

DIE CHROMATOGRAPHISCHE ADSORPTIONSMETHODE

GRUNDLAGEN · METHODIK · ANWENDUNGEN

VON

DR. L. ZECHMEISTER UND DR. L. v. CHOLNOKY

PROFESSOR

PRIVATDOZENT

AM CHEMISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT PECS (UNGARN)

**ZWEITE
WESENTLICH ERWEITERTE AUFLAGE**

MIT 74 ABBILDUNGEN



**WIEN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1938**

**ALLE RECHTE, INSBESONDERE DAS DER ÜBERSETZUNG
IN FREMDE SPRACHEN, VORBEHALTEN**

ISBN 978-3-7091-3176-3 ISBN 978-3-7091-3212-8 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-7091-3212-8

COPYRIGHT 1937 AND 1938 BY JULIUS SPRINGER IN VIENNA
Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1937

Aus dem Vorwort zur ersten Auflage.

„Jeder wissenschaftliche Fortschritt ist ein Fortschritt der Methode.“

Ein neu entdecktes spezielles Laboratoriumsverfahren erobert in rascher Folge wissenschaftliche und technische Gebiete, bis es sich schließlich erschöpft und von einem leistungsfähigeren Arbeitsgang abgelöst wird. Die von dem genialen russischen Botaniker Professor M. TSWETT ersonnene „*Chromatographische Adsorptionsmethode*“, welche das räumlich getrennte Festhalten von Bestandteilen eines Gemisches erlaubt, befindet sich gerade jetzt am Beginn einer glänzenden Entfaltung: sie bietet dem Forscher einfache experimentelle Hilfsmittel, namentlich auf dem Gebiet der reinen sowie angewandten organischen Chemie, der Biochemie und Physiologie.

In der Hoffnung, zum weiteren Durchdringen der noch immer nicht gebührend anerkannten Methodik etwas beizutragen, veröffentlichen wir die vorliegende kurze Monographie, welche aus zwei Teilen besteht. Es werden zunächst die allgemeinen Grundlagen sowie die Ausführungsformen der Chromatographie besprochen, worauf, in einem bewußt unvollständigen „Speziellen Teil“, Anwendungsbeispiele folgen. Die zusammengestellten Versuchsvorschriften erstrecken sich auf sehr verschiedenartige Körperklassen und dürften im Hinblick auf die recht unübersichtliche Lage der Literatur nützlich sein. Wenn das behandelte Gebiet mit der erwünschten Geschwindigkeit sich weiter entwickelt, so wird in absehbarer Zeit ein erschöpfender Bericht ebensowenig zu schreiben sein, wie heute ein Referat z. B. über die Anwendung von Destillations- oder Umscheidungsverfahren.

Blättert man im nachfolgenden Text, so dürfte öfters der Eindruck entstehen, daß nicht die festgelegten Ergebnisse am interessantesten sind, sondern die zahlreichen Lücken, von welchen man in theoretischer oder praktischer Richtung zur Weiterarbeit angeregt wird.

Vorwort zur zweiten Auflage.

Obzwar seit dem Erscheinen dieses Buches nur anderthalb Jahre vergangen sind, hat die vorliegende Neufassung eine namhafte Erweiterung erfahren, was sich in dem Anwachsen des Umfanges sowie des Abbildungsmaterials kundgibt und besonders in der Aufnahme von rund 200 neuen Zitaten in das Literaturverzeichnis. Das letztere zeigt, daß das Verfahren von TSWETT in zahlreiche Laboratorien Eingang gefunden hat, in welchen es bisher nicht geübt wurde. Offenbar befinden wir uns in jenem Stadium der Entwicklung, in welchem ein neues Hilfsmittel im Bedarfsfalle gern herangezogen wird, wobei aber eine systematische Untersuchung der Anwendungsmöglichkeiten nur selten erfolgt. Namentlich gilt dies auch für den noch ungenügend studierten Zusammenhang zwischen Chromatogramm und Konstitution organischer Verbindungen. In die anorganische Chemie wurde die Methode von SCHWAB und JOCKERS vor Jahresfrist mit Erfolg eingeführt, worüber das letzte Kapitel berichtet.

Hinweise und Auskünfte, die bei der Bearbeitung der ersten und zweiten Auflage verwertet wurden, verdanken wir den folgenden Herren: H. A. BOEKENOOGEN (Koog a. d. Zaan), H. BROCKMANN (Göttingen), Ch. DHÉRE (Fribourg), H. FINK (Berlin), O. FREHDEN (Pécs), A. v. GORKA (Pécs), A. E. GILLAM (Manchester), I. M. HEILBRON (Manchester), G. HESSE (München), P. KARRER (Zürich), R. KUHN (Heidelberg), E. LEDERER (Paris), J. K. PARNAS (Lwów), W. RUHLAND (Leipzig), G. M. SCHWAB (München), A. STOLL (Basel), G. TÓTH (Pécs), P. TUZSON (Pécs), J. WALDENSTRÖM (Uppsala), R. WILLSTÄTTER (München), A. WINTERSTEIN (Basel).

Es war beabsichtigt, den vorliegenden Band mit einer Biographie von TSWETT einzuleiten, zuverlässige Angaben über das bewegte Leben dieses Bahnbrechers waren aber bis jetzt nicht erhältlich.

Pécs, im Juli 1938.

Die Verfasser.

Inhaltsübersicht.

Allgemeiner Teil.

	Seite
Erstes Kapitel. Grundlagen	1
Anwendungsbereich	5
a) Prüfung eines Stoffes auf Einheitlichkeit	7
b) Feststellung der Identität bzw. Verschiedenheit von zwei Verbindungen	8
c) Anreicherung eines in sehr großer Verdünnung vor- liegenden Naturproduktes	9
d) Zerlegung eines Gemisches. Nachweis, Bestimmung und Isolierung der Komponenten	9
e) Reinigung einer Substanz, z. B. eines technischen Produktes, von Begleitern	10
f) Kennzeichnung und Kontrolle von Handelswaren ..	11
Zur Geschichte	12
Die theoretischen Grundlagen der Chromatographie	16
Ausblicke	20
Austausch-adsorption	21
Zusammenhang zwischen Chromatogramm und Konstitution	23
Chromatographische Trennung von Stereoisomeren ...	24
1. Synthetische Polyene	25
2. Natürliche Polyene: Carotinoide	27
3. Mehrkernige aromatische Kohlenwasserstoffe mit kondensierten Ringen	29
4. Azofarbstoffe	38
5. Gruppe des Fluoresceins	41
Zweites Kapitel. Methodik	42
Adsorptionsmittel	42
Allgemeines	42
Spezielle Angaben	46
Lösungsmittel	53
Elutionsmittel	54
Apparatur	55
Große Apparate	64
Apparate zur Mikro-chromatographie	66

	Seite
Gang des Versuches	68
Einfüllen der Adsorptionsmasse.....	68
Einführen der Lösung	71
Entwickeln zum fertigen Chromatogramm	73
Beurteilung des Chromatogramms. Einfluß von Begleitern.....	74
Auspressen und Zerschneiden der Säule. Elution	75
Flüssiges Chromatogramm	77
Adsorption und Elution in wäßriger Lösung. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration	78
Besondere Methoden zur Chromatographie farbloser Substanzen	80
1. Empirisches Verfahren	81
2. Markierung einer farblosen Zone mit einem Indicator	82
3. Chromatographie nach chemischer Umwandlung des farblosen Gemisches in gefärbte Stoffe	82
4. Sichtbarmachung des Chromatogramms in ultraviolettem Licht	83
5. Sichtbarmachung des Chromatogramms mittels Farb-reaktionen	87
Pinselformel.....	88

Spezieller Teil.

Drittes Kapitel. Anwendungen auf natürliche Farbstoffe	90
1. Chlorophyll	90
Bestimmung des Mengenverhältnisses von Chlorophyll a und b	92
Isolierung von Chlorophyll a und b aus Rohchlorophyll	93
Bakterien-chlorophyll	95
Tierische Chlorophylle	95
Derivate und Abbauprodukte des Chlorophylls	95
Vorstufe des Chlorophylls	95
2. Hämin	98
3. Porphyrine	99
Harn-porphyrine	99
Porphyrine aus Kot.....	102
Künstlich bereitete Porphyrinpräparate	103
4. Gallenfarbstoffe	105
a) Photochemische Überführung des Ätio-porphyrins I in bilirubinoide Farbstoffe.....	105
b) Verhalten des Blutserum-Bilirubins. Trennung von Carotinoiden des Serums	106
c) Harn	106
d) Abbauprodukte	107
e) Synthetische Hexa-pyrrene	107

	Seite
5. Carotinoide	108
Vorbereitende Operationen	109
Entmischung	109
Anwendung von Lösungs- und Adsorptionsmitteln	
Elution	111
Kurze Angaben über das Adsorptionsverhalten einiger	
Carotinoide	112
Identifizierung einzelner Carotinoide	113
Isomerisierung von Carotinoiden	114
A. Beispiele zur Verarbeitung von Pflanzencarotinoiden .	117
Trennung von α -, β - und γ -Carotin	117
Kryptoxanthin aus Mais	117
Isolierung von Taraxanthin	118
Isolierung der Paprikafarbstoffe	119
Quantitative Bestimmung der Paprika-farbstoffe	122
Isolierung von Lycoxanthin und Lycophyll	123
Isolierung von Fucoxanthin aus Braunalgen	124
Nachweis und Isolierung von Bakterien-carotinoiden	125
B. Beispiele für die Verarbeitung von tierischen Carotinoiden	127
Bestimmung des Lipochroms in der menschlichen Leber	127
Chromatographie des Blutserum-lipochroms	127
Isolierung von Carotin aus Pferdefett	147
Carotin und Xanthophyll (Lutein) aus Pferdemit	154
Isolierung von Actinio-erythrin aus Actinia equina ...	154
Tiefseeschlamm- und Meerwasser-carotinoide	155
C. Beispiele für die Verarbeitung von künstlichen Um-	
wandlungsprodukten der Carotinoide	155
Trennung von Carotin und Isocarotin	155
Darstellung von Neo-lycopin. Trennung von Lycopin	156
β -Carotin-monoxyd	156
Darstellung von β -Oxycarotin, β -Carotinon und Semi-	
β -carotinon	157
Lycopinal aus Lycopin	157
Überführung von Rhodoxanthin in Zeaxanthin	158
D. Beispiele für die Mikro-chromatographie von Caroti-	
noiden	159
Anhang: Synthetische Polyene	160
6. Naphtochinon- und Anthrachinonfarbstoffe	162
a) Boletol und Isooletol	162
b) Chrysarobinreihe	163
c) Alkannin	163
d) Phtiocol	164
7. Flavine (Lyochrome)	164
Isolierung von Tetraacetyl-lactoflavin aus Heu	165
Synthetische Flavine	166
Flavine des Harnes	167

	Seite
8. Pterine.....	169
Darstellung von Roh-xanthopterin	170
Mikro-chromatographie von Pterinen.....	171
Mikro-chromatographischer Nachweis in Insekten	173
Isolierung von Uropterin aus Menschenharn	174
9. Anthocyane	176
Trennung von Cyanin- und Paeoninchlorid	177
Aufteilung des Althaeins	178
Weinfarbstoffe. Nachweis von Verfälschungen	178
10. Sonstige natürliche Farbstoffe.....	180
Pilzfarbstoffe (Lactaro-violin. Azulene)	180
Harzfarbstoffe (aus Palm-drachenblut)	182
Anhang: Farblose Harzbestandteile	184
Fruchtfarbstoffe (Osajin, Rottlerin)	184
Viertes Kapitel. Anwendungen auf künstliche Farbstoffe	185
Azofarbstoffe, basische und saure	185
Substantive Farbstoffe	186
Pharmazeutisch wichtige Farbstoffe	188
Fünftes Kapitel. Anwendungen auf farblose und schwachge-	
 färbte Substanzen	189
1. Verschiedene aliphatische Verbindungen	189
a) Reinigung des Hentriakontans	189
b) Isolierung eines Pflanzenparaffins	189
c) Fettsäuren und Derivate	190
d) Zuckerarten	190
e) Acetylcellulose	190
2. Terpene. Ätherische Öle	192
a) Trennung von Geraniol und Limonen	192
b) Aliphatische Terpenhalogenide	192
c) Cyclische Terpene.....	192
d) Ätherische Öle.....	193
3. Benzol- und Naphtalinreihe	196
a) Verhalten einiger Phenole und Derivate	196
b) Nitraniline	197
c) Zwischenprodukte von Flavinsynthesen	198
4. Di- und Triaryl-alkyle	200
5. Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe mit kon-	
densierten Kernen und verwandte Substanzen	201
A. Reinigung des Anthracens.....	201
Reinigung des Chrysens. Trennung von	
Naphtalin und Anthracen, von Anthracen	
und Chrysen usw.	202
Reihe des Benzpyrens.....	204

	Seite
Aceanthren-, Benzanthracen-, Benzphenanthren- und Fluoren-Derivate	206
B. Reinigung von Dehydrierungsprodukten (aus Cholesterin, Ergosterin, Chinovasäure)	207
6. Sterine. Gallensäuren	210
Pflanzen-sterine	210
Nebensterine der Hefe	210
Tritisterine	211
Sterine aus Reiskeimöl	212
Tierische Sterine	214
Gallensäuren	214
7. Sapogenine	215
Sarsa-sapogenin	215
Sojabohnen-Sapogenole	215
Trennung von Oleanol und Oleanylen	217
8. Pflanzliche und tierische Gifte mit sterinartigem Gerüst	217
Pflanzliche Herzgifte	217
a) Wirkstoffe des Strophanthus	217
b) Calotropin, ein afrikanisches Pfeilgift	218
Krötengift	218
9. Heterocyclische Basen. Alkaloide	221
Einfache heterocyclische Substanzen	221
China-alkaloide	222
Strychnos-alkaloide	223
Opium-alkaloide	223
Curare-alkaloide	224
Sanguinaria-alkaloide	225
Lupinen-alkaloide	225
Sinomenium- und Cocculus-alkaloide	225
Mutterkorn-alkaloide	225
Amanita-toxin	228
10. Vitamine	229
Vitamin A	229
Nachweis	229
Isolierung	230
Keton aus Vitamin A	233
Trennung von Vitamin A und Carotinoiden ..	234
Bestimmung des Provitamin-A-Gehaltes von Pflanzen- und Tierstoffen	235
Vitamin B ₁	236
Vitamin B ₂	237
Vitamin C	238
Vitamin D	239
a) Vitamin D ₃ aus 7-Dehydro-cholesterin	241
b) Isolierung des Vitamins D ₃ aus Thunfisch- und Heilbuttlederöl	241

	Seite
c) Vitamin D ₃ aus Bluefin Thune-Leberöl	243
d) Isolierung von Provitaminen D	244
Vitamin E	247
a) Trennung der Allophanate	249
b) Isolierung von α -Tocopherol	249
c) Isolierung von β -Tocopherol	250
d) Reinigung über das p-Nitrobenzoat	252
e) Kondensationsprodukt von Trimethyl-hydro- chinon und Phitylbromid	253
Vitamin K	253
11. Hormone.	254
Adrenalin	254
Sexualhormone und verwandte Körper	254
Isolierung aus Pferdeharn	254
Umwandlungsprodukte von Sexualhormonen..	257
Auxine	260
12. Enzyme, Co-enzyme, biochemische Aktivatoren.	261
Trennung von Co-Zymase und Co-Dehydrase II	262
Reindarstellung der Co-Zymase aus Hefe	263
Chromatographische Trennung von einigen Enzymen des Emulsins.	264
Inhibitor der Blutkoagulation.	265
Sechstes Kapitel: Anwendungen in der Warenkunde.	265
1. Technische Gerbstoffextrakte	265
2. Technische Öle und Fette. Butter.	266
3. Pharmazeutisch verwendbare Drogen. Galenische Präparate	271
Anthrachinon-Drogen	275
Bestimmung des Alkaloidgehaltes galenischer Präparate	277
Siebentes Kapitel. Anorganische Chromatographie	280
Versuchstechnik	281
Trennung von Kationen	282
Trennung von Anionen.	288
Reinigung anorganischer Stoffe.	289
Photographische Aufnahmen von Chromatogram- men	291
Literaturverzeichnis	298
Namenverzeichnis	330
Sachverzeichnis.	337

Verzeichnis der Tabellen.

	Seite
1. Adsorptionsrangordnung von Diphenyl-polyenen	25
2. Adsorptionsrangordnung einiger Indoleninfarbstoffe	26
3. Adsorptionsreihe der wichtigsten Carotinoide	28
4. Adsorptionsrangordnung von sauerstoffhaltigen Carotinoiden	29
5. Adsorptionsrangordnung der natürlichen Polyen-kohlen-	
wasserstoffe und Molekülbau	30
6. Adsorptionsrangordnung von sauerstoffhaltigen Carotinoiden	
und Molekülbau	31
7. Adsorptionsrangordnung von Oxydationsprodukten des	
β -Carotins	33
8. Durchschnittliche Teilchengröße einiger Adsorptionsmittel	45
9. Fluoreszenz des Uropterins in Abhängigkeit von der Wasser-	
stoffionenkonzentration	86
10. Vergleich von α -Carotin und Pseudo- α -carotin	115
11. Beispiele für die Chromatographie von Polyenen aus höheren	
Pflanzen	128
12. Beispiele für die Chromatographie von Algen-, Pilz- und	
Bakterien-Polyenen	135
13. Beispiele für die Chromatographie von Polyenen des mensch-	
lichen Organismus	138
14. Beispiele für die Chromatographie von tierischen Polyenen .	140
15. Beispiele für die Chromatographie von Umwandlungs- und	
Abbauprodukten von Carotinoiden	148
16. Schätzung des Xanthopterins im Gemisch mit Erythropterin	172
17. Chromatographisches Verhalten von Bordeauxrot	179
18. Aufteilung von Cellit und relative Viskosität der Fraktionen	191
19. Temperaturerhöhung von Bestandteilen ätherischer Öle unter	
der Einwirkung von Frankonit	194
20. Allo-pregnan-triol und -tetrol im flüssigen Chromatogramm	260
21. Verhalten einiger Handelsöle auf Aluminiumoxyd	267
22. Nachweis von künstlich zugesetzten Fettfärbemitteln	268
23. Chromatogramme von Antrachinondrogen	276
24. Alkoholische Auszüge von Cortex Frangulae auf Magnesium-	
oxyd	278
25. Paarweise Trennung von benachbarten Kationen auf Alu-	
miniumoxyd	285

Verzeichnis der Abbildungen.

	Seite
1. Chromatogramm eines grünen Blattes nach TSWETT	3
2. Zonenwachstum beim Waschen (SCHWAB und JOCKERS) . .	23
3. Originalvorrichtung von TSWETT	56
4. Adsorptionsvorrichtung nach TSWETT für größere Versuche	57
5. Einfache Adsorptionsvorrichtung	57
6. Alfalfaheu-Auszug in einem einfachen Rohr (PALMER und ECKLES)	57
7. Apparat von DHÉRE und ROGOWSKI	58
8. Adsorptionsvorrichtung nach DHÉRE und VEGEZZI	58
9. Vorrichtung nach WINTERSTEIN und STEIN	59
10. Vorrichtung nach HESSE	59
11. Vorrichtung nach HEILBRON, HESLOP, MORTON, WEBSTER, RÉA und DRUMMOND zur Adsorptionsanalyse bei Luft- ausschluß	60
12. Vorrichtung nach HOLMES, CASSIDY, MANLY und HARTZLER zur Adsorptionsanalyse bei Luftausschluß	60
13. Vorrichtung nach VALENTIN und FRANCK	61
14. Adsorptionsrohr nach KUHN und BROCKMANN für analytische Zwecke	61
15. Apparate zur Untersuchung des Weines (MOHLER und HÄMMERLE)	61
16. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und eingelegter Siebplatte	62
17. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und eingelegter Siebplatte (montiert)	63
18. Adsorptionsrohre mit Schliffansatz ohne Siebplatte	62
19. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und angeschmolzener Siebplatte	62
20. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und angeschmolzener Siebplatte (montiert)	63
21. Schrank zur Aufbewahrung der Adsorptionsrohre	64
22. Adsorptionsproberöhrchen (SCHÖPF und BECKER)	65
23. Adsorptionssäule, elektrisch geheizt (RALSTON, HARWOOD und POOL)	65
24. Apparat nach WINTERSTEIN und SCHÖN (größeres Modell) . .	66
25. Apparat nach WINTERSTEIN und SCHÖN (kleineres Modell) .	66
26. Mikro-adsorptionsrohr (HESSE)	67
27. Mikro-adsorptionsrohr (BECKER und SCHÖPF)	67
28. Einrichtung zur Mikro-chromatographie (WILLSTAEDT und WITH)	67
29. Schematische Folge verbogener Schichten	68
30. Holzpistille	69
31. Selbsttätige Einfüllvorrichtung nach KÖRNER	72
32. Überdruck-vorrichtung nach SANNIÉ	73
33. Adsorptionsrohr aus Quarz nach GRASSMANN	83
34. Aufteilung des Chromatogramms unter der tragbaren Quarz- lampe	84

	Seite
35. Aufnahme eines Spektro-chromatogramms	86
36. Chromatogramm des Blattauszuges, nach WINTERSTEIN ...	93
37. Chromatogramms des Bestrahlungsproduktes von Ätiopor- phyrin (FISCHER und HERRLE).....	105
38. Chromatogramm eines Rotweines (MOHLER und HÄMMERLE)	179
39. Chromatogramm von ungefärbter Sommerbutter (THALER)	269
40. Chromatogramm des Perubalsams in gewöhnlichem Licht (VALENTIN).....	272
41. Chromatogramm des Perubalsams in ultraviolettem Licht (VALENTIN).....	272
42. Chromatogramm der Digitalistinktur (VALENTIN)	273
43. Cantharidentinktur (VALENTIN und FRANCK)	274
44. Oleum Hyocyami (FRANCK)	274
45. Crocus-auszug (FRANCK)	275
46. Tinctura Chinae (MERZ und FRANCK)	278
47. Extractum Chinae spir. (MERZ und FRANCK).....	278
48. Tinctura Ipecacuanhae (MERZ und FRANCK)	279
49. Tinctura Belladonnae (MERZ und FRANCK)	279
50. Kaffeeaufgüsse (VALENTIN).....	280
51. Einfaches Chromatogramm	291
52—53. Verdrängungsvorgang	291
54—56. Ausbildung eines Chromatogramms.....	292
57—59. Unzweckmäßige Ansätze	293
60—62. Einfluß des Lösungs- und Entwicklungsmittels.....	294
63—65. Einfluß von Verunreinigungen.....	295
66—67. Nachweis einer Isomerisierung	296
68. Trennung von cis- und trans-Azobenzol	296
69. Pinselmethode. Nachweis des Vitamins A.....	297
70—72. Trennung von anorganischen Kationen	297
73—74. Trennung von anorganischen Anionen	297

Allgemeiner Teil.

Erstes Kapitel.

Grundlagen.

„Wie die Lichtstrahlen im Spektrum, so werden in der Calciumcarbonat-Säule die verschiedenen Komponenten eines Farbstoffgemisches gesetzmäßig auseinandergelegt und lassen sich dann qualitativ und quantitativ bestimmen.“ (Tswett)

Überblickt man den Werdegang der organischen Chemie und der Biochemie, so fällt auf, wie oft eine gewaltige Steigerung der Arbeitsmöglichkeiten von *physikalischer* Seite ausgegangen ist. Man denke nur an die Förderung, welche der Ausbau der erwähnten Wissenszweige durch polarimetrische, refraktometrische Methoden, durch die im Sichtbaren und Unsichtbaren vorgenommene Spektroskopie empfangen hat. Es ist klar, daß für die Verarbeitung von hochempfindlichen Stoffen überhaupt nur physikalische Wege offenstehen.

Weniger allgemein dürfte es bekannt sein, daß das Studium von organischen Farbstoffen und später auch der farblosen und schwachgefärbten Kohlenstoffverbindungen durch eine originelle, von TSWETT 1906 veröffentlichte *Ausführungsform der Adsorptionsanalyse* in früher ungeahntem Maße erleichtert wurde. Diese als „*chromatographisches Verfahren*“, kurz „*Chromatographie*“ bezeichnete, einfache Methodik sowie ein Abriß der von der TSWETT-schen Idee ausgelösten wissenschaftlichen Bewegung bildet den Inhalt der vorliegenden Schrift.

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 TSWETT den petroleätherischen, aus grünen Blättern bereiteten Auszug auf eine, in ein vertikal gestelltes Glasrohr eingestampfte *Säule* von pulverförmigem Calciumcarbonat und stellte fest, daß der scheinbar homogene Pigmentinhalt der allmählich durchsickernden Lösung sich alsbald *zerlegt*: im oberen Säulenteil erschien eine blaßgelbe Scheibe, knapp darunter sah man zwei grüngefärbte Zonen, während drei andere, gelbe Komponenten weiter nach unten vorgedrungen sind und erst in den tiefer liegenden Bezirken des Carbonats hängen blieben. Noch viel schöner gestaltet sich das „*Chromatogramm*“, wenn man beträchtliche Mengen des reinen Lösungsmittels nachgießt. So wird das Bild „entwickelt“: weiße Zwischenräume erscheinen und verbreitern sich, indem die einzelnen Farbstoffkomponenten mit ungleichen Geschwindigkeiten nach unten wandern. Eine gelbe Verbindung (Carotin) durchläuft die ganze Kolonne und gelangt leicht in das Filtrat.

Die zusammengesetzte Natur des Chlorophylls und des Blattgelbs war damit bewiesen und die Art der Bestandteile richtig erkannt (Abb. 1, S. 3).

Nun zerschnitt TSWETT die Säule und löste die individuellen Farbstoffe einzeln heraus, z. B. durch Zufügen von Sprit. Nachdem das entfärbte Adsorbens aus den getrennten Anteilen durch Filtration ausgeschaltet wurde, standen die einheitlichen Pigmentlösungen zur Spektroskopie sowie zur chemischen Untersuchung bereit. So verwirklicht sich ein Wunschtraum des Chemikers: Stoffe, die früher im Gemisch vorlagen, werden mit dem Messer voneinander getrennt.

Der einfache chromatographische Versuch besteht demnach aus den folgenden Operationen:

Vorbereitung der Säule durch Einstampfen des Adsorptionsmittels.

Aufgießen der zu untersuchenden Lösung.

Entwickeln zum fertigen Chromatogramm, durch Einführung eines Lösungsmittels.

Auspressen der Säule aus dem Rohr.

Zerschneiden der Säule, entsprechend den ausgebildeten Schichten.

Elution der einzelnen Säulenteile.

Entfernen des leeren, nun pulverigen Adsorptionsmittels durch Filtration.

Weitere Verarbeitung der einzelnen Filtrate (physikalische Messungen, Isolierung des Stoffinhaltes, Elementaranalyse usw.).

Selbstredend kann der Arbeitsgang in mannigfacher Weise abgeändert werden, worauf wir noch zurückkommen. Wie man aber auch die Ausführungsform variieren mag, zeigen sich meist entscheidende *Vorteile* gegenüber der klassischen Arbeitstechnik, nach welcher die Lösung mit pulverförmigem Adsorbens behandelt wird. Bei der älteren Methode bleibt man bis zum Schlusse des Adsorptionsvorganges nur mangelhaft orientiert, während ein Blick auf das Chromatogramm genügen wird, um den jeweiligen Stand der Versuchslage festzustellen.

Der wesentlichste Fortschritt, welcher der Chromatographie zu verdanken ist, besteht also nicht etwa in einer besonderen Selektivität des Adsorptionsmittels an sich, sondern in der zeitlich und räumlich günstigen Berührungsart der festen und flüssigen Phase. Die berühmten Enzymforschungen WILLSTÄTTERS liefern ja dafür den Beweis, daß man Adsorbentien höchstgesteigerter Selektivität ausbilden und überraschend feine Differenzierungen erreichen kann, ohne Anwendung der Chromatographie. Indessen führt dann ein Einzelversuch nur zur Zweiteilung des Ausgangsmaterials, während das Verfahren von TSWETT zahlreiche Fraktionen eines verwickelten Gemisches auseinanderhalten kann. Oft zeigt die Säule innerhalb weniger Minuten Dutzende von Schichten (Abb. 56, S. 292).

Der *Unterschied* zwischen Einzeloperationen der beiden Arbeitsgänge läßt sich folgendermaßen kennzeichnen:



Abb. 1. Chromatogramm eines Blattauszuges nach TSWETT (Zonen im farbigen Original von oben nach unten: blaßgelb, grün, breit grünlichblau, gelb, gelb).

Älteres Verfahren: Adsorption aus *ruhender* (oder geschüttelter) Lösung. Pulverförmiges Adsorbens, das in allen möglichen Richtungen gleichzeitig durchtränkt wird. Die festgehaltenen Stoffarten sind voneinander räumlich nicht getrennt, jedes Körnchen enthält das nämliche Adsorbat. Ergebnis:

Ausgangslösung $\begin{matrix} \nearrow & \text{Gesamtadsorbat,} \\ \searrow & \text{Filtrat.} \end{matrix}$

Tswettsche Chromatographie: Adsorption aus *strömender* Lösung. Adsorbens säulenförmig, die Richtung der Durchtränkung ist definiert. Die an der wirksamen Oberfläche festgehaltenen individuellen Verbindungen (oder Verbindungsgruppen) sind räumlich voneinander getrennt. Es gibt daher große qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den in den einzelnen Körnchen ausgebildeten Adsorbaten und so auch zwischen den verschiedenen Bezirken der Kolonne. Ergebnis:

Ausgangs-
lösung $\begin{matrix} \nearrow & \text{Komponente mit der stärksten Adsorptions-} \\ & \text{affinität,} \\ \nearrow & \text{Komponente mit der zweitstärksten Adsorp-} \\ & \text{tionsaffinität,} \\ \searrow & \text{Komponente mit der drittstärksten Adsorp-} \\ & \text{tionsaffinität usw.;} \\ \searrow & \text{Nicht adsorbiertes (im Filtrat).} \end{matrix}$

Die Grenzlinie zwischen den beiden Methoden wird weniger scharf, wenn man das *Gesamtadsorbat anteilsweise eluiert*, z. B. die nicht zerschnittene Adsorptionssäule zunächst mit einem schwächeren, dann nacheinander mit immer stärker wirksamen Elutionsflüssigkeiten behandelt. So lassen sich in günstigem Falle die Bestandteile des fixierten Stoffvorrates einzeln ablösen. Aber auch dann ist der Gebrauch der TSWETTSCHEN Kolonne bequem, aus welcher das Eluat selbsttätig abfließt.

