - Gent

**RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE**  
Directeur a.i.: Dr. Ir. Vyncke W.

# Assymetrische dunnelaag chromatografie

dr. W. Deschacht



Studie uitgevoerd met financiële steun van de Commissie van de Europese Unie

Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (CLO Gent)  
Publikatie nr. 238

**MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW**  
Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek  
**Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek - Gent**

**RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE**  
Directeur a.i.: Dr. Ir. Vyncke W.

# **Assymetrische dunnelaag chromatografie**

dr. W. Deschacht



Studie uitgevoerd met financiële steun van de Commissie van de Europese Unie

Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (CLO Gent)  
Publikatie nr. 238/D/1995/0889/3

# Assymetrische dunnelaag chromatografie.

W. Deschacht

## Inleiding.

Gedurende het evalueren van dunnelaag chromatografische technieken voor het scheiden van bewaarmiddelen, werden bij het uittesten van de methode beschreven door R. Rangone en C. Ambrosio (1970) moeilijkheden ontmoet. Deze auteurs gebruikten een reversed-phase methode voor de scheiding van de esters van het para-hydroxybenzoezuur. Het aanwenden van gebruiksklare platen (Merck) bleek evenwel onmogelijk. Door het contact met minstens één van de voorgeschreven loopmiddelen vormden zich blaren, waardoor de plaatstructuur vernietigd werd. Daar het aanwezige bindmiddel voor het verschijnsel verantwoordelijk was, zat er niets anders op dan de platen zelf te gieten. Bij een dergelijke operatie wordt gestreefd naar een uniforme laagdikte over de gehele oppervlakte van de glasplaten. Toen uit de beschikbare literatuur bleek dat over het gebruik van platen met een veranderlijke laagdikte echter geen informatie beschikbaar was, werd beslist de gelegenheid aan te grijpen om enige inlichtingen te verzamelen in verband met een eventuele invloed van deze parameter op de scheiding. Het uitvoeren van de metingen werd ernstig bemoeilijkt door de zachtheid van de aangebrachte laag, zodat ook hiervoor een oplossing gezocht werd.

## Experimenteel.

### Voorbereiden van de platen.

Het gieten van de platen gebeurde met een DESAGA uitrusting. Op de grondplaat werden een plaat van 10 x 20 cm (de startplaat), 4 platen van 20 x 20 cm en een stopplaat van 10 x 20 cm geplaatst. Deze opstelling maakte het mogelijk om maximaal 4 bruikbare platen te bekomen. De begin- en eindplaat schakelde eventuele storende invloeden uit bij het op gang brengen, respectievelijk stoppen van het handmatige uitspreiden. Om een uniforme laagdikte te bekomen werd de positie van de grondplaat met behulp van een waterpas gecontroleerd. en zo nodig bijgesteld. Deze platen worden verder aangeduid als platen met een code (assymetriefactor) 0. Om platen te bekomen met een assymetriefactor 1 werd over de gehele lengte van de grondplaat een DYMO bandje van 6 mm breedte op de glasplaten gekleefd. Platen met een assymetriefactor 2 en 3 werden bekomen door op het (de) alreeds aangebrachte bandje(s) een nieuwe band aan te brengen. Daarop werd het ledige uitstrijkapparaat op de glasplaten geplaatst. Hierbij rust nu één kant van het toestel op de DYMO laag, de andere op de glasplaat, en met behulp van een waterpas werd de bovenzijde van de het uitstrijkapparaat opnieuw horizontaal gebracht. Deze horizontale positie werd over de gehele lengte van de basisplaat gecontroleerd en bijgesteld.

### Het gieten van de platen.

Al de platen werden gegoten met een ongewijzigde instelling van de laagdikte op 0,25 mm. De suspensie werd opgemaakt door 60 g HF<sub>254</sub> (Merck) silanized silica gel te

suspenderen in een mengsel van 80 ml gedeïoniseerd water en 40 ml methanol p.a. (Merck). Er werd gedurende zowat één minuut krachtig geschud en deze operatie werd, telkens na een korte rustperiode, meerdere malen hernomen. Uiteindelijk werd aan de homogene suspensie nog 10 g van het silicagel toegevoegd en het schudden werd een paar maal herhaald. De bekomen dikvloeibare suspensie werd in het uitstrijkapparaat overgebracht, de platen werden gemaakt en aan de lucht gedroogd. Een te lang contact met het plaatmateriaal bemoeilijkt het verwijderen van de DYMO band(en), zodat deze na een korte droogperiode werden weggenomen. Na een nacht drogen aan de lucht werden de platen in een desiccator opgeslagen.

