

Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie

4. Die chromatographische Adsorption*)

Von Doz. Dr. habil. H. BROCKMANN

Biochemische Abt. des Allg. Chemischen Universitätslaboratoriums Göttingen

Historisches.

Zu Beginn dieses Jahrhunderts machte der russische Botaniker *Tswett* bei der Untersuchung pflanzlicher Pigmente eine Beobachtung von großer Bedeutung. Als er einen mit Petroläther hergestellten Blattextrakt durch ein mit Calciumcarbonat gefülltes Rohr filtrierte, bildeten sich in der Calciumcarbonatschicht farbige Zonen aus, die sich beim Nachwaschen mit dem Lösungsmittel deutlich trennten und langsam in bestimmtem Abstand voneinander durch die Säule des Adsorptionsmittels wanderten. Trennte man nach Entfernen des Lösungsmittels die farbigen Zonen mechanisch voneinander und eluierte sie mit Methanol, so erhielt man die einzelnen Farbstoffkomponenten des Pflanzenextraktes.

Diese Auftrennung beruht grob umrissen offenbar darauf, daß durch die obersten Schichten der Adsorptionssäule zunächst vorwiegend die Komponente mit der größten Affinität zum Adsorbens aus der Lösung herausadsorbiert wird. Dann erfolgt überwiegend die Adsorption der Komponente mit der zweitgrößten Adsorptionsaffinität, dann die mit der drittgrößten und so fort. Daneben findet durch die dauernd nachfließende Lösung, besonders aber durch das Nachwaschen mit reinem Lösungsmittel, eine Elution der einzelnen Zonen und daran anschließend eine erneute Adsorption in den darunterliegenden Schichten der Säule statt. Die Zonen enthalten zunächst neben der als Hauptmenge vorhandenen Komponente des Gemisches fast immer noch mehr oder weniger große Mengen von anderen Stoffen geringerer Adsorptionsaffinität. Diese werden beim Nachwaschen zuerst eluiert, wodurch eine weitere Fraktionierung eintritt. Beim Wandern der Zonen während des Nachwaschens findet eine dauernde Elution und Adsorption statt, in deren Verlauf schließlich bei genügend großer Differenz in den Adsorptionsaffinitäten eine völlige Trennung der Komponenten stattfindet. *Tswett*, der diese Zerlegung in der Säule mit der spektralen Zerlegung des Lichtes verglich und die Bedeutung seiner Methode klar erkannte, bezeichnete sie als „chromatographische Adsorption“ oder kurz als „Chromatographie“ und benutzte sie lediglich für analytische Zwecke. Er veröffentlichte seine Ergebnisse 1906 in botanischen Zeitschriften¹⁾ und 1910 zusammenfassend in einem nur in russischer Sprache erschienenen Buch über „Chromophylle“²⁾.

Die geniale Methode *Tswetts* blieb lange Zeit fast unbeachtet³⁾; vielleicht weil die betr. Arbeiten dem Chemiker schwer zugänglich waren, vielleicht aber auch, weil *Willstätter* nachwies, daß bei der von *Tswett* studierten Adsorption des Chlorophylls an Calciumcarbonat eine Veränderung des Farbstoffes eintritt, wodurch der Wert der Methode zweifelhaft erscheinen konnte. Erst im Jahre 1931, nachdem inzwischen die Enzymarbeiten der *Willstätterschen* Schule die große Leistungsfähigkeit der Adsorption zur Trennung empfindlicher Stoffe gezeigt hatten, wurde die *Tswettsche* Methode in ihrer ganzen Bedeutung von *R. Kuhn* neu entdeckt. Arbeiten auf dem Carotinoidgebiet, bei denen die klassischen Trennungsmethoden nur sehr unvollkommene Ergebnisse lieferten, waren es, die dringend ein besonders spezifisches und schonendes Trennungsverfahren erforderten und den Anlaß gaben, sich der Chromatographie zu erinnern.

Nachdem sich die Methode im *Kuhnschen* Laboratorium bei der Mikroanalyse von Carotinoiden bestens bewährt hatte⁴⁾, wurde sie zum ersten Male präparativ von *Kuhn*, *Winterstein* u. *Lederer*⁵⁾ zur Auftrennung des Eidotterfarbstoffes und zur Reindarstellung des Luteins aus Pflanzen, sowie von *Kuhn* u. *Lederer*⁶⁾ zur Zerlegung des bis dahin für einheitlich gehaltenen Carotins in α - und β -Carotin benutzt. Daß auch die Trennung sehr ähnlicher Stoffe, die in sehr ungleichem Mengenverhältnis vorliegen, glatt gelingt, zeigte die Entdeckung des γ -Carotins⁷⁾, dessen Menge in dem als Ausgangsmaterial verwendeten Carotin etwa 0,1% betrug. Es ist ein glücklicher Umstand gewesen, daß die erste präparative Anwendung der *Tswettschen* Methode auf dem Gebiet der Carinoide erfolgte, auf dem ihre Leistungsfähigkeit besonders eindrucksvoll hervortrat, denn dadurch wurde die Anregung gegeben, die chromatographische

Adsorption auch bei anderen Stoffklassen zu erproben. Hier hat sich besonders *Winterstein* verdient gemacht, der im *Kuhnschen* Institut die alten Versuche *Tswetts* zur chromatographischen Trennung des Chlorophylls wieder aufgriff und zeigen konnte, daß sich durch Adsorption an Puderzucker eine präparative Trennung von Chlorophyll a und b durchführen läßt⁸⁾. Ferner wies er nach, daß die Methode mit gutem Erfolg zur Trennung polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe verwendet werden kann⁹⁾. Eine weitere wichtige Anwendung der Chromatographie kurz nach ihrer Wiederentdeckung war die von *Karrer* u. Mitarb. durchgeführte¹⁰⁾ Anreicherung des A-Vitamins aus Fischleberölen, die so weit getrieben wurde, daß mit den besten Fraktionen die Konstitutionsermittlung des Vitamins möglich war.

Die chromatographische Adsorption hat sich dann schnell auf den verschiedensten Gebieten bewährt und steht heute den klassischen Trennungsmethoden der Chemie ebenbürtig zur Seite. Über ihre Handhabung und ihren Anwendungsbereich berichtet eine Reihe von zusammenfassenden Darstellungen¹¹⁾, von denen die ausgezeichnete Monographie von *Zeichmeister* u. *v. Cholnoky*¹²⁾ besonders hervorgehoben werden muß.

Wenn trotzdem an dieser Stelle nochmals ein Referat gebracht wird, so geschieht es deswegen, weil der Anwendungsbereich der Methode noch sehr erweiterungsfähig ist und eine erneute Zusammenfassung des bisher Erreichten vielleicht Anregung zu weiterem Ausbau der Chromatographie geben kann. Da im Rahmen dieses Aufsatzes auf eine auch nur einigermaßen erschöpfende Darstellung verzichtet werden muß, sollen nur die für die praktische Anwendung wichtigen Punkte zusammengestellt und durch einige Erfahrungen ergänzt werden, die wir während einer langjährigen Beschäftigung mit der Methode gesammelt haben. Die Einteilung des Stoffes in einen Teil, der die Technik der chromatographischen Adsorption schildert und einen solchen, der ihre Anwendung behandelt, ergibt sich von selber.

Die Technik der chromatographischen Adsorption.

Die chromatographische Adsorption besteht, wie eingangs schon angedeutet, darin, die Lösung der zu trennenden Stoffe durch eine lange, festgefügte Schicht eines geeigneten Adsorptionsmittels zu filtrieren, die sich in einem Glasrohr, dem Adsorptionsrohr befindet, und anschließend mit dem Lösungsmittel nachzuwaschen. Dabei kann die Filtration allein durch den Druck der im Rohr befindlichen Flüssigkeitssäule oder aber durch Überdruck erfolgen. Die entstandenen Zonen werden nach Entfernen des Lösungsmittels voneinander getrennt und mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert.

Adsorptionsröhren. Als Adsorptionsröhren dienen im einfachsten Fall Glasröhren geeigneter Länge und Weite, an deren einem stark verjüngten Ende ein enges Ablaufrohr angesetzt ist. Vor Einfüllen des Adsorptionsmittels wird das Ablaufrohr an der Ansatzstelle mit einem festen Wattepfropf verschlossen. Wir verwenden für Vorversuche Röhren von 8—10 cm Länge und 0,8 cm Dmr., für die meisten präparativen Arbeiten solche von 20—35 cm Länge bzw. 4—6 cm Dmr. Im allg. ist es nicht zweckmäßig, die Röhren sehr viel länger zu bemessen, da sonst das Herausheben der Zonen Schwierigkeiten macht und bei feinkörnigen Adsorptionsmitteln die Durchlaufgeschwindigkeit zu gering wird. Um ein gleichmäßiges Filtrieren am Rand und im Inneren der Säule zu erreichen, wurde von *Winterstein* vorgeschlagen, den unteren Teil des Rohres an Stelle des Wattedausches mit einer Glassinterplatte zu verschließen¹³⁾. Ein solches Rohr erhält man leicht durch Anschmelzen eines passenden Glasrohres an ein Jenaer

*) Der vorhergehende Beitrag dieser Reihe ist erschienen diese Zschr. 53, 321 [1947].
3. *Crieger*, Oxydation mit Bleitetraacetat u. Perjodsäure.

1) Arb. Naturf. Ges. Warschau 14 [1903]; Ber. dtsch. bot. Ges. 24, 316, 381 [1906].

2) Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt, Warschau 1910 (russ.). Hier ist bereits die chromatographische Trennung von künstlichen Farbstoffen (Fettfarbstoffe, Sudan III) beschrieben.

