

There would appear to be no clear correlation between the severity of the hypoxic state and the preoperative state of the lungs and the nature of the cardiac lesion. Thus we have been forced to consider factors other than pre-existing mechanical damage.

The severity of the postoperative hypoxic state could vary with such factors as: (1) the histocompatibility of white blood cells and the lungs of the perfused patient; (2) the age of blood used to prime the pumps; (3) the duration of the perfusion by the extracorporeal pumps; (4) the preoperative state of the lungs; (5) the preoperative state of the coronary circulation.

The spontaneous recovery, we believe, is due to the destruction of the invading plasma cells by the defences of the host and also to the resolution of the oedema caused partly by the plasma cells and partly by the general effect of the extracorporeal perfusion¹².

Zusammenfassung. Bei Patienten, bei welchen ein extrakorporaler Blutkreislauf durchgeführt wurde, fanden sich in den Lungen grosse Mengen von Plasmazellen. Bei

Benützung von frischem homologem Blut für die Ingangsetzung des extrakorporalen Kreislaufes scheinen die Plasmazellen des Spenderblutes in den Lungen schädigend zu wirken. Sie können möglicherweise für Kapillarschädigungen und Störungen des normalen Gasaus tauschs verantwortlich gemacht werden.

D. G. MELROSE, R. NAHAS, D. ALVAREZ,
I. A. D. TODD, and W. J. DEMPSTER

Experimental Surgical Unit and Nuffield Unit of Clinical Physiology, Department of Surgery, Postgraduate Medical School of London (England), August 19, 1964.

¹² Acknowledgments: The expenses involved in these experiments were defrayed by a grant from the Nuffield Trust (D.G.M.) and by a grant from the Wellcome Trust and by a generous personal gift from Sir BILLY BUTLIN (W.J.D.). We are grateful for technical assistance from Miss BEATON, Miss BROWN, Miss HANLY and Mr. SPARKS, Mr. WILLIAMS and Mr. ADAMS.

PRO EXPERIMENTIS

Polyzonale Dünnschichtchromatographie. Chromatographische Fliessmittelentmischung und ihre Anwendung zur Trennung von Substanzgemischen

I. Teil: Duozonale Dünnschichtchromatographie, Theorie und Praxis

Dünnschicht- (DC) und Papierchromatographie (PC) unterscheiden sich von anderen Chromatographieverfahren wesentlich dadurch, dass das trockene Sorptionsmittel erst während des Trennprozesses mit dem Fliessmittel in Berührung kommt. Es besteht also anfangs kein Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase, und deshalb erleidet ein mehrkomponentiges Fliessmittel beim Eindringen in die Schicht zwangsläufig eine teilweise Entmischung. Diese Erscheinung ist von der PC her wohlbekannt¹⁻⁹. Ein entsprechender Vorgang bildet die Basis der Frontalanalyse¹⁰ nach TISELIUS¹¹⁻¹⁵.

Die Entmischung macht sich besonders deutlich bemerkbar, wenn das Fliessmittel – z. B. ein binäres Gemisch – Komponenten von deutlich verschiedener Polarität enthält. Das Sorptionsmittel nimmt vom einströmenden Fliessmittel beide Komponenten bis zur Einstellung des jeweiligen lokalen Gleichgewichts zwischen mobiler und stationärer Phase auf. Weil dabei die polarere Komponente bevorzugt abgefangen wird, entsteht allmählich hinter der Fliessmittelfront (α -Front) ein sich stetig erweiternder Bereich (α -Zone), der nur noch die weniger polare Fliessmittelkomponente enthält. Nach hinten ist die α -Zone durch eine β -Front gegen eine β -Zone abgegrenzt, welche das Fliessmittel in seiner ursprünglichen Zusammensetzung enthält und welche bis zum Eintauchspiegel zurückreicht. Da aus dem Fliessmittelbehälter ständig frisches Fliessmittel nachströmt, erweitert sich auch die β -Zone. Die Wanderungsgeschwindigkeit der β -Front ist gegenüber derjenigen der α -Front um einen

konstanten Verzögerungsfaktor k_β ¹⁶ kleiner. Es ist deshalb in jedem Zeitpunkt

$$\frac{\text{Distanz Eintauchspiegel-}\beta\text{-Front}}{\text{Distanz Eintauchspiegel-}\alpha\text{-Front}} = k_\beta. \quad (1)$$

Die durch k_β gekennzeichnete Lage der β -Front ist für ein gegebenes Sorptionsmittel und eine gegebene qualitative Fliessmittelzusammensetzung eine Funktion des

¹ E. C. MARTIN et al., *J. Chromatogr.* **10**, 338, 347 (1963).

