

Die chromatographische Trennung farbloser Verbindungen an fluoreszierenden Adsorbentien¹⁾

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN und Dipl.-Chem. E. BEYER, Organisch-chemisches Institut der Universität Göttingen

Die chromatographische Adsorption farbloser Stoffe an fluoreszierenden Adsorbentien wurde in ihrer Anwendung auf kurzzeitig absorbierende Verbindungen verbessert. Ein einfacher Monochromator wurde entwickelt, der ermöglicht, jede Adsorptionszone mit der geeigneten Wellenlänge zu belichten. Mit einer einfachen Vorrichtung konnten farblose Zonen ohne Verwendung fluoreszierender Adsorbentien photographisch sichtbar gemacht werden.

Die chromatographische Trennung farbloser Verbindungen war lange Zeit dadurch erschwert, daß ein allgemein anwendbares Verfahren zur Kenntlichmachung der farblosen Chromatogrammzonen fehlte. Diese Lücke in der Methodik ist seit kurzem durch die Einführung fluoreszierender Adsorbentien ausgefüllt worden²⁾. Belichtet man Chromatogrammsäulen aus solchem Material mit UV-Licht, dessen Wellenlänge im Absorptionsbereich der zu trennenden farblosen Stoffe liegt, so werden deren Adsorptionszonen als dunkle Ringe auf der hell fluoreszierenden Säule sichtbar.

Fluoreszierende Adsorbentien lassen sich auf zweierlei Weise gewinnen; entweder durch innige Vermischung des Adsorbens mit 1–5% seines Gewichtes einer geeigneten Leuchtfarbe³⁾, oder durch „Anfärben“ des Adsorbens mit kleinen Mengen einer fluoreszierenden Verbindung²⁾. Im ersten Fall wirken die Partikel der Leuchtfarbe als kleine Leuchtschirme, deren Fluoreszenzhelligkeit anzeigt, wie stark das eingestrahlte UV-Licht in der äußeren Schicht der Chromatogrammsäule absorbiert wird⁴⁾. Da diese Absorption bei Adsorbenteilchen, die mit farbloser Substanz beladen sind, stärker ist als bei unbeladenen, erscheinen die Chromatogrammzonen dunkler als die hell fluoreszierenden leeren Partien der Säule. Der gleiche Leuchtschirm- und Filtereffekt ist bei den durch Anfärben fluoreszierend gemachten Adsorbentien möglich. In manchen Fällen werden bei ihnen die Zonen aber auch dadurch sichtbar, daß die adsorbierte farblose Verbindung die Fluoreszenz des zum Anfärben benutzten Stoffes löscht.

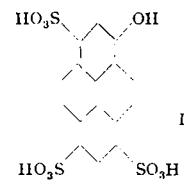
Die im folgenden beschriebenen Versuche hatten das Ziel, die Anwendung der Fluoreszenz-Methode bei solchen Verbindungen zu erleichtern, deren Absorption zwischen 220 und 320 m μ liegt. Dazu war eine Verbesserung der Adsorbentien und der bisher verwendeten Beleuchtung der Adsorptionssäulen erforderlich.

I. Fluoreszierende Adsorbentien

„Gefärbte“ Adsorbentien

Um Adsorbentien durch „Anfärben“ fluoreszenzfähig zu machen, braucht man fluoreszierende Verbindungen, die vom Adsorbens auch durch stark eluierend wirkende Solventien nicht abgelöst werden und in so kleiner Menge wirksam sind, daß ihre Gegenwart die Adsorptions-aktivität und -kapazität des Adsorbens nicht merklich verringert. Für Calciumcarbonat, Aluminiumoxyd und besonders für das viel gebrauchte Aluminiumoxyd genügt das Pentaoxy-flavon Morin diesen Anforderungen²⁾. Beim Kieselgel bewährte sich das ebenso wie Morin gelb fluoreszierende Berberin²⁾. Die Fluoreszenzhelligkeit der mit Morin und Berberin gefärbten Adsorbentien ist optimal bei Anregung mit langwelligem UV-Licht, dagegen gering bei Wellenlängen unterhalb 300 m μ . Infolgedessen sind die Zonen der in

diesem Bereich absorbierenden Verbindungen wenig kontrastreich. Wir haben daher versucht, zum Anfärben geeignete Substanzen ausfindig zu machen, die zwischen 220 und 300 m μ heller fluoreszieren als Morin und Berberin. Die Untersuchung verschiedener Verbindungen ließ uns in dieser Hinsicht bisher nur eine, und zwar für Aluminiumoxyd brauchbare finden, die 3-Oxypyren-5.8.10-trisulfosäure (I)⁵⁾. Wird „gesäuertes“ Aluminiumoxyd mit einer wäßrigen Lösung des Natriumsalzes von I behandelt⁶⁾, so werden die Cl-Ionen des Aluminiumoxydes gegen die Oxypyren-trisulfonat-anionen ausgetauscht und man erhält bei einer Beladung mit nur 80 mg Farbstoff auf 1 kg Aluminiumoxyd ein Adsorbens, dessen hellgrüne Fluoreszenz schon im langwelligen Ultraviolett heller ist als die eines Morin-Aluminiumoxydes mit 600 mg Farbstoff pro kg. Viel größer ist dieser Unterschied im kurzwelligen Ultraviolett. Während Morin-Aluminiumoxyd bei Bestrahlung mit Wellenlängen unterhalb 275 m μ nur noch schwach leuchtet, zeigt das mit I angefärbte Aluminiumoxyd auch bei 214 m μ noch helle Fluoreszenz.



