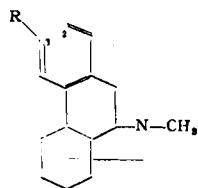


Nitro-Verbindungen, die einzeln durch Reduktion und Diazotierung auf die übliche Weise in 2- bzw. 3-Oxy-N-methylmorphinan überführt werden können.



XXIII

In pharmakologischer Hinsicht beanspruchen die 3-Oxy-Derivate des N-Methylmorphinans ein besonderes Interesse, weil bei ihnen die Oxy-Gruppe an der gleichen Stelle steht wie im Morphin. Befindet sich in 3-Stellung eine freie phenolische Hydroxyl-Gruppe (XXIII, R = OH), so zeigt der Stoff alle für das Morphin charakteristischen Allgemeinwirkungen. Analgetisch ist das 3-Oxy-N-Methylmorphinan im Rattenversuch dem Morphin hinsichtlich Grenzdosis, Intensität und Dauer überlegen, am Meerschweinchen hat es jedoch eine schwächere Wirkung als Morphin. Die 3-Oxy-Verbindung ist also dem hydroxyl-freien N-Methylmorphinan nicht wesentlich überlegen. Methylierung der phenolischen Hydroxyl-Gruppe zu XXIII (R = OCH₃) setzt die analgetische Wirkung stark herab, Acetylierung dagegen bewirkt am Meerschweinchen

eine stärkere Analgesie als Morphin, die Wirkung ist aber von kürzerer Dauer.

Ähnliche Wirkungsverschiebungen sind von den entsprechenden methylierten und acetylierten Morphin-Derivaten her bekannt; besonders auffallend sind aber die gleichen Parallelen vom Dolantin zum Meta-Hydroxydolantin und dessen Derivaten. Die früheren Modellvorstellungen an der Dolantin-Molekel erhalten damit eine weitere Stütze.

Die Synthese von Morphinan-Derivaten, die im alicyclischen Ring geeignet substituiert sind, erscheint in gleicher Weise möglich. Da das Grundgerüst des Morphans wahrscheinlich mit dem des Morphins sterisch übereinstimmt (cis-Dekalin-Typ) und auch Methoden bekannt sind, „offene“ Morphin-Derivate mit einer Sauerstoff-Brücke zu versehen, dürfte das neue Ringschlußprinzip zahlreiche morphinähnliche Basen zugänglich machen, deren pharmakologische Untersuchung mit Rücksicht auf das Sucht-Problem von besonderem Interesse ist. Im gleichen Rahmen bietet sich auch erstmalig eine diskutierbare Grundlage für die praktische Totalsynthese des natürlichen Morphins.

In A. Windaus verehere ich meinen einzigartigen Lehrer, der mein ganzes Studium seit 1931 gelenkt hat und dessen Forschungsweise später in jahrelanger Zusammenarbeit für mich ein Vorbild war. Zur Beschäftigung speziell mit dem Morphinproblem wurde ich durch A. Butenandt angeregt, der damals in der Windausschen Schule in Göttingen wirkte und dessen Vorlesungen auf dem Alkaloid-Gebiet auf mich einen nachhaltigen Eindruck machten.

Eingeg. am 24. Juli 1947. [A 61].

Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der chromatographischen Adsorption

Von Prof. Dr. HANS BROCKMANN, aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

1. Der Adsorptionsvorgang
2. Die Variation des Adsorptionsmilieus
3. Adsorbentien mit abgestufter Adsorptionsaktivität
4. Die „euetrope“ Reihe der Lösungsmittel

Durch die chromatographische Adsorption ist die Chemie um eine Trennungsmethode bereichert worden, die eine Verarbeitung auch kleinster Mengen gestattet und dadurch ausgezeichnet ist, daß sie oft gerade dort eine verblüffende Leistungsfähigkeit zeigt, wo die klassischen Trennungsvorgänge versagen. Die Zahl der Beispiele, die ihre erfolgreiche Anwendung auf den verschiedensten Gebieten der Chemie demonstrieren, ist sehr groß und nimmt noch dauernd zu. Diesen Erfolgen ist es wohl zuzuschreiben, daß man der Frage, ob sich die Methode durch eine systematische Untersuchung ihrer Grundlagen noch verfeinern läßt, lange Zeit wenig Beachtung geschenkt hat. Wir haben uns mit dieser Frage im Zusammenhang mit Arbeiten auf dem Naturstoffgebiet etwas eingehender beschäftigt, denn hier ist die chromatographische Adsorption oft das einzige Verfahren, das die Isolierung unbekannter Verbindungen ermöglicht und daher ein besonderes Bedürfnis vorhanden, die Methode wirklich bis an die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit auszunutzen. Zwei Ziele sollten bei unseren Versuchen erreicht werden:

1. Eine Steigerung der Trennleistung durch Anwendung von Adsorbentien mit abstuftbarer und in weiten Grenzen variierbarer Aktivität sowie durch Verwendung von Lösungsmitteln mit abstuftbarem Elutionsvermögen.
2. Eine Verbesserung der Methoden zur chromatographischen Trennung farblosere Verbindungen.

Einige unserer Ergebnisse sollen zusammen mit denen anderer Autoren, die in ähnlicher Richtung gearbeitet haben, im folgenden geschildert werden.

Der Adsorptionsvorgang

Die zur Chromatographie verwendeten Adsorbentien sind fast ausnahmslos Oxyde, Oxyhydrate oder Salze, also polar gebaute Stoffe (hydrophile Adsorbentien), und die sich an ihrer Oberfläche abspielenden Adsorptionsvorgänge sog. chemische Adsorptionen, bei denen sich, je nachdem, ob der Adsorbend in dissoziierter oder undissoziierter Form vorliegt, zwei Reaktionsweisen unterscheiden

5. Konstitution und Adsorption
6. Chromatographische Trennung farblosere Substanzen
7. Das Verteilungschromatogramm

lassen. Die Bindung dissoziierter Verbindungen erfolgt fast immer auf dem Wege der Austauschadsorption, die nichts anderes ist als eine doppelte Umsetzung zwischen den Ionen des Adsorbenden und denen des Adsorbens. Die Austauschadsorption ist im wesentlichen auf wäßrige Lösungen beschränkt und dadurch charakterisiert, daß nicht die ganze Molekel des Adsorbenden, sondern nur ein Teil davon als Ion gebunden wird. Chromatographisch wurde sie in den letzten Jahren vielfach mit Erfolg verwendet¹⁾, besonders zur Trennung von Aminosäuren²⁾. Auf ihre Bedeutung in biologischer Hinsicht hat kürzlich Bersin³⁾ hingewiesen.

Wir wollen im folgenden die Austauschadsorption unberücksichtigt lassen und uns auf die zweite der beiden oben genannten Adsorptionsarten, auf die Adsorption undissoziierter Verbindungen aus nicht wäßrigen Lösungsmitteln beschränken, die als eigentliche Domäne der Chromatographie anzusehen ist. Bei ihr werden polare bzw. polarisierbare Verbindungen von den an der Oberfläche des Adsorbens liegenden Bausteinen des Krystallgitters (Ionen) additiv gebunden, weshalb man hier, um den Unterschied zur Austauschadsorption zu betonen, auch von Additionsadsorption⁴⁾ spricht. Die Kräfte, die den Adsorbenden binden, sind die gleichen, die für den Zusammenhalt des Gitters verantwortlich sind. Sie wirken bei den an der Oberfläche liegenden Gitterbausteinen z. T. nach außen, besonders stark an den „aktiven Stellen“ d. h. dort, wo Ionen nach mehreren Seiten freiliegen, wie es an den Kanten, Spitzen und Bruchstellen der krystallinen Partikel des Adsorbens und an den Fehlstellen des Gitters der Fall ist. Diese zuerst von Haber und später von Rheinboldt und Wedekind⁴⁾ vertretene Auffassung der Adsorptionskräfte als Randkräfte des Gitters macht verständlich, daß die Adsorptionsaktivität der hydrophilen Adsorbentien durchweg der Härteskala parallel geht, die ja ein gewisses Maß für die Größe der Gitterkräfte gibt.

¹⁾ Vgl. G. Hesse, Adsorptionsmethoden im Chemischen Laboratorium, Berlin 1943, S. 32.

²⁾ Zusammenfassung bei Th. Wieland, diese Ztschr. 56, 213 [1943].

³⁾ Th. Bersin, Naturwiss. 33, 108 [1946].

⁴⁾ H. Rheinboldt u. E. Wedekind, Kolloidchem.-Beih. 17, 118 [1923].

Die an der Oberfläche der dipolartigen Adsorbentien vorhandenen starken elektrischen Felder können an sich unpolare Verbindungen durch Induktion polarisieren und dadurch elektrostatisch binden und bei polar gebauten Adsorbenden die Polarisation verstärken; in manchen Fällen bis zur Ionisation, die wie Weitz⁴⁾ gezeigt hat, besonders bei solchen farblosen Verbindungen augenfällig wird, die farbige Ionen bilden können. Die hier auftretenden farbigen Adsorbate sind Komplexverbindungen, analog gebaut den farbigen Komplexsalzen, die beim Umsatz der betreffenden Adsorbenden mit $AlCl_3$, $SnCl_4$, usw. gebildet werden⁵⁾. Der Unterschied besteht lediglich darin, daß bei der Adsorption die Molekeln des anorganischen Reaktionspartners im Kristallgitter miteinander verbunden sind und daher nur an der Oberfläche reagieren können, während sie bei den Komplexsalzen frei beweglich sind. Nicht selten gibt sich die Polarisation des Adsorbenden durch erhöhte Reaktionsfähigkeit zu erkennen, eine Erscheinung, die wie Weitz betont hat, zweifellos bei manchen Katalysen eine Rolle spielt.

Enthält der Adsorbend OH-Gruppen, so können sich deren H-Atome unter Ausbildung einer Wasserstoffbrücke an einsame Elektronenpaare des Adsorbens (z. B. denen des Oxydsauerstoffes) analog der Bildung von Oniumsalzen anlagern. Die gleiche Bindungsart ist zu erwarten, wenn das Adsorbens OH-Gruppen und der Adsorbend einsame Elektronenpaare enthält⁶⁾. Besonders fest binden die hydrophilen Adsorbentien Wasser und die niedrigmolekularen Alkohole. Daher verdrängt Methanol die meisten anderen Stoffe vom Adsorbens⁵⁾ und wird deswegen in der Chromatographie allgemein als Elutionsmittel benutzt.