² H. G. BUNGENBERG DE JONG und J. TH. HOOGEVEEN, *Proc. Acad. Sci. (Amsterdam)* **64 B**, 18, 167, 183 (1961).

³ J. BOUZKOVÁ, M. HEJTMÁNEK und I. VAVRUCH, *Coll. Czech. Chem. Comm.* **22**, 1219 (1957).

⁴ F. H. POLLARD, J. F. W. McOMIE und D. J. JONES, *J. chem. Soc. 1955*, 4337.

⁵ K. MACEK, *Chem. Listy* **48**, 1181 (1954).

⁶ G. KOWKABANY und H. G. CASSIDY, *Anal. Chem.* **24**, 643 (1952).

⁷ R. MUNIER, M. MACHEBOEUF und N. CHERBIER, *Bull. Soc. Chim. biol.* **34**, 204 (1952).

⁸ H. G. BOMAN, *Nature* **170**, 703 (1952).

⁹ M. LEDERER, *Nature* **162**, 776 (1948).

¹⁰ Bei der Frontalanalyse bringt man zunächst die Chromatographiesäule ins Gleichgewicht mit dem Lösungsmittel und lässt dann eine verdünnte Lösung des Substanzgemisches solange hindurchlaufen, bis die Substanzkonzentration (Brechungsindex) im Säuleneinlauf und Säulenaustritt identisch wird. Jede Komponente des Substanzgemisches verursacht eine *Stufe* im Diagramm «Brechungsindex gegen ausgeflossenes Volumen».

¹¹ A. TISELIUS, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* **14 B**, Nr. 22 (1940).

¹² S. CLAESSON, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* **20 A**, Nr. 3 (1945); **23 A**, Nr. 1 (1946); **24 A**, Nr. 7 (1946).

¹³ J. GRIFFITHS, D. JAMES und C. PHILLIPS, *Analyst* **77**, 897 (1952).

¹⁴ A. KLINKENBERG und G. G. BAYLE, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **76**, 593, 607 (1957).

¹⁵ I. FATT und M. A. SELIM, *J. phys. Chem.* **63**, 1641 (1959).

¹⁶ POLLARD et al.⁴ benützen hierfür das Symbol R_p , BOUZKOVÁ et al.³ das Symbol A .

Mischungsverhältnisses. Der experimentell feststellbare Zusammenhang wird durch Beziehung (2) dargestellt:

$$\log \left(\frac{1}{k_\beta} - 1 \right) = \alpha - \zeta \log c, \quad (2)$$

wobei α sowie ζ Konstanten sind und c die Konzentration der polareren Fliessmittelkomponente in Molprozent bedeutet¹⁷.

Eine Beziehung dieser Form lässt sich unter gewissen vereinfachenden Annahmen auch aus der Freundlichischen Adsorptionsisotherme herleiten: Ein Fliessmittel aus einer stärker (P) und einer schwächer polaren Komponenten (Q), deren Wechselwirkung miteinander gering sei, möge als ideale Lösung von P in Q aufgefasst werden. Seine Zusammensetzung c werde durch die Konzentration von P in Mol/l ausgedrückt. Enthält das Adsorbens der β -Zone, das sich während der Chromatographie mit diesem Fliessmittel im Gleichgewicht befindet, pro Gewichtseinheit a Mole adsorbiertes P , so gilt¹⁸:

$$a = \alpha c \frac{1}{n}, \quad (3)$$

wobei

a = Spezifische Belegungsdichte

α = Adsorptionskoeffizient von P im Lösungsmittel Q

c = Gleichgewichtskonzentration (Mol/l) von P , identisch mit ursprünglicher Konzentration von P im Fliessmittelbehälter

$n = \text{const} > 1$.

