

TEMPERATURPROGRAMMIERUNG BEI DER ADSORPTIONSCHROMATOGRAPHIE VON LÖSUNGEN

GERHARD HESSE UND HEINZ ENGELHARDT*

Institut für organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg (Deutschland)

(Eingegangen den 2. August, 1965)

Der Einfluss der Temperatur ist in der Gaschromatographie wohlbekannt¹ und auch für den Ionenaustausch² ausführlich untersucht und klargestellt. Bei der *Adsorptionschromatographie* aus Lösungen sind die Literaturangaben widerspruchsvoll.

Es wurde beobachtet, dass manche Stoffe bei höherer Temperatur etwas schneller durch die Trennsäule wandern als bei Raumtemperatur³. Andere Autoren berichten aber, dass kein Einfluss der Temperatur auf das Retentionsvolumen zu beobachten sei⁴. Über den weiten Temperaturbereich von -50° bis $+200^{\circ}$ wurde bei Azofarbstoffen an Kieselgel kein einheitliches Verhalten festgestellt⁵. Einige R_F -Werte stiegen mit der Temperatur an, andere wurden kleiner oder überhaupt nicht beeinflusst. HESP UND BARABAS⁶ kommen ebenfalls zu der Ansicht, dass im allgemeinen die Temperaturerhöhung keinen Einfluss hat; lediglich bei einem schwefelhaltigen Erdöl wurde eine Verbesserung der Trennung bemerkt. Bei der Chromatographie von Zuckern an Kohle erfolgt die Desorption in der Wärme rascher, wodurch die Trennung beschleunigt werden kann⁷.

Diese Unsicherheit dürfte sich zum grossen Teil daraus erklären, dass Temperaturerhöhung sowohl die Adsorption der gelösten Stoffe wie die des Lösungsmittels herabsetzt. Massgebend für die Stärke der Adsorption ist aber die *Differenz der Adsorptionenthalpien* von gelöstem Stoff und Lösungsmittel pro Flächeneinheit, denn nur unter Verdrängung von Lösungsmittel kann ein anderer Stoff adsorbiert werden. Der Temperaturgang dieser Differenz ist aber nicht allgemein voraussehbar. Verwendet man Lösungsmittel mit geringer Affinität zum Adsorbens, so ist deren Eigenadsorption verhältnismässig schwach und auch ihre Änderung kann kaum den Einfluss überspielen, den die Temperatur auf die Adsorption der gelösten Stoffe hat. In solchen Lösungsmitteln sollte die Adsorption *aller* gelösten Stoffe mit steigender Temperatur schwächer werden, was sich in der Abnahme der Retentionsvolumina zeigen muss. Es ist bezeichnend, dass die einzigen eindeutigen Angaben in der Literatur sich auf solche Systeme beziehen.

In die gleiche Richtung weisen Beobachtungen, die wir⁸ kürzlich an Trennröhren mit grossem Querschnitt gemacht haben. Dort findet man häufig ein Vorauslaufen der Zonenmitte vor den Randpartien. Als Ursache konnte die langsamere Ableitung der Adsorptionswärme im Innern der Packung bewiesen werden.

Bei den oxidischen Adsorptionsmitteln pflegt die Eigenadsorption der Lösungsmittel im Sinne der elutropen Reihe⁹ zuzunehmen, die in grossen Zügen mit den

* H. ENGELHARDT, Dissert., Univ. Erlangen, Nürnberg, 1965.

Dielektrizitätskonstanten parallel geht. Am geringsten ist sie bei den Kohlenwasserstoffen und ihren Halogenderivaten. Zur Prüfung der aufgeworfenen Frage verwenden wir Aluminiumoxid mit Xylol, das bis 70° brauchbar ist; bei höherer Temperatur bilden sich Dampfblasen in der Säule, die die Ausbildung regelmässiger Elutionsbanden stören. Als Testsubstanzen haben wir die von BROCKMANN UND SCHODDER¹⁰ eingeführten Farbstoffe benutzt. Sie sind so ausgesucht, dass ihre Adsorptionenthalpien den ganzen Bereich der an Aluminiumoxiden verschiedener Aktivität überhaupt trennbaren Stoffe umfasst. Zunächst wurde die *Abhängigkeit des Retentionsvolumens von der Temperatur* untersucht. Azobenzol zeigt an Aluminiumoxid der höchsten Aktivitätsstufe I tatsächlich eine sehr starke Temperaturabhängigkeit im erwarteten Sinne (Fig. 1).

