

Dreißig Jahre Chromatographie

Von

L. ZECHMEISTER und L. v. CHOLNOKY

Mit einer Figur im Text

(Eingegangen am 28. 3. 1936. Vorgelegt in der Sitzung am 23. 4. 1936)

I.

Überblickt man die Geschichte der organischen Chemie, so wird ersichtlich, wie oft eine gewaltige Steigerung der Arbeitsmöglichkeiten von physikalischer Seite ausgegangen ist. Während aber z. B. die spektroskopische, die polarimetrische, die refraktometrische Methode bei dem Studium der Kohlenstoffverbindungen bereits allgemein ausgenützt wird, errang eine besondere Ausführungsform der Adsorptionsanalyse erst vor kurzem die Anerkennung weiterer Kreise.

Gelegentlich der Untersuchung von *Blattgrünauszügen* hat der verdienstvolle russische Botaniker M. TSWETT ein originelles und, wie es sich viel später erwies, überraschend vielseitig anwendbares Verfahren ersonnen, zum Nachweis sowie zur Trennung von Farbstoffen. Gerade vor 30 Jahren bezeichnete er diese Versuchstechnik als „*Chromatographische Adsorptionsmethode*“, kurz „*Chromatographie*“¹.

Schüttelt man die gemeinsame Lösung von mehreren stark gefärbten Verbindungen mit einem geeigneten Adsorbens, so findet, je nach den Mengenverhältnissen und den Adsorptionskoeffizienten, eine Verteilung zwischen den beiden Phasen statt. Günstige Bedingungen vorausgesetzt, werden die einzelnen Farbstoffe mehr oder weniger tief in das Adsorptionsmittel eindringen und sich dort anreichern. Das Adsorbat ist dann ein Gemisch, zu dessen Zerlegung kein einfacher Weg zur Verfügung steht. Ganz anders, nämlich viel günstiger, liegen jedoch die Verhältnisse, falls die Durchströmung des Adsorbens nur in *einer* definierten Richtung erfolgt.

In seiner grundlegenden Versuchsreihe goß TSWETT² den petrolätherischen Blattauszug auf eine, in ein vertikal gestelltes Glasrohr eingestampfte Säule von pulverförmigem Calciumcarbonat und stellte fest, daß der scheinbar homogene Pigmentinhalt der

¹ Ber. dtsh. botan. Ges. 24 (1906) 234.

² Siehe das Zitat am Ende dieses Aufsatzes.

durchsickernden Lösung sich alsbald zerlegt: im oberen Säulenteil erschien eine gelbe Scheibe, knapp darunter sah man zwei grüngefärbte Zonen, während drei andere, gelbe Komponenten noch weiter nach unten vorgedrungen sind und erst in den tiefer liegenden Bezirken des Carbonats hängen blieben. Noch viel schöner wird das „Chromatogramm“, wenn man beträchtliche Mengen des reinen Lösungsmittels nachgießt. So wird nämlich das Bild „entwickelt“ und die weißen Zwischenräume verbreitern sich, indem die einzelnen Farbstoffkomponenten mit ungleichen Geschwindigkeiten nach unten wandern. Eine gelbe Verbindung (Carotin) passierte die ganze Kolonne und gelangte in das Filtrat.

Die zusammengesetzte Natur des Chlorophylls und des Blattgelbs war damit bewiesen und die Art der Bestandteile richtig erkannt.

Nun zerschnitt TSWETT die Säule mit dem Skalpell und löste einzeln die individuellen Farbstoffe heraus, z. B. durch Zufügen von etwas Sprit. Nachdem das entfärbte Adsorbens aus den einzelnen Portionen durch Filtration ausgeschaltet wurde, standen die einheitlichen Pigmentlösungen zur Spektroskopie sowie zur chemischen Untersuchung bereit.

II.

Die *theoretischen Grundlagen* des einfachen Verfahrens, das einen großen Fortschritt gegenüber der Kapillaranalyse bedeutet, wurden bereits von dem Entdecker der Chromatographie erkannt. Es handelt sich offenbar um eine Selektion, auf Grund der Verschiedenheit von Adsorptionsaffinitäten, gegenüber einem gemeinsamen Adsorptionsmittel:

Betrachtet man die gesamte Aufnahmefähigkeit einer gegebenen Adsorbensmenge als konstant, so werden sich um diese Oberflächenkräfte alle in der Lösung vorliegenden Substanzen gleichzeitig, jedoch mit verschiedenem Enderfolg bewerben. Reicht die Menge des Adsorptionsmittels zur Bindung des gesamten (im Hinblick auf die einzelnen Adsorptionskoeffizienten verfügbaren) Pigments nicht aus, so wird nur die mit der *stärksten Affinität* ausgestattete Farbstoffart fixiert und hierdurch die adsorbierende Oberfläche „erschöpft“.