3) Von den vereinzelt Arbeiten, die sich in der Zeit zwischen 1906 und 1931 mit der *Tswettschen* Methode beschäftigt haben, seien erwähnt die von *Dheré* u. *Palmer* (Literatur bei *Zeichmeister* u. *v. Cholnoky*: Die chromatographische Adsorptionsmethode, Julius Springer, Wien 1938, 2. Aufl.)

4) *R. Kuhn* u. *H. Brockmann*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 206, 41 [1932].

5) Ebenda 197, 141 [1931].

6) Ber. dtsch. chem. Ges. 64, 1349 [1931].

7) *R. Kuhn* u. *H. Brockmann*, ebenda 66, 407 [1933].

8) *A. Winterstein* u. *G. Stein*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 220, 263 [1934].

9) *A. Winterstein* u. *K. Schön*, ebenda 230, 139, 146 [1934]; *A. Winterstein*, *K. Schön* u.

H. Vetter, ebenda 230, 153 [1934]; *A. Winterstein* u. *H. Vetter*, ebenda 230, 169 [1934].

10) *P. Karrer*, *R. Morf* u. *K. Schöpp*, Helv. chim. Acta 14, 1036 [1931].

11) *A. Winterstein* in *G. Kleins* Handb. d. Pflanzenanalyse, Bd. IV, S. 1403, Julius Springer, Wien 1933; *G. Hesse*, diese Zschr. 49, 315 [1936]; Chem. Techn. Untersuchungsmethoden, Julius Springer, 1939, Erg.-Bd. 8, 173; *H. Vetter*, Physikal. Methoden d. analyt. Chemie, III. Teil, S. 1, Akad. Verlagsges., Leipzig 1930. Ferner verschiedene Zusammenfassungen der ausländischen Literatur.

12) Die chromatographische Adsorptionsmethode, 2. Aufl. Julius Springer, Wien 1938.

Glassinterfilter (G 1). Bei kleinen Röhren ist die Glassinterplatte meistens entbehrlich.

Statt die Zonen des Chromatogrammes mit einem langen Spatel herauszuschaben, kann man auch die Säule nach Absaugen des Lösungsmittels vom unteren Ende her aus der Röhre herausdrücken und dann zerlegen. Dieses Verfahren ist nur bei kleinen bis mittelgroßen Adsorptionssäulen glatt durchführbar und eignet sich am besten für feinkörnige Adsorbentien. Man braucht dafür Adsorptionsröhren, die am unteren Ende nicht verengt sind. Sie lassen sich so herstellen, daß man das eine Ende eines Glasrohres nach *Dhéré* mit einem feindurchlöchernten Kork oder nach *Winterstein*¹⁰⁾ mit einem Wattebausch und einer feinmaschigen Drahtnetzkappe verschließt und dieses Rohrende mittels Gummistopfen in einen Glasvorstoß einsetzt. Bei der Anordnung nach *Winterstein* steht dabei die Drahtnetzkappe des Rohres auf einem in den Vorstoß eingelegten grobmaschigen Drahtnetz. Eine Abänderung dieses Rohres ist von *Zechmeister*¹²⁾ angegeben (Abb. 1). In das Rohr wird bis zur Verengung eine Porzellan-

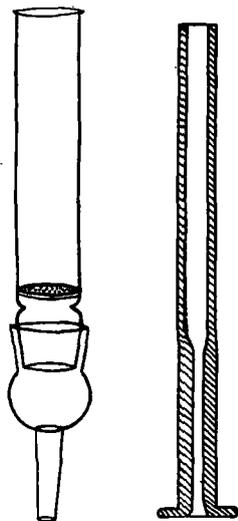


Abb. 1.

Adsorptionsrohr nach *Zechmeister*.

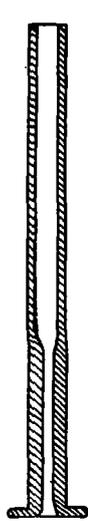


Abb. 2.

Mikroadsorptionsrohr nach *Schöpf* u. *Becker*.

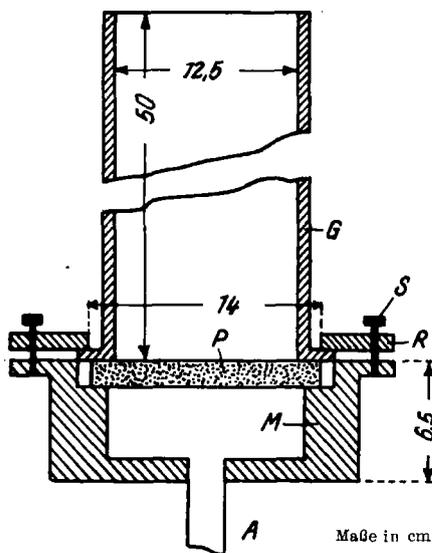


Abb. 3.

Adsorptionsrohr nach *Winterstein* u. *Schön*.

S = Schraube
R = Ring
P = Porolithfilterplatte
M = Metallgehäuse
G = Glaszylinder
A = Ablaufstütze

Maße in cm

siebplatte geschoben, auf die man zuvor eine Wattescheibe gebracht hat, deren überstehender Rand nach unten umgelegt ist und dadurch ein Anritzen der Glaswand beim Herauschieben der Säule verhindert.

Für die Adsorption sehr kleiner Mengen verwendeten *Schöpf* u. *Becker*¹⁴⁾ ein Mikrorohr (Abb. 2), dessen Capillarteil einen Durchmesser von 1 mm hat und zur Aufnahme des Adsorptionsmittels dient, während der obere Teil (4—5 mm lichte Weite) das Lösungsmittel aufnimmt. Das untere etwas erweiterte Ende der Capillare wird mit einem Wattebausch verschlossen und die plangeschliffene Fußplatte in einem Vorstoß auf eine Siebplatte gestellt. Als Vorstoß eignet sich gut eine kleine Jenaer Glasfritte.

Handelt es sich um die Adsorption großer Mengen, so kann man Adsorptionsröhren mit Wattebausch oder Siebplatte bis zu einer Länge von etwa 40 cm (Dmr. 8—10 cm) verwenden. Reichen diese nicht aus, so empfiehlt sich die Verwendung einer von *Winterstein* u. *Schön*¹⁵⁾ beschriebenen Vorrichtung (Abb. 3). Sie besteht aus einem 50 cm langen und 12,5 cm weiten Glasrohr, das mit dem unteren umgelegten und plangeschliffenen Rand mittels Gummidichtung auf eine Porolith-Filterplatte¹⁶⁾ aufgesetzt wird, die ihrerseits mit Gummidichtung auf dem Metalltrichter M ruht. Mit Hilfe des Ringes R und der Schraube S wird der Zylinder zusammen mit der Porolithplatte auf den Trichter aufgeschraubt. Der Apparat ruht auf einem Dreifuß¹⁷⁾.

¹⁰⁾ Statt dessen kann auch eine Porzellan-siebplatte in das Rohr gebracht werden, die mit Watte bedeckt wird.

¹⁴⁾ Liebig's Ann. Chem. **524**, 124 [1936].

¹⁵⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **230**, 144 [1934].

¹⁶⁾ Filterwerk Meßlen.

¹⁷⁾ Die Apparatur sowie eine sehr ähnlich gebaute von etwas kleineren Ausmaßen sind zu beziehen durch die Firma L. Hormuth, Inh. Vetter, in Heidelberg.

Nicht immer ist es günstig, für große Mengen große Adsorptionsröhren zu verwenden. Bei der Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Lebertran⁴⁵⁾ fanden wir es vorteilhafter, statt in einem großen Rohr, in mehreren Röhren von 25 cm Länge und 5 cm Dmr. gleichzeitig zu adsorbieren.

Gelingt es nicht, für eine Substanz ein Lösungsmittel zu finden, in dem sie sich bei Zimmertemperatur genügend löst, so kann man in manchen Fällen zum Ziel kommen, wenn man aus einem hochsiedenden Lösungsmittel bei höherer Temperatur adsorbiert. Die Heizung des Adsorptionsrohres erfolgt am einfachsten durch einen gläsernen Heizmantel, der von den Dämpfen einer Flüssigkeit mit geeignetem Siedepunkt durchströmt wird.

Um das Nachgießen von Lösung und Lösungsmittel zu vereinfachen, ist es bei größeren Flüssigkeitsmengen zweckmäßig, als Vorratsgefäß einen großen Tropftrichter mit Hahn und langem Ablaufrohr mittels dicht schließendem Stopfen auf das Adsorptionsrohr zu setzen. Für größere Mengen haben sich in unserem Institut Trichter bewährt, die sich aus 5- oder 10-l-Rundkolben durch Anschmelzen eines Glashalmes am Boden des Kolbens leicht herstellen lassen. Man kann dann das Adsorptionsrohr längere Zeit unbeaufsichtigt lassen und erreicht durch die größere Flüssigkeitssäule eine erhöhte Durchlaufgeschwindigkeit. Daß man bei luftempfindlichen Substanzen durch das Vorratsgefäß, über die Flüssigkeit im Adsorptionsrohr sowie durch die Vorlage ein indifferentes Gas leitet, braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden.

Will man aus irgendeinem Grunde das Durchströmen der Säule unterbrechen, so verschließt man das Ablaufrohr mit einem Korken oder durch einen am Ablaufrohr angebrachten Hahn und läßt die Säule mit Flüssigkeit bedeckt stehen. Eine längere Unterbrechung ist nicht ratsam, weil die Zonen durch Diffusionsprozesse innerhalb der Säule an Schärfe verlieren.

