

Über physikalische Methoden im chemischen Laboratorium. XXIX*).

Die Chromatographische Analyse und ihre Anwendung.

Von Dr. GERHARD HESSE.

Chemisches Laboratorium der Universität München.

(Eingeg. 15. April 1936.)

Inhalt: Einleitung. — Ausführung der Trennung. — Die wichtigsten Erfolge der neuen Methode: 1. Präparative Trennungen; 2. Bestimmungsverfahren. — Leistungsfähigkeit und Grenzen. — Adsorptionsreihen. — Praktische Fragen.

Einleitung.

Neben den klassischen Methoden zur Trennung homogener Gemische, Destillation und Kristallisation, sind in den letzten Jahrzehnten zwei neue Prinzipien zu diesem Zweck viel benutzt worden: die Diffusion und die Adsorption an feste Körper. Die Diffusion sortiert die Moleküle nach ihrer Größe und Masse, aber nicht nach der chemischen Konstitution. Hieraus ergibt sich ihre Anwendung als bequemes Mittel, anorganische Ionen und alle niedrigmolekularen Stoffe bis etwa zum Molekulargewicht 300 hinauf von den größeren Molekülen abzutrennen.

Im Gegensatz dazu hängt die Adsorbierbarkeit in erster Linie von chemischen Eigentümlichkeiten ab. Adsorptionsmethoden sind also geeignet, Gemische nächstverwandter, sogar isomerer Verbindungen, aufzuteilen. Vor der Kristallisation haben sie voraus, daß sie auch auf sehr unreine und sehr verdünnte Lösungen anwendbar sind.

Zu Entfärbungszwecken sind Adsorptionsmittel schon lange im Gebrauch. Technisch spielen sie außerdem z. B. zur Regeneration von Schmierölen, Reinigung von Speisefetten und in der Gasmasken eine Rolle. Präparativ angewandt findet sich die Adsorption im fernen Osten schon in einem uralten empirischen Verfahren, der Darstellung von Chinagrin (1): in den Wurzelextrakt einer Rhamnuspflanze, die diesen Farbstoff enthält, werden Baumwolltücher eingelegt. Nach einiger Zeit nimmt man sie heraus und laugt sie mit frischem Wasser aus, das sich dabei grün anfärbt und nach dem Eintrocknen den Farbstoff hinterläßt. Ihre höchste Vollendung hat die präparative Adsorption in der Enzymchemie durch Willstätter und seine Schüler erfahren (2). Eine quantitative Ausgestaltung, besonders zur Wirkungsprüfung von Gerbstoffextrakten und Leimlösungen, gab ihr H. Wislicenus (3).

Wenigstens teilweise ein Adsorptionsverfahren ist die Capillaranalyse von Goppelsröder (4). Sie dient dazu, Farbstofflösungen auf ihre Einheitlichkeit zu prüfen. Man hängt Streifen von Filterpapier in die Lösung ein; dann werden verschiedene Substanzen von dem aufgesaugten Lösungsmittel verschieden weit mitgenommen, bis sie sich durch Verdunstung und Adsorption ausscheiden. Sie bilden dann übereinander angeordnete Zonen, die die Anwesenheit ebensovieler verschiedener Stoffe anzeigen. Die Methode eignet sich jedoch nur zur Diagnose, präparative Anwendung ist nicht möglich.

Gewissermaßen eine Kombination aller dieser Verfahren ist die „Chromatographische Analyse“ des russischen Botanikers M. Tswett (5). Sie diente ihm nur zur Trennung der verschiedenen Farbstoffe aus grünen Blättern und hat daher den Namen. Tswett selbst betont schon, daß sein Verfahren allgemein auch auf farblose Substanzen anwendbar sein müsse. Er verwendet pulverförmige Adsorptionsmittel, die er in senkrecht stehende Röhren einfüllt. Dann wird die Lösung hindurchfiltriert. Dabei werden zunächst diejenigen Stoffe festgehalten, die am kräftigsten adsorbiert

werden; sie verdrängen die anderen von der Oberfläche des Adsorptionsmittels und bilden die oberste Zone. Darunter schließen sich die anderen Molekülarten in der Reihenfolge ihrer „Adsorptionsaffinitäten“ an. Wenn die Lösung durchgelaufen ist, wird mit einem reinen Lösungsmittel nachgewaschen, „entwickelt“. Erst hierbei tritt eine saubere Trennung der Zonen ein: die adsorbierten Moleküle lösen sich wieder ab, treiben eine Zeitlang im Strom des Lösungsmittels und setzen sich, ihrer Eigenart entsprechend, früher oder später von neuem fest. Es ist also nicht eine fraktionierte Adsorption, die die Stoffe ordnet, sondern eine endlose Folge von spezifischen Adsorptionen und Elutionen. Das Ergebnis wird bei farbigen Stoffen in einer Anzahl von Farbringern, die durch farblose Zwischenräume voneinander getrennt sind, sichtbar (Chromatogramm). Zum Schluß zerteilt man die Säule mit der adsorbierten Substanz zwischen den Zonen und eluiert jeden Teil für sich.

Ausführung der Trennung.

Zur Aufnahme des Adsorptionsmittels dient ein zylindrisches Rohr aus Glas oder Uviolglas, das in einen Gooch-Vorstoß eingepaßt ist und unten durch eine lose eingelegte Siebplatte verschlossen wird. Über die Siebplatte kommt eine etwa 1 cm hohe Schicht Watte und darauf eine Scheibe Filterpapier. Der Vorstoß hat vorteilhaft einen Hahn, mit dem man das Durchlaufen unterbrechen kann. Oben ist auf das Rohr ein Tropftrichter aufgesetzt. Das Ganze steht auf einer Saugflasche (Abb. 1). Solche Rohre können bis zu 500 g Adsorptionsmittel aufnehmen. Für große Ansätze (mehrere Kilogramm) wird von Winterstein ein Rohr¹⁾ angegeben (6), das aus einem starkwandigen Zylinder besteht, der auf beiden Seiten offen ist und unten einen überstehenden Rand hat. Dieser ist auf einen Vorstoß mit auswechselbarer poröser Platte aufgeschliffen, und beide Teile werden mit einer Klemmvorrichtung zusammengehalten. Für Vorproben und Reinheitsprüfungen bewährt sich ein Gaseinleitungsrohr (Abb. 2) oder ein Mikrorohr nach Abb. 3 (beides natürliche Größe).

