

12. Hans Brockmann und Hella Schodder: Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption*).

[Aus d. Biochem. Abteil. d. Allgem. Chem. Universitäts-Laborat. in Göttingen.]

(Eingegangen am 10. Dezember 1940.)

Die Methode des russischen Botanikers Tswett, ein Gemisch farbiger Stoffe dadurch zu trennen, daß man seine Lösung durch die Säule eines farblosen Adsorbens filtrierte, wobei sich die einzelnen Komponenten auf Grund ihrer verschiedenen starken Adsorption als farbige Zonen „chromatographisch“ zu erkennen geben, hat sich seit ihrer Wiederentdeckung durch R. Kuhn ungemein vielseitig bewährt und bedeutet präparativ einen entscheidenden Fortschritt¹⁾. Zum Aufbau der Adsorptionssäule sind bisher, je nach Art des zu trennenden Gemisches verschiedene Stoffe verwendet worden, am häufigsten das Aluminiumoxyd; und zwar deshalb, weil es bei einer Korngröße, die eine gute Filtriergeschwindigkeit in der Adsorptionssäule gestattet, ein ausgeprägtes Adsorptionsvermögen für viele Stoffklassen besitzt. Allerdings hängt dieses Adsorptionsvermögen außer von der Art der Gewinnung²⁾ weitgehend vom Wassergehalt der Präparate ab und kann daher bei den einzelnen Handelssorten verschieden sein. Diese Schwankungen, die es namentlich bei der Trennung farbloser Stoffe schwer machen, unter reproduzierbaren Bedingungen zu arbeiten, gaben vor mehreren Jahren Anlaß, die Herstellung eines Aluminiumoxydes mit festgelegtem immer gleichbleibenden Adsorptionsvermögen anzuregen³⁾. Sein Anwendungsbereich ist ziemlich groß, erreicht aber seine Grenze bei solchen Stoffen, die entweder so fest adsorbiert werden, daß eine Auftrennung in Zonen nicht erfolgt, oder deren Bindung an das Adsorbens andererseits so locker ist, daß sie leicht durch die Säule hindurchgewaschen werden.

Der durch verschieden hohen Wassergehalt bedingte große Spielraum im Adsorptionsvermögen des Aluminiumoxydes erlaubt nun, wie wir fanden, die Herstellung einer ganzen Anzahl von Präparaten mit definierter, abgestufter Adsorptionsaktivität. Für das chromatographische Verfahren bewährt sich nach unseren Ergebnissen die Verwendung von fünf verschiedenen Aktivitätsstufen. Sie lassen sich dadurch gewinnen, daß man käufliches Aluminiumoxyd oder -hydroxyd durch Erhitzen zunächst entwässert und dadurch aktiviert und dann durch Liegen lassen oder Schütteln an feuchter Luft bis zu dem gewünschten Adsorptionsvermögen entaktiviert.

Einer besonderen Prüfung bedurfte die Frage, wie der Aktivitätsgrad der Präparate am zweckmäßigsten festzulegen und wie seine Einstellung zu kontrollieren ist. Am genauesten ist das zweifellos zahlenmäßig durch Messung der Adsorptionsisotherme geeigneter Stoffe möglich. Dieses Verfahren ist aber zu umständlich, wenn es sich darum handelt, im Verlaufe der Ent-

*) Vorgetragen in der Sitzung des Bezirksvereins Hannover des Ver. Dtsch. Chemiker am 7. Dezember 1940.

¹⁾ Zusammenfassende Darstellung: L. Zechmeister u. L. v. Cholnoky, Die chromatographische Adsorptionsmethode, 2. Aufl., Verlag Julius Springer, Wien 1938; H. Brockmann, Angew. Chem. **53**, 384 [1940].

²⁾ H. N. Holmes u. Mitarbb., Journ. biol. Chem. **99**, 417 [1933].