Die Laufstrecke der α -Front betrage L cm und jene der β -Front $k_\beta L$ cm. In der Sorptionsschicht befindet sich daher ein Fliessmittelfilm mit der Länge L cm, der Breite B und der mittleren Höhe H . Dieser Fliessmittelfilm ist inhomogen: Die Sorptionsschicht mit der Länge $k_\beta L$ cm, der Breite B , der mittleren Höhe h und der Dichte d hat aus ihm $(1 - k_\beta)L B H c$ Mole der Komponente P abgefangen. Die Belegungsdichte beträgt also

$$a = \frac{(1 - k_\beta)L B H c}{k_\beta L B h d}. \quad (4)$$

(4) in (3) eingesetzt ergibt nach Umformung

$$\log \left(\frac{1}{k_\beta} - 1 \right) = \log \frac{h d}{H} \alpha + \left(\frac{1}{n} - 1 \right) \log c. \quad (5)$$

Schreibt man $1 - 1/n = \zeta'$ und

$$\log \frac{h d}{H} + \log \alpha = \alpha', \quad (6)$$

so ergibt sich unmittelbar die formale Übereinstimmung von (5) mit (2). Beachte den Unterschied im Konzentrationsmass!

Wie man aus (2) ersieht, wird k_β um so grösser, je grösser die Konzentration und je kleiner der Adsorptionskoeffizient [vgl. (6)] der polareren Komponente ist. Aus der Gleichung geht jedoch explizit nicht hervor, welchen Einfluss die als Lösungsmittel dienende unpolare Komponente (vgl. dazu Tabelle I) und der Aktivitätsgrad (z. B. Luftfeuchtigkeit) der Schicht auf den Wert von k_β ausüben. Während die Freundlichische Adsorptionsisotherme streng nur für kleinere Konzentrationen gilt, scheint Beziehung (2) in einem weiten Konzentrationsbereich anwendbar zu sein. Er erstreckt sich im System Benzol/Pyridin von 1 bis mindestens 42 Mol-% Pyridin ($\alpha = 0,6$, $\zeta = 0,84$) und im System Toluol/Eisessig von 2 bis mindestens 32 Mol-% Eisessig ($\alpha = 0,91$, $\zeta = 0,82$); diese

Angaben beziehen sich auf Versuche bei 20° mit lufttrockenen Schichten von Kieselgel G «Merck» (Streichgerät Desaga, Schlitzbreite 0,25 mm; relative Luftfeuchtigkeit 40%) unter Verwendung der horizontalen Chromatographier technik¹⁹. Tabelle I soll eine Vorstellung von der jeweiligen Lage der Entmischungslinie einiger in der DC verwendbarer Systeme geben. Im Sinne einer Faustregel ergibt sich, dass die Konzentration von P vervierfacht werden muss, wenn k_β von 0,4 auf 0,6 ansteigen soll.

Die β -Front kann im allgemeinen leicht nachgewiesen werden: Spuren von Verunreinigungen aus Schicht, Filterpapierbrücke²⁰ oder Fliessmittel reichern sich gern an der Entmischungslinie an und lassen diese im Tageslicht dunkler erscheinen; sie können auch im UV fluoreszieren oder aber mit Sprühreagenzien reagieren. Siedet die polarere Fliessmittelkomponente deutlich höher als die weniger polare, so hebt sich die β -Zone beim Trocknen der Platte vorübergehend merklich ab. Basen- oder Säurenzonen werden durch sofortiges Besprühen mit Universalindikatorlösung erkannt. In jedem Fall aber ergibt sich die Lage der β -Front aus dem chromatographischen Verhalten geeigneter Substanzen (siehe Figur 2 und 3).