Auch andere Lösungsmittel werden adsorbiert, die meisten allerdings schwächer als die Alkohole. In einer Lösung konkurrieren also die Molekeln des gelösten Stoffes mit denen des Lösungsmittels um die aktiven Stellen des Adsorbens. In welchem Ausmaße der gelöste Stoff adsorbiert wird, hängt daher abgesehen von seiner konstitutionsbedingten spezifischen „Adsorptionsaffinität“ sowohl von der Natur des Lösungsmittels als auch von der des Adsorbens oder wie Hesse⁷⁾ es kurz ausgedrückt hat vom „Adsorptionsmilieu“ ab.

Die Variation des Adsorptionsmilieus

Bei der chromatographischen Adsorption eines Gemisches können die Komponenten in einem bestimmten Adsorptionsmilieu folgendes Verhalten zeigen.

1. Praktisch irreversible Adsorption. Die Verbindungen werden entweder völlig irreversibel oder doch so fest adsorbiert, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der Zonen sehr gering ist. Infolgedessen läßt sich auch durch längeres Nachwaschen mit dem Lösungsmittel keine ausreichende Trennung der Zonen, keine „Entwicklung“ des Chromatogramms erreichen.

2. Reversible Adsorption. Die Komponenten des Gemisches bilden, wenn ausreichende Unterschiede in der Adsorptionsaffinität vorhanden sind, Zonen, die sich beim Nachwaschen mit dem Lösungsmittel auseinanderwaschen lassen und dabei durch die Adsorptionssäule wandern.

3. Keine Adsorption. Die Verbindungen passieren die Adsorptionssäule ohne Zonenbildung und sammeln sich im Filtrat an.

Reagieren alle Komponenten des Gemisches nach 1., so muß ein schwächeres Adsorbens oder ein stärker eluierendes Lösungsmittel angewendet werden; reagieren alle nach 3., so muß umgekehrt das Adsorbens stärker oder das Lösungsmittel hinsichtlich seiner eluierenden Wirkung schwächer gewählt werden. Werden alle Komponenten nach 2. reversibel adsorbiert, so ist eine chromatographische Trennung möglich, falls die Unterschiede in der Adsorptionsaffinität der Komponenten ausreichend sind. Ist das nicht oder nicht bei allen Komponenten der Fall, so muß versucht werden, ob an einem anderen Adsorbens oder in einem anderen Lösungsmittel eine Trennung zu erreichen ist.

Enthält ein komplizierteres Gemisch Komponenten, die nach 1., 2. und 3. reagieren, so ist auf jeden Fall zunächst eine Trennung in diese drei Gruppen möglich, wobei die reversibel adsorbierten Komponenten (Gruppe 2) Zonen ausbilden können. Für die praktisch irreversibel adsorbierten (Gruppe 1) und die im Filtrat be-

findlichen Komponenten (Gruppe 3), sind dann wie eben erwähnt, geeignete Adsorptionsbedingungen ausfindig zu machen. Die Trennung komplizierterer Gemische wird um so besser durchzuführen sein, je vollkommener man die Variation des Adsorptionsmilieus beherrscht und je feiner es sich daher auf die jeweilige Trennungsaufgabe abstimmen läßt. Um das zu erreichen, ist zweierlei nötig; eine möglichst reichhaltige Reihe von Adsorbentien mit definierter abgestufter Adsorptionsaktivität und eine genaue Kenntnis der verwendeten Lösungsmittel hinsichtlich ihrer „elutropen“ Wirkung, d. h. ihrer Fähigkeit durch ihre eigene Adsorption die der gelösten Stoffe zu beeinflussen. Die in dieser Hinsicht erzielten Fortschritte sollen zunächst erörtert werden.

Adsorbentien mit abgestufter Adsorptionsaktivität

Die Adsorptionsaktivität der chromatographisch brauchbaren Adsorbentien ist bekanntlich sehr unterschiedlich. Die Forderung nach einer Reihe von Adsorbentien mit abgestufter Aktivität ist dadurch bis zu einem gewissen Grade erfüllt. Doch ist diese Abstufung verhältnismäßig ungenau, weil die Aktivität der einzelnen Adsorbentien beträchtlichen Schwankungen unterliegen kann, die bedingt sein können durch einen verschiedenen Bau der Oberfläche (verschiedene Gittertypen) oder, was eine noch größere Rolle spielt, durch einen verschiedenen Wassergehalt. Diese Erscheinung, die beim Aluminiumoxyd, dem am meisten gebrauchten Adsorbens der Chromatographie, besonders ausgeprägt ist, hat es häufig erschwert, unter reproduzierbaren Bedingungen zu arbeiten. Sie bietet aber andererseits die Möglichkeit zu einer Variation der Adsorptionsaktivität, die für die Praxis der Chromatographie von Bedeutung sein kann. Denn, wenn es gelingt, von den gebräuchlichen Adsorbentien jeweils mehrere Präparate mit abgestufter und festgelegter Aktivität herzustellen, besteht die Aussicht, eine von den schwächsten bis zu den aktivsten reichende Reihe von Adsorbentien zu gewinnen, die eine lückenlose Variation des Adsorptionsmilieus und damit eine optimale Trennleistung gestattet.

Vorbedingung für die Aufstellung einer solchen Reihe ist eine Methode, mit der sich die Aktivität eines Adsorbens bestimmen und dadurch mit der anderer Adsorbentien vergleichen läßt. Die Adsorptionsaktivität oder das Adsorptionsvermögen eines Adsorbens läßt sich dadurch ermitteln, daß in einem bestimmten Lösungsmittel die Adsorptionsisotherme einer geeigneten Testsubstanz, am zweckmäßigsten eines Farbstoffes, gemessen wird; oder einfacher durch die Feststellung der Farbstoffmenge, die von 1g oder 1cm³ Adsorbens aus einer Testlösung bestimmter Konzentration aufgenommen wird, eine Größe, die man als „Adsorptionswert“ bezeichnet hat⁸⁾. Auch die Messung der Adsorptionswärme von Lösungsmitteln ist zur Kennzeichnung von Adsorbentien verwendet worden⁹⁾. Für die Festigkeit, mit der das Adsorbens den Adsorbenden bindet und die für die Chromatographie von Bedeutung ist, weil von ihr hauptsächlich die Wanderungsgeschwindigkeit der Zonen abhängt, geben die beiden letztgenannten Methoden kein zuverlässiges Maß. Denn ihre Werte hängen außer von der Bindungsfestigkeit (Intensitätsgröße), die im folgenden als Adsorptionsaktivität bezeichnet werden soll, auch noch von der Größe der aktiven Oberfläche (Zahl der aktiven Stellen, Kapazitätsgröße) ab, die bei zwei in ihrer Aktivität gleichen Präparaten sehr verschieden sein kann. Infolgedessen kann ein Adsorbens mit großer Aktivität und kleiner aktiver Oberfläche einen geringeren Adsorptionswert oder eine geringere Adsorptionswärme aufweisen als ein Adsorbens mit geringerer Aktivität und großer aktiver Oberfläche¹⁰⁾.

Ein annäherndes Bild von der Adsorptionsaktivität läßt sich gewinnen, wenn das Verhalten eines Testfarbstoffes gegenüber verschiedenen Adsorbentien chromatographisch verglichen wird. Etwa dadurch, daß man gleiche Volumina der Testlösung durch gleich große Säulen der Adsorbentien filtriert und mit gleichen Volumina Lösungsmittel nachwäscht. Je aktiver das Adsorbens ist, desto langsamer wird der Farbstoff wandern. Es ist klar, daß bei Verwendung eines einzigen Farbstoffes der Anwendungsbereich der Methode begrenzt ist. Denn bei manchen Adsorbentien wird

⁴⁾ W. Trappe, *Biochem. Z.* 305, 150 [1940].

⁵⁾ B. P. Müller, *Helv. chim. Acta* 26, 1945 [1943].

¹⁰⁾ Der Einfluß der Adsorptionskapazität auf das chromatographische Verhalten läßt sich an Gemischen aus aktivem und inaktivem Aluminiumoxyd demonstrieren. Je weniger aktives Oxyd das Gemisch enthält, desto breiter werden die Zonen. Gleichzeitig vergrößert sich die Wanderungsgeschwindigkeit und die Trennung der Zonen wird deutlicher. Solche Gemische werden mit Vorteil bei sehr feinkörnigen Adsorbentien mit geringer Durchlaufgeschwindigkeit angewandt.

⁶⁾ E. Weitz u. F. Schmidt, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 72, 1740 [1939]; 72, 2099 [1939]; E. Weitz, F. Schmidt u. J. Singer, *Z. Elektrochem. angew. physik. Chem.* 46, 222 [1940]; vgl. auch diese *Ztschr.* 44, 123 [1939] u. 59, 164 [1947].

⁷⁾ Vgl. dazu E. Wicke, diese *Ztschr.* Teil B 59, 34 [1947]; A. Eucken u. E. Wicke, *Z. Naturforsch.* 2a, 163 [1947].

⁸⁾ Zitat I S. 31.

der Farbstoffe irreversibel gebunden werden und bei manchen gar nicht, so daß ein Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeit nicht möglich ist. Daher ist es zweckmäßig, mehrere Testfarbstoffe mit verschiedener Adsorptionsaffinität zu verwenden. Mit einer solchen aus 6 Azofarbstoffen bestehender Reihe konnten beim Aluminiumoxyd 5 verschiedene Aktivitätsstufen gekennzeichnet werden¹¹⁾. Zur Testung werden je zwei aufeinander folgende Farbstoffe dieser Reihe benutzt, wobei gleiche Volumina ihrer Lösungen durch gleich große Säulen des Adsorbens filtriert werden und mit gleichen Volumina Lösungsmittel nachgewaschen wird. Jede Aktivitätsstufe ist dann durch ein bestimmtes Zonenbild charakterisiert, das durch das folgende Schema wiedergegeben wird. Diese Testmethode ist schnell und bequem zu handhaben. Obgleich sie keine Zahlenangaben über die Adsorptionsaktivität macht, kennzeichnet sie diese mit einer für die Praxis der Chromatographie hinreichenden Genauigkeit.