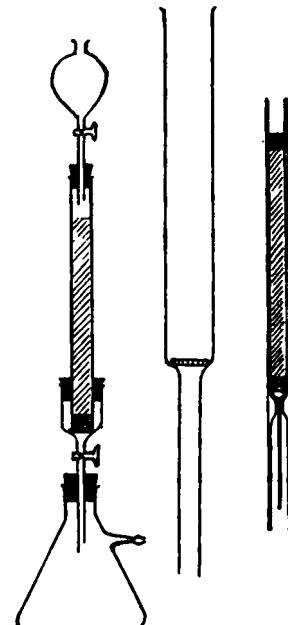


Abb. 1. Abb. 2. Abb. 3.
1) Firma L. Hormuth, Inhaber W. Vetter, Heidelberg.

* Aufsatz XXVIII dieser Reihe: G. Schmid, „Ultraschall u. chem. Forschung“, diese Ztschr. 49, 117 [1936].

Mercksche Präparat am meisten zu empfehlen. Sein Vorfäher war die Fasertonerde nach *W. Wislicenus*. Aber auch gewöhnliche gefällte Aluminiumoxyde kommen gelegentlich in Betracht (37), besonders wenn man nach dem Vorschlag von *Ruggli* mit Leitungswasser aktiviert (8, 9). Es würde sich lohnen, eine reproduzierbare Vorschrift für diese Salzaktivierung auszuarbeiten.

Viel benutzte basische Adsorptionsmittel sind: Calciumoxyd (10), Magnesiumoxyd (11), Calciumcarbonat (12, 17, 20, 23), lufttrockenes Calciumhydroxyd (10, 24, 26). Man verwendet meistens die gefällten oder gemahlenen Stoffe ohne besondere Aktivierung. Ein sehr aktives Magnesiumoxyd stellt die California Chemical Corporation, Newark, unter der Bezeichnung „mikron brand magnesium oxyde No. 2641“ her.

Sauren Charakter haben: Talk, Silicagel, Bleicherden (37). Die Bleicherden, z. B. Floridin XXF (13) (Hermann Bensmann, Bremen) oder Frankonit KL, haben eine vorzügliche Adsorptionsfähigkeit auch aus wäßrigen Lösungen. Sie sind noch sehr wenig erprobt. Bei basischen Stoffen macht die Elution mitunter Schwierigkeiten.

Für Sonderzwecke werden benutzt: Zucker für Chlorophyll (14) und Kohle für Kohlenhydrate (15), Glucoside (15) und Heteroauxin (12).

Auch Gemische mehrerer dieser Adsorptionsmittel sind schon benutzt worden (vgl. 16, 17, 31). Hierbei kann aber auch bei einheitlichen Stoffen eine Fraktionierung auftreten, weil die zwei Adsorbate sich verschieden verhalten (45). Zu Reinheitsprüfungen sollen deshalb nur einheitliche Adsorptionsmittel verwandt werden.

Welches Adsorptionsmittel in einem vorliegenden Fall geeignet ist, muß man durch Vorversuche ermitteln. Dabei ist besonders auf die Möglichkeit der Elution zu achten.

Wieviel Adsorptionsmittel ist nötig? Zur Übersicht dient folgende Tabelle, die angibt, wieviel Adsorptionsmittel in praktischen Versuchen nötig ist, um 1 g der genannten Substanz darzustellen bzw. zu reinigen:

Für 1 g Carotin	2000 g Fasertonerde
Für 1 g Lutein	5000 g Aluminiumoxyd
Für 1 g Chlorophyll	1000 g Zucker
Für 1 g Anthracen	50 g Aluminiumoxyd
Für 1 g Bufotalin	60 g Aluminiumoxyd
Für 1 g Cholesterin	20 g Aluminiumoxyd

Zum Füllen des Rohres werden verschiedene Verfahren empfohlen. Je nach den Eigenschaften des Adsorptionsmittels ist bald das eine, bald das andere empfehlenswerter. Wichtig ist in allen Fällen, daß der untere Abschluß der Säule eben ist und daß das Pulver gleichmäßig dicht liegt. Körnige Adsorptionsmittel, z. B. das Mercksche Aluminiumoxyd, füllt man am besten trocken ein unter Klopfen und Luftpuffern. Bei feinen Pulvern muß man feststampfen, damit nicht nachher Risse entstehen, die das Chromatogramm zerstören. Das Feststampfen erfordert große Übung; es muß schichtenweise und sehr gleichmäßig geschehen, sonst treten Verzerrungen der Ringe auf. Einheitliche Adsorptionsmittel füllt man nach dem Vorschlag von *Winterstein* (45) besser als Suspension ein, wobei man an der Wasserstrahlpumpe schwach saugt, aber die Säule nie trocken werden läßt. Hierbei tritt stets eine geringe Sortierung der Teilchen nach der Sinkgeschwindigkeit ein, also nach der Teilchengröße und -dichte. Da man aber mehrfach nachgießen muß, hat eine solche Säule Schichten verschiedenen Adsorptionsvermögens und kann dadurch Uneinheitlichkeit bei reinen Substanzen vortäuschen. Deshalb sollen zur Diagnose dienende Röhren nie auf diese Weise gefüllt werden. Stets soll man die Suspension möglichst dick machen, weil dann weniger Gelegenheit zur Entmischung besteht.

Wenn man Stoffe sehr verschiedener Adsorbierbarkeit zu trennen hat, ist es mitunter zweckmäßig, mehrere Adsorptionsmittel übereinander in das gleiche Rohr einzufüllen (*A. Winterstein*).

Vor der Zugabe der Substanz müssen trocken gefüllte Rohre mit dem Lösungsmittel durchfeuchtet werden. Gewöhnlich ist es notwendig, die Filtration durch Saugen an der Wasserstrahlpumpe zu unterstützen; dabei suche man mit möglichst geringem Unterdruck auszu kommen. Ehe alle Flüssigkeit eingezogen ist, gibt man aus dem aufgesetzten Tropftrichter die Lösung der Substanz zu. Während der Zugabe und der Entwicklung darf die Säule niemals trocken gesaugt werden, weil sonst leicht Risse entstehen. Wenn die Lösung annähernd ganz durchgeflossen ist, gießt man die Entwicklungsflüssigkeit nach.