Dies ist in der Tat der Fall, als die auf die Säule gegossene Lösung zunächst mit der obersten, hinreichend dünn gedachten Scheibe in Berührung kommt. Durch das Passieren der letzteren ist also die Lösung nur in bezug auf ihren best-adsorbierbaren

Inhaltsstoff verdünnter geworden. Ansonsten blieb sie unverändert und sie tritt nun in die nächst tiefer liegenden Bezirke ein, wo der Restbetrag der erwähnten Substanz allmählich erschöpft und festgehalten wird. Sofort übernimmt ihre Rolle eine andere Verbindung, an der die stetig weitersickernde Flüssigkeit alsbald ebenfalls völlig verarmt, nachdem der zweite Farbstoff, unterhalb des ersteren, sich in der Säule abgelagert hat. So läuft das Spiel weiter, bis die Lösung praktisch farblos geworden ist und bis man schließlich in der von oben nach unten geltenden Reihenfolge der ausgebildeten Farbzonen ein Schema der *Adsorptionsrangordnung* erblickt.

Die gegebene Beschreibung der bei dem Zustandekommen des Chromatogramms verlaufenden Vorgänge ist nur in groben Zügen zufriedenstellend und sie harrt noch der Ergänzung in bezug auf feinere Teilprozesse. Denn offenbar trifft die Annahme nicht streng zu, daß die Oberfläche jedes einzelnen Körnchens von vorneherein und ausschließlich die mit der größten Affinität ausgestattete Komponente binde. Vielmehr werden auch Bruchteile des übrigen Farbstoffinhaltes in der Elementarschicht hängen bleiben; sie werden jedoch von der stetig nachfolgenden „stärksten“ Komponente aus ihrer Adsorptionsverbindung *verdrängt*, d. h. wieder in Lösung gebracht. Nach der Freilegung lassen sie sich von dem Flüssigkeitsstrom in die nächst tiefer liegenden Bezirke mitreißen, wo sie, vorübergehend fixiert, wiederum eine Verdrängung erleiden. Sie lagern sich endgültig erst ab, wenn nichts „Stärkeres“ mehr nachkommt, wenn also (in einem höher liegenden Säulenteil) der Farbring des Verdrängers bereits fertig ausgebildet ist.

Die experimentellen Stützen dieser Anschauung reichen bis zu TSWETT zurück. Auch wir hatten wiederholt Gelegenheit, diese eigenartigen Verhältnisse zu beobachten. So wurde z. B. die Lösung eines homogenen Farbstoffs eingeführt, welcher in der Nähe des oberen Säulenrandes hängen blieb. Nachdem das Chromatogramm sich stabil ausgebildet hatte, haben wir die Lösung einer zweiten, und zwar stärker adsorbierbaren Verbindung aufgegossen, mit dem Ergebnis, daß der früher erhaltene Farbring alsbald nach unten wanderte und ihren Platz an das zweite Pigment abtrat. Wiederholt man aber den Versuch in der umgekehrten Reihenfolge der Farbstoffe, so findet eine derartige Verdrängung nicht statt. Die Lösung des später eingeführten (schwächer adsorbierbaren) Farbstoffes passiert jetzt den bereits fixierten Farb-

ring, um eine tiefer liegende Stelle zu belegen. In beiden Fällen erhält man schließlich das nämliche Chromatogramm. Unter sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen ist also nur die Reihenfolge der einzelnen Körper gegeben, während der in der Kolonne absolut eingenommene Platz jedes Farbstoffs von der Art der übrigen abhängt.

Interessant sind auch die Vorgänge, die sich beim „*Entwickeln*“ des Chromatogramms abspielen. Saugt man reines Lösungsmittel nach, so wird (den einzelnen Adsorptionskoeffizienten entsprechend) Farbstoff herausgelöst; in der Elementarschicht steuert die Verteilung zwischen den beiden Phasen dem betreffenden Adsorptionsgleichgewicht zu. Ist dasselbe erreicht worden, so läuft die Lösung, in bezug auf die Konzentration an dem betreffenden Farbstoff, unverändert durch die tieferen Lagen der Zone. Sobald sie jedoch auf farbstofffreie Bezirke stößt, setzt von neuem Adsorption ein und nun läßt sich der Farbstoffinhalt von einer Reihe dünngedachter Scheiben schließlich vollständig abfangen. Die Flüssigkeit fließt also farblos weiter, nachdem ihr Pigmentinhalt, im Verlaufe der erwähnten Vorgänge, allmählich von Null bis zu einem Grenzwert angestiegen ist, um wieder auf Null zu sinken (TSWETT).