#### De scheiding.

Een te gebruiken plaat werd eerst op 120 °C geactiveerd gedurende 1 uur. De plaat werd vervolgens in een desiccator afgekoeld tot op kamertemperatuur. De testoplossingen werden gemaakt door 100 mg van een ester van het para-hydroxybenzoezuur in 100 ml methanol pa (Merck) op te lossen. De methylester (Fluka), de ethylester (Fluka), de propylester (Fluka) en de butylester (Fluka) werden gebruikt. Na afkoelen van de plaat werd langs drie zijden zowat één cm materiaal zorgvuldig verwijderd. De plaat werd in de spotmal geplaatst en met behulp van een scherp gepunt potlood werd de eindstreep voorzichtig aangeduid, de plaat werd over 180° gedraaid en de testoplossingen werden met een drummondpipet van 1 microliter aangebracht. Na het indrogen van de testoplossing werd de plaat als rugzijde van een sandwichkamer gemonteerd en het geheel werd in de solventtrog geschoven. Bij de hier beschreven experimenten werden twee solventsysteem gebruikt. In beide gevallen werd aan 90 ml van een boraatbuffer met pH 11 (Merck Titrisol) 10 ml van een organisch solvent toegevoegd. Een serie waarnemingen werd verricht met behulp van methylcellosolve (Merck), een tweede met behulp van het tetrahydrofuraan (Merck). De proef werd afgebroken wanneer het front de aangebrachte merkstreep bereikte. De tijd die hiervoor nodig was werd genoteerd. De plaat werd losgemaakt en gedroogd met behulp van een warme luchtstroom. Ze werd vervolgens onder een UV lamp bekeken en met behulp van een potlood werd de omtrek van de vlekken aangeduid. Uiteindelijk werden zowel de frontals de startlijn en de grenzen van de vlekken zo goed mogelijk aangegeven door met behulp van een scherp gepunt potlood het plaatmateriaal tot op het glas weg te schrappen.

#### Het verrichten van de metingen.

Om de meetproblemen, die een gevolg waren van de zachte en gemakkelijk te beschadigen plaatoppervlakte, te omzeilen en een permanente afbeelding van de platen te bekomen, werd een scanner van het cameratype gebruikt (DS3000 Chinon). De voorbereide plaat werd op een donker vel papier geplaatst en het geheel werd ingelezen op een diskette. Naderhand werd de figuur op ware grootte op papier afgedrukt. Overigens was het mogelijk om op de afbeelding referentielijnen aan te brengen, zodat het bepalen van de diverse afstanden naderhand gemakkelijker verliep. Het is zelfs mogelijk om op het scherm de nodige gegevens via de positie van de cursor af te lezen. Een afbeelding van de plaat en de op de plaat aangebrachte informatie en meetlijnen is weergegeven in figuur 1.

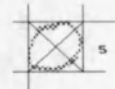
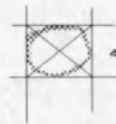
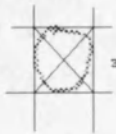
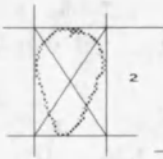
#### De looprichting.

Bij platen met een gelijkmatige laagdikte speelt de looprichting van het solvent allicht