Ein Übergang zwischen den beiden Hauptausführungsformen der Adsorptionsanalyse besteht ferner darin, daß man keine schlanke Säule baut, sondern das Pulver auf eine Nutsche schichtet und dort die fraktionierte Elution vornimmt. Allerdings muß man dann auf eine visuelle Verfolgung der im Adsorbens sich abspielenden Vorgänge meist verzichten. Man kommt noch näher zum alther geübten Arbeitsgang, wenn man von einer fraktionierten Elution absieht. Diese Arbeitsweise wird von FINK (1, 2) „ad-

sorptive Filtration“ genannt, im Gegensatz zur gewöhnlichen Filtration, bei der lediglich eine Siebwirkung ausgenützt wird.

Der GOPPELSROEDERSchen Capillaranalyse ist das Verfahren von TSWETT, namentlich was die präparative Anwendbarkeit betrifft, weitaus überlegen, selbst wenn man die capillaranalytische Technik, nach einem Vorschlag von SCHWAB und JOCKERS, durch Aufsaugenlassen von reinem Lösungsmittel verbessert.

Anwendungsbereich.

Es ist eine selbstverständliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Chromatographie, daß die in der Säule festgehaltene Substanz keine chemische Änderung während der Adsorption erleide. Diese Forderung wird in einer überraschend großen Anzahl von Fällen tatsächlich erfüllt, doch sind der Methode natürlich auch gewisse *Grenzen* gesteckt. Vor allem kann es vorkommen, daß das basische oder saure Adsorbens z. B. unter Bildung oder Zerlegung eines Salzes reagiert. Solche reversible Vorgänge sind meist wenig störend, wenn sie richtig erkannt wurden.

Gelegentlich der Verarbeitung von Organauszügen haben wir manchmal beobachtet, daß die Lösung in der Kolonne aschehaltig wird; betreffend Al_2O_3 s. die Angaben von EULER und SCHLENK.

Bei empfindlichen Stoffen kann es aber auch vorkommen, daß die Substanz, namentlich wenn nicht rasch genug gearbeitet wird, *in der Adsorptionssäule eine chemische Änderung erleidet bzw. verdirbt*, wozu nachstehend einige *Beispiele* angeführt werden.

Eine leicht verständliche Wirkung der Säule kann im Zerlegen von Additionsverbindungen bestehen. So hat man beobachtet, daß gewisse Azulen-pikrate auf Al_2O_3 in die Komponenten zerfallen, die Pikrinsäure bleibt am Adsorbens, während das Azulen weiterläuft (PLATTNER und PFAU, S. 181). Auch das Pikrat eines Sapogenol-oxydationsproduktes unterliegt der analogen Spaltung (OCHIAI, TSUDA und KITAGAWA 1, 2, TSUDA und KITAGAWA) sowie z. B. das Pikrat des 5-Chlor-10-methyl-1,2-benzanthracens (NEWMANN 2). So verhalten sich Azulen-trinitrobenzolate, weiters nach FIESER und HERSHBURG (5), das Trinitrobenzolat des 6,7-Dihydro-20-methylcholanthrens, aus welchem der Kohlenwasserstoff $C_{21}H_{18}$ befreit und in den Durchlauf getrieben wird. Schließlich stammen einschlägige Beobachtungen von KONDO.

Zu einer Acylabspaltung kam es beim Chromatographieren des Diacetyltoxicarols auf Al_2O_3 (CAHN und PHIPERS).

Triphenylmethanfarbstoffe zeigen nach RUGGLI und JENSEN (1) in der Aluminiumoxyd-Säule Aufhellung, offenbar infolge einer allmählich fortschreitenden Hydrolyse.

Eine Dimerisation wurde von HESSE beobachtet (Privatmitt.), und zwar an einem so einfachen Stoff, wie Aceton. Saugt man Aceton durch Aluminiumoxyd, so entsteht in erheblichem Ausmaß Diacetonalkohol $(\text{CH}_3)_2\text{COH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$, besonders wenn das Oxyd früher ausgeglüht wurde. Damit in Einklang beobachten STOLL und HOFMANN, daß aus einem acetonhaltigen Durchlauf ein Teil des Lösungsmittels sich nur schwer verdampfen läßt.

Weniger durchsichtig sind die nachfolgend aufgezählten Änderungen. Chlorophyll läßt sich auf Puderzucker sehr gut chromatographieren, es erfolgt jedoch teilweise Zersetzung, wenn man z. B. Talcum nimmt (WINTERSTEIN und STEIN 2, S. 90). An Aluminiumoxyd aus schwach saurer Lösung fixierten Pterine werden an der Oberfläche des Adsorbens rasch zerstört, auf Frankonit sind sie stabil (SCHÖPF und BECKER, S. 169). Bei der Adsorption von Vitamin-A-Konzentraten traten farbige Zonen auf (CASTLE, GILLAM, HEILBRON und THOMPSON, S. 232). GRASSMANN hat beobachtet, daß die Fluoreszenzerscheinungen von chromatographisch festgehaltenen Gerbstoffextrakten innerhalb 1—2 Tagen sich bedeutend ändern können (S. 265).

Die katalytische Einwirkung der Al_2O_3 -Säule auf ätherische Öle sowie der Einfluß der Adsorptionswärme haben CARLSOHN und MÜLLER (2) untersucht (S. 194).

Interessant ist die Angabe von KUHN und STRÖBELE, daß chromatographiertes 2-Nitro-4,5-dimethylanilin die Fähigkeit zur Glukosidbildung verloren hat, da der hierzu notwendige, spurenweise im Rohprodukt vorgelegene Katalysator, nämlich Ammoniumchlorid, durch Einwirkung der Säule entfernt worden ist.

Über die Isomerisierung von Carotinen, nach GILLAM und EL RIDI sowie GILLAM, EL RIDI und KON, s. S. 114. Möglichkeit von cis-trans-Umlagerungen: TAYLOR und LAVINGTON.

Es sei betont, daß von den soeben erwähnten Grenzlinien ein ungeheures Gebiet der glatten Anwendbarkeit der Chromatographie umrahmt wird.

Ohne noch auf methodische Griffe einzugehen, seien die chro-

matographisch derzeit lösbaeren *Hauptaufgaben* kurz besprochen, um zu zeigen, in welchem Umfang die übliche organisch-chemische Laboratoriumstechnik mit Hilfe des TSWETTSCHEschen Gedankens gefördert und vereinfacht werden konnte. Dies ist namentlich auf folgenden Gebieten der Fall:

- a) Prüfung eines Stoffes auf Einheitlichkeit.
- b) Feststellung der Identität bzw. der Verschiedenheit von zwei Verbindungen.
- c) Anreicherung eines in sehr großer Verdünnung vorliegenden Naturproduktes.
- d) Zerlegung eines Gemisches; Nachweis, Bestimmung und Isolierung der Komponenten.
- e) Reinigung einer Substanz, z. B. eines technischen Produktes von Begleitern.
- f) Kennzeichnung und Kontrolle von Handelswaren.

a) Prüfung eines Stoffes auf Einheitlichkeit.

Eine Substanz ist in chromatographischem Sinne einheitlich, wenn sie in der Adsorptionssäule nicht zerlegt werden kann.

Diese Homogenität bedeutet in außerordentlich zahlreichen Fällen wirklich chemische Reinheit, da die Stärke der Adsorptionsaffinitäten meist in weit höherem Maße von dem Molekülbau abhängt, als die zur Einheitlichkeitsprüfung sonst herangezogenen Merkmale, wie Schmelzpunkt, Siedepunkt, Spektrum u. dgl. Namentlich sind die *Löslichkeitsunterschiede von nahe verwandten chemischen Individuen oft geringfügiger als die Differenzen in der Adsorbierbarkeit*. Man sollte daher fraktionierte Krytallisationen, wenn tunlich, durch einen chromatographischen Versuch ersetzen oder die beiden Reinigungsmethoden kombinieren.

Wegen der hohen Selektivität der Oberflächenkräfte erzielt man nach dem TSWETTSCHEschen Prinzip sehr oft auch dort eine Aufteilung, wo die übliche Laboratoriumstechnik versagt hat.

Über die *Grenzen der Einheitlichkeitsprobe* sei hier folgendes angeführt.

Es gibt natürlich Fälle, in denen zwei Verbindungen praktisch die gleiche Adsorptionsaffinität besitzen und sich in der Säule nicht trennen lassen. Die Zuverlässigkeit der Analyse kann jedoch nach einem negativen Ergebnis gesteigert werden, wenn die Zer-

legung aus verschiedenen Lösungsmitteln und an mehreren Adsorbenten versucht wird. Denn es wäre, wie bereits TSWETT (1) bemerkt, recht unwahrscheinlich, daß die Adsorptionsisothermen von zwei Stoffen sich streng gleichartig ändern würden, falls man das Milieu und die adsorbierende Phase beliebig variiert.

Die Einheitlichkeitsprobe läßt sich übrigens noch etwas weiter treiben, wenn man die sich nicht aufteilende Scheibe dennoch in mehrere Regionen zerschneidet, welche dann nach physikalischen oder chemischen Methoden einzeln geprüft werden. Es kommt nämlich vor, daß die verschiedene Adsorbierbarkeit zwar die Teilung des Materials veranlaßt, jedoch zur Ausbildung einer leeren Zwischenschicht nicht genügt.

In selteneren Grenzfällen begegnet man der Schwierigkeit, daß ein einheitlicher Stoff dennoch ein heterogenes Bild in der Säule liefert. Hierzu führt die oben erwähnte, manchmal beobachtete Bildung oder Zersetzung eines Salzes, wie dies z. B. auf S. 176 nach KARRER und STRONG für Anthocyane gezeigt wird. Ferner ist aus physikalischen Gründen eine chromatographische Uneinheitlichkeit bei stark polydispersen Lösungen zu erwarten, doch steht eine genauere Prüfung solcher Verhältnisse noch aus.

Scheinbare Heterogenität, S. 75.

b) Feststellung der Identität bzw. der Verschiedenheit von zwei Verbindungen.

Ist die Frage nach der Identität zu entscheiden, so bereitet man eine gemeinsame Lösung der beiden Stoffe, welche adsorptionsanalytisch geprüft wird. Zwei Zonen beweisen Verschiedenheit, ein homogener Bezirk zeigt Identität an. Das „*Mischchromatogramm*“ ist der Bestimmung des Mischschmelzpunktes an die Seite zu stellen, und sie erfordert in günstigen Fällen kaum mehr Substanz als jene altbewährte Identitätsprobe.

Liefert eine Lösung im Adsorptionsversuch zwei Schichten und soll entschieden werden, welche von den beiden mit einer bekannten Substanz identisch ist, so füge man eine größere Menge der letzteren zur Lösung. Es wird dann im Chromatogramm festgestellt, ob die obere oder die untere Zone eine starke Verbreiterung erfahren hat, verglichen mit dem Säulenbild der Originallösung.

e) Anreicherung eines in sehr großer Verdünnung vorliegenden Naturproduktes.

Bei biochemischen Untersuchungen leistet wohl kein Arbeitsgang in dieser Hinsicht mehr als das chromatographische Verfahren. Man läßt mehrere Liter oder Hektoliter Lösung durch eine entsprechend gewählte, relativ kleine Säule sickern und verwirft das Filtrat. So wird der Versuchsmaßstab mit einem Schlage verkleinert, ohne daß ein langwieriges und bei empfindlichen Substanzen bedenkliches Eindampfen nötig gewesen wäre.

Meist wird man das gesamte hängengebliebene Material zunächst ohne weitere Aufteilung eluieren, zwecks Vornahme einer genaueren Prüfung, oder man löst die Komponenten anteilsweise heraus. Das Konzentrat wird adsorptionsanalytisch oder nach einer anderen Methode verarbeitet.

Beispiel. Isolierung von Harnfarbstoffen nach KOSCHARA (1—5), S. 174.

d) Zerlegung eines Gemisches; Nachweis, Bestimmung und Isolierung der Komponenten.

Diese Hauptrichtung der Chromatographie ermöglicht die Lösung von sehr verschiedenartigen Aufgaben, und sie umfaßt eine mannigfaltige Versuchstechnik, die an dieser Stelle nur kurz umrissen werden soll.

Bekanntlich arbeitet die organisch-analytische Chemie in steigendem Maße mit *kleinen Substanzmengen*. Der gewaltige Anstoß, den die Einführung der PREGLSchen Mikroanalyse namentlich der Biochemie gegeben hat, wirkt sich in fruchtbarer Weise aus, indem zur quantitativen Ermittlung des Molekulargewichtes sowie einer Anzahl von Elementen und Atomgruppen nur mehr wenige Milligramme Substanz erforderlich sind. Das moderne Rüstzeug der Mikroanalyse konnte indessen nicht voll ausgenutzt werden, solange weiteren Kreisen kein allgemeines Verfahren bekannt war, zur präparativen Reindarstellung von geringen Stoffmengen bzw. zu deren Abtrennung von ähnlichen Verbindungen oder aus einem verwickelt zusammengesetzten Gemisch. Fraktioniertes Krystallisieren führt im Falle sehr kleiner Substanzmengen meist nicht zum Ziel, und es bietet oft keine Handhabe zur Überprüfung der Einheitlichkeit des Endpräparates.

Diese methodische Lücke wird von dem TSWERTSchen Arbeitsgang auf das glücklichste ausgefüllt. Chromatographisch bereitete und in der Säule als homogen befundene Körper stehen zur quantitativen Mikroanalyse bereit.

Selbstverständlich kann aber der *Versuchsmaßstab vergrößert* werden; schon jetzt arbeitet man in einzelnen Laboratorien mit mehreren Kilogrammen Adsorbens, in einem Ansatz. Auch der Einführung der TSWERTSchen Methode in den Fabrikbetrieb steht in geeigneten Fällen nichts im Wege, so daß eine entsprechende Ausdehnung der Patentliteratur mit Bestimmtheit vorausgesagt werden darf.

Je verwickelter das Ausgangsmaterial, um so schwieriger ist seine saubere Zerlegung, welche aber durch erneuerte, mit den einzelnen Fraktionen *wiederholte* Chromatographie verbessert und zu Ende geführt werden kann.

In der Laboratoriumspraxis wird ein präparatives Erfassen der homogenen Teillösungen manchmal unterbleiben müssen, nämlich z. B. dann, wenn die von der Natur dargebotene Substanz nicht einmal für die Mikroanalyse hinreicht. Auch sonst begnügt man sich oft mit dem *Nachweis* und mit der *Bestimmung* des Stoffinhaltes, welcher in den Eluaten vorliegt. Hierzu sind alle gebräuchlichen Verfahren brauchbar. Gerade darin besteht ein Vorteil der hier behandelten Methodik, daß man, zumindest in einfacheren Fällen, fast ohne Verlust arbeitet und schließlich irgendwelche physikalischen oder chemischen Operationen vornehmen kann.

Handelt es sich um Farbstoffe, so liegen spektroskopische und colorimetrische Messungen an der Hand; bei schwach gefärbten oder farblosen Substanzen greift man zu anderen Methoden, unter Umständen auch zum Tierversuch.

e) Reinigung einer Substanz, z. B. eines technischen Produktes von Begleitern.

Es stellt sich nicht selten heraus, daß „reinste“ Handelschemikalien weit davon entfernt sind, chromatographisch einheitlich zu sein. Je mehr Schritte bei der Fabrikation erforderlich waren, eine um so größere Wahrscheinlichkeit spricht für die Heterogenität des Endproduktes.

Zur Reinigung genügt oft ein vereinfachter Versuchsgang,

indem nur die Hauptzone bearbeitet wird, während man die sonstigen Säulenteile verwirft. War eine vollkommene Reinigung beabsichtigt, so ist die Adsorptionsanalyse bis zum vollständigen Verschwinden der Nebenzonen zu wiederholen. Selbst wenn die Säule nur so schmale leere Zwischenräume aufweist, daß eine scharfe Abteilung durch Zerschneiden nicht möglich ist, verbessert man den Reinheitsgrad durch Wiederholung der Chromatographie in steigendem Maße, da die absolute Menge der Begleiter rasch sinkt.

Besonders einfach und eindrucksvoll gestaltet sich der Versuch, wenn aus einem, in seiner Hauptmenge farblosen Präparat ein Pigment auszuschalten ist, dessen Schicksal man mit dem Auge verfolgen kann, oder wenn die Adsorptionsaffinitäten von Haupt- und Nebenkomponente so stark voneinander abweichen, daß eine der beiden leicht durch die Kolonne läuft und quantitativ in das Filtrat gelangt.

Auch hier eröffnen sich gewisse technische Ausblicke, in engem Anschluß an bereits geübte Verfahren der fabrikatorischen Adsorptionsreinigung.

Beispiele: S. 201.

f) Kennzeichnung und Kontrolle von Handelswaren.

Da einem käuflichen Produkt bestimmter Herkunft und Qualität, sofern es löslich oder extrahierbar ist, ein ganz bestimmtes Chromatogramm zukommt, bieten sich auch für die Warekunde (u. a. für die praktische Pharmazie) vielfache Hilfsmittel. Hier besteht die Aufgabe nicht darin, irgendwelche Trennungen vorzunehmen, sondern um die möglichst scharfe, empirische Kennzeichnung des Materials und eventuell um die Aufdeckung von Verfälschungen. Im Verlaufe solcher Adsorptionsanalysen wird man nicht selten auch die auf S. 83 erörterte Ultraviolettbelichtung der Säule vornehmen.

Als einer der ersten Ansätze in dieser Richtung erscheint die Arbeit von GRASSMANN sowie von GRASSMANN und LANG (S. 265). Die von ihnen bereiteten Chromatogramme waren in einigen Fällen zur raschen Unterscheidung von Gerbstoffen verschiedener Herkunft geeignet. Ferner sei die Aufmerksamkeit auf Angaben von RUGGLI und JENSEN (1, 2) gelenkt, betreffend Beurteilung gewisser Teerfarbstoffe (S. 185). Chromatographischer Nachweis von Verfä-

schungen des Weines: S. 178 (MOHLER und HÄMMERLE), Untersuchung von technischen Ölen und Fetten: S. 267 (BOEKENOOGEN; THALER), von galenischen Präparaten: S. 271 (VALENTIN; VALENTIN und FRANCK; MERZ und FRANCK).

Zur Geschichte.

Als 1910 das zusammenfassende Werk von TSWETT (1), „Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt“, erschien, ist das 1906 eingeführte chromatographische Verfahren außerhalb seines Laboratoriums kaum angewandt worden. TSWETT zitiert lediglich Arbeiten von KRÄNZLIN sowie von STOKLASA, BRDLIK und ERNEST, welche teils polemischen Inhaltes sind. Wie bereits erwähnt, ist die ganze Entwicklung der neuen Methodik von dem Studium des Blattgrüns ausgegangen. TSWETT war von der Tragweite seiner Entdeckung und von der Zuverlässigkeit des Verfahrens so tief überzeugt, daß er — obwohl seine Versuche nicht bis zur Isolierung von reinen Präparaten gediehen sind — trotz aller Angriffe daran festhielt, daß das Chlorophyll ein Gemisch zweier Komponenten ist, ebenso das damalige Phäophytin. Gleichfalls auf Grund chromatographischer Beobachtungen erklärt TSWETT, daß das sog. „krystallisierte Chlorophyll“ kein Naturprodukt sein kann und aus zwei Bestandteilen bestehen muß. Er erkennt, daß der Unterschied zwischen krystallisiertem und amorphem Chlorophyll mit der Dualität des nativen Pigments nichts zu tun hat (TSWETT 1, 4, 8, 10, 13, 15, 16, 20, 21).

In den beiden nachfolgenden Jahrzehnten blieb die neue Versuchstechnik fast unbeachtet, wobei der Umstand mitspielt, daß das erwähnte TSWETTSche Buch nur in russischer Sprache gedruckt wurde. Obzwar WILLSTÄTTER (3) bereits im Jahre 1910, dann WILLSTÄTTER und STOLL, ferner WILLSTÄTTER und ISLER (1912) nachdrücklich auf die Bedeutung des TSWETTSchen Verfahrens hingewiesen haben, kann man das von 1906 bis 1931 reichende Vierteljahrhundert als die *Latenzzeit* in der Geschichte der Chromatographie bezeichnen.

Wenige, nachfolgend erwähnte, vereinzelt gebliebene Abhandlungen stammen aus dieser Frühperiode.

Einer der ersten Forscher, von dem die TSWETTSche Methodik angewandt wurde, war DHÉRÉ, in dessen Laboratorium die adsorptionsanalytische Arbeitsweise seit 1911 in Gebrauch steht.

Er ließ von seinen Schülern ROGOWSKI und VEGEZZI Experimentaluntersuchungen ausführen, u. a. über die Bestandteile des Blattgrüns, über Schneckenleberfarbstoffe, über das alte „Tetronerythrin“ usw. Gleichzeitig wurden biochemisch wichtige Versuche von PALMER (meist mit ECKLES) mitgeteilt, betreffend die chromatographische Untersuchung des Milchfettpigments sowie anderer pflanzlichen und tierischen Produkte (1913—1914). Auch hat PALMER (1) in seiner, in englischer Sprache verfaßten Monographie mit Nachdruck die TSWETTSCHE Idee hervorgehoben (1922).

Etwas spätere Arbeiten stammen von COWARD (1924), ferner von LIPMAA (1926) und betreffen Blumenauzüge bzw. die Scheidung von Rhodoxanthin und Xanthophyll.

Die *Blütezeit* der Chromatographie datiert seit 1931 und ist vor allem durch die Modernisierung der Arbeitstechnik und besonders 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 Krystallisierbarkeit kaum und sie gelangten nie zur chemischen Analyse. Deshalb blieb manche gute Beobachtung unbemerkt oder sie wurde stillschweigend angezweifelt. Daß aber bereits TSWETT (1) die präparative Anwendbarkeit der Chromatographie bewußt war, zeigt u. a. sein Versuch, in welchem die Isolierung von „Lecithin“-Krystallen aus frischem Eigelb durchgeführt wird.

Derartige, vereinzelte Beobachtungen sind indessen ohne allgemeineren Einfluß auf die chemische Arbeitsweise geblieben. Das TSWETTSCHE Verfahren gewann erst zu einem Zeitpunkt Aktualität, als aus den klassischen Enzymforschungen von WILLSTÄTTER und seiner Schule bereits bekanntgeworden war, daß man durch planmäßig geleitete Adsorptionen und Elutionen überraschend feine strukturelle Unterschiede präparativ erfassen kann.

Die Chromatographie wurde anfangs 1931 von KUHN und LEDERER, sowie von KUHN, WINTERSTEIN und LEDERER mit Erfolg in die präparative Chemie der *Polyenfarbstoffe* eingeführt. Die erstere Arbeit 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 aus verschiedenen Pflanzenteilen Lutein gewinnen und

den Eidotterfarbstoff aufteilen konnten. So ging die 1910 gemachte Voraussage von TSWETT (1) in Erfüllung: „Sehr möglich, daß das Blattcarotin kein chemisches Individuum ist, sondern ein Gemisch von zwei oder von einigen Homologen, welche man mit Hilfe der Adsorptionsmethode voneinander scheiden könnte, unter Benutzung geeigneter Adsorbenten.“

Noch Ende 1931 hat PETTER, wohl unabhängig von den erwähnten Forschern, die Aufteilung von Bacterioruberin vorgenommen, gleichfalls in präparativem Maßstab.

In den letzten Jahren verhalf die *präparativ* angewandte Chromatographie, namentlich in den Händen von KARRER sowie von KUHN, ferner von WINTERSTEIN u. a., vor allem der Chemie der *Carotinoide* zu einem neuen Aufschwung, so daß diese Methodik aus dem erwähnten Gebiet gar nicht mehr weggedacht werden kann. Die Versuche erstrecken sich nicht nur auf höhere Pflanzen, sondern auch auf Algen-, Pilz- und Bakterienfarbstoffe (CHARGAFF, HEILBRON, KARRER, LEDERER, WILLSTAEDT u. a.) sowie auf das tierische Lipochrom (BROCKMANN, v. EULER, HEILBRON, KARRER, KUHN, WILLSTAEDT, WINTERSTEIN, ZECHMEISTER und TUZSON usw.).

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 näher untersuchten Chlorophylle a und b wurden von WINTERSTEIN und STEIN (2, 3) in ausgezeichnetem Reinheitsgrad auf chromatographischem Wege bereitet. Betreffend Bakterienchlorophyll und seiner Abbauprodukte sei u. a. auf Forschungen von H. FISCHER hingewiesen. Daß auch das Gebiet der physiologisch wichtigen Flavine (KARRER, KOSCHARA, KUHN) sowie anderer *Naturfarbstoffe* entscheidende Förderung erhielt, wird noch später darzulegen sein. Die Aufteilung von wasserlöslichem Anthocyan ist kürzlich KARRER und STRONG gelungen.

Qualitative Versuche über *künstliche* Farbstoffpräparate stammen bereits von TSWETT (1); er hat aus petrolätherischer Lösung z. B. käufliches Fettblau und Sudan III in mehrere Zonen zerlegt. Wasserlösliche und sonstige Teerfarbstoffe wurden von RUGGLI und JENSEN (1, 2) verarbeitet.

Ein unerschöpfliches, methodisch eben erst erschlossenes Gebiet umfaßt die Untersuchung und Aufteilung von *farblosen Sub-*

stanzen in der Säule. Auch diesbezüglich findet man Tastversuche bei TSWETT (1), die aber nicht weit gediehen und in Vergessenheit geraten sind. Jüngst wurden in die moderne Arbeitstechnik verschiedene Kunstgriffe eingeführt, um die Schichtung sichtbar zu machen, damit der Gang des Versuches besser verfolgt und das Zerschneiden der Säule planmäßig vorgenommen werden könne. Naheliegend sind Farbreaktionen, die mit Filtraten, Eluaten, aber auch in der Kolonne selbst sich ausführen lassen. Besonders entwicklungsfähig ist die Belichtung des Adsorptionsrohres mit der Quarzlampe, wodurch man oft in die Lage kommt, verschiedenartig fluoreszierende Scheiben zu unterscheiden („Ultra-chromatographie“). Diese Arbeitsweise wurde einerseits von WINTERSTEIN und SCHÖN (1), anderseits von KARRER und SCHÖPP (2) empfohlen (1933—1934).

Wasserlösliche Substanzen können chromatographisch und ultrachromatographisch bearbeitet werden, sie erfordern aber meist eine entsprechend umgestaltete Versuchsführung. Leitgedanken hierzu verdankt man KOSCHARA (vgl. auch bei FINK).

Es war im obigen nur beabsichtigt, die geschichtliche Entwicklung mit wenigen Zügen zu umreißen. Im Speziellen Teil findet man nähere Angaben über den vielfältigen Anwendungsbereich der Methode. Es wird von dort aus ersichtlich sein, daß das Adsorptionsverfahren auch bei zahlreichen *Synthesen* ein unentbehrliches Hilfsmittel geworden ist. Was ferner die *biochemisch und biologisch wichtigen Stoffe* betrifft, so werden die großen Fortschritte auf dem Vitamingebiet hervorzuheben sein. Bekanntlich hat KARRER (mit MORF und SCHÖPP) 1931—1933 reine A-Vitamin-Präparate chromatographisch gewonnen (s. auch die Forschungen von HEILBRON, HOLMES und ihrer Arbeitskreise). Das Vitamin D₃ wurde jüngst von WINDAUS, SCHENCK und WERDER als Kunstprodukt, von BROCKMANN (3) aus Fisch-leberölen mit chromatographischen Hilfsmitteln bereitet. Neuere Anwendungen in der Vitamin- und Hormonchemie sind aus dem Speziellen Teil ersichtlich (S. 229—261). Auf dem Gebiete der Enzyme, Co-Fermente, biochemischen Aktivatoren usw. eröffnet sich für die Forscher ein breites Feld (vgl. EULER und ADLER; EULER und SCHLENK 1, 2).

Endlich sei vermerkt, daß der chromatographische Gedanke im Jahre 1937 von SCHWAB und JOCKERS (1, 2) mit Erfolg auf

das Gebiet der *anorganischen Analyse* übertragen wurde (Näheres S. 280—290).

Vorgänge, die mit der in *einer* Richtung erfolgenden Durchströmung der TSWETTschen Kolonne vergleichbar sind und zu lokalen Stoffanreicherungen führen, werden auch im *lebenden Gewebe* anzutreffen sein (Modellversuch: LOU). Denn nicht die gerade Kolonnenform ist das Wesentliche an der Idee von TSWETT, sondern die festgelegte, eventuell auch krumme Richtung des Durchströmens.

Wurde diese Voraussetzung erfüllt, so ist somit die Möglichkeit zur örtlich-selektiven Ablagerung der im Flüssigkeitsstrom mitgeführten Stoffe gegeben, je nach ihrer Adsorptionsaffinität.

Ferner können gewisse *geologische* Prozesse (nach TREIBS) von diesem Gesichtspunkte aus betrachtet werden; vgl. auch SCHWAB und JOCKERS (2).

Die recht zersplitterte *Literatur* nahm in den letzten Jahren einen bedeutenden Umfang an, was aus den, im Verzeichnis abgedruckten Zitaten am besten hervorgeht. Die erste moderne, ausführliche Zusammenfassung verdankt man WINTERSTEIN (1), eine Monographie kündigt WILLSTAEDT (12) an. Kürzere Sammelreferate wurden von ARMSTRONG, CELSI, COFFARI, COOK, DAM, HESSE, KOSCHARA (6), LEDERER (1), SCHWAB, SÖRENSEN (3), STIX, VALENTIN, WILLSTAEDT (1) sowie von den Verfassern (1) geliefert (s. auch ZECHMEISTER 1, 6). Es ist erfreulich, daß die chromatographische Methode bereits Eingang in mehrere, für das Hochschulpraktikum bestimmte Lehrbücher gefunden hat (BERNHAUER; BERTHO und GRASSMANN; GATTERMANN und WIELAND).