Die Adsorptionsmittel. Als Adsorptionsmittel ist jede fein gepulverte Substanz verwendbar, die für die zu trennenden Stoffe ein geeignetes Adsorptionsvermögen besitzt, sich in dem verwendeten Lösungsmittel nicht löst, das Erkennen farbiger Zonen nicht durch ihre Eigenfarbe unmöglich macht und die adsorbierten Stoffe nicht verändert. Die Korngröße des Adsorptionsmittels ist maßgebend für die Durchlaufgeschwindigkeit; sie schwankt bei den gebräuchlichen Adsorbentien nach *Zechmeister*¹²⁾ zwischen 1,2 μ (Calcium carbonicum laevissimum) und 10 μ (wasserhaltiger Gips). Von grobkörnigen Adsorptionsmitteln lassen sich längere Säulen verwenden als von feinkörnigen, bei denen zu lange Schichten die Durchlaufzeit ungebührlich verlängern können.

Als geeignetes Adsorptionsvermögen ist ein solches anzusehen, bei dem eine gute Ausbildung der Zonen auftritt. Ist das Adsorptionsvermögen zu gering, so wandern die Stoffe ohne Zonenbildung durch die Säule hindurch, ist es zu groß, so bleiben sie in einer schmalen Zone im obersten Teil der Säule hängen und lassen sich nicht zu einzelnen Zonen auseinanderwaschen. Man hat es in der Hand, die Stärke der Adsorption durch geeignete Wahl des Adsorptionsmittels sowie auch des Lösungsmittels so zu bemessen, daß eine optimale Trennung erreicht wird.

Verhältnismäßig selten sind die Fälle, in denen die adsorbierte Substanz am Adsorbens irreversible Veränderungen erleidet. So wird Carotin bei der Adsorption an Fullererde zerstört¹⁸⁾, bei der Adsorption an Aluminiumoxyd, wie sich erst in jüngster Zeit herausgestellt hat¹⁹⁾, zum Teil isomerisiert. Chlorophyll wird an Calciumcarbonat verändert, nicht dagegen bei der Adsorption an Puderzucker.

Interessante Untersuchungen über Veränderung von Stoffen bei der Adsorption führte *E. Weitz*²⁰⁾ durch. An sich unpolare, farblose Verbindungen (z. B. Triarylmethanderivate), die unter gewissen Bedingungen (Lösen in flüssigem SO₂ oder durch Komplexbildung) heteropolar und dabei farbig werden, lassen sich auch durch Adsorption polarisieren und bilden farbige Adsorbate (vorwiegend an Silicagel und Aluminiumoxyd); ein Vorgang, der nach *Weitz* durchaus in Parallele zu setzen ist mit der bei diesen Verbindungen beobachteten Bildung farbiger Komplexe mit anorgani-

¹⁸⁾ R. Kuhn u. H. Brockmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **200**, 255 [1931].

¹⁹⁾ A. E. Gillam u. M. S. El Ridi, Biochemical J. **30**, 1735 [1936].

²⁰⁾ 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].

sehen Halogeniden, wie z. B. Aluminiumchlorid. Beim Eluieren der Adsorbate mit Lösungsmitteln von ausgeprägter Dipolnatur werden die farblosen Ausgangsverbindungen zurückerhalten, es findet also keine irreversible Veränderung statt. Daß bei empfindlichen Stoffen eine solche Polarisierung der Vorstufe zu weiteren irreversiblen Veränderungen sein kann, ist ohne weiteres verständlich. Nach unseren Erfahrungen ist beim Auftreten dieser Polarisationserscheinungen (z. B. bei Naphthazarin- und Anthrachinonfarbstoffen) eine chromatographische Trennung schwer oder unmöglich; man muß dann nach Adsorbentien suchen, bei denen Polarisierung ausbleibt²¹⁾.

Im folgenden ist eine Reihe von Adsorptionsmitteln angeführt, die sich bei der chromatographischen Adsorption bewährt haben. Sie adsorbieren aus wasserfreien Lösungsmitteln umso besser, je schärfer sie getrocknet sind. Bei ungleicher Korngröße ist es empfehlenswert, sie vor Gebrauch durchzusieben.

Aluminiumoxyd ist von allen Adsorptionsmitteln bisher am meisten gebraucht worden. Die Korngröße des käuflichen Präparates (*E. Merck*) erlaubt eine sehr gleichmäßige Füllung des Adsorptionsrohres und eine Filtriergeschwindigkeit, die auch ohne Verwendung von Überdruck ausreichend ist. Das Adsorptionsvermögen weist erhebliche Schwankungen auf. Von der Firma *Merck*, Darmstadt, wird daher ein sehr aktives Aluminiumoxyd mit bekanntem durch Testmethoden standardisiertem Adsorptionsvermögen²²⁾ in den Handel gebracht. Es eignet sich besonders zur Trennung von Carotinoidkohlenwasserstoffen und von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Ist das standardisierte Präparat für bestimmte Zwecke zu stark, so kann man es durch Stehenlassen an der Luft oder schneller durch Schütteln in offenen Gefäßen bis zur gewünschten Stärke entaktivieren. Es eignet sich, wie schon erwähnt, nicht zur chromatographischen Trennung von Naphthazarin- und Anthrachinonfarbstoffen, da es mit ihnen tiefgefärbte Adsorbate (Farblacke) bildet, in denen der Farbstoff recht fest gebunden ist.

Bleicherden (Aluminiumsilicate), wie sie in der Ölindustrie zum Reinigen gebraucht werden, eignen sich für manche Trennungen. Sie sind unter verschiedenen Namen im Handel (Frankonit KL, Floridin u. a.). Da manche mit Salzsäure vorbehandelt sind, können sie ziemlich stark sauer reagieren, worauf bei säureempfindlichen Stoffen zu achten ist. Ihr Adsorptionsvermögen ist sehr gut; sie eignen sich besonders zur Adsorption aus wäßrigen Lösungen²³⁾.

Calciumcarbonat wurde schon von *Tswett* zur Trennung der in Blattextrakten vorhandenen Farbstoffe benutzt. Sein Adsorptionsvermögen ist geringer als das des Aluminiumoxyds. Es leistet auf dem Gebiet der Carotinoide zur Trennung der Xanthophylle wertvolle Dienste und kann u. a. auch zur Trennung von Naphthazarinfarbstoffen verwendet werden²⁴⁾.

Calciumhydroxyd. Der käufliche gelöschte Kalk ist nach *Karrer*²⁵⁾ ein brauchbares Adsorptionsmittel zur Trennung der isomeren Carotine, das sich durch große Billigkeit auszeichnet. Für wäßrige Lösungen und alkaliempfindliche Substanzen ist es natürlich unbrauchbar.

Calciumoxalat ist von uns mit gutem Erfolg zur Trennung von Naphthazarin- und Anthrachinonfarbstoffen verwendet worden²⁶⁾ und dürfte sich auch sonst bewähren. Durch Behandeln des käuflichen Calciumoxalats mit Oxalsäure und anschließende Trocknung läßt sich das Oxalat mit Oxalsäure „beladen“ und dadurch für manche Zwecke aktiver machen.

Calciumsulfat. *Karrer*²⁷⁾ hat das wasserhaltige Sulfat zur Trennung von Anthocyanemischen in wäßrigem Medium benutzt. Nach unseren Erfahrungen ist der käufliche Gips für Adsorption aus wasserfreien Lösungsmitteln in vielen Fällen ein ausgezeichnetes Adsorbens.

Kaolin hat sich wiederholt bewährt.

Kieselgur eignet sich gut zur Adsorption von Naphthazarinfarbstoffen. Mit seiner Hilfe gelang die Abtrennung von Alkanin aus Alkannin²⁸⁾, deren Mengenverhältnis etwa 1 : 2000 betrug.

Magnesiumoxyd ist verschiedentlich als Adsorptionsmittel empfohlen worden.

Pudersucker ist ein mildes, billiges Adsorbens für wasserfreie Lösungsmittel, das vor dem Gebrauch getrocknet und gesiebt werden muß. Es wurde, wie schon erwähnt, von *Winterstein* u. *Stein*⁸⁾ zur Trennung von Chlorophyll a und b benutzt.

Silicagel ist in gepulverter Form ein sehr aktives Adsorptionsmittel, das vielseitig verwendbar ist. (Polarisationserscheinungen vgl. *Weitz*²⁰⁾).

Stärke ist schon von *Tswett* zu chromatographischen Trennungen angewandt worden. Ihr Adsorptionsvermögen ist gering.

Talkum ist brauchbar, hat aber den Nachteil, daß die Filtrationsgeschwindigkeit gering ist.

Wenn ein Adsorptionsmittel sehr feinkörnig ist, läßt sich die Filtrationsgeschwindigkeit durch Beimischung eines grobkörnigeren Stoffes, dessen Adsorptionsvermögen möglichst klein sein soll, erhöhen.

Statt nacheinander an zwei verschiedenen Stoffen zu adsorbieren, kann man diese auch in zwei getrennten Schichten so in ein Adsorptionsrohr füllen, daß sich der mit der geringeren Adsorptionskraft oben im Rohr befindet, ein Verfahren, das sich für Demonstrationszwecke besser eignet als für präparative Arbeiten. So läßt sich die chromatographische Auftrennung eines Blattextraktes sehr schön derart zeigen, daß man ihn durch ein Rohr filtriert, das als untere Schicht Aluminiumoxyd, als mittlere Calciumcarbonat und als obere Pudersucker enthält. Am Pudersucker werden dann Chlorophyll a und b adsorbiert, in der Calciumcarbonatschicht die Xanthophylle und am Aluminiumoxyd die Carotine.