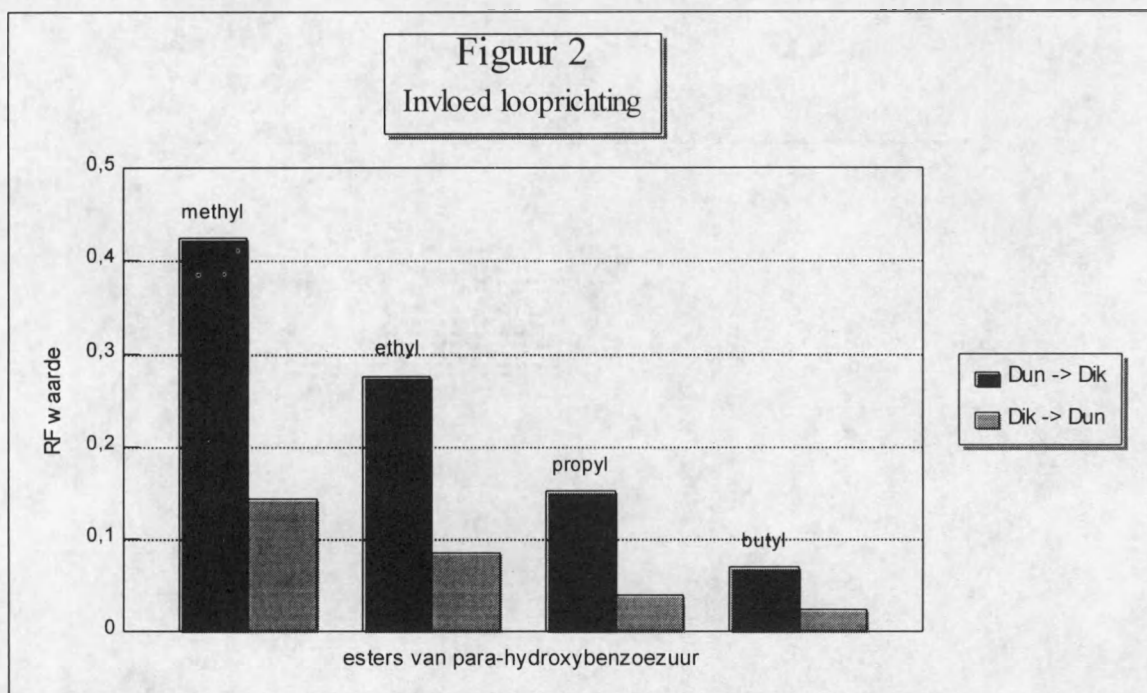
# Figuur 1

afbeelding van plaat

silanized silicagel HM  
1 microliter  
3 gr / 100 ml methanol  
buffer pH 11 + tetrahydrofuran (90/10)  
looptijd 1 h 30'  
//  
1993-03-16  
DLCAG01 & DLCAG01B  
1. p-hydroxy-benzoesuur  
2. p-hydroxy-benzoesure methylester  
3. p-hydroxy-benzoesure ethylester  
4. p-hydroxy-benzoesure propylester  
5. p-hydroxy-benzoesure butylester



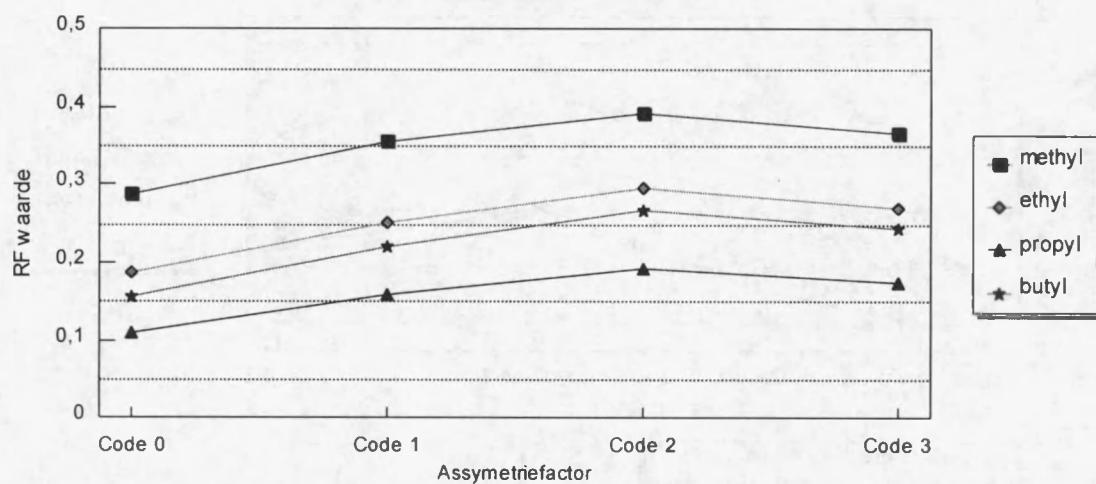
geen rol. Bij het gebruik van assymetrische platen verwacht men een verschil tussen een transport van "dun → dik" of van "dik → dun". Een kleine voorproef toonde aan dat de eerste looprichting te verkiezen viel. De resultaten van deze test zijn in figuur 2 samengevat.