³⁾ Aluminiumoxyd zur Adsorption nach Brockmann der Firma E. Merck.

aktivierung durch wiederholte Probenahme die Einstellung des gewünschten Aktivitätsgrades zu ermitteln. Wir haben daher die Festlegung und Prüfung des Adsorptionsvermögens chromatographisch mit Farbstoffgemischen durchgeführt. Als Testfarbstoffe verwendeten wir eine Reihe von Azofarbstoffen, deren Adsorption an Aluminiumoxyd vom Azobenzol über *p*-Methoxyazobenzol, Sudangelb, Sudanrot und *p*-Amino-azobenzol bis zum *p*-Oxy-azobenzol stufenweise zunimmt. Je zwei aufeinander folgende Glieder dieser Reihe werden zusammen in einer für alle Farbstoffe gleichen Konzentration in einem Gemisch aus 4 Teilen Benzin und 1 Teil Benzol gelöst. Von dieser Testlösung werden jeweils 10 ccm durch eine stets gleich große Säule des zu prüfenden Aluminiumoxydes filtriert, worauf man durch Nachwaschen mit 20 ccm Lösungsmittel das Chromatogramm entwickelt. Für jeden Aktivitätsgrad sind zur Prüfung ein oder zwei Farbstoffgemische vorgeschrieben, die im Chromatogramm einen bestimmten Trennungsgrad aufweisen müssen. Bei der Auswahl der Farbstoffe war neben deren Adsorptionseigenschaften ihre leichte Zugänglichkeit maßgebend. Die Festlegung der einzelnen Aktivitätsstufen soll durch das folgende Schema verdeutlicht werden:

Schema der Prüfung auf Aktivität.						
I	II		III		IV	V
1	1	2	2	3	3	4
Methoxy- azobzl.		Sudangelb		Sudanrot		Amino- azobzl.
Azobenzol	Methoxy- azobzl.	Methoxy- azobzl.	Sudangelb	Sudangelb	Sudanrot	Sudanrot
	Azobenzol		Methoxy- azobzl.		Sudangelb	

In diesem Schema bedeuten die römischen Ziffern den Aktivitätsgrad des Aluminiumoxyds, angefangen mit dem wirksamsten Präparat, die beiden Querstriche den oberen und unteren Rand der Adsorptionssäule. Die zwischen diesen Strichen stehenden Namen der Farbstoffe sollen anzeigen, wo sich ihre Zonen nach der Entwicklung des Chromatogramms in der Säule befinden. Ist ein Farbstoff bei der Entwicklung in das Filtrat übergegangen, so steht sein Name unter dem unteren Querstrich. Die arabischen Ziffern über den einzelnen Säulen bezeichnen die verwendeten Farbstoffgemische.

Man sieht, daß die Aktivität so abgestuft ist, daß ein Farbstoffgemisch, das sich bei dem einen Präparat in zwei untereinander liegende Zonen auf trennt, bei der nächst schwächeren Aktivitätsstufe so zerlegt wird, daß sich die eine Komponente im Filtrat befindet.

Es ist selbstverständlich, daß die angegebene Definition der Adsorptionsaffinität nicht so genau ist wie ihre zahlenmäßige Festlegung durch die Adsorptionsisotherme. Denn auch bei Präparaten gleicher Aktivität kann die Ausbildung der Farbzonen etwas verschieden ausfallen, so daß sich ihre Breite und ihr Zwischenraum nicht auf Millimeter genau reproduzieren läßt. Die Brauchbarkeit der Testmethode wird durch diese kleinen Ungenauigkeiten aber in keiner Weise beeinträchtigt.

Im allgemeinen wird aus Benzol weniger stark adsorbiert als aus Benzin. Man hat es also in der Hand, durch geeignete Mischung dieser Lösungsmittel, auch bei jeder Aktivitätsstufe das Adsorptionsvermögen wiederum zu variieren.