Zum Entwickeln dient meistens das Lösungsmittel, in dem das Substanzgemisch gelöst war. Wenn die Trennung der Zonen zu langsam fortschreitet, setzt man etwas Elutionsmittel zu oder verwendet eine andere Flüssigkeit, aus der schwächer adsorbiert wird. Das Umgekehrte gilt bei zu rascher Dispersion der Zonen. Diese systematische Entwicklung setzt allerdings voraus, daß man den Vorgang verfolgen kann. Bei allen farbigen Substanzen ist dies ohne weiteres möglich. Viele farblose Substanzen, z. B. aromatische Kohlenwasserstoffe, kann man an ihrer Fluorescenz im ultravioletten Licht der Analysen-Quarzlampe erkennen; ein Adsorptionsrohr aus Uviolglas ist dazu meist gar nicht nötig. Man entwickelt so lange, bis sich die Zonen sauber voneinander trennen lassen.

Wo während der Entwicklung eine Kontrolle nicht möglich ist, unterbricht man nach Gutdünken, wenn das doppelte bis zehnfache Volumen der ursprünglichen Lösung an Entwicklungsflüssigkeit durchgelaufen ist. Sehr häufig ist es zweckmäßig, die Zonen nacheinander durchzuwaschen und jedesmal beim Auftreten einer neuen Fraktion die Saugflasche zu wechseln. Das Auftreten einer neuen Zone erkennt man gewöhnlich schon an der Entstehung von Schlieren in der Waschflasche.

Sobald die Entwicklung beendet ist, saugt man den Überschuß des Lösungsmittel ab, drückt die noch feuchte Säule mit einem breiten Stempel aus dem Rohr heraus und zerteilt zwischen den Zonen. Oder man saugt vollkommen trocken — nötigenfalls nach Nachwaschen mit einem flüchtigeren Lösungsmittel —, lockert schichtenweise mit einem Spatel und schüttet das aufgelockerte Adsorptionsmittel unter Drehen des Rohres heraus. Bei großen Röhren hebt man das Adsorptionsmittel mit einem kleinen Löffelchen heraus. Mikrorohre zerschneidet man zwischen den Schichten. Wenn die Zonen farblos und mit keinem der erwähnten Hilfsmittel zu erkennen sind, muß man beliebig unterteilen und die einzelnen Eluate getrennt untersuchen (adsorbierte Menge pro Gramm Adsorptionsmittel, Farbreaktionen, Drehung, biologische Wirksamkeit). *Winterstein* empfiehlt Zusatz von Indicatorfarbstoffen, die so gewählt sind, daß ihre Adsorbierbarkeit zwischen denen der aufeinanderfolgenden Fraktionen liegt. Dann gibt jeweils ein Farbring die Stelle an, an der die Säule zerteilt werden muß.

Bei allen präparativ ausgeführten Adsorptionen ist die Frage nach der Eluierbarkeit von größter Bedeutung. Für die Wahl des Elutionsmittels ist weniger wichtig, daß es den betreffenden Stoff leicht löst, als vielmehr, daß es vom Adsorptionsmittel stark adsorbiert wird und ihn von dessen Oberfläche verdrängt. Carotin zum Beispiel wird durch Alkohol, in dem es sehr schwer löslich ist, aus seinen Benzol- oder Petrolätherlösungen gefällt. Bei der Chromatographie wird es aus Petroläther stark adsorbiert, mit Alkohol oder alkoholhaltigem Petroläther aber leicht eluiert. Es genügt also häufig ein geringer

Zusatz eines solchen „Verdrängers“. Sehr wirksame Elutionsmittel sind: Wasser, Alkohole, Pyridin, Pyridinsäuregemisch (37), für Eiweißkörper auch ionenhaltige wässrige Lösungen (36).

Ein anderes Prinzip der Elution besteht darin, durch Salzbildung die Adsorbierbarkeit zu verringern. Basische Stoffe zum Beispiel, die aus neutraler Lösung sehr stark adsorbiert werden, liegen in saurer Lösung als Salze vor, also als ganz neue chemische Individuen mit geringerer Adsorbierbarkeit. Pufferlösungen mit verschiedenem pH sind ein wichtiges Hilfsmittel der Chromatographie besonders aus wässrigen Lösungen (*Koschara*) (37).

Gebrauchte Adsorptionsmittel sind gewöhnlich sehr wenig aktiv, weil die adsorbierenden Zentren noch vom Elutionsmittel besetzt sind. Vielfach gelingt durch Erhitzen auf 150—200° (evtl. im Vakuum) eine ausreichende Reaktivierung. Zur Regeneration und Verwertung gebrauchter Bleicherden vgl. (25).

Die wichtigsten Erfolge der neuen Methode.

1. Präparative Trennungen.

Die erste deutsche Veröffentlichung von *Tswett* erfolgte schon 1906 (5). Fünfundzwanzig Jahre lang wurde das Verfahren kaum beachtet, bis dann ab 1931 *R. Kuhn* (19), *P. Karrer* und *L. Zechmeister* mit ihren Schulen ihre großen Erfolge bei der Trennung von Carotinoiden bekanntmachten. Eine bequeme Trennung von α - und β -Carotin (10) war erreicht worden, das dritte Isomere γ -Carotin wurde gefunden und aus der tausendfachen Menge der beiden anderen herausgeholt (18). An Neuentdeckungen folgten aufeinander: Flavoxanthin (20), Kryptoxanthin (21), Rubixanthin (22), Capsorubin (23), Lycoxanthin und Lycopophyll (24), um nur die wichtigsten zu nennen. *Karrer* gelang die wirksamste Reinigung von Vitamin A durch Chromatographie an Calciumhydroxyd (26), und *Kuhn* konnte das Gemisch der Oxydationsprodukte des β -Carotins bzw. ihrer Oxime erfolgreich trennen und den Zusammenhang mit dem Azafrin herstellen (27). Die große Auswahl an reinen Carotinfarbstoffen mit bekannten Formeln lieferte dann Material zur Beantwortung der Frage, welche Gruppierungen wesentlich sind für ein Provitamin A.