### De resultaten.

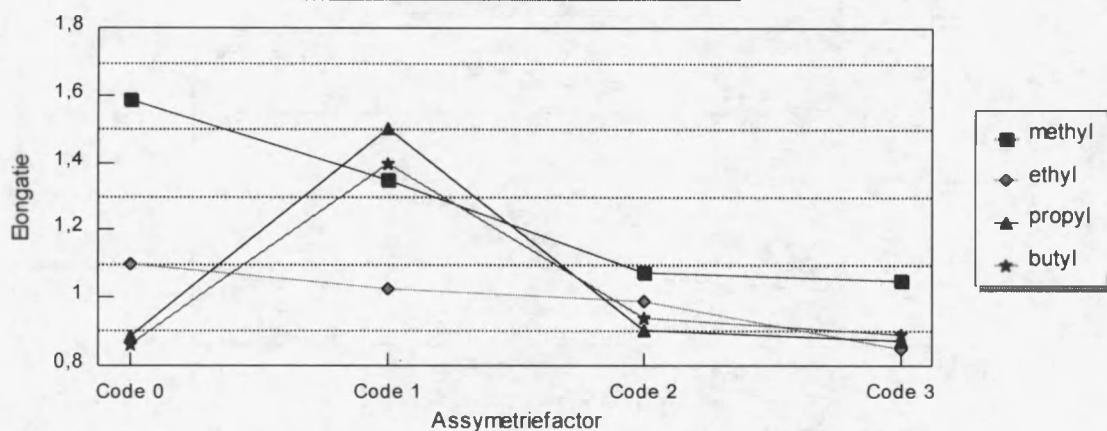
De impact van de assymetriefactor op de bekomen scheiding werd voor twee solventsysteemen onderzocht. De omvangrijkste reeks steunt op het gebruik van het tetrahydrofuraan bevattende loopmiddel. In het totaal werden 45 platen gebruikt. Hiervan behoorden er 13 tot de assymetriegroep 0, 12 tot de groep 1, 13 tot de groep 2 en 6 tot de groep 3. Nadat een kopie op papier vervaardigd was werden de nodige metingen verricht en aan de hand hiervan werden een reeks parameters bepaald, met name de RF-waarde, de lengte en de breedte van de vlek, de verhouding tussen beide of de elongatie, als een maatstaf voor de vorm van de vlek en de afstand tussen de ondergrens van de ene vlek en de bovenste grens van de "volgende" vlek als een maatstaf voor het scheidend vermogen. De gemiddelde resultaten van de invloed van de assymetriefactor op de RF-waarde werden samengevat in figuur 3, deze met betrekking tot de eventuele invloed van de assymetriefactor op de vorm van de vlek werden samengevat in figuur 4 en deze in verband met het scheidend vermogen zijn opgenomen in figuur 5. In een tweede serie experimenten werd gewerkt met het boraatbuffer/methylcellosolve systeem. In het totaal werden 21 platen gebruikt. Hiervan behoorden er 5 tot de assymetriegroep 0, 5 tot de groep 1, 6 tot de groep 2 en 5 tot de groep 3. De grafische weergave van de gemiddelde resultaten met betrekking tot de invloed van de assymetriefactor op de RF-waarde, de vorm van de vlek en de scheiding tussen de vlekken gebeurde in de figuren 6, 7 en 8.