Substanzerhalten und R_f -Werte bei duozonaler Dünnenschichtchromatographie. Um das Verhalten von Substanzen

Tabelle I. k_β -Werte einiger Fliessmittel aus zwei Komponenten, auf Kieselgel G «Camag» (lufttrockene Platten vor der Chromatographie 15 min auf 110°C erhitzt). Das Molverhältnis der polaren zur unpolaren Komponente beträgt jeweils 1/10, in den eingeklammerten Beispielen 1/40. Es handelt sich um Einzelexperimente bei 15°C in der BN-Kammer¹⁹

Unpolare Komponente	ml	Polare Komponente	ml	k_β
Benzol	88,7	n-Butylacetat	13,2	0,68
Benzol	88,7	n-Butylacetat	(3,3)	(0,46)
Benzol	88,7	Eisessigester	9,8	0,61
Benzol	88,7	Methylacetat	8,0	0,58
Benzol	88,7	Methyläthylketon	8,9	0,54
Benzol	88,7	Methyläthylketon	(2,2)	(0,30)
Benzol	88,7	Benzylalkohol	10,3	0,47
Benzol	88,7	t-Butanol	9,4	0,46
Benzol	88,7	sec-Butanol	9,2	0,47
Benzol	88,7	n-Butanol	9,1	0,45
Benzol	88,7	iso-Propanol	7,6	0,41
Benzol	88,7	n-Propanol	7,5	0,39
Benzol	88,7	Athanol	5,8	0,34
Benzol	88,7	Methanol	4,0	0,27
Cyclohexan	108	n-Butylacetat	13,2	0,63
Cyclohexan	108	1,2-Dichlorathan	7,2	0,43
Cyclohexan	108	Eisessig	5,7	0,13
1,2-Dichlor-athan	78,7	Eisessig	5,7	0,42
n-Butylacetat	132	Eisessig	5,7	0,51

¹⁷ Tabellen zur Umrechnung von k_β in $\log(1/k_\beta - 1)$ und umgekehrt findet man, wenn dazu $k_\beta \approx R_f$ und $\log(1/k_\beta - 1) \approx R_m$ gesetzt wird, z. B. in E. STAHL, «Dünnenschicht-Chromatographie» (Springer-Verlag, Heidelberg 1962), p. 519, und in I. M. HAIS und K. MACKE, «Handbuch der Papierchromatographie» (VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1958), Bd. I, p. 65.

¹⁸ H. FRUNDELICH, Z. phys. Chem. 57, 394 (1907).

¹⁹ M. BRENNER und A. NIEDERWIESER, Exper. 17, 237 (1961); eine entsprechende Apparatur ist unter dem Namen «BN-Kammer» im Handel erhältlich (Firma Desaga, Heidelberg).

²⁰ Eine Filterpapierbrücke überträgt bei unserer Chromatographieranordnung¹⁹ die mobile Phase vom Fliessmitteltrog auf die Schicht.

zu verstehen, die in einem zweikomponentigen Fliessmittel bei kleinem Trennkammervolumen¹⁹ chromatographiert werden, muss man sich vor Augen halten, dass der Startpunkt der Substanz aus technischen Gründen praktisch nie mit der Startlinie des Fliessmittels (Eintauchspiegel) zusammenfallen kann (vgl. Figur 1). Im Moment, da die Fliessmittelfront auf den Substanzflecken trifft, hat also die Fliessmittelentmischung schon eingesetzt: die verschiedenen Fronten existieren bereits, auch wenn ihr Abstand noch beliebig klein sein sollte. Es kann nun die Substanz schon in der α -Zone oder auch erst in der β -Zone wandern (Figur 3). Im erstenen Falle gibt es folgende Möglichkeiten. Die Substanz läuft:

schneller als die β -Front ($Rf > k_\beta$, Figur 2, oberste Fleckenreihe),

in konstantem Abstand vor der β -Front ($Rf = k_\beta$),

langsamer als die β -Front ($Rf < k_\beta$),

wird aber nicht eingeholt (Figur 2, rechte Hälfte, zweit- und drittoberste Fleckenreihe),

wird eingeholt und wandert fortan mit der β -Front (Figur 2, linke Hälfte, Verdrängung!),

wird überholt und wandert fortan in der β -Zone (Figur 4, unterste und mittlere Fleckenreihen).