Lösungsmittel. Die chromatographische Adsorption ist bisher in der Hauptsache mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt worden. Sie dürfen keinen Alkohol enthalten, weil dieser die Adsorption entweder stark herabsetzt oder meistens ganz verhindert, und müssen daher gegebenenfalls mit Wasser mehrmals durchgeschüttelt werden. Die am meisten gebrauchten Lösungsmittel sind folgende:

Benzin. Man verwendet vorteilhaft die zwischen 70^o und 80^o siedende Fraktion oder „Normalbenzin“ (Kahlbaum). Es hat sich als indifferentes Lösungsmittel besonders auf dem Carotinoidgebiet und bei der Isolierung von Vitamin A und D bewährt. Bei manchen Handelssorten ist es notwendig, durch fraktionierte Destillation höher siedende Anteile, die namentlich beim Arbeiten mit größeren Mengen Lösungsmittel störend wirken, zu entfernen.

Benzol. Aus Benzol werden die meisten Stoffe nicht so gut adsorbiert wie aus Benzin. Dagegen hat es den Vorteil, daß die Löslichkeit in ihm durchweg größer ist als in Benzin. Sehr häufig werden Benzol-Benzin-Gemische verwendet. Das ist immer dann nötig, wenn die Substanz in Benzin zu wenig löslich ist oder daraus zu stark adsorbiert wird, aus Benzol allein aber die Adsorption ungenügend ist. Durch Vorversuche wird dann ein geeignetes Mischungsverhältnis der beiden Lösungsmittel ausfindig gemacht.

Schwefelkohlenstoff ist in manchen Fällen wegen seines guten Lösungsvermögens brauchbar. Für empfindliche Substanzen, wie manche Carotinoide, ist er ebenso wie Chloroform oder andere halogenhaltige Lösungsmittel ungeeignet.

Äther, Essigester sowie **Pyridin** sind gelegentlich mit gutem Erfolg verwendet worden. Bei Substanzen, die so stark adsorbiert werden, daß eine Auftrennung der Zonen nicht stattfindet, läßt sich durch Zugabe kleiner Mengen Alkohol die Adsorption stark herabsetzen und so eine chromatographische Trennung ermöglichen.

Wasser. Die chromatographische Adsorption aus wäßrigen Lösungen ist erst in wenigen Fällen verwendet worden. So, wie schon erwähnt, von *Karrer*²⁷⁾ zur Trennung von Anthocyanen, von *Koschura*²³⁾ zur Trennung von Harnfarbstoffen, von *Schöpf*²³⁾ bei der Untersuchung von Pterinen und von *Ruggli* u. *Jensen*²⁸⁾ zur Chromatographie von Teerfarbstoffen.

Adsorption und Elution sind hier oft sehr weitgehend vom pH abhängig. Man kann schon jetzt sagen, daß das Hauptanwendungsgebiet der chromatographischen Methode die Adsorption aus wasserfreien Lösungsmitteln bleiben wird.

Vorversuche. Wenn es sich darum handelt, kompliziertere Gemische zu trennen, so ist stets zu berücksichtigen, daß bei aller Leistungsfähigkeit der Chromatographie ihre Anwendung allein nicht immer ausreichend ist und oft erst die Kombination mit anderen Trennungsmethoden zum Ziel führt. Wo immer möglich, soll der chromatographischen Adsorption in diesen Fällen eine Vorreinigung durch Verteilung zwischen verschiedenen Lösungsmitteln²⁹⁾, fraktionierte Fällung oder andere Methoden vorangehen. Manchmal ist es zweckmäßig, durch Filtration durch die Säule eines geeigneten Adsorbens eine „Voradsorption“ durchzuführen²⁹⁾, bei der man zunächst einmal die gut adsorbierbaren Anteile (in der Säule) von den weniger gut adsorbierbaren (im Filtrat) trennt.

Um festzustellen, wie weit sich ein Gemisch trennen läßt und welches Adsorbens und Lösungsmittel dabei zu verwenden

²¹⁾ So lassen sich Naphthazarinfarbstoffe, die an Kieselsäure z. T. polarisiert werden, an mit Salzsäure vorbehandelter Kieselsäure gut chromatographisch trennen, *H. Brockmann* u. *K. Müller*, *Liebigs Ann. Chem.* **540**, 51 [1939].

²²⁾ Aluminiumoxyd zur Adsorption nach *Brockmann*.

²³⁾ *W. Koschura*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **239**, 89 [1936], **240**, 127 [1936]; vgl. auch *C. Schöpf* u. *E. Becker*, *Liebigs Ann. Chem.* **524**, 49 [1936].

²⁴⁾ *H. Brockmann*, ebenda **521**, 1 [1936].

²⁵⁾ *P. Karrer* u. *O. Walker*, *Helv. chim. Acta* **16**, 641 [1933].

²⁶⁾ *H. Brockmann* u. *K. Müller*, *Liebigs Ann. Chem.* **540**, 51 [1939].

²⁷⁾ *P. Karrer* u. *H. M. Weber*, *Helv. chim. Acta* **19**, 1025 [1936].

²⁹⁾ *Helv. chim. Acta* **18**, 624 [1935], **19**, 64 [1936].

²⁸⁾ *H. Brockmann*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **241**, 104 [1936].

ist, werden Vorversuche in kleinen Adsorptionsröhren durchgeführt. Dabei empfiehlt es sich, mit Lösungen bekannter Konzentration zu arbeiten und die Menge des Adsorptionsmittels sowie das Volumen der Lösung und der Waschflüssigkeit abzumessen. Man gewinnt so einen Anhaltspunkt für die beim Hauptversuch anzuwendenden Mengen. Bei feinkörnigen Adsorptionsmitteln ist darauf zu achten, daß die Säule beim Hauptversuch annähernd das gleiche Verhältnis von Länge und Querschnitt aufweist wie beim Vorversuch. Es ist lästig, wenn man feststellen muß, daß die Filtrationsgeschwindigkeit, die beim Vorversuch in kurzer breiter Säule ausreichend war, im Hauptversuch in einer dünnen langen Adsorptionsröhre unerträglich langsam ist. Zu beachten ist ferner, daß der Durchmesser der Säule im Verhältnis zur Menge der zu adsorbierenden Substanz nicht zu groß gewählt wird, weil sich sonst sehr schmale dicht beieinander liegende Zonen ausbilden, die nicht sauber zu trennen sind. Die Menge des Adsorptionsmittels richtet sich selbstverständlich nach dessen Adsorptionsvermögen und nach der Menge der zu adsorbierenden Substanz. Die Konzentration der Lösungen muß unter allen Umständen so gewählt werden, daß ein Auskristallisieren gelöster Substanzen in der Säule unterbleibt. Die Größe der Säule wird i. allg. so bemessen, daß nach Entwickeln des Chromatogrammes höchstens die unterste Zone mit ins Filtrat gelangt ist.

Füllung des Adsorptionsrohres. Vorbedingung für die gute Ausbildung der Zonen und damit für das Gelingen der Trennung ist eine gleichmäßige Füllung des Rohres mit dem Adsorptionsmittel. Man geht so vor, daß man jeweils eine kleine Menge davon einfüllt und sie zu einer gleichmäßigen Schicht zusammenstampft. Für kleine Röhren dient dazu ein Glasstab, dessen eines Ende zu einer kleinen Platte ausgedrückt ist oder ein passender Kork, der in einem Glasrohr steckt. Für größere Röhren kann man nach *Zechmeisters* Vorschlag¹²⁾ aus Holz gedrehte Stampfer verwenden, bei denen die Durchmesser der Endplatte etwa $\frac{2}{3}$ des Rohrdurchmessers betragen. Wir verwenden Stampfer, die aus einem halb durchbohrten Kork bestehen, in dessen Bohrung ein Glasstab gesteckt ist. Nachdem das Rohr bis etwa $\frac{2}{3}$ seiner Länge mit Adsorbens gefüllt ist, wird die Oberfläche der Säule mit einem Rundfilter oder einer dünnen Watteschicht bedeckt, um beim Aufgießen der Lösung ein Aufwirbeln des Adsorptionsmittels zu verhindern. Ist dieses sehr feinkörnig, so daß Durchsaugen der Lösung erforderlich ist, so setzt man vor dem Aufgießen der Lösung das Rohr auf die Saugflasche, stopft bei laufender Pumpe die Säule nochmals fest und gießt dann die Lösung auf. Bei richtigem Arbeiten muß jetzt die Lösung gleichmäßig in die Säule eindringen. Während der ganzen Adsorption ist darauf zu achten, daß die Säule stets mit Flüssigkeit bedeckt ist. Beim Trockensaugen entstehen leicht durch Schrumpfung Risse und Kanäle im Adsorbens, die eine gute Ausbildung der Zonen unmöglich machen. Außerdem können empfindliche Stoffe beim Durchsaugen von Luft verändert werden. Manchmal ist es zweckmäßig, vor dem Aufgießen der Lösung das Lösungsmittel durch die Säule zu saugen, um diese damit anzufeuchten.

Die gleichmäßige Füllung eines Rohres ist um so schwieriger, je größer es ist. Bei großen Röhren ist es empfehlenswert, die Füllung durch Einschlämmen vorzunehmen³⁰⁾. Man gießt eine dicke Aufschlämmung des Adsorptionsmittels (in demselben Lösungsmittel, das bei der Adsorption verwendet wird) portionsweise in das Rohr, saugt das Lösungsmittel so weit ab, bis das Adsorbens noch eben damit bedeckt ist, und füllt die nächste Portion ein.