**Figuur 3**  
Invloed op RF-waarde



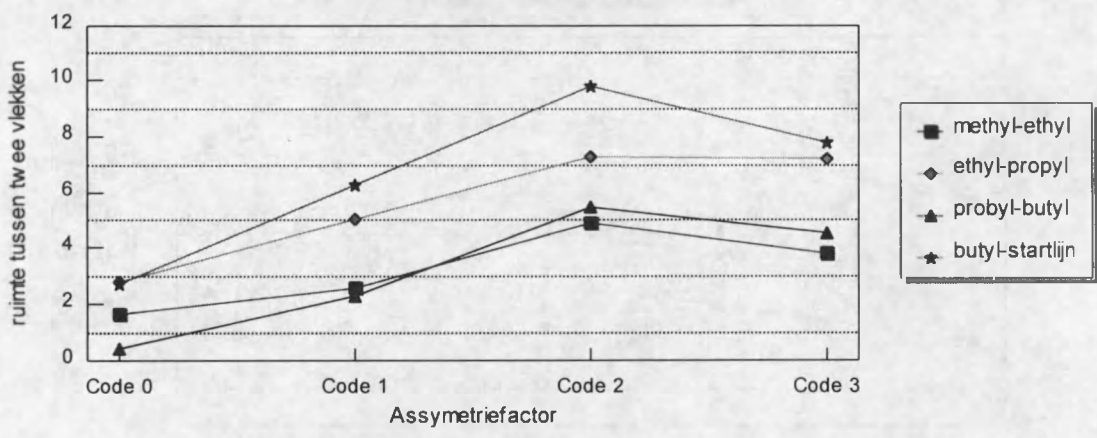
boraatbuffer/tetrahydrofuraan  
esters van het para-hydroxybenzoezuur

**Figuur 4**  
Invloed op de vorm van de vlek



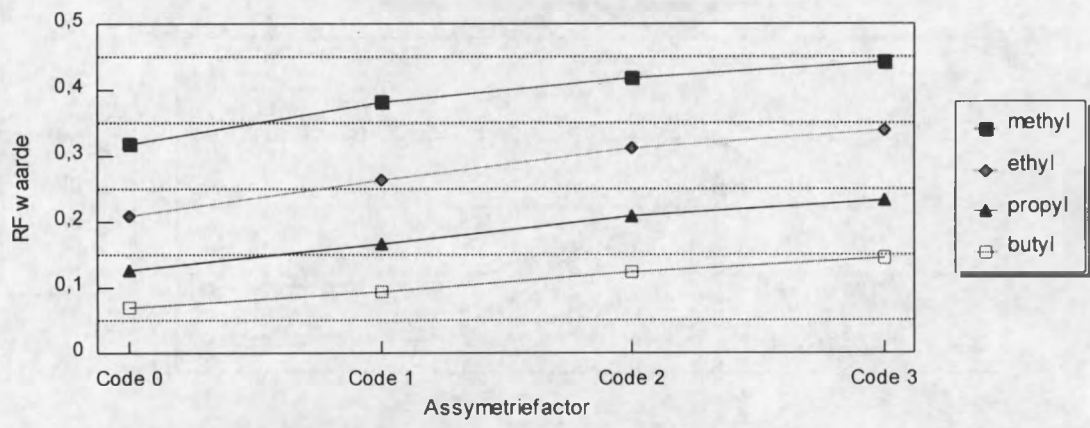
boraatbuffer/tetrahydrofuraan  
esters van het para-hydroxybenzoezuur