Jede Volumeinheit des Solventen löst einen bestimmten Bruchteil des Farbstoffes heraus und transportiert ihn nach einem tiefer liegenden Bezirk der Kolonne. Das Integral einer großen Anzahl solcher Teilprozesse kommt in einem langsamen *Abwärtswandern* sämtlicher Pigmentkomponenten zur Geltung. Es ist klar, daß die Wanderung der einzelnen Zonen, schon mit Rücksicht auf die Verschiedenheit der Adsorptionskoeffizienten, mit ungleichen Geschwindigkeiten einsetzen und verlaufen wird. Im allgemeinen werden die am schwächsten adsorbierbaren und leichtest eluierbaren Komponenten am raschesten nach unten geführt. Da aber gerade solche Farbstoffe schon von Haus aus die untersten Abschnitte des rohen Chromatogramms gebildet haben, müssen sich die weißen Zwischenräume während des Entwickelns vergrößern oder sie zeigen sich überhaupt erst jetzt. Das Chromatogramm dehnt sich aus, sehr zum Vorteil des Experimentators, der nun die aus dem Rohr gedrückte Säule zu *zerschneiden* hat.

Über die darauf folgende *Elution* der einzelnen Farbstoffe aus den Säulenteilen sei folgendes vermerkt. Das geeignete Mittel hierzu ist empirisch zu wählen. Wendet man z. B. Schwefelkohlenstoff, Benzin, Petroläther, Tetrachlormethan im Hauptversuch an,

so bewirkt nach TSWETT meist schon der Zusatz von etwas Spirit sofortige Elution. Man erwarte natürlich nicht, daß eine Verbindung aus einem Medium, in welchem sie schwer löslich ist, leicht adsorbiert werde, während gute Solventen zur Elution geeignet seien. Oft zeigt sich gerade das Gegenteil; z. B. läßt sich das Carotin aus Benzin sehr gut chromatographisch festhalten und mit Hilfe von Alkohol eluieren, obzwar es im ersteren Solvent verhältnismäßig reichlich, in dem letzteren so gut wie gar nicht löslich ist. Hier handelt es sich eben nicht um einfache Lösungsvorgänge, sondern um die Zerlegung von Adsorbaten, wobei die Verhältnisse betr. Oberflächenspannung und mitunter auch chemische Faktoren mitspielen.

III.

Die *Technik der Chromatographie* ist einfach. Wir beschreiben sie an Hand der nebenstehend abgebildeten Vorrichtung, die sich in unserem Laboratorium seit Jahren bewährt hat und meist mit den Maßen 10×150 bis 60×260 mm verfertigt wird³. Zwecks Füllung entfernt man den unten angeschliffenen Ansatz, führt von oben eine passende, durchlöcherichte Porzellanplatte ein, schichtet etwas Watte darauf und schließlich, in kleinen Portionen, das getrocknete und gesiebte Adsorptionsmittel (z. B. Calciumcarbonat, Calciumhydroxyd, Aluminiumoxyd, Zuckerpuder, Bleicherde usw.), das im vertikal gestellten Rohr mit Hilfe eines Holzpistills teilweise festgestampft wird. Etwa $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ des Rohrinhaltes bleibt frei. Nun wird der Unterteil angesetzt, der Apparat mittels eines Gummistopfens an eine Saugflasche montiert und die letztere mit der Pumpe verbunden. Unter mäßigem Saugen gießt man die Lösung allmählich auf, so daß die obere Grenzfläche des Adsorbens ständig mit Flüssigkeit bedeckt bleibe. Nach dem Fixieren des Farbstoffinhaltes beginnt man, ohne Unterbrechung, nach und nach reichliche Mengen des reinen Lösungsmittels einzuführen. Verläuft das Entwickeln allzu langsam, so ist der Zusatz eines schwachen Elutionsmittels statthaft.



³ CHOLNOKY, Ber. ung. pharm. Ges. 9 (1933) 400; die Verf., Liebigs Ann. Chem. 509 (1934) 276. — Eine viel mehr Material fassende Apparatur wurde von WINTERSTEIN und SCHÖN beschrieben: Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 230 (1934) 139. — In manchen Fällen ist die Verarbeitung einer Anzahl von kleineren Röhren vorteilhafter; z. B. wurden die entsprechenden Schichten von 380 Chromatogrammen vereinigt: Liebigs Ann. Chem. 516 (1935) 30.