Neben der präparativen Herausarbeitung neuer Stoffe erschienen bald auch Untersuchungen über Verbreitung und Vergesellschaftung von Carotinoiden; grundlegend hierfür ist der Trennungsgang von *Kuhn* und *Brockmann* (28). An Einzeluntersuchungen seien genannt: Analyse des Flügelpigments vom Kanarienvogel (29), der Pigmente in herbstlichen Blättern, vieler Beerenpigmente, Blüten- und Fruchtfarbstoffe.

Auch das Chlorophyll kann chromatographisch erfolgreich in seine beiden Komponenten zerlegt werden, wenn man an Zucker adsorbiert. An den meisten anderen Stoffen wird es chemisch verändert (14).

Aus dem Chrysen des Steinkohlenteers hat *Winterstein* den gelben Begleiter abgetrennt, ferner hat er die Synthese des krebsregenden 3,4-Benzpyrens durch Chromatographie des Rohproduktes an einem Aluminiumoxyd-Carbonaffin-Gemisch wesentlich verbessert (43). *Diels* hat das Gemisch der Kohlenwasserstoffe, das bei der Selendehydrierung des Cholesterins entsteht, neuerdings auch chromatographisch getrennt und einen neuen Stoff darin gefunden (32).

Auf dem Sterin- und Terpengebiet ist die Chromatographie noch wenig benutzt worden. Es ist gezeigt worden, daß man das Ergosterin aus rohem Cholesterin anreichern kann, und daß die Trennung von Oleanol und Oleanylen leicht gelingt (45). Ferner sind Krötengiftstoffe voneinander getrennt worden, vgl. (33). Geeignete Adsorptionsmittel sind Aluminiumoxyd nach *Brockmann*, Magnesiumoxyd und Bleicherden.

Köggl hat die isomeren Anthrachinonderivate Boletol und Isoboletol voneinander getrennt (34), und *Karrer* hat neuerdings Trennung und Reindarstellung von Anthocyanten durchgeführt (9).

Das Vitamin B₂, die Farbkomponente des „Gelben Atmungsferments“ von *Warburg*, ist von *R. Kuhn* chromato-

graphisch gereinigt worden (35); auch auf Uroflavin und Ovoflavin wurde das Verfahren mit großem Erfolg angewandt. Die Darstellung von Uroflavin durch *Koschara* (13) ist einer der wenigen Fälle, in denen bisher eine Bleicherde (Floridin XXF) zur Chromatographie eines Naturstoffs benutzt wurde. Es ist zu erwarten, daß dieses billige und wirksame Adsorptionsmittel besonders bei technischen Verfahren einmal eine große Rolle spielen wird.

Der Wuchsstoff Heterauxin, der im Pflanzenorganismus die Rolle eines Hormons spielt, ist von *Köggl* (12) durch Chromatographie an Calciumcarbonat gereinigt und dann als β -Indolylsuccinsäure erkannt worden.

Auch eine chromatographische Trennung von Enzymen liegt bereits vor; *Euler* hat Co-Zymase und Co-Dehydrase II an Aluminiumoxyd chromatographiert und mit Phosphatlösung eluiert (36).

Studien zur Trennung synthetischer Farbstoffe hat *Ruggli* angestellt (8).

Diese Zusammenstellung der präparativen Erfolge der chromatographischen Methode will nicht vollständig sein. Sie soll nur zeigen, wie ungeheuer vielseitig das Verfahren ist, und wie viele Probleme von höchster Bedeutung in den fünf Jahren seiner Anwendung damit schon gefördert worden sind.

2. Bestimmungsverfahren.

Von quantitativen Bestimmungsmethoden, die die Chromatographie benutzen, wurde die Mikromethode von *Kuhn* und *Brockmann* schon erwähnt. Sie dient zur Trennung und Bestimmung von Carotinoiden und beruht darauf, daß das Farbstoffgemisch zuerst durch Lösungsmittel in die drei Gruppen der Kohlenwasserstoffe, der Alkohole und der Ester zerlegt wird. Jede Gruppe wird für sich chromatographisch aufgeteilt und die einzelnen Farbstoffe nach der Elution colorimetrisch bestimmt. Es genügen noch Farbstoffmengen von 0,001—0,01 mg, wie sie etwa in einem einzigen Blütenblatt vorkommen (28). *Winterstein* und *Stein* haben ein Verfahren zur quantitativen Mikrobestimmung der Chlorophyllkomponenten ausgearbeitet (14).

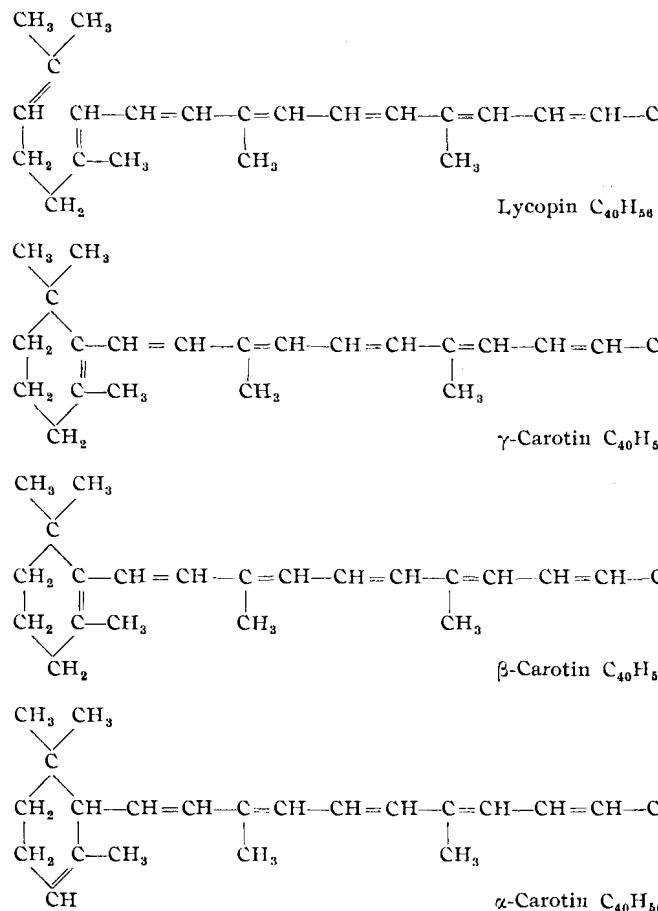
Zur Diagnose der Zusammensetzung oder Einheitlichkeit von Stoffen tritt die Chromatographie jetzt an die Stelle der Capillaranalyse, der sie weit überlegen ist, wenn man die erwähnten Vorsichtsmaßregeln beachtet. Bei allen vorhin aufgeführten Isolierungen ist zum Schluß die Reinheit des Stoffes chromatographisch kontrolliert worden. Aber auch rohe Pflanzenauszüge können verglichen, ihre Herkunft aus dem oft sehr charakteristischen Chromatogramm erkannt und Verfälschungen festgestellt werden. Meistens fehlt noch eine ausgearbeitete Methode. Für Gerbstoffextrakte hat *Graßmann* (38) das Problem mit großem Erfolg in Angriff genommen. Auch hierbei ist die Analysenquarzlampe wertvoll.