Aktivitätsstufe Nr. d. Testlösung	I		II		III		IV		V
	1	1	2	2	3	3	4	5	
Lage der Farbstoffe in der Säule	p-Methoxy-azobenzol Azobenzol	p-Methoxy-azobenzol	Sudangelb p-Methoxy-azobenzol	Sudangelb	Sudanrot Sudangelb	Sudanrot	p-Amino-azobenzol Sudanrot	p-Oxy-azobenzol p-Amino-azobenzol	
Filtrat		Azobenzol		p-Methoxy-azobenzol		Sudangelb			

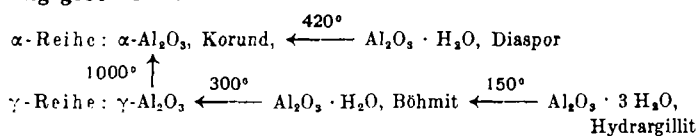
Tabelle 1
Chromatogramme der einzelnen Aktivitätsstufen

Die mit den Zahlen I–V gekennzeichneten Aktivitätsstufen des Aluminiumoxyds unterscheiden sich durch ihren Wassergehalt. Sie lassen sich aus käuflichem Aluminiumoxyd oder Aluminiumhydroxyd, das durch Erhitzen auf 300° bzw. 500° auf die höchste Aktivitätsstufe I gebracht worden ist, durch verschieden langes Verweilen an feuchter Luft gewinnen, wobei der Fortgang der Entaktivierung mit Hilfe der Testfarbstoffe kontrolliert wird.

Die Entaktivierung kann auch so durchgeführt werden, daß man das Aluminiumoxyd I mit einer bestimmten Menge Wasser versetzt und eine Zeitlang in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrt¹²⁾. Hat man die zur Erreichung einer bestimmten Aktivitätsstufe erforderliche Wassermenge für ein bestimmtes Ausgangsmaterial einmal ermittelt, so lassen sich die verschiedenen Aktivitätsstufen in bequemer Weise ohne Testen herstellen. Die Entaktivierung kommt in diesem Fall dadurch zustande, daß das Wasser allmählich verdunstet und sich dadurch gleichmäßig über die Oberfläche verteilen kann. Dort, wo es direkt mit dem Oxyd in Berührung kommt und infolge der Kapillarkwirkung auf einen relativ kleinen Raum festgehalten wird, tritt selbstverständlich völlige Entaktivierung ein. Dieser unwirksam gewordene Anteil wird beim Vermischen aber gleichmäßig verteilt und macht sich dadurch nicht bemerkbar.

Welche Vorteile die Anwendung verschiedener Aktivitätsstufen eines Adsorbens bringt, läßt sich an einem Gemisch der sechs oben genannten Testfarbstoffe demonstrieren, das an Aluminiumoxyd gleich welcher Aktivität nur teilweise zerlegt werden kann. Erst wenn nacheinander an verschiedenen aktiven Aluminiumoxyd-Präparaten adsorbiert wird, gelingt eine quantitative Abtrennung¹³⁾. Vor Einführung der 5 verschiedenen Aluminiumoxyd-Präparate wäre man zu dem Ergebnis gekommen, daß dieses Gemisch an Aluminiumoxyd nicht vollständig zerlegbar ist.

Die Beobachtung, daß manche Aluminiumoxyd-Präparate, auch nach Erhitzen auf 500° völlig inaktiv bleiben, hat uns veranlaßt, sie röntgenographisch mit den aktiven Präparaten zu vergleichen¹²⁾. Die kristallisierten Oxyde und Oxyhydrat des Aluminiums lassen sich ihrem Gitteraufbau nach bekanntlich in zwei Gruppen einteilen, deren Hauptvertreter im folgenden Schema angegeben sind.



Die Röntgendiagramme zeigen eindeutig, daß in den nicht aktivierbaren Präparaten α -Oxyd und in den aktiven γ -Oxyd bzw. Böhmit vorliegen. Nach den Angaben der Literatur hergestelltes γ -Oxyd zeigt die gleiche Aktivität wie unser Aluminiumoxyd I und ist ebenso hygroskopisch wie dieses. Dasselbe Verhalten zeigt

Böhmit. Hydrargillit gleicht in seinem Adsorptionsverhalten dem käuflichen Aluminiumhydroxyd, dessen Aktivität wesentlich geringer ist als die des Aluminiumoxyds V. Das durch Erhitzen aus $\text{AlCl}_3 + 6\text{H}_2\text{O}$ erhaltene δ -Aluminiumoxyd zeigt chromatographisch die gleiche Aktivität wie Aluminiumoxyd II. Der Befund, daß γ -Oxyd im Gegensatz zum α -Oxyd gut adsorbiert, ist zweifellos darauf zurückzuführen, daß γ -Oxyd ein gestörtes Gitter hat, dessen Fehlstellen in erster Linie für die Adsorption verantwortlich zu machen sind.

Die für die Adsorption in Frage kommenden Stellen der Oberfläche besitzen sicher nicht alle die gleiche Aktivität. An feuchter Luft werden zuerst die aktivsten Wasser binden und dadurch entweder ganz gehindert, andere Stoffe zu adsorbieren, oder zumindest in ihrem Adsorptionsvermögen stark beeinträchtigt. Sind die aktivsten mit Wasser besetzt, so reagieren die weniger aktiven und so fort, bis zur völligen Inaktivierung. Die Abhängigkeit der Aktivität vom Wassergehalt wird so ohne weiteres verständlich.

Es ist gelungen, auch bei anderen Adsorbentien die Aktivität reproduzierbar abzustufen. Beim Bentonit, einer Tonerde, die als Hauptbestandteil Montmorillonit enthält, ließen sich fünf verschiedene Aktivitätsstufen gewinnen, die in gleicher Weise wie beim Aluminiumoxyd charakterisiert wurden¹³⁾. Kieselsäure und Kieselgel kann in vier, Calciumcarbonat, Calciumsulfat, Magnesiumoxyd und Magnesiumcarbonat in zwei bzw. drei verschiedenen Aktivitätsstufen erhalten werden¹³⁾. In der folgenden Tabelle ist das Verhalten der Adsorbentien gegenüber den Testfarbstoffen angegeben, aus dem sich ihre Rangordnung hinsichtlich der Adsorptionsaktivität ergibt. Die Adsorbentien einer Querreihe zeigen gleiches Verhalten gegen die angegebenen Testfarbstoffe.

Die für CaCO_3 II und CaSO_4 III benutzten Farbstoffe Fettblau und Fettorange sind Handelspräparate¹⁴⁾, deren Zusammensetzung uns nicht bekannt war. Sie sollen durch Farbstoffe bekannter Konstitution ersetzt werden. Für die schwächsten Adsorbentien wie Rohrzucker und Stärke fehlen noch geeignete Testfarbstoffe.

p-Methoxy-azobenzol Azobenzol	Al_2O_3 I	SiO_2 ¹⁵⁾ I	MgO I	
Sudangelb p-Methoxy-azobenzol	Al_2O_3 II	SiO_2 II	MgO II	CaSO_4 I
Sudanrot Sudangelb	Al_2O_3 III	SiO_2 III	MgO III	CaSO_4 II
p-Amino-azobenzol Sudanrot	Al_2O_3 IV	SiO_2 IV		
p-Oxy-azobenzol p-Amino-azobenzol	Al_2O_3 V		MgCO ₃ I	
p-Oxy-azobenzol p-Amino-azobenzol im Filtrat			CaCO_3 I	
Fettorange Fettblau			CaCO_3 II	CaSO_4 III

Tabelle 2
Aktivität verschiedener Adsorbentien

Außer den in der Tabelle angeführten Adsorbentien wurden verschiedene andere Salze und Oxyde auf ihr Verhalten gegenüber den Testfarbstoffen untersucht. In der Gruppe der Erdalkalisulfate nimmt bei in gleicher Weise vorbehandelten Präparaten die Aktivität vom CaSO_4 zum BaSO_4 hin ab. Dasselbe Verhalten zeigen die im Vergleich zu den Sulfaten weniger aktiven Carbonate. Calciumoxalat ist weniger aktiv als CaSO_4 . Ein für manche Zwecke brauchbares Adsorbens fanden wir im wasserfreien CuSO_4 . Es adsorbiert mit

¹¹⁾ H. Brockmann u. H. Schodder, Ber. dtsh. chem. Ges. 74, 73 [1941].
¹²⁾ H. Brockmann u. J. Jander, unveröffentlicht.

¹³⁾ H. Brockmann u. K. Müller, Unveröffentlicht.

¹⁴⁾ Bezogen von der Firma Holborn, Leipzig.

¹⁵⁾ Gefällte Kieselsäure oder Kieselgel (Korngröße 0,06 bis 0,09 mm).

Ausnahme des p-Amino-azobenzols (das fester gebunden wird als p-Oxy-azobenzol) die Testfarbstoffe in der gleichen Reihenfolge wie Al_2O_3 und ist so aktiv wie dessen Stufe II. Das gleiche Adsorptionsverhalten wie $CuSO_4$ zeigen wasserfreies $NiSO_4$, $ZnSO_4$ und $FeSO_4$. Trockenes ZnO , $ZnCO_3$ und ZnS verhalten sich gegen die Testfarbstoffe wie Al_2O_3 III.

Ein Vergleich der Aktivität von Adsorbentien, wie sie das vorstehende Schema bringt, hat zur Voraussetzung, daß dieselbe Rangordnung, wie sie gegenüber den Testfarbstoffen gefunden wird, auch für andere Stoffe gilt, d. h. daß ein Adsorbens A_1 , das gegen die Testfarbstoffe stärker aktiv ist als ein Adsorbens A_2 auch gegenüber allen anderen Stoffen stets das stärkere Adsorbens ist. Die Erfahrung zeigt, daß dies im allgemeinen der Fall ist. Ausnahmen kommen nur bei Adsorbentien vor, die sich in ihrer Aktivität nicht wesentlich unterscheiden. So wird z. B. p-Oxy-azobenzol an Aluminiumoxyd fester gebunden als p-Amino-azobenzol, an wasserfreiem Kupfersulfat dagegen schwächer; an Aluminiumoxyd liegt die Oxy-azobenzol-Zone über der des Amino-azobenzols, an Kupfersulfat unter derselben.