Hat man das Rohr vor dem Versuch gleichmäßig gefüllt, so zeigen alle Teile des fertigen Chromatogramms eine tadellos waagrechte Schichtung, was sich jedoch nicht immer erreichen läßt. Man sieht dann Verbiegungen und Verzerrungen der einzelnen Zonen. Ein geübter Arbeiter gleicht derartige Fehler bei der Aufteilung der Kolonne aus, durch kunstgerechtes Abschaben gewisser Säulenteile. Zur vollkommenen Scheidung der Komponenten dient, wenn nötig, eine Wiederholung der Adsorptionsanalyse, nachdem man die gewünschte Pigmentfraktion aus seinem Eluat in das ursprünglich angewandte Lösungsmittel oder in ein anderes Medium übergeführt hat. Nun wird jede Komponente zum Hauptfarbstoff des betreffenden Chromatogramms und läßt sich leicht von den Begleitern trennen.

IV.

Der *diagnostische Wert* des Verfahrens ist, wie schon TSWETT hervorhebt, sehr groß: die Einheitlichkeit bzw. die zusammengesetzte Natur eines Pigments kann oft in wenigen Minuten festgestellt werden. Bei einiger Übung schätzt man auch die relativen Mengenverhältnisse richtig ein, doch sei in diesem Zusammenhang betont, daß zwischen der Dicke der Farbscheiben und der Pigmentmengen keineswegs Proportionalität besteht. Denn abgesehen von anderen Faktoren, enthält oft die Rohlösung farblose Begleiter, die das Aussehen des Chromatogramms beeinflussen. Zonen mit stark verunreinigtem Material zeigen nicht selten die Tendenz, sich abnormal auszubreiten, wobei natürlich auch der Farbton verschoben wird.

Zu vortrefflichen quantitativen Ergebnissen führt die Mikrokolorimetrie der einzelnen Eluate. Dabei sollte aber die Identifizierung mit bekannten Farbstoffen nicht leichtfertig erfolgen. Die regelmäßig angewandte spektroskopische Messung genügt nicht immer, da, wie bekannt, die Lichtextinktion vorwiegend von der chromophoren Gruppierung und nicht von dem Bau des Gesamtmoleküls abhängig ist. Daher ziehe man auch chemische Merkmale, wie Farbreaktionen, zu Rate, ferner die Kristallisationsfähigkeit, sowie Größe und Form der Kristalle, endlich auch das „Misch-Chromatogramm“.

Das letztere dient zur Entscheidung der Frage, ob zwei Präparate identisch sind oder nicht. Ein künstlich vorbereitetes Gemisch wird gelöst und im Adsorptionsrohr geprüft. Man sieht dann ohne weiteres, ob das Chromatogramm nur von einer ein-

zigen Farbzone gebildet wurde bzw. ob eine Aufteilung stattgefunden hat. Die Misch-Chromatographie ist der Bestimmung des Misch-Schmelzpunktes an die Seite zu stellen und sie erfordert in günstigen Fällen kaum mehr Substanz als jene altbewährte Identitätsprobe.

Wie aus den obigen Ausführungen ersichtlich ist, wird man an ein Farbstoffpräparat in Zukunft größere Anforderungen stellen müssen als bisher, bevor die Einheitlichkeit endgültig ausgesprochen wird: das Pigment muß „chromatographisch homogen“ sein. Oft wird die TSWETT^{sche} Säule auch dort Uneinheitlichkeit anzeigen, wo alle üblichen physikalischen und chemischen Methoden versagt haben. Bei dem gegenwärtigen Stand namentlich der Biochemie ist es indessen wichtig, noch unbekannte Heterogenitäten der Natur abzurufen.

V.

Als das zusammenfassende Werk von TSWETT⁴ (1910) erschien, wandte man die Chromatographie außerhalb seines Laboratoriums kaum an; er zitiert Arbeiten von KRÄNZLIN⁵ und von STOKLASA⁶. Aber auch in den nachfolgenden Jahren blieb die neue Arbeitstechnik fast unberücksichtigt, wobei der Umstand mitspielte, daß das TSWETT^{sche} Buch leider nur in russischer Sprache erschien. Man kann das von 1906 bis 1931 reichende Vierteljahrhundert als die Latenzzeit in der Geschichte der Chromatographie bezeichnen. Die nachfolgend aufgezählten, isoliert gebliebenen Aufsätze stammen aus dieser Frühperiode.