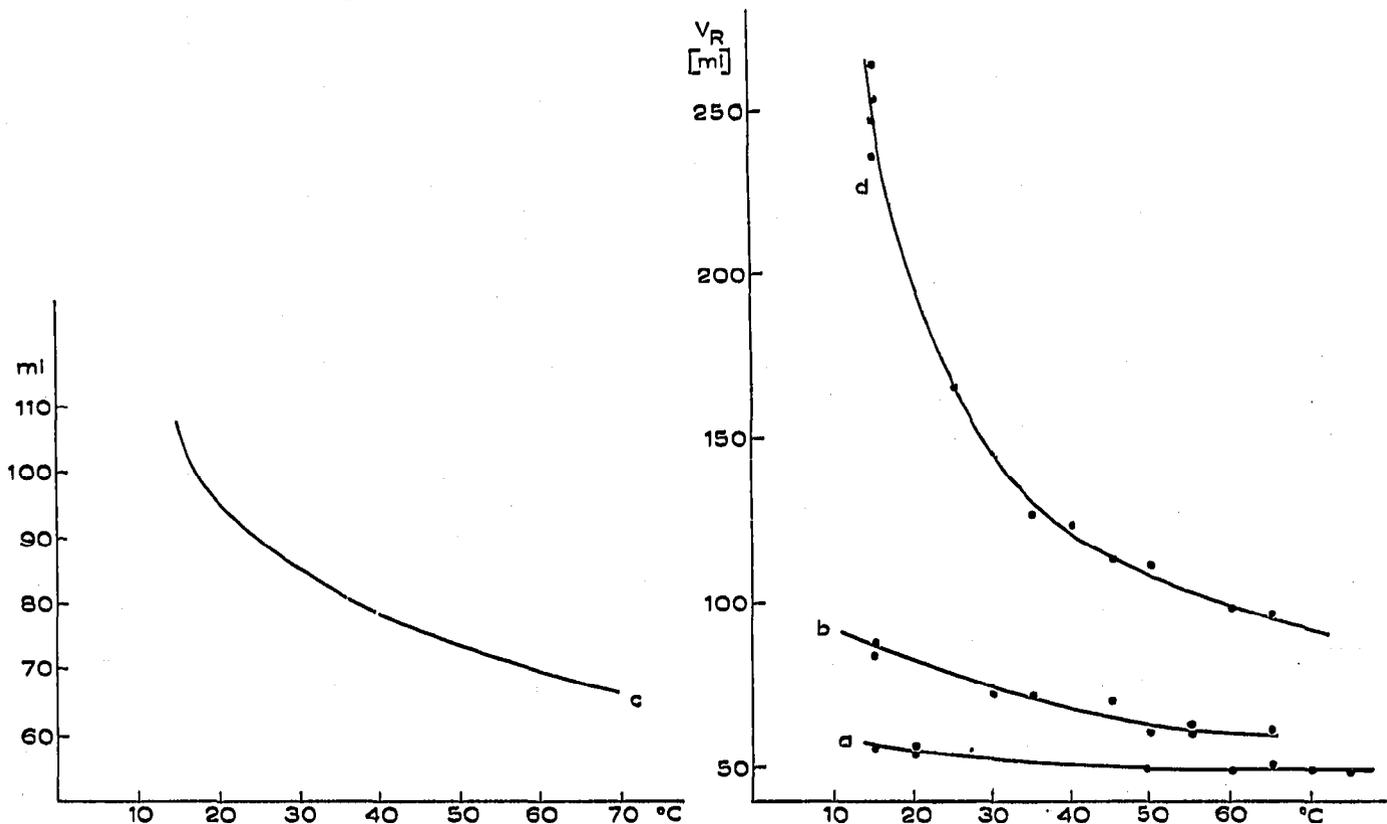


Fig. 1. Abhängigkeit des Retentionsvolumens von Azobenzol von der Temperatur. Aluminiumoxid (basisch), Akt. I; Xylol.

Fig. 2. Temperaturabhängigkeit der Retentionsvolumina von Sudan II (a), Sudan III (b) und *p*-Aminoazobenzol (d). Aluminiumoxid (basisch), Akt. II (Glycerin); Xylol.

Die polareren Farbstoffe verlangen weniger aktive Adsorptionsmittel. Die Aktivitätseinstellung durch Vorbelegung mit Wasser¹⁰ ist für unsere Versuche nicht brauchbar, weil sie bei höherer Temperatur nicht beständig ist. Wir ersetzen es daher durch die entsprechende Menge Glycerin¹¹, das von Xylol auch bei 60° nicht ausgewaschen wird. Ein mit 3 % Glycerin belegtes Aluminiumoxid entspricht nach dem Farbstofftest¹⁰ der Aktivitätsstufe II. Auch die spezifische Oberfläche* (71 m²/g) stimmte mit einem Präparat der Stufe II überein, dass durch Vorbelegung mit

* Herrn W. KOWALLIK danken wir für die Durchführung der Messungen.

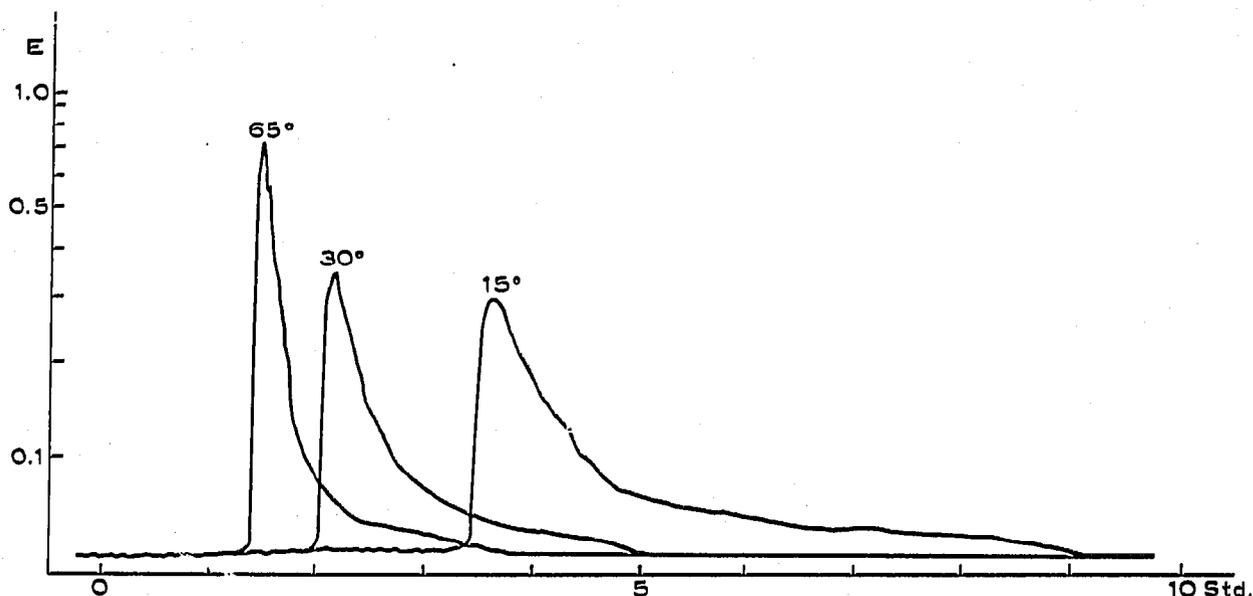


Fig. 3. Elutionskurven von Azobenzol. Al_2O_3 (basisch), Akt. I; Xylol.

Wasser erhalten worden war ($74 \text{ m}^2/\text{g}$). Die Temperaturabhängigkeit von drei weiteren Farbstoffen an diesem Präparat zeigt Fig. 2. Stets nimmt das Retentionsvolumen mit steigender Temperatur ab, jedoch in sehr verschiedenem Masse. Der am stärksten adsorbierte Stoff hat auch die stärkste Temperaturabhängigkeit.

Bei höherer Temperatur wandern also alle untersuchten Farbstoffe schneller durch die Säule. Da sie einen sehr breiten Bereich von Adsorbierbarkeiten umfassen, wird man das Ergebnis auf den gesamten Anwendungsbereich der Aluminiumoxide verallgemeinern können. Ausser einem mässigen Zeitgewinn besagt dies jedoch wenig über die Güte der Trennung.