Viel häufiger sind die Fälle, in denen die Unterschiede in der Bindungsfestigkeit zweier Stoffe an verschiedenen Adsorbentien zwar differieren, aber nicht so stark, daß, wie in dem eben erwähnten Beispiel, eine Umkehrung in der Reihenfolge der Zonen auftritt; oder anders ausgedrückt, ein Stoff S_1 wird zwar an verschiedenen Adsorbentien stets fester gebunden als ein zweiter Stoff S_2 , jedoch an einem viel fester, an einem anderen nur wenig fester. Das bedeutet, daß an einem Adsorbens, eine Trennung erfolgt, am anderen dagegen nicht. So läßt sich z. B. an Kieselsäure das 1, 4, 5, 8-Tetraoxy-anthrachinon von 1,8-Dioxy-anthrachinon ebensowenig trennen wie 1,4-Dioxy-anthrachinon von 1, 8-Dioxy-anthrachinon. An Calciumsulfat dagegen gelingt die Trennung dieser Verbindungen recht glatt¹³⁾. Diese und viele andere Beispiele zeigen, daß bei Gemischen, die sich an einem Adsorbentium nicht trennen lassen, stets noch an andere Adsorbentien ausprobiert werden sollten. Führt eine solche Änderung des Adsorbentiums nicht zum Ziel, so bleibt noch, wie im nächsten Abschnitt näher ausgeführt wird, die Möglichkeit, durch Wechsel des Lösungsmittels eine Trennung zu versuchen. Versagt auch diese Maßnahme, so ist damit die derzeitige Grenze der chromatographischen Methode erreicht. Noch nicht systematisch untersucht ist die Frage, ob in solchen Fällen die Verwendung sehr langer Adsorptionssäulen weiterführt. Ist nämlich infolge ähnlicher Adsorptionisothermen die Differenz in den Wanderungsgeschwindigkeiten der Zonen sehr klein, so wird erst nach Durchlaufen einer größeren Strecke die schnellere die langsamere überwindet haben¹⁴⁾. Und zwar ist diese Strecke um so größer, je geringer der Unterschied in den Geschwindigkeiten ist. Da die Durchlaufgeschwindigkeit des Lösungsmittels mit zunehmender Länge der Adsorptionssäule abnimmt, sind deren Verlängerung Grenzen gesetzt, die von der Korngröße des Adsorbens abhängen.

Vorversuche, die wir in dieser Richtung angestellt haben, zeigen, daß beim Aluminiumoxyd mit Adsorptionssäulen von 100-150 cm Länge und 0,8-1 cm Durchmesser selbst ohne Überdruck noch eine annehmbare Durchlaufgeschwindigkeit zu erreichen ist. Während gewöhnlich das Länge-Querschnittverhältnis der Adsorptionssäulen 10 : 1 beträgt, ist es hier um das 10fache größer. Unsere Versuche haben ergeben, daß sich entsprechend den eben erwähnten Überlegungen mit solchen Säulen tatsächlich Gemische zerlegen lassen, deren Trennung unter den bisherigen Bedingungen nicht möglich war. Das „Langsäulenverfahren“ bringt also eine Erhöhung der Trennleistung, die für manche Zwecke nützlich sein kann.

Die „elutrope“ Reihe der Lösungsmittel

Da, wie schon oben erwähnt, die Festigkeit, mit der ein Stoff adsorbiert wird, nicht nur von seiner Konstitution und der Art des Adsorbens, sondern weitgehend auch von der Natur des Lösungsmittels abhängt, läßt sich das Adsorptionsmilieu durch Anwendung verschiedener Solventien erheblich variieren. Man kann den Einfluß des Lösungsmittels auf die Adsorption zahlenmäßig dadurch erfassen, daß man einen Testfarbstoff in bestimmter Konzentration in ihm löst und dessen Adsorptionswert¹⁵⁾ für ein geeignetes Adsorbens ermittelt. Solche Messungen sind vor einiger Zeit von *Trappe*¹⁶⁾ durchgeführt worden und haben zur Aufstellung der folgenden Reihe geführt, die im wesentlichen schon vorher durch die Praxis der Chromatographie bekannt war.

Petroläther (oder Benzin, Cyclohexan, Tetrachlorkohlenstoff) – Benzol – Chloroform – Äther – Essigester – Aceton – n-Propylalkohol – Äthylalkohol – Methylalkohol – Wasser – Pyridin.

Je weiter oben ein Lösungsmittel in dieser Reihe steht, desto fester werden Stoffe aus ihm adsorbiert. Umgekehrt nimmt die eluierende Wirkung von oben nach unten zu („elutrope“ Reihe¹⁷⁾). Zwischen dem Elutionsvermögen der Lösungsmittel und einigen ihrer physikalischen Eigenschaften bestehen Zusammenhänge. So steigt die Benetzungswärme in der obigen Reihe von oben nach unten an. In der gleichen Richtung werden das Lösungsvermögen für Wasser und die Dielektrizitätskonstante größer. Es muß betont werden, daß die elutrope Reihe in der oben angegebenen Form nur für hydrophile Adsorbentien, nicht dagegen für die hydrophobe Kohle gilt.

Das verschiedene Elutionsvermögen der Lösungsmittel ermöglicht es, ein an der Adsorptionssäule adsorbiertes Gemisch dadurch zu trennen, daß nacheinander mit Lösungsmitteln zunehmenden Elutionsvermögens nachgewaschen und das Filtrat fraktioniert aufgefangen wird; eine Modifikation des *Tswett*schen Verfahrens, die man als „flüssiges Chromatogramm“ bezeichnet hat. Sie hat sich häufig bewährt, besonders bei der Trennung farbloser Verbindungen. Ein gutes Beispiel für ihre Anwendung ist die von *Trappe*¹⁷⁾ beschriebene Trennung natürlicher und künstlicher Lipoid-Gemische, die sich quantitativ in Kohlenwasserstoffe, Cholesterinester, Triglyceride, freies Cholesterin und Fettsäuren zerlegen ließen.

Da für das flüssige „Chromatogramm“ nur ein Adsorbens erforderlich ist, dessen Aktivität durch Verwendung verschiedener Waschflüssigkeiten variiert wird, erhebt sich die Frage, ob dieses Verfahren nicht einfacher ist als die wiederholte Adsorption an Adsorbentien verschiedener Aktivität. Um sie zu beantworten, muß durch systematische Versuche geklärt werden, ob sich die Aktivität eines Adsorbens allein durch Verwendung verschiedener Lösungsmittel genau so abtufen läßt, wie durch einen verschiedenen Feuchtigkeitsgehalt, und ob dabei die Trennschärfe die gleiche ist wie bei Verwendung verschiedener Adsorbentien. Im Rahmen solcher Versuche haben wir mit unseren Testfarbstoffen zunächst den Einfluß von reinem Benzol und Benzol-Benzingemisch 1 : 4 auf die Adsorption an Aluminiumoxyd untersucht. Dabei hat sich ergeben, daß in Benzol die Aktivität des Oxydes jeweils um eine Stufe niedriger erscheint als in Benzol-Benzin; ein Aluminiumoxyd, das in Benzol-Benzin 1 : 4 z. B. die Aktivität I zeigt, verhält sich also in Benzol wie ein Aluminiumoxyd II. Eine bemerkenswerte Ausnahme von dieser Regel ergab sich bei den Farbstoffen Sudanrot und Sudangelb¹⁸⁾. Sie werden an Aluminiumoxyd III aus Benzol-Benzin gut getrennt und sollten nach dem eben gesagten aus Benzol an Aluminiumoxyd II die gleiche gute Trennung aufweisen. Das ist jedoch nicht der Fall. Aus Benzol werden beide Farbstoffe als einheitliche auch beim Nachwaschen nicht

Lösungsmittel	p-(CH ₃) ₂ N-Azob. p-CH ₃ O-Azob. Al ₂ O ₃ I	p-NH ₂ -Azob. p-CH ₃ -CO-Azob. Al ₂ O ₃ II	p-CH ₃ -CO-Azob. p-CH ₃ -COO-Azob. Al ₂ O ₃ I	p-NH ₂ -Azob. p-CH ₃ -COO-Azob. Al ₂ O ₃ II
1. Benzol-Cyclohexan 1:4 oder Chloroform	Keine Trennung	Keine Trennung	Keine Trennung	Keine Trennung
2. Benzol	Gute Trennung	Gute Trennung	Keine Trennung	Keine Trennung
3. Chloroform + 1% Alkohol	Gute Trennung	Gute Trennung	Gute Trennung	Gute Trennung
4. Cyclohexan + 10% Essigester	Gute Trennung	Gute Trennung	Gute Trennung	Gute Trennung

Tabelle 3
Elutionswirkung verschiedener Lösungsmittel

¹⁴⁾ Vorausgesetzt, daß sich die beiden Stoffe nicht gegenseitig in ihrer Adsorption beeinflussen.

¹⁷⁾ W. *Trappe*, *Biochem. Z.* 306, 316 [1940]; 307, 97 [1940].

¹⁸⁾ Konstitution der Farbstoffe vgl. H. *Brockmann* u. H. *Schodder*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 74, 73 [1941].

trennbare Zone adsorbiert. In Übereinstimmung damit liegen die Adsorptionsisothermen der beiden Farbstoffe in Benzol sehr nahe beieinander, während sie in Benzol-Benzin stark voneinander abweichen. Ein ähnliches Verhalten des Benzols fanden wir bei Versuchen mit verschiedenen Azobenzol-Derivaten, die in der Tabelle 3 wiedergegeben sind. Die Farbstoffe wurden aus Benzol-Cyclohexan 1 : 1 oder aus alkohol-freiem Chloroform an alkali-freiem Aluminiumoxyd I bzw. II adsorbiert, wobei sich eine einheitliche Zone ausbildete. Bei dem Nachwaschen mit den Lösungsmitteln 3 und 4 trat in allen Fällen eine gute Zonenbildung und Trennung ein, mit Benzol dagegen nur bei den Farbstoffpaaren der beiden ersten Spalten¹⁹⁾.