Ein Farbstoff, der zur Herstellung fluoreszierender Adsorbentien dienen soll, darf auch von stark eluierenden Lösungsmitteln nicht abgelöst werden. Diese Bedingung ist bei I erfüllt, weil es als Anion am Adsorbens verankert ist. Da der Farbstoff nur die Cl-Ionen des Aluminiumoxyds ersetzt, wird dessen Adsorptionskapazität durch die Anfärbung nicht beeinflusst.

Bemerkenswert ist, daß beim Anfärben aus der alkoholischen Lösung des Natriumsalzes von I ein blau fluoreszierendes Aluminiumoxyd erhalten wird. Beim Behandeln mit Wasser schlägt seine Fluoreszenzfarbe nach grün um.

Die Aufgabe, ein für langwellig und kurzzeitig absorbierende farblose Verbindungen gleich brauchbares Aluminiumoxyd herzustellen, ist durch die Verwendung der Oxypyren-trisulfosäure gelöst. Einen in gleicher Weise für die Anfärbung von Kieselsäure geeigneten Farbstoff haben wir dagegen noch nicht gefunden.

Wie schon erwähnt, können bei Adsorbentien, die durch Anfärbung fluoreszenzfähig gemacht sind, die Zonen auch dadurch sichtbar werden, daß die adsorbierte farblose Substanz die Fluoreszenz des zum Anfärben benutzten Farbstoffes löscht. Ob diese Löschung durch Sekundäradsorption⁷⁾ oder durch eine Wechselwirkung der adsorbierten Verbindung mit den neben ihr auf der Adsorbensoberfläche befindlichen Molekeln des fluoreszierenden Farbstoffes zustande kommt, ist noch nicht geklärt. Auf jeden Fall spielt dabei die Lichtabsorption der farblosen Verbindung keine entscheidende Rolle. Ihre Zone wird auch dann sichtbar, wenn das zur Beleuchtung der Adsorptionssäule verwendete Licht langwelliger ist als der Absorptionsbereich der

¹⁾ V. Mittell. zur Kenntnis der Chromatographischen Adsorption. Vorgehen auf der 49. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft in Marburg, 19. Mai 1950.

²⁾ H. Brockmann u. F. Volpers, Naturwiss. 33, 58 [1946]; Chem. Ber. 80, 77 [1947].

³⁾ H. Brockmann, diese Ztschr. 59, 206 [1947]. J. W. Sease, J. Amer. chem. Soc. 69, 2242 [1947].

⁴⁾ H. Brockmann u. F. Volpers, Chem. Ber. 82, 95 [1948].

⁵⁾ E. Tietze u. O. Bayer, Liebigs Ann. Chem. 540, 189 [1939]; S. Petersen, diese Ztschr. 61, 17 [1949]. Wir verdanken das Präparat den Farbfabriken „Bayer“, Werk Leverkusen.

⁶⁾ 1 kg Aluminiumoxyd (standardisiert nach Brockmann oder ein gleichwertiges Präparat) wird in 2 n-HCl suspendiert, nach 1 h abfiltriert, gewaschen und anschließend in 400 cm³ Wasser, das 120 mg Natriumsalz der 3-Oxypyren-5.8.10-trisulfosäure enthält, suspendiert. Nach gründlichem Waschen wird bei 120–150° getrocknet.

⁷⁾ Adsorption der farblosen Verbindung am fluoreszierenden Farbstoff.

farblosen Verbindung, was praktisch bedeutet, daß sich unter Umständen auch sehr kurzwellig absorbierende Verbindungen unter der Analysenlampe an Morin-Aluminiumoxyd bzw. Berberin-Kieselsäure erkennen lassen. Ein Beispiel dafür gibt die Tabelle 1.