Die theoretischen Grundlagen der Chromatographie

wurden bereits von ihrem Entdecker erkannt. Es handelt sich offenbar um eine *Auswahl, auf Grund der verschieden stark wirkenden Adsorptionsaffinitäten mehrerer Stoffe, in gemeinsamer Lösung, gegenüber dem gleichen Adsorbens*. Die einzelnen Komponenten sichten sich dann in der sinkenden Reihenfolge, entsprechend der Abnahme ihrer Oberflächenkräfte. Über die bei der üblichen chromatographischen Arbeitsweise sich abspielenden Teilvorgänge sei, öfters in Anlehnung an die Gedankengänge von TSWETT (1) zusammenfassend folgendes ausgeführt. Wir verfolgen der Einfachheit halber das Schicksal eines *Farbstoffgemisches* und möchten betonen, daß die Chromatographie farbloser Substanzen grundsätzlich ebenso verläuft.

Betrachtet man die gesamte Aufnahmefähigkeit einer bestimmten Adsorbensmenge als gegeben, so werden sich um diese Oberflächenkräfte alle in der Lösung vorliegenden Substanzen gleichzeitig, jedoch mit ganz verschiedenem Enderfolg bewerben. Reicht die Masse des Adsorptionsmittels zur Bindung des gesamten Pigments nicht aus, so wird nur die mit der *stärksten Affinität* ausgestattete Farbstoffart festgehalten und hierdurch die adsorbierende Oberfläche „erschöpft“.

Dies ist in der Tat der Fall, wenn 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 tritt nun in die nächst-tiefer liegenden Bezirke ein, wo der Restbetrag der erwähnten Substanz allmählich erschöpft und festgehalten wird. Ihre Rolle wird von einem anderen Farbstoff übernommen, welcher in bezug auf die Adsorbierbarkeit an die Spitze vorgerückt ist und an welchem die stetig weiter sickernde Flüssigkeit bald ebenfalls verarmt, indem auch dieser zweite Farbstoff, unterhalb des ersteren, sich in der Säule ablagert. So läuft das Spiel weiter, bis die Lösung praktisch farblos geworden ist und bis man schließlich, in der von oben nach unten betrachteten Reihenfolge der ausgebildeten Farbzonen, ein Schema der *Adsorptionsrangordnung* erblickt, welche alle Komponenten der Rohlösung umfaßt.

Die gegebene Beschreibung der bei dem Zustandekommen des Chromatogramms verlaufenden Vorgänge ist indessen nur in groben Zügen zufriedenstellend, denn sie harrt noch der Ergänzung in bezug auf feinere Teilprozesse.

Offenbar trifft nämlich die Annahme nicht streng zu, daß die Oberfläche eines jeden Körnchens von vornherein und ausschließlich die mit der größten Affinität ausgestattete Komponente binde. Stellt man sich vor, daß im obersten Säulenbezirk die oberflächenaktive feste Phase plötzlich mit der Mischlösung in Berührung kommt, so wird im ersten Augenblick jedes Körnchen von Molekülen sämtlicher Farbstoffarten umhüllt sein. Alle diese Molekülararten, die an die noch unbeladene Oberfläche des Körnchens unmittelbar herangekommen sind, beteiligen sich an der Bildung eines Adsorbates. So bleiben zunächst auch Farbstoffe mit ver-

hältnismäßig geringerer Adsorptionsaffinität in der Elementarschicht hängen; sie werden jedoch von den stetig nachfolgenden „stärkeren“ Komponenten aus ihrer Adsorptionsverbindung alsbald *verdrängt*: sie verlassen die feste Phase und gelangen wieder in Lösung. Nach ihrer Freilegung werden sie von dem Flüssigkeitsstrom in den nächst-tiefer liegenden Bezirk mitgerissen, wo sie, vorübergehend fixiert, wiederum eine Verdrängung erleiden. Jeder Anteil lagert sich endgültig erst ab, wenn nichts „Stärkeres“ mehr nachkommt, wenn also die Farbringe aller Stoffe, die als Verdränger in Betracht kommen könnten, in einem höher liegenden Säulenteil bereits fertig ausgebildet sind.

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, gelben Polyenfarbstoffes in die Säule geführt, welcher in der Nähe des oberen Randes hängen blieb. Nachdem das Chromatogramm sich stabil ausgebildet hatte, haben wir die Lösung einer zweiten, und zwar stärker adsorbierbaren, roten Verbindung aufgegossen, mit dem Ergebnis, daß der früher erhaltene Farbring alsbald nach unten wanderte und seinen Platz an das zweite Pigment abtrat (Abb. 52—53, S. 291). Wiederholt man jedoch den Versuch in der umgekehrten zeitlichen Reihenfolge der Farbstoffeinführung, so findet ein derartiges Abdrängen nicht statt: Die Lösung des später eingeführten (schwächer adsorbierbaren) gelben Farbstoffes passiert jetzt den bereits fixierten roten Bezirk, um eine tiefer liegende Stelle zu belegen. In beiden Fällen erhält man schließlich das nämliche Chromatogramm. Ähnliche Erfahrungen haben RUGGLI und JENSEN (1, dort S. 636) an Azofarbstoffen gemacht.

Unter sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen ist also nur die *Reihenfolge* der einzelnen Körper gegeben, während der im Adsorbens absolut eingenommene *Platz jedes Farbstoffes 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 von der aktiven Oberfläche verdrängt, also herausgelöst. Die Verteilung zwischen den beiden Phasen steuert in der Elementarschicht dem betreffenden Adsorptionsgleich-

gewicht zu. Ist dasselbe erreicht worden, so verläßt die Lösung, in bezug auf die Konzentration des betreffenden Farbstoffs, unverändert die Elementarzone. Sobald sie jedoch auf pigment-freie Bezirke stößt, setzt von neuem Adsorption ein und nun läßt sich der Farbstoffinhalt von einer ununterbrochenen Reihe dünngedachter Scheiben schließlich vollständig abfangen. Der Entwickler fließt also farblos weiter, nachdem sein Pigmentgehalt im Verlaufe der erwähnten Vorgänge allmählich von Null bis zu einem Grenzwert angestiegen ist, um wieder auf Null zu fallen (TSWETT).

Durch den Entwicklungsvorgang kann das Säulenbild, je nach Größe der wirksamen Adsorptionskraft, in verschiedenem Maße und mit ganz verschiedenen Geschwindigkeiten verändert werden. Handelt es sich um eine schwache Fixierung, so hält sich die adsorbierte Substanz nur vorübergehend in der Säule auf und wird durch Aufgießen des angewandten Lösungsmittels sehr rasch in das Filtrat gespült. Der entgegengesetzte Grenzfall tritt ein, wenn die Adsorption äußerst stark und daher (praktisch) irreversibel ist, so daß ein noch so langes Waschen mit dem beim Adsorptionsversuch benützten Solvent ergebnislos bleibt. Nun nähert sich das Verhältnis zwischen dem Adsorbens und dem adsorbierten Stoff einer chemischen Bindung in klassischem Sinne, obzwar es bekanntlich seit der Aufstellung der Elektronentheorie hier keine scharfen Begriffscheidungen gibt.

Je stärker und je weniger umkehrbar eine Substanz sich in der Säule festhalten ließ, um so mehr wird man zur Anwendung eines zweiten Lösungsmittels beim Entwickeln veranlaßt.

In den von CARLSOHN und MÜLLER (1, 2) untersuchten Fällen konnte der festgehaltene Stoff nur durch solche Solventen wieder freigelegt und nach unten geführt werden, welche stärker adsorbierbar sind als er. Auch in diesem Zusammenhang zeigt sich also eine Verdrängung, was für die TSWETTSCHE Arbeitsweise charakteristisch ist.

Die beschriebenen Teilvorgänge spielen sich an zahllosen Punkten der Adsorptionssäule gleichzeitig ab. Jede Volumeinheit der Waschflüssigkeit löst Bruchteile des Farbstoffes heraus und transportiert sie nach einem tiefer liegenden Bezirk der Kolonne. Das Integral aller 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 adsorbierten und leichtest eluierbaren Komponenten am raschesten nach unten geführt. Da aber gerade diese 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 (Abb. 54, 55, 56, S. 292). Das Chromatogramm dehnt sich aus; die Einzelschichten werden schärfer abgeteilt und ausgeprägt, sehr zum Vorteil des Experimentators, der nun die aus dem Rohr gedrückte Säule zu *zerschneiden* hat.

Über die darauffolgende *Elution* der individuellen Farbstoffe aus den Säulenteilen sei folgendes bemerkt. Das geeignete Mittel hierzu ist empirisch zu wählen. Hat man im Hauptversuch z. B. Schwefelkohlenstoff, Benzin, Petroläther, Tetrachlormethan angewandt, so bewirkt nach TSWETT oft schon der Zusatz von etwas Sprit sofortige Elution. Man erwarte natürlich nicht, daß eine Verbindung aus dem Medium, in welchem sie schwer löslich ist, leicht adsorbiert werde, während gute Solventen zur Elution geeignet seien. Oft zeigt sich gerade das Gegenteil; so läßt sich Carotin sehr gut aus Benzin chromatographisch festhalten und durch Zusatz von etwas Alkohol eluieren, obzwar es im ersteren Solvent verhältnismäßig reichlich, in dem letzteren viel dürftiger löslich ist. Hier handelt es sich eben nicht um einfache Lösungsvorgänge, sondern um die Zerlegung von Adsorbaten, wobei physikalische und chemische Faktoren mitwirken.

Ausblicke.

Wenn auch die in der Kolonne sich abspielenden Vorgänge, was ihr Wesen anbelangt, verständlich sind, so wäre ein weiteres Eindringen in die Probleme des behandelten Gedankenkreises erwünscht, im Anschluß an die bekannte physikalisch-chemische Theorie der Adsorptionen.

Es könnten Zusammenhänge zwischen dem Verhalten eines Stoffes in der TSWETTschen Säule und seiner physikalischen Konstanten ermittelt werden, z. B. der Viskosität der Lösung, welche im Verlaufe des Versuches zunächst ständig abnimmt. Auch müssen zu den *Diffusionsgeschwindigkeiten* und ferner zum *Färbevermögen* auf Faserstoffen Beziehungen bestehen. Die letzteren Probleme

wurden von RUGGLI und JENSEN (1) angeschnitten. Es hat sich in mehreren, aber nicht in allen untersuchten Fällen gezeigt, daß Teerfarbstoffe, die in Gelatine langsamer diffundieren, mittels Aluminiumoxyds leichter festzuhalten sind. Eine allgemein verwertbare Regelmäßigkeit erblickt man noch nicht.

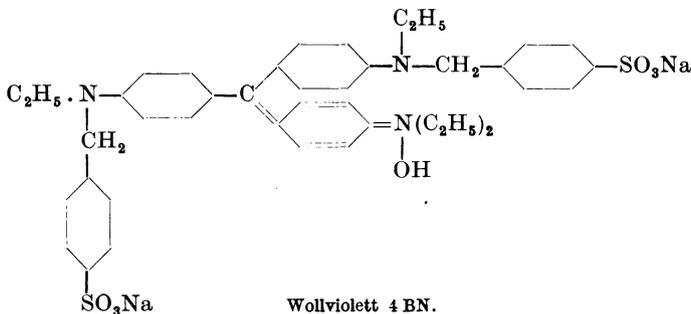
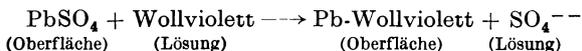
Es fehlt eben an einer gut ausgearbeiteten theoretischen Grundlage, welche auch für den Spezialfall der TSWERTSchen Anordnung nur im Rahmen der Elektronentheorie geschaffen werden könnte. Die Bedingungen zur stabilen Festhaltung in der Säule hängen auch hier u. a. von dem Molekülfeinbau des *Lösungsmittels* ab; z. B. wird das Vitamin A aus dem homöopolaren Cyclohexan viel leichter aufgenommen als aus dem heteropolaren Chloroform (BOWDEN und BASTOW).

Eine weitere Aufgabe besteht darin, das chromatographische Verhalten von verschiedenartig vorbereiteten *Adsorptionsmitteln* aus dem Gebiet der reinen Empirie herauszuheben (vgl. hierzu z. B. die Studie von CARLSOHN und MÜLLER 1, 2, S. 194).

Besonders dankbare Probleme bieten sich auf dem Gebiete der Elutions- und namentlich der *Verdrängungsvorgänge*, wenn jene auch keineswegs leicht vorauszusehen sind. Es handelt sich, sogar im einfachsten Fall, um die Wechselwirkung von Adsorbens, Lösungsmittel und zweier gelöster organischer Verbindungen. Daß nicht nur die Geschwindigkeit eines Verdrängungsvorganges von der Beschaffenheit der festen Phase abhängig ist, sondern auch dessen Richtung, geht z. B. aus der (keineswegs alleinstehenden) Angabe hervor, daß die Kalksäule oben das Follikulin und in einem tiefer liegenden Bezirk das Indirubin festhält, während auf Tonerde eine umgekehrte Schichtenfolge beobachtet wurde (DUSCHINSKY und LEDERER). Mehr oder weniger stabile chemische Beziehungen zwischen dem Adsorbens und dem adsorbierten Stoff, z. B. das Entstehen von salzartigen Gebilden, Komplexverbindungen, Lacken usw. geben unter Umständen den Ausschlag. Das theoretische Studium verwickelterer Vorgänge, das „Vielkörper-Problem“ der Chromatographie, erscheint ebenfalls als zeitgemäß.

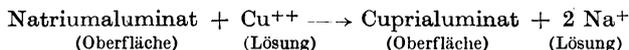
Austausch-adsorption. Eine besondere Art von Verdrängung stellt sich ein, wenn gleichzeitig mit der Adsorption gewisse Atomgruppen aus der festen Phase entfernt werden, um dem aufzunehmenden Stoff Platz zu machen. Ein schönes Beispiel hierfür

wurde von KOLTHOFF, v. FISCHER und ROSENBLUM (s. auch KOLTHOFF und ROSENBLUM) am Bleisulfat studiert. Bindet dieses Adsorbens den Triphenylmethanfarbstoff Wollviolett 4BN, so werden an der Oberfläche der festen Phase Sulfationen durch Farbstoffionen *ausgetauscht*:



Die ersteren gelangen in die Lösung, wo auch Natriumionen aus dem Farbstoff verblieben sind. Die Verwertung solcher Beobachtungen bei der Chromatographie weiterer organischer Stoffe wäre erwünscht. Für das Verhalten *anorganischer Ionen* liegen interessante Angaben von SCHWAB und JOCKERS (1, 2) sowie von SCHWAB und DATLER vor:

Wird ein entsprechend gewähltes Metallsalz, z. B. Kupfersulfat, auf eine Aluminiumoxyd-Säule gegossen, so läßt sich das Kupfer leicht fixieren, nicht aber das Sulfation, welches in den Durchlauf gelangt. Demnach muß eine mit dem SO_4^{--} äquivalente Kationmenge aus der Säulensubstanz in die flüssige Phase abgedrängt worden sein. Tatsächlich enthält das Filtrat ein Metallion, aber nie Aluminium, sondern Natrium, das auch in den reinsten Sorten als Aluminat enthalten zu sein scheint und während des Versuches von anderen Metallen in permutoider Art verdrängt wird, z. B.:



In der Tat wird das Cobalt- oder Kupferion von natriumfreien Aluminiumoxyd-Säulen schwächer adsorbiert als von der Handelsware. Man beobachtet auch eine stärkere Aus-

breitung der Zonen, wenn das Chromatogramm entwickelt wird (Abb. 2). Damit in Einklang steht nach der Ansicht der genannten Autoren die Beobachtung, daß unbesetzte Zwischenräume hier nicht auftreten, da das Adsorbens, wenn das Natrium einmal verdrängt worden ist, nie wieder „leer“ wird.

Hat man die Säule mit verdünnter HNO_3 vorbehandelt, so ist der ursprüngliche Alkaligehalt nun entfernt. An den adsorptionsfähigen Stellen dürfte dann Aluminiumnitrat vorliegen, dessen

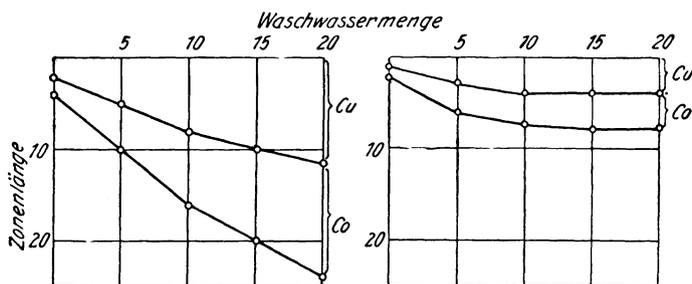


Abb. 2. Zonenwachstum beim Waschen des Chromatogramms mit Wasser, nach SCHWAB und JOCKERS (2). Links natrium-armes, rechts gewöhnliches Aluminiumoxyd.

Anion durch „stärkere“ Anionen verdrängt werden kann. Eine solche Säule ist zur Austausch-adsorption von gewissen Säureresten geeignet (S. 288).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die physikalisch-chemische Untersuchung von Teilvorgängen, die speziell in der Adsorptionssäule verlaufen, noch sehr ausbaufähig ist.

Zusammenhang zwischen Chromatogramm und Konstitution.

Es befriedigt nicht, wenn man das Verhalten zahlreicher Verbindungen in der TSWERTSchen Säule empirisch festlegt, sondern es müssen die Beziehungen zum molekularen Bau näher erforscht werden. Diese Arbeit ist noch wenig fortgeschritten, sie liefert jedoch bereits einige Stützen für den Experimentator, nämlich die Voraussage des Adsorptionsverhaltens für bestimmte Fälle, manchmal auch Rückschlüsse auf die Strukturformel, auf Grund eines chromatographischen Versuches.

Chromatographische Trennung von Stereoisomeren.

Es ist eine wichtige Aufgabe, das TSWETTSCHE Verfahren in der Raumchemie zu verwerten. Einerseits ergibt sich so das zur Trennung von zwei Körpern erforderliche Ausmaß von Struktur-unterschieden und andererseits wird man Körper isolieren können, die auf keinem anderen Wege zu fassen sind.

WINTERSTEIN und STEIN (1) sowie WINTERSTEIN (1) haben als erste die chromatographische Fraktionierung von *cis*- und *trans*-Bixin sowie von *cis*- und *trans*-Crocetin-dimethylester in der Adsorptionssäule kurz erwähnt. Unter den stickstoffhaltigen Substanzen kann die *cis*-form des Azobenzols, die nach HARTLEY (1, 2) durch Belichten entsteht, im Chromatogramm abgetrennt werden (Abb. 68, S. 296, ZECHMEISTER, FREHDEN und FISCHER JÖRGENSEN, Al₂O₃, Benzol).¹ Auf dem Gebiete der *optischen Isomerie* haben STOLL und HOFMANN die Scheidung von Epimeren beschrieben (Näheres S. 227). Ein besonders interessantes Ergebnis ist die von HENDERSON und RULE mit Hilfe einer optisch aktiven Säulenfüllung durchgeführte, partielle *Zerlegung eines Racemkörpers*. Die hohe Selektivität der Adsorptionsaffinitäten wurde dadurch mit einem weiteren schönen Beispiel belegt:

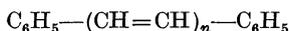
HENDERSON und RULE haben eine schwache Lösung von racemischem *p*-Phenylen-bis-iminocampher C₁₀H₁₆=N.C₆H₄.N=C₁₀H₁₆ in Benzin + Benzol (8:1) durch eine Milchzucker-Säule gegossen. Das Entwickeln wurde mit dem erwähnten Gemisch so lange fortgesetzt, bis die anfangs nur oben fixierte blaßgelbe Farbschicht so gut wie das ganze Rohr erfüllte. Nun hat man die Säule in vier Teile zerschnitten, welche mit Chloroform ausgezogen und im Polariometer geprüft wurden. Es zeigte sich, daß *d* stärker adsorbiert worden ist als *l*. Die spezifische Drehung des im oberen Viertel enthaltenen gewesenen Materials betrug nämlich + 90°, während diejenige vom untersten Viertel — 50° drehte (Chloroform). Diese Werte ließen sich durch Umkrystallisieren nicht ändern. Da [α]_D der reinen Antipoden ± 1500° beträgt, ist hier die Trennung des Racemates in einer Operation, in bezug auf die *d*-Komponente, im Ausmaß von etwa 1/16 gelungen. —

Nachstehend werden über den Einfluß gewisser Atomgruppen auf die Stärke der Adsorptionsaffinität Angaben gemacht, soweit dies schon heute tunlich ist.

¹ *Nachtrag*. Soeben erschien eine ausführliche Abhandlung von COOK (2) über denselben Gegenstand.

1. Synthetische Polyene.

Die *Poly-ene* enthalten ein mehr oder minder langes System von lückenlos konjugierten C-Doppelbindungen in offener Kette. Die Vertreter dieser Reihe sind streng analog gebaut, so daß es leicht ist, dasjenige Strukturelement herauszufinden, durch welches die Adsorbierbarkeit spezifisch gesteigert wird. Es ist dies die *Äthylenbindung*. Je länger die erwähnte ungesättigte Gruppierung sich ausdehnt, um so stärker gibt sich die Adsorptionsaffinität kund, was theoretisch einleuchtend ist. Das Beispiel der von KUHN und WINTERSTEIN (5) dargestellten *Diphenyl-polyene*, mit der allgemeinen Formel



zeigt nach WINTERSTEIN und SCHÖN (2) den bedeutenden Einfluß, den der Mehrgehalt an einer einzigen Doppelbindung auf das Verhalten in der Adsorptionssäule ausübt (Tabelle 1):

Tabelle 1. Adsorptionsrangordnung von
Diphenyl-polyenen.

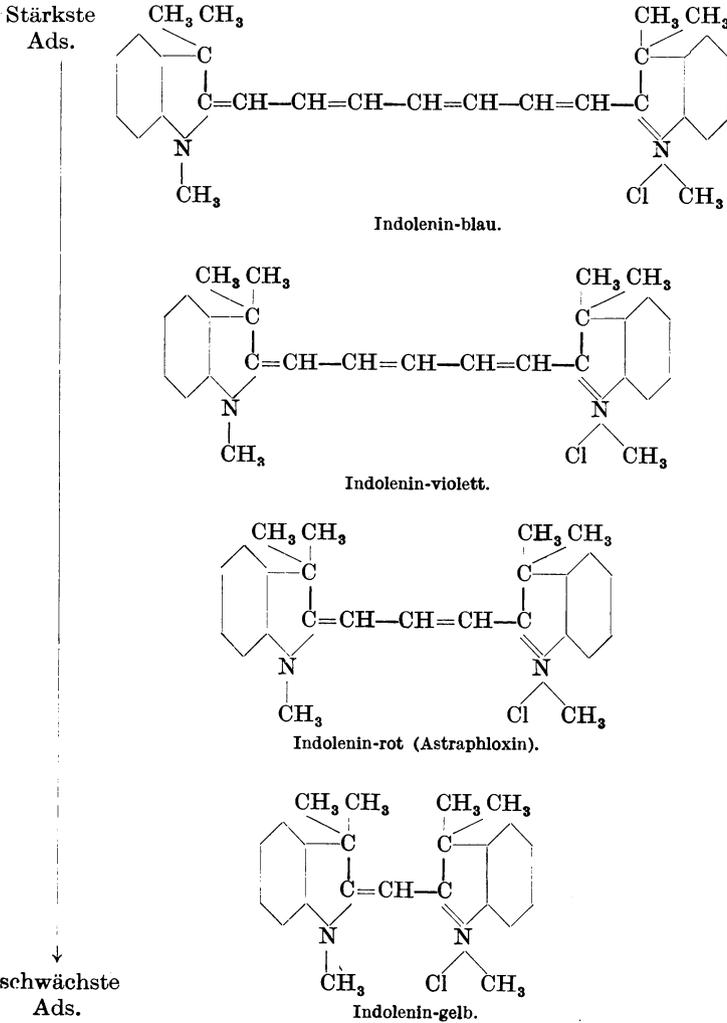
Stärkste Ads.	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ Diphenyl-octatetraen.
↓	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ Diphenyl-hexatrien.
↓	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ Diphenyl-butadien.
↓	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ Stilben.
schwächste Ads.	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{C}_6\text{H}_5$ Diphenyl.

Nach der Entwicklung nehmen die genannten Homologen scharf geschiedene Plätze im Chromatogramm ein, was besonders schön im ultravioletten Licht sich vorführen läßt: oben erblickt man zwei verschieden gelb aufleuchtende, darunter in drei verschiedenen Blau fluoreszierende Zonen.

Wird der Benzolring durch gewisse *heterocyclische* Gebilde ersetzt, so bleibt der adsorptions-steigernde Einfluß der konjugierten Doppelbindungen bestehen. Nach RUGGLI und JENSEN (1) enthält das aus wäßriger Lösung bereitete Aluminiumoxyd-Chromato-

gramm, im Rahmen der von KUHN, WINTERSTEIN und BALSER studierten (teils unveröffentlichten) *Indolenin-Reihe*, den blauen Farbstoff oben, den gelben im untersten Bezirk. Auch hier laufen also Farbtiefe und Adsorptionsaffinität parallel (Tabelle 2):

Tabelle 2. Adsorptionsrangordnung einiger Indoleninfarbstoffe.



2. Natürliche Polyene: Carotinoide.

Wie bekannt, sind die Carotinoide fettlösliche, wasserunlösliche, gelbe bis violette Farbstoffe, welche sich von dehydrierten Isoprenresten ableiten. Ihr ganz oder vorwiegend aliphatischer Charakter kommt in den S. 30—32 stehenden Symbolen zum Ausdruck (0, 1 oder 2 Jononringe). Von den oben besprochenen synthetischen Polyenen unterscheiden sich die Carotinoide am auffallendsten durch die mehrfache Verzweigung des Kohlenstoffskelettes (Näheres z. B. in den Monographien von ZECHMEISTER 1, 6, WILLSTÄDT 2, LEDERER 2, 3, 12).

Die Carotinoide im engeren Sinne (mit C_{40}) bieten ein geeignetes Material für die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Adsorptionsverhalten und Struktur. Die allgemeine Gestalt des Moleküls ist bei sämtlichen Vertretern dieser Pigmentklasse übereinstimmend, ebenso die Lage und Bindungsart der 22 mittleren Kohlenstoffatome. Auf Grund der Strukturformeln lassen sich die folgenden *Regeln* ableiten (Tabelle 5—6, S. 30—31). Nach der bisherigen Erfahrung ist *bei sonst analogem molekularem Bau die Adsorptionsaffinität stärker, also die in der Säule relativ eingenommene Stelle höher liegend*:

1. wenn die Anzahl der Doppelbindungen größer ist (Beispiel: Lycopin und γ -Carotin),
2. wenn bei gleicher Anzahl solcher Bindungen alle konjugiert sind (Beispiel: β - und α -Carotin),
3. wenn im Falle identischer ungesättigter Systeme Hydroxyl im Molekül vorkommt (Beispiel: Kryptoxanthin und β -Carotin),
4. wenn die Anzahl der OH-Gruppen steigt (Beispiel: Zeaxanthin und Kryptoxanthin) und
5. wenn an Stelle einer C-Doppelbindung konjugiertes Carbonyl steht (Beispiel: Capsanthin und Zeaxanthin).

Ähnliches gilt nicht nur für die nativen Carotinoide, sondern auch für deren künstliche *Abbauprodukte*, z. B. Carotinon und Semi- β -carotinon (KUHN und BROCKMANN 6, 10: Tabelle 7, S. 33).

Über die Beziehung zwischen *Farbe* und Adsorptionsverhalten s. S. 36, 114.

Die Haftfestigkeit eines Polyens an der adsorbierenden Oberfläche geht also mit der Größe derjenigen Kräfte parallel, die in der älteren Chemie unter dem Begriff „Partialaffinität“ zusammengefaßt wurden. Dazu kommt noch die spezifische Wirkung des

Hydroxyls, welche z. B. auf CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oder Al_2O_3 viel stärker und wohl in „chemischem“ Sinne zum Ausdruck gelangt als der Mehrgehalt an 1 konjugierten Doppelbindung. So nimmt das Lutein (mit nur 10 konj. F) einen höheren Platz in der Säule ein als das Lycoxanthin (11 konj. F), wobei die größere Anzahl der *Hydroxyle* (2 gegen 1) entscheidend ist (Tabelle 6, S. 31). Als merkwürdig erscheint dort auch die Einordnung des Rhodoxanthins. Dieses Keton (12 konj. F, daran anschließend 2 Carbonyle, kein Hydroxyl) steht tiefer als ein Polyenalkohol mit nur 11 C-Doppelbindungen. Auch hier denkt man wohl an den besonders starken Anschluß der OH-Gruppe an das Adsorptionsmittel.

Wird das *Hydroxyl verestert*, so sinkt die Adsorptionsaffinität des Carotinoide in außerordentlichem Maße, so daß das Verhalten an sauerstoff-freie Polyene erinnert. In der Rangordnung steht Zeaxanthin-dipalmitat (Physalien) nicht nur tiefer als Zeaxanthin, sondern seine Adsorbierbarkeit wird sogar von derjenigen des Kryptoxanthins übertroffen; 1 unverestertes Hydroxyl ist also weit stärker wirksam als mehrere veresterte. Ferner kommt die größere Länge des konjugierten Systems auch beim Rhodoxanthin sofort zur Geltung, wenn es z. B. mit freiem und mit verestertem Zeaxanthin verglichen wird: in der Säule nimmt das Keton eine Mittelstellung ein.

Was speziell die *Ester* anbetrifft, so wird ihr chromatographisches Verhalten auch von der Art der sauren Komponente mitbestimmt, namentlich wenn die letztere ungesättigter Natur ist.

Tabelle 3. Adsorptionsreihe der wichtigsten Carotinoide aus Benzinlösung, nach WINTERSTEIN (1).

Abnahme der ↓ Adsorptionsaffinität ↓ am schwächsten adsorbiert	Am stärksten adsorbiert	Fucoxanthin . . . $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_6$	} Alkohole } CaCO ₃ } Keton Ester „ } Kohlenwasserstoffe } Al ₂ O ₃ } Adsorptionsmittel
		Violaxanthin . . . $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_4$	
		Taraxanthin . . . $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_4$	
		Flavoxanthin . . . $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_3$	
		Zeaxanthin . . . $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$	
		Lutein $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$	
		Rhodoxanthin . . $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{O}_2$	
		Physalien $\text{C}_{72}\text{H}_{116}\text{O}_4$	
		Helenien $\text{C}_{72}\text{H}_{116}\text{O}_4$	
		Lycopin $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	
		γ -Carotin $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	
		β -Carotin $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	
	α -Carotin $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	am schwächsten adsorbiert	

Die erste *Adsorptionsrangordnung* auf dem Gebiete der Carotinoide stammt von WINTERSTEIN (1) und ist in der Tabelle 3, S. 28, wiedergegeben.