Hierfür ist die *Form der Elutionsbanden* wesentlicher. In den folgenden Fig. 3 bis 5 sind deshalb die colorimetrisch ausgemessenen Elutionsbanden der untersuchten Farbstoffe jeweils für verschiedene Temperaturen wiedergegeben. Man sieht

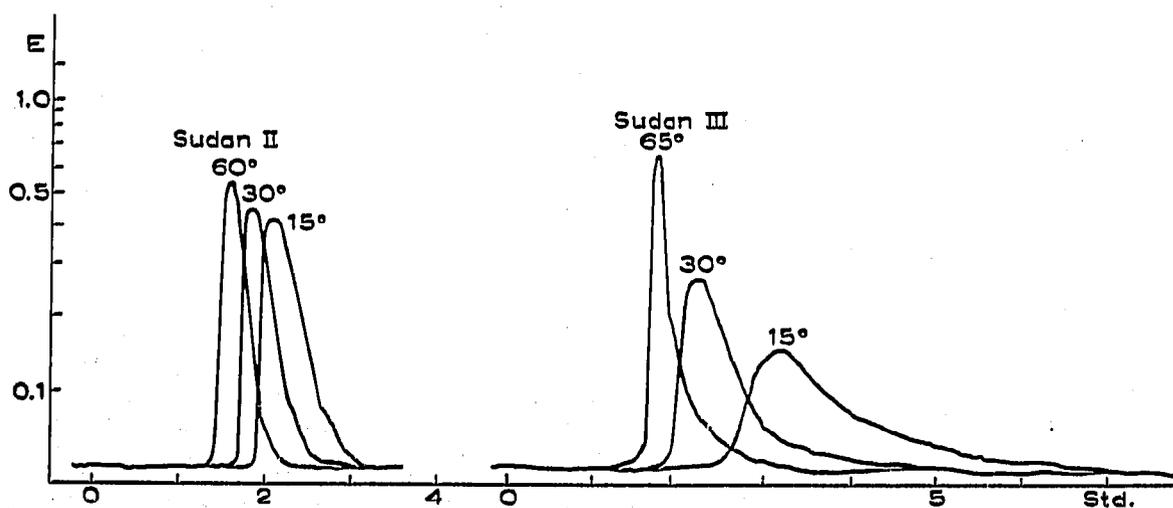


Fig. 4. Elutionskurven von Sudan II und Sudan III. Al_2O_3 (basisch), Akt. II (3% Glycerin); Xylol.

sofort, dass sie mit steigender Temperatur schmaler und höher werden und dass die Asymmetrie (das "tailing") abnimmt. Dies gilt auch für Sudan II, bei dem der zeitliche Vorteil wenig überzeugend ist.

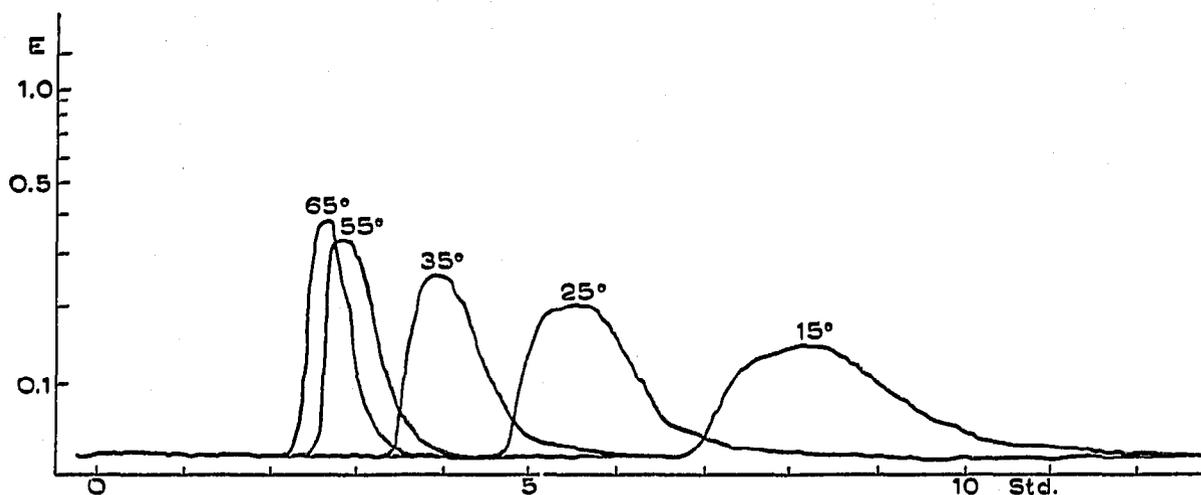


Fig. 5. Elutionskurven von *p*-Aminoazobenzol. Al₂O₃ (basisch), Akt. II (3 % Glycerin); Xylol.

Nach der Bodentheorie von MARTIN und Mitarb.^{12,13} lässt sich aus der Basisbreite und der Retentionszeit (t_R) einer Bande die *Bodenzahl* (n) der Trennsäule berechnen. Bei wenig symmetrischen Banden verwendet man besser die Breite in halber Höhe ($b_{1/2}$)¹⁴:

$$n = 8 \ln 2 \left(\frac{t_R}{b_{1/2}} \right)^2 \quad (1)$$

Die aus den Elutionsdiagrammen (Figs. 3–5) nach Gleichung (1) ermittelten Bodenzahlen sind in Fig. 6 als Funktion der Temperatur dargestellt.

Sie steigen mit der Temperatur ausnahmslos stark an, doch zeigen sich auch individuelle Stoffeigenschaften. Der Knick in der Kurve von Sudan III erklärt sich daraus, dass bei dieser Substanz die Neigung zur Schwanzbildung oberhalb 50° besonders stark abnimmt.

Mit dem Temperaturanstieg vermindert sich die Viskosität des Laufmittels und dadurch steigt die *Strömungsgeschwindigkeit* bei unvermindertem Druckabfall längs der Säule. In der Chromatographie von Lösungen ist dies fast immer mit einer Verringerung der Bodenzahl verknüpft; die Bodenhöhe (HETP) steigt also an. Bei Azobenzol wurde dieser Einfluss bei 15° und 65° untersucht.

Die Strömungsgeschwindigkeit steigt in dieser Anordnung beispielsweise von 36 auf 45 ml/Std. an, wenn von 15° auf 65° aufgeheizt wird. Die zugehörigen Bodenhöhen sind 3.3 und 2.7 mm (Fig. 7). Der Nachteil der grösseren Strömungsgeschwindigkeit wird durch die Ausbildung schmalerer Elutionsbanden mehr als ausgeglichen, und überdies hat man den Vorteil der geringeren Versuchsdauer. Es ist also nicht nötig, bei Temperaturerhöhung die Fließgeschwindigkeit konstant zu halten, was sicher mit erheblichem technischem Aufwand verbunden wäre.