Einige, im Versuchsteil näher beschriebene Beispiele zeigen das Verhalten verschiedener Aktivitätsstufen gegenüber einzelnen Kohlenwasserstoffen. So bilden 1.2-Benz-pyren, Chrysen und Anthracen aus Benzol-Benzin-Gemisch an Aluminiumoxyd I und II adsorbiert gut ausgebildete, unter der Analysenquarzlampe erkennbare Zonen, während sie durch das Aluminiumoxyd zur Adsorption von E. Merck ohne Zonenbildung hindurchwandern. Diese beiden Aluminiumoxyde können also bei der Trennung von Produkten der Zinkstaubdestillation und der Selendehydrierung gut Verwendung finden. Anthro-dianthren (9 kondens. Benzolringe) wird aus Benzol an Aluminiumoxyd II gut als rote Zone adsorbiert, während es durch III ohne Zonenbildung hindurchgewaschen wird. Zur Trennung von Lycopin und Carotin aus Benzol-Benzin eignen sich die Präparate II und III. Guajazulen wird an II als blaue verwaschene Zone adsorbiert, an I dagegen unter Bildung brauner Produkte zerstört; ein Beispiel für ungünstige Wirkung zu aktiver Präparate. Wie sich am Gemisch Taraxanthin und Lutein zeigt, werden Xanthophylle auch an dem schwächsten Aluminiumoxyd V so stark adsorbiert, daß keine Trennung erfolgt.

Es ist naheliegend, die angeführte Methode auf andere für die Chromatographie geeignete Adsorptionsmittel zu übertragen, mit dem Ziel, angefangen mit den stark aktiven Bleicherden bis herunter zu dem schwach aber selektiv adsorbierenden Rohrzucker, eine Reihe in ihrem Adsorptionsvermögen wohldefinierter Adsorbentien festzulegen. Mit ihrer Hilfe wird besonders bei farblosen Verbindungen manche Aufgabe leichter zu lösen sein. Versuche in dieser Richtung haben wir begonnen.

Für die Trennung farbloser Stoffe lassen sich die angeführten Ergebnisse auch noch in anderer Richtung weiter ausbauen. Unterwirft man farblose Gemische dem Tswettschen Adsorptionsverfahren, so tritt auch hier eine Auftrennung in Zonen ein, nur lassen sich diese nicht ohne weiteres erkennen. Diese Schwierigkeit läßt sich auf verschiedenen Wegen überwinden. Der eine besteht darin, dem Gemisch einen Farbstoff zuzusetzen, der genau so fest adsorbiert wird wie der gesuchte Stoff und dadurch als Indicatorfarbstoff dessen Zonen anzeigt. Er muß sich nach der Adsorption in einfacher Weise wieder entfernen lassen. Dieses Verfahren konnten wir mit Erfolg bei der Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Lebertranen anwenden⁴⁾, wobei als Indicator für die Vitaminzone der Fettfarbstoff Sudan III diente⁵⁾, der sich nach der Adsorption durch alkoholisches Alkali vom Vitamin abtrennen ließ. Für die allgemeinere Anwendung des Verfahrens ist die Kenntnis einer ganzen Reihe solcher Indicatorfarbstoffe erforderlich. Als erste Vertreter einer solchen Reihe können die von uns benutzten Testfarbstoffe angesehen werden, von denen sich das *p*-Oxy-azobenzol und die beiden Sudanfarbstoffe nach der Adsorption gegebenenfalls durch Alkali, das *p*-Amino-azobenzol durch Säure abtrennen lassen. Es ist übrigens nicht immer erforderlich, daß der Indicatorfarbstoff genau so fest adsorbiert wird wie der gesuchte Stoff. Auch wenn sich der gesuchte Stoff in der Säule oberhalb oder unterhalb der Farbzone befindet, ist eine erfolgreiche Trennung möglich, vorausgesetzt, daß man durch einen Vorversuch seine Lage zur Farbzone festgestellt hat.

⁴⁾ H. Brockmann, Ztschr. physiol. Chem. **241**, 104 [1936]; **245**, 96 [1937].

⁵⁾ Damals als Indicatorrot 33 bezeichnet.