Berücksichtigt man auch einige neuentdeckte Vertreter, so ergibt sich für die unveresterten, sauerstoffhaltigen Carotinoide der C₄₀-Reihe etwa die in der Tabelle 4 verzeichnete Schichtenfolge¹:

Tabelle 4. Adsorptionsrangordnung von sauerstoffhaltigen (unveresterten) Carotinoiden.

Am stärksten adsorbiert ↓ am schwächsten adsorbiert	Fucoxanthin . . . C ₄₀ H ₅₆ O ₆ (Struktur unbekannt)
	Capsorubin . . . C ₄₀ H ₆₀ O ₄ (Dioxy-diketon)
	Capsanthin . . . C ₄₀ H ₅₈ O ₃ (Dioxy-monoketon)
	Violaxanthin . . . C ₄₀ H ₅₆ O ₄ } (3—4-wertige Alko-
	Taraxanthin . . . C ₄₀ H ₅₆ O ₄ } hole)
	Antheraxanthin . . . C ₄₀ H ₅₆ O ₃ } (3-wertige Alkohole)
	Petaloxanthin . . . C ₄₀ H ₅₆ O ₃ }
	Flavoxanthin . . . C ₄₀ H ₅₆ O ₃ }
	Lycophyll . . . C ₄₀ H ₅₆ O ₂ } (2-wertige Alkohole)
	Zeaxanthin . . . C ₄₀ H ₅₆ O ₂ }
	Lutein C ₄₀ H ₅₆ O ₂ }
	Lycoxanthin . . . C ₄₀ H ₅₆ O } (1-wertige Alkohole)
	Krypto- und Rubixanthin . C ₄₀ H ₅₆ O }
Rhodoxanthin . C ₄₀ H ₅₀ O ₂ (Diketon)	

Die Tabellen 5—6, S. 30—31, enthalten strukturell geklärte Carotinoide und geben gleichzeitig deren Rangordnung.

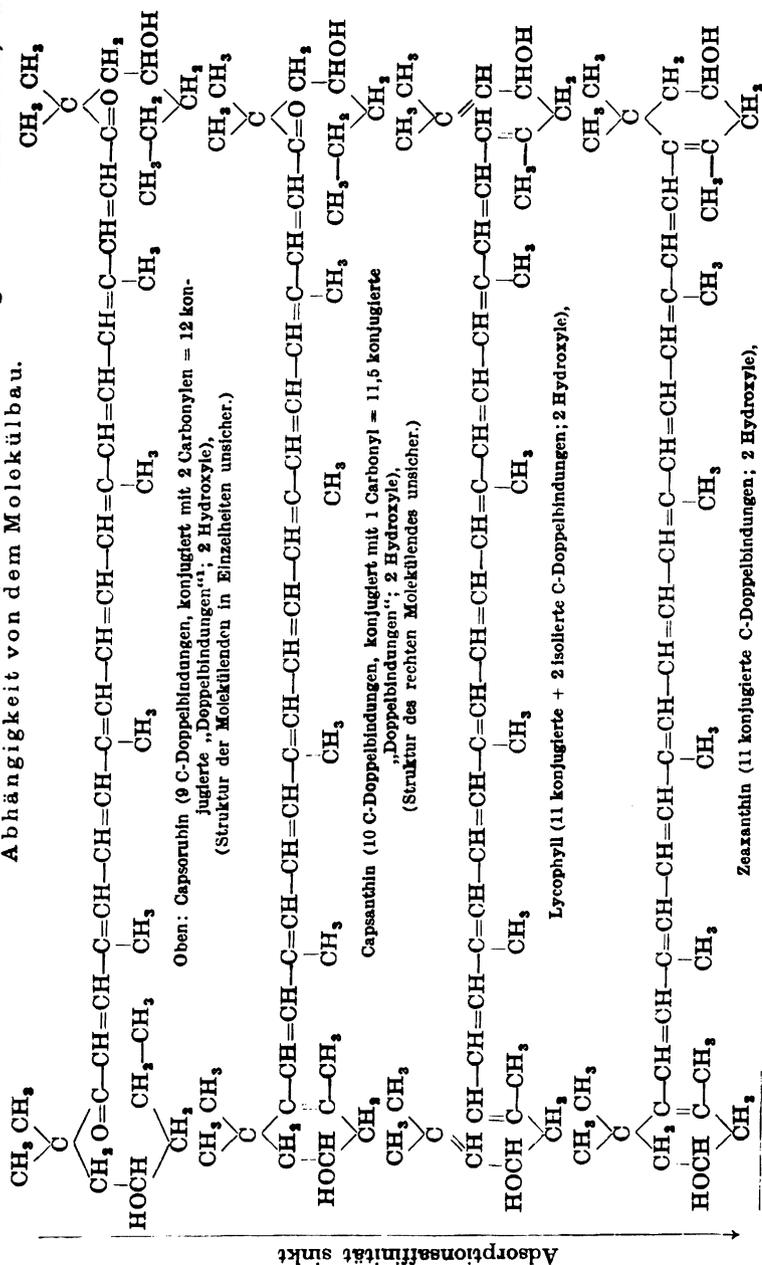
Ähnlich liegen die Adsorptionsverhältnisse bei gewissen künstlichen Abbauprodukten der Carotinoide (vgl. Tabelle 7, S. 33).

3. Mehrkernige aromatische Kohlenwasserstoffe mit kondensierten Ringen.

Es haben sich auch auf diesem Gebiete interessante Beziehungen zwischen Molekülbau und Adsorptionsrangordnung ergeben, welche auf Grund der Arbeiten von WINTERSTEIN und SCHÖN (2, 3), ferner von WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER, von

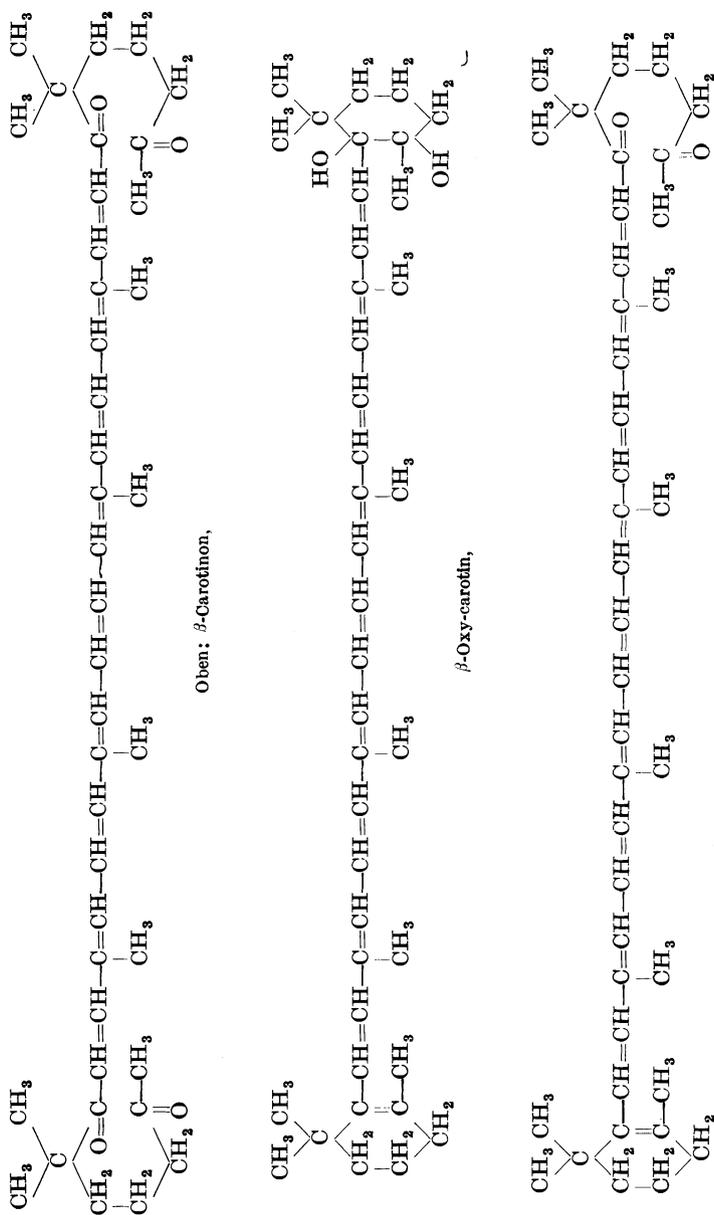
¹ Nachstehende Kombinationen sind auf Grund der Literatur eingeordnet worden und konnten nicht unmittelbar in der Säule verglichen werden: Fucoxanthin—Capsorubin, Lycophyll—Flavoxanthin, Antheraxanthin (und Petaloxanthin)—Flavoxanthin. Dieselben—Lycophyll.

Tabelle 6. Adsorptionsrangordnung von einigen sauerstoffhaltigen Carotinoiden, in Abhängigkeit von dem Molekülbau.



¹ 1 Carboxyl oder Carbonyl, welches mit dem ungesättigten System in lückenloser Konjugation steht, wirkt sich bei der Farbbildung (nach KUHN und WINTERSTEIN 6) so aus wie 1 1/2 C-„Doppelbindungen“. Auch in bezug auf die Adsorptionsaffinität darf dies schematisch gesetzt werden. Siehe hierzu KUHN und GRUNDMANN (8).

Tabelle 7. Adsorptionsrangordnung von Oxydationsprodukten des β -Carotins.



WINTERSTEIN und VETTER sowie von WINTERSTEIN, VETTER und SCHÖN nachfolgend skizziert werden.

Oft zeigt sich auch hier die Regelmäßigkeit, daß der in der Säule (relativ) eingenommene Platz um so höher liegt, je *mehr Doppelbindungen* vorhanden sind. Besteht das Molekül ausschließlich aus kondensierten Sechsringen, so bewirkt der gleichartige Anschluß eines neuen Ringes (und damit die Steigerung des C-Gehaltes) eine Vermehrung der Doppelbindungen. Bei sonst gleichbleibender Struktur beobachtet man dann, daß die Schichtenfolge im Aluminiumoxyd-Chromatogramm, *von oben nach unten, mit der Verminderung der Ringzahl* parallel geht, z. B.:

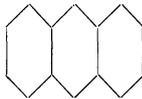
Oben:	Naphtacen	$C_{18}H_{12}$: 4 Ringe, 9 F (Formel III),
	Anthracen	$C_{14}H_{10}$: 3 Ringe, 7 F (II),
unten:	Naphtalin	$C_{10}H_8$: 2 Ringe, 5 F (I).

Nach dem gleichen Prinzip verläuft die Zonenbildung aus einem Gemisch der folgenden vier Kohlenwasserstoffe, von denen Benzopyren im oberen Säulenbezirk, Phenanthren im Filtrat angereichert wird, so daß die Wiederholung des Adsorptionsversuches schließlich zu einer annähernd vollständigen Trennung führen muß:

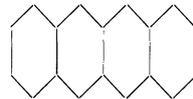
Oben:	1,2-Benzpyren ¹	$C_{20}H_{12}$: 5 Ringe, 10 F (VII),
	Chrysen	$C_{18}H_{12}$: 4 Ringe, 9 F (VI),
	Pyren	$C_{16}H_{10}$: 4 Ringe, 8 F (V),
unten:	Phenanthren	$C_{14}H_{10}$: 3 Ringe, 7 F (IV).



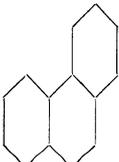
I.
Naphtalin.



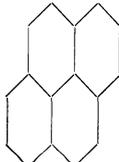
II.
Anthracen.



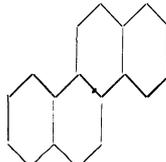
III.
Naphtacen.



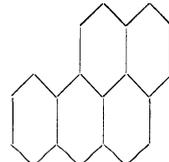
IV.
Phenanthren.



V.
Pyren.



VI.
Chrysen.

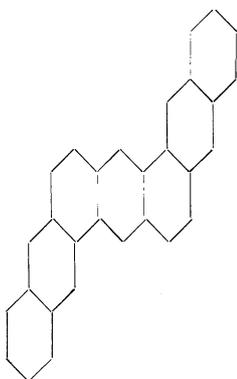


VII.
1,2-Benzpyren
(= „3,4-Benzpyren“).

¹ Wird auch 3,4-Benzpyren genannt.

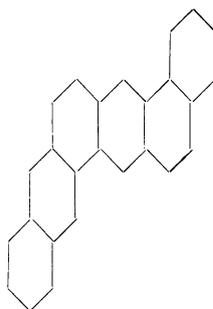
Als ein weiterer Beleg sei noch das folgende Chromatogramm angeführt:

- Oben: 1,2:2',3'-5,6:2'',3''-Dinaphtanthracen $C_{30}H_{18}$: 7 Ringe, 15 F (Formel VIII),
 1,2-Benz-5,6-(2'-3'-naphto)-anthracen $C_{26}H_{16}$: 6 Ringe, 13 F (IX),
 unten: 1,2,5,6-Dibenzanthracen $C_{22}H_{14}$: 5 Ringe, 11 F (X).



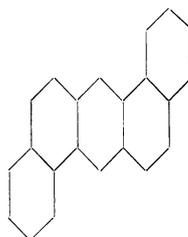
VIII.

1,2:2',3'-5,6:2'',3''-Dinaphtanthracen.



IX.

1,2-Benz-5,6-(2',3'-naphto)-anthracen.



X.

1,2,5,6-Dibenzanthracen.

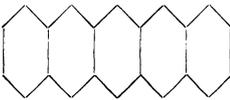
So eindrucksvoll die erwähnte einfache Regel ist, so reicht sie zur Erklärung der Verhältnisse in vielen Fällen nicht aus, sondern man erkennt besondere Strukturelemente, durch welche die Adsorbierbarkeit in hohem Maße gesteigert wird, weit über das Erwartete hinaus. Als ein solcher Faktor erwies sich jener merkwürdige Zustand, in welchem die beiden mittleren, *meso*-Stellen des Anthracens sich befinden; man denke nur an ihr überraschendes Additionsvermögen. Der an jenen Stellen vorhandene, *radikalartige Zustand* ist nach WINTERSTEIN und SCHÖN (2) mit einer *Stärkung der Adsorptionsaffinität* verknüpft.

Nur so wird es verständlich, daß das 1,2-Benzpyren (5 Ringe, 10F, Formel VII, S. 34) im Chromatogramm tiefer steht als Naphtacen (4 Ringe, 9F, Formel III, S. 34). Im Molekül des ersteren ist nämlich gerade eine *meso*-Stelle von dem anschließenden Ringsystem besetzt, wodurch dort die „normalen“ Valenzverhältnisse hergestellt werden.

Wir gehen nun zur Erörterung der *Beziehungen zwischen Struktur, Adsorptionsaffinität und Farbe* über, welche sich auf dem behandelten Gebiet ergeben haben.

Da der erwähnte radikalartige Zustand sowohl mit einer bedeutenden Farbvertiefung als auch mit einer Steigerung der Adsorbierbarkeit einhergeht, kommen auch Farbtiefe (z. B. die Lage des langwelligsten optischen Schwerpunktes) und Adsorptionsaffinität miteinander in Zusammenhang. Dies wirkt sich, wie bei den Carotinoiden, in dem Sinne aus, daß gewisse, tiefer gefärbte Kohlenwasserstoffe in der TSWETTSchen Säule höher stehen als ihre Verwandten, welche kurzwelliger absorbieren. Dasselbe gilt, wenn die Extinktionsmaxima in das Unsichtbare verschoben sind.

Bezeichnend ist z. B. der Fall des orangeroten *Naphtacens* (III, S. 34). Nach einer von CLAR aufgestellten (u. a. von SCHOLL nicht anerkannten) Hypothese



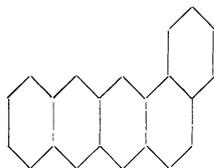
2,3,6,7-Dibenzanthracen.

wird der radikalartige Zustand des Anthracens durch den *linearen* Anschluß eines weiteren Benzolkernes noch bedeutend gesteigert. Demgemäß zeigt sich eine Stärkung der Adsorptionsaffinität in der Säule: das Naphtacen (2,3-Benzanthracen) wird fester fixiert als alle anderen vierkernigen Kohlenwasserstoffe der Reihe. Sogar unter den pentacyclischen Verbindungen nimmt nur das gleichfalls linear gebaute 2,3,6,7-Dibenzanthracen einen höheren Platz als Naphtacen ein.

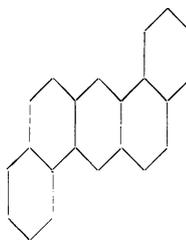
Weitere Beispiele:

- a) Oben: Naphtacen (orangerot, III, S. 34),
unten: Chrysen (farblos, VI, S. 34).
- b) Oben: Naphtacen (orangerot, III, S. 34),
unten: 1,2,6,7-Dibenzanthracen (orangegeilb, Formel folgt).
- c) Oben: 1,2,6,7-Dibenzanthracen (orangegeilb),
unten: 1,2,5,6-Dibenzanthracen (farblos, Formel folgt).

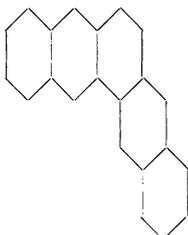
Die Differenz im Adsorptionsverhalten der beiden letzteren Isomeren dürfte dadurch bedingt sein, daß im einen Falle vier, im anderen nur drei Ringe linear angeordnet sind. Ein angularer Anschluß vermindert nämlich nach der Annahme von CLAR den „anormalen“ Zustand, also auch die Farbtiefe.



1,2,6,7-Dibenzanthracen.



1,2,5,6-Dibenzanthracen.



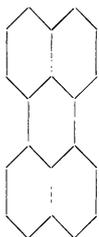
1,2-(2',3'-Naphto)-anthracen.

Ein typisches Ergebnis zeigte sich auch bei den folgenden Trennungen:

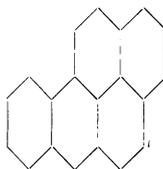
- d) Oben: 1,2,6,7-Dibenzanthracen (orange gelb, Formel voranstehend),
 unten: 1,2-(2',3'-Naphto)-anthracen (blaß gelb).

Es sei betont, daß die Chromatographie mit den Gemischen c) und d) öfters wiederholt werden muß, da die Adsorptionsdifferenzen bereits gering sind. Führt man in das zuletzt erwähnte Paar noch je einen Benzolring ein, so versagt die Trennungsmethode völlig.

- e) Oben: Perylen (orange gelb, Formel nachstehend),
 unten: 1,2-Benzpyren (blaß gelb, Formel nachstehend).

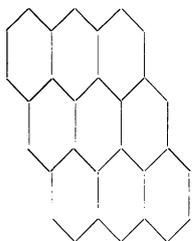


Perylen.

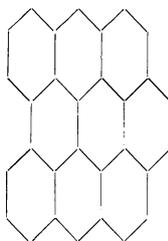


1,2-Benzpyren (= „3,4-Benzpyren“).

Perylen und 1,2-Benzpyren sind isomer ($C_{20}H_{12}$), pentacyclisch und ohne freie meso-Lage; der Grund ihrer gelungenen Scheidung ist noch unklar. Daß die Adsorptionsaffinität in der besprochenen Körperklasse selbst von feinen strukturellen Unterschieden stark abhängig ist, kann auch mit der chromatographischen Trennbarkeit des anti-diperi-Dibenzcoronens von Anthro-dianthren belegt werden (S. 38).



anti-diperi-Dibenzcoronen.



Anthro-dianthren.

Zusammenfassend sei vermerkt, daß die WINTERSTEINSCHEM Untersuchungen einerseits die Grenzen der Anwendbarkeit des TSWETSCHEN Verfahrens innerhalb einer scharf umrissenen Stoffklasse abstecken und andererseits dartun, daß hier Farbvertiefung sowie Steigerung der Adsorbierbarkeit auf die gleiche strukturelle Ursache zurückzuführen sind.

Die entscheidende Anzahl von C-Doppelbindungen bildet nur einen besonders leicht feststellbaren Spezialfall einer umfassenderen Gesetzmäßigkeit.

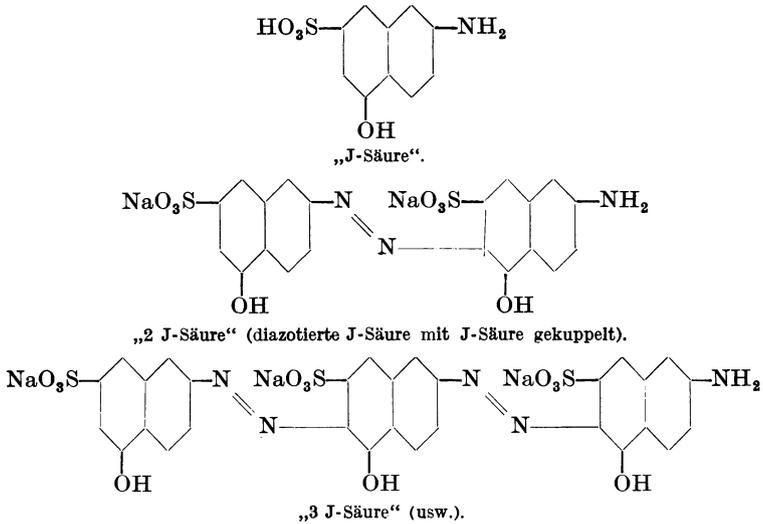
4. Azofarbstoffe.

Mit Rücksicht auf die außerordentlich große Anzahl der hierher gehörenden Körper wird die adsorptionsanalytische Klärung des Gebietes noch ausgedehnte Untersuchungen erfordern. Bereits jetzt liegen interessante Ergebnisse von RUGGLI und JENSEN (1, 2) vor, aus deren Arbeit die folgenden Angaben entnommen sind (Einzelheiten s. auch S. 185 sowie besonders bei JENSEN).

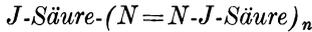
Ist der sonstige Bau des Farbstoffes in großen Zügen festgelegt, so wird die Adsorptionsaffinität mit der *Anzahl der Azogruppen* parallel wachsen; so ergab sich z. B. die folgende Schichtenreihe (wäßrige Lösung, Al_2O_3 -Säule, was auch für die weiteren Trennungen gilt):

Stärkste Ads.	Diamingrün G (Trisazo-farbstoff),
↓	Kongorot rein (Disazo-farbstoff),
schwächste Ads.	Diaminrosa FFB (Monoazo-farbstoff).

Sehr schön sieht man diesen Einfluß in jener azohomologen Reihe, deren Vertreter nacheinander entstehen, bei dem schrittweisen Diazotieren und alkalischen Kuppeln der sogen. „J-Säure“, (2-Amino-5-naphtol-7-sulfosäure) bzw. der daraus entstandenen Farbstoffe:



Die nach dem Schema



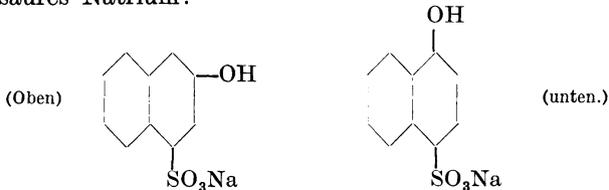
zusammengesetzten Farbstoffe schieben sich in der nachstehenden Art (je 0,8 g in 250 cm³ Wasser, mit 750 cm³ entwickelt):

Stärkste Ads.	$n = 4$,	Zone dunkelviolett,
↓	$n = 3$,	,, heller violett,
↓	$n = 2$,	,, rötlich-violett,
schwächste Ads.	$n = 1$,	rotorange Filtrat.

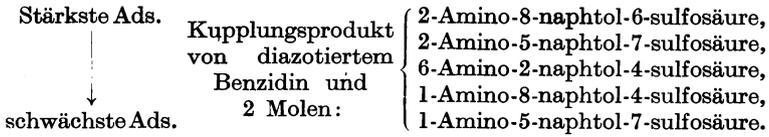
Ein durch Selbstkuppelung entstandener Farbstoff mit zweifelhafter Struktur (n unbekannt) schiebt sich unterhalb $n = 2$ ein.

Bei *gleichbleibender Anzahl der Azogruppen* ermittelten RUGGLI und JENSEN (1, 2) weitere Faktoren, durch welche die Adsorptionsaffinität wesentlich beeinflusst wird:

a) Ein β -ständiges Hydroxyl scheint im Naphtalinkern stärker zu wirken als ein α -Hydroxyl, z. B. steht das Natriumsalz der 2-Naphtol-4-sulfosäure im Chromatogramm höher als 1-Naphtol-4-sulfosaures Natrium:



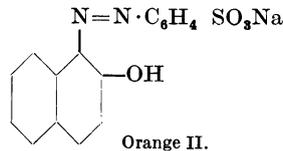
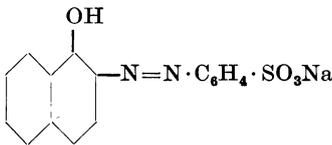
b) Eine β -ständige *Aminogruppe* bewirkt, bei sonst analoger Struktur, kräftigere Adsorption als eine α -ständige, z. B.:



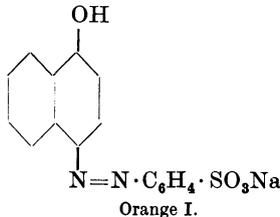
(Die beiden letzteren Farbstoffe sind ungefähr gleich stark adsorbierbar.)

Alle diese Verhältnisse gelten natürlich nur für wäßrige Lösung und bei Anwendung von Aluminiumoxyd. Entfernt man die Sulfogruppen und arbeitet in nichtwäßrigem Medium, so gestalten sich die Adsorptionskräfte vielfach ganz anders.

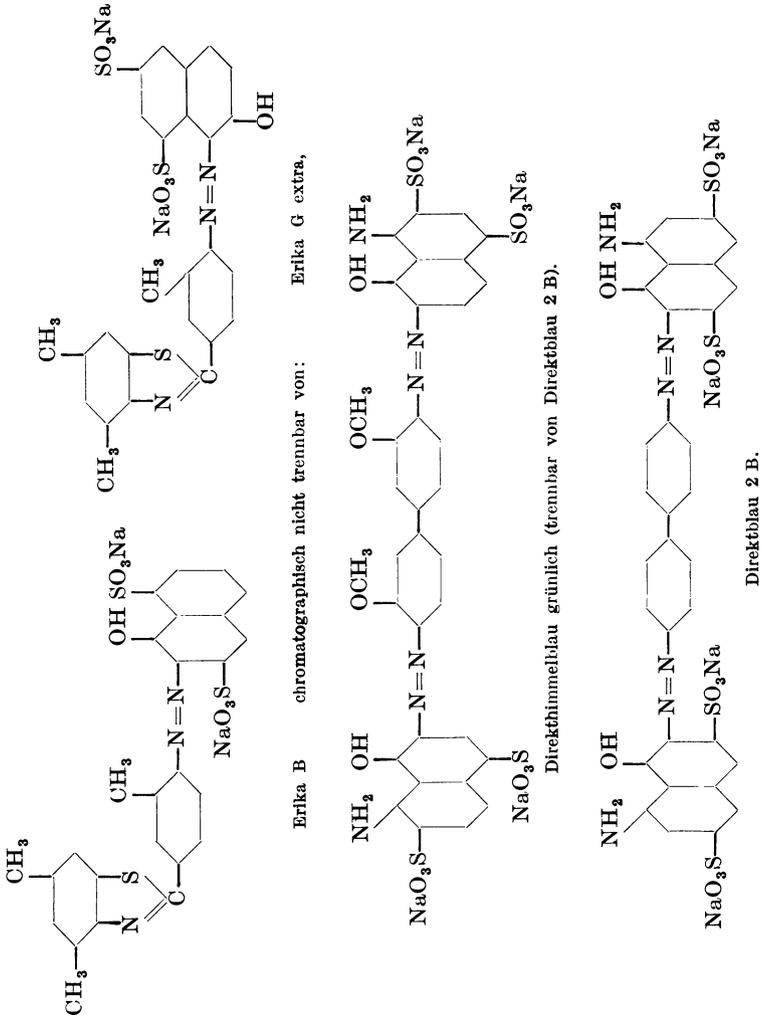
c) *o-Oxyazofarbstoffe* werden besser adsorbiert als *p-Oxyazofarbstoffe*. Dieser starke Einfluß wirkt bei dem folgenden Paar ausgleichend, die beiden nachstehenden Verbindungen werden nämlich gleich stark fixiert, trotz der β - bzw. α -Lage der Hydroxylgruppe.



Bedeutend schwächer wird hingegen Orange I festgehalten, infolge seiner *p*-ständigen Kupplungsstelle.



d) Wie schwer es ist, bei verwickelt zusammengesetzten Farbstoffen das Verhalten in der Säule bzw. die Trennbarkeit von anderen Vertretern vorauszusagen, sei mit folgendem Beispiel belegt. Erika B und Erika G extra sind adsorptionsanalytisch nicht trennbar, während Direkthimmelblau grünlich und Direktblau 2 B sich sehr gut scheiden lassen, obzwar die Strukturunterschiede



nicht viel größer sind als bei dem erstgenannten Paar. Vielleicht geben hier die Methoxyle den Ausschlag.

5. Die Gruppe des Fluoresceins

zeigt nach RUGGLI und JENSEN (1) eine starke Abhängigkeit des Verhaltens von dem *Halogengehalt*, indem die Adsorptionskraft

mit der Anzahl und dem Atomgewicht des Halogens wächst. Da auch eine Farbvertiefung von dem gleichen Faktor verursacht wird, sieht man auch hier eine Parallele zwischen Farbtiefe und Stellung im Chromatogramm (Wasser, Al_2O_3):

Stärkste Ads.	Rose bengale (4 J, 2 Cl), Phloxin (4 Br, 4 Cl) und Erythrosin (4 J), Sprit-eosin (Eosin-methylester, 4 Br) und Eosin (4 Br),
schwächste Ads.	Fluorescein (halogenfrei).

Zweites Kapitel.

Methodik.

Adsorptionsmittel.

Allgemeines.