Man stößt also bei den Lösungsmitteln auf ähnliche Verhältnisse wie bei den Adsorbentien. Ebenso wie an einem Adsorbens Trennung eines Gemisches erfolgen kann, am anderen dagegen nicht, kann am gleichen Adsorbens in einem Lösungsmittel Zonenbildung eintreten, während in einem anderen die Adsorptionsunterschiede so gering sind, daß eine Trennung nicht möglich ist¹⁷⁾. Die Analogie geht sogar noch weiter. Wir hatten oben gezeigt, daß die Unterschiede in der Adsorptionsfestigkeit zweier Stoffe so weit differieren können, daß die Reihenfolge der Zonen an verschiedenen Adsorbentien verschieden ist. Die gleiche Erscheinung findet sich, wie die folgenden Befunde zeigen²⁰⁾, auch bei Lösungsmitteln. 1-Amino-anthrachinon und sein Acetyl-Derivat lassen sich aus Benzol an Aluminiumoxyd III gut trennen, wobei die Acetyl-Verbindung die obere Zone bildet, also fester adsorbiert wird. Adsorbiert man aber aus Benzol an Aluminiumoxyd I, so entsteht eine schmale, einheitliche Zone, aus der sich beim Nachwaschen mit Essigester das Acetyl-Derivat ins Filtrat bringen läßt, während das Amino-anthrachinon in der Mitte der Säule zurückbleibt. Im System Aluminiumoxyd III – Benzol wird also die Acetyl-Verbindung stärker, im System Aluminiumoxyd I – Essigester dagegen wird sie schwächer adsorbiert, als Amino-anthrachinon. Die gleiche Erscheinung wurde bei einer Reihe anderer Farbstoffe beobachtet. Sie ist nicht auf Aluminiumoxyd beschränkt, sondern kommt auch bei anderen Adsorbentien vor²⁰⁾.

Diese Versuche zeigen, daß beim „flüssigen“ Chromatogramm, die Reihenfolge in der die Komponenten eines Gemisches eluiert werden, von der Natur des Lösungsmittels abhängen kann.

Ein Hinweis, daß das flüssige Chromatogramm auch bei komplizierteren Gemischen mit Erfolg angewendet werden kann, ist darin zu sehen, daß sich das Gemisch der 6 Testfarbstoffe nach Adsorption an Al₂O₃ I durch fraktionierte Elution mit verschiedenen Lösungsmitteln glatt zerlegen läßt. Das Verfahren kann hier also durchaus mit der successiven Anwendung verschiedener aktiver Adsorbentien konkurrieren, in anderen von uns untersuchten Fällen war es ihm sogar überlegen. Welche Methode im Einzelfall vorzuziehen ist, muß jeweils durch Vorversuche geklärt werden.

Konstitution und Adsorption

Das große Beobachtungsmaterial über die Chromatographie homöopolarer Verbindungen an hydrophilen Adsorbentien, läßt gewisse Zusammenhänge zwischen der Konstitution der Adsorbenden und ihrer Adsorptionsaffinität erkennen, die sich im wesentlichen folgendermaßen kennzeichnen lassen²¹⁾. Gesättigte Kohlenwasserstoffe werden gar nicht oder in sehr geringem Umfange adsorbiert, ungesättigte im allgemeinen um so fester, je mehr Doppelbindungen sie enthalten und je mehr davon konjugiert sind. Daraus folgt die Regel, daß ein Kohlenwasserstoff eine um so größere Adsorptionsaffinität besitzt, je langwelliger er absorbiert, je tiefer also seine Farbe ist. Wenn man annimmt, daß die Adsorption ungesättigter Kohlenwasserstoffe auf ihrer Polarisierbarkeit beruht, wird dieser Zusammenhang verständlich. Denn mit wachsender Zahl der π -Elektronen wird bei konjugierten Systemen die Anregungsenergie geringer (langwelligere Adsorption) und die Zahl der polaren Formen oder die Polarisierbarkeit größer.

Die meisten funktionellen Gruppen wirken, in einen Kohlenwasserstoff eingeführt, erhöhend auf die Adsorptionsaffinität. Ordnet man sie nach dieser Eigenschaft, so ergibt sich folgende Reihe abnehmender Adsorption: -COOH, -OH, -NH₂, >CO, -O-Alkyl, die sich übrigens auch in der elotropen Reihe der Lösungsmittel wiederfindet, deren Elutionsvermögen in der Reihenfolge: Essigsäure – Alkohol – Aceton – Äther abnimmt. Die Rangordnung der funktionellen Gruppen hat sich im wesentlichen aus dem Vergleich ähnlich gebauter Verbindungen²²⁾ ergeben und sagt quantitativ über die Unterschiede in der Adsorptionsaffinität nichts aus. Um in dieser Hinsicht einen genaueren Vergleich der funktionellen Gruppen, etwa an Hand der Adsorptionsisothermen durchzuführen, braucht man Verbindungen, die – alle von der gleichen Stammsubstanz abgeleitet – sich nur durch die Natur einer Stellungsgleichen funktionellen Gruppe unterscheiden. Dieser Forderung genügen, wie wir fanden, in vorbildlicher Weise die farbigen, leicht zugänglichen p-substituierten Azobenzole, deren chromatographisches Verhalten bei einer größeren Anzahl von Vertretern untersucht wurde. Ein zahlenmäßiger Vergleich durch Ausmessung der Adsorptionsisothermen steht noch aus. Das Ergebnis unserer Versuche, bei denen als Adsorbens Aluminiumoxyd verschiedener Aktivität und als Lösungsmittel Benzol verwendet wurde, ist in Tabelle 4 wiedergegeben. Die nummeriert untereinander ste-

1.	↕	V	$\text{R}-\text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
2.	↕	IV	R-OH
3.	↕	III	$\text{R}-\text{NH}-\text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
4.	↕	III	$\text{R}-\text{NH}-\text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{matrix}$
5.	↕	III	$\text{R}-\text{NH}_2 > \text{---} < \text{R}-\text{O}-\text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
6.	↕	II	$\text{R}-\text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{matrix}$
	↕	II	$\text{R}-\text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{CH}_3 \end{matrix} > \text{---} < \text{R}-\text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
7.	↕		$\text{R}-\text{O}-\text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{matrix}$
8.	↕	I	$\text{R}-\text{N}(\text{CH}_3)_2 > \text{---} < \text{R}-\text{NO}_2$
9.	↕	I	R-OCH ₃
10.	↕		$\text{R}-\text{Cl} > \text{---} < \text{R}-\text{CH}_3 > \text{---} < \text{R}-\text{H}$

↔ trennbar > < nicht trennbar

Tabelle 4

R = Azobenzol-Rest Röm. Ziffern = Aktivitätsstufe des Aluminiumoxydes

henden Verbindungen konnten unter diesen Bedingungen voneinander getrennt werden, die in einer Reihe nebeneinander stehenden dagegen nicht. Verbindungen, die zwischen zwei Nummern stehen, ließen sich von den Vertretern dieser beiden Nummern nicht trennen.

Man hat also in den Azobenzol-Derivaten eine Reihe von Verbindungen zur Verfügung, die sich durch ihre fein abgestufte Adsorptionsaffinität gut als Testfarbstoffe zur Herstellung verschiedener aktiver Adsorbentien sowie als Indikatorfarbstoffe zur Trennung farbloser Verbindungen (siehe unten) eignen.

¹⁹⁾ Ein gutes Beispiel für die Abhängigkeit der Trennung vom Lösungsmittel fanden kürzlich Wolfson u. Mitarb. J. Amer. chem. Soc. 68, 2170 [1944] bei der Trennung von Raffinose und Saccharose an einem hydratisierten sauren Calciumsilikat „Silen EF“. Mit 90 proz. Dioxan waren die Zonen der beiden Zucker sehr dicht beieinander, beim Entwickeln mit 25 proz. Äthanol oder Isopropylalkohol dagegen lagen sie weit auseinander.

²⁰⁾ H. Brockmann u. G. Reuter, Unveröffentlicht.

²¹⁾ Vgl. Zechmeister u. v. Cholnoky, Die chromatographische Adsorptionsmethode, Julius Springer, Wien 1938, 2. Aufl. G. Hesse Zitat 1.

²²⁾ Ein größeres Beobachtungsmaterial liegt bisher nur bei den Carotinoiden vor. Vgl. A. Winterstein u. G. Stein Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 220, 251 [1933].

Wie aus der Tabelle hervorgeht, lassen sich einige Vertreter der Reihe unter den angegebenen Bedingungen (Aluminiumoxyd-Benzol) nicht trennen. Da Gemische, die an Aluminiumoxyd oder aus Benzol nicht trennbar sind, wie oben gezeigt wurde, häufig an anderen Adsorbentien oder durch Verwendung eines anderen Lösungsmittels zerlegt werden können, besteht die Möglichkeit, daß dies auch bei diesen Verbindungen gelingt. Sie sind daher geeignet, die Abhängigkeit der Trennbarkeit vom Adsorptionsmilieu zu studieren. Beim Gemisch aus p-Amino-azobenzol und p-Acetoxy-azobenzol konnte eine Trennung bereits durch Wechsel des Lösungsmittels (Cyclohexan : 10% Essigester statt Benzol) erreicht werden.

Hinsichtlich des adsorptiven Verhaltens der funktionellen Gruppen läßt sich aus Tabelle 4 folgendes entnehmen.

1) Für die HOOC-, HO-, H₂N-, OC<, H₃COOC-, CH₃O-Gruppe ergibt sich die gleiche Reihenfolge, wie sie auch bei anderen Verbindungen gefunden worden ist. Alkylierung setzt die Wirksamkeit der HOOC-, HO- und H₂N-Gruppe stark herab, wobei in den Methylderivaten die Reihenfolge der Stammverbindungen (-COOH, -OH, -NH₂) nicht erhalten bleibt.

2) Acylierung der HO-Gruppe schwächt die Adsorption.

3) Acylierung der H₂N-Gruppe erhöht die Adsorption.