Adsorbens	Acetophenon	Benzaldehyd	Anisaldehyd
Morin-Al ₂ O ₃	++	+	+
3-Oxypyren-5.8.10-trisulfosäure-Al ₂ O ₃	++	++	++
8-Oxy-chinolin-Al ₂ O ₃ ^{b)}	++	+	+
2-Oxy-3-naphthoesäure ^{b)} -Al ₂ O ₃	++	+	+
Aluminiumoxyd + Leuchtfarbe K 4 grün/1 Dr. Franke, Frankfurt/M.	unsichtbar	unsichtbar	unsichtbar
Aluminiumoxyd + Leuchtfarbe grün Riedel-de-Haën	"	"	"
Aluminiumoxyd + Leuchtfarbe SF 152 rot Auer-Gesellschaft	"	"	"

Tabelle 1

(Sehr gut sichtbare Zonen ++, gut sichtbare +, Lichtquelle: Analysenlampe)

Acetophenon, Benzaldehyd und Anisaldehyd zeigen bei 366 m μ keine merkliche Lichtabsorption. Adsorbiert man sie an Aluminiumoxyd, das mit Leuchtfarbe vermischt ist, und belichtet mit einer Analysenquarzlampe (Wellenlänge 366 m μ), so sind, wie zu erwarten, die Adsorptionszonen unsichtbar, da das eingestrahle Licht durch die mit Substanz beladenen Adsorbentsteilchen nicht stärker absorbiert wird als durch die unbeladenen Teilehen. Adsorbiert man dagegen an Aluminiumoxyd, das mit einer der oben erwähnten Verbindungen angefärbt ist, so treten die Zonen infolge Fluoreszenzlösung deutlich in Erscheinung.

Leuchtfarben-Adsorbentien

Angefärbte Adsorbentien dürfen, um Zerstörung des Farbstoffes zu vermeiden, nicht höher als 150° erhitzt werden. Infolgedessen muß man beim Aluminiumoxyd und auch bei anderen Adsorbentien auf die erst bei höheren Temperaturen zu erreichende höchste Aktivitätsstufe verzichten. Diesen Nachteil haben die durch Beimischung von Leuchtfarbe hergestellten Adsorbentien nicht. Ein weiterer Vorzug dieses Verfahrens besteht darin, daß ein und dieselbe Leuchtfarbe für jedes beliebige Adsorbens verwendet werden kann, d. h. auch bei solchen, für die geeignete fluoreszierende Verbindungen zum Anfärben nicht gefunden werden können. Das Leuchtfarben-Verfahren ist also allgemeiner anwendbar als die Anröbung der Adsorbentien.

Die anfangs von uns benutzte Leuchtfarbe war ein grün phosphoreszierendes Präparat der Firma *Riedel-de-Haën*. Da wir unsere Adsorptionssäulen zunächst nur mit der Analysenlampe, also immer mit der gleichen Wellenlänge belichteten, war das lange Nachleuchten insofern günstig, als die Zerlegung der Säule nicht unter der Lampe durchgeführt zu werden brauchte. Soll dagegen schnell hintereinander mit Licht verschiedener Wellenlänge beleuchtet werden, wie beim Arbeiten mit dem unten beschriebenen Monochromator, so sind phosphoreszierende Präparate unbrauchbar.

Um das Leuchtfarben-Verfahren auch für kurzwellig absorbierende Verbindungen allgemein anwendbar zu machen, kam es darauf an, aus den vielen Leuchtfarben des Handels eine herauszusuchen, die folgende Bedingungen erfüllt:

1. Helle Fluoreszenz auch im kurzwelligen Ultraviolett.
2. Gute Mischbarkeit mit den Adsorbentien.
3. Keine Phosphoreszenz.
4. Unempfindlichkeit gegen Erhitzen, um eine Neuaktivierung des Adsorbens zu ermöglichen.

Diesen Anforderungen entspricht auf Grund unserer Versuche in vorbildlicher Weise die Leuchtfarbe K 4 grün/1 von Dr. *Franke*, Frankfurt/Main. Ihre Fluoreszenz ist so hell, daß eine Beimischung in Höhe von 1% des Adsorbengewichtes ausreichend ist. Durch Auswaschen und Erhitzen auf höhere Temperatur lassen sich die Adsorbens-Leuchtfarbenmischungen regenerieren.

^{b)} Das mit 8-Oxychinolin und 2-Oxy-3-naphthoesäure angefärbte Aluminiumoxyd läßt sich nur mit langwelligem UV-Licht zur Fluoreszenz anregen. Weiterhin wurde auch Eosinsäure zur Herstellung fluoreszierenden Aluminiumoxyds benutzt. Seine Fluoreszenz reicht mit genügender Helligkeit bis 214 m μ .