An den von uns benutzten Farbstoffen läßt sich gut zeigen, wie weitgehend die chromatographische Trennungsleistung durch Verwendung verschiedener Aktivitätsstufen des Adsorbens gesteigert wird. Mischt man die sechs Farbstoffe miteinander und versucht, das Gemisch durch Adsorption an nur einem der fünf Aluminiumoxydpräparate, etwa dem der mittleren Aktivität III zu trennen, so gelingt dies nicht; Azobenzol und *p*-Methoxy-azobenzol gehen ins Filtrat über, und die übrigen Farbstoffe werden zum Teil so fest adsorbiert und bilden infolgedessen so schmale Zone, daß eine saubere Trennung nicht möglich ist. Adsorbiert man dagegen nacheinander an den verschiedenen aktiven Aluminiumoxyden, so wird eine einwandfreie Zerlegung des Gemisches erreicht. Dieses Beispiel zeigt, welche Hilfe man bei der Aufarbeitung komplizierter Gemische von der aufeinander folgenden Anwendung verschiedener Aktivitätsstufen desselben Adsorptionsmittels zu erwarten hat.

Beschreibung der Versuche.

Farbstoffe: Zum Austesten der Aluminiumoxydpräparate wurden folgende Azofarbstoffe verwendet: 1) Azobenzol, käufliches Präparat, aus wenig Alkohol umkristallisiert, Schmp. 68°. 2) *p*-Methoxy-azobenzol aus *p*-Oxy-azobenzol durch mehrstündiges Erwärmen mit Dimethylsulfat und Kaliumcarbonat⁶⁾, nach 2-maligem Umkristallisieren aus verd. Methanol, Schmp. 55°. 3) *p*-Oxy-azobenzol aus diazotiertem Anilin und Phenol, umkristallisiert aus Benzol-Benzin, Schmp. 153°. 4) *p*-Amino-azobenzol, aus Benzin umkristallisiert, Schmp. 127°. 5) Benzol-azo-naphthol-(2), aus diazotiertem Anilin und β -Naphthol⁷⁾, von uns als Sudangelb bezeichnet; aus Methanol umkristallisiert, Schmp. 134°. 6) Sudanrot, käufliches als Sudan III bezeichnetes Präparat der Firma E. Merck; mehrmals aus Essigester umkristallisiert, Schmp. 184°. Alle Farbstoffe wurden vor Gebrauch feingepulvert im Hochvakuum getrocknet.

Zur Herstellung der Farbstofflösungen werden in allen Fällen je 20 mg der vorgeschriebenen beiden Farbstoffe zusammen in 10 ccm reinstem Benzol (über KOH destilliert) gelöst, worauf mit Normalbenzin (Kahlbaum) auf 50 ccm aufgefüllt wird. Von dieser Lösung verwendet man jeweils 10 ccm zur Prüfung des Aluminiumoxydes.

Es kann gelegentlich vorkommen, daß ein Farbstoff trotz mehrfachem Umkristallisieren chromatographisch nicht rein ist. Die Zone des betreffenden Farbstoffes ist dann nicht einheitlich, sondern es bildet sich beim Entwickeln des Chromatogrammes, meist oberhalb der Hauptzone, eine schmale Zone aus, welche die Verunreinigung enthält. In diesem Falle ist es zweckmäßig, vor dem Gebrauch die ganze Menge des Farbstoffes an dem geeigneten Aluminiumoxyd zu adsorbieren und nach längerem Nachwaschen die Hauptzone von der Zone der Verunreinigung abzutrennen. Nach Eluieren der Hauptzone mit Benzol, dem etwas Methanol zugesetzt ist, gewinnt man durch Verdampfen und Umkristallisieren des Rückstandes reinen Farbstoff.

Durchführung des Testes: Zur chromatographischen Prüfung des Aluminiumoxydes werden 10 cm lange Glasröhren von 1.5 cm lichter Weite

⁶⁾ Robertson u. Backhouse, Journ. chem. Soc. London 1939, 1269.