Einer der ersten Autoren, der die Tragweite des neuen Verfahrens erkannte, war PALMER, der, gemeinsam mit ECKLES⁷, schon 1913—1914 die Bearbeitung des Milchfettpigments und anderer tierischer und pflanzlicher Produkte ausführt. Auch hat PALMER in seiner Monographie⁸ (1922) die chromatographische Technik beschrieben und gewürdigt. Inzwischen nahm VEGEZZI⁹ (1916) die Trennung von Farbstoffen der Schneckenleber vor.

⁴ Zitat am Ende dieses Aufsatzes.

⁵ Dissert. Berlin (1908).

⁶ STOKLASA, BRDLIK und ERNST, Ber. dtsch. botan. Ges. 27 (1907) 10.

⁷ J. biol. Chem. 17 (1914) 191, 211, 223, 237, 245; Missouri agr. exper. stat. 9 (1914) 313; 10 (1914) 339; 11 (1914) 391; 12 (1914) 415.

⁸ Carotinoids and related pigments, New York; The chemical catalog Co. (1922).

⁹ Dissert. Fribourg (1916).

Etwas spätere einschlägige Arbeiten stammen von COWARD¹⁰ (1924), sowie von LIPMAA¹¹ (1926) und betreffen Blumenauszüge bzw. die Scheidung von Rhodoxanthin und Xanthophyll.

Die Blütezeit der Chromatographie datiert seit 1931 und ist vor allem durch die Übertragung der Versuche in den *präparativen Maßstab* gekennzeichnet.

TSWETT arbeitete mit kleinen Stoffmengen und pflegte die gelösten Farbstoffe nicht abzuscheiden. So konnte man ihre Kristallisierbarkeit kaum und sie gelangten auch nie zur chemischen Analyse; deshalb blieb manche gute Beobachtung unbeachtet oder sie wurde stillschweigend angezweifelt. Daß aber bereits TSWETT die präparative Anwendbarkeit der Chromatographie bewußt war, zeigt u. a. sein Versuch, in welchem die Isolierung von „Lecithin“-Kristallen aus frischem Eigelb durchgeführt wird: Der entsprechend vorbehandelte Extrakt floß durch eine Inulinsäule und das Fixierte wurde so lange mit Petroläther gewaschen, bis die abtropfende Lösung, auf Seidenpapier verdampft, keinen Fettfleck mehr hinterließ. Nun wurde mit Sprit eluiert und die Flüssigkeit verdampft; sie lieferte myelinförmige Kristalle einer doppelbrechenden Substanz von wachsartiger Konsistenz.

Derartige, vereinzelte Beobachtungen sind indessen ohne allgemeineren Einfluß auf die organische Arbeitsweise geblieben. Das TSWETT^{sche} Verfahren gewann erst in einem Zeitpunkt Aktualität, als aus den klassischen Enzymforschungen von WILLSTÄTTER und seiner Schule bereits bekannt geworden war, daß man durch planmäßig geleitete Adsorptionen und Elutionen feine strukturelle Unterschiede präparativ erfassen kann.

Die Chromatographie wurde anfangs 1931 von KUHN und LEDERER¹² sowie von KUHN, WINTERSTEIN und LEDERER¹³ mit Erfolg in die präparative Chemie der *Polyenfarbstoffe* eingeführt. Die erstere Untersuchung betrifft die Zerlegung des damals gerade 100 Jahre lang bekannt gewesenen Carotins in seine Komponenten, nebst Isolierung von α - und β -Carotin, während die letztgenannten Autoren das Lutein aus verschiedenen Pflanzenteilen gewannen und den Eidotterfarbstoff aufteilen konnten. So ging die 1910 gemachte Voraussage von TSWETT in Erfüllung: „Sehr möglich, daß das Blattcarotin kein chemisches Individuum ist, sondern ein Ge-

¹⁰ Biochem. J. 18 (1924) 1114.

¹¹ C. r. Acad. Sci. Paris 182 (1926) 847.

¹² Naturwiss. 19 (1931) 306; Ber. dtsch. chem. Ges. 64 (1931) 1349.

¹³ Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 197 (1931) 141.

misch von 2 oder von einigen Homologen, welche man mit Hilfe der Adsorptionsmethode voneinander scheiden könnte, unter Benützung geeigneter Adsorbenten.“

Noch Ende 1931 hat PETTER¹⁴, unabhängig von den erwähnten Forschungen, das Verfahren von TSWETT zur Aufteilung des Bakterioruberins benützt, gleichfalls in präparativem Maßstab.