Von der Teilchengröße des Adsorbens sowie von der Länge der Säule hängt es ab, ob man die Flüssigkeit mit oder ohne Hilfe der Wasserstrahlpumpe durch die Säule filtriert. Langsames Durchströmen begünstigt die Ausbildung der Zonen, schnelles Filtrieren ist zu vermeiden. Bei niedrig siedenden Lösungsmitteln und großem Widerstand der Säule kann beim Durchsaugen ein unerwünschtes Verdampfen des Lösungsmittels im Ablaufrohr und im unteren Teil der Säule eintreten. Dann ist es geraten, das Filtrieren ohne Vakuum unter Verwendung eines Überdruckes, der mit Wasserstrahlgebläse oder Ölpumpe erzeugt wird, durchzuführen.

Entwickeln des Chromatogrammes. Hat die gesamte Lösung die Säule passiert, wobei sich schon Zonen ausbilden können, so wird durch Nachwaschen mit dem Lösungsmittel die optimale Trennung der Zonen herbeigeführt, das Chromatogramm wird „entwickelt“. Diese Entwicklung gelingt nur unvollständig, wenn die zu trennenden Stoffe zu fest adsorbiert werden. In diesem Fall läßt sich oft durch Nachwaschen mit einem anderen Lösungsmittel eine bessere Trennung der Zonen erreichen. Hat man z. B. aus Benzin adsorbiert, so kann man entweder mit Benzol-Benzin-Gemischen oder mit Benzol nachwaschen. Unter günstigen Verhältnissen sind die einzelnen Zonen durch leere Schichten des Adsorptionsmittels voneinander getrennt. Oft grenzen die Zonen aber auch unmittelbar aneinander oder gehen in einer „Zwischenzone“ ineinander über, deren Eluat zur weiteren Auftrennung einer erneuten Adsorption unterworfen wird. Bei Stoffen mit sehr ähnlichem Adsorptionsverhalten treten keine Einzelzonen auf, es bildet sich eine einzige, gleichmäßig aussehende Zone, in deren oberem und unterem Teil bestimmte Komponenten des Gemisches angereichert sein können.

Elution. Um die einzelnen Zonen zur Elution aus der Säule abtrennen zu können, muß das Lösungsmittel so weit abgesaugt werden, daß die Säule eine kompakte, möglichst wenig zerbröckelnde Masse bildet. Ob man die Säule aus dem Rohr herausdrückt und dann zerlegt oder die Aufteilung im Rohr vornimmt, hängt von der Größe und Konsistenz der Säule ab. Wir bevorzugen auch bei kleinen Röhren das Heraus-schaben der Zonen mit einem Spatel. Vor dem Zerlegen der Säule stellt man sich für jede Zone ein Gefäß mit Elutionsflüssigkeit bereit, in das die betreffende Schicht sofort überführt wird. Das Zerlegen der Säule soll möglichst schnell vor sich gehen, damit etwaige Oxydation der adsorbierten Substanz verhindert wird.

Als Elutionsflüssigkeit dient meistens das jeweils benutzte Lösungsmittel, dem eine geringe Menge (0,5—2%) Methanol oder Äthanol zugesetzt wird. Die Tatsache, daß schon geringe Alkoholmengen die Adsorption stark herabsetzen oder ganz verhindern, wurde bereits von *Tswett* beobachtet. Sie beruht offenbar darauf, daß der Alkohol vom Adsorbens sehr stark adsorbiert wird und daher die adsorbierten Stoffe von der Oberfläche verdrängt. Wird durch alkoholhaltiges Lösungsmittel das Adsorbens nicht völlig abgelöst, so wird mit Alkohol allein eluiert. Ist auch damit keine Elution zu erreichen, so versucht man mit Pyridin zum Ziel zu kommen, dem, wenn es sich um saure Substanzen an einem basischen Adsorbens handelt, Essigsäure oder bei der Adsorption basischer Verbindungen an sauren Adsorptionsmitteln Alkali oder Piperidin zugesetzt wird. Hat man auch damit keinen Erfolg, so besteht noch die Möglichkeit, an Stelle der adsorbierten Substanz das Adsorbens aufzulösen, was natürlich nur bei einigen (z. B. Puderzucker, Calciumcarbonat, Calciumoxalat, Magnesiumoxyd) durchführbar ist. Eine derartig schwere Eluierbarkeit darf allerdings höchstens bei einer Komponente vorkommen, sonst ist eine völlige Trennung des Gemisches im Chromatogramm nicht möglich.

Die eluierten Fraktionen müssen gegebenenfalls nach Verdampfen des Lösungsmittels und Wiederauflösen in dem gleichen oder einem anderen Lösungsmittel einer erneuten Adsorption unterworfen werden. Will man aus dem gleichen Lösungsmittel weiter adsorbieren, so entfernt man den Alkohol, statt zu verdampfen am einfachsten durch gründliches Durchschütteln des Eluates mit Wasser.

Fraktionierte Elution. In manchen Fällen bilden sich auch bei längerem Nachwaschen keine Zonen aus. Statt nun die Schichten der Säule auf eine etwaige Fraktionierung hin zu untersuchen, kann man auch mit geeigneten Lösungsmitteln, am besten Gemischen, deren Elutionsvermögen durch wechselnde Zusammensetzung variierbar ist, fraktioniert aus der Säule eluieren. Dabei muß man das Filtrat in kleinen Portionen auffangen und mit Hilfe geeigneter Reaktionen oder auch spektroskopisch³¹⁾ auf den Gehalt der abzutrennenden Substanzen untersuchen. Ist nichts mehr eluierbar, dann ändert man die Zusammensetzung der Waschflüssigkeit so, daß ein weiterer Anteil des Adsorbens eluiert wird. Man hat diese Art der Fraktionierung auch als „Flüssiges Chromatogramm“ bezeichnet. Mit dieser Methode konnten *Windaus* u.

³⁰⁾ A. Winterstein u. G. Stein, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **220**, 273 [1933]; D. C. Castle, A. E. Gillam, I. M. Heilbron u. H. W. Thompson, Biochemical J. **28**, 1702 [1934].

³¹⁾ H. Brockmann u. K. Müller, Liebigs Ann. Chem. **540**, 51 [1939].

Mitarb.³²⁾ das Provitamin des antirachitischen Vitamins D₂ und D₃ aus Cholesterin in reiner Form abtrennen.

Ultrachromatogramm. Wie von Winterstein³³⁾, sowie von Karrer³⁴⁾ gezeigt wurde, läßt sich die Tswettsche Methode ohne weiteres auf solche farblosen Stoffe ausdehnen, die bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht Fluoreszenz zeigen. Der Anwendungsbereich der Chromatographie hat dadurch eine wichtige Erweiterung erfahren. Von Karrer ist diese Modifikation der Methode als „Ultrachromatographie“ bezeichnet worden. Zur Aufnahme des Adsorptionsmittels sind naturgemäß Rohre aus Quarz oder Uviolglas besonders geeignet. Meistens kommt man aber mit solchen aus gewöhnlichem Glas vollkommen aus. Als Lichtquelle dient eine Analysenquarzlampe (Heraeus), bei der durch Dunkeluvioilglas der langwellige Spektralbereich etwa von 360 m μ ab wegfiltriert wird. Die Arbeitsweise der Ultrachromatographie ist der bei farbigen Stoffen angewandten durchaus analog. Zu beachten ist allerdings, daß die Fluoreszenz mancher Stoffe schon durch sehr geringfügige Beimengungen ausgelöscht werden kann. So fand Winterstein, daß die Fluoreszenz des Anthracens bereits durch einen Gehalt von 1/30000% Naphthacen vollkommen zum Verschwinden gebracht wird.

Die Ultrachromatographie eignet sich nach Winterstein³³⁾ gut zur Trennung polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und ist auf diesem Gebiet zweifellos noch ausbaufähig. Ferner kann sie nach unseren eigenen Erfahrungen mit Vorteil benutzt werden, um bei Konstitutionsermittlungen die Reaktionsprodukte der Zinkstaubdestillation³⁵⁾ oder der Selendehydrierung zu trennen und dadurch zu kristallisierenden Fraktionen zu kommen. Bei der Anwendung auf wäßrige Lösungen, für welche die von Koschara³⁷⁾ durchgeführte Isolierung von Uropterin aus Harn ein schönes Beispiel gibt, muß berücksichtigt werden, daß die Fluoreszenz weitgehend vom p_H der Lösung abhängen kann.

Die Anwendung der chromatographischen Adsorption.

Das Hauptanwendungsgebiet der chromatographischen Adsorption ist die Trennung gefärbter oder fluoreszierender Stoffe, von denen die in organischen Lösungsmitteln löslichen i. allg. geeigneter sind als die nur wasserlöslichen. Der Anwendungsbereich der Methode erreicht seine Grenze in den Fällen, in denen entweder die adsorbierten Stoffe irreversible Veränderungen erleiden, oder vom Adsorptionsmittel so fest gebunden werden, daß eine Elution nicht möglich ist, oder aber in ihrem Adsorptionsverhalten so ähnlich sind, daß eine Trennung ausbleibt. Praktisch bedeuten diese drei Grenzfälle kaum eine Beschränkung der Methode, weil sie verhältnismäßig selten und auch dann fast immer nur bei einigen Adsorbentien auftreten.

Die Anwendungsmöglichkeiten kann man, je nachdem, ob man die Chromatographie für präparative oder für analytische Zwecke verwendet, in zwei Gruppen einteilen, aus denen im folgenden Beispiele angeführt werden.