4) Die CO-Gruppe in der Aldehyd-, Keto- und veresterten HOOC-Gruppe zeigt keine wesentlichen Unterschiede in ihrem Einfluß auf die Adsorption.

5) Die adsorptiven Eigenschaften der O₂N-Gruppe sind gering. Halogen und H₃C- im Kern ist unter den oben geschilderten Bedingungen ohne merklichen Einfluß auf die Adsorption.

Bei einer der obigen analogen Reihe von Stilben-Derivaten fanden wir die gleiche Adsorptionsrangordnung der funktionellen Gruppen. Wir halten es für wahrscheinlich, daß sie im großen und ganzen für alle Verbindungsreihen gilt, die bei gleicher Stammsubstanz sich nur in der Konstitution einer stellungsgleichen funktionellen Gruppe unterscheiden, vorausgesetzt, daß das gleiche Adsorptionsmilieu wie bei der Aufstellung der Rangordnung angewendet wird.

Ein größeres Beobachtungsmaterial zeigt, daß bei Verbindungen mit mehreren gleichen funktionellen Gruppen die Adsorptionsaffinität mit deren Zahl zunimmt, was ohne weiteres verständlich ist, da in der Hauptsache diese Gruppen die Bindung an das Adsorbens vermitteln. Bei solchen Verbindungen genügt bei sonst gleichem Bau der Mehrgehalt von einer Gruppe, um eine glatte chromatographische Trennung zu erreichen. Wie sich die Zahl der funktionellen Gruppen quantitativ auf die Adsorptionsaffinität auswirkt, ist noch nicht untersucht worden. Solche Untersuchungen wären von Interesse, um festzustellen, ob sich die Adsorptionsaffinität einer Verbindung annähernd additiv aus derjenigen ihrer einzelnen Gruppen (Stammsubstanz, funktionelle Gruppen) zusammensetzt. Bei einfacher gebauten Verbindungen scheint das in ganz grober Annäherung der Fall zu sein. Dabei sind allerdings sterische Verhältnisse zu berücksichtigen, z. B. die Stellung der funktionellen Gruppen in aromatischen Ringsystemen. So wird bei den drei isomeren Nitrophenolen und Nitranilinen die para-Verbindung fester adsorbiert als die meta- und diese wiederum fester als die ortho-Verbindung, was bei rein additiver Wirkung der beiden funktionellen Gruppen nicht der Fall sein dürfte. Ebenso ist bei den Zuckern, wie zu erwarten, die sterische Anordnung der funktionellen Gruppen von Einfluß auf die Adsorption, so daß auch bei ihnen Verbindungen mit gleicher Zahl der Gruppen in manchen Fällen chromatographisch trennbar sind. Z. B. läßt sich der Penta-azoyl-ester („Azoyl“-Azobenzol-p-carbonsäure-Rest) der d-Fruktose infolge seiner festeren Adsorption an Aluminiumoxyd vom Penta-azoyl-ester der d-Glucose trennen.

Spüren sterische Unterschiede dagegen keine Rolle, so kann, wie sich an einer großen Zahl von Beispielen zeigen läßt, als Faustregel der Satz gelten, daß sich die adsorptive Wirkung des Grundgerüsts und der funktionellen Gruppen in ganz grober Annäherung additiv verhält. Mit dieser Regel und der oben aufgestellten adsorptiven Rangordnung der funktionellen Gruppen läßt sich in vielen Fällen für das Adsorptionsmilieu Al₂O₃-Benzol voraussetzen, ob Verbindungen chromatographisch trennbar sind.

Von der Annahme ausgehend, daß die Festigkeit der Bindung um so größer wird, je stärker polar oder polarisierbar die funktionellen Gruppen sind, hat man versucht, die Dipolmomente der Adsorbenden mit ihrer Adsorptionsaffinität in Beziehung zu setzen. In einigen Fällen, so bei den drei stellungsisomeren Nitrophenolen und Nitranilinen ergibt sich, daß die Adsorptionsaffinität in Richtung ortho- meta- para- mit der Größe des Dipolmomentes zunimmt²⁵⁾. Ein solcher Zusammenhang kann aber keineswegs als allgemeiner gültig angesehen werden, auch dann nicht, wenn man Verbindungen mit nur einer funktionellen Gruppe hinsichtlich ihres Gruppenmomentes miteinander vergleicht.

²⁵⁾ R. T. Arnold, J. Amer. chem. Soc. 61, 1611 [1939].

Im Zusammenhang mit den in diesem Abschnitt behandelten Beziehungen zwischen Konstitution und Adsorption soll noch kurz erörtert werden, wie weit sich eine verschiedene Länge aliphatischer Seitenketten bei sonst gleich gebauten Verbindungen, z. B. bei Fettsäuren und aliphatischen Aminosäuren auf die Adsorption auswirkt. Bei der Adsorption von Fettsäuren aus Petroläther an Magnesiumoxyd war eine Trennung nur möglich, wenn sich die Säuren um 4 C-Atome unterschieden²⁶⁾. Dagegen ließ sich eine ungesättigte Säure von einer gesättigten auch dann trennen, wenn sie die gleiche Anzahl C-Atome enthielt. Ein Gemisch aus Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure war aus Petroläther an Aluminiumoxyd nicht zerlegbar²⁷⁾, dagegen gelang die Trennung an Aktivkohle. In theoretischer Hinsicht von Interesse sind Befunde von Cassidy²⁸⁾ über den Zusammenhang zwischen Adsorptionsisothermen und chromatographischer Trennung. Obwohl an einer Aktivkohle auf Grund der Adsorptionsisothermen Laurinsäure stärker als Stearinsäure adsorbiert wurde, zeigte sich bei der chromatographischen Adsorption eines Gemisches umgekehrt die Stearinsäure fester adsorbiert. Ferner ließ sich an einer anderen Kohle, an der die Adsorptionsisothermen nahezu übereinstimmten, eine teilweise chromatographische Trennung erreichen. Die Säuren üben also offenbar in gemeinsamer Lösung einen gegenseitigen Einfluß auf ihre Adsorption aus. Cassidy schließt aus seinen Befunden, daß man aus den Adsorptionsisothermen der einzelnen reinen Säuren nichts über ihre chromatographische Trennbarkeit aussagen kann. Diese Befunde sind für eine Theorie des Chromatogrammes von Bedeutung. Es wäre daher von Interesse zu prüfen, ob sich bei den hydrophilen Adsorbentien ähnliche Verhältnisse ergeben.

Um die Fettsäuren im Chromatogramm sichtbar zu machen, hat man vorgeschlagen, sie durch Umsetzen mit p-Amino-azobenzol in farbige Verbindungen überzuführen. Eine Untersuchung der so erhaltenen Derivate hat ergeben, daß sich auch bei den niedermolekularen Säuren benachbarte Glieder der homologen Reihe nicht trennen lassen²⁹⁾. Eine Zonenbildung tritt erst bei größeren Differenzen in der Kettenlänge ein. Dagegen lassen sich, wie vor kurzem gefunden wurde²⁷⁾, die p-Phenyl-phenacyl-ester der unverzweigten Fettsäuren bis zur Decansäure an Kieselsäure aus Benzol-Petroläther 1 : 1 trennen (Nachwaschen mit Aceton), wenn sich die Säuren um eine CH₂-Gruppe unterscheiden. Die Zonen der Ester geben sich unter der UV-Lampe durch blaue Fluoreszenz zu erkennen. Die Adsorption ist um so schwächer, je länger die aliphatische Kette ist.

Chromatographische Trennung farbloser Substanzen

Die Übertragung der chromatographischen Adsorption auf farblose Substanzen ist, falls sie nicht fluoreszieren, dadurch erschwert, daß ihre Zonen nicht sichtbar sind. Alle Bestrebungen, die Methode für farblose Verbindungen nutzbar zu machen, sind deshalb darauf gerichtet gewesen, die Adsorptionszonen erkennbar zu machen. Das ist auf folgenden Wegen erreicht worden:

1) Durch Zusatz eines Farbstoffes, der zusammen mit einer gesuchten Komponente des Gemisches adsorbiert wird und dadurch deren Zone anzeigt (Indikatormethode).

2) Durch Pinselung der aus dem Chromatogrammrohr herausgedrückten Adsorptionssäule mit einem Reagenz, das die Lage einer oder womöglich mehrerer Zonen anzeigt³⁰⁾ (Teststrichmethode).

3) Durch Überführung der farblosen Verbindungen in farbige Derivate, aus denen sie nach der Adsorption zurückgewonnen werden können³¹⁾ (Farbkopplungsmethode).

Das erste, schon von Tswett vorgeschlagene Verfahren hat den Nachteil, daß nur eine Zone des Chromatogrammes gekennzeichnet wird und bisher wenig über geeignete Indikatorfarbstoffe bekannt war. Diese stehen jetzt in den oben genannten Testfarbstoffen und den Azobenzol-Derivaten in größerer Anzahl

²⁶⁾ M. L. Graaf u. E. L. Skan, Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. 15, 340 [1943].

²⁷⁾ H. G. Cassidy, J. Amer. Chem. Soc. 62, 3073 [1940]; 63, 2735 [1941].

²⁸⁾ J. Amer. chem. Soc. 62, 3076 [1940].

²⁹⁾ J. G. Kirchner, A. N. Prater u. A. J. Haagen-Smit Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. 16, 31 [1944].

³⁰⁾ L. Zechmeister, Bull. Soc. Chim. biol. 18, 1885 [1936].

³¹⁾ W. S. Reich, Biochem. J. 33, 1001 [1939].

und in abgestufter Adsorptionsaffinität zur Verfügung, so daß es in manchen Fällen nunmehr möglich sein wird, auch mehrere Zonen zu markieren. Die Methode ist nicht so vielseitig anwendbar, wie die beiden unter 2 und 3 genannten. Sie eignet sich in der Hauptsache dafür, einen in seinen Eigenschaften schon bekannten Stoff in kleiner Menge aus einem komplizierten Gemisch abzutrennen. Ein typisches Beispiel für eine derartige Anwendung bietet die Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Fischlebertran²⁰⁾, bei der weder die Teststrichmethode noch die Überführung in farbige Derivate anwendbar gewesen wäre.