In den letzten Jahren verhalf die präparativ ausgeführte Chromatographie, namentlich in den Händen von KARRER¹⁵ sowie von KUHN¹⁶ und ihrer Mitarbeiter, die Chemie der Carotinoide zu einem neuen Aufschwung, so daß diese Methodik aus dem erwähnten Gebiet gar nicht mehr weggedacht werden kann. Die Versuchsführung wird ständig ausgestaltet; so trennt man z. B. mit Hilfe von Calciumhydroxyd (KARRER und WALKER¹⁷) das α - und β -Carotin auf einen Schlag. Der Leitgedanke bei allen diesen und von anderer Seite ausgeführten Untersuchungen ist: die in größerem Maßstab ausgeführte Scheidung durch Reindarstellung und Analyse der individuellen Farbstoffe zu ergänzen, um die Präparate der strukturellen Klärung zuzuführen. Die Anzahl der auf dem Gebiet der Polyene höherer und niederer Pflanzen (inkl. Pilz- und Bakterienfarbstoffe) veröffentlichten Arbeiten geht bereits in die Hunderte, so daß wir auf Sammelwerke verweisen müssen (s. unten). Neuestens hat die rege Tätigkeit sich auch auf das tierische Lipochrom ausgedehnt (KUHN, KARRER, v. EULER, LEDERER, WILLSTAEDT, HEILBRON, ZECHMEISTER-TUZSON u. a.). Die erste moderne Zusammenfassung der chromatographischen Arbeitsweise stammt von WINTERSTEIN¹⁸.

Im Verlaufe der mit Polyenen ausgeführten Studien ist ein bedeutendes Material betr. den Zusammenhang zwischen chemischer *Struktur* und *Adsorptionsverhalten* gesammelt worden. Während die Überlegungen von TSWETT auf physikalische Wesenszüge sich beschränken mußten, ist man heute über den Einfluß von gewissen Atomgruppen auf die Adsorptions-Rangordnung recht gut unterrichtet. Je länger ein ununterbrochen konjugiertes Doppelbindungssystem im Molekül sich ausdehnt, je mehr Carbonyle und Hydroxyle vorliegen, ein um so höherer Platz kommt dem chromatographierten Farbstoff in der Säule zu, die Analogie der

¹⁴ Amsterdamer Akad. Wiss. **34** (1931) Nr. 10.

¹⁵ Helv. chim. Acta seit 1931.

¹⁶ Ber. dtsh. chem. Ges. sowie Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. seit 1931.

¹⁷ Helv. chim. Acta **16** (1933) 641.

¹⁸ Zitat am Ende dieses Aufsatzes.

sonstigen Strukturelemente vorausgesetzt. Die Reihenfolge der Scheiben läuft dann mit der Tiefe des Farbtons parallel.

Es lag nahe, auch das wichtigste Pflanzenpigment, das *Blattgrün*, einer modernen Bearbeitung zu unterziehen. Die schon von TSWETT nachgewiesenen, aber erst von WILLSTÄTTER und STOLL isolierten und analysierten Chlorophylle *a* und *b* haben WINTERSTEIN und STEIN¹⁹ in ausgezeichnetem Reinheitsgrad auf chromatographischem Wege bereitet. Betr. Bakterienchlorophyll sei auf die Forschungen von H. FISCHER²⁰ verwiesen.

Eine Aufteilung von gewissen *künstlichen* Farbstoffen in petrolätherischer Lösung war bereits TSWETT geglückt (Fettblau, Sudan III usw.).

VI.

Ein neues Zweiggebiet der Chromatographie befaßt sich mit *wasserlöslichen Pigmenten*. Schon vor zwei Jahren erreichte KOSCHARA²¹ die Isolierung von Uroflavin aus Harn: die adsorptionsanalytische Methode wird in verschiedenen Varianten bei den Flavinforschungen der KUHN^{schen}²² sowie der KARRER^{schen}²³ Schule angewandt und hierdurch die Klärung eines der interessantesten Kapitel der modernen Biochemie erleichtert. Es sei in diesem Zusammenhang auch auf eine Mitteilung von EULER und BRANDT hingewiesen²⁴. KARRER und STRONG²⁵ dehnten den Anwendungsbereich der Adsorptionsanalyse auch auf Anthocyane aus.

Wasserlösliche künstliche Farbstoffe werden von RUGGLI und JENSEN²⁶ sowie von WILLSTAEDT²⁷ verarbeitet.