II. Die Beleuchtung der Adsorptionssäulen

Um unsere Methode auch für die Chromatographie solcher Verbindungen nutzbar zu machen, die bei 366 m μ nicht merklich absorbieren und daher unter der Analysenlampe nicht sichtbar werden, haben wir, wie früher beschrieben, aus der Strahlung einer Hg-Niederdrucklampe mit einer Filterkombination Chlorgas-UG 5 Glas (Schott & Gen.) das Licht der Hg-Linie 253.7 m μ herausfiltriert und zur Beleuchtung der fluoreszierenden Adsorptionssäulen benutzt. Da hierbei die Lichtausbeute nur etwa 20% beträgt, war ein großer Filterdurchmesser erwünscht. Wir verzichteten daher auf die Verwendung eines *Oldenberg*-Chlorfilters, das bekanntlich Chlorgas unter 7 Atü enthält und daher meistens ein klein dimensioniertes Quarzgefäß hat, und bedienten uns einer mit Chlor unter Atmosphärendruck gefüllten Glas-küvette von 25 cm Länge und 8 cm Durchmesser, die mit Fenstern aus UG 5 Glas versehen war. Durch dieses Filter wurde ein durch eine Quarzlinse parallel gemachtes Strahlenbündel der Hg-Lampe geschickt, eine Anordnung, mit der an fluoreszierenden Leuchtfarbe-Adsorbentien kurzwellig absorbierende Verbindungen sichtbar gemacht werden konnten. Die Länge der Küvette und die Schwierigkeit, sie gasdicht zu machen, sind Nachteile dieses Filters. Wir haben daher versucht, ob sich an Stelle des gasförmigen Chlors seine Lösung in Tetrachlorkohlenstoff verwenden läßt. Das ist in der Tat der Fall. Wegen der guten Löslichkeit von Chlor in Tetrachlorkohlenstoff (ca. 2 Mol pro l gegenüber einer Konzentration von weniger als 0.05 Mol pro l in der Gasküvette) war es möglich, die Schichtdicke auf 4 mm zu reduzieren. Das Gefäß zur Aufnahme der Chlor-Lösung bestand aus zwei UG-5-Glasscheiben von 1.5 mm Stärke und 8 cm Durchmesser, die mit geschmolzenem Silbernitrat auf einen gläsernen Distanzring aufgeklebt waren. Der Tetrachlorkohlenstoff muß sorgfältig gereinigt werden; Spuren von Schwefelkohlenstoff z. B. bewirken eine merkliche Absorption bei 300 m μ . Dieses Filter ist dem Chlorgasfilter durch seine Handlichkeit und vor allem dadurch überlegen, daß man es ohne Kollimatorlinse dicht vor die Lichtquelle in deren divergierendes Strahlenbündel bringen und dadurch eine größere Fläche beleuchten kann.

Die Hg-Lampe in Verbindung mit dem eben erwähnten Filter, oder mit dem Filter der Analysenlampe ist eine auch im organisch-chemischen Laboratorium leicht zugängliche Lichtquelle, mit der sich die Chromatogrammmzonen zahlreicher farblos-er Verbindungen an fluoreszierenden Adsorbentien sichtbar machen lassen. Sie erfaßt aber nicht oder nur unvollkommen diejenigen Stoffe, deren Absorption zwischen 260 und 350 m μ liegt.

Um an fluoreszierenden Adsorbentien optimale Kontraste zwischen den Zonen und den leeren Teilen der Adsorptionssäule zu erhalten, muß jede Zone mit einer Wellenlänge belichtet werden, die dem Hauptabsorptionsmaximum der in der Zone enthaltenen Substanz entspricht. Dazu braucht man eine Lichtquelle, deren Wellenlänge weitgehend variiert werden kann. Eine solche Variation ist, da geeignete Filtersätze für kurzwelliges UV-Licht vorläufig nicht zur Verfügung stehen, nur durch einen Monochromator in Verbindung mit einer linienreichen Lichtquelle möglich. Ein solcher Monochromator muß, um sich in der Praxis durchzusetzen, einfach und preiswert sein und neben ausreichender Lichtstärke eine möglichst große Dispersion aufweisen. Diesen Anforderungen entsprechend wurde die in Bild 1, 2 und 3 wiedergegebene Apparatur gebaut.

Als Lichtquelle dient ein Eisenbogen zwischen 8 mm starken Elektroden, die sich in einem mit Schornstein und Beobachtungsfenster versehenen Blechgehäuse befinden. Die durch den Hebel H bewegliche, mit Schraube 1 feststellbare Elektrode E₁ ist geerdet, die feste untere Elektrode E₂ (vom Blechkasten durch eine Trolitulplatte isoliert) über einen Schalter S und Steckkontakt St (zum Anschluß des Vorschaltwiderstandes) mit der Phase verbunden. Auf richtige Polung ist daher zu achten. Das Licht des Eisenbogens fällt durch einen Spalt Sp, der etwa 3–4 mm geöffnet wird, auf die in Rohr R angebrachte Quarzlinse L (Brennweite 100 mm, Durchmesser 50 mm). R steckt auf der einen Seite in einem am Blechgehäuse hinter dem Spalt Sp angesetzten Rohr R₁, auf der anderen Seite im Rohransatz des Prismagehäuses G und kann durch die Schraube 2 festgestellt werden. Der ganze Apparat ist auf einer Eisensehne montiert, auf der sich das Lampengehäuse verschieben läßt. Hierdurch und durch das verschiebbare Linsenrohr R ist der Abstand Spalt-Linse, sowie Linse-Prisma variierbar.