Alle bisherigen Versuche wurden mit 1 mg Farbstoff auf 50 g Adsorptions-

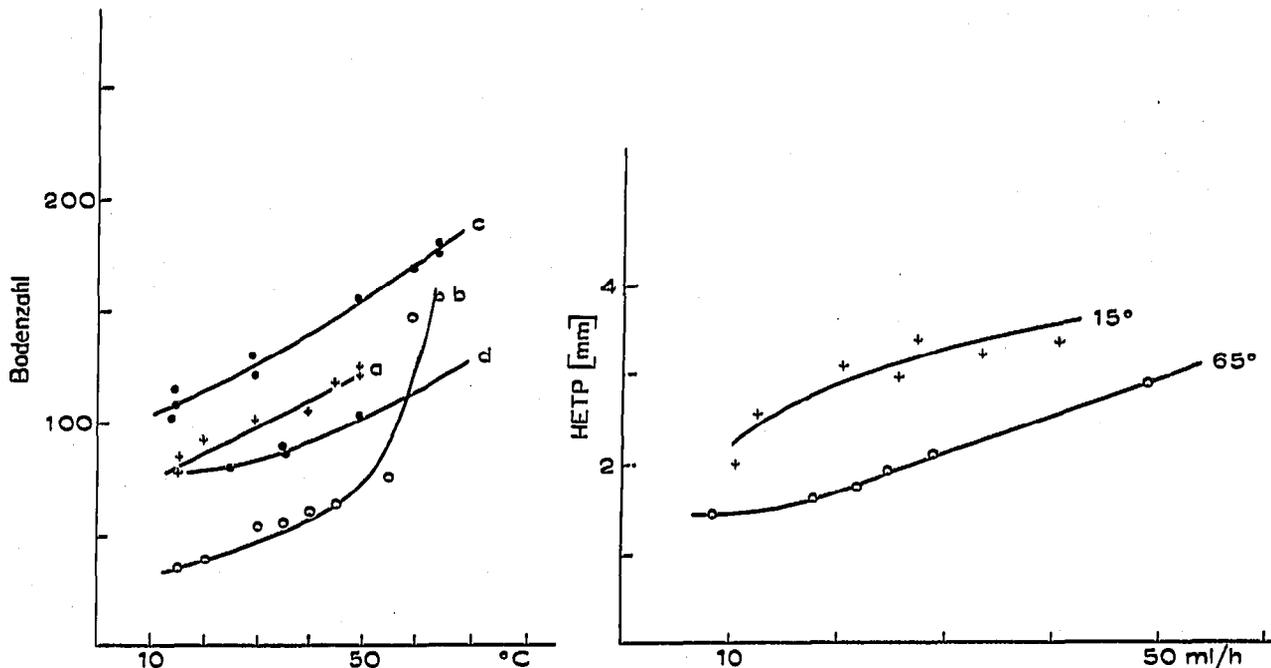


Fig. 6. Abhängigkeit der Bodenzahl von der Temperatur bei verschiedenen Testfarbstoffen. Al_2O_3 (basisch), Akt. I für (c), sonst Al_2O_3 , Akt. II (Glycerin). 45 cm Säule; Xylol. (a) Sudan II; (b) Sudan III; (c) Azobenzol; (d) *p*-Aminoazobenzol.

Fig. 7. Abhängigkeit der Bodenhöhe von der Strömungsgeschwindigkeit. Azobenzol an Al_2O_3 (basisch), Akt. I; Xylol.

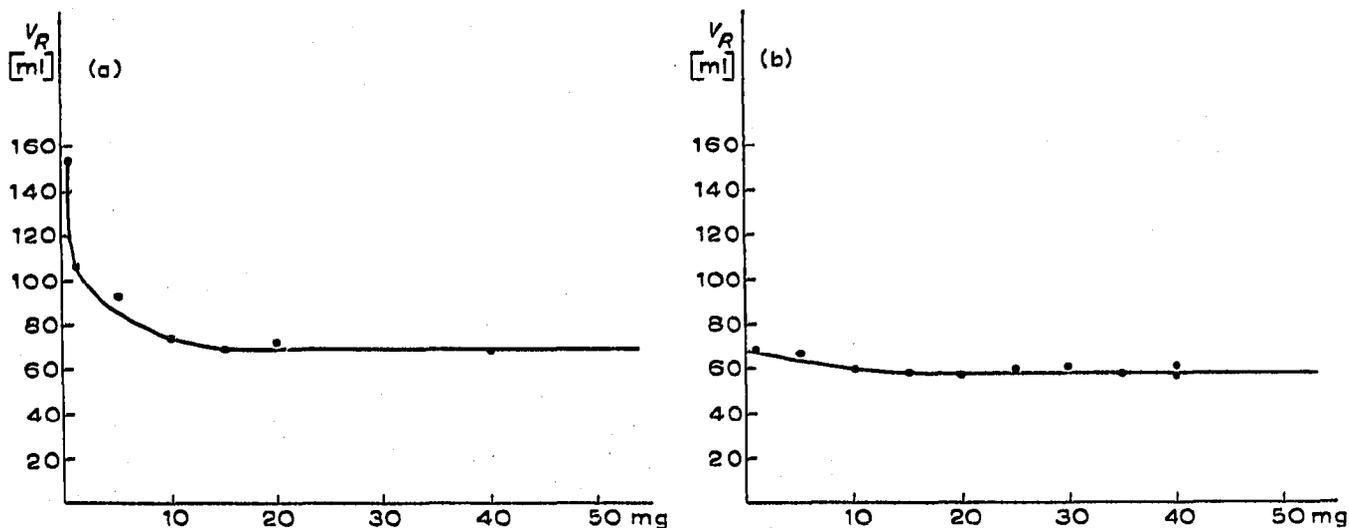


Fig. 8. Abhängigkeit des Retentionsvolumens von der Substanzmenge. 50 g Al_2O_3 (basisch), Akt. I; Azobenzol aus Xylol. (a) Bei 15°. (b) Bei 65°.

mittel durchgeführt. Bei höherer *Belastung der Säule* sinkt das Retentionsvolumen (Fig. 8) und vor allem die Bodenzahl (Fig. 9).