Präparative Anwendung.

Bei der präparativen Anwendung handelt es sich oft darum, aus einem Gemisch mehrere oder auch sämtliche Komponenten in reinem Zustand zu isolieren. Meistens ist dann die Zahl der Komponenten nicht groß. Der einfachste Fall ist gegeben, wenn zwei Stoffe vorliegen, von denen der eine vollständig in der Säule adsorbiert wird und der andere beim Nachwaschen ohne weiteres ins Filtrat übergeht. Als Beispiel sei die Zerlegung von Pikraten (besonders solcher von Kohlenwasserstoffen) angeführt, die sich in vielen Fällen sehr einfach so durchführen läßt, daß man die Lösung durch eine Säule von Aluminiumoxyd filtriert, wobei die Pikrinsäure adsorbiert wird und die andere Komponente (Kohlenwasserstoff oder Base) sich im Filtrat ansammelt.

Besonders eindrucksvoll zeigt sich die allen anderen Trennungsmethoden überlegene Leistungsfähigkeit der Chromatographie bei Gemischen, die eine Komponente in sehr geringer Menge enthalten und bei denen trotzdem eine fast quantitative Trennung möglich ist. Beispiele dafür sind die Trennung von β -Carotin und γ -Carotin⁷⁾ sowie von Alkannin und Alkannan²⁴⁾.

Recht aussichtsreich erscheint die Anwendung der chromatographischen Adsorption zum Studium des Reaktionsverlaufes bei farbigen Verbindungen, weil es hier gelingt, auch kleine Mengen von Nebenprodukten zu erfassen, die sich bei den üblichen Anarbeitungsmethoden dem Nachweis entziehen. Ein erster Versuch in dieser Richtung liegt vor in einer Arbeit von Brockmann u. Müller²⁶⁾, bei der es gelang, bei der Kondensation von Naphthazarin mit Aldehyden neben dem erwarteten Reaktionsprodukt noch vier interessante Nebenprodukte zu isolieren. Zweifellos wird der weitere Verfolg dieser Arbeitsrichtung zu genaueren Einblicken in den Verlauf mancher Reaktionen führen.

Es ist klar, daß die Schwierigkeiten bei der Trennung mit der Zahl der Komponenten größer werden; einmal deswegen, weil die Wahrscheinlichkeit wächst, daß Komponenten in ihrem Adsorptionsverhalten einander so ähnlich sind, daß eine deutliche Zonenbildung ausbleibt, zum anderen deshalb, weil sich die Komponenten des Gemisches in ihrer Adsorption unter diesen Bedingungen leichter gegenseitig beeinflussen können. Nicht selten beobachtet man, daß im Gemisch eine Verbindung schwächer adsorbiert wird als in reinem Zustande. Auch der umgekehrte Fall, daß durch andere Stoffe die Adsorption erhöht wird, kann vorkommen. So wird, wie Schöpf u. Becker zeigen konnten³⁶⁾, Erythropterin aus Rohlösungen durch einen Begleitstoff an Aluminiumoxyd gebunden, während es in reinem Zustande nicht adsorbiert wird. Da die Menge des Begleitstoffes nicht ausreichend ist, um nach Art einer Beize das gesamte Erythropterin an das Aluminiumoxyd zu binden, läuft ein Teil davon durch die Säule und nur eine dem Begleitstoff entsprechende Menge wird adsorbiert. Man gewinnt so den Eindruck, daß der Farbstoff uneinheitlich ist, was in Wirklichkeit nicht zutrifft.

Sehr häufig handelt es sich bei der Anarbeitung eines Gemisches darum, nur eine Komponente zu isolieren. Das ist z. B. der Fall, wenn man die Tswettsche Methode zur Reinigung eines Rohproduktes anwendet, wobei nur die das Hauptprodukt führende Zone aufgearbeitet wird. Dabei gelingt es oft, sehr hartnäckig anhaftende Verunreinigungen, die sich durch Umkristallisieren schwer oder gar nicht entfernen lassen, durch eine einzige Adsorption zu beseitigen.

Während hier das isolierte Produkt die Hauptmenge des Gemisches ausmacht, kommt es umgekehrt bei der Isolierung eines Naturstoffes meistens darauf an, einen in geringer Konzentration vorhandenen Stoff von großen Mengen verschiedenartiger Begleitstoffe abzutrennen. Auch bei dieser Aufgabe hat die Chromatographie bereits in vielen Fällen sehr wertvolle Dienste geleistet.

In manchen Fällen läßt sich die Filtration durch eine Adsorptionssäule auch dazu verwenden, um gelöste Stoffe von Lösungsmitteln zu trennen. Statt große Mengen einer verdünnten Lösung zu verdampfen, kann man sie durch ein Adsorbens filtrieren, an dem das Gelöste hängen bleibt, während das Lösungsmittel als Filtrat erhalten wird. Ein Beispiel für diese Anwendungsart, die, streng genommen, nicht mehr zur Chromatographie gehört, bietet die Arbeit von Koschara³⁷⁾ über die Isolierung von Uropterin aus großen Mengen (5000 l) Harn.

Die Zahl der bisher durchgeführten präparativen Trennungen ist sehr groß. Da die Anführung nur einiger Beispiele kein richtiges Bild geben würde, sei nochmals auf die Monographie von Zechmeister u. v. Cholnoky hingewiesen, in der die präparativen Anwendungsarten ziemlich erschöpfend zusammengefaßt sind.

Analytische Anwendung.

Qualitative Analyse. Eine wichtige Rolle kommt der chromatographischen Adsorption zu bei der

Prüfung einer Substanz auf Einheitlichkeit.

Häufig lassen sich bei Substanzen, die auf Grund der Schmelzpunktkonstanz als einheitlich anzusehen sind, im Chromatogramm noch kleine Mengen von Verunreinigungen als schmale Zonen (meist oberhalb der Hauptzone) erkennen. Als Reinheitskriterium ist das Chromatogramm der Schmelzpunktsbestimmung also oft überlegen³⁸⁾. Zeigt ein Stoff eine einzige homogene Zone, so kann man ihn i. allg. als einheitlich ansehen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß, wie schon erwähnt, bei Ver-

²²⁾ A. Windaus u. O. Stange, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **244**, 218 [1936]; A. Windaus u. F. Bock, ebenda **245**, 168 [1937].

²³⁾ A. Winterstein u. K. Schön, ebenda **230**, 139 [1934].

²⁴⁾ P. Karrer u. K. Schöpf, Helv. chim. Acta **17**, 693 [1934].

²⁵⁾ H. Brockmann, Liebigs Ann. Chem. **521**, 1 [1936]; M. N. Haschad, Diss. Göttingen 1939.

²⁶⁾ Liebigs Ann. Chem. **524**, 49 [1936].

²⁷⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **240**, 127 [1936].

²⁸⁾ Vgl. hierzu Kofler, „Mikroskop. Methoden z. Identifizierung organischer Substanzen“, Beiheft zur Ztschr. des VDCh Nr. 36; Auszug diese Ztschr. **53**, 167 [1940].

bindungen, deren Adsorptionsverhalten sehr ähnlich ist, eine Auftrennung in Zonen nicht erfolgt. Meistens tritt aber doch innerhalb der einheitlich aussehenden Zone eine gewisse Fraktionierung ein, auf die mit Hilfe geeigneter Erkennungsmittel zu prüfen ist. Ist das nicht möglich oder unterbleibt auch diese Fraktionierung, dann läßt sich eine dennoch vorhandene Inhomogenität der Substanz fast immer dadurch erkennen, daß beim Wechseln von Adsorbens und Lösungsmittel doch noch Zonen auftreten³⁹⁾. Das Verfahren ist durchaus analog dem beim Umkristallisieren üblichen Vorgehen, die Schmelzpunktkonstanz nach nochmaligem Umkristallisieren aus einem anderen Lösungsmittel zu überprüfen. Nur äußerst selten sind zwei Substanzen in ihrer Adsorption so ähnlich, daß sie bei der Adsorption aus verschiedenen Lösungsmitteln und an verschiedenen Adsorbentien im Chromatogramm keine Unterschiede erkennen lassen. Umgekehrt kann das Ausbleiben einer chromatographischen Trennung in Analogie zum Mischschmelzpunkt benutzt werden zur

Prüfung zweier Substanzen auf Identität

(Mischchromatogramm). Die beiden Verbindungen werden im gleichen Mengenverhältnis gelöst und an verschiedenen Adsorptionsmitteln chromatographiert. Tritt keine Trennung auf, so kann mit derselben Sicherheit wie aus der Konstanz des Mischschmelzpunktes auf Identität geschlossen werden.

Prüfung von Handelswaren. Zur schnellen qualitativen Untersuchung und Kennzeichnung von Farbstoffen, Drogen usw. kann ein unter genau festgelegten Bedingungen mit standardisierten Adsorptionsmitteln erhaltenes Chromatogramm wertvolle Dienste leisten. Ist z. B. unter diesen Versuchsbedingungen eine Droge oder eine andere Ware durch ein bestimmtes Bild des Chromatogrammes gekennzeichnet, so lassen sich Veränderungen, Zusätze oder Verfälschungen leicht erkennen (künstlicher Butterfarbstoff⁴⁰⁾, Verfälschung von Wein⁴¹⁾ u. a.).

Wertvolle Dienste kann die chromatographische Adsorption nach Arbeiten von Kaufmann^{41a)} bei der Reinheitsprüfung von Fettsäuren und der Untersuchung von Oleinen leisten.