**Figuur 5**  
Invloed op scheiding



boraatbuffer/tetrahydrofuraan  
esters van het para-hydroxybenzoezuur

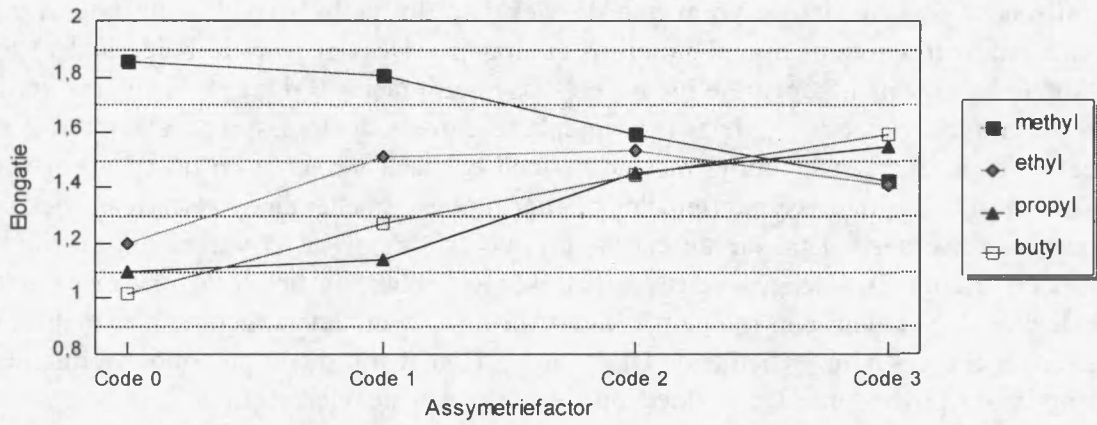
**Figuur 6**  
Invloed op de RF-waarde



boraatbuffer/methylcellosolve  
esters van het para-hydroxybenzoezuur

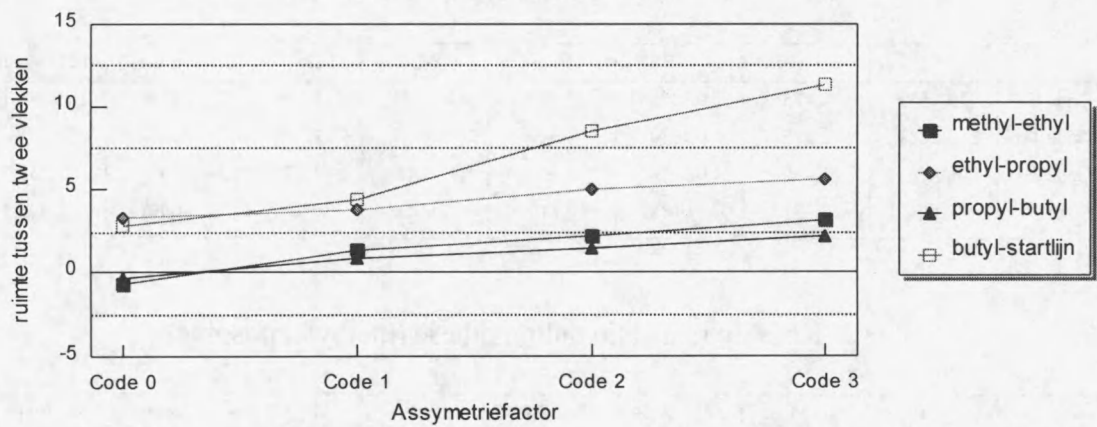


**Figuur 7**  
Invloed op de vorm van de vlek



boraatbuffer/methylcellosolve  
esters van het para-hydroxybenzoezuur

**Figuur 8**  
Invloed op de scheiding



boraatbuffer/methylcellosolve  
esters van het para-hydroxybenzoezuur

## Discussie.

Uit figuur 3 volgt dat voor het solventsysteem op basis van het tetrahydrofuraan voor ieder van de esters de RF-waarde bij een assymetriefactor 2 door een optimum gaat. De invloed van de assymetriefactor op de vorm van de vlek is niet zo eenduidig. Wel volgt uit de grafische weergave dat de vorm van de vlek van de methyl- en de ethylester van een verticale naar een enigszins afgeplatte ellips evolueren. De vlek van de beide andere esters gaat van een enigszins afgeplatte elips bij een assymetriefactor 0 door een enigszins verticaal gestrekte, assymetriefactor 1, naar een afgeplatte elips voor de assymetriefactoren 2 en 3. Geheel en al in overeenstemming met de invloed op de RF-waarde en op de vorm van de vlekken wordt bij de assymetriefactor 2 het hoogste scheidend vermogen bekomen. Daarenboven evolueert de separatie van de propyl- en de butylester van slecht tot duidelijk gescheiden (figuur 5). De gegevens die betrekking hebben op het solventsysteem met het methylcellosolve tonen een enigszins ander beeld. Een toenemende assymetriefactor resulteert in een gestadig toenemende RF-waarde. Hier wordt dus in het onderzochte gebied geen optimum gevonden. De invloed op de vorm van de vlek, figuur 7, is ook voor dit systeem complex. Terwijl voor de methylester de verticale as krimpt, maar groter blijft dan de horizontale as, neemt de lengte van deze as in vergelijking tot de lengte van de horizontale as toe voor de propyl- en butylester. Bij de ethylester lijkt deze verhouding eerder een zwak optimum te vertonen. De vorm van de vlek wordt dus alleen bij de methylester gunstig beïnvloed. Niettemin evolueert de scheiding voor alle esters naar beter bij een toenemende assymetrie. Voor de scheiding methyl-ethyl en propyl-butyl wordt bij de platen met een gelijkmatige dikte een slechte scheiding bekomen. De negatieve waarde van de weergegeven factor wijst immers op het in elkaar lopen van de vlekken. Inzake de al dan niet goede scheiding tussen twee spots vertellen de figuren 5 en 8 evenwel niet het gehele verhaal. Het ligt voor de hand dat dit mede afhankelijk is van de belasting en dat voor een gegeven hoeveelheid aangebracht materiaal de informatie op grond van een gemiddelde intervalswaarde voor de experimentele variabiliteit moet gekorrigeerd worden.