Wenn man adsorbierte Farbstoffe spektroskopisch charakterisieren will, muß man beachten, daß das Spektrum im Adsorbat meistens ein anderes ist als in Lösung. Es kommt auch vor, daß Stoffe im Adsorbat fluorescieren, die es in reiner Form nicht tun.

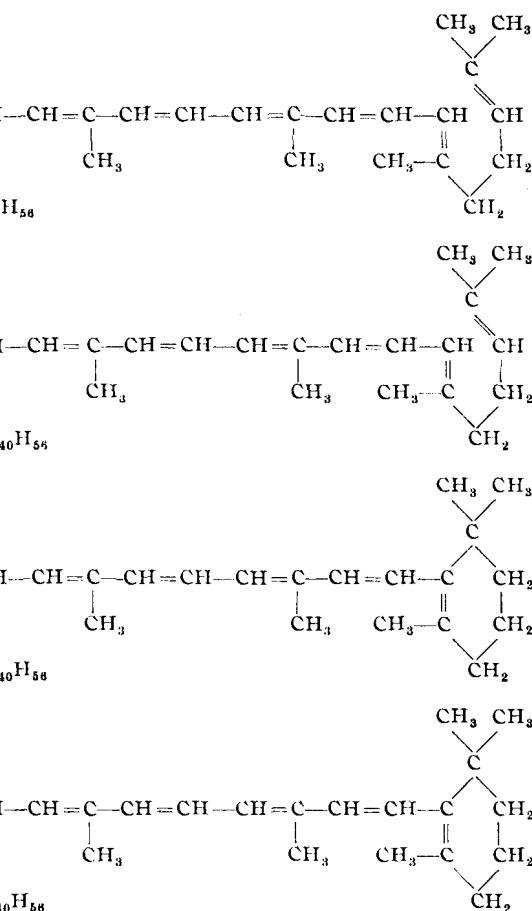
Leistungsfähigkeit und Grenzen.

Es wurde schon mehrfach betont, daß die chromatographische Adsorption mit nachfolgender Entwicklung noch auf sehr geringe Unterschiede in der chemischen Konstitution anspricht; dafür sollen jetzt einige Belege gebracht werden. Selbstverständlich gelingt die Trennung von stärker unterschiedenen Stoffen noch viel leichter, und ich halte es für unnötig, Beispiele dafür eigens aufzuführen. Aus praktischen Gründen empfiehlt es sich meistens, Gemische sehr verschiedenartiger Stoffe erst

nach den bisherigen Methoden in Fraktionen zu zerteilen, die dann an verschiedenen Adsorptionsmitteln getrennt chromatographiert werden.



Das schönste Beispiel für die Konstitutionsspezifität der Chromatographie ist wohl immer noch die Trennung der 4 isomeren Farbstoffe der Gonocaryumfrucht (39):



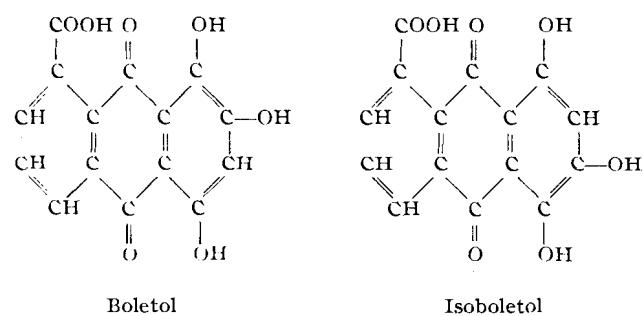
Der Petrolätherauszug der getrockneten Droge wird scharf getrocknet und durch eine Säule von Aluminiumoxyd (standardisiert nach Brockmann, Merck) filtriert. Nach dem Entwickeln mit dem achtfachen Volumen Benzin bilden sich 4 Schichten, die von oben nach unten aus Lycopin, γ -Carotin, β -Carotin und α -Carotin bestehen und deren Elution die annähernd reinen Farbstoffe liefert. α - und β -Carotin unterscheiden sich nur durch die Stellung einer Doppelbindung, γ -Carotin hat eine Doppelbindung mehr und einen Ring weniger, Lycopin hat zwei Doppelbindungen mehr als β -Carotin, aber gar keinen Ring!

Durch Chromatographie an dem gleichen Aluminiumoxyd gelingt auch die Trennung der nebenstehenden beiden aromatischen Kohlenwasserstoffe,

I II

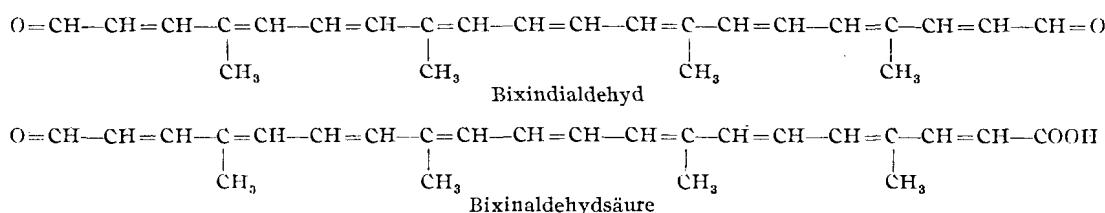
die nicht nur isomer, sondern auch in der ganzen Molekülform überaus ähnlich sind (40); II geht zuerst in das Filtrat.

Ebenso überraschend ist die leichte Trennung von Boletol und Isoboletol (34), die sich nur durch die Stellung einer Hydroxylgruppe unterscheiden:



Cis- und trans-Crocetindimethylester lassen sich ebenfalls chromatographisch trennen.