Dagegen haben diese beiden Verfahren in den letzten Jahren wesentlich dazu beigetragen, die Chromatographie für die Trennung farbloser Verbindungen nutzbar zu machen, besonders auf dem Gebiete der Zucker und der Aminosäuren. Daß hier eine mit kleinen Mengen arbeitende quantitative Trennungsmethode von großer Bedeutung ist, braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden.

Die erste chromatographische Trennung von Zuckern gelang Reich²¹⁾ nach Methode 3). Als Farbkomponente diente Azobenzol-p-carbonsäure. Er fand, daß sich die Penta-azoyl-ester der d-Fructose und d-Glucose an Kieselsäure aus Benzol-Benzin 1 : 4 trennen lassen. Mit der gleichen Methode konnten später die folgenden Zucker getrennt werden²¹⁾:

Cellulose-d-Glucose, d-Glucose-d-Galactose, d-Xylose-1-Arabinose, Saccharose-Trehalose, d-Glucose-Saccharose-Cellobiose, d-Arabinose-d-Glucose-Saccharose-Cellobiose.

Auch für die Trennung partiell methylierter Zucker ist das Verfahren geeignet²²⁾ (2,3,4,6-Tetra-methylglucose-azoyl-ester-3-Methylglucose-ester sowie 2,3,6-Trimethylglucose von 2,3-Dimethylglucose (Adsorbens: Kieselsäure, Lösungsmittel: Chloroform-Benzol-Leichtbenzin). Bei der Adsorption unveresterter Methylglucose aus Benzol an Aluminiumoxyd nicht trennen lassen; dagegen kann Dimethylglucose von diesen beiden durch Adsorption an dem gleichen Adsorbens getrennt werden, wenn als Lösungsmittel Aceton-Benzol 1 : 1 verwendet wird²³⁾. Für die Konstitutionsermittlung von Polysacchariden ist es von Bedeutung, daß kürzlich Jones die Trennung von Tetramethyl-methylglucosid und Trimethyl-methylglucosid an aktiviertem Aluminiumoxyd aus Äther-Leichtbenzin gelang, denn dadurch läßt sich auch in kleinen Mengen von Stärkehydrolysaten das Verhältnis der beiden Abbauprodukte ermitteln²⁴⁾.

In Form ihrer Acetyl-Derivate können Rohrzucker, Glucose und Fructose durch Adsorption aus Benzol an „Magnesol“ (synthetisches, hydratisiertes Magnesiumsilikat) getrennt werden, wobei die Zonen nach der Pinselmethode mit Kaliumpermanganat-Lösung sichtbar gemacht werden, ein Verfahren, das von Wolfrom²⁵⁾ zur Analyse roher Rohrzuckerpräparate verwendet wurde. Derselbe Autor²⁶⁾ hat vor kurzem gezeigt, daß sich auch die Zucker selber chromatographisch trennen lassen, wenn man sie an „Magnesol“ oder bestimmten Filtererden aus Äthylalkohol oder Isopropylalkohol mit wechselndem Wassergehalt adsorbiert. Verwendet würden folgende Mischungen, deren eluierende Wirkung von links nach rechts abnimmt: 70%iger Alkohol, 90%iger Alkohol, 95%iger Alkohol, 90%iger Isopropylalkohol, 97%iger Isopropylalkohol. Nach ihrer Adsorptionsaffinität lassen sich die Zucker in verschiedene Gruppen einteilen. Folgende Trennungen wurden unter anderen durchgeführt: d-Glucose-d-Sorbit, d-Mannit-d-Dulcitol, Saccharose-Raffinose, sowie die Trennung der folgenden Zucker, die in Hydrolysaten von Hemicellulosen vorkommen können, nämlich d-Galacturonsäure, d-Galactose, d-Glucose, d-Xylose und d-Rhamnose. Auch bei diesen Trennungen wurden die Zonen dadurch sichtbar gemacht, daß die aus dem Adsorptionsrohr herausgedrückte Säule mit einer Kaliumpermanganat-Lösung bepinselt wurde.

Die Überführung in farbige Verbindungen durch Kupplung mit Azobenzolcarbonsäure hat sich auch zur Trennung von Aminosäuren bewährt. So konnte Karrer²⁷⁾ zeigen, daß nach Veresterung der Carboxyl-Gruppe und Kupplung der Amino-Gruppe mit Azobenzol-p-carbonsäure sich Glykokoll, Alanin, Leucin und Valin trennen lassen, wobei die Adsorptionsaffinität in dieser Reihe von

links nach rechts abnimmt. Die Beobachtung, daß die Adsorption um so fester ist, je kleiner die aliphatische Seitenkette ist, stimmt überein mit den oben erwähnten Befunden an Fettsäure-Derivaten. Ebenso wie bei den p-Phenyl-phenacylestern der niedermolekularen Fettsäuren genügt auch hier, wie das Beispiel Alanin-Glykokoll zeigt, ein Unterschied einer einzigen CH₂-Gruppe in der aliphatischen Seitenkette, um eine Trennung herbeizuführen.

Trotz der eben geschilderten Erfolge haben die Teststrich- und die Farbkopplungsmethode gewisse Nachteile. Um den Teststrich anzuwenden, muß die Adsorptionssäule, ohne zu zerbröckeln, aus dem Chromatogrammrohr herausgedrückt werden, was nicht immer gelingt, und es muß ein geeignetes Reagenz zur Kennzeichnung der Zonen zur Verfügung stehen, was bei vielen Stoffen nicht der Fall ist. Hinzu kommt, daß die „Entwicklung“ des Chromatogramms nicht verfolgt werden kann und bei verbogenen Zonen eine saubere Trennung schwer ist. Bei der Farbkopplungsmethode entfallen diese Schwierigkeiten. Dafür hat sie den Nachteil, daß bei der Überführung in farbige Derivate und deren rückläufiger Spaltung Verluste auftreten können und bei manchen Verbindungen solche Derivate garnicht zu erhalten sind.

In jüngster Zeit ist nun ein Verfahren entwickelt worden, daß bei einfacher Handhabung alle diese Schwierigkeiten umgeht und recht allgemeiner Anwendung fähig ist²⁸⁾. Es beruht auf folgender Überlegung. Die Zonen farbiger Stoffe werden dadurch sichtbar, daß sie einen Teil des weißen Lichtes selektiv adsorbieren. Die gleiche selektive Adsorption muß bei den Zonen farbloser Stoffe eintreten, wenn sie mit ultraviolettem Licht geeigneter Wellenlänge bestrahlt werden. Gelingt es, diese Adsorption sichtbar zu machen, so werden damit auch die Zonen erkennbar. Das ist, wie wir fanden, möglich, durch Verwendung fluoreszierender Adsorbentien. Ist deren Oberfläche mit einem farblosen Adsorbenden bedeckt, so wird bei Bestrahlung mit Ultraviolettlicht, dessen Wellenlänge innerhalb des Absorptionsbereiches des Adsorbenden liegt, ein Teil des fluoreszenzerregenden Ultraviolett absorbiert. Infolgedessen ist dort, wo sich Zonen befinden, die Fluoreszenz schwächer als da, wo die Säule „leer“ ist; die Zonen erscheinen daher dunkel auf hellem Grunde. Die einzelnen Körnchen des Adsorbens wirken also wie kleine Leuchtschirme. Als Adsorbens verwendeten wir bei unseren ersten Versuchen Aluminiumoxyd, das durch Erhitzen mit kleinen Mengen von Schwermetallen fluoreszierend gemacht worden war. Später stellte sich heraus, daß es bequemer ist, Adsorbentien dadurch fluoreszenzfähig zu machen, daß man sie mit kleinen Mengen einer fluoreszierenden Verbindung anfärbt, die zwei Bedingungen erfüllen muß. Sie darf mit den zu adsorbierenden Verbindungen nicht reagieren, und sie muß so fest am Adsorbens haften, daß sie beim Eluieren der Adsorptionszonen nicht abgelöst wird. Für Aluminiumoxyd eignet sich in dieser Hinsicht weitaus am besten, das zum Aluminium-Nachweis verwendete Pentaoxyflavon Morin, das schon in kleiner Menge dem Adsorbens eine leuchtend gelbe Fluoreszenz verleiht, ohne dessen Adsorptionsfähigkeit merklich zu beeinflussen. Es läßt sich mit Vorteil auch zur Herstellung von fluoreszierendem Calciumcarbonat und Magnesiumoxyd verwenden. An Stelle des Morins können auch andere Verbindungen benutzt werden, beim Aluminiumoxyd z. B. Salicylsäure, die blau fluoreszierende und Diphenyl-fluorindin-sulfosäure, die rot fluoreszierende Präparate liefert. Zur Herstellung fluoreszierender Kieselsäure eignet sich am besten Berberin (gelbe Fluoreszenz).

Bei den Adsorbentien mit Eigenfluoreszenz, wie den durch Erhitzen mit kleinen Metallmengen dargestellten oben erwähnten Aluminiumoxyd-Präparaten kommt die Schwächung der Fluoreszenz innerhalb der Zonen dadurch zustande, daß die jedes Teilchen des Adsorbens umhüllende Schicht der adsorbierten Substanz das fluoreszenzerregende Licht absorbiert, wodurch das darunterliegende als Leuchtschirm wirkende Teilchen weniger hell fluoresziert. Bei den angefärbten Adsorbentien (Fremdfluoreszenz) ist dieser Vorgang nicht möglich. Hier kann die Schwächung der Fluoreszenz dadurch hervorgerufen werden, daß der adsorbierte Stoff die Fluoreszenz einer unmittelbar neben ihm auf der Adsorbensoberfläche befindlichen Farbstoffmolekel löscht. Oder aber das einfallende UV-Licht wird durch die obersten Schichten des

²⁰⁾ H. Brockmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 211, 104 [1936].

²¹⁾ G. H. Coleman u. Mitarb., J. Amer. chem. Soc. 64, 1501 [1942]; 65, 1588 [1943]; 67, 381 [1945].

²²⁾ J. K. Merzweiler u. Mitarb., J. Amer. chem. Soc. 65, 2367 [1943].

²³⁾ E. J. Norberg, J. Auerbach u. R. M. Hixon, J. Amer. chem. Soc. 67, 342 [1945].