In Figur 1 sind drei Fleckenpositionen eingezeichnet, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegen können. Die

Verhältnisse sind besonders einfach, wenn der Fleck in der α -Zone wandert und $Rf \geq k_\beta$. Weil der Substanzfleck während des Trennprozesses nicht von der β -Front eingeholt wird, bleibt der im zusammengesetzten Fliessmittel beobachtete Rf -Wert bis zum Versuchsabbruch gleich wie derjenige, den man findet, wenn die Substanz nur mit der reinen, unpolareren Komponente des Fliessmittels chromatographiert wird. Tabelle II belegt, dass Art und Konzentration der polareren Komponente keinen Einfluss auf Rf -Werte von Substanzen ausüben, welche bis zum Versuchsabbruch in der α -Zone wandern. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die polare Komponente nicht sehr leichtflüchtig ist und ein

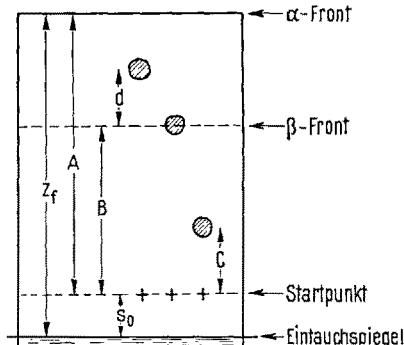


Fig. 1

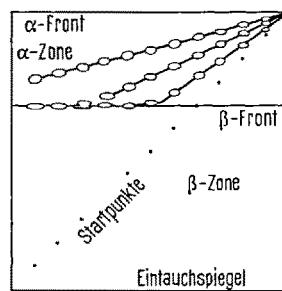


Fig. 2

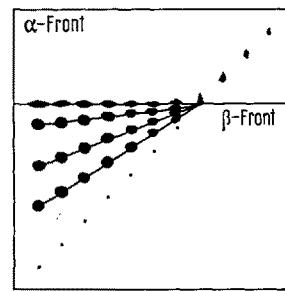


Fig. 3

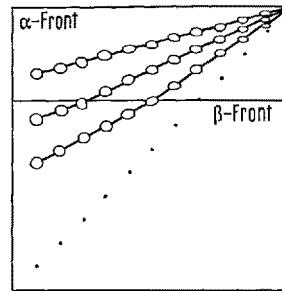


Fig. 4

Fig. 2–4. Mögliches Substanzerhalten in Fliessmitteln aus zwei Komponenten (schematisch). Zur Staffelung der Startpunkte vgl. Text. Von allen Startpunkten aus, die zur gleichen Diagonalen gehören, wird das gleiche Substanzgemisch chromatographiert.

Tabelle II. Bei Chromatographie in mehrkomponentigen Fliessmitteln verhalten sich die Substanzen, solange sie in der α -Zone wandern, genau wie in den reinen, unpolarsten Fliessmittelkomponenten: Die Rf -Werte einiger 2,4-Dinitrophenylamine verändern sich nicht, wenn man dem Fliessmittel Benzol, Pyridin und Eisessig als polare Komponenten zusetzt

Fliessmittelzusammensetzung			k_β	αRf -Werte ^a von	DNP-	DNP-	DNP-	DNP-
Benzol	Pyridin	Eisessig		Methylamin	Äthylamin	n-Propylamin	n-Butylamin	n-Amylamin
100	0	0	—	0,29	0,39	0,47	0,52	0,56
95	5	0	0,48	0,30	0,41	0,48	0,54	0,58
90	10	0	0,62	0,29	0,39	0,47	0,52	0,57
80	20	0	0,75			0,46		0,56
60	40	0	0,84	0,28	0,39	0,46	0,52	0,57
80	20	2	0,75			0,46		0,56

^a Rf -Werte wie üblich auf die α -Front bezogen. Angegeben sind Mittelwerte aus jeweils 3 Einzelmessungen. BN-Kammer¹⁹, horizontale Technik; lufttrockenes Kieselgel G «Merck», rel. Luftfeuchtigkeit 40% bei 20°C. $z_f = 14$ cm; s_0 wurde bei Substanzen mit $Rf < k_\beta$ so gross gewählt, dass die β -Front die Flecken bis zum Versuchsabbruch nicht überholen konnte.