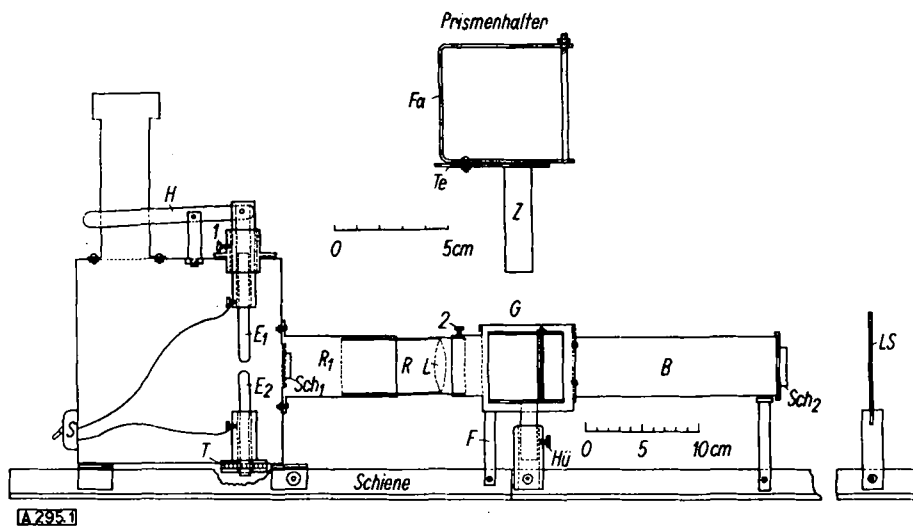


Bild 1
Monochromator-Schnitt, seitlich

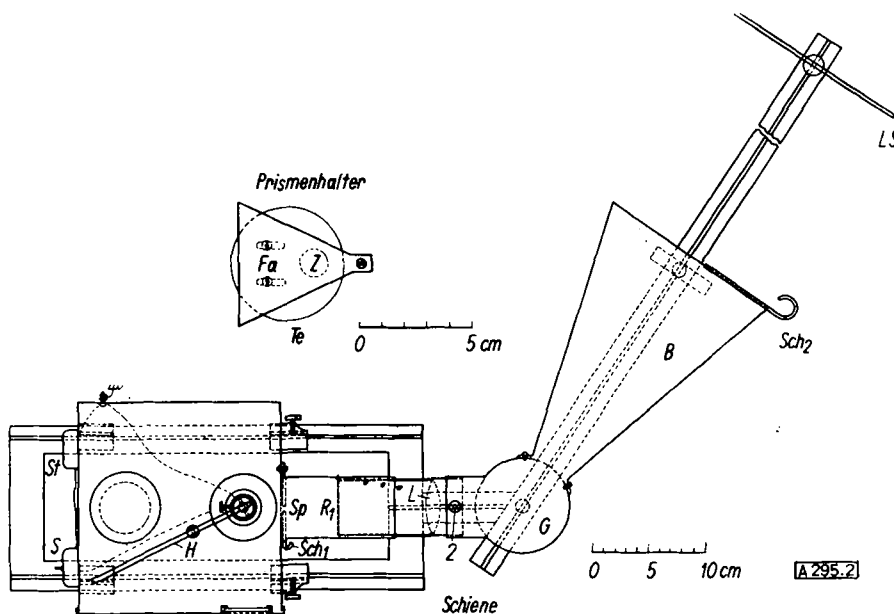


Bild 2
Monochromator. Schnitt von oben

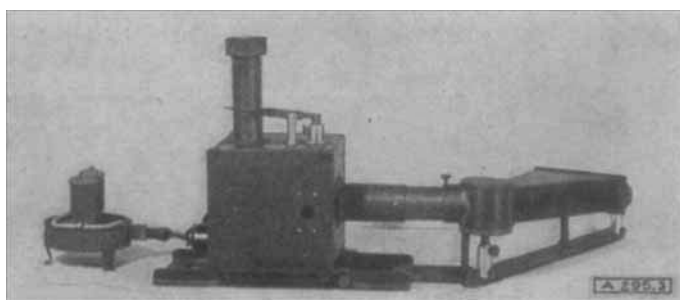


Bild 3
Monochromator
(links Kochplatte und Spule als Vorschaltwiderstand)

Das mit einem abnehmbaren Deckel versehene Prismagehäuse G ist durch F auf der Schiene befestigt. Seine Bodenplatte ist zum Durchlaß des Prismenhalters durchbrochen. In der Hülse Hü läßt sich der Prismenhalter in seiner Höhe verschieben und um seine Vertikalachse drehen. Der Prismenhalter (Bild 1b) besteht aus einem auf Zapfen Z befestigten Teller Te und der Fassung des Prismas Fa. Zwei am Boden der Fassung angebrachte Schrauben gleiten in entsprechenden Schlitz des Tellers und gestatten dadurch die Horizontaljustierung des Prismas. Am Prismagehäuse sitzt der Blendschirm B, der an seiner Öffnung einen Schieber Sch₂ zum Abblenden des sichtbaren Spektralgebietes trägt.