Anorganische chromatographische Analyse. Eingehende Untersuchungen über die Frage, wieweit sich die Tswettische Methode in der anorganischen Chemie zur qualitativen Analyse eignet, verdankt man G.-M. Schwab⁴²⁾. Sie haben ergeben, daß sich viele Kationen an Aluminiumoxyd gut trennen lassen, daß die Trennung aber, wie zu erwarten, Schwierigkeiten macht, wenn die Zahl der vorliegenden Kationen groß ist. In diesem Falle ist es nötig, die üblichen Gruppentrennungen beizubehalten und die chromatographische Methode für die Analyse innerhalb einer Gruppe zu verwenden. Besonders günstig scheint die Auftrennung der Schwefelammoniumgruppe zu verlaufen. Eine Kationentrennung durch Adsorption an einer Mischung von 8-Oxy-chinolin und Kieselgur haben Erlenmeyer u. Dahn⁴³⁾ beschrieben. Sie halten die Methode für geeignet zur Analyse von Legierungen. Auch bei der anorganischen Mikroanalyse kann nach Schwab⁴⁴⁾ die Chromatographie als Hilfsmethode gute Dienste leisten.

Quantitative Analyse. Zur quantitativen Analyse ist es erforderlich, daß die einzelnen Zonen des Chromatogramms so weit voneinander entfernt sind, daß eine saubere Abtrennung aus der Säule möglich ist. Man eluiert die Zonen quantitativ, mißt das Volumen des Eluates und colorimetriert. Als Mikromethode zur Bestimmung von Carotinoiden wurde die chromatographische Adsorption von Kuhn u. Brockmann⁴⁾ ausgearbeitet. Durch Verteilung zwischen Benzin und 90%igem Methanol wird zunächst eine Trennung in Xanthophylle, Xanthophyll-ester und Carotinoidkohlenwasserstoffe durchgeführt und anschließend die chromatographische Trennung der einzelnen Gruppen vorgenommen. Die Methode gestattet, in einem Blatt oder wenigen Blüten den Gehalt der verschiedenen Carotinoide zu ermitteln. Eine chromatographische Mikromethode zur Bestimmung von Chlorophyll a und b in 1 bis 2 Blättern haben Winterstein u. Stein⁵⁾ beschrieben.

³⁹⁾ R. Kuhn u. H. Brockmann, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 894 [1932].

⁴⁰⁾ H. Thaler, Z. Untors. Lebensmittel **75**, 130 [1938].

⁴¹⁾ H. Mohler u. W. Hämmerle, ebenda **70**, 193 [1933], **71**, 186 [1936].

^{41a)} E. P. Kaufmann, diese Ztschr. **53**, 98 [1940]; Fette u. Seifen **46**, 208 [1939], **47**, 294 [1940] sowie Engl. Pat. 853066 [1940].

⁴²⁾ G.-M. Schwab u. K. Jockers, diese Ztschr. **50**, 546 [1937]; G.-M. Schwab u. G. Dattler, ebenda **50**, 691 [1937], **51**, 709 [1938]; G.-M. Schwab u. A. N. Ghosh, ebenda **52**, 666 [1939].

⁴³⁾ Helv. chim. Acta **22**, 1369 [1939]. ⁴⁴⁾ Diese Ztschr. **53**, 39 [1940].

Die Trennung farbloser Stoffe mit Hilfe der Tswettischen Methode.

Die großen Erfolge, die bei der chromatographischen Trennung farbiger und fluoreszierender Stoffe erzielt worden sind, haben es natürlich nahegelegt, die Methode auch bei farblosen Substanzen anzuwenden. Bei ihnen muß, entsprechende Unterschiede im Adsorptionsverhalten vorausgesetzt, ebenfalls eine Ausbildung von Zonen in der Adsorptionssäule auftreten, nur daß sie dem Auge nicht sichtbar ist und daher streng genommen nicht als „chromatographisch“ bezeichnet werden kann. Die Schwierigkeit, die Zonen zu erkennen und richtig zu trennen, bedeutet für die Anwendung der Methode auf farblose Substanzen ein erhebliches Hindernis, das sich allerdings auf verschiedenen Wegen erfolgreich umgehen läßt. Die primitivste Methode zur Trennung farbloser Substanzen, die man als Empirisches Verfahren bezeichnen kann, besteht darin, die Adsorptionssäule, nachdem durch genügend langes Nachwaschen mit Lösungsmittel „entwickelt“ ist, in viele dünne Schichten zu zerlegen und diese auf eine Fraktionierung hin zu untersuchen. Bei diesem Verfahren bedeutet es schon einen gewissen Erfolg, wenn sich feststellen läßt, wieweit die Säule durch adsorbierte Stoffe besetzt ist oder mit anderen Worten, wo die Grenze der untersten Zone liegt. Das gelingt, wie wir fanden, gelegentlich dadurch, daß man nach dem Entwickeln die Lösung eines Farbstoffes durch die Säule laufen läßt, der schwächer adsorbiert wird als die Komponenten des Gemisches, so daß keine Verdrängung des Adsorbierten durch den Farbstoff zu befürchten ist. Da, wo die Säule nicht mehr mit Adsorbiertem beladen ist, setzt dann die Adsorption des Farbstoffes ein und läßt so das untere Ende des „unsichtbaren Chromatogramms“ erkennen.

Mehr noch als bei farbigen Verbindungen ist es bei farblosen erforderlich, mit Adsorptionsmitteln bekannter und konstanter Aktivität unter genau festgelegten und reproduzierbaren Bedingungen zu arbeiten. Nur dann ist es nach sorgfältigen Vorversuchen, bei denen man sich über die Verteilung der Komponenten in der Säule orientiert, möglich, mit Hilfe des empirischen Verfahrens zu brauchbaren Ergebnissen zu kommen. Statt die Säule zu zerlegen, empfiehlt es sich mitunter, bei farblosen Substanzen, ein „flüssiges Chromatogramm“ (s. oben) durchzuführen und die Fraktionen des Filtrates aufzuarbeiten.

Verwendung von Indicatorfarbstoffen. Handelt es sich um die Aufgabe, aus einem Gemisch nur einen Stoff zu isolieren, so kann man, worauf schon Tswett hingewiesen hat, versuchen, einen Farbstoff ausfindig zu machen, der das gleiche Adsorptionsverhältnis besitzt, wie die zu isolierende Substanz und sich nach der Adsorption leicht wieder entfernen läßt. Ein solcher Farbstoff zeigt als Indicator die Zone an, die den gesuchten Stoff enthält. Wir haben dieses Verfahren mit Erfolg bei der Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Fischeleberölen angewandt⁴⁵⁾.

Nicht immer wird sich ein solcher Farbstoff finden lassen; aber es bedeutet schon eine große Erleichterung, wenn wenigstens ein Farbstoff von ähnlichem Adsorptionsverhalten zu ermitteln ist, denn man kann ihn als Indicator für die Entwicklung des Chromatogramms benutzen, die sich an der Breite der Farbzone und ihrer Entfernung vom oberen Rand der Säule abschätzen läßt. In Vorversuchen wird dann festgestellt, ob der gesuchte Stoff sich in der Säule oberhalb oder unterhalb der Farbzone befindet und wieweit er von ihr entfernt ist. Hält man beim Hauptversuch die entsprechenden Versuchsbedingungen ein, so läßt sich die Zone des gesuchten Stoffes recht gut auffinden. Da bei diesem Verfahren der gesuchte Stoff nicht mit dem Indicatorfarbstoff vermischt ist, braucht man auf dessen leichte Abtrennbarkeit keinen Wert zu legen.

Manchmal kann auch eine farbige Beimengung als Indicatorfarbstoff dienen⁴⁶⁾.

Markierung der gesuchten Zone. Bei einer Reihe von Stoffen gelingt es, ihre Zone in der Säule durch eine Farb-reaktion zu bezeichnen, und zwar derart, daß man die Säule aus dem Adsorptionsrohr herausdrückt und mit einem geeigneten Reagens einen Pinselstrich an der Säule entlang zieht. So läßt sich bei der Adsorption von A-Vitamin-Konzentraten die A-Vitamin enthaltende Zone durch die Blaufärbung er-

⁴⁵⁾ H. Brockmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **241**, 104 [1936], **245**, 96 [1937]; H. Brockmann u. A. Busse, ebenda **249**, 176 [1937].

⁴⁶⁾ H. Wieland, G. Hesse u. R. Hüttel, Liebigs Ann. Chem. **524**, 203 [1936]; R. Tschesche u. H. A. Ofje, Ber. dtsch. chem. Ges. **68**, 1998 [1935]; **69**, 2361 [1936].

kennen, die auftritt, wenn man die Säule mit einer Antimontrichloridlösung in Chloroform pinselt. (Andere Beispiele für diese Methode in der Monographie von Zechmeister u. v. Cholnoky, S. 87.)

Überführung in eine gefärbte Substanz. Die bisher angeführten Methoden zur Trennung farbloser Stoffe erfordern sorgfältige Vorversuche und sind dadurch zeitraubend. Dieser Nachteil fällt weg, wenn man bei der Verwendung des Indicatorfarbstoffs noch einen Schritt weiter geht und ihn direkt mit den zu trennenden Stoffen verbindet, diese demnach in farbige Derivate überführt. Damit wird also die Trennung farbloser Verbindungen auf das eigentliche Gebiet der Chromatographie verschoben.