Beide Erscheinungen, die für eine chromatographische Trennung nachteilig sind, werden durch höhere Temperatur gemildert.

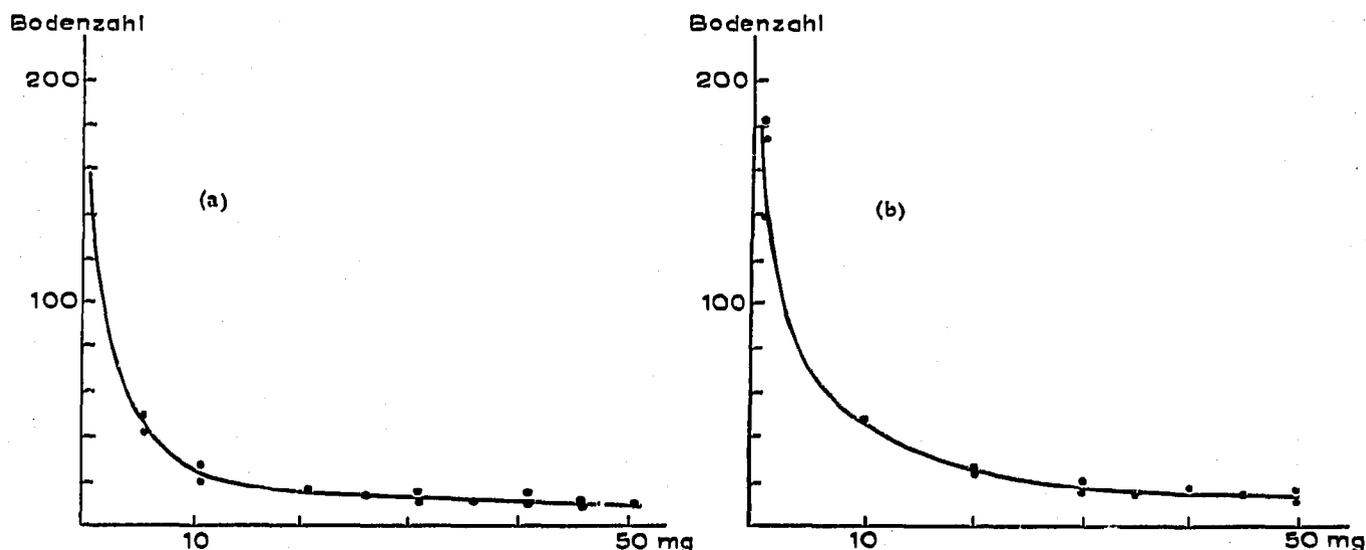


Fig. 9. Abhängigkeit der Bodenzahl von der Substanzmenge. 50 g Al_2O_3 (basisch), Akt. I; Azobenzol aus Xylol. (a) Bei 15° . (b) Bei 65° .

Bei linearer Sorptionsisotherme sollte das Retentionsvolumen von der Menge unabhängig sein. Aus der starken Abhängigkeit bei 15° muss man schliessen, dass dieser Idealzustand nicht annähernd erreicht ist. Bei 65° verhält sich das gleiche System fast ideal. Die starke Verzögerung kleiner Konzentrationen, die wohl auf einzelne besonders aktive Zentren am Adsorbens zurückzuführen ist und sich in einer starken Verbreiterung der Elutionsbanden äussern muss, ist kaum noch vorhanden.

Temperaturerhöhung macht das Adsorptionsmittel einheitlicher, da sie aus dem weiten Spektrum verschieden aktiver Zentren die schwächeren ausschaltet. Von der anderen Seite her vereinheitlicht eine Vorbelegung das Adsorbens, denn sie schaltet die aktivsten Zentren aus. Durch Kombination dieser beiden Massnahmen kann man den linearen Teil der Isotherme beträchtlich verlängern und dadurch die Bodenzahl einer Säule wesentlich steigern.

Es fällt auf, dass die Bodenzahl nach anfänglichem starkem Abfall bei höheren Belastungen wieder annähernd konstant wird. Wir vermuten, dass dann in der primären Zone Adsorptionssättigung erreicht ist. Bei der Elution fliesst daraus eine Gleichgewichtslösung ab, deren Konzentration nicht mehr durch die aufgegebene Menge bestimmt wird, sondern nur noch durch die Gleichgewichtslage zwischen der gesättigten Zone und dem Elutionsmittel. Man kann dieses so wählen, dass in der Säule immer nur eine sehr verdünnte Lösung fliesst. Dann befindet man sich im annähernd linearen Bereich der Adsorptionsisotherme und erhält verhältnismässig symmetrische Elutionsbanden¹⁵, aber der Versuch dauert entsprechend lange. Statt das Elutionsmittel zu ändern, kann man auch die Temperatur erhöhen. Dabei verlängert sich in der Regel der lineare Ast der Adsorptionsisotherme¹⁶, zugleich steigt

die Konzentration der Gleichgewichtslösung an. Im vorliegenden Fall (Fig. 9) ist auch bei hoher Belastung bei 65° eine bessere Trennung zu erwarten als bei 15°.

Fig. 9 erklärt mindestens teilweise die hohe Trennleistung der *Dünnschichtchromatographie*. Bei der Aufgabe verteilt sich die Substanz einigermaßen gleichmässig über den ganzen Startfleck und die Sättigungsadsorption wird in der Regel nirgends erreicht. Bei analytischer Anwendung werden üblicherweise 10^{-5} bis 10^{-4} g Substanz aufgegeben. Diesen stehen bei einer Schichtdicke von 250 μ und 10 cm Laufstrecke etwa 0.2 g Adsorbens zur Verfügung. Die Belastung bleibt also unter 10^{-4} g/g Adsorbens. Nach SNYDER¹⁵ befindet man sich damit noch im linearen Bereich der Adsorptionsisotherme. Bei Trennungen in der Säule begünstigt schon die Aufgabetechnik die Ausbildung einer gesättigten Primärzone. Ausserdem sind Belastungen von 1 % bis 0.1 % üblich, also 10^{-2} – 10^{-3} g/g Adsorbens. Aus Fig. 9 entnimmt man für 5 mg Azobenzol (10^{-4} g/g) 50 Böden, für 50 mg (10^{-3} g/g) nur noch 15–20 Böden unter sonst gleichen Bedingungen.