Nach Einschalten des Lichtbogens bildet man dessen Spektrum durch geeignete Einstellung der Linse und des Prismas auf einem Leuchtschirm LS ab. Durch den Schieber Sch₂ wird nun der sichtbare Teil des Spektrums herausgeblendet und der Schirm in der gleichen Stellung so umgedreht, daß das jetzt unsichtbare Spektrum auf seine Rückseite fällt. Durch Verschieben des zu untersuchenden Chromatogramms (Quarz) vor dem Schirm gelingt es leicht, die für die Erkennung der Zonen günstigste Wellenlänge aufzufinden.

Enthält die Adsorptionssäule Verbindungen mit weiter auseinanderliegenden Absorptionsbereichen, so werden die Zonen, wenn man die Säule von längeren zu kürzeren Wellenlängen verschiebt, nacheinander sichtbar. Zuerst treten die langwellig absorbierenden Zonen hervor, werden beim Weiterschieben schwächer und verschwinden schließlich, während an den vorher hell fluoreszierenden Teilen der Säule nunmehr die kurzwellig absorbierenden Zonen sichtbar werden.

Die mit dem Quarzprisma (gleichseitig, brechende Kante 60°, Höhe⁹⁾ und Kantenlänge 40 mm, Quarzglas Sorte 2 der Firma Heraeus) erreichbare Dispersion war für die Beleuchtung kleiner Säulen ausreichend, für größere jedoch nicht. Wir haben das Quarzprisma daher durch ein gleich großes aus Kochsalz (Einkristall aus synthetischem NaCl¹⁰⁾) ersetzt, das wesentlich billiger ist als das aus Quarzglas. Die damit erhaltene Länge des UV-Spektrums betrug 12 cm (gegenüber 6 cm bei Quarz) und erwies sich auch für die Beleuchtung größerer Säulen als vollkommen ausreichend. Infolge der hohen Reinheit des Kochsalzes war das Prisma gegen Luftfeuchtigkeit so unempfindlich, daß sich eine Beheizung erübrigte.

Leuchtschirme.

Als Leuchtschirme zum Sichtbarmachen des UV-Spektrums unseres Monochromators dienten mit einer Mischung von Leuchtfarbe und Kaltleim bestrichene Papptafeln. Mit einer grünen Leuchtfarbe der Firma Riedel-de-Haën erhielten wir Schirme, die mit Wellenlängen bis 214 mμ herunter zu heller Phosphoreszenz anregbar waren. Für nicht nachleuchtende Schirme wurde an Stelle der Leuchtfarbe ein mit Oxypyrentrisulfosäure angefärbtes Aluminiumoxyd benutzt. Die Fluoreszenz dieser billigen Schirme, deren Anregungsbereich bis mindestens 214 mμ geht, ist erheblich intensiver als bei den handelsüblichen Leuchtfarben. Durch Baden von Cellophanfolien in einer alkoholischen Lösung des Natriumsalzes von I wurden durchsichtige Leuchtschirme hergestellt, die aber das auffallende Licht nur unvollkommen absorbieren oder dispergieren. Gut haben sich dagegen Schirme bewährt, die durch Baden von Pergamentpapier in der gleichen Lösung gewonnen werden. Sie zeigen in der Durch- und Aufsicht blaue Fluoreszenz (Anregungsbereich bis mindestens 214 mμ) und lassen sich gut verwenden, um in den mit Ultraviolett durchleuchteten gläsernen Röhren einer Gegenstromverteilungsapparatur die Konzentrationen farbloser Verbindungen zu vergleichen.

III. Die photographische Indikation farbloser Zonen

Außer mit Hilfe von fluoreszierenden Adsorbentien können die Chromatogrammzonen farbloser Verbindungen auch durch Photographie der Adsorptionssäule im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Da die Zonen stärker absorbieren als die leere Säule, müssen sie auf dem Negativ heller erscheinen als die unbesetzten Teile der Säule. Um zu prüfen, ob diese Methode, die keine fluoreszierenden Adsorbentien erfordert, praktisch brauchbar ist, wurde die in Bild 4 wiedergegebene Versuchsanordnung benutzt.

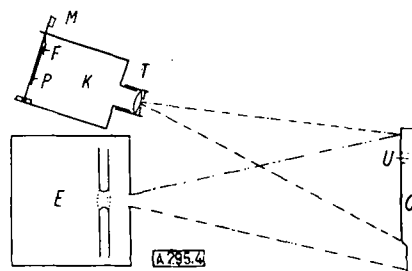


Bild 4

E = Eisenbogen; C = Chromatogramm mit unsichtbarer Zone U; K = Kamera mit Linse und Blende im Tubus T und Mattscheibe M bzw. Kassette mit Klemmfeder F für Photopapier P

⁹⁾ Diese Höhe des Prismas erwies sich als günstig, um einen genügend breiten Teil der Säule zu belichten.

¹⁰⁾ Den Kochsalzeinkristall verdanken wir der Badischen Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen, den Schliff besorgte die Firma Steeg und Reuter.