Dagegen ist die Trennung von Bixindialdehyd und Bixinaldehydsäure bisher nicht gelungen (42):



Carbonyl- und Säuregruppe, der einzige Unterschied zwischen beiden Verbindungen, sind sich in ihrem Beitrag zur Adsorptionsaffinität (an neutralem Adsorbens!) zu ähnlich; erst nach Umsatz mit Hydroxylanin, mit dem

die Säuregruppe nicht reagiert, entstehen zwei trennbare Verbindungen.

Ein weiteres Beispiel, wo eine Reinigung nicht gelang, ist das rohe Picen des Steinkohlenteers.

Einen Fall, daß eine einheitliche Substanz verschiedene Zonen gab, beschreibt *Karrer* bei dem Anthocyan der Päonienblüten (9).

Lehrreich ist noch eine Beobachtung *Kuhns* am β -Oxy-carotinon (44). Nach der Chromatographie an Aluminiumoxyd schien dieses Oxydationsprodukt des β -Carotins vollkommen einheitlich zu sein. Die eluierte Substanz gab dennoch bei der Chromatographie an Calciumcarbonat zwei getrennte Zonen, denen zwei verschiedene Substanzen entsprachen. Bei der chromatographischen Reinigung ist also der Wechsel des Adsorptionsmittels ebenso angebracht, wie beim Umkristallisieren der Wechsel des Lösungsmittels üblich ist.

Adsorptionsreihen.

Für ein bestimmtes Lösungs- und Adsorptionsmittel kann man verschiedene Stoffe nach der Stärke ihrer Adsorbierbarkeit (Adsorptionsaffinität) in einer Reihe anordnen. Diese gibt zunächst einmal die Reihenfolge im Chromatogramm an: der Stoff, der am stärksten adsorbiert wird, bildet die oberste Zone usw. Allgemeines Interesse verdienen solche Reihen, wenn sie ähnlich gebaute Stoffe von bekannter Konstitution umfassen. Dann kann man nämlich abschätzen, welchen Beitrag bestimmte Gruppierungen zur Adsorbierbarkeit liefern, und kommt damit zu wertvollen Regeln für die Auswahl der Adsorptionsmittel. Die Adsorptionsreihe der wichtigsten Carotinoidfarbstoffe ist nach *Winterstein* (7, 45) folgende:

am stärksten adsorbiert:	Fucoxanthin Violaxanthin Taraxanthin Flavoxanthin Zeaxanthin Lutein Rhodoxanthin Physalien Helenien Jycopin γ -Carotin β -Carotin α -Carotin	$C_{40}H_{56}O_6$ $C_{40}H_{56}O_4$ $C_{40}H_{56}O_4$ $C_{40}H_{56}O_3$ $C_{40}H_{56}O_2$ $C_{40}H_{56}O_2$ $C_{40}H_{56}O_2$ $C_{72}H_{116}O_4$ $C_{72}H_{116}O_4$ $C_{40}H_{56}$ $C_{40}H_{56}$ $C_{40}H_{56}$	Alkohole	$CaCO_3$
Reihenfolge in der Säule				
am schwächsten adsorbiert:			Keton	Al_2O_3
Adsorbierbarkeit			Ester	
			Kohlen- wasser- stoffe	

Das Lösungsmittel ist in allen Fällen Benzin. Als Adsorptionsmittel hat bei den Alkoholen Calciumcarbonat gedient, weil ihre Adsorption an Aluminiumoxyd so stark ist, daß an ihm nur durch sehr langes Entwickeln eine Trennung zu erreichen wäre; die Reihenfolge würde aber dieselbe sein. Die Kohlenwasserstoffe dagegen werden von Calciumcarbonat so wenig festgehalten, daß man riesige Säulen brauchen würde: hier verwendet man besser aktiviertes Aluminiumoxyd.

Man sieht, daß die Alkoholgruppe ($-OH$) die Adsorption sehr stark erhöht, stärker als die Ketogruppe ($C=O$). Veresterung hebt diesen Einfluß auf und macht die Verbindungen kohlenwasserstoffähnlich. Unter den vier isomeren Kohlenwasserstoffen (ausführliche Formeln siehe S. 318) wird das Lycopin mit 13 Doppelbindungen am stärksten adsorbiert, dann folgt das γ -Carotin mit 12 Doppelbindungen, dann erst die beiden anderen Carotinkomponenten mit je 11 Doppelbindungen.

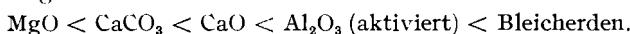
Faßt man diese Beobachtungen mit anderen über den Einfluß der Molekülgröße zusammen, dann ergibt sich, daß ein Stoff um so stärker adsorbiert wird,

je mehr polare Gruppen vorhanden sind (OH , CO , $COOH$, NH_2),

je ungesättigter das Molekül ist,
je höher das Molekulargewicht ist.

Im gleichen Sinne steigt auch die Zersetzung an und macht Destillationen bald unmöglich. Die Chromatographie fängt gerade da an, gut zu arbeiten, wo die Destillierbarkeit aufhört.

Was den Einfluß des Adsorptionsmittels betrifft, so hängt die Reihenfolge der Carotinoide nur wenig, die absolute Adsorbierbarkeit dagegen sehr stark davon ab. Ähnliches wird für alle neutralen Verbindungen gelten, während saure oder basische Stoffe wahrscheinlich starke Umstellungen erfahren werden, wenn man etwa von einem neutralen zu einem sauren Adsorptionsmittel übergeht. Das gleiche gilt für verschiedene p_H des Lösungsmittels (37). Die Adsorptionskraft für neutrale Stoffe steigt ungefähr in folgender Reihe an:



Praktische Fragen.

Die größten Schwierigkeiten, die dem chromatographischen Verfahren im Wege stehen, sind der große Bedarf an Adsorptionsmitteln und deren hoher Preis. Die früher mitgeteilte Tabelle zeigt, daß man mit der zehn- bis tausendfachen Menge rechnen muß, bezogen auf die gewonnene Substanzmenge. Für wissenschaftliche Untersuchungen wird das durch die großen Vorteile des Verfahrens aufgewogen: ist es doch bei den Carotinoiden längst herrschend geworden, obgleich gerade da das Umsatzverhältnis besonders ungünstig ist! Es ist daher zu erwarten, daß es bald bei allen präparativen Untersuchungen gleichberechtigt neben der Destillation und der Kristallisation angewandt werden wird.