Diese Methode setzt voraus, daß sich die zu trennenden Stoffe mit guter Ausbeute in farbige Verbindungen überführen lassen, daß diese sich in der Adsorptionssäule gut trennen und daß aus ihnen die farblosen Ausgangsstoffe leicht wiederzugewinnen sind. Die erste und dritte Bedingung werden sich z. B. bei Alkoholen und Aminen durch Veresterung bzw. Acylierung mit farbigen Säuren, bei Säuren durch Veresterung mit gefärbten Alkoholen in vielen Fällen erfüllen lassen. Was die zweite Bedingung, die gute Trennbarkeit der farbigen Derivate, angeht, so läßt sich darüber allgemein sagen, daß sie um so besser sein wird, je kleiner das Molekulargewicht und je geringer die Adsorption der farbigen Gruppe ist. Denn man wird erwarten dürfen, daß die Unterschiede im Adsorptionsverhalten zweier Stoffe nach Verknüpfung mit einer gefärbten Verbindung (wegen der damit verbundenen Vergrößerung des Molekulargewichtes) kleiner werden, u. zw. um so mehr, je größer das Molekulargewicht und die Adsorption der farbigen Komponente ist. Für die erst im Anfang der Entwicklung befindliche, zweifellos sehr ausbaufähige Methode sollen zwei Beispiele angeführt werden.

Wie Strain⁴⁷⁾ zeigen konnte, lassen sich β -Ionon und Campher sowie Geronsäure und Lävulinsäure dadurch trennen, daß man sie zunächst in die gefärbten 2,4-Dinitro-phenylhydrazone überführt und diese aus Benzol an Talkum chromatographiert. Aus den getrennten Dinitro-phenylhydrazonen lassen sich in saurer Lösung durch Umsetzen mit einer Dicarboxylverbindung (Glyoxal, Diacetyl) die freien Ausgangsstoffe gewinnen. Ein weiteres Beispiel ist die von Reich⁴⁸⁾ durchgeführte Trennung von Glucose und Fructose. Die Zucker wurden mit Azobenzol-p-carbonsäure⁴⁹⁾ verestert, die farbigen Ester chromatographisch getrennt und dann verseift.

Es sei erwähnt, daß man farblose Stoffe durch Verknüpfung mit geeigneten Verbindungen auch in fluoreszierende Stoffe überführen und diese im Ultrachromatogramm trennen kann. Da aber die Fluoreszenz eines Stoffes bei Überführung in ein Derivat verschwinden kann, ist diese Methode nicht so allgemein anwendbar wie die der Überführung in farbige Derivate.

Zusammenhänge zwischen Adsorption und Konstitution.

Wie zu erwarten, sind Zusammenhänge zwischen Konstitution und chromatographischer Adsorption bisher nur bei Gruppen von chemisch sehr nahe verwandten Stoffen aufgefunden worden. Da hierüber in der Zusammenfassung von Hesse¹¹⁾ und in der Monographie von Zechmeister u. v. Cholnoky¹³⁾ ausführlich berichtet ist, beschränken wir uns auf einige kurze Hinweise.

In den Carotinoiden haben wir dank den Arbeiten des letzten Jahrzehnts eine Gruppe von Naturfarbstoffen kennengelernt, deren zahlreiche Vertreter sich in einfacher Weise von wenigen als Stammsubstanzen aufzufassenden Carotinoidkohlenwasserstoffen ableiten. Es ist also nicht verwunderlich, wenn hier Zusammenhänge zwischen Konstitution und Adsorption besonders deutlich zutage treten. Neben anderen Regelmäßigkeiten hat sich bei ihnen ergeben, daß die Adsorption um so stärker ist, die Zonen im Chromatogramm also um so weiter nach oben liegen, je größer die Zahl der konjugierten Doppelbindungen und die Zahl der Hydroxylgruppen ist. Eine ähnliche Abhängigkeit von der Zahl der Doppelbindungen findet sich bei den von Winterstein⁹⁾ untersuchten Diphenylpolyenen sowie den polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Je größer die Zahl der Doppelbindungen, desto stärker ist auch hier i. allg. die Adsorption.

Bei der Untersuchung einer Reihe von Azofarbstoffen fanden Ruggli u. Jensen²⁸⁾, daß deren Adsorptionsaffinität mit der Zahl der Azogruppen zunimmt, und in der Gruppe der halogenierten Fluoresceine stellten sie fest, daß die Adsorption mit der Anzahl der Halogenatome und dem Atomgewicht größer wird. Ähnliche Zusammenhänge werden sich zweifellos auch bei anderen Verbindungsklassen finden lassen.

Bei den angeführten Untersuchungen hat sich immer wieder die ungewöhnliche Leistungsfähigkeit der chromatographischen Methode darin gezeigt, daß schon bei sehr geringfügigen Unterschieden in der Konstitution eine Trennung möglich ist. Das klassische Beispiel dafür ist die Trennung von α - und β -Carotin⁶⁾, ein anderer typischer Fall die von Winterstein durchgeführte Trennung von anti-peri-Dibenzocoronon und Anthro-dianthron.

Auch cis-trans-Isomere lassen sich, wie Winterstein u. Stein⁵⁰⁾ zuerst am cis-trans-Crocetin-methylester feststellten, trennen. Ebenso kann nach Zechmeister⁵¹⁾ die beim Belichten entstehende cis-Form des Azobenzols durch Adsorption aus Benzol an Aluminiumoxyd von der trans-Form abgetrennt werden.

Besonderes Interesse verdient die Frage, ob sich auch solche Verbindungen, die den größten überhaupt möglichen Ähnlichkeitsgrad besitzen, nämlich optische Antipoden, durch Adsorption an einem optisch aktiven Adsorbens chromatographisch trennen lassen. Zwei Möglichkeiten sind hier gegeben. Entweder werden die beiden Antipoden ohne irgendeine Beteiligung ihres Asymmetriezentrums adsorbiert; dann tritt kein optisches Auswählen ein. Oder aber es bilden sich unter Mitwirkung des Asymmetriezentrums diastereomere Adsorbate; dann wird eine Trennung der Antipoden zu erwarten sein. Beide Fälle wurden beobachtet. So läßt sich dl-m- β -Naphthol-azomandelsäure aus Benzol an Lactose unter Trennung der Antipoden adsorbieren, während bei der Adsorption an Calcium-d-tartrat, Quarz, Emulsin, Maltose, Glucose und Saccharose keine Spaltung eintritt⁵²⁾. Eine partielle Zerlegung des Racemates in die optischen Isomeren wurde auch bei der Adsorption von p-Phenyl-bis-imino-Campher aus Benzol-Benzin (1:8) an Milchzucker beobachtet⁵³⁾.

Schlußbemerkungen.

Wenn man das bisher Erarbeitete überblickt und sich die Frage vorlegt, in welcher Richtung der weitere Ausbau der Methode vorzunehmen ist, so eröffnen sich verschiedene Möglichkeiten. Von großer Bedeutung wäre ein genaueres Studium der theoretischen Grundlagen der Chromatographie, eine Arbeit, die wohl mit der genauen Messung der Adsorptionsisothermen und ihrem Vergleich mit dem chromatographischen Verhalten der gemessenen Substanzen zu beginnen hätte. Hier wäre in praktischer Hinsicht von Interesse, zu untersuchen, wie weit die Adsorptionsisothermen voneinander abweichen müssen, damit noch eine ausreichende Trennung im Chromatogramm möglich ist. Bei farblosen Stoffen würde sich dann aus den Isothermen voraussagen lassen, ob eine Trennung in der Adsorptionssäule überhaupt erfolgen kann.

Nicht weniger wichtig ist es, die beim Aluminiumoxyd eingeführte Standardisierung der Adsorptionsaktivität auf weniger aktive Aluminiumoxydpräparate auszudehnen⁶⁴⁾ und auch auf andere Adsorbentien zu übertragen, und ferner in gewisser Analogie zu den pH-Indicatoren den Aufbau einer Farbstoffreihe durchzuführen, deren Adsorptionsaffinität genau abgestuft ist. Diese Reihe würde geeignete Indicatorfarbstoffe zur Trennung farbloser Substanzen sowie Eichfarbstoffe zur Einstellung einer bestimmten und reproduzierbaren Aktivität der Adsorbentien an die Hand geben. Vorarbeiten dazu haben wir bereits begonnen. Weiterhin wird sich die oben beschriebene Methode zur Trennung farbloser Stoffe nach Überführung in farbige Derivate noch bedeutend weiter ausbauen lassen und ebenso wie die Indicatorfarbstoffreihe dazu beitragen, den Anwendungsbereich der Tswettischen Methode dort zu erweitern, wo ihr die meisten Schwierigkeiten entgegenstehen, nämlich bei der Trennung nicht gefärbter Stoffe.

Eingeg. 20. Mai 1940. [A. 62.]

⁵⁰⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **220**, 251 [1934].

⁵¹⁾ L. Zechmeister, O. Freliden u. P. Fischer-Jørgensen, Naturwiss. **26**, 495 [1938]; vgl. auch A. H. Cook, J. chem. Soc. London **1938**, 877.

⁵²⁾ G. M. Henderson u. H. G. Rule, ebenda **1939**, 1508.

⁵³⁾ G. M. Henderson u. H. G. Rule, Nature, London **141**, 917 [1936].

⁵⁴⁾ Bei der Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Fischleberölen (Zitat 43) haben wir ein „Aluminiumhydroxyd III“ benutzt, das weniger aktiv ist als das „Aluminiumoxyd“ nach Brockmann.

⁴⁷⁾ J. Amer. chem. Soc. **57**, 758 [1935]. ⁴⁸⁾ Biochemical J. **33**, 1000 [1939].
⁴⁹⁾ Erhalten durch Kondensation von Nitrosobenzol mit p-Aminobenzoesäure.