Zur photographischen Aufnahme der in einem Quarzrohr befindlichen, mit einem Eisenbogen beleuchteten Chromatogrammsäule diente eine einfache Kamera, bestehend aus einem lichtdichten Holzkasten, mit einer in einem Tubus verschiebbaren Quarzlinse von 3 cm Durchmesser und 10 cm Brennweite. Der Abstand der durch eine Lochblende von 1 cm Öffnung abgeblendeten Linse von der Mattscheibe betrug 20 cm. Die Aufnahme erfolgte wie Bild 3 zeigt, schräg von oben, um störendes Reflexlicht auszuschalten. Nachdem das Bild der Säule scharf auf die Mitte der Mattscheibe eingestellt war, wurde diese durch einen lichtdicht schließenden Holzschieber ersetzt, der in der Mitte befestigt durch eine Klemmfeder einen Streifen Vergrößerungspapier (Format 6×1) trug. Belichtet wurde durch kurzes Wegnehmen der auf dem Linsentubus sitzenden Verschlusskappe.

Bild 5 gibt eine Reihe von Aufnahmen wieder, wie man sie beim Entwickeln des Papiers erhält. Da ein Blatt vom Format 6×9 acht Aufnahmestreifen liefert, ist die Photographie nicht teurer als die Anwendung von Leuchtfarben-Adsorbentien¹¹⁾.

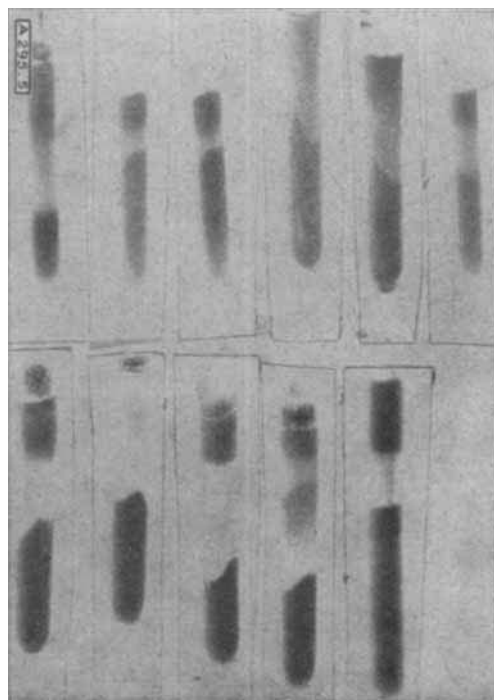


Bild 5

An Hand der Bilder ist es leicht, die Lage der Zonen auf dem Chromatogrammrohr zu markieren und dementsprechend die Zerlegung der Säule durchzuführen. Die Veränderung des Abstandes Kamera – Säule ermöglicht eine verschiedene Vergrößerung des Säulenbildes, während durch Variation von Dauer und Intensität der Belichtung, sowie durch die Art der Entwicklung die Kontraste abgestuft werden können. Am empfindlichsten arbeitet die Methode, wenn zur Beleuchtung der Säule der Monochromator verwendet wird.

Die photographische Indikation hat den Vorzug, daß sie für alle Adsorbentien bis ins kurzwellige UV anwendbar ist und einen geringen apparativen Aufwand¹²⁾ erfordert. Bei allen Verbindungen, die sich an fluoreszierenden Adsorbentien sichtbar machen lassen, bietet ihre Anwendung jenem Verfahren gegenüber keinen besonderen Vorteil. Jedoch kann sie bei kurzwellig absorbierenden Verbindungen mit schwacher Extinktion und geringer Adsorptionsaffinität (und demzufolge geringer Beladungsdichte) von Bedeutung werden, weil sie Kontraste erfaßt, die sich mit der Fluoreszenzmethode nicht mehr erkennen lassen. Von Interesse erscheint es uns daher, ihre Brauchbarkeit bei der Verteilungschromatographie zu prüfen, z. B. bei der Trennung von Aminosäuren an Adsorptionssäulen aus Stärke oder Cellulosepulver.

IV. Zusammenfassung

Welche der beschriebenen Methoden für eine bestimmte Trennung die beste und bequemste ist, hängt vom Absorptionsspektrum der Verbindungen und ihrer Adsorptionsaffinität ab.

¹¹⁾ Die für 1 kg Adsorbens benötigte Leuchtfarbe kostet 2.80 DM, 100 Blatt Photopapier (6×9) zum Preis von 3.— DM ermöglichen 800 Aufnahmen.
¹²⁾ Die Kosten der Apparatur sind praktisch die der Quarzlinse.

Für die Auswahl gelten folgende Gesichtspunkte:

1. Allgemein anwendbar für alle farblosen Verbindungen:
 - a) Leuchtfarben-Adsorbentien. Lichtquelle: Eisenbogen mit Monochromator.
 - b) Photographische Methode. Von Vorteil bei kurzwellig absorbierenden Verbindungen mit geringer Extinktion und kleiner Adsorptionsaffinität.
2. Für langwellig absorbierende Verbindungen: Methoden unter 1 oder Morin-aluminiumoxyd, Berberin-Kieselsäure, Leuchtfarben-Adsorbentien. Lichtquelle: Analysenlampe.
3. Für kurzwellig absorbierende Verbindungen mit Absorption bei ungefähr 250 mμ: Leuchtfarbenadsorbentien, Oxypyren-trisulfosäure-Aluminiumoxyd. Lichtquelle: Hg-Lampe mit Chlor-UG 5-Glas-Filter oder die unter 1 genannten Verfahren.