Die technische Anwendung wird sich im wesentlichen auf Reinheits- und Herkunftsprüfungen beschränken. Zur Darstellung wertvoller Arzneimittel und dergleichen kommt die Chromatographie natürlich in Frage. Grundbedingung ist aber die Schaffung billiger Adsorptionsmittel, die mit Ausnahme der Bleicherden bisher nicht vorhanden sind. Hier sind noch große Fortschritte zu erwarten. Wichtig ist ferner, daß es gelingt, die gebrauchten Adsorptionsmittel zu regenerieren.

Vielfach werden Bedenken geäußert, ob es möglich ist, die adsorbierten Substanzen unverändert wieder von ihrem Träger zu lösen. Daß dies fast immer auch bei den empfindlichsten Substanzen möglich ist, haben *Willstätters* Enzymarbeiten bewiesen. Daß es in einzelnen Fällen nicht gelingt und daß Veränderungen vorkommen können, soll nicht verschwiegen werden.

Die Einarbeitung in das Verfahren ist sehr einfach²⁾.

Schrifttum.

- (1) *H. Rupe*, Chemie d. natürl. Farbstoffe, S. 276, Braunschweig 1900. — (2) Vgl. *R. Willstätter*, Ber. dtsh. chem. Ges. **55**, 3601 [1922]. — (3) *H. Wislicenus*, diese Ztschr. **27**, III, 503 [1914]. — (4) *F. Goppelsröder*, Anregung zum Studium der Kapillaranalyse, Basel 1906; *H. Neugebauer*, Die Kapillar-Jumineszenzanalyse im pharmazeutischen Laboratorium, Leipzig 1933. — (5) *M. Tswett*, Ber. dtsh. bot. Ges. **24**, 234, 316, 384 [1906]; Biochem. Z. **5**, 9 [1907]; Ber. dtsh. chem. Ges. **41**, 1352 [1908], **43**, 3199 [1910], **44**, 1124 [1911]. — (6) *A. Winterstein* u. *K. Schön*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **230**, 143 (Abbildung) [1934]. — (7) *A. Winterstein* in *Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse*, Julius Springer, Wien 1933. — (8) *P. Ruggli* u. *P. Jensen*, Helv. chim. acta **XVIII**, 624 [1935]. — (9) *P. Karrer* u. *Strong*, ebenda **XIX**, 25 [1936]. — (10) *P. Karrer* u. *O. Walker*, ebenda **XVI**, 641 [1933]. — (11)

²⁾ Übungsbeispiele mit genauen Angaben findet man in den Aufsätzen von *Winterstein* (7, 45), in der 24. Auflage von *Gattermann-Wieland*, im „Biochemischen Praktikum“ von *Bertho* und *Graßmann*, in der „Einführung in die organisch-chemische Laboratoriumstechnik“ von *K. Bernhauer* und in vielen der angeführten Arbeiten.

H. H. Strain, J. biol. Chemistry **105**, 523 [1935]. — (12) F. Kögl u. Mitarbeiter, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **228**, 101 [1934]. — (13) W. Koschka, Ber. dtsch. chem. Ges. **67**, 761 [1934]; Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **229**, 103 [1934]. — (14) A. Winterstein u. G. Stein, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **220**, 263 [1933]. — (15) Hayashi, Chem. Ztrbl. **1933**, I, 2926; Schwz. Pat. 125334; Chem. Ztrbl. **1928**, II, 1797. — (16) H. Brockmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **221**, 127 [1933]. — (17) L. Zechmeister u. P. Tuzson, Ber. dtsch. chem. Ges. **67**, 170 [1934]. — (18) R. Kuhn u. H. Brockmann, ebenda **66**, 6, 407 [1933]. — (19) R. Kuhn, A. Winterstein u. E. Lederer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **197**, 141 [1931]. — (20) R. Kuhn u. H. Brockmann, ebenda **213**, 192 [1932]. — (21) R. Kuhn u. Ch. Grundmann, Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 1746 [1933]. — (22) R. Kuhn u. Ch. Grundmann, ebenda **67**, 339 [1934]. — (23) L. Zechmeister u. L. v. Cholnoky, Liebigs Ann. Chem. **509**, 269 [1934]. — (24) L. Zechmeister u. L. v. Cholnoky, Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 422 [1936]. — (25) O. Eckart, Chemiker-Ztg. **60**, 153 [1936]. — (26) P. Karrer u. O. Walker, Helv. chim. Acta **XVI**, 625 [1933]. — (27) R. Kuhn u. H. Brockmann, Liebigs Ann. Chem. **516**, 95 [1935]. — (28) R. Kuhn

u. H. Brockmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **206**, 41 [1932]. — (29) H. Brockmann u. O. Völker, ebenda **224**, 193 [1934]. — (30) P. Karrer u. O. Walker, Helv. chim. Acta **XVII**, 43 [1934]. — (31) A. Winterstein u. Mitarbeiter, Ber. dtsch. chem. Ges. **68**, 1079 [1935]. — (32) O. Diels u. H. F. Rickert, ebenda **68**, 267 [1935]. — (33) R. Tschesche u. H. A. Offe, ebenda **68**, 1998 [1935]. — (34) F. Kögl u. W. B. Deijns, Liebigs Ann. Chem. **515**, 32 [1935]. — (35) R. Kuhn u. H. Kaltischnitt, Ber. dtsch. chem. Ges. **68**, 128 [1935]. — (36) H. v. Euler u. E. Adler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **238**, 246 [1936]. — (37) W. Koschka, ebenda **239**, 89 [1936]. — (38) W. Graßmann u. O. Lang, Collegium **1935**, 114; W. Graßmann, ebenda **1935**, 401. — (39) A. Winterstein, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **215**, 51 [1932]. — (40) A. Winterstein u. K. Schön, ebenda **230**, 152 [1934]. — (41) R. Kuhn u. A. Winterstein, Ber. dtsch. chem. Ges. **64**, 326 [1931]. — (42) R. Kuhn u. Ch. Grundmann, ebenda **65**, 1880 [1932]. — (43) A. Winterstein u. Mitarbeiter, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **230**, 163 [1934]. — (44) R. Kuhn u. H. Brockmann, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 894 [1932]. — (45) A. Winterstein u. G. Stein, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **220**, 247 [1933].