Theoretisch kann jeder pulverisierbare oder sonst fein zerteilbare Stoff und auch faseriges Material als Adsorbens dienen, vorausgesetzt, daß es in dem angewandten Solvent unlöslich ist und weder auf das letztere noch auf die festzuhaltenden Verbindungen in störendem Sinne einwirkt. Bereits TSWETT (1) prüfte über 100 Adsorptionsmittel.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß im allgemeinen eine engere Auswahl hinreichend ist. Zunächst entfielen die meisten *organischen* Materialien aus praktischen Gründen, da man sie nur vorsichtig trocknen und durch Ausglühen nicht regenerieren kann. Außerdem enthalten manche derartige Präparate kleine Mengen löslicher Begleiter, die man durch eine lästige Vorextraktion entfernen muß. Bisher haben sich aus dieser Stoffklasse Inulin und Puderzucker bewährt, die beide schon TSWETT (1) empfahl. Mitunter wird Milchzucker angewandt. Die Anzahl der organischen Adsorbentien dürfte indessen wieder steigen, denn verschiedene Möglichkeiten sind noch unausgenutzt; so kündigen RUGGLI und JENSEN (1) chromatographische Versuche mittels Baumwolle an.

Auf dem Gebiete der *anorganischen* Adsorptionsmittel kommen die sehr stark sauren oder basischen Verbindungen im allgemeinen außer Betracht, oft auch dunkle oder stark gefärbte Substanzen,

auf denen die Schichtenfolge sich schwer erkennen läßt. Sollen die einzelnen Komponenten direkt aus der unzerteilten Säule herausgelöst werden, so entfällt die letztere Beschränkung.

Das *Mengenverhältnis* zwischen dem Adsorbens und dem adsorbierten Stoff ist je nach der Versuchslage sehr großen Schwankungen unterworfen und variiert z. B. von 1 : 10 bis zu 1 : 100 000. Der bedeutende Verbrauch an Säulenmaterial ist ein Nachteil der TSWETTschens Methodik, namentlich im Großversuch.

Bei der *Wahl des Adsorptionsmittels* verfährt man empirisch, es gibt jedoch bereits Literaturangaben in genügender Zahl, welche innerhalb gewisser Stoffklassen wegleitend sind.

Die nachstehenden Angaben gelten für das gemäßigte Klima, in tropischen Ländern liegen die Adsorptionsverhältnisse unter Umständen ganz anders. So fanden VAN VEEN und LANZING bei der Untersuchung der Blutserum-polyene, daß Calciumhydroxyd und Aluminiumoxyd in Batavia erheblich schwächer fixieren als in Europa. Das erstere Adsorbens war eben deshalb unbrauchbar, das zweite besonders gut brauchbar und differenzierend.

Natürlich ist nicht nur die chemische Beschaffenheit der Säule entscheidend, sondern ganz besonders ihre *Qualität*. Wie bekannt, wirken Präparate verschiedener Herkunft, welche den gleichen chemischen Namen tragen, bei Adsorptionsversuchen oft ganz abweichend, in quantitativer, sogar in qualitativer Hinsicht. Vor allem spielt hier die Ausdehnung und die Beschaffenheit der *Oberfläche* der einzelnen Teilchen eine Rolle. Ferner gibt es unbekannte Faktoren, welche die Verwendung eines ganz bestimmten Präparates, z. B. einer Handelsmarke, bevorzugen lassen. Die Anwesenheit chemischer Verunreinigungen ist nicht unbedingt von Nachteil, sie kann sogar fördernd sein (S. 22).

Stark wirksame Adsorptionsmittel nennt man „*aktive*“. Es kann eine planmäßige „Aktivierung“, mitunter auch eine „Desaktivierung“ vorgenommen werden (S. 48).

Für die besonderen Zwecke der Chromatographie ist die Verwendung einer höchstaktiven Rohrfüllung nicht immer günstig, im Gegensatz zu gewissen älteren Adsorptionsverfahren und zu mancher modernen Reinigungsoperation des Großbetriebes. Wirkt nämlich die feste Phase allzu energisch, so nimmt sie zwar die in der Lösung vorliegenden Inhaltsstoffe zuverlässig auf und fixiert sie stark, aber gerade durch diese energische Bindungsart

werden die feinen Unterschiede der einzelnen Adsorptionsaffinitäten ausgeglichen und in grober Weise überdeckt. Die Komponenten bleiben zusammengedrängt, sie vermögen keine klar abgegrenzten Bezirke zu bilden, auch nicht, wenn entwickelt wird. Die auf S. 18 erwähnten Verdrängungsvorgänge kommen ungenügend zur Geltung, weil den zahllosen, gleichzeitig verlaufenden Einzel-elutionen ein Widerstand gesetzt ist. Auch die am Schlusse des Versuches vorzunehmende Elution der Säulenteile kann erschwert sein oder versagen.

Was also bei der TSWERTSchen Arbeitstechnik von dem Adsorbens meist verlangt wird, liegt auf einer mittleren Linie: gute Festhaltung der Komponenten, welche jedoch imstande sein sollen, beim Waschen mit mäßiger Geschwindigkeit abwärts zu wandern und sich dabei zu scheiden. Dann verläuft auch die Elution der einzelnen Verbindungen zufriedenstellend.

Natürlich läßt sich der Versuch auch so leiten, daß man verschiedene Adsorptionsmittel in getrennten Ansätzen, nacheinander verwendet. Man kann z. B. den Gesamtfarbstoff, zur Abtrennung von weißen Begleitern, im Rohre festhalten, zunächst unter Verzicht auf eine feinere Aufteilung, was in einem zweiten Ansatz, mit Hilfe einer schwächer adsorbierenden Kolonne erreicht wird.

Dispersität. Es seien zunächst einige Korngrößen verzeichnet, die sich teils auf die im Laboratorium der Verfasser gebräuchlichen Materialien beziehen (Tabelle 8). Die Zahlen besitzen daher nur einen orientierenden Wert. Sie bedeuten den mittleren Durchmesser der Hauptmenge, wobei auch Körnchen mit recht stark abweichenden Maßen zugegen sein können.

Die Dispersität der Säulenfüllung soll gewöhnlich nicht allzu ungleichmäßig sein, da sonst die feinsten Teilchen sich fast wie ein anderes Adsorptionsmittel verhalten und zu stark wirksam sein können. In einem Ausnahmefall fand allerdings KOSCHARA (4), daß ein Farbstoff gerade von den gröberen Al_2O_3 -Körnern besonders stark (irreversibel) festgehalten wird. Hier ist eine chemische Verschiedenheit der größten und kleineren Teilchen naheliegend.

Der *Anwendungsbereich* mancher Adsorptionsmittel läßt sich unter Umständen recht fein *abstufen*, wenn man eine gröbere und eine feinere Sorte in verschiedenen Gewichtsverhältnissen mengt. So erwies sich das Gemisch 20:1 von Calcium carboni-

cum praecipitatum Merck und von Calcium carbonicum laevisimum der pharmazeutischen Praxis für die Verarbeitung von gewissen Polyenalkoholen als sehr günstig, während es für die Festhaltung von Farbwachsen (veresterten Polyenalkoholen) ungenügend wirksam ist. Für den letzteren Zweck wähle man das Mischungsverhältnis zu 5 : 1 bis 4 : 1. Im Falle eines Quotienten 1 : 1 wird aus Benzin sogar der Kohlenwasserstoff Lycopin fixiert, welcher sonst durch die CaCO_3 -Säule läuft. Zur Festhaltung der Carotine ist selbst das letztere Gemisch zu wenig aktiv und unbrauchbar (ZECHMEISTER und CHOLNOKY 2).

Tabelle 8. Durchschnittliche Teilchengröße einiger Adsorptionsmittel.

Adsorptionsmittel	Teilchengröße (μ)
Aluminiumoxyd Merck, standardisiert nach BROCKMANN	7
Aluminiumoxyd käuflich, selbst gepulvert	2
Adsorptionston aus Java (acid clay) ¹	10
Calcium carbonicum praecipitat. Merck	1,5
Calcium carbonicum laevis. des Handels	1,2
Calciumhydroxyd, selbst bereitet	2,5
Gips (wasserhaltig) ²	10,5
Magnesiumoxyd ³	1,5
Bleicherde	3
Floridin	1,5—7
Floridin XXF	1,5—6

Recht verschiedene Anforderungen werden an ein Adsorbens gestellt, je nachdem es in *wasserfreiem* oder in *wasserhaltigem* Milieu gebraucht werden soll. In ersterem Falle ist ein Feuchtigkeitsgehalt der Säulenfüllung meist schädlich und muß ausgeschaltet werden, nämlich durch Erhitzen und nachheriges Aufbewahren bei Luftabschluß. (Durch eine solche Vorbereitung kann auch die Aktivität beeinflußt werden.) Führt man den Versuch in

¹ Angabe von EULER und GARD. Dieser Ton ist ein Ca-Al-Mg-Silicat. Die Oberfläche von 1 g liegt in der Nähe von 10 m² und ist doppelt so groß wie diejenige des von BOWDEN und BASTOW angewandten Silicapulvers.

² Nach KARRER und WEBER.

³ Enthält auch ziegelförmige Krystalle (etwa 3—14 μ).

wäßriger oder wasserhaltiger Lösung aus, so darf das Adsorptionsmittel kein Wasser binden, nicht quellen usw., da sonst Risse in der Säule entstehen und außerdem der Abfluß verstopft werden kann. Auch wird das Herauspressen der Säule erschwert. Aus diesem Grunde ist der sonst vielfach verwendbare Kalk hier ungeeignet. Man kann übrigens den Kunstgriff gebrauchen, daß man z. B. wasserhaltigen Gips in das Rohr füllt (KARRER und WEBER, S. 178).

Es ist verständlich, daß in die Adsorptionsanalyse wäßriger Lösungen zunächst diejenigen Handelsprodukte Eingang gefunden haben, welche vom Großbetrieb bei Reinigungs- und Entfärbungsoperationen seit längerer Zeit verwendet werden, z. B. Bleicherden.

Spezielle Angaben.

Nachfolgend stehen einige Angaben über die wichtigsten Adsorptionsmittel, die derzeit in Gebrauch sind.

Puderzucker, bereits von Tswett (1) angewandt, dient zur Trennung der Chlorophylle. Es gibt Sorten, die stärker, und solche, die schwächer adsorbieren als *Milchzucker* (WINTERSTEIN und STEIN 2). *Milchzucker*: S. 24.

Inulin wird seltener angewandt, (S. 91 f.). Darstellung im Laboratorium z. B. nach SPOEHR.

Aluminiumoxyd (auch hydratisiert) ist vielleicht das meist verwendete Adsorptionsmittel, sowohl in wäßrigem als auch in wasserfreiem Medium gut brauchbar. Die nach verschiedenen Verfahren hergestellten Präparate bzw. Handelswaren zeigen große Schwankungen in bezug auf ihre Adsorptionskraft, so daß die Qualität des Materials stets genau definiert werden sollte.

Die *Fasertonerde* nach WISLICENUS (Merck, aus dem Amalgam bereitet) ist allein sehr stark, mit anderen Sorten vermengt noch immer kräftig wirksam, jedoch für größere Versuche viel zu teuer.

Darstellung der Fasertonerde („gewachsene Tonerde“), nach WISLICENUS.

In emaillierten Töpfen (ca. 15 × 15 cm) wurden je 200 g Aluminiumgrieß von 0,5 mm (gleichmäßiger) Körnung mit 200 cm³ 10proz. Natronlauge unter starkem Schwenken bis zur kräftigen Wasserstoffentwicklung angeätzt. Den entstandenen grauen, schaumigen Schlamm spült man unter einem kräftigen Strahl der Wasserleitung mehrmals weg, wiederholt das Anätzen rasch mit 100 cm³ NaOH bis zur kräftigen H₂-Entwicklung, spült rasch öfters ab, bis das Wasser

klar wird, gibt dann 50 g (ca. 40 cm³) kalt gesättigte Sublimatlösung hinzu (stets unter starkem Schwenken des entstandenen dunklen Schlammes), spült diesen Schlamm mit starkem Wasserstrahl fort und gießt das Wasser bis zur Tropfenbildung rasch ab. Nun wird unter Schwenken ein Gemisch von 2—2,5 g Nitrobenzol, 18—20 g Äther, 20 g 90proz. Alkohol und 10—12 g Wasser zugefügt und das sich stark erhaltende Material einige Stunden stehen gelassen. Man schwemmt die aufgeblähte, gelbliche Masse von unverbrauchtem Aluminium mit Spülalkohol ab, nutsch, läßt etwas trocknen und glüht das Präparat (nach dem Sammeln genügender Portionen) in flachen Schamotteschalen bei mäßiger Rotglut im Muffelofen aus. Die weiße Masse wird schließlich zur Entfernung des feinsten Staubes und der größten Krümel sowie von Al-Körnchen entweder mit Alkohol oder Äther abgeschlämmt oder in einem weiten, langen Rohr mit zwei nachgeschalteten großen Fangflaschen, mit getrockneter Luft abgeblasen. 1 g des im Exsiccator oder gutschließender Flasche aufzubewahrenden Materials muß, nach dem allmählichen Eintragen in 200 cm³ einer 0,3—0,4proz., reinen Tanninlösung und gutem Durchschütteln, 0,33—0,4 g Tannin aufnehmen.

RENZ gibt die folgende Vorschrift für die Darstellung der „gewachsenen Tonerde“: Aluminiumgrieß wird in einer Porzellanschale mit wenig Wasser und einigen Kubikzentimetern frisch bereiteter Quecksilberacetatlösung versetzt. Die Reaktion setzt alsbald, unter starker Erwärmung ein. Man spritzt ganz allmählich wenig Wasser nach, bis die Umsetzung zu Ende ist und erhält das Aluminiumhydroxyd in Form eines sehr lockeren, hellgrauen Pulvers.

Das *Aluminiumoxyd* der Firma Merck, „standardisiert nach BROCKMANN“, zeichnet sich durch eine sehr willkommene Konstanz seiner Eigenschaften aus, da es durch Erhitzen (angeblich im CO₂-Strom) auf einen bestimmten Wassergehalt gebracht und mit Hilfe geeigneter Farbstoffe auf den gewünschten Aktivitätsgrad eingestellt wird. Dieses körnige Produkt ist ebenfalls nicht billig und wird oft im Gemisch mit gewöhnlichen Handelspräparaten angewandt, um so mehr, als es für bestimmte Zwecke zu stark wirkt. Es sei noch bemerkt, daß das standardisierte Al₂O₃ nach CAHN und PHIPERS stärker alkalisch reagiert als die gewöhnlichen Sorten, was bei einem laugeempfindlichen Stoff zu beachten wäre.

Für viele Zwecke genügt das preiswerte Aluminiumoxydhydrat oder *Aluminium oxydatum anhydricum* aus guter Bezugsquelle. Man kann auch Al(OH)₃ im Laboratorium entwässern und kommt so zu stark aktiven Präparaten. HESSE (Privatmitt.) erhitzt technisches Aluminiumhydroxyd (Merck oder Kahlbaum) in Por-

tionen von 200—300 g in einem emaillierten Topf, über einem kräftigen Brenner, bis keine Blasfontänen mehr entstehen. Chemisch reines Al_2O_3 bietet keinen Vorteil.

„Hydralo“, ein amerikanisches Trocknungsmittel, wird von STRAIN (2) empfohlen und soll stärker wirken als Fasertonerde.

HOLMES, LAVA, DELFS und CASSIDY haben ausführliche Angaben über die Wirksamkeit verschiedenartig hergestellter Präparate gemacht, von welchen einige Handelssorten sind. Die Adsorptionsmittel wurden meist durch das 200er Sieb geschickt und 2 Stunden bei 200° im Kohlendioxidstrom aktiviert; Luft- und Wassergehalt lassen sich so verdrängen.

Beispiele. a) Ein Handelsprodukt wurde alkalifrei gewaschen und aktiviert. — b) Krystallwasserhaltiges Aluminiumnitrat wird so lange (einige Stunden) zwischen 200—300° gehalten, bis kein NO_2 mehr entweicht. — c) Man versetzt AlCl_3 mit einem kleinen Überschuß von Ammoniak, trocknet die Lösung im Verlaufe von 2—3 Monaten ein, wäscht den Rest chlorfrei und siebt. — d) Auf Glas ausgebreitetes Aluminiumäthylat wird unter gelegentlichem Umnketen in einem warmen, feuchten Raum 5 Wochen aufbewahrt, 3 Stunden in trockenem CO_2 -Strom auf 210° erhitzt, bis kein Dampf mehr entweicht, gepulvert und nochmals aktiviert. — e) Es wurden auch Präparate auf Bimsstein bereitet, nämlich durch langsame Hydrolyse von Aluminium-alkoholaten.

Für die praktischen Zwecke der Chromatographie sind derartige Arbeitsweisen zu langwierig.

Einen wesentlichen Fortschritt bedeutet der einfache, von RUGGLI und JENSEN (1, 2) erfundene Kunstgriff zur *Aktivierung*, die darin besteht, daß man das Oxyd mit *Leitungswasser* bespült und eventuell noch stark erhitzt. Für die meisten Zwecke reicht 1 Behandlung aus, welche aber, falls sie für die betreffende Aufgabe noch nicht genügt, nach Belieben wiederholt werden kann. Zwecks Ausschaltung der Härtedifferenzen verschiedener Wasserproben nimmt FRANCK diese Aktivierung mit 5proz. Calciumhydroxyd vor. Da eine Bespülung mit destilliertem Wasser unwirksam ist, handelt es sich hier offenbar um die Beladung des Adsorbens mit einer Spur Kalk. Das Verfahren hat den Vorteil, daß man die Wirksamkeit der Säulenfüllung abstimmen kann; so haben KARRER und STRONG für die Chromatographie von Anthocyanen ein nur schwach aktiviertes Aluminiumoxyd als günstig befunden.

Es kommt, wenn auch seltener, vor, daß die Oberfläche eines Aluminiumoxyds allzu stark wirkt und *desaktiviert* werden muß. Dies erreicht man nach HEILBRON und PHIPERS dadurch, daß

z. B. die nach BROCKMANN standardisierte Handelsware mit Methanol gewaschen und an der Luft getrocknet wird.

Die Herstellungsmethoden für zuverlässig wirkende Oxyd- und Hydroxydpräparate sind, auch industriell, noch entwicklungsbedürftig. BROCKMANN (3) kündigt die Einführung eines hochaktiven Aluminiumhydroxyds „III“ an.

Schließlich sei bemerkt, daß Aluminiumoxyd-Säulen recht feucht ausgepreßt werden müssen, da sie sonst leicht zerbröckeln. Namentlich gilt dies für das standardisierte Präparat.

Magnesiumoxyd wurde u. a. von EULER und GARD und namentlich von STRAIN (1—5) empfohlen. Es wirkt ganz verschieden energisch, je nach der Bereitungsart. Verbrennt man einfach das Metall, so besitzt das Oxyd eine nur geringe Sorptionskraft. Auch das Erhitzungsprodukt des Carbonats, bei höherer Temperatur gewonnen, wirkt nur mittelmäßig. Zu einem weit besseren Ergebnis führt die Wasserabspaltung aus Magnesiumhydroxyd, bei nicht zu hoher Temperatur. Ein amerikanisches Handelsprodukt („Micon Brand Magnesium oxyde Nr. 2641“, California Chemical Corporation, Newark) wird empfohlen. Nach unserer Erfahrung genügt die allgemein käufliche Ware für die meisten Zwecke.

Weitere Magnesiumverbindungen als Adsorptionsmittel: EULER und GARD.

Calciumhydroxyd. Nach KARRER und WALKER (1) ist käuflicher, gelöschter Kalk eine ausgezeichnete Füllmasse und besitzt, ebenso wie das gelegentlich angewandte *Oxyd*, den Vorzug der großen Billigkeit. Für die Aufteilung wasserhaltiger Flüssigkeiten ist er natürlich unbrauchbar (Verstopfung; wenn das Löschen nicht vollständig war: Aufblähen der Masse). In unserem Institut wird käuflicher Kalk durch Besprengen mit Wasser nur soweit gelöscht, bis er gerade zerfällt. Man schickt das Material durch ein 120maschiges Sieb oder, falls höhere Dispersität erwünscht ist, durch ein 180maschiges. Aufbewahrung des hygroskopischen Produktes bei Luftabschluß. Vor der Entnahme wird die Stöpselflasche gut durchgeschüttelt, um den erhöhten Carbonat- und Feuchtigkeitsgehalt der oben liegenden Schicht gleichmäßig zu verteilen.

Calciumsulfat (wasserhaltig) wird von KARRER und WEBER in wäßrigem Medium benutzt (S. 178).

Calciumcarbonat, von TSWETT oft gebraucht, ist ein milde

wirkendes, in vielen Fällen angewandtes Adsorptionsmittel. Über den Einfluß der Dispersität auf sein Aufnahmevermögen wurden schon S. 45 Angaben gemacht. Durch ein entsprechendes Mischen von gröberem und feinerem Pulver hat man es in der Hand, die Adsorptionskraft jeweils dem Bedarf anzupassen (S. 44). Feuchte Präparate wirken schlecht und werden nötigenfalls einige Stunden auf 150° erhitzt.

Bleicherden sind technisch angewandte Aluminium-hydro-silicate mit tonähnlichem Charakter, deren Ca-, Mg- und Fe-Gehalt weitgehend variieren kann. Man unterscheidet „*Natureerden*“, die nur mechanisch verarbeitet wurden, und „*aktivierte Erden*“. Die Aktivierung besteht meist in einer fabrikatorischen Behandlung mit Salzsäure, welche gewisse Bestandteile herauslöst. Die Oberflächenbeschaffenheit (Porosität) gestaltet sich dadurch günstiger, ferner besitzen solche Präparate saure Gruppen und sind bei der Adsorption zur Salzbildung befähigt.

Nach den Untersuchungen von CARLSOHN und MÜLLER (1, 2) handelt es sich dabei keineswegs um Spuren von Mineralsäure, denn Sudanrot (Kupplungsprodukt von diazotiertem o-Amino-azotoluol mit β -Naphtol) liefert in Benzin auf Al_2O_3 ein blaues, auf Kaolin, das mit Säure vorbehandelt wurde, ebenfalls ein blaues, aber auf aktivierten Bleicherden ein violettblau bis grünblaues Adsorbat (hier Salzbildung). Nach vollständiger Ausschaltung des locker gebundenen Wassers aus der Erde, durch mäßiges Erhitzen, nähert sich die Nuance des Sudanrot-adsorbats demjenigen Grün, welches in Schwefelsäure auftritt.

Bei der Aufteilung wäßriger Flüssigkeiten hat KOSCHARA (4) namentlich mit den folgenden Adsorbentien gute Erfahrungen gemacht:

Frankonit KL: mit HCl aktiviert, ist kongo-sauer (Pferschinger Mineralwerke, Kitzingen).

Floridin XXF: fein gemahlen, stark wirksam, obzwar unvorbehandelt; hellgrau (H. Bensmann, Bremen).

Floridin XS: dasselbe, aber gröber-dispers, sandartig.

Das vorletzte Floridin-Präparat erwies sich bei den Pterin-Untersuchungen von SCHÖPF und BECKER als zu stark und adsorbierte z. B. das Erythropterin irreversibel. Hierbei spielt wahrscheinlich der *Eisengehalt* mit, indem das Adsorbat dieselben Farben aufweist, wie die aus sauren Erythropterinlösungen mit Ferrichlorid erhaltliche Fällung. Wurde der Eisengehalt des Floridins durch zehnmaliges Auskochen (während je 3—5 Minuten) mit 10 Teilen 3n-HCl stark

vermindert, so zeigte das Material die für den erwähnten Versuch gerade günstige Adsorptionskraft. Kocht man jedoch das so vorbehandelte Floridin mit der Säure weiter, so verschwindet gleichzeitig mit dem Eisengehalt auch die Aufnahmefähigkeit für den Farbstoff.

Oft wird die Beurteilung des Chromatogramms durch die dunkle Eigenfarbe von feuchten Bleicherden gestört; in manchen Fällen erhält man nach dem Trocknen des ausgepreßten Adsorbens oder im Uviollicht ein besseres Bild.

Fullererden verschiedener Herkunft und Qualität werden ebenfalls verwendet. Meist reagieren sie deutlich sauer und sehen, namentlich mit Flüssigkeit befeuchtet, mehr oder weniger dunkel aus. Eine häufiger gebrauchte Abart ist „LLOYD's Reagens“.

Künstlich bereitete *Zeolithe* werden noch wenig verwendet; CERECEDO und HENNESSY benutzen das Zeolith „Decalso“ (The Permutit Cie., New York).

Seltener angewandte anorganische Adsorptionsmittel. Es wird hier nicht beabsichtigt, eine vollständige Liste derselben zu geben. In manchen Fällen wurden auch schwerer zugängliche Adsorbentien verwendet, die ohne Schwierigkeit durch allgemeiner gebräuchliche ersetzt werden könnten.

Wiederholt haben sich bewährt: *Natriumsulfat* (wasserfrei), *Bleisulfid*, *Talcum*, *Kieselgur*, *Infusorienerde*, *Kaolin*, *Silicagel* (unelastisch, z. B. „Intermediate Activated“ der Silica Gel Corporation, Baltimore), ebenso auch *Tonsil* sowie *Clarit* (Moosburger Tonerden). Gewisse *Kohlenpräparate* (Vereinigte Farbwerke, Werk Düsseldorf; Anticarbon, Paris) wirken kräftig adsorbierend und sind leicht zugänglich, allerdings muß man auf ein sichtbares Chromatogramm verzichten und fraktionierte Elutionen oder ein empirisches Zerschneiden der Säule ausführen. Empfehlenswert sind auch *Carboraffin* (durch Verkohlen von Nadelholz mit Chlorzink gewonnen) und *Norit* (eine, mit überhitztem Wasserdampf aktivierte Holzkohlensorte); sie können durch Erhitzen im Stickstoffstrom entlüftet werden. Gepulverte *Blutkohle* ist manchmal verwendbar.

Gebraucht man ein technisches Material, so ist zu prüfen, ob nicht Substanz an das Lösungsmittel abgegeben wird.

Das **Regenerieren** einer gebrauchten Füllmasse ist im Kleinversuch kaum lohnend. Anorganische Stoffe können, eventuell nach guter Durchspülung mit einem geeigneten Lösungsmittel,

durch Ausglühen zurückgewonnen werden, namentlich, wenn sie nicht mit schwer verkohlbaren Kohlenstoffverbindungen beladen sind. Man überzeuge sich, daß die Adsorptionsaktivität nicht gelitten hat.

Gebrauchtes *Calciumcarbonat* kann in vielen Fällen durch Ausziehen mit kaltem oder warmem Methanol und Trocknen an der Luft zurückgewonnen werden; es ist dann aber unbedingt nötig, das Material längere Zeit hindurch bei 100—150° zu halten. — Technische Regenerierung von *Bleicherden*, namentlich wenn sie fetthaltig sind: ECKART.

Die mitunter empfehlenswerte gleichzeitige Anwendung von zwei Adsorptionsmitteln in demselben Rohr kann entweder so erfolgen, daß man das gesamte Füllmaterial homogen durchmischt, oder wird die Säule teils aus dem einen, teils aus dem anderen Adsorbens aufgebaut, welche man gesondert einstampft.

Durch die Verwendung einer einheitlichen Mischfüllung will man meist eine mittlere Adsorptionskraft einstellen oder die Durchflußgeschwindigkeit dadurch erhöhen, daß ein gröberes Material mitverwendet wird. Es sei bemerkt, daß beim Entwickeln oder bei (anteilsweiser) Elution eine Fraktionierung vorgetäuscht werden kann, falls die beiden Füllstoffe allzu abweichend wirken.

Zur Erhöhung der Durchlaufgeschwindigkeit ist in manchen Fällen eine Beimischung von Sand oder von Glaspulver zweckmäßig.

Gibt man *verschiedene Lagen* von Adsorptionsmitteln in das gleiche Rohr, so geschieht dies für Demonstrationszwecke oder um Arbeit zu sparen. Die obere Kolonnenhälfte wird von einer schwächeren, die untere von einer energischer wirksamen Substanz gebildet. Der Stoffinhalt des Zwischenfiltrates, welcher in den unteren Bezirk des Rohres gelangt, wird dort abgefangen, so daß man keine zweite Säule zu bereiten braucht.

Beispiele für die letztere Arbeitsweise:

a) Calciumcarbonat-Aluminiumoxyd-Säule zur Mikroanalyse von Polyenausügen, nach KUHN und BROCKMANN (3; Abb. 14, S. 61).

b) Eine Calciumcarbonat-Calciumhydroxyd-Kolonne zur Bestimmung der Paprika-Farbstoffe, nach CHOLNOKY (3), S. 122.

c) WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER versahen bei der Bearbeitung von polycyclischen Kohlenwasserstoffen die Al_2O_3 -Säule oben mit einer dünnen Schicht von Aluminiumoxyd + Carboraffin-gemisch, das gewisse Verunreinigungen stärker zurückhält: S. 203.

d) Drei Adsorptionslagen (oben Zucker, in der Mitte CaCO_3 , unten Al_2O_3) zur Demonstration der Komponenten des Blattgrüns: Abb. 36, S. 93, nach WINTERSTEIN (1).

Lösungsmittel.

Hier sei zunächst das Arbeiten bei *Wasserausschluß* erörtert, spezielle Angaben über wäßrige Lösungen folgen auf S. 78.

Die *Wahl des Solventen* hängt natürlich in erster Linie von den Löslichkeitsverhältnissen der Substanz ab. Liegt dieselbe bereits gelöst vor, z. B. in Form eines Extraktes, so wird sie nach dem Vakuum-abdampfen in das günstigste Milieu übergeführt. Arbeitet man mit nichtwäßrigen Flüssigkeiten, so ist es meist vorteilhaft, die Feuchtigkeit wirklich auszuschließen, wenn nötig, durch entsprechende Vorbehandlung des Lösungsmittels. Das Heranziehen von Solventen, die mit Wasser nicht mischbar sind, erscheint von vornherein als günstig. Es ist ein Nachteil der TSWETSCHEN Methodik, aber auch von manchem anderen Adsorptionsverfahren, daß die Lösung im allgemeinen recht verdünnt sein muß. Das Auskrystallisieren in der Säule soll unbedingt vermieden werden, man geht daher in der Rohlösung selten über einige Prozente des zu adsorbierenden Stoffgehaltes hinaus. Eine Verunreinigung, falls sie nicht aus anderen Gründen störend wirkt, darf natürlich auch in höherer Konzentration vorliegen.