Nach diesen Vorarbeiten schien es lohnend, den *Einfluss höherer Temperatur auf eine chromatographische Trennung* in flüssiger Phase erneut zu untersuchen. In den folgenden Diagrammen werden Trennungen von je 10 mg *p*-Methoxyazobenzol, Sudan III und *p*-Aminoazobenzol an 35 g Aluminiumoxid bei 15° und 65° verglichen. Die Belastung der Säule ist mit 30 mg Gemisch auf 35 g Adsorptionsmittel etwa 0.1 % und erreicht damit die bei präparativem Arbeiten übliche Höhe. Bei Raumtemperatur (Fig. 10) dauert die Elution mehr als 10 Stunden und liefert die beiden letzten Farbstoffe in äusserst verdünnter Lösung sowie mit starker Überlappung.

Bei 65° dagegen ist die gleiche Trennung in 3 Stunden beendet (Fig. 11) und die Elutionsbanden sind viel schärfer und symmetrischer, die Lösungen konzentrierter. Die Trennung der beiden letzten Farbstoffe ist allerdings immer noch unvollkommen.

Eine weitere Verbesserung bringt die *kontinuierliche Steigerung der Temperatur* von 15° auf 65° während des Versuchs (Temperaturprogrammierung). Die in Fig. 12 zusätzlich eingezeichnete Linie gibt den Temperaturanstieg an. Die Symmetrie der ersten Banden ist zwar etwas schlechter geworden, wie es der niedrigeren Temperatur entspricht, aber alle Banden sind weiter auseinandergerückt und die beiden letzten Farbstoffe überlappen sich weniger.

Temperaturerhöhung ist dem Übergang zu einem polareren Fließmittel äquivalent. Bei *p*-Aminoazobenzol ergibt beispielsweise die Steigerung von 15° auf 65° eine Verringerung des Retentionsvolumens von 260 ml auf 100 ml (Fig. 2). Die gleiche Änderung erhält man bei Raumtemperatur, wenn anstelle von Xylol (V_R 264 ml) als Laufmittel Benzol mit 10 % Chloroform (V_R 102 ml) verwendet wird. Die Temperaturprogrammierung entspricht dann dem laufenden Zusatz eines polareren Lösungsmittels, wie er bei der Gradient-Elution üblich ist. Der technische Aufwand für den Regelthermostaten ist dabei nicht grösser als für eine Mischkammer mit Rührwerk. Weiter hat sich gezeigt, dass durch den Temperaturanstieg von aussen her dem Vorauslaufen der Zonenmitten entgegengewirkt wird⁸. Während bei Lösungsmittelzusätzen die Säule nur einmal benutzt werden kann, wird sie durch die Temperatursteigerung nicht verändert und liegt nach dem Erkalten wieder in der Ausgangsform vor. Schliesslich erleichtert die Vermeidung von Zusätzen die Wiederverwendung der Lösungsmittel und die physikalische Registrierung der Elutionsbanden im Durchlauf.

Bei Stoffen, die ein gemeinsames Chromophor haben, z. B. bei vielen Azofarb-

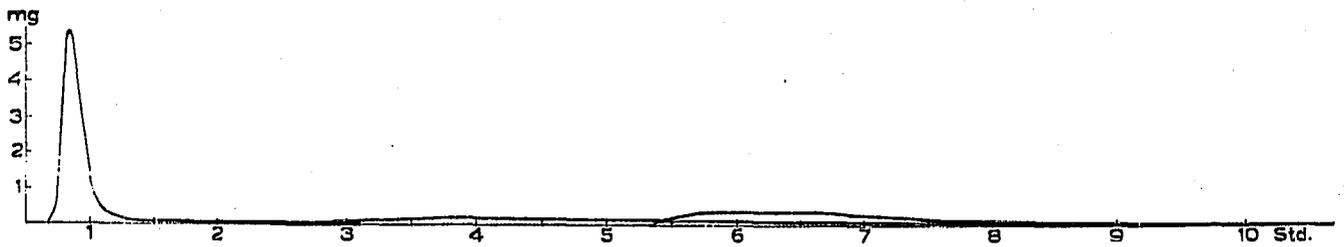


Fig. 10. Trennung von *p*-Methoxyazobenzol, Sudan III und *p*-Aminoazobenzol an Al_2O_3 (basisch), Akt. II (Glycerin) bei 15° ; Xylol.

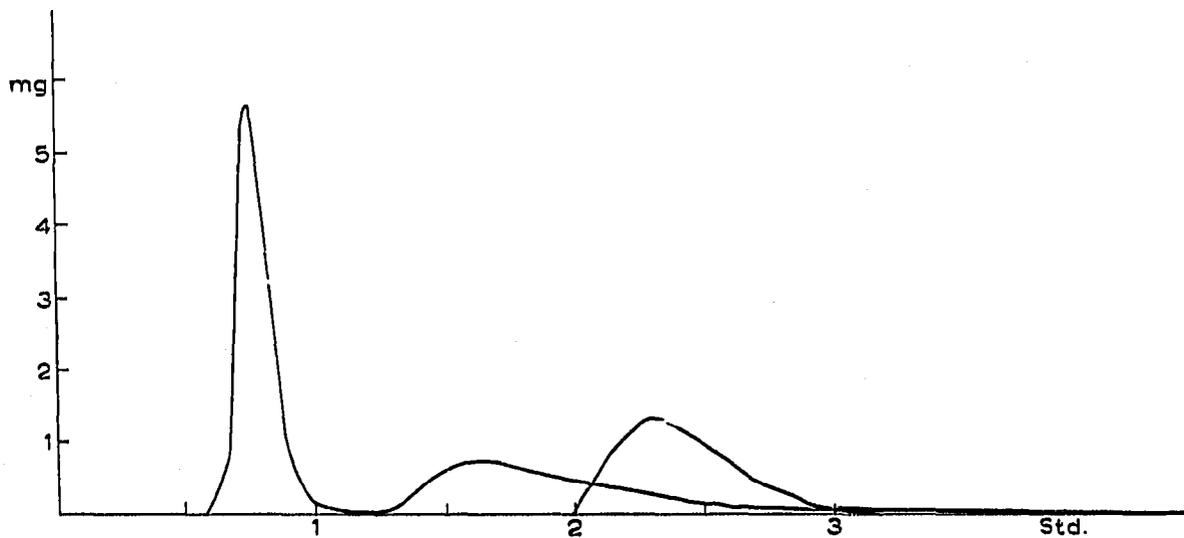


Fig. 11. Trennung von *p*-Methoxyazobenzol, Sudan III und *p*-Aminoazobenzol an Al_2O_3 (basisch), Akt. II (Glycerin) bei 65° ; Xylol.