⁷⁾ Liebermann, B. 16, 2860 [1883].

verwendet, an deren unterem Ende ein kurzes Ablaufrohr von 4—5 mm Durchmesser angesetzt ist. Sie werden, nachdem ein Wattebausch von oben her in das Ablaufrohr fest eingedrückt ist, mit einer 5 cm hohen Schicht des Adsorbens gefüllt, auf die man einen dünnen Wattebausch oder ein Filtrierpapierscheibchen legt, damit beim Eingießen der Lösung ein Aufwirbeln des Adsorbens vermieden wird. Dann setzt man das Röhrchen mit Hilfe eines seitlich eingekerbten Korkens auf ein Kölbchen und gießt 10 ccm der Farbstofflösung auf die Säule. Die Durchlaufgeschwindigkeit beträgt etwa 20—30 Tropfen pro Minute. Bevor der letzte Anteil der Lösung in die Säule eingesickert ist, beginnt man mit dem Nachgießen des Lösungsmittels (1 Vol. Benzol + 4 Vol. Benzin), von dem bei allen Proben 20 ccm zum Entwickeln des Chromatogrammes benutzt werden.

Herstellung und Prüfung der verschiedenen Aktivitätsstufen: Als Ausgangsmaterial diente techn. Aluminiumhydroxyd der Firma E. Merck (Katalog-Nr. 1089), das wegen seiner Korngröße gut geeignet ist. Das Präparat geht fast vollständig durch ein Sieb von 0.12 mm Maschenweite, während bei einer Maschenweite von 0.06 mm etwa die Hälfte das Sieb passiert.

Aluminiumoxyd I. Das Ausgangsmaterial wird in kleinen Portionen unter häufigem Umrühren in einem Eisentiegel geglüht und im Exsiccator erkalten gelassen. Filtriert man durch die Testsäule 10 ccm Prüflösung 1, die *p*-Methoxy-azobenzol und Azobenzol in der angegebenen Konzentration enthält und wäscht mit 20 ccm Lösungsmittel nach, so muß das *p*-Methoxy-azobenzol als 4—5 mm breite, scharf abgegrenzte gelbe Zone am oberen Rande der Säule hängen bleiben, während das Azobenzol als 2—3 cm breite, etwas verwaschene Zone, durch einen 3—4 mm breiten fast farblosen Zwischenraum sich davon abgetrennt hat. Deutliche Trennung der beiden Zonen ist schon nach Durchwaschen mit 10 ccm Lösungsmittel erreicht. Das Präparat ist zu schwach, wenn der untere Rand der Azobenzol-Zone nach Waschen mit 20 ccm Lösungsmittel bereits das Ende der Säule erreicht hat.

Beispiele: Guajazulen wird an diesem Präparat aus Benzol-Benzin (1 Vol. + 4 Vol.) als schmutzig-braune, verwaschene Zone adsorbiert, wobei Zersetzung eintritt, denn mit methanolhaltigem Benzol bildet sich ein braunes Eluat. Chrysen und Anthracen werden aus dem gleichen Lösungsmittel als scharf abgegrenzte, unter der Analysenlampe blau fluoreszierende Zone am oberen Rande der Säule fest adsorbiert. Erst beim Nachwaschen mit Benzol verbreitern sich die Zonen und wandern durch die Säule.

Aluminiumoxyd II: Man bedeckt den Boden eines größeren Topfes etwa 3 cm hoch mit dem Ausgangsmaterial und erhitzt 4—6 Stdn. unter sehr häufigem Umschütteln über einen großen Pilzbrenner. Nach dem Erkalten läßt man in dünner Schicht ausgebreitet an der Luft liegen und prüft die Aktivität nach etwa 30 Minuten. Zur Prüfung der Adsorption kann man Prüflösung 1 oder besser Lösung 2 verwenden, die Sudangelb und Methoxy-azobenzol in der vorgeschriebenen Menge enthält. Filtriert man 10 ccm Lösung 1 und wäscht mit 20 ccm Lösungsmittel nach, so muß das Azobenzol völlig durch die Säule hindurchgelaufen sein, während das *p*-Methoxy-azobenzol sich in einer gelben Zone etwa 1 cm unterhalb des oberen Randes der Säule befindet. Verwendet man 10 ccm der Lösung 2, so bildet nach dem Nachwaschen mit 20 ccm Lösungsmittel Sudangelb eine 5—7 mm breite orangegelbe Zone am oberen Rande der Säule, während sich darunter deutlich abgetrennt die gelbe des *p*-Methoxy-azobenzols befindet.