Theoretisch bildet jedes flüssige Medium sowohl ein Adsorptions- als auch ein Elutionsmittel; welche Rolle ihm bei der Chromatographie zugedacht wird, hängt im gegebenen Fall von dem Verlauf der Adsorptionsisotherme ab. Es gelten hier ähnliche Leitgedanken, wie bei der Wahl des Adsorptionsmittels: Wird die Substanz allzu stark fixiert, so bereitet sie bei dem Entwickeln und bei der schließlichen Elution Schwierigkeiten; ist andererseits die im System herrschende Adsorptionsaffinität zu schwach, so läuft die Substanz leicht durch die Kolonne, noch bevor ein zufriedenstellendes Schichtenbild sich ausgestaltet hat. (Unter Umständen wird dies beabsichtigt: „Flüssiges Chromatogramm“, S. 77.) Wie ersichtlich, hat man es durch verschiedenartiges *Mischen von zwei Lösungsmitteln* in der Hand, den Versuch nach Belieben zu leiten.

Oft genügen die nachfolgend erwähnten Lösungsmittel. Hochsiedende Flüssigkeiten sind, wie bei anderen Reinigungsopera-

tionen, unbrauchbar, wenn im Anschluß an den Versuch ein empfindlicher Stoff isoliert werden soll. Ein allzu niedriger Kochpunkt stört wiederum wegen der starken Verflüchtigung. Siedepunkte zwischen 40° und 80° sind günstig.

Schwefelkohlenstoff (Siedep. 46°) wirkt in vielen Fällen, z. B. auf Calciumcarbonat, sehr vorteilhaft. Die technische Ware ist nötigenfalls vorzureinigen. Das andauernde Arbeiten mit diesem Lösungsmittel ist lästig und gesundheitsschädlich, besonders wenn der Experimentator eine große Anzahl von Säulen zu zerschneiden hat; man Sorge daher für Ventilation. Ferner wird der Kunstgriff gebraucht, daß man den Schwefelkohlenstoff aus dem fertigen Chromatogramm mit Hilfe von Benzin verdrängt und die Säule erst dann auspreßt.

Benzin bzw. *Petroläther* („Ligroin“, „light petroleum“, Siedep. nicht über 80°) ist gegenwärtig wohl das meistgebrauchte Lösungsmittel, zufolge seiner Reinheit, Billigkeit und sonstigen guten Eigenschaften. Die Kombination Aluminiumoxyd-Benzin oder Calciumhydroxyd-Benzin hat sich oft ausgezeichnet bewährt. Auch *Pentan* ist verwendbar (Siedep. 36°).

Benzol (Siedep. $80,4^{\circ}$) wird ebenfalls häufig gebraucht. Es unterscheidet sich von dem Benzin in vielen Fällen dadurch, daß es stärker eluierend wirkt. Die Verwendung von Benzol + Benzin-Gemischen ergibt sich daher von selbst. Man kann z. B. aus Benzin adsorbieren und mit Benzin + Benzol entwickeln, oder man adsorbiert aus Benzin + Benzol 10:1 und entwickelt mit einem Gemisch 3:1. Unter Umständen dient reines Benzol zur Elution.

Seltener werden angewandt: *Chloroform*, *Tetrachlorkohlenstoff*, *Dichlormethan*, *Alkohol*, *Anisol*, *Aceton*, *Äther* usw. Der letztere ist meist als Elutionsmittel in Gebrauch und wirkt teils zufolge seines Spritgehaltes. Jedenfalls soll der Äther frei von Peroxyden sein, was bekanntlich durch tagelanges Aufbewahren über einer wäßrigen Ferrosulfatlösung erreicht wird.

Elutionsmittel.

Vor längerer Zeit hat TSWETT festgestellt, daß zahlreiche Adsorbate von *Methyl- oder Äthylalkohol* (auch von Aceton) sofort zerlegt werden. Durch diese Beobachtung wurde eines der besten,

leicht zugänglichen Elutionsmittel ermittelt. Meist ist es gar nicht erforderlich, reine Alkohole anzuwenden, sondern es genügt schon ein Zusatz von 0,5—2% zum Solvent, mit dem gerade gearbeitet wird. Oder man eluiert mit schwach methanolhaltigem Äther.

Soll der chromatographische Versuch mit einem Säulenteil oder mit dem gesamten Stoffinhalt wiederholt werden, so eluiert man z. B. mit schwach holzgeisthaltigem Benzin, filtriert vom Adsorptionsmittel, wäscht den Alkohol mit Wasser weg, trocknet und gießt die Benzinlösung auf eine frische Säule. Eindampfungsoperationen werden so vermieden.

Daß die Adsorptionskräfte von niedrigen Alkoholen nicht immer herabgesetzt oder aufgehoben werden, geht aus den S. 169 referierten Pterin-Untersuchungen von SCHÖPF und BECKER hervor; es wurden von diesen Forschern Adsorptionen auch aus methanolischem Medium vorgenommen. Adsorptionen aus Äthylalkohol: z. B. bei KUHN, DESNUELLE und WEYGAND (S. 199).¹

Ist die Elution in besonderen Fällen sehr schwer durchführbar, so wird man ein Auskochen mit niedrigen Alkoholen versuchen. Oft hat sich kaltes *Pyridin* bewährt (allein oder im Gemisch, z. B. mit Wasser oder Äther). Es kommt, wenn auch nicht häufig vor, daß das Adsorbat durch keines der erwähnten Hilfsmittel zerlegt werden kann. Bei säure-unempfindlichen Inhaltsstoffen greift man dann zu einem Notbehelf und löst z. B. das Calciumcarbonat in verdünnter Salzsäure, um hierauf die organische Substanz zu extrahieren; Säulen aus Zucker werden in Wasser gelöst.

Gelegentlich der Bearbeitung einer Substanz, welche auf CaCO_3 überhaupt nicht, auf Ca(OH)_2 unelulierbar fest hängen bleibt, bewährte sich der folgende Kunstgriff: Man chromatographiert auf Ca(OH)_2 , suspendiert den zerstampften Säulenteil in Wasser und verwandelt den Kalk durch Einleiten von CO_2 in das Carbonat. Die Elution gelang nun ohne Schwierigkeiten (ТÓТН, unveröffentlicht).

Apparatur.

Es sind mannigfach Apparate zur Ausführung der Chromatographie empfohlen worden. Von historischem Interesse ist die in Abb. 3 (Nr. 1) dargestellte Vorrichtung von TSWETT (1), die zu raschen, orientierenden Versuchen mit kleinen Extraktmengen geeignet hat. Das Passieren der Säule wird hier nicht mit Hilfe einer

Saugpumpe, sondern durch Anwendung von Überdruck erreicht Man lockert den Quetschhahn *Q*, betätigt den Gummiball *P*, wodurch Überdruck im Leitungsrohr *D* sowie in der Reserveflasche *F* entsteht, was vom Manometer *M* angezeigt wird. An *D* werden die Adsorptionsröhrchen angeschlossen (konstruiert nach Abb. 3 Nr. 2: die Kolonne befindet sich im unteren, zylindrischen Teil: $30\text{--}40 \times 2\text{--}3\text{ mm}$). Einzelheiten der Apparatur sind aus

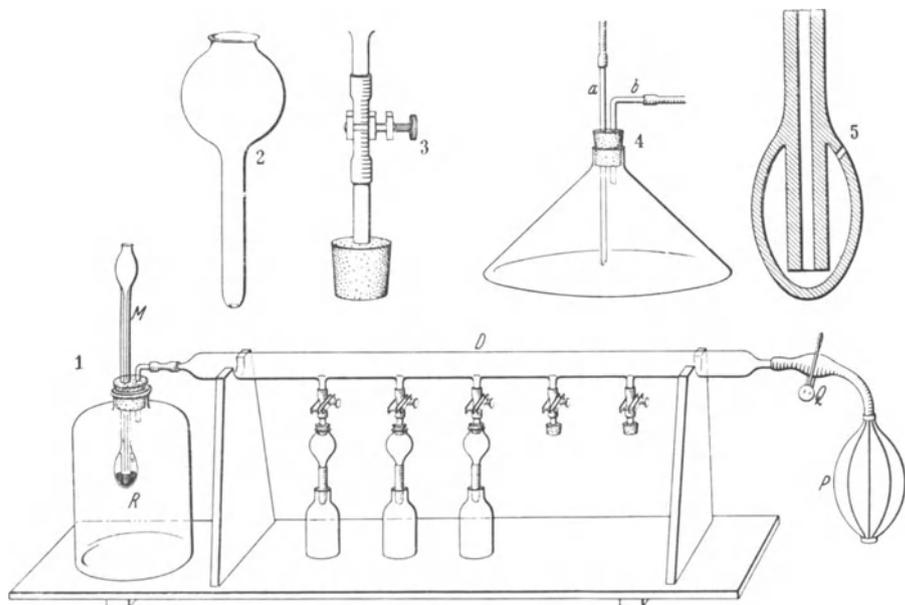


Abb. 3. Originalvorrichtung von TSWETT.

den Zeichnungen Nr. 2, 3 und 5 der Abb. 3 ersichtlich, während das Gefäß Nr. 4 die Rolle eines Scheidetrichters spielt und mit der Bereitung des Chromatogramms nichts zu tun hat.

Zur Verarbeitung etwas größerer Mengen benutzte TSWETT (1) eine, nach der Abb. 4 gebaute Apparatur, die im Prinzip noch heute verwendet wird: *R* nimmt die Lösung, *A* (Durchmesser *b* bis zu 3 cm) die Säule auf, in *V* wird Vakuum erzeugt. Das Ausdrücken der Säule ist bei diesem Adsorptionsrohr kaum durchführbar.

Ist man nicht im Besitz einer besonders konstruierten Vor-

richtung und will kleine Proben ausführen, so montiere man ein einseitig ausgezogenes Glasrohr auf eine Saugflasche (Abb. 5). Freilich wird durch die Form auch dieses Rohres das Ausdrücken der Säule unmöglich gemacht, wenn man nicht das Glas zerschneidet. Bei orientierenden Versuchen ist dies öfters entbehrlich. Ferner kann ein schritt-

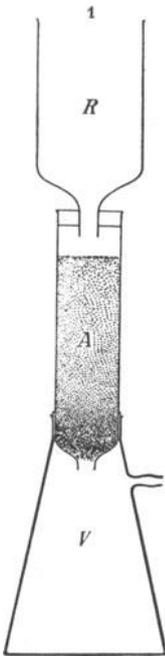


Abb. 4. Adsorptionsvorrichtung von TSWETT für größere Versuche.



Abb. 5. Einfache Adsorptionsvorrichtung.

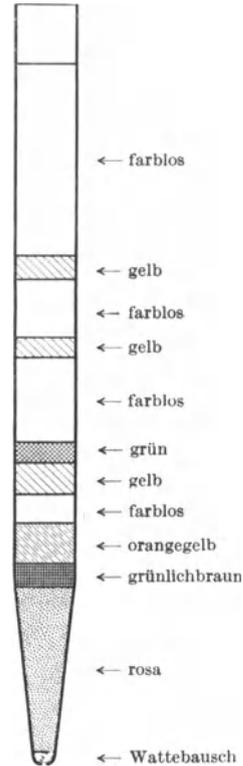


Abb. 6. Alfalfaheu-Auszug in einem einfachen Rohr, auf CaCO_3 , soweit gewaschen, daß das Carotin durchzulaufen beginnt (PALMER und ECKLES).

weises Abwärtswaschen der einzelnen Scheiben vorgenommen und die Saugflasche entsprechend gewechselt werden (Näheres S. 77). Ein Beispiel hierzu haben schon frühzeitig PALMER und ECKLES mitgeteilt (Abb. 6).

Von den heute in Gebrauch stehenden Vorrichtungen verlangt man ein klagloses Auspressen der unversehrten Kolonne. Dies wurde zuerst, im Laboratorium von DHÉRÉ, von ROGOWSKI

(Abb. 7), ferner von VEGEZZI erreicht: Auf Abb. 8 sieht man im Inneren des Glaszylinders *m* das eigentliche Adsorptionsrohr *t* ($35 \times 1,6$ cm). Das letztere ist mit Hilfe eines durchlöchernten Korkstopfens befestigt und kann bequem herausgenommen werden.

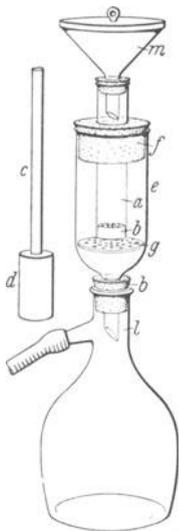


Abb. 7. Apparat von DHÉRE und ROGOWSKI (Zeichnung bei ROGOWSKI). Rohr 25×2 cm, Füllhöhe 6—8 cm. Auf dem Korkstopfen Filterpapier, darüber 1—2 cm Sand. — Links Holzpistill.

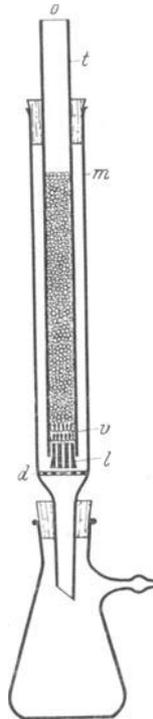


Abb. 8. Adsorptionsvorrichtung nach DHÉRE und VEGEZZI (Zeichnung bei VEGEZZI).

Vor dem Versuch wird es mit dem erwähnten Stopfen abgeschlossen, gefüllt und auf die Siebplatte *d* gestellt (*v* = Glaswolle). Eine Modifikation dieser Einrichtung stammt von WINTERSTEIN und STEIN (1) und ist in Abb. 9 wiedergegeben (*G* = Glasrohr, *K* = engmaschiges Kupferdrahtnetz, *V* = Vorstoß, *D* = weitmaschiges Drahtnetz, *S* = Saugflasche; s. auch Abb. 10).

Ist die Adsorptionsanalyse bei *Luftausschluß* vorzunehmen, z. B. im Stickstoffstrom, so empfiehlt sich der Apparat von HEILBRON, HESLOP, MORTON, WEBSTER, REA und

DRUMMOND (Abb. 11, in *S* leitet man O-freies Gas ein) oder die Vorrichtung nach HOLMES, CASSIDY, MANLY und HARTZLER (Abb. 12, S. 60).

Von KOSCHARA (1) wurde ein gerader Vorstoß (Durchmesser etwa 3 cm) mit eingeschmolzener Glassiebplatte und Rundfilter angewandt.

Für pharmazeutische Untersuchungen empfehlen VALENTIN

und FRANCK die in Abb. 13, S. 61 wiedergegebene Vorrichtung, in der das Filtrat zunächst in einen graduierten Scheidetrichter fließt und von dort nach Bedarf abgelassen werden kann. Betr. Apparatur s. auch EULER und SCHLENK (2), S. 263.

Nach unseren Erfahrungen sind *Adsorptionsrohre mit Glasschliff besonders zweckmäßig*.

Ein solches wurde für analytische Zwecke von KUHN und BROCKMANN (3) vorgeschlagen; die schlanke Kolonne steht auf einem Wattebausch (Abb. 14, S. 61, vergl. auch Abb. 15, S. 61). Im Laboratorium der Verfasser hat sich die folgende Anordnung bewährt (Abb. 16—17, S. 62 bis 63)¹: Man legt auf eine passende Porzellansiebplatte eine kreisrunde, höchstens $\frac{1}{2}$ cm dicke Wattescheibe (Verbandwatte), deren Durchmesser um 2 cm denjenigen des Porzellans übertrifft. Der ringsum herausragende Wattering wird gleichmäßig nach unten abgebogen und das Ganze vorsichtig in das horizontal gehaltene Adsorptionsrohr geschoben, das mittels seines Schliffes montiert wird. (Die

Hülle vermeidet ein Ritzen der Glaswand beim späteren Auspressen der Füllmasse.) Nach Beendigung des Adsorptionsversuches wird der angeschliffene Unterteil entfernt und die Kolonne in waagerechter Stellung, von dem geschliffenen Ende aus beginnend, mit Hilfe eines Holzpistills (Abb. 30, S. 69) ausgedrückt. Arbeitet man mit Materialien, durch welche das Auspressen (namentlich im Falle

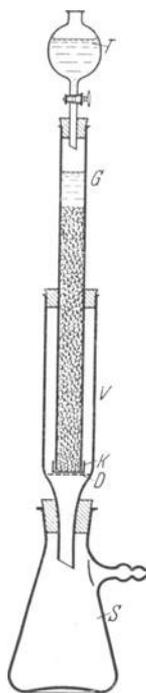


Abb. 9. Vorrichtung nach WINTERSTEIN und STEIN.

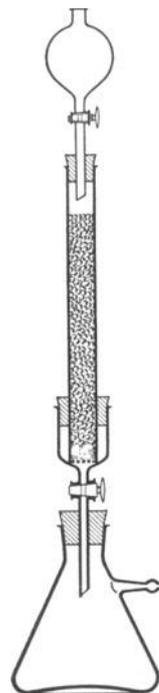


Abb. 10. Vorrichtung nach HESSE.

¹ Lieferant: Paul Haack, Garelligasse 4, Wien IX/2.

wäßriger Flüssigkeiten) erschwert ist, so kann die Porzellanplatte wegfallen. Die mit Watte unterschichtete, adsorbierende Säule wird dann von 1—5 Glasrohrstückchen getragen, die man in den unteren, kurzen Ansatzteil nach Abb. 18 lose einsetzt (S. 62).

Ein zweites Modell, das gleichfalls seit längerer Zeit in unserem

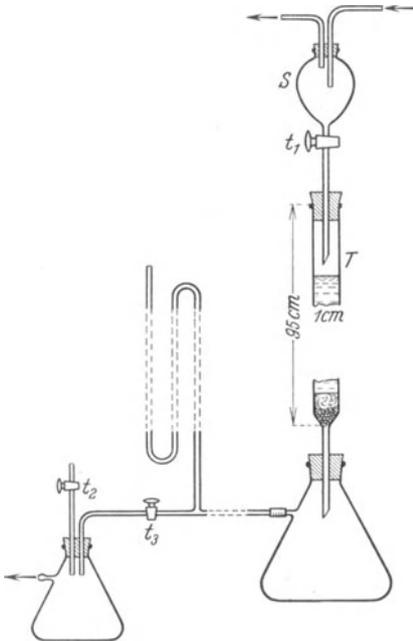


Abb. 11. Vorrichtung nach HEILBRON, HESLOP, MORTON, WEBSTER, REA und DRUMMOND, zur Adsorptionsanalyse bei Luftausschluß.

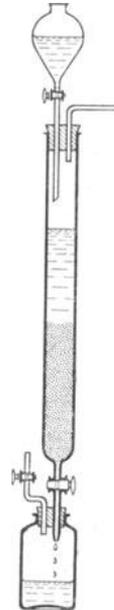


Abb. 12. Vorrichtung nach HOLMES, CASSIDY, MANLY und HARTZLER zur Adsorptionsanalyse bei Luftausschluß.

Laboratorium gebraucht wird, enthält eine *durchlöcherter Glasplatte*, die an den Unterteil des Schließapparates *angeschmolzen* ist (Abb. 19, 20, S. 62—63).¹ Diese Vorrichtung besteht also nur aus zwei Teilen, die mit Hilfe von Spiralfedern zusammengehalten werden. Da das Einstampfen der Füllmasse hier nach Anbringung des Unterteiles erfolgt, darf das

¹ Lieferant: S. 59 (Nach einer Mitteilung der Jenaer Glaswerke Schott u. Gen. können auch Porzellanplatten auf Duranglas verschmolzen werden).

unterste Ablaufrohr nicht schräg abgeschnitten werden. Die Kolonne wird von einer Wattescheibe gehalten (etwa 5 mm dick). Man schneide eine runde Scheibe von Preßwatte aus, mit einem Durchmesser, der um 3—5 mm denjenigen des Glasrohres übertreffe.

Zur schonenden *Aufbewahrung* der Adsorptionsrohre empfehlen wir die in Abb. 21 wiedergegebene Einrichtung (S. 64).



Abb. 13. Vorrichtung nach VALENTÍN und FRANCK (*A* = Adsorbens, *V* = Vakuumleitung, *S* = Scheide-trichter).

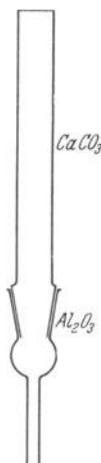


Abb. 14. Adsorptionsrohr nach KUHN und BROCKMANN (3), für analytische Zwecke.

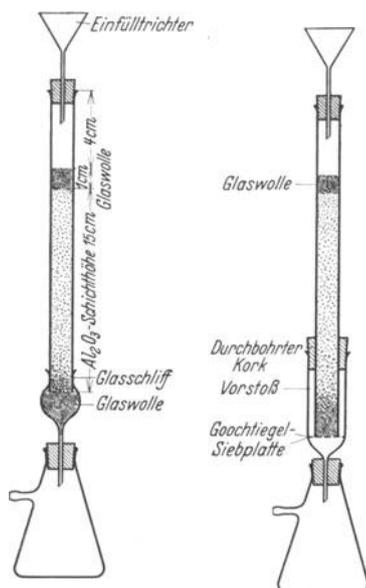


Abb. 15. Apparate zur Untersuchung des Weines (MOHLER und HÄMMERLE).

Zur raschen, *qualitativen Prüfung* des chromatographischen Verhaltens haben kürzlich SCHÖPF und BECKER *Adsorptions-Probierröhrchen* eingeführt (Abb. 22, S. 65): Ein Glasrohr (Durchmesser 5 mm) wird nahe dem einen Ende in der Flamme so weit einfallen gelassen, daß noch eine 0,5—1 mm breite Capillare offen bleibt. Man preßt etwas Watte ein, füllt das Adsorbens in das Rohr und saugt es schwach an.

Die Maße des Adsorptionsrohres betragen meist 15—35 × 1 bis 6 cm, seltener werden im Schrifttum größere Dimensionen erwähnt. So verwenden z. B. HELBRON, HESLOP, MORTON, WEBSTER, REA und DRUMMOND ein 95 cm, GRASSMANN ein 100 cm

langes Rohr (10 cm breit), WIELAND und PROBST eine ebenso lange, nur 1 cm breite Kolonne. In den Versuchen von KARRER und STRONG war die Füllmasse 80 cm hoch. Es ist klar, daß der Steigerung des Maßstabes hier eine Grenze gesetzt ist, besonders im Hinblick auf die Widerstände beim Durchtreiben der Lösung sowie beim Auspressen des Adsorptionsmittels.

In unseren eingeschliffenen Modellen besitzt der zylindrische Teil meist die folgenden Maße: 35×8 , 30×6 , $25 \times 4,5$, $23 \times 3,5$ und 20×2 cm.



Abb. 16. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und eingelegter Siebplatte.

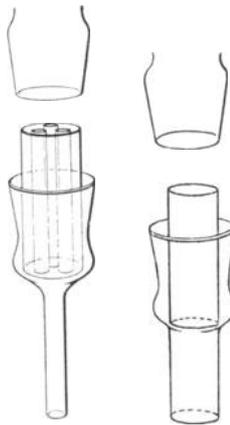


Abb. 18. Adsorptionsrohre mit Schliffansatz, ohne Siebplatte. (Das linksstehende Modell ist stärker verkleinert gezeichnet.)



Abb. 19. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und angeschmolzener Siebplatte.

Die Wahl der Rohrgröße soll nie schematisch getroffen werden. Öfters wären im Interesse eines ungestörten Versuchsaufbaues breite Kolonnen erwünscht, welche möglichst viel Füllmaterial und eine bedeutende Menge der adsorbierten Substanz fassen, ohne daß die Schichtenhöhe und damit der Widerstand allzu stark anwächst. Bis zu einem gewissen Grad läßt sich dies auch erreichen. Besonders dann, wenn ein einfacher zusammengesetztes Stoffgemisch vorliegt, oder wenn man für Nebenzonen kein Interesse hat, wird sich die Verwendung eines kurzen, breiteren Glasrohres empfehlen. Die letztere Form versagt jedoch, wenn das bearbeitete Ausgangsmaterial viele Komponenten ent-

hält, von denen einige nur in belanglosen Mengen zugegen sind. Dann ist man auf ein schlankes Rohr angewiesen, da sonst die einzelnen Farbringe viel zu dünn und voneinander kaum trennbar werden.

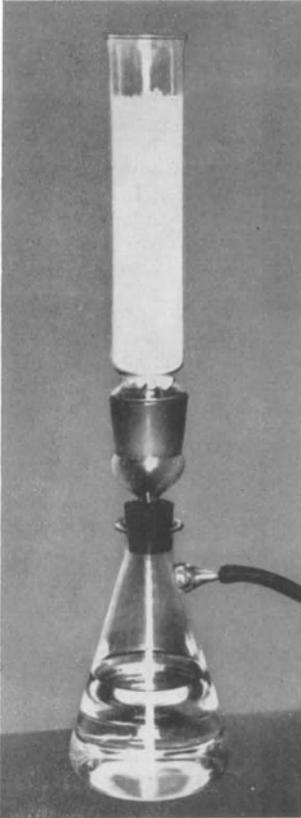


Abb. 17. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und eingelegerter Siebplatte (montiert).

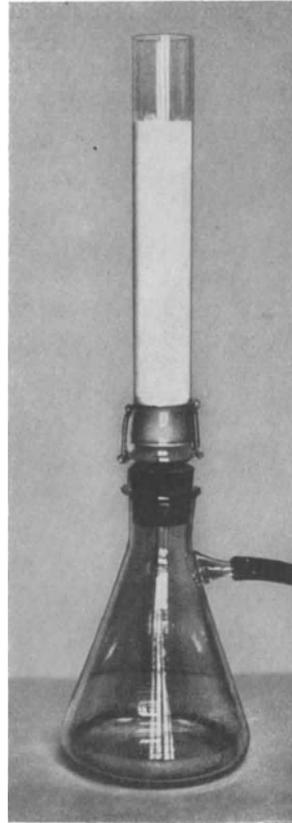


Abb. 20. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und angeschmolzener Siebplatte (montiert).

Nötigenfalls nehme man eine größere Anzahl von Kolonnen und vereinige die Eluate der jeweils entsprechenden, herausgeschnittenen Ringe. In einem Ausnahmefall haben wir den Stoffinhalt von 380 Chromatogrammen verarbeitet (ZECHMEISTER und CHOLNOKY 3).

Man kann auch eine erste Scheidung in einer geräumigen Apparatur vornehmen, worauf die weiter zu zerlegende Fraktion in einem engen Glasrohr zur endgültigen Analyse gelangt.

Bei der Anfertigung aller Adsorptionsrohre ist darauf zu achten, daß die zum Einfüllen dienende Mündung nicht enger, sondern eher eine Spur breiter sei als der Durchmesser des Glas-

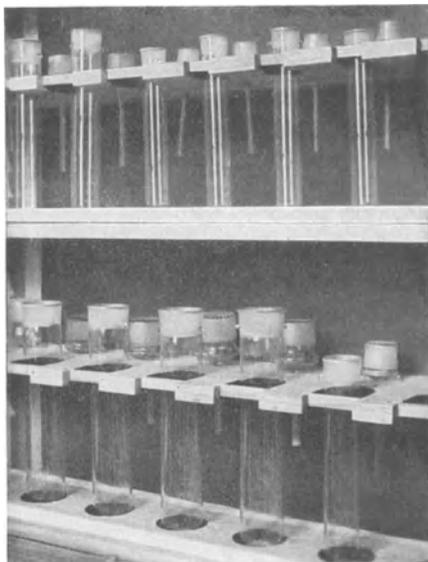


Abb. 21. Schrank zur Aufbewahrung der Adsorptionsrohre.

zylinders, da sonst die Säule beim Ausdrücken zerbröckeln kann. Gelegentlich wurden auch unten engere, also schwach konische Rohre empfohlen.

In besonderen Fällen läßt sich das Adsorptionsrohr mit einem Wassermantel umgeben, zwecks *Kühlung* oder *Erwärmung* der Säule (s. z. B. die Angabe von BOEKENOOGEN 1 über die Chromatographie von unverdünntem Palmfett, ferner von KUHN und STRÖBELE, S. 200). Eine derartige Einrichtung ist natürlich nur an einer dünnen Säule wirksam. RALSTON, HARWOOD und POOL benutzen eine elektrische

Heizvorrichtung und messen die Innentemperatur ihrer Silicagel-Säulen mit Hilfe eines Thermoelements (Abb. 23). CERECEDO und HENNESSY haben einen Metallturm (150 × 28 cm) samt Füllung durch Passieren von heißem Wasser auf 75° gebracht (S. 236).

Große Apparate. Über den gangbaren Maßstab der zur Chromatographie verwendeten Laboratoriumsgeräte geht eine von WINTERSTEIN und SCHÖN (3) empfohlene Vorrichtung hinaus, die mehrere Kilogramm Pulver faßt und eine dicke, feinporöse Porolith-Filterplatte (Filterwerk, Meißen) besitzt. Ein Chlorophyll-Chromatogramm (Zucker) wird in dieser Apparatur in 1½ Stunden fertig; noch rascher arbeitet man mit Aluminium-

oxyd. Ein 50 cm hoher Glaszylinder *G* (Abb. 24, S. 66) von 12,5 cm lichter Weite, welcher unten mit einem geschliffenen Flansch versehen ist, wird mittels der Schrauben *S* und des Ringes *R* auf die von einem Gummiring umgebene Porolith-Filterplatte *P* aufgepreßt, welche ein gleichmäßiges Saugen gewährt (S. 66). Die Platte sitzt in dem Metallgehäuse *M*, das mit einem Ablaufstutzen *A* versehen ist. Der letztere wird mittels einer Gummiplatte auf eine Säugflasche montiert. Der Apparat¹ (Fassungsraum: rund 6 kg Adsorbens) steht auf einem Dreifuß.

Für den Fall kleinerer Substanzmengen ist der zweite Apparat von WINTERSTEIN und SCHÖN (3) geeignet (Abb. 25). Das Rohr (25 × 7,5 cm) besitzt unten einen geschliffenen Flansch; mit welchem es auf der von einem Gummiring umgebenen Porolithplatte *P* (Durchmesser 9,5 cm) steht. Die letztere ruht auf einem, mit passendem Schliff versehenen Glasrichter. Die drei Teile des Apparates werden durch zwei Metallringe *R*, mittels der Schrauben *S* zusammengehalten.¹

Zum Einfüllen wird das Adsorbens z. B. mit Benzin angerührt und portionenweise festgesaugt; die mechanische Trennung der Chromatogrammschichten geschieht durch Abräumen mit einer kleinen Schaufel.