Selbstverständlich erheischt das Arbeiten in wässrigem oder wasserhaltigem Medium eine entsprechende Wahl der Versuchsbedingungen, namentlich des Adsorbens. Ferner wird man, wie bei älteren Ausführungsformen der Adsorptionsanalyse, den Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die bei der Fixierung und Elution sich abspielenden Vorgänge noch näher studieren

¹⁹ Zitate im Literaturverzeichnis.

²⁰ FISCHER und HASENKAMP, Liebigs Ann. Chem. **515** (1935) 148.

²¹ Ber. dtsh. chem. Ges. **67** (1934) 761.

²² Ber. dtsh. chem. Ges. seit 1933.

²³ Helv. chim. Acta seit 1934.

²⁴ Naturwiss. **23** (1935) 544.

²⁵ Helv. chim. Acta **19** (1936) 25.

²⁶ Helv. chim. Acta **18** (1935) 624, **19** (1936) 64.

²⁷ Svensk kem. Tidskr. **48** (1936) 32 und zwar 48.

müssen. Diesbezügliche Leitgedanken hat jüngst KOSCHARA²⁸ erörtert.

VII.

Ein weiteres, eben erst erschlossenes Arbeitsgebiet umfaßt die Chromatographie von *farblosen Substanzen*. Schon TSWETT spricht von einem „unsichtbaren Chromatogramm“ und er hat die Möglichkeit ins Auge gefaßt, einen Farbstoff, dessen Adsorptionsverhalten (verglichen mit den zu isolierenden farblosen Verbindungen) bekannt ist, in die Säule einzuführen und so die Lage der farblosen Ringe zu markieren. Dies mag in seltenen Fällen ausführbar sein, zu einem allgemeineren Verfahren gelangt man so nicht.

Es kommt vor, daß man keinen besonderen Kunstgriff anzuwenden braucht, z. B. wenn ein Bestandteil leicht die Kolonne passiert, ein anderer fest haften bleibt. Im allgemeinen wird man indessen bestrebt sein, unmittelbare Beobachtungen mit dem Auge zu machen, also irgendwie *Farbe hervorzurufen*. So benützte z. B. KÖGL²⁹ bei der Adsorptionsanalyse des Heteroauxins die Farbreaktion mit Eisenchlorid-Salzsäure, welche mit dem Filtrat negativ, mit den einzelnen Schichten teils positiv ausfiel. In unserem Laboratorium bewährte sich in mehreren Fällen die Bepinselung der herausgepreßten Säule mit einem Farbreagens: man zieht einen dünnen Strich entlang der Längsachse, stellt die einzelnen Lagen fest, schabt den bepinselten Streifen ab und zerschneidet die Kolonne³⁰.

RUGGLI und JENSEN (l. c.) gelang die Trennung von Naphtol-Sulfosäuren wie folgt: das unsichtbare Chromatogramm wird so lange mit Wasser entwickelt, bis die einzelnen Zonen nacheinander in das Filtrat gelangen. Man fängt sie in einer Diazolösung auf und erhält z. B. mit 1-Naphtol-4-sulfosäure einen roten, mit der 2-Naphtol-4-säure einen violetten Farbstoff. In einem anderen Versuch wurde die herausgedrückte Kolonne mit der Diazolösung übergossen, wobei sie sich teils violett, teils rot anfärbte.

STRAIN³¹ verwandelt die farblosen Ketone in gelbe Dinitrophenylhydrazone, um die letzteren, wie üblich, zu trennen und schließlich die chromophore Gruppierung wieder abzuspalten.

²⁸ Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 239 (1936) 89.

²⁹ KÖGL, HAAGEN-SCHMIT und ERXLEBEN, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 228 (1934) 90.

³⁰ Unveröffentlicht.

³¹ J. Americ. chem. Soc. 57 (1935) 758.

Vielleicht den größten Fortschritt bedeutet aber, namentlich in bezug auf aromatische Stoffe, die Verknüpfung von zwei leistungsfähigen Methoden: der Adsorptions- und der *Fluoreszenzanalyse*. Nach unabhängig voneinander ausgeführten Arbeiten von KARRER und SCHÖPP³² bzw. von WINTERSTEIN³³ wird das unsichtbare Chromatogramm im Quarzrohr oder nach dem Herauspressen für sich allein mit einer Quarzlampe bestrahlt. Man zerteilt dann die Säule auf Grund der verschiedenen Fluoreszenzerscheinungen, die von den einzelnen Bezirken ausgehen. KARRER bezeichnete diese Arbeitsweise als „Ultra-Chromatographie“. Dieselbe ist in den Händen von WINTERSTEIN und seiner Mitarbeiter namentlich bei der Scheidung von solchen Teerbestandteilen nützlich geworden, in welchen viele kondensierte Ringe enthalten sind (Isolierung von krebserregenden Komponenten). Technische Probleme werden von den GRASSMANN^{schen} Versuchen³⁴ betr. Ultra-Chromatographie der Gerbstoffe berührt.