²⁴⁾ J. K. N. Jones, J. Chem. Soc. [London] 1944, 333.

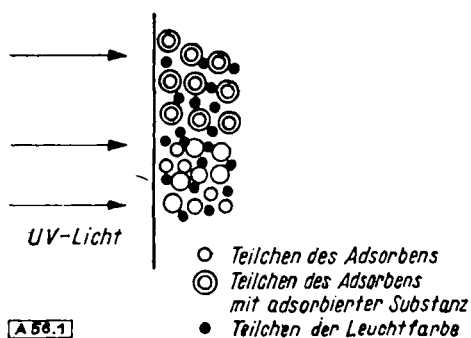
²⁵⁾ W. W. Binkley u. M. L. Wolfrom, J. Amer. chem. Soc. 68, 1720 [1946].

²⁶⁾ B. W. Lew, M. L. Wolfrom u. R. M. Goepf, J. Amer. chem. Soc. 68, 1449 [1946].

²⁷⁾ P. Karrer, R. Keller u. G. Szonyi, Helv. Chim. Acta, 26, 38 [1943].

²⁸⁾ H. Brockmann u. F. Volpers, Chem. Ber. 80, 77 [1947]; Naturwiss. 33, 58 [1946]; diese Ztschr. 59, 30 [1947].

mit farbloser Substanz beladenen Adsorbens absorbiert und kann nun die darunterliegenden fluoreszierenden Teilchen nicht oder nur noch wenig zur Fluoreszenz anregen. Wenn diese Überlegung richtig ist, müßten sich Zonen farbloser Substanzen auch dadurch sichtbar machen lassen, daß man dem Adsorbens eine zweite fluoreszierende aber nicht adsorbierende Substanz beimischt. Das ist nun, wie wir fanden, tatsächlich der Fall³⁹⁾. Vermischt man nämlich Aluminiumoxyd mit 5–10% seines Gewichtes einer Zinksulfid enthaltenden Leuchtfarbe, die selber nicht adsorbiert, so werden unter der Analysenlampe die Zonen farbloser Verbindungen dunkel auf hellem Grunde erkennbar, auch bei dem länger anhaltenden Nachleuchten der Adsorptionssäule. Bild 1 soll die Leuchtschirmfunktion der Zinksulfidteilchen deutlich machen.



Mit Hilfe von fluoreszierendem Morin-Aluminiumoxyd konnten z. B. folgende Gemische getrennt werden (die zuerst genannte Verbindung wird fester adsorbiert): Zimtaldehyd-Benzaldehyd, p-Methoxy-benzaldehyd-Benzaldehyd, Dimethylamino-benzaldehyd-Benzaldehyd, Vanillin-Piperonal, β -Jonon-Pseudojonon, Phoron-Mesityloxyd. Bei den meisten dieser Verbindungen läßt sich auf Grund der oben dargelegten Zusammenhänge zwischen Adsorption und Konstitution die Trennbarkeit voraussagen. Gut sichtbare Zonen gaben auch die zur Charakterisierung von Alkoholen verwendeten p-Nitrobenzoesäure-ester, sowie die zur Kennzeichnung von Säuren häufiger benutzten p-Brom- und p-Phenylphenacyl-ester.

Als Lichtquelle diente für diese Trennungen eine Analysenquarzlampe, deren Filter praktisch nur für die Linien 365 und 366,3 $m\mu$ durchlässig ist. Für Stoffe, die bei dieser Wellenlänge keine merkliche Absorption mehr zeigen, muß kurzwelligeres Licht verwendet werden, das sich verhältnismäßig leicht mit Hilfe geeigneter Filter gewinnen läßt. Wir benutzten zu dem Zweck ein Chlorfilter von 25 cm Länge und Fenstern aus Filterglas UG 5 der Firma Schott, das praktisch nur die Linie 253,7 $m\mu$ durchläßt. Mit dieser Anordnung konnten z. B. die Chromatogrammzonen des Ergosterins und des Patulins, die unter der Analysenlampe nicht zu erkennen sind, sichtbar gemacht werden. Damit ist gezeigt, daß an fluoreszierenden Adsorbentien alle farblosen Verbindungen, die zwischen 250 $m\mu$ und dem sichtbaren Teil des Spektrums merkliche Absorption zeigen, sichtbar gemacht werden können. Das bedeutet, daß die Mehrzahl aller für die Adsorptionstrennung überhaupt in Frage kommenden farblosen Stoffe durch das neue Verfahren der chromatographischen Adsorption zugänglich gemacht werden können.

Das Verteilungschromatogramm

Grundsätzlich ist jeder Vorgang, bei dem sich ein Stoff reversibel zwischen zwei Phasen verteilt, zur chromatographischen Verwendung geeignet, z. B. auch die Verteilung zwischen zwei begrenzt mischbaren Lösungsmitteln. Angenommen, es ließe sich

eine Säule aufbauen, die statt aus Körnchen eines festen Adsorbens aus Partikeln eines Lösungsmittels bestünde, so müßte sich diese Säule beim Durchströmen mit einer Lösung, die sich mit der Säulenflüssigkeit nicht mischt, wie eine Adsorptionssäule verhalten, d. h. die Komponenten des Gemisches würden nach Maßgabe ihres Verteilungskoeffizienten in die Säule übergehen. Das Verdienst, diese Überlegung in die Tat umgesetzt zu haben, gebührt Gordon, Martin und Synge⁴⁰⁾, die zeigen konnten, daß sich der Aufbau einer Säule aus Flüssigkeitspartikeln dadurch erreichen läßt, daß man die Flüssigkeit von feinkörnigem Kieselgel aufsaugen läßt. Die Flüssigkeitsteilchen erhalten dadurch ein Gerüst, das ihr Zusammenfließen verhindert. Mit dieser neuen, als „Verteilungschromatogramm“ bezeichneten Methode, konnten die Autoren Phenylalanin, Norleucin, Isoleucin, Leucin, Prolin und Valin in Form ihrer Acetyl-Derivate trennen und aus Proteinhydrolysaten auch Peptide abscheiden⁴¹⁾. Die Chromatogrammsäule bestand aus Kieselgel, das 70% seines Gewichtes an Wasser enthielt. Um die Zonen sichtbar zu machen, war dieses Wasser mit Methylorange angefärbt⁴²⁾. Als Lösungsmittel für die Acetyl-aminosäuren diente Chloroform, das 0,5 bis 1 Prozent n-Butanol enthielt. Wie Th. Wieland u. H. Fremery⁴³⁾ fanden, lassen sich die Kupfersalze von Valin und Alanin, mit Hilfe des Verteilungschromatogramms trennen, wobei als Lösungsmittel Phenol-Chloroform 1:1 verwendet wird, während die Säule mit phenol-gesättigtem Wasser getränkt ist. In der gleichen Weise ließen sich Leucin und Valin sowie Leucin und Prolin trennen.

Auch in der Zuckerchemie hat sich das Verteilungschromatogramm bewährt. So ließ sich an der wasserhaltigen Kieselgelsäule 2, 3, 4, 6-Tetramethyl-glucose von 2, 3, 6-Trimethyl-glucose und Dimethyl-glucose trennen⁴⁴⁾ (Lösungsmittel Chloroform), ein Ergebnis, das für die Endgruppenbestimmung bei Stärke und Glykogen von Bedeutung ist, zumal nur 50–200 mg Substanz erforderlich sind. Ferner hat das Verteilungschromatogramm zur Trennung von Glucose-pentaacetat und Cellobioseoctaacetat Verwendung gefunden⁴⁵⁾.

In der Reihe der niedermolekularen Fettsäuren gelang die Trennung von Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure⁴⁶⁾. Zu erwähnen ist, daß mit Hilfe des Verteilungschromatogramms die Bestimmung von Penicillin K in Penicillin-Gemischen möglich ist⁴⁷⁾.

Verwendet man Filtrierpapier als Träger der einen Phase, so lassen sich „zweidimensionale“ Chromatogramme herstellen, mit deren Hilfe in 400 mg eines Proteinhydrolysates 22 verschiedene Aminosäuren festgestellt wurden⁴⁸⁾.

Das neue Verfahren ist zweifellos ausbaufähig und wird sich mit Erfolg auf viele andere Stoffklassen anwenden lassen. Von Bedeutung ist, daß es eine andere physikalische Eigenschaft, die Löslichkeit, zur Grundlage hat. Sind also zwei Verbindungen in ihrer Adsorptionsaffinitäten so ähnlich, daß sie sich im Adsorptionsschichtchromatogramm nicht trennen lassen, so besteht immer noch die Möglichkeit, daß sie auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit im Verteilungschromatogramm zerlegt werden können. Bei farblosen Verbindungen lassen sich wie wir fanden die Zonen unter der Analysenlampe dadurch sichtbar machen, daß das Kieselgel mit Berberin fluoreszierend gemacht wird.

Eingeg. am 1. Juli 1947. [A 56]

³⁹⁾ A. H. Gordon, A. J. P. Martin u. R. L. M. Synge, *Biochemic. J.* 35, 91, 1358 [1941].

⁴⁰⁾ Dieselben, ebenda 37, 79, 86, 92, 313 [1943]; 38, 285 [1944]; 39, 363 [1945].

⁴¹⁾ Ein besonders geeigneter, schwer auswaschbarer Indikator ist von H. F. Liddell u. H. N. Rydon, *Biochemic. J.* 38, 68 [1944] angegeben.

⁴²⁾ H. Wieland u. H. Fremery, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 77, 234 [1944].

⁴³⁾ D. J. Bell, *J. chem. Soc. [London]* 1944, 473.

⁴⁴⁾ V. E. Gilbert, F. Smith u. M. Stacey, *J. Chem. Soc. [London]* 1946, 623.

⁴⁵⁾ L. L. Ramsey u. W. L. Patterson, *J. Assoc. off. Agric. Chemists* 28, 644 [1945].

⁴⁶⁾ H. Fischbach, M. Mundell u. T. E. Eble, *Science* 104, 84 [1946].

⁴⁷⁾ R. Conden, A. H. Gordon u. A. J. P. Martin, *Biochemic. J.* 38, 224 [1944]; 39, 355, 363 [1945].

³⁸⁾ H. Brockmann u. F. Volpers, Unveröffentlicht.