[A. 41]

VERSAMMLUNGSBERICHTE

Tagung der Südwestdeutschen Chemiedozenten.

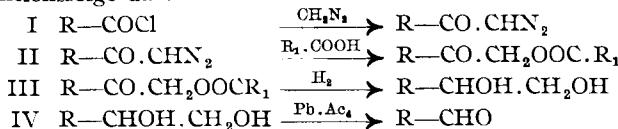
Darmstadt, vom 24.—26. April 1936.

Freitag, den 24. April 1936, 15 Uhr.

Vorsitzender: Staudinger.

Ch. Grundmann, Heidelberg: „Über ein neues Verfahren zur Überführung von Carbonsäuren in Aldehyde.“

Aus Säurechloriden (R.COCl) und überschüssigem Diazomethan entstehen, wie F. Arndt gezeigt hat, fast ausschließlich Diazoketone der allgemeinen Formel (R.CO.CH₂). Diese verlieren bei der Einwirkung wasserfreier organischer Säuren Stickstoff und gehen dabei in die Ester von 1,2-Ketoalkoholen (R.CO.CH₂OOCR₁) über. Durch Reduktion mit Aluminium- oder Magnesiumalkoholaten nach Meerwein und Ponndorf geben diese unter Verlust der Acylgruppe (durch Umesterung) direkt die entsprechenden 1,2-Glykole (R.CHOH.CH₂OH). Die Spaltung der Glykole mit Bleitetraacetat liefert schließlich die Aldehyde (R.CHO). Das nachstehende Schema stellt die Reaktionsfolge dar:



Das Verfahren empfiehlt sich zur Darstellung von auf anderen Wegen schwer zugänglichen Aldehyden, zumal die Ausbeuten in allen Stufen durchweg befriedigend sind, so daß man die Aldehyde in vielen Fällen in einer Ausbeute von 60—70 %, auf das angewandte Säurechlorid berechnet, erhalten kann. Nicht darstellbar sind nach dieser Methode α - β -ungesättigte Aldehyde; in diesem Falle lagert die Doppelbindung bei der Darstellung des Diazoketons gleichzeitig Diazomethan unter Bildung von Pyrazolinen an. Nach diesem Verfahren wurden bisher dargestellt aus den entsprechenden Carbonsäuren: Benzaldehyd, Stearinaldehyd, Oleylaldehyd, Elaidylaldehyd, Undecenaldehyd, β -Hexenaldehyd und Dihydro-mucondialdehyd.

S. Skraup, Würzburg: „Zur biologischen Bedeutung der ungesättigten Fettsäuren.“

Referat fehlt.

G. Rienäcker, Freiburg i. Br.: „Katalytische Studien an Legierungen“ (gemeinsam mit W. Dietz und G. Wessing).

Als Beispiel einer Zerfallsreaktion an einfachen Mehrstoff-katalysatoren wurde der Zerfall des Ameisensäuredampfes an Silber-Kupfer-, Silber-Gold-, Kupfer-Gold- und Kupfer-Palladium-Legierungen untersucht. Die Metalle lagen in kompakter Form (Draht oder Blech) vor.

In dem eutektisch erstarrenden System Silber-Kupfer sind die gemessenen Aktivitäten des Zerfalls an Legierungen größtenteils gleich denen an reinen Metallen. Die Aktivierungsenergien ändern sich jedoch sehr stark: bei Legierungen, die aus überschüssigem Kupfer, eingebettet in Eutektikum, bestehen, wurde starke Erniedrigung der Aktivierungsenergie (bis 17,3 kcal), also Verstärkung, beobachtet, dagegen bei Silberüberschuß und beim Eutektikum selbst starke Abschwächung (bis 27,7 kcal). In der Mischkristallreihe Silber-Gold liegen Aktivitäten und Aktivierungsenergien im wesentlichen zwischen denen der Komponenten, es herrscht also additives Verhalten. In der Mischkristallreihe Kupfer-Gold liegt bei ungeordneter Atomverteilung eine Verstärkung vor: Die Aktivierungsenergie des Kupfers (rund 24 kcal) bleibt auch trotz Beimischung des Goldes (29 kcal) erhalten, die Aktivitäten übersteigen die des Kupfers. Die Legierung Cu₃Au mit geordneter Atomverteilung unterscheidet sich in katalytischer Hinsicht von Cu₃Au ungeordnet: Die Aktivierungsenergie ist gegenüber der ungeordneten Legierung stark erniedrigt (21,3 kcal), die geordnete Phase ist demnach ein Katalysator höherer Wirksamkeit. Änderungen des Feinbaus beeinflussen also die katalytischen Eigenschaften. Ähnliche, noch stärkere Effekte wurden auch an Kupfer-Palladium-Legierungen beobachtet.

Die Ergebnisse der Messungen werden im Zusammenhang mit anderen Eigenschaften der Legierungen besprochen.

Vorsitzender: Kränlein.

A. Simon, Dresden: „Über Konstitutionsfragen bei den Säuren des Phosphors.“

Angesichts der großen Bedeutung der Herstellung und Kenntnis der Konstitution der Phosphorsäuren und deren Salze, vor allem für keramische Probleme, haben wir Methoden zur Reindarstellung der Glieder der homologen Reihe H₃PO₄, H₃PO₃, H₃PO₂, PH₃O und PH₄⁺ bzw. deren Salze ausgearbeitet und mit Hilfe der Schwingungsspektren näher zu untersuchen begonnen. Die Ergebnisse liegen vor für die ersten 3 Glieder dieser Reihe und für die entsprechenden Salze. Entgegen der bisherigen Ansicht ergibt sich einwandfrei, daß H₃PO₄ auch 100 %ig in der aci-Form (keine H₂O- oder OH-Bande) vorliegt und der Phosphor als koordinativ 4 wertig mit den 4 Sauerstoffatomen ein Tetraeder bildet, das durch die 3 Wasserstoffkerne eine geringe Deformation erleidet. Die hohe Symmetrie des PO₄-Radikals drückt sich in der Linienarmut der Spektren (3 bzw. 4 Linien im Einklang mit den Placekschen Auswahlregeln, die für das Tetraeder 4 Linien fordern) aus. Die zu