kleines Trennkammervolumen vorliegt. – Wenn $Rf = k_\beta$, so ergibt sich anhand von Figur 1 für den Abstand d zwischen Fleck und β -Front

$$d = s_0 (1 - k_\beta) = \text{const.}$$

Ist d zufällig sehr klein, so mag die nahe β -Zone die Wanderung des Flecks beeinflussen. Ein Einfluss ist insbesondere dann zu erwarten, wenn die polarere Fließmittelkomponente wesentlich stärker eluiert als die weniger polare; er äußert sich darin, dass der Quotient

$$\frac{d_{\text{beobachtet}}}{s_0 (1 - k_\beta)}$$

größer als 1 wird. Bei unserer Chromatographieranordnung (bedeckte Platte¹⁰) und Fließmittelkomponenten mit Siedepunkten > 70° ist dies in der Regel erst bei $d < 4$ mm nachweisbar. Wir sehen darin einen Hinweis, dass der Konzentrationsgradient an der β -Front sehr steil ist.

Das Bild wird komplizierter, wenn $Rf < k_\beta$. Ein Fleck, der in der α -Zone wandert, wird zu demjenigen Zeitpunkt von der β -Front eingeholt, da das Verhältnis

$$\varphi = \frac{s_0}{z_f} = \frac{\text{Distanz Eintauchspiegel - Start}}{\text{Distanz Eintauchspiegel - } \alpha\text{-Front}} \quad (7)$$

den Wert $\varphi = (k_\beta - Rf)/(1 - Rf)$ erreicht hat. Von nun an wandert die Substanz nicht mehr unabhängig von der β -Zone (Figur 2 und 4). Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ändert sich beim Auftreffen der β -Front sprunghaft, und zwar nicht nur wegen des Unterschieds der Fließmittelgeschwindigkeit vor und hinter der β -Front. Mit der Änderung der Fließmittelzusammensetzung ergibt sich nämlich eine Änderung des Verteilungskoeffizienten, und infolgedessen ist der nunmehr gültige Rf -Wert (retardation factor!) nicht mit dem ursprünglichen, für die Substanzwanderung in der α -Zone massgeblichen Rf -Wert identisch. Wir unterscheiden zweckmäßig ein αRf und βRf ²¹ und begnügen uns hier mit der Definition

$$\beta Rf = \frac{\text{Substanzweg in der } \beta\text{-Zone}}{\text{Substanzweg in der } \beta\text{-Zone} + \text{Distanz Fleck-}\beta\text{-Front}} \quad (8)$$

Das effektive Substanzverhalten in Abhängigkeit von den Chromatographierbedingungen (Abmessungen des Chromatogramms) lässt sich hier am besten durch die Angabe des totalen Substanzweges $S_{\alpha\beta}$ beschreiben; die Indices α , β sollen die «gemischte» Wanderung in der α - und β -Zone andeuten. Man findet bei Benutzung von Figur 1 unter Berücksichtigung der Bedingungen

$$k_\beta > \alpha Rf, \quad z_f > s_0 \frac{1 - \alpha Rf}{k_\beta - \alpha Rf}$$

$$S_{\alpha\beta} = \beta Rf k_\beta z_f - \frac{k_\beta (\alpha Rf + \beta Rf - \alpha Rf \beta Rf) - \alpha Rf}{k_\beta - \alpha Rf} s_0 \quad (9)$$

wobei nach (7): $s_0 = \varphi z_f$.

Der unterhalb der β -Front gelegene Teil von Figur 4 entspricht einer graphischen Darstellung von (9). Indem ein gegebenes Substanzgemisch mehrfach auf ein und denselben Platte von Startpunkten aus chromatographiert wird, die auf einer schrägen Linie, z. B. einer Plattendiagonalen, liegen, erzielt man bei konstantem z_f in einfacher Weise eine Variation von s_0 bzw. φ (7).

Ausschließliche Fleckenwanderung in der β -Zone macht die Verhältnisse wieder übersichtlicher und ist dann zu erwarten, wenn eine Substanz für das Fließmittel der α -Zone zu polar ist ($\alpha Rf = 0$). Appliziert man ein entsprechendes Substanzgemisch auf mehrere Startpunkte längs einer Plattendiagonalen, so resultiert nach der Chromatographie das in Figur 3 gezeigte Bild. Man beachte, dass die Lage der β -Front als Schnittpunkt von Geraden definiert ist, auf denen Substanzen gleicher Wanderungsgeschwindigkeit sitzen (chromatographische Identifizierung einer Front). – Die α -Front ist hier zu keinem Zeitpunkt richtiger Bezugsort für die Rf -Messung; der «natürliche» Bezugsort ist die β -Front, und entsprechend berechnete Rf -Werte werden zweckmäßig als βRf bezeichnet²¹.