Tabel 1. Kans op realisatie nulhypothese (tetrahydrofuraan)

	M-E	SD M-E	E-P	SDE-P	P-B	SD P-B	B-start	SD B-start
Code 0	13,16%	1,485	0,41%	1,067	40,17%	1,700	2,36%	1,387
Code 1	13,28%	2,275	0,12%	1,649	19,93%	2,705	1,23%	2,781
Code 2	0,04%	1,459	0,00%	1,300	0,00%	1,077	0,00%	1,258
Code 3	0,00%	0,631	0,00%	0,419	0,00%	0,236	0,00%	1,426

Tabel 2. Kans op realisatie nulhypothese (methylcellosolve)

	M-E	SD M-E	E-P	SDE-P	P-B	SD P-B	B-start	SD B-start
Code 0	58,12%	3,1155	4,83%	2,0106	56,74%	1,7675	0,01%	0,7521
Code 1	0,00%	0,1855	0,84%	1,6067	34,80%	2,2525	0,31%	1,6129
Code 2	13,98%	2,0966	0,01%	1,2877	8,73%	1,1172	0,00%	0,8266
Code 3	0,00%	0,4707	0,00%	1,0028	4,00%	1,2448	0,00%	1,4274

Om dit beter te kunnen beoordelen werd vooropgezet dat in een willekeurig experiment het interval tussen de onderste zijde van de ene vlek en de bovenzijde van de "volgende" spot groter dan nul moest zijn. De kans dat de experimentele intervalswaarde niet wezenlijk verschillend is van NUL, de nulhypothese, kan dan worden geschat op grond van de populatiestandaardafwijking en de excentriciteit van deze waarde in de normale verdelingskurve. Deze gegevens werden in de tabellen 1 en 2 samengevat. De hoofding SD... duidt de populatiestandaardafwijking op het interval tussen de geciteerde vlekken (M: methyl, E: ethyl, P- propyl, B: butyl) aan. Voor het systeem met tetrahydrofuraan worden de gegevens uit de figuur 5 bevestigd. Tussen de propyl- en de butylester wordt slechts bij een assymetriefactor van 2 of 3 een goede scheiding bekomen, en dit geldt ook voor het methyl-/ethylester koppel. Verder blijken de gegevens uit tabel 2 aan te geven dat de beste scheiding voor de diverse esters bekomen wordt bij de hoogste assymetriefactor.

### **Besluiten.**

De uitgevoerde experimenten maken het duidelijk dat problemen bij een scheiding in een dunnelaag techniek eventueel omzeild kunnen worden met behulp van assymetrische platen. Het loont om enkele van deze platen te gieten en de invloed van deze factor op het scheidend vermogen van het systeem te onderzoeken. Hierdoor kan een, eventueel vruchteloze zoektocht en het aansluitend uittesten van een ander systeem worden voorkomen. Indien deze platen opgemaakt worden zonder bindmiddel kan het zachte oppervlak tot problemen leiden. Deze kunnen gemakkelijk vermeden worden door het inschakelen van een eenvoudige scanner en een PC.

### **Literatuur.**

R. Rangone and C. Ambrosio - J. Chromatog., 50 (1970)436-441.