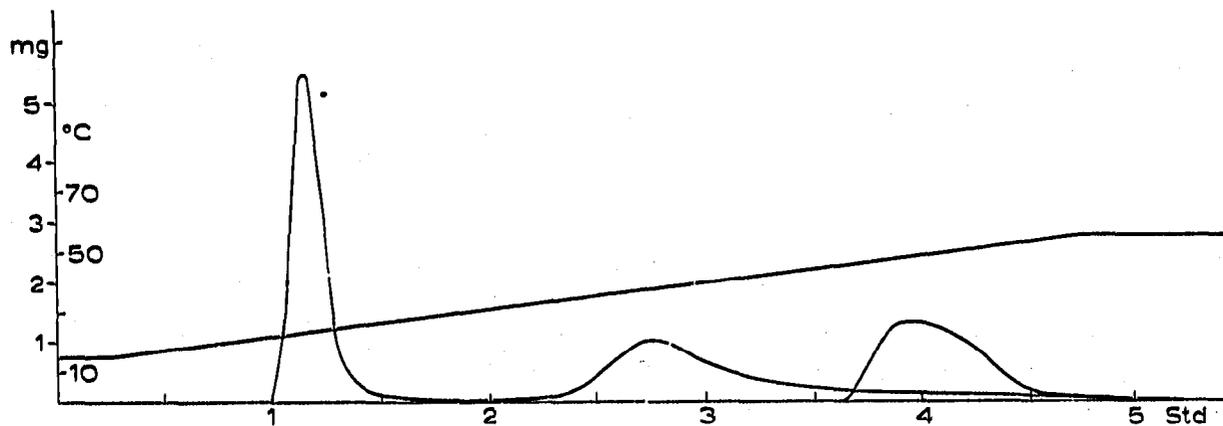


Fig. 12. Ansatz wie Fig. 11, jedoch Temperaturprogrammierung zwischen 15° und 65° . Temperaturanstieg $8.75^\circ/\text{Std.}$

stoffen, lässt sich die Trennung weitgehend automatisieren. Man schaltet eine Durchlaufküvette hinter die Trennsäule und registriert laufend die Extinktion an der Stelle des gemeinsamen Maximums. Die Anzeige des Photometers ist der Lichtdurchlässigkeit proportional. Dadurch erhält man eine logarithmische Anzeige der Extinktion, die der Konzentration proportional ist. Die kleinen Restkonzentrationen zwischen den Elutionsbanden, die für die Beurteilung der Trennung besonders wichtig sind, werden also stark vergrößert wiedergegeben. Als Beispiel ist in Fig. 13 das Diagramm einer Trennung von je 10 mg Azobenzol, *p*-Methoxyazobenzol, Sudan III und *p*-Aminoazobenzol wiedergegeben. Die beiden ersten Stoffe werden allerdings nur andeutungsweise getrennt; die Doppelzone kann an Aluminiumoxid der Aktivität I in einem eigenen Versuch aufgespalten werden. Hierbei möge man bedenken, dass die Testfarbstoffe so ausgesucht sind, dass sie sich mit der isothermen Chromatographie prinzipiell nicht an der gleichen Aktivitätsstufe trennen lassen.

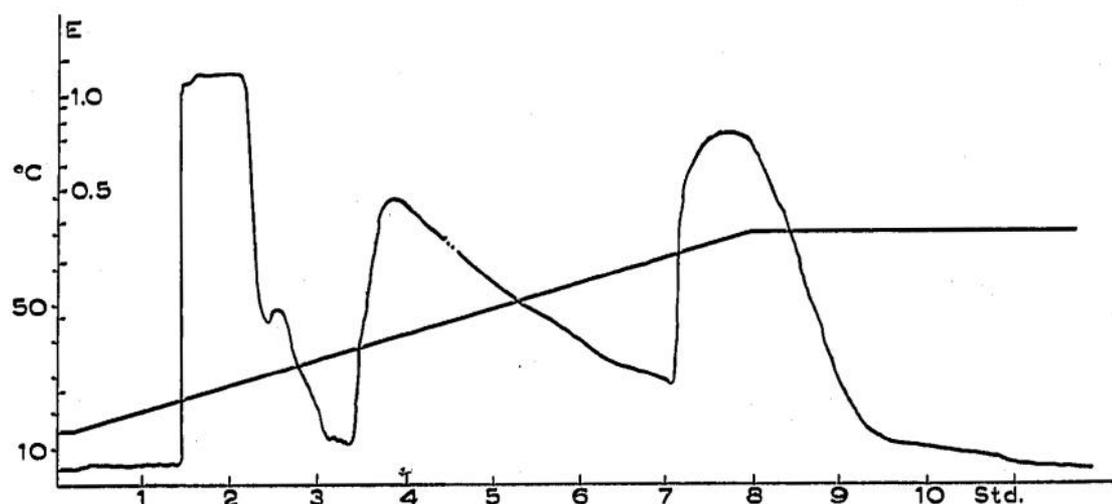


Fig. 13. Automatische Trennung in logarithmischer Aufzeichnung. Erklärung im Text. Temperaturprogrammierung 15–70°. Al_2O_3 (basisch), Akt. II (Glycerin); Xylol. Temperaturanstieg 7.1°/Std.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Alle Versuche mit festgelegter Temperatur wurden in einem *Trennröhr mit Heizmantel* nach Art eines Liebig-Kühlers ausgeführt. Am unteren Ende ist ein Glashahn angeschmolzen. Innerer Durchmesser 12 mm, Mantellänge 500 mm, Füllhöhe bei 50 g Aluminiumoxid 450 mm. Zur *Thermostatisierung* wurde ein Umpumpthermostat (Gebr. Haake, Berlin) verwendet. Die Verbindungsschläuche waren mit "Moosgummi" gegen Wärmeverluste geschützt. Zur *Temperaturprogrammierung* wurde das Regelthermometer des Thermostaten mit einem Elektromotor verstellt. Dazu war die Motorwelle mit einem Zahnradgetriebe verbunden, das Untersetzungen im Verhältnis 100:10:1 erlaubte. Die einzelnen Zahnräder konnten mit dem Regelkopf des Thermometers verbunden werden. Als *Adsorptionsmittel* wurden Aluminiumoxide "zur Säulenchromatographie" der Firma M. Woelm, Eschwege, verwendet. Sofern nicht anderes vermerkt ist, handelt es sich um "basisches" Oxid der Aktivitätsstufe I, die mit dem Triphenylchlormethantest¹⁷ nachgeprüft wurde. Es wurde auch zur Reinigung und Trocknung der Lösungsmittel^{18,10} verwendet.