Es ist nun wichtig, die Wanderungsstrecke S_β eines solchen nur der β -Wanderung unterworfenen Flecks festzuhalten und insbesondere die φ -Abhängigkeit von S_β mit jener von $S_{\alpha\beta}$ zu vergleichen. Man findet aus (9) oder bei Benutzung von Figur 1 unter Berücksichtigung der Bedingungen $\alpha Rf = 0$, $z_f > s_0(1/k_\beta)$

$$S_\beta = \beta Rf k_\beta z_f - \beta Rf s_0, \quad (10)$$

wobei nach (7): $s_0 = \varphi z_f$. Figur 3 entspricht einer graphischen Darstellung von (10).

Aus der Gegenüberstellung von (9) und (10) und ebenso aus einer Überlagerung (Figur 5) der Figur 3 und 4 ergibt sich, dass Fleckenpositionen von Substanzen, die sich nach (9) bzw. Figur 4 verhalten, gegenüber Fleckenpositionen von solchen Substanzen, die sich nach (10) bzw. Figur 3 verhalten, verschiebbar sind, indem man φ bzw. s_0 verändert. Eine Änderung von s_0 verändert somit den Trenneffekt. Im Falle des Schemas nach Figur 5 ist es offensichtlich am besten, wenn von dem mit einem Pfeil bezeichneten Startpunkt aus chromatographiert wird.

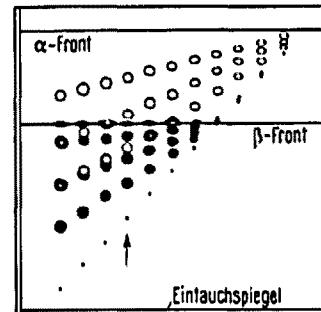


Fig. 5. Die Treuigkeit ist eine Funktion von φ [Definition siehe (7)]. Die optimale Lage des Startpunktes ist durch einen Pfeil bezeichnet. Bei nachfolgenden routinemässigen Trennungen desselben Substanzgemisches bedient man sich dieser Erfahrung.

²¹ M. BRENNER, A. NIEDERWIKSER, G. PATAKI und R. WEBER, in E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie* (Springer-Verlag, Heidelberg 1962), p. 119.

²² C. G. HONEGGER berichtet in Helv. chim. Acta 46, 1732 (1963) über vergebliche Trennversuche von «Testgemisch Stahl» in Petroläther/n-Butanol (8:2) sowie von Lipidgemischen in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4) bei Verwendung der Desaga S-Kammer. Der Grund für beide Misserfolge ist unserer Ansicht nach Fließmitteltentmischung.

Bei Verwendung zweikomponentiger Fliessmittel laufen gelegentlich mehrere Substanzen mit der Entmischungslinie und bleiben dann ungetrennt (vgl. Figur 2 und 3)²². Die Elutionskraft der mobilen Phase steigt offenbar an der β -Front zu stark an. Man muss in solchen Fällen ein Fliessmittel wählen, dessen Komponenten sich nicht so stark in ihrer Polarität unterscheiden (versuchsweise auch die reine, unpolarere Komponente verwenden!), oder eine sehr leichtflüchtige polare Komponente (z. B. Methylenchlorid, Äther, Methylformiat) einführen bzw. Trennkammervolumen vergrössern (Verwischung der β -Front durch Konzentrationsausgleich über die Dampfphase) oder aber zu vielkomponentigen Fliessmitteln

übergehen. Wir beschränken uns im nachfolgenden II. Teil auf eine Untersuchung dieser dritten Möglichkeit.

(Fortsetzung: vide Exper., vol. XXI, fasc. 2 (1965).)

A. NIEDERWIESER²³ und M. BRENNER

Institut für Organische Chemie der Universität Basel (Schweiz), 28. Mai 1964.

²² Gegenwärtige Adresse: Forschungslabor der Neurologischen Universitätsklinik Basel (Schweiz).