Die Verarbeitung großer Stoffmengen gelingt übrigens einfach in einem schlanken *Perkolator* (Höhe z. B. 85 cm, Breite oben 12, unten 7 cm), welcher unten mit Watte, mit einem Drahtnetz und Filtrierpapier abgeschlossen

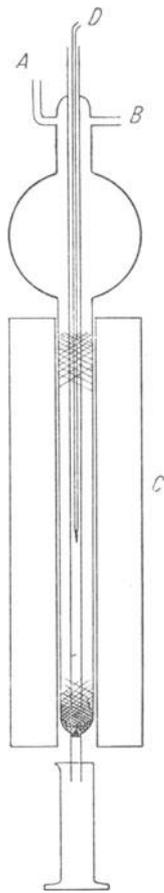


Abb. 22. Adsorptionsprobe-röhren (SCHÖPF und BECKER).

Abb. 23. Adsorptionssäule, elektrisch geheizt. A = Zufuhr der Lösung, B = Stickstoffstrom, 8 cm Druck, C = Helzmantel, D = Thermoelement (RALSTON, HARWOOD und POOL).

¹ Lieferfirma: L. Hormuth, Inh. W. Vetter, Heidelberg.

und durch eine Saugflasche mit 1—2 guten Wasserstrahlpumpen in Verbindung gesetzt wird. Wir verwenden breitere, etwas konisch gebaute Perkolatoren, namentlich zur ersten Anreicherung von Adsorbat aus großen Flüssigkeitsmengen; die mit Filtrierpapier bedeckte Säule ruht auf einer Porzellanplatte. Das Abräumen der (meist schön horizontal liegenden) Schichten geschieht mit dem Spatel. Ist der Perkolator oben nicht verengt, so kann man ihn

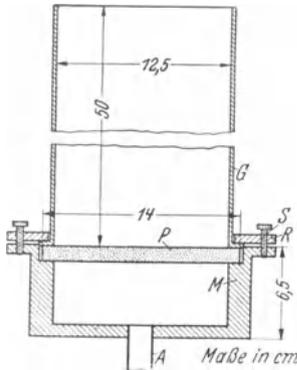


Abb. 24. Apparat nach WINTERSTEIN und SCHÖN (größeres Modell).

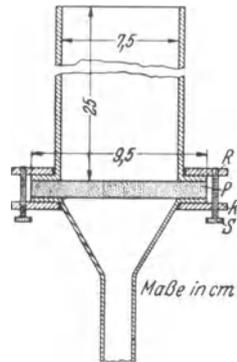


Abb. 25. Apparat nach WINTERSTEIN und SCHÖN (kleineres Modell).

umdrehen und die kuchenförmige Masse durch Schlagen der Öffnung mit dem Handteller zum Fall bringen.

Über Einrichtungen für den Fabriksbetrieb ist unseres Wissens bisher nichts bekannt geworden.

Apparate zur Mikro-chromatographie.

Um die zu verarbeitenden Substanzmengen stärker vermindern zu können (bis auf $\frac{1}{2}$ — 1γ), muß vor allem der Durchmesser des Rohres entsprechend klein gewählt werden. Bereits TSWETT (1) ging bis zu 2 mm herab. HESSE (1) gebraucht ein Mikro-rohr (Abb. 26, S. 67), die Maße seiner Kolonne betragen 30×2 mm. SCHWAB und JOCKERS (2) benutzen ähnliche, oben ausgeweitete Röhrchen (Innendurchmesser 4—7 mm).

Noch dünner als in der HESSESchen Apparatur ist die Adsorptionssäule von BECKER und SCHÖPF (Abb. 27, S. 67). An eine dickwandige Capillare (innen 1 mm weit, die unten zur Aufnahme eines Watterfröpfchens etwas erweitert ist, wird zum bequemen Ein-

füllen der Lösung ein Glasrohr angeschmolzen (lichte Weite 4—5 mm). Man stellt das Rohr, welches am unteren Ende eine geschliffene Fußplatte besitzt, in einem geraden Vorstoß auf eine Siebplatte und befestigt das Ganze an der Saugflasche. Nach dem Versuch wird eventuell auch das Rohr aufgeteilt.

Jüngst haben sich auch WILLSTAEDT und WITH (1) mit mikrochromatographischen Versuchen beschäftigt und die in der Abb. 28 wiedergegebene Einrichtung vorgeschlagen. Die Säulenfüllung kommt in ein Rohr von z. B. 5—10 mm Durchmesser und ruht auf einem Wattebausch, der von einem Glasstab gestützt wird. Der letztere steht auf dem Boden der Saugflasche und kann nach beendeter Adsorption zum Auspressen der Säule dienen. Zwecks Darstellung der Kolonne gibt man zunächst unter mäßigem Saugen eine 5 mm hohe Schicht von trockenem Aluminiumoxyd ein,

stellt dann die Pumpe ab und füllt das Rohr mit Benzin. Während die Flüssigkeit langsam durchläuft, läßt man durch einen trockenen Glasrichter Aluminiumoxyd in das Benzin sinken. Mittels einer Pipette wird Lösungsmittel nachgefüllt, so daß die Säule stets unter Flüssigkeit stehe. Schließlich wird die Füllmasse, namentlich im Falle eines größeren Rohres, mit zwei Filterpapierscheiben bedeckt. Bei engen Rohren, mit einem zwischen 1 und 5 mm liegenden Durchmesser, verwendet man zur Einführung des Adsorbens eine große Pasteurpipette. Die Anwendung des Glasstabes ist hier entbehrlich.



Abb. 26.
Mikro-
adsorptions-
rohr
(HESSE).



Abb. 27.
Mikro-
adsorptions-
rohr
(BECKER
und SCHÖPF).



Abb. 28 Einrichtung
zur Mikrochromato-
graphie (WILLSTAEDT
und WITH).

Beispiele für die mikro-chromatographische Arbeitsweise findet man auf S. 159, 171.

Das Hauptproblem der Mikro-chromatographie liegt nicht in der Zusammenstellung einer Apparatur, sondern in der einwandfreien Identifizierung der adsorbierten Substanz.

Gang des Versuches.

Einfüllen der Adsorptionsmasse.

Ein wichtiges Erfordernis für das Gelingen der Analyse ist ein *fest und homogen gefülltes Rohr*. Wird nämlich das Pulver ungleichmäßig verteilt, so entstehen Risse und Rinnen, durch welche die Lösung ihren Weg nehmen kann, ohne die zur richtigen Fraktionierung unerläßliche hohe Anzahl von elementaren Adsorptionen und Elutionen durchgemacht zu haben. Derartig grobe Fehler vermeidet man leicht. Etwas mehr Übung erfordert das Erreichen einer so weitgehenden Homogenität, daß die Einzelzonen des Chromatogramms nicht zu stark verbogen oder verzerrt seien. Unregelmäßigkeiten, wie in den Abb. 55 und 56 (S. 292), sind statthaft, während Abb. 57 (S. 293) ein schlecht gefülltes Rohr wiedergibt.



Abb. 29.
Schematische Folge verbogener Schichten.

Namentlich in mittlerem Versuchsmaßstab zeigen sich ideale Schichtungsverhältnisse nur selten. Es ist dies aber auch nicht notwendig, sondern es genügt, wenn durch die Lage der einzelnen, klar gezeichneten Bezirke das spätere Zerschneiden ermöglicht wird. Eine nicht selten beobachtete Erscheinung besteht darin, daß die Flüssigkeit entlang der zylindrischen Glasfläche allmählich vorseilt, verglichen mit der Strömungsgeschwindigkeit in der Mitte der festen Phase. So ergibt sich die in Abb. 29 wiedergegebene Lagerungsart: dünne, tiefliegende Scheiben können in einem breiten Adsorptionsrohr kappenförmige Gestalt annehmen.

Zur Entfernung größerer Verunreinigungen aus dem Pulver empfehlen wir, dasselbe durchzusieben, am besten unmittelbar vor der Beschickung des Rohres. Sodann versieht man den Apparat mit der nötigen Stütze für die Kolonne (Wattebausch,

Glaswolle, Porzellansieb, Glassinterplatte usw., S. 59) und schüttet das Adsorbens anteilsweise in das vertikal gestellte Rohr.

Das *Feststampfen* jeder einzelnen Portion (die erste soll größer sein als die übrigen) geschieht bei Rohrdurchmessern bis zu 1 cm mit einem abgeplatteten Glasstab. In größeren Apparaten, welche für präparative Zwecke meist verwendet werden, bedient man sich eines glattgedrehten, runden *Holzpistills*, dessen Endfläche $\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$ des Rohrqerschnittes ausmacht. Es ist praktisch, das Gerät aus Nußholz, für zweierlei Rohrgrößen anfertigen lassen zu (Abb. 30); eventuell dient das schmalere Ende zum Auspressen des Füllmittels nach beendetem Versuch. Wird der S. 63, Abb. 20 wiedergegebene Apparat benutzt, so darf das Endstück des Holzpistills nur ganz wenig kleiner sein als die Breite des Adsorptionsrohres. Die Endstücke sollen kreisrund, scharfkantig und durch einen ganz schwach konvex gearbeiteten Mittelteil mit dem Stab verbunden sein.

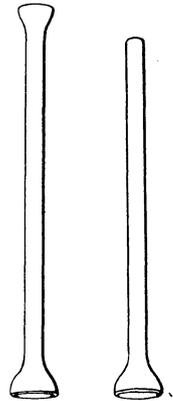


Abb. 30. Holzpistille.

Man stampft nicht allzu stark, mit kleinen, energischen Schlägen (Hubhöhe 3—6 cm). Beim Hochgehen des Pistills wird Vakuum erzeugt und bei gewissen Adsorptionsmitteln eine Wolke von feinem Pulver zurückgesaugt. Zwecks Verhinderung dieses Übelstandes hat vor längerer Zeit Rogowski eine Durchlöcherung des Holzes empfohlen, es genügt jedoch, wenn man beim Heben des Stampfers eine kleine drehende Bewegung macht. Die Gleichmäßigkeit der Füllung wird auch gefördert, wenn man das waagrecht stehende Rohr nach jedem Anhieb des Pistills mit der linken Hand etwas dreht.

Beispiel. Ein Glasrohr (30 × 5,5 cm) nahm bis zu einer Füllhöhe von 24 cm 550 g Calciumcarbonat auf, das in 21 Portionen eingestampft wurde: 50 g + 20 × 25 g. Man führte bei jedem Anteil 15—20 Schläge aus. Gesamtdauer des Einfüllens 10—15 Minuten.

Etwa $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{5}$ des Rohrinhaltes bleibt für die Lösung frei. Die Menge des Adsorptionsmittels wird, im Verhältnis zur aufzunehmenden Substanzmenge, im allgemeinen reichlich bemessen. Man weicht von diesem Grundsatz nur in Spezialfällen ab.

So hat STRAIN (1) zur partiellen Scheidung von α - und β -Carotin

nur so viel Magnesiumoxyd angewandt, daß die Menge desselben etwas geringer war, als zur Bindung des gesamten Farbstoffes erforderlich gewesen wäre. Das schwächer adsorbierbare α -Isomere häufte sich im Filtrat an.

Nachdem das Pulver bis zur gewünschten Höhe eingefüllt worden ist, setzt man das Rohr auf eine Saugflasche und läßt die Pumpe laufen, während man die Säule mit dem Holzpestill oben nochmals feststampft: die ganze kreisrunde Oberfläche wird, namentlich entlang der Glaswand, gleichmäßig mit gelinden Stößen bearbeitet (nicht drücken). Diese letzte Vorbereitung dauert 1 Minute und muß so lange (aber nicht länger!) fortgesetzt werden, bis beim Zurückziehen des Pestills keine Staubwolke mehr entsteht. So wird das Entstehen von Luftblasen bzw. Rissen beim nachfolgenden Aufgießen der Lösung vermieden. Erzeugt man jedoch eine allzu harte Oberfläche (namentlich auf CaCO_3 und ähnlichen Materialien), so kann die Füllung gleichfalls bersten; größere Stücke des Adsorbens schwimmen dann in der Flüssigkeit.

Namentlich beim Gebrauch von geräumigen Vorrichtungen ist das Einstampfen oft beschwerlich, obzwar wir auch große Perkolatoren nach dieser Methode füllen. WINTERSTEIN und STEIN (1) verfahren so, daß sie die mit der Saugpumpe verbundene, lotrecht gestellte Apparatur anteilsweise mit einer Benzin-*Suspension des Adsorptionsmittels* beschicken. Jedesmal wird schwach und schließlich stark gesaugt. Die Oberfläche muß ohne Unterbrechung mit Benzin bedeckt sein. Das Füllen des S. 65 erwähnten Perkolorators mit 3 kg Puderzucker war zu langwierig und erforderte 2 bis 3 Stunden. Das Stampfverfahren arbeitet rascher.

CASTLE, GILLAM, HEILBRON und THOMPSON geben an, daß die für die Aufteilung von Vitamin-A-Konzentraten geeignete Calciumhydroxyd-Säule folgend vorbereitet werden muß: Man schüttelt das Material stark mit einigen Raumteilen Benzin, läßt die Suspension $\frac{1}{2}$ Stunde stehen, wobei zur Entfernung von Luftbläschen gelegentlich mild geschwenkt wird. Man füllt das Glasrohr anteilsweise und führt die nächste Portion jeweilig erst ein, wenn die vorangehende sich vollkommen abgesetzt hatte. Die Vorbereitung der Kolonne erforderte hier einige Stunden! — HOLMES, CASSIDY, MANLY und HARTZLER entfernen Gasbläschen durch Klopfen, SCHWAB und JOCKERS (2) wärmen die wäßrige Al_2O_3 -Suspension auf 70—80° vor. Siehe auch bei EULER und SCHLENK (2) (S. 263).

Nach unserer Erfahrung erzielt man durch die Einfüllung

einer Suspension in manchen Fällen, wenn auch nicht immer, tatsächlich eine gleichmäßigere Schichtung von Farbstoffzonen, man muß aber, namentlich wenn ein Glasrohr Calciumcarbonat oder Kalk enthält, den Nachteil in Kauf nehmen, daß die Säule beim Auspressen durchlaufende Risse längs der Zylinderachse erhalten kann.

In geeigneten Fällen haben wir, falls das Einfüllen dringend war, dasselbe so ausgeführt, daß unter stetigem *Saugen* trockenes CaCO_3 oder Ca(OH)_2 portionsweise in das Rohr gebracht und rasch gestampft wurde. Man erzielt auf diesem Wege eine schön waagerechte Lagerung, bei der weiteren Verarbeitung darf jedoch die Füllmasse nicht ausgepreßt werden, da sie in mehrere, lange, von der Rohrmündung an nach auswärts gebogene Stücke zu zerfallen pflegt. Dem Abräumen des Rohrinhaltes mit dem Spatel oder der Bereitung eines „flüssigen“ Chromatogramms (S. 77) steht natürlich nichts im Wege.

Füllt man getrennte Schichten von *zwei* Adsorptionsmitteln in ein gemeinsames Rohr, so stampe man die untere Lage, wie gewöhnlich, fest, wickle dann das Holzpistill in ein reines Leinwandtuch und setze das Schlagen noch einige Zeit fort, während die Saugpumpe läuft. Sodann wird die Glaswand sehr sorgfältig von kleinen Staubteilen befreit und erst dann mit dem Einstampfen des zweiten Adsorptionsmittels begonnen. Versäumt man diese Vorsichtsmaßregel, so erleidet das Chromatogramm an der Berührungsfläche der beiden Säulen unter Umständen eine empfindliche Störung.

Einführen der Lösung.

Wenn das Rohr vorbereitet ist (s. oben), läßt man die Pumpe weiterlaufen und gießt den ersten Flüssigkeitsanteil ohne Verzug so auf, daß die gesamte Oberfläche möglichst gleichzeitig benetzt und bedeckt, jedoch nicht aufgewirbelt werde. Dies geschieht ohne besondere Vorrichtung, man kann aber auch einen Tropftrichter oder sonstige, selbsttätig wirkende Reguliermittel gebrauchen. Beispiele hierzu bringt S. 59 bis 61 wie auch für das Arbeiten bei Luftausschluß. Ein langhalsiger, mit dem Lösungsmittel gefüllter Kolben, dessen Hals in die Flüssigkeit eintaucht, leistet bei Dauerversuchen einen ähnlichen Dienst, noch bequemer ist die Vor-

richtung von KÖRNER, die ebenfalls über dem Adsorptionsrohr in einem Metallring hängt (Abb. 31).

Es ist sehr wichtig, daß die obere Grenzfläche des Pulverzylinders ständig mit Flüssigkeit bedeckt bleibe, von der Einführung des ersten Lösungsanteiles bis zum Abschluß des Entwickelns. Achtet man hierauf nicht, so wird unter Umständen die rasch austrocknende Säule schrumpfen. Gießt man dann wieder Flüssigkeit auf, so sickert dieselbe nicht mehr gleichmäßig durch den gesamten Querschnitt, sondern es eilt ein Teil davon voraus, entlang der Glaswand. Deshalb darf die flüssige Phase aus dem ungefüllten Rohrteil erst verschwinden, wenn bereits das Auspressen vorgenommen werden soll.

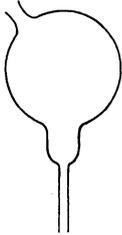


Abb. 31. Selbsttätige Einfüllvorrichtung nach KÖRNER.

Kommt eine soeben eingestampfte, noch trockene Adsorptionssäule plötzlich mit einer Flüssigkeit in Berührung, so ergeben sich bei manchen Materialien zwei Übelstände: 1. werden von der oberen Grenzfläche feine Teilchen aufgewirbelt und 2. können kleine Risse entstehen, wodurch das feste Gefüge gestört wird.

Man schützt die Säule durch Auflegen eines runden Filtrierpapierstückes; eventuell wird dieses kurz vor dem Versuch mit dem Lösungsmittel befeuchtet. TSWETT legte einen, mit dem reinen Solvent durchtränkten Wattebausch auf die Rohrfüllung, welcher einige Zeit dort belassen und erst unmittelbar vor dem Aufgießen der Lösung entfernt wurde. Man erzielt so ein allmähliches Durchdringen der empfindlichen Oberfläche mit den Dämpfen eines organischen Solventen. Manchmal ist es sogar vorteilhaft, zunächst die gesamte Säule mit dem Lösungsmittel unter Saugen anzufeuchten. In zahlreichen anderen Fällen sind alle die erwähnten Maßregeln entbehrlich, besonders wenn ein engeres Rohr in Gebrauch steht.

Bei der Chromatographie von Acetylcellulose erwies sich ein Anfeuchten der Säule als ungünstig; S. 190.

Schließlich sei vermerkt, daß die von TSWETT ursprünglich angewandte Arbeitsweise, die statt dem Saugen Überdruck verwendet, neuerdings in verbesserter Form von einigen Autoren empfohlen wird. Diesbezügliche Angaben findet man bei SANNIÉ

(Abb. 32) sowie bei POTTS und KOCH. MARK und SAITO arbeiten mit Preßluft (Näheres S. 190, bei Acetylcellulose, vgl. auch Abb. 23, S. 65).

Zur Benützung des Apparates von SANNIÉ (Abb. 32) verfährt man folgendermaßen: Nach dem Bereiten der Kolonne auf nassem Wege soll dieselbe mit etwas Lösungsmittel bedeckt sein. Man schließt R_2 sowie R_3 , öffnet R_1 und füllt die Lösung in A ein. Jetzt wird R_1 abgeschlossen, R_3 geöffnet und der Eintritt der Flüssigkeit von A in T derart geregelt, daß ungefähr so viel einfließt, als von dem unteren Ende der Kolonne abläuft. Ebenso läßt sich der Entwickler einführen. Der Druckanschluß erfolgt bei M , unter Zwischenschaltung einer Flasche, welche ein 80 cm langes, offenes, mit Quecksilber gefülltes Rohr trägt.

Entwickeln zum fertigen Chromatogramm.

Das „Entwickeln“ geschieht durch reichliches Aufgießen eines reinen Lösungsmittels, das entweder identisch mit dem angewandten Solvent oder davon verschieden sein kann. Man wählt die letztere Variante, wenn die Elutionskraft gesteigert werden soll, d. h. wenn das Lösungsmittel des eingeführten Substanzgemisches nicht oder nur mit großem Zeitverlust imstande ist, die Zonen auseinanderzuziehen. Man setze das Entwickeln so lange fort, bis ein optimales Säulenbild erreicht ist, bis also der Eindruck entsteht, daß alle oder diejenigen Schichten, für welche man Interesse hat, sauber herausgeschnitten werden können. Im Verlaufe auch der Entwicklung muß die obere Grenzfläche des Adsorptionsmittels stets mit Flüssigkeit bedeckt sein. Selbst ganz kurze Unterbrechungen sind schädlich.

Über den Gang des Entwickelns orientieren die Abb. 54—56 auf S. 292.

KUHN und WEYGAND haben ein rohes, für die Reinigung bestimmtes Flavin-Präparat in fester Form mit Aluminiumoxyd verrieben und das Gemisch auf eine vorbereitete Al_2O_3 -Säule gestampft. Lösen und Entwickeln verliefen hier während der gleichen Operation, nämlich beim Aufgießen von Holzgeist + Xylol.

Die Beschreibung eines entwickelten Säulenbildes geschieht zweckmäßig nach dem im Speziellen Teil gebrauchten Schema,

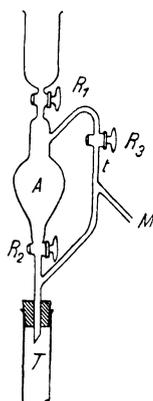


Abb. 32. Überdruckvorrichtung nach SANNIÉ.

wobei von den *links stehenden Zahlen die Zonendicke in Millimetern* angegeben wird (Beispiel: S. 119).

Beurteilung des Chromatogramms. Einfluß von Begleitern.

Für die *Beurteilung* des Chromatogramms gelten die folgenden Gesichtspunkte.

Das Aussehen desselben ist weitgehend unabhängig von *Begleitstoffen*, worauf eigentlich die vielseitige Anwendbarkeit der TSWERTSchen Methode beruht. Es gibt aber auch zahlreiche Fälle, in denen eine Änderung des normalen Säulenbildes beobachtet wird, wobei die Zonen sich anormal ausbreiten und verwaschen aussehen, ganz als wenn ein Elutionsmittel zugegen wäre. Tatsächlich setzen höhere Konzentrationen mancher Begleiter die Oberflächenaktivität der festen Phase gegenüber der gelösten Substanz stark herab. Die Adsorptionsisotherme verläuft dann ganz anders als diejenige der reinen Verbindung, und zwar so, daß beim Versuch *Elutionsvorgänge* zur Geltung kommen. Man beobachtet dies z. B. bei der Aufteilung von tierischem Lipochrom, wenn es in sehr viel Fett, Cholesterin usw. eingelagert ist. Seltener wird das Festhalten durch die Verunreinigung völlig verhindert, so daß Stoffe durch die Kolonne gehen, die eigentlich fixiert werden müßten (vgl. hierzu Abb. 63—64, S. 295.)

Das ein- bis viermalige Wiederholen des Adsorptionsversuches führt meist zum Ziel, da die absolute Menge des Begleitstoffes von Säule zu Säule rasch sinkt. Wenn unbedingt nötig, so führe man eine Vorreinigung des Rohauszuges nach irgendeinem anderen Verfahren aus, was namentlich dann erforderlich sein wird, wenn der Quotient gesuchte Substanz/gesamter Stoffinhalt sehr ungünstig liegt.

In manchen Fällen wird ein stark verunreinigtes Stoffgemisch erst nach gewissen Vorbereitungen für die Chromatographie reif.

Besonders reine Präparate zeigen meist größere Adsorptionskraft, ja es kam vor, daß die Elution gerade durch den hohen Reinheitsgrad erschwert oder vereitelt wurde.

Die Vielfältigkeit der möglichen Kombinationen bringt es jedoch mit sich, daß die soeben beschriebenen Verhältnisse auch *umgekehrt* werden können, so daß das Festhalten einer Substanz durch die Anwesenheit eines Begleitstoffes in der Säule begünstigt wird. Von dem Begleiter wird die Kolonne sozusagen *gebeizt*

und das „Aufziehen“ gefördert. Als Adsorbens ist dann nicht die in das Rohr eingefüllte Masse zu betrachten, sondern das System Füllmasse + Begleiter. Das Fixieren einer dritten Substanz wurde von SCHÖPF und BECKER als „Sekundär-adsorption“ bezeichnet (vgl. auch KOSCHARA 4, 5).

SCHÖPF und BECKER haben gezeigt, daß das Erythropterin (S. 169) aus seiner Rohlösung in wäßrigem Pyridin sehr fest an Aluminiumoxyd adsorbiert wird, während dies mit dem reinen Farbstoff mißlingt. Die Menge des wirksamen, kaum gefärbten Begleiters kann nur gering sein, denn sie reicht zur Festhaltung des Gesamtfarbstoffes nicht aus; ein Teil davon läuft durch die Kolonne und könnte eine gar nicht vorhandene Heterogenität vortäuschen. Der hängengebliebene Pigmentanteil wird von Pyridinwasser langsam eluiert und beim nochmaligen Filtrieren durch eine neue Al_2O_3 -Säule nicht mehr adsorbiert. Der Begleiter verbleibt in demselben Bezirk der ersten Säule, wo früher das Erythropterin festgehalten war, und verrät sich durch eine schwach bräunliche Verfärbung oder durch die violettblaue Fluoreszenz unter der Quarzlampe.

Das noch ausstehende Studium von künstlich hervorgerufenen Sekundär-adsorptionen verspricht interessante Ergebnisse.

Schließlich sei vermerkt, daß das Adsorptionsverhalten in wäßriger Lösung auch von *Salzen* beeinflußt werden kann, so daß verschiedene Salzkonzentrationen zu abgestuften Möglichkeiten der Fixierung bzw. der Elution führen (vgl. z. B. KOSCHARA 4, RUGGLI und JENSEN 1 sowie S. 188).

Auspressen und Zerschneiden der Säule. Elution.

Damit das *Auspressen* des Adsorptionsmittels leicht und ohne Zerbröckelung gelinge, darf die Säulenfüllung weder zu feucht noch zu trocken sein. Nachdem das Entwickeln abgeschlossen wurde, läßt man die Pumpe zunächst weiterlaufen, bis die oben stehende Flüssigkeitsschicht verschwunden ist. Dann wird das Saugen noch kurz fortgesetzt (bei sehr luftempfindlichen Stoffen unter Einleiten von Stickstoff). Oft kommt man zum richtigen Feuchtigkeitsgrad, wenn man, nachdem die letzten Anteile des Lösungsmittels eingesickert sind, die Rohrmündung mit dem flachen Handteller $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$ Minute verschlossen hält, während die Pumpe noch läuft.

Das Auspressen geschieht am besten mit Hilfe des auf S. 69 abgebildeten *Holzpistills*, in waagerechter Stellung des Glasrohres, das unmittelbar über Schreib- oder Glanzpapier gehalten wird. Der sitzende Experimentator stemmt das eine Ende des Pistills gegen seinen Körper; ein größeres Rohr wird mit beiden Händen festgehalten. Ist das Ausdrücken erschwert oder unausführbar, so räumt man das Füllmaterial mit einem Spatel oder Löffel ab, was im großen Versuchsmaßstab meist erforderlich ist (S. 64). Zur Auflockerung kleinerer Rohrfüllungen genügt es, wenn man das vom Apparat abgenommene Rohr umdreht und, mit der Mündung nach unten, mehrere Male sanft aus 1—2 cm Höhe auf die mit einem Tuch bedeckte Tischplatte fallen läßt. Die Säule wandert langsam der Öffnung zu und wird nun leicht ausgepreßt. Man kann übrigens einzelne Säulenbezirke mit Hilfe von runden Leinwandstückchen von vornherein abgrenzen, worauf nur der gewünschte Säulenteil ausgedrückt wird.

Zum *Zerschneiden* dient ein Skalpell. Die Aufteilung wird vorsichtig durchgeführt, also die Säule nicht etwa schematisch, rechtwinklig zur Längsachse zerteilt. Zunächst entfernt man Stücke von unbelasteten Kolonnenteilen, nimmt dann einzelne größere Bezirke in die linke Hand und schabt mit der rechten, in einem spitzen Winkel zur Achse, die weißen Lagen sowie etwaige geringfügige Nebenzonen vorsichtig ab. Dies ist erforderlich, damit auch verbogene oder verzerrte Schichten sauber herausgeholt werden können. In komplizierten Fällen leistet man eine Art Bildhauerarbeit.

Die einzelnen, homogenen Säulenteile werden mit dem Skalpell grob zerbröckelt, sofort in das bereit stehende *Eluens* geworfen und umgeschwenkt. Das Herauslösen erfolgt meist mit großer Geschwindigkeit. Es muß nur ausnahmsweise erwärmt werden. Die Suspension wird filtriert, vorteilhaft auf Glassinternutschen, und der Kuchen nachgewaschen.

Die *Kontrolle* der Homogenität erfolgt am besten wieder chromatographisch.

Für die weitere Untersuchung können keine allgemein geltenden Regeln gegeben werden, da ja alle physikalischen, chemischen und physiologischen Methoden zur Verfügung stehen, der Eigenart des betreffenden Körpers gemäß. Ähnliches gilt für die Isolierung.

RUGGLI und JENSEN (1) haben bei der Chromatographie von

gewissen wasserlöslichen Teerfarbstoffen ein originelles Verfahren angewandt. Jedes Teil-eluat wurde unmittelbar auf merzerisierte Baumwolle *aufgefärbt*, von dort mit kochendem Wasser wieder abgezogen und erst dann als Pulver isoliert. Zur Selektivität der Adsorptionssäule gesellte sich hier das auswählende Festhalten von Pigment durch die Faser (S. 187).

Flüssiges Chromatogramm.

Außer dem vorangehend beschriebenen Gang des Adsorptionsversuches wird recht häufig noch eine andere Arbeitsweise befolgt, welche bereits S. 53 erwähnt wurde und dadurch gekennzeichnet ist, daß die Säule weder aus dem Glasrohr gepreßt, noch zerschnitten wird. Vielmehr trachtet man, den gesamten adsorbierten Stoffinhalt, oder Teile davon, durch die Kolonne zu treiben und *fängt die einzelnen Filtratfraktionen durch Wechseln der Vorlage gesondert auf*. Die Reihe der Filtrate bildet ein „flüssiges Chromatogramm“. So ergibt sich ein gleichfalls bequemer Arbeitsgang.