Ist ein farbloser Bestandteil systematisch anzureichern oder von farbigen Begleitstoffen zu trennen, so wird eines der ange-deuteten Verfahren benützt. Als Beispiele erwähnen wir die Scheidung von Carotinoiden und A-Vitamin (KARRER und SCHÖPP)³⁵, die Darstellung von reinen A-Vitamin-Präparaten (KARRER, v. EULER, HEILBRON)³⁶ sowie von Hormonen (DUSCHINSKY und LEDERER)³⁷.

VIII.

Im Rahmen der obigen Ausführungen war es kaum möglich, das behandelte Gebiet selbst skizzenhaft zu umreißen, so daß die Leistung mancher Forscher nicht gebührend verzeichnet werden konnte. Wir beschränkten uns auf einen Rückblick aus geschichtlicher Perspektive, mit der Zielsetzung, das Interesse von Fachgenossen, in deren Laboratorien noch nicht chromatographiert wird, auf die vielfältigen Möglichkeiten zu lenken, in bezug auf Diagnose und Analyse, Trennung und Reindarstellung, Vergleich

³² Helv. chim. Acta **17** (1934) 693.

³³ Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **220** (1933) 247, **230** (1934) 146, 158, 169. SCHÜRCH und WINTERSTEIN, ebenda **236** (1935) 79.

³⁴ Collegium Nr. 779, III, S. 114, und Nr. 785, IX, S. 401 (1935).

³⁵ Helv. chim. Acta **15** (1932) 745.

³⁶ Zusammenfassung: ZECHMEISTER, Lipochrom und Vitamin A; in SCHÖNFELD-HEFTER: Chemie und Technologie der Fette und Fettprodukte. Bd. I. S. 185. Wien: Julius Springer (1935).

³⁷ Bull. Soc. Chim. biol. **17** (1935) 1534.

und Unterscheidung von natürlichen und künstlichen Kohlenstoffverbindungen.

Man sieht aus dem Werdegang der Laboratoriumstechnik, daß jedes originelle Arbeitsverfahren in rascher Folge neue Gebiete erobert, bis sie sich schließlich erschöpft und von einer leistungsfähigeren Methode abgelöst wird, welche die Grenzpfähle der Erkenntnis wiederum weiter rückt. Wir hoffen, gezeigt zu haben, daß man sich gegenwärtig in der Entfaltungsperiode der Chromatographie befindet und in mancher Hinsicht aus dem Vollen schöpfen kann. Zweifellos werden die nächsten 30 Jahre weitere, noch ungeahnte Fortschritte bringen, aber schon heute gebührt volle Anerkennung dem Bahnbrecher TSWETT, dessen fruchtbare Idee ein Vierteljahrhundert unbeachtet blieb.

Zusammenfassende Literatur.

TSWETT, M.: Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt. SS. 378. Warsava: Tipogr. Warschawskago utschelnago Okruga (1910, russisch).

WINTERSTEIN, A. und G. STEIN: Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **220** (1933) 247.

WINTERSTEIN, A.: Fraktionierung und Reindarstellung von Pflanzenstoffen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. In G. KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. IV, SS. 1403—1437. Berlin: Julius Springer (1933).

ZECHMEISTER, L.: Carotinoide. Ein biochemischer Bericht über pflanzliche und tierische Polyenfarbstoffe. SS. 94—102. Berlin: Julius Springer (1934).

LEDERER, E.: L'adsorption chromatographique et ses applications. Chimie et industrie **33** (1935) 1072.

WILLSTAEDT, H.: Über chromatographische Analyse und ihre Anwendungen. Svensk kem. Tidskr. **48** (1936) 32.

Berichtigung zur Arbeit über

„Das Liesegang-Phänomen bei der Fällung von Jod in
Abwesenheit eines Gels“¹⁾

VON BINAYENDRA NATH SEN, Kalkutta

Auf der Seite 11 der genannten Arbeit hat es in der 5. Zeile von oben anstatt 5 cm zu heißen 0·5 cm; in der 8. Zeile von oben und auf S. 10 in der Zeile 22 von oben anstatt Kalziumchloridlösung **Kalium**chloridlösung.

¹⁾ Mh. Chem. **67** (1936) 10 bzw. S.-B. Akad. Wiss. Wien (IIb) **144** (1935) 584.