A Medium to Demonstrate the Ligninolytic Activity of some Fungi

Techniques for easily and rapidly demonstrating the ability of a microorganism to break down wood or its individual constituents are of economic and theoretical significance. Although there are several methods^{1,2} for rapidly determining the cellulolytic activities of microorganisms, using relatively unaltered cellulose as a substrate, few techniques exist for determining their ligninolytic abilities. This is probably because of the difficulty of readily obtaining unaltered lignin, due to its usually close association with cellulose in plant material.

SØRENSEN³ prepared lignin by chemical extraction from pine and spruce wood flour; he incorporated this in solid media and was able to determine the ligninolytic activities of bacteria by their ability to clear the resultant opaque media. The technique used to extract the lignin rather precludes the adoption of this clear-cut method for routine use.

Methods which have been used to determine the ligninolytic activities of fungi have usually relied either on the gross form of the rot produced, or on chemical analysis of the attacked wood, or on the production of polyphenol oxidases, which are often produced by ligninolytic Basidiomycetes.

In the method to be described, ball-milled beech (*Fagus sylvatica* L.) sawdust is used as the major carbon source in an agar medium; this is similar to the method of EGGINS and PUGH² to determine the cellulolytic activities of fungi by the use of ball-milled cotton cellulose. The resultant medium is fawn and opaque and sets in Petri dishes with the ball-milled wood particles evenly distributed. The ability of a fungal culture to break down lignin (as well as cellulose and hemicelluloses) is shown by its clearing of the medium, which can usually be observed within fourteen days from inoculation. As it is considered⁴ that ligninolytic fungi are usually cellulolytic as well, the presence of cellulose in the medium is not a marked disadvantage.

The medium has the following constituents: ammonium sulphate 0.5 g; L-asparagine 0.5 g; potassium dihydrogen phosphate 1.0 g; potassium chloride 0.5 g; crystalline magnesium sulphate 0.2 g; calcium chloride 0.1 g; ball-milled beechwood 10 g; water to 1 l. The beechwood is prepared by ball-milling for 96 h a 4% suspension in

water of sawdust (which has been passed through a sieve of aperture 0.15 mm). This suspension of ball-milled beechwood sawdust is added to the other constituents of the medium after they have been steamed and before autoclaving for 20 min at 10 lb pressure. The final pH of the medium is 5.0.

A number of known ligninolytic Basidiomycetes, e.g. *Peniophora gigantea* (Fr.) Massee, *Polystictus sanguineus* (L.) Mey, *P. versicolor* (Linn.) Fr. and *Lenzites trabea* (Pers.) Fr., have produced complete clearing of the medium showing that they are ligninolytic as well as cellulolytic; such fungi may also be shown to be cellulolytic when grown on the ball-milled cotton cellulose medium².

Although the effect of ball-milling on the association of lignin and cellulose has not yet been determined, it is considered that this technique may be of use in studying the deterioration by fungi of wood species in general; it may also be of use in toxicity testing of wood preservatives.

Zusammenfassung. Es wird hier eine neue Methode angeführt, um die holzauflösende Fähigkeit einiger Pilze zu bestimmen. Ein milchiges, homogenes Agarmedium wird hergestellt, indem man kugelgemahlenes Buchensägemehl als hauptsächliche Kohlenstoffquelle benutzt. Wenn man in dieses Medium bestimmte holzzerstörende Pilze einpflanzt, wird sowohl ihre holzspaltende als auch ihre zellulosezerstörende Wirkung dadurch gezeigt, dass das Medium unter dem Wurzelgeflecht sich aufklärt.

H. O. W. EGGINS

Department of Biological Sciences, College of Advanced Technology, Birmingham (England), August 14, 1964.

¹ R. E. HUNGATE, Bact. Rev. 14, 1 (1950).

² H. O. W. EGGINS and G. J. F. PUGH, Nature 193, 94 (1962).

³ H. SØRENSEN, J. gen. Microbiol. 27, 21 (1962).

⁴ W. G. CAMPBELL, in *Wood Chemistry* (Ed. L. E. WISE and E. C. JAHN; Reinhold Publishing Corp., New York 1952), vol. 2, p. 1061.