Beispiele: Guajazulen läuft in Benzol-Benzin (1 + 4) gelöst schon beim Filtrieren der Lösung als blaue verwaschene Zone ziemlich schnell durch die Säule.

1,2-Benz-pyren und Chrysen werden aus Benzol-Benzin (1 + 5) auch beim Nachwaschen mit Lösungsmittel gut adsorbiert, während Anthracen eine Zone bildet, die beim Nachwaschen breit durch die Säule wandert. Verwendet man beim Benz-pyren und Chrysen Benzol zum Nachwaschen, so erfolgt ein schnelles Durchwandern der Zonen. Lycopin und β -Carotin werden aus Benzol-Benzin (1 + 4) als schmale Zonen adsorbiert, die sich bei längerem Nachwaschen gut voneinander trennen.

Aluminiumoxyd III: Dieses Präparat sowie die beiden folgenden werden aus II durch längeres Liegenlassen oder Schütteln an feuchter Luft (Keller) gewonnen. Von Zeit zu Zeit werden Proben mit Hilfe der Prüflösungen untersucht. Die Stufe III ist erreicht, wenn nach Filtrieren von 10 ccm Lösung 3, die Sudangelb und Sudanrot enthält, nach Nachwaschen mit 20 ccm Lösungsmittel Sudanrot als rote Zone, etwa 1 cm breit am oberen Rande der Säule sitzt, während Sudangelb darunter, deutlich davon abgetrennt, eine orangegelbe etwas breitere Zone bildet. Prüft man mit 10 ccm Lösung 2 unter Nachwaschen mit 20 ccm Lösungsmittel, so befindet sich Sudangelb als 1—2 cm breite, etwas verwaschene Zone in der Mitte der Säule, während das *p*-Methoxy-azobenzol durch die Säule hindurchgewaschen ist.

Beispiele: Benz-pyren, Chrysen und Anthracen werden aus Benzol-Benzin (1 + 4) nicht mehr als deutliche Zone adsorbiert. Lycopin und β -Carotin werden aus demselben Lösungsmittel als breite Zonen adsorbiert, von denen die des Carotins beim Nachwaschen in das Filtrat übergeht.

Aluminiumoxyd IV: Diese Stufe ist erreicht, wenn nach Filtrieren von 10 ccm Lösung 3 und Nachwaschen mit 20 ccm Lösungsmittel das Sudangelb sich nahezu oder ganz im Filtrat befindet, während Sudanrot als rote Zone 1—2 cm vom oberen Rande entfernt in der Säule hängt. Eine Trennung der beiden Farbstoffe in zwei Zonen ist meistens schon erreicht, wenn die Prüflösung in die Säule eingelaufen ist. Man kann zur Prüfung von Aluminiumoxyd IV auch Lösung 4 verwenden, die Amino-azobenzol und Sudanrot enthält. In diesem Falle sitzt nach Entwicklung des Chromatogrammes mit 20 ccm Waschflüssigkeit Amino-azobenzol ohne Trennungszone unmittelbar über der Zone des Sudanrotes.

Beispiele: Lycopin und β -Carotin werden aus Benzol-Benzin (1 + 4) so wenig adsorbiert, daß eine saubere Trennung nicht möglich ist. Verwendet man dagegen Benzin als Lösungsmittel, so erfolgt Trennung in 2 Zonen.

Aluminiumoxyd V: Zur Prüfung dient Lösung 5, die *p*-Oxy-azobenzol und *p*-Amino-azobenzol enthält. Beim Nachwaschen mit 20 ccm Lösungsmittel bleibt *p*-Oxy-azobenzol als gelbe Zone am oberen Rande der Säule hängen, das *p*-Amino-azobenzol hat sich als etwa 2 cm breite Zone, deren unterer Rand scharf abgegrenzt ist, deutlich von der *p*-Oxy-azobenzolzone getrennt.

Filtriert man Lösung 3 durch das Adsorbens, so werden beim Nachwaschen beide Farbstoffe gemeinsam durchgewaschen.

Taraxanthin und Lutein werden auch aus Benzol so fest adsorbiert, daß keine Trennung erfolgt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Unterstützung unserer Arbeit.