V. Trennung von Stilben-Derivaten

In einer früheren Arbeit haben wir eine Reihe von Stilben-Derivaten, die sich durch die Natur einer p-ständigen funktionellen Gruppe unterscheiden, chromatographisch untersucht, um den Einfluß funktioneller Gruppen auf die Adsorptionsaffinität kennenzulernen. Wir haben diese Verbindungen erneut untersucht, indem wir sie paarweise zu gleichen Teilen gemischt und unter gleichen Bedingungen aus einem Gemisch von Tetrachlorkohlenstoff-Chloroform 1:1 an fluoreszierendem Aluminiumoxyd und Kieselsäure chromatographierten. Die Adsorptionsrangordnung ist in Tabelle 1 wiedergegeben, sie ist für Aluminiumoxyd und Kieselsäure die gleiche. Carbomethoxy- und Dimethylaminostilben, die an Aluminiumoxyd nur unvollkommen trennbar sind, geben an Kieselsäure sauber getrennte Zonen.

Substanz	R _L	R _F
p-Acetaminostilben	0,10	0,02
p-Aminostilben	0,09	0,04
p-Acetoxytilben	0,19	0,05
p-Dimethylaminostilben	0,26	0,05
Carbomethoxytilben	0,30	0,08
p-Nitrostilben	0,37	0,15
p-Methoxytilben	0,58	0,26
Stilben	0,91	0,5

Tabelle 2

Zur zahlenmäßigen Kennzeichnung des chromatographischen Verhaltens einer Verbindung verwendet man neuerdings den Quotienten R, den man erhält, wenn man den Weg, den die Zone innerhalb einer bestimmten Zeit zurücklegt, durch den Weg dividiert, den das Lösungsmittel in gleicher Zeit durchläuft. Je nachdem, ob die Wanderungsgeschwindigkeit der Zone am unteren, meist scharfen Rand oder am oberen gemessen wird, unterscheidet man R_L- und R_F-Werte (L = leading, F = following). Die für die untersuchten Stilben-Derivate mit Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel gemessenen R-Werte sind in Spalte 2 und 3 der Tabelle 1 aufgeführt, wobei der mittlere Fehler für die R_L-Werte optimal 10% beträgt, während er für die R_F-Werte bis zu 20% ansteigen kann. Hieraus geht klar hervor, daß die R-Werte zwar Aufschluß über die Adsorptionsaffinitäten der einzelnen Substanzen zu geben vermögen, aber über ihre Trennbarkeit voneinander nur recht beschränkte Aussagen zulassen; denn unter Berücksichtigung der Fehlerbreite für die Zonenfronten zweier benachbarter Substanzen der R-Reihe folgt ein weitgehendes Überdecken der R-Werte und somit der zu erwartenden Zonen.

Daß die Substanzen dennoch chromatographisch viel besser voneinander trennbar sind als die R-Werte vermuten lassen, deutet bereits darauf hin, daß in der mit Substanzgemischen beschickten Säule doch andere Verhältnisse vorliegen müssen als an der nur eine Substanz enthaltenden Säule. In dieser Richtung weist auch die folgende Beobachtung, die zugleich die Bedeutung der R-Werte für die Trennung von Substanzgemischen abschwächt.

Auf drei gleichartige Al₂O₃-Säulen wurden Lösungen von p-Nitrostilben (a) p-Methoxytilben (c) und ein Gemisch beider (b) aufgegeben und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich nach entsprechender Zeit nebenstehendes Bild 6 (schematisch):

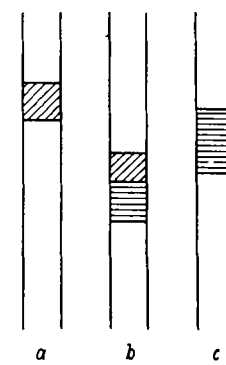


Bild 6

Während die reinen Komponenten in den gemäß ihren R-Werten erwarteten Höhen der Säule a, c vorgefunden wurden, hatte sich in der Säule b das Gemisch einwandfrei in die beiden Zonen getrennt, die dicht übereinander, aber an viel tieferer Stelle der Säule saßen, als ihren R-Werten entspricht. Es scheint hier also ein Verdrängungsprozeß zweier Substanzen vorzuliegen — wie er bereits 1943 von Tiselius beschrieben wurde¹³⁾ —, bei dem das fester haftende Nitrostilben das Methoxytilben „vor sich herschiebt“.

Eingeg. am 7. August 1950.

[A 295]

¹³⁾ A. Tiselius, Kolloid-Z. 105, 101 [1943].