Aluminiumoxid der Aktivität II

Es wurde durch Zusatz von 3 Gew.-% trockenem Glycerin zu dem genannten Präparat und zehnstündiges Tempern bei 90–100° erhalten¹¹. Die Wärmebeständigkeit dieser Einstellung gegenüber Xylol wurde durch wiederholte Messung des Retentionsvolumens von *p*-Aminoazobenzol bei 20° und 60° an der gleichen Säule geprüft. Eine typische Versuchsreihe ist in Tabelle I wiedergegeben.

TABELLE I

RETENTIONSOLUMEN VON *p*-AMINOAZOBENZOL BEI 20° UND 60°

Versuch	Temperatur (°C)	Reten- tions- vo- lumen (ml)
1	20	216
2	60	96
3	60	97
4	20	200
5	60	96
6	60	98
7	20	205

Packen der Säule

Das untere, konische Ende über dem Glashahn wird mit einem Wattepfropf verschlossen; darüber wird so hoch Seesand geschüttet, dass der obere Abschluss innerhalb des Heizmantels liegt. Bei geschlossenem Hahn wird in das genau senkrecht stehende Rohr die Suspension von 50 g Aluminiumoxid in 80 ml Benzol oder Xylol durch einen Trichter möglichst in einem Guss eingefüllt. Anschliessend wird leicht an die Röhre geklopft, um das Absitzen zu beschleunigen und Luftblasen zum Aufsteigen zu bringen; dabei öffnet man den Hahn und lässt das überschüssige Suspensionsmittel abfließen. Nach dem Planieren wird die Füllung mit einer 3–4 cm hohen Sandschicht abgedeckt.

Registrierung der Elutionsbanden und Bestimmung der Retentionsvolumina

Der Auslauf der Trennsäule wurde durch einen Teflonschlauch (innerer Durchmesser 0.7 mm) mit einer Durchlaufküvette (Schichtdicke 1 mm; Firma Hellma, Müllheim/Baden) verbunden. Anschliessend wurde das Eluat mit dem *Fraktions-sammler* Radirac (LKB-Producters, Stockholm) in gleichen Zeitintervallen aufgefangen. Die Extinktion wurde mit dem Spektralphotometer PMQ II (Zeiss, Oberkochen) laufend registriert. Dazu wird am eingebauten Galvanometer die Spannung (0–5 mV) abgegriffen und mit dem Kompensationsmessgerät GKt (Metrawatt, Nürnberg) aufgezeichnet (Papiervorschub 20 mm/Std.). Bei Temperaturprogrammierung wurde gleichzeitig die Temperatur mit einem Thermoelement gemessen und mit einem Kompensationsschreiber registriert. Aus Anzahl und Grösse der Fraktionen kann die (durchschnittliche) Strömungsgeschwindigkeit u , aus dem Tangentenschnittpunkt im Elutionsdiagramm die *Retentionszeit* (t_R) entnommen werden. Daraus lässt sich $V_R = t_R \cdot u$, das Retentionsvolumen berechnen.

ZUSAMMENFASSUNG

An mehreren Stoffen wird das Elutionsverhalten in unpolaren Lösungsmitteln an Aluminiumoxiden bei verschiedener Temperatur untersucht. Erhöhung der Temperatur verringert das Retentionsvolumen und noch mehr die Elutionszeit. Gleichzeitig nimmt die Bodenzahl der Trennsäule erheblich zu. Temperatursteigerung entspricht dem Übergang zu einem stärker eluierenden Laufmittel. Durch programmierte Temperaturerhöhung kann die Trennung in der Säule verbessert und ihre Dauer abgekürzt werden. Dieses Verfahren gibt die gleichen Ergebnisse wie eine Gradientelution. Dabei ist es vorteilhaft, dass das Lösungsmittel nicht verändert wird.

SUMMARY

The elution behaviour of different substances was studied in nonpolar solvents on alumina at different temperatures. By increasing the temperature, the retention volume and, even more so, the elution time is decreased. Simultaneously the number of the plates of the column is considerably raised. The increase of temperature is analogous to a change to a more strongly eluting solvent. By programming the increase of temperature the separation in the column can be improved and the time necessary for separation be shortened. This procedure gives the same results as gradient-elution, but is advantageous as the solvents need not be changed.

LITERATUR

- 1 O. VITZTHUM, *Z. Anal. Chem.*, 189 (1962) 66.
- 2 F. HELFFERICH, *Ionenaustauscher*, Bd. I, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1959.
- 3 H. H. STRAIN, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 18 (1946) 605.
- 4 A. L. LEROSEN UND C. A. RIVET, JR., *Anal. Chem.*, 20 (1948) 1093.
- 5 L. T. CHANG, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1235.
- 6 V. HESP UND J. BARABAS, *Magyar Kém. Lapja*, 10 (1955) 269.
- 7 C. C. TU UND K. WARD, JR., *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 4938.
- 8 G. HESSE UND H. ENGELHARDT, vorstehende Arbeit.
- 9 W. TRAPPE, *Biochem. Z.*, 305 (1940) 150.
- 10 H. BROCKMANN UND H. SCHODDER, *Ber.*, 74 (1941) 73.
- 11 G. HESSE UND G. ROSCHER, *Z. Anal. Chem.*, 200 (1964) 3.
- 12 A. J. P. MARTIN UND R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1358.
- 13 A. J. P. MARTIN UND A. T. JAMES, *Biochem. J.*, 50 (1952) 679.
- 14 R. KAISER, *Chromatographie in der Gasphase I*, B. I. Taschenbücher, Bibliographisches Institut, Mannheim, 1960, S. 50.
- 15 L. R. SNYDER, in C. N. REILLEY (Editor), *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, Vol. III, Interscience, New York, 1964.
- 16 S. ROSS UND J. P. OLIVIER, *On Physical Adsorption*, Interscience, New York, 1964.
- 17 G. HESSE, H. ENGELHARDT UND W. KOWALLIK, *Z. Anal. Chem.*, 214 (1965) 81.
- 18 G. HESSE UND H. SCHILDKNECHT, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 737.
- 19 G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 741;
G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 752.