Je nach der Adsorptionskraft kommt das obige Prinzip in verschiedenen Ausführungsformen zur Geltung. Beispielsweise erzeugt man zunächst ein normales Chromatogramm, welches dann so energisch entwickelt wird, daß die Komponenten nacheinander in das Filtrat wandern. Man erzielt dies entweder mit Hilfe einer einzigen Elutionsflüssigkeit oder werden immer stärker wirkende Eluente nacheinander aufgegossen; jedes entfernt gewisse Stoffarten aus der Säule. Hätte man für jede Schicht ein streng auswählend wirkendes Elutionsmittel zur Verfügung, so wären ideale Voraussetzungen für die beschriebene Art des Versuches gegeben.

Im Falle einer stark verunreinigten Rohlösung muß man unter Umständen zwangsweise ein „flüssiges“ Chromatogramm bereiten, weil ein stabil verankertes Säulenbild überhaupt nicht zustande kommt. Man beobachtet dann, von dem Zeitpunkte des ersten Aufgusses bis zur Beendigung der Analyse, ein stetiges Durchlaufen von gelöster Substanz. Entwickelt wird überhaupt nicht, sondern man fängt die abwärtswandernden Teilfiltrate einzeln auf. Ähnliche Verhältnisse lassen sich planmäßig hervorrufen, falls ein für das Festhalten des Lösungsinhaltes zu schwach wirkendes Adsorptionsmittel gewählt wurde.

Freilich genügt die angegebene Ausführungsform zur Trennung von eng aneinander liegenden, dünnen Scheiben nicht, namentlich

wenn sie sehr ähnliche Stoffe enthalten; bereits geschiedene Komponenten vereinigen sich im Filtrat. Dies kann auch bei gut ausgebildeten Chromatogrammen geschehen und die bereits durchgeführte Aufteilung verderben, falls der Entwickler allzu stark eluierend wirkt. Dann werden nämlich die in den oberen Bezirken der Säule festgehaltenen Stoffanteile rasch herausgelöst, nach unten gespült und mit dort befindlichen anderen Fraktionen wieder vermengt, noch bevor die letzteren die Säule verlassen konnten. Geschieht dies im Falle farbloser Materialien, in dem man die Vorgänge nicht unmittelbar beobachten kann, so kann Untrennbarkeit vorgetäuscht werden, besonders wenn einzelne Schichten des Chromatogramms stark verbogen waren.

Trotz dieser Einschränkungen bildet das „flüssige“ Chromatogramm ein unentbehrliches Hilfsmittel zur Aufarbeitung vieler Stoffmenge. Die gewonnenen Filtratanteile lassen sich mitunter einer „normalen“ Chromatographie unterziehen.

Adsorption und Elution in wäßriger Lösung. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.

Es ist namentlich aus den klassischen Enzym-Forschungen von WILLSTÄTTER und seiner Schule bekannt, daß die Adsorption von organischem Material an eine anorganisch zusammengesetzte feste Phase, aus wäßriger Lösung, von der *Wasserstoffionenkonzentration* beeinflußt und geleitet wird. Verhältnismäßig kleine Verschiebungen im p_H können gewaltige Effekte hervorrufen und führen beispielsweise zur Zerlegung des Adsorbats. Ähnliche Vorgänge kommen an der Oberfläche eines jeden Körnchens zur Geltung und sind von der äußeren Form der adsorbierenden Gesamtmasse weitgehend unabhängig. Sie spielen demnach auch in die TSWETTSCHE Versuchstechnik hinein.

Dies bedeutet, daß man in geeigneten Fällen unter Anwendung von *Puffer*-Gemischen arbeiten wird.

Es ist das Verdienst von KOSCHARA (4, 5), die einschlägigen Verhältnisse für bestimmte Fälle systematisch untersucht und dargelegt zu haben. Aus seinen, namentlich an *Bleicherden* (S. 50) gesammelten Erfahrungen sei hier folgendes mitgeteilt.

Man kann in wäßriger Lösung, unter Verwendung von Bleicherde in einem breiten Reaktionsbereich arbeiten, nämlich be-

ginnend von 5 n-Mineralsäure, bis zu $p_H = 11$. Ein stärkeres Alkali fällt Hydroxyde aus, welche das Filter verstopfen. Die Elution geschieht meist in der intakten Säule, einfach durch Senken oder Erhöhen der Wasserstoffionenkonzentration. So wurde z. B. bei $p_H = 7,6$ adsorbiert, bei 8,3 nachgewaschen und bei 9,2 entwickelt. Es kam vor, daß die Reihenfolge zweier Zonen bereits durch eine Verschiebung des p_H um 0,3 Einheiten vertauscht wurde. Oft bieten diese Verhältnisse gute Vorbedingungen für die Erzeugung eines „flüssigen“ Chromatogramms (S. 77).

Als *Puffer* haben sich Phosphat- und Boratlösungen nach SÖRENSEN bewährt; die Verwendung von Ammonchlorid + Ammoniakpuffer ist ungünstiger. Wäßrige Alkaliacetate sind auf Bleicherden zu vermeiden. Gebraucht man Aluminiumhydroxyd, so wird die Pufferlösung zweckmäßig mit Holzgeist verdünnt.

Falls die Alkalinität des Puffers zur *Elution* nicht ausreicht, verwende man eine 2prozentige oder stärkere wäßrige Pyridinlösung, eventuell eine noch wirkungsvollere Mischung von Pyridin und Säuren. Die Eluierbarkeit hängt natürlich nicht nur vom Milieu, sondern auch von der chemischen Zusammensetzung des Adsorptionsmittels ab, z. B. erforderte ein Farbstoff zur Elution aus Bleicherde XXF $p_H = 8,3$, während er von einer Frankonit-KL-Säule erst bei 9,2 abgelöst werden konnte.

Man versuche die Anwendung von *Bleicherde* zuerst in neutraler oder saurer Lösung. Eine „neutrale Adsorption“ läßt sich indessen nur erreichen, wenn auch das Adsorbens wirklich neutral reagiert, wenn es also fabrikatorisch nicht mit Säure vorbehandelt wurde (vgl. S. 50). Die Kombination neutrale Erde + saure Lösung ist in der Adsorptionssäule ungünstig, da durch das Entweichen von Kohlendioxyd Risse entstehen können. Auf *Frankonit* sind auch saure Lösungen verwendbar, obzwar es meist genügt, wenn eine neutrale Flüssigkeit zu dieser sauren Erde gelangt.

Die Frankonit-KL-Säule sowie das Adsorbat müssen ausgiebig *mit dem Aufnahmepuffer gewaschen* werden, denn nur dann ist die Kolonne für eine glatt verlaufende Entwicklung richtig vorbereitet. Durch ein solches Waschen wird allerdings der Farbstoff meist gar nicht abwärtsgetrieben und nicht eluiert, die Säule verändert sich jedoch derart, daß lokale, „sauer adsorbierende“ Stellen verschwinden. Hat man dagegen die Säule ungenügend mit dem Aufnahmepuffer durchspült, so löst zwar das

nachfolgend angewandte Eluens den Farbstoff ab und treibt ihn in tiefer liegende Bezirke, doch stockt die wandernde Schicht plötzlich und bezeichnet damit jene Stelle, bis zu welcher das vorbereitende Waschen wirksam war und unterhalb der noch „saure“ Adsorption besteht.

Als Apparat dienen zylindrische Nutschen, mit der Wasserwaage ausgerichtet. Man saugt erst ganz schwach (30—50 cm Wasserdruck) und läßt die Pumpe erst später kräftig laufen.

Einschlägige Arbeitsvorschriften. Isolierung von Lyochromen (S. 168) sowie von Uropterin (S. 174) aus Harn. — Chromatographie in wäßriger Lösung, *ohne* Anwendung von Puffern: Anthocyane, S. 176.

Besondere Methoden zur Chromatographie farbloser Substanzen.

Die auf Grund der Verschiedenheit von Adsorptionsaffinitäten sich abspielende Stoffzerlegung steht mit der *Farbe* in keinem zwangsweisen Zusammenhang. Vielmehr ist die fraktionierte Adsorption von Pigmenten der für den Experimentator bequemste Spezialfall einer allgemeineren Erscheinung, in welchem der Versuchsablauf mit dem Auge verfolgt werden kann. In zahllosen anderen Fällen erfolgt gleichfalls eine Schichtung, ohne daß dies auffallend zutage treten würde. Schon TSWETT (1) spricht treffend von einem *unsichtbaren Chromatogramm*.

Vor kurzem empfahl KOSCHARA (4), die historische Bezeichnung „Chromatographie“ bei farblosen Materialien fallen zu lassen, zugunsten von „Adsorptionsanalyse“. Wir schließen uns diesem Vorschlag nicht an, da das Wesentlichste der TSWETTschen Idee, nämlich das Durchströmen des Adsorbens in *einer* Richtung, auch bei Versuchen mit weißen Substanzen in Geltung bleibt.

Derzeit sind die nachfolgend aufgezählten Methoden zur Chromatographie von farblosem bzw. schwachgefärbtem Material in Gebrauch.

1. Das empirische Verfahren.
2. Markierung einer farblosen Zone mit einem Indicator.
3. Chromatographie nach chemischer Umwandlung des farblosen Gemisches in gefärbte Stoffe.
4. Sichtbarmachung des Chromatogramms in ultraviolettem Licht.
5. Sichtbarmachung des Chromatogramms mittels Farbreaktionen.

Man ist meist bestrebt, ein unmittelbares Beobachten zu ermöglichen, also irgendwie Farbe oder Leuchterscheinungen hervorzurufen. Gelingt dies, so werden jene Aufteilungsverfahren brauchbar, welche sich auf dem Gebiet der Pigmente bewährt haben.

1. Das empirische Verfahren

besteht einfach darin, daß man die Säule, obzwar kein sichtbarer Wegweiser vorhanden ist, in mehrere Bezirke zerschneidet und die Eluate einzeln untersucht. Nachdem so die Verteilung geklärt wurde, wird man bei ähnlichen, mit demselben Material ausgeführten Versuchen planmäßig vorgehen können. Dasselbe gilt natürlich auch für Filtrate, die sich anteilsweise auffangen und prüfen lassen. Ein flüssiges Chromatogramm wurde in vielen Fällen in empirischer Weise bereitet.

2. Markierung einer farblosen Zone mit einem Indicator.

Bereits TSWETT (1) empfahl, der aufzuteilenden farblosen Lösung *ein Pigment beizumischen*, dessen Platz in der Säule, relativ zu einem weißen Inhaltsstoff, genau bekannt ist. Durch den Farbstoff wäre dann auch die Lage einer unsichtbaren Zone markiert, ebenso ihr Abwärtswandern während der Entwicklung zum fertigen Chromatogramm. Das Verfahren ist wirklich ausführbar, eine allgemeine Methode bietet sie aber nicht (vgl. auch WINTERSTEIN und STEIN 1). Jedenfalls muß das Adsorptionsverhalten genau studiert und die Vorschrift sorgfältig festgelegt werden.

In einer neuen Untersuchung von BROCKMANN (3) bzw. von BROCKMANN und BUSSE findet man schöne Beispiele für diese Arbeitstechnik. Zwecks Isolierung des Vitamins D₃ aus Fischleberölen (Einzelheiten S. 244) wurden zahlreiche Farbstoffe auf ihre Eignung als Säulenindicator geprüft, und zwar durch Vergleich mit Vitamin D₂ in bezug auf die Adsorptionsisotherme sowie auf das chromatographische Verhalten. Hierbei fand auch der Einfluß von physiologisch unwirksamen Begleitern, welche in Leberölen vorzukommen pflegen, die gebührende Berücksichtigung. Am besten hat sich das „Indicatorrot 33“ bewährt, die roten Zonen des Chromatogramms waren nämlich die vitaminreichsten. Erst wenn der Farbstoff in einer schmalen Schicht sich an-

gesammelt hatte, schließt man das Entwickeln ab und zerschneidet die Säule.

In günstigen Ausnahmefällen wird der Indicator von der Natur selbst dargeboten; so befindet sich im Giftsekret der Kröte ein Pigment, das genau im selben Säulenbezirk adsorbiert wird, wie das farblose Hauptgift Bufotalin (WIELAND, HESSE und HÜTTEL; s. S. 218, vgl. auch TSCHESCHE und OFFE, S. 220, ferner DUSCHINSKY und LEDERER, S. 254).

3. Chromatographie nach chemischer Umwandlung des farblosen Gemisches in gefärbte Stoffe.

Das Prinzip dieses Kunstgriffes besteht darin, den Substanzen, vor Ausführung der Adsorptionsanalyse, ein später leicht abspaltbares Chromophor anzuhängen, wodurch die gestellte Aufgabe auf die Zerlegung von Farbstoffen zurückgeführt wird. Diese Arbeitsweise stammt von STRAIN (4) und diente zunächst zur Trennung von gewissen Carbonylverbindungen. Man kondensiert dieselben mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazin und nimmt die Aufteilung des Hydrazongemisches auf Talcum, Fasertonerde, Aluminiumoxyd, Aluminiumphosphat, tert. Magnesiumphosphat oder Fullererde vor. (Magnesiumoxyd oder andere basische Adsorptionsmittel wirken zersetzend.) Das nützliche Verfahren erfordert einen verhältnismäßig bedeutenden Zeitaufwand.

Beispiele. a) Eine Petrolätherlösung der Dinitro-phenylhydrazone von β -Jonon und Campher wird auf Talcum verarbeitet: oben bleibt das Jonon-, darunter das Campherderivat hängen.

b) Trennung von Geronsäure- und Lävulinsäure-dinitrophenylhydrazon, in Benzin, auf Talcum. Oben: das Hydrazon der Lävulinsäure $\text{CH}_3 \cdot \text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$, darunter dasjenige der Geronsäure $\text{HOOC} \cdot \text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$.

Die mit Sprit eluierten Dinitro-phenylhydrazone lassen sich in wäßriger, wäßrig-saurer oder in Eisessiglösung mittels einer Dicarbonylverbindung wieder spalten, z. B. mit Glyoxal, Methylglyoxal oder Diacetyl.

c) Das Verfahren wurde auch auf Pikrate von Tetraalkylammoniumhydroxyden ausgedehnt.

Ein prinzipiell ähnlicher Weg wird von LEDERER bei der Trennung von Phenolen befolgt (Privatmitteilung): Man versetzt die wäßrige Lösung mit Ferrichlorid und chromatographiert die tiefgefärbte Flüssigkeit auf Al_2O_3 . Phenol, Resorcin, Brenzcatechin und Phloroglucin lassen sich gut unterscheiden.

4. Sichtbarmachung des Chromatogramms in ultraviolettem Licht.

Dieses besonders fruchtbare und entwicklungsfähige Verfahren gründet sich darauf, daß zahlreiche farblose Substanzen im Licht der Quarzlampe lebhaft fluorescieren. Die Erscheinung wurde gleichzeitig von WINTERSTEIN und SCHÖN (1) bzw. von KARRER und SCHÖPP (2) auf dem Gebiet der TSWETTschen Arbeitstechnik nutzbar gemacht. Die letztgenannten Forscher führten die Bezeichnung „Ultra-chromatographie“ ein, GRASSMANN und LANG sprechen von einem „Fluoreszenz-chromatogramm“.

Durch diese Arbeitsweise wird es nicht nur ermöglicht, den Platz fluoreszierender Substanzen in der Säule zu lokalisieren und dieselben von Stoffen zu trennen, welche mittels einer Ultraviolettbestrahlung nicht anregbar sind, sondern man beobachtet im günstigen Falle verschiedenfarbiges und ungleich starkes Leuchten der einzelnen Bezirke (Blaufluoreszenz ist meist untypisch).

Es ist von Vorteil, daß man die Schichtung auch auf Adsorbentien wahrnimmt, die dunkel sind oder in befeuchtetem Zustand als dunkel erscheinen. Die richtige Aufteilung der Säule verläuft auch in derartigen Fällen klaglos. Eine schöne Erscheinung ist ferner der Übergang von leuchtenden Stoffen in das Filtrat. Die Voraussetzungen für die Erzeugung eines flüssigen Chromatogramms sind dann erfüllt.

Die theoretisch günstigsten Versuchsbedingungen sind bei der Verwendung eines Quarzrohres gegeben, z. B. in der einfachen Anordnung der Abb. 33 (R = Rohr, 16 cm lang; W = Watte; K = Kork; nach GRASSMANN). KARRER und SCHÖPP (2) empfehlen für den Kleinversuch ein viereckiges Rohr mit planparallelen Wänden. Der Gebrauch des immerhin kostspieligen Quarzes, aus welchem geschliffene Apparaturen nur umständlich herzustellen sind, ist aber nach unseren Erfahrungen gar nicht erforderlich, wenn die Fluoreszenz einigermaßen stark ist, sondern man

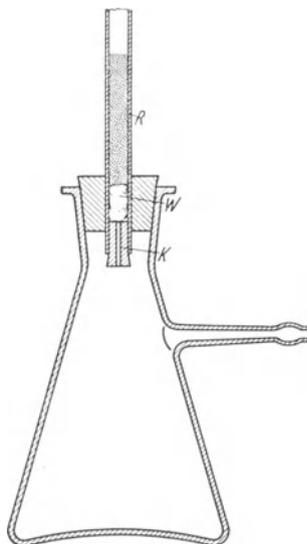


Abb. 33. Adsorptionsrohr aus Quarz (montiert).

kommt fast immer mit Glas aus, am besten mit weichem Geräteglas (Schott u. Gen., Jena). Übrigens kann man die Säule erst nach dem Auspressen in das Uviollicht bringen, wodurch die apparative Schwierigkeit umgangen wird.

Als *Lichtquelle* für die im Dunkelzimmer vorzunehmende Bestrahlung eignet sich jede gute Lampe („Analysen-Quarzlampe“). In unserem Laboratorium hat sich die neue, *tragbare* Konstruktion der Quarzlampen-Ges. m. b. H. (Hanau) sehr gut bewährt



Abb. 34. Aufteilung des Chromatogrammes unter der tragbaren Quarzlampe (im Dunkelzimmer auszuführen).

(Abb. 34). Die Gefäßhülle besteht aus Dunkel-uviolglas, von welchem nur das um $366\ \mu\mu$ liegende Spektralgebiet durchgelassen wird. So entfällt der Gebrauch eines besonderen Lichtfilters. Der Innenraum der geräumigen Halbkugel (Durchmesser 36 cm) kann voll ausgenutzt werden. Man drückt die Säule auf schwarzes Papier aus und zerschneidet sie unter der Glocke, während der Experimentator durch eines der Gucklöcher blickt (Schutzbrille unnötig).

Sogar verbogene Chromatogramme lassen sich mit Hilfe des Skalpells gut verarbeiten. Öfters sehen die „leeren“ Säulenteile dunkelbraun oder schwarz aus, so, daß die festgehaltene Substanz sich leuchtend abhebt. Allerdings kann auch eine leere Kolonne fluorescieren, je nach ihrer chemischen Beschaffenheit.

Es sei betont, daß die Leuchtfarbe nicht für die adsorbierte Substanz an sich, sondern meist nur *für das Adsorbat charakteristisch* ist. Dieselbe Verbindung kann daher je nach der Art der Säule verschiedenartig fluoreszieren, besonders wenn die Möglichkeiten zur Bildung salzartiger Gebilde stark variiert werden. Auch die Art des *Lösungsmittels* kann von Bedeutung sein.

Ein gutes Beispiel hierzu bildet das von CARLSOHN und MÜLLER (1) untersuchte *Benzanthron*.

Benzanthron löst sich in Benzol mit goldgelber Farbe. Das Fluoreszenzlicht des Calciumcarbonat-, Aluminiumoxyd- oder Talcumadsorbates ist kanariengelb; auf natürlichen Bleicherden fluoresziert Benzanthron leuchtend grün bis schwach grün, auf künstlichen Bleicherden goldgelb bis rotorange. Infolge Salzbildung mit dem Tonsäurekomplex nähert sich die letztgenannte Fluoreszenzfarbe derjenigen, die in Schwefelsäure beobachtet wird. Künstlich aktivierte Tonsubstanz führt, je nach ihrem Gehalt an locker gebundenem Adsorptionwasser, zu einer rotorangen bis goldgelben Fluoreszenz.

Durch stark adsorbierbare Lösungsmittel, z. B. Alkohol, wird Benzanthron von der Oberfläche des Tones verdrängt, was sich durch Umschlag der gelben, grünen oder orangefarbenen Fluoreszenz in Blau kundgibt.

Manchmal beeinflußt die Anwesenheit einer Substanz das Leuchten einer anderen in überraschend hohem Maße. So wird die Fluoreszenz des Anthracens schon durch einen Zusatz von $\frac{1}{30000}$ % Naphtacen vollständig, durch einen solchen von $\frac{1}{100000}$ % fast ganz gelöscht (WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER).

Arbeitet man in *wäßrigen* oder wasserhaltigen Medien, so ist zu beachten, daß Stärke und Farbe der Leuchterscheinung weitgehend *vom herrschenden p_H abhängen* können. Das Verhalten des Fluoreszenzlichtes bei einer planmäßigen Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration kann für die betreffende Substanz typisch sein und dieselbe von sonst ähnlichen Begleitern unterscheiden. Ein schönes Beispiel bietet hierzu der von KOSCHARA (5) studierte Farbstoff Uropterin, dessen Verhalten in Tabelle 9, S. 174, wiedergegeben wird.

Man sieht, daß das Gebiet der Fluoreszenz-chromatographie noch sehr ausbaufähig ist. Namentlich wird man viele qualitative Proben in der Analyse und in der Warenkunde, bei welchen auch bisher die Uviolbestrahlung zugezogen wurde, mit Vorteil auf die TSWETTSCHE Säule umstellen.

Tabelle 9. Fluoreszenz des Uropterins unter der Quarzlampe, in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration.

Milieu	Farbe bei Tageslicht	Fluoreszenz in ultraviolettem Licht
Starke Mineralsäure	farblos	rot
normal-Mineralsäure	farblos	gelöscht
Essigsäure	gelb	gelöscht (mattgelb)
p _H =4	grünblau	gelbgrün (schwach)
p _H =7 bis 11	grünblau	himmelblau
Sodalösung	blaugrün	grün
Natronlauge	gelb	gelöscht (moosgrün)

Zusammenfassungen über die Fluoreszenzerscheinung in verschiedenen Körperklassen findet man z. B. bei DHÉREÉ sowie bei HATTINGER und bei DANCKWORTT.

Das Fluoreszenzlicht kann auch *spektroskopisch* gekennzeichnet werden, und zwar, wie ALMASY in der nachfolgend besprochenen

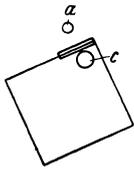


Abb. 35. Aufnahme eines Spektrochromatogramms (in Aufsicht); a = Adsorptionsrohr, b = Spalt des Spektrographen, c = Quecksilberdampf Lampe, e = Quarzlinse (ALMASY).

Arbeit gezeigt hat, selbst gleichzeitig für mehrere leuchtende Zonen (*Spektrochromatographie*). Das Verfahren wurde an 1, 2-benzopyren-haltigen Hochvakuumfraktionen von Teerdestillationsrückständen erprobt.

Die Hexanlösung der benzopyrenführenden Kondensate wird auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN, 15—20 × 0,8 cm) so weit mit Hexan entwickelt, daß noch keine fluoreszierenden Stoffe in das Filtrat gelangen. Im Lichte der Quecksilberbogenlampe (Schott-Filter UG 2) erscheinen dann verschiedene leuchtende Zonen. Das Rohr, 30 cm lang, aus vollständig klarem Quarz, wird gemäß der Abb. 35 in etwa 120 cm Abstand vom Spalt eines HILGERSchen Quarzspektrographen (Typ E 2) aufgestellt. Das Licht der dicht abgeschlossenen Lampe passiert ein Schwarzglasfilter (Schott UG 2) sowie eine 8 mm dicke Schicht 0,17proz. Salicylsäure. Die fluoreszierende Säule wird auf dem Spektrographenspalt abgebildet und darf nicht größer sein als die effektive Spalthöhe (2 cm). Bei 0,05 mm Spaltbreite erhält man in $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ stündiger Exposition eine Anzahl übereinander liegender Fluoreszenzspektren von wechselnder Höhe, welche den einzelnen Chromatogrammzonen entsprechen. Zur Feststellung des Benzopyrens wird als Vergleich das Fluoreszenzspektrum

der adsorbierten Verbindung herangezogen. (Trägt man am Adsorptionsrohr mit schwarzem Lack Ringmarken auf, so erscheinen im Spektrochromatogramm schmale, scharfbegrenzte Aussparungen. Aus den Abständen der Marken bzw. der Aussparungen läßt sich der Verkleinerungsmaßstab ermitteln und dieser bei der Zerteilung der Säule eventuell verwerten.)

5. Sichtbarmachung des Chromatogramms mittels Farbreaktionen.

Es gibt in der Literatur zahlreiche Angaben dafür, daß die für das Auge unsichtbare Schichtung des Materials mit Hilfe einer Farbreaktion festgestellt wird. Dies kann entweder nach dem mehr oder weniger empirisch vorgenommenen Zerschneiden des Adsorptionsmittels, also in den Teileluaten geschehen und fällt dann, streng genommen, außerhalb der chromatographischen Methodik, oder aber während des eigentlichen Versuches, am besten in der Säule selbst.

Für die erstere Arbeitsweise stammt ein frühes Beispiel von WINTERSTEIN und STEIN (1) und betrifft die Scheidung von Cholesterin und Ergosterin bzw. die Anreicherung des letzteren (S. 244). Das Cholesterin ging größtenteils in das Filtrat, die Säule wurde in vier Teile zerschnitten und mit Äther + Methanol eluiert. Die ROSENHEIM-TORTELLI-JAFFÉSche Farbreaktion fiel nur mit dem Stoffinhalt der obersten Schicht stark positiv aus.

KÖGL, HAAGEN-SMIT und ERXLEBEN haben ihr Hetero-auxin-Präparat aus Benzol auf Calciumcarbonat chromatographiert und mit Benzol + Alkohol entwickelt (S. 260). Ein Teil der Substanz passierte das Adsorbens und gab keine Reaktion mit Eisenchlorid-Salzsäure. Nun wurde die Säule in sechs Teile zerschnitten, jeder mit Sprit eluiert und der Trockenrückstand der Auszüge auf die genannte Farbreaktion untersucht, welche hauptsächlich mit dem 3. und 4. Anteil positiv verlief.

Die Anzahl derartiger Vorschriften ließe sich vermehren. Wir gehen indessen zu weiteren Verfahren über, bei welchen das Zerschneiden der Kolonne entweder erst *nach* Vornahme einer Farbreaktion ausgeführt wird oder ganz wegbleibt. Dann werden die Anteile eines flüssigen Chromatogramms mit Hilfe einer Farbreaktion geprüft, deren Ausfall für die Abgrenzung der einzelnen Fraktionen wegleitend sein kann.

RUGGLI und JENSEN (2) gelang die Scheidung von Naphtol-

sulfosäuren wie folgt: Das unsichtbare Chromatogramm (Aluminiumoxyd, wäßrige Lösung) wird mit Wasser entwickelt, bis die einzelnen Zonen nacheinander in das Filtrat gelangen. Man fängt sie in besonderen Vorlagen auf, die mit einer Diazolösung beschickt sind (diazotiertes Echtrot JTR-Base), und erhält z. B. mit Natriumsalzen der 1-Naphtol-4-sulfosäure einen roten, mit der 2-Naphtol-4-säure einen violetten Farbstoff. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die herausgepreßte Säule mit der Diazolösung übergossen, wobei ihre obere Hälfte violett, die untere sich rot anfärbte.

Die Aufgabe ist in zahlreichen Fällen auch nach der folgenden **Pinselmethode** lösbar, und zwar fast ohne Verlust an Substanz (ZECHMEISTER, CHOLNOKY und UJHELYI, Abb. 67, S. 297).

Nach Erzeugung des unsichtbaren Chromatogramms preßt man die Säule aus dem Rohr und zieht mit einem Pinsel, der in ein passend gewähltes Reagens getaucht worden ist, einen dünnen Strich auf dem Adsorbens, parallel zur ganzen Längsachse. Die Linie wird nur dort scharf hervortreten, wo sie die Schicht einer Substanz passiert, welche mit ihr zur Pigmentbildung befähigt ist. Im Falle farbiger Reagenzien, z. B. Permanganat, beobachtet man einen Umschlag der Nuance. Nachdem die Lage der betreffenden Schicht aufgefunden und bezeichnet worden ist, schabt man mit einem Messer die vom Reagens befeuchtete dünne Lage des Adsorbens ab und zerschneidet die Säule wie gewöhnlich.

Beispiele. a) Trennung von *Benzidin* und α -*Naphtylamin*. Je 30 mg Substanz wurden in 20 cm³ Benzol + 50 cm³ leichtem Benzin gelöst und auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) gegossen. Als Reagens dient eine wäßrige Lösung von Sulfanilsäure + Natriumnitrit, welche in einem oberen Säulenteil grüne Farbe hervorruft (*Benzidin*). Das *Naphtylamin* befindet sich tiefer und gibt einen roten Farbstoff. Wird statt dem Diazoreagens eine Lösung von Bleiperoxyd in 30proz. Essigsäure angewandt, so sieht man oben einen blauen, darunter einen grünen Abschnitt des Striches.

b) Die Trennung von α - und β -*Naphtol* (in Benzol + Benzin, auf Al₂O₃) gelingt leicht mit der Diazolösung. Man erhält eine leuchtend orange Färbung (β) und tieferliegend eine violette (α).

c) Auch Permanganat ist oft verwendbar und diente z. B. zur Lokalisierung von ω -*Nitrostyrol* (Benzin, Ca(OH)₂), in Gegenwart gesättigter Substanzen.

d) Die Lage mancher *Aldehyde* läßt sich mit Hilfe von Fuchsin-schwefligsäure ermitteln (Rotfärbung), z. B. diejenige von m-Nitrobenzaldehyd in Benzol + Benzin, auf Ca(OH)₂.

e) Löst man *Dimethylglyoxim* in viel warmem Benzol, so bleibt es in der Kalkkolonne oben haften und wird mit Hilfe von Nickelsulfat lokalisiert (Rotfärbung).

f) *Vitamin-A*-Präparate lassen sich in der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Säule mittels der CARR-PRICE-Reaktion verarbeiten (Pinseln mit SbCl_3 in Chloroform, Blaufärbung): Abb. 69, S. 297.

In besonderen Fällen entsteht durch das Bepinseln ein zwar farbloser, aber im Uviollicht fluoreszierender Streifen, der sich unter der Quarzlampe verrät. Diese Arbeitsmöglichkeit ist auch von POTTS und KOCH erkannt worden.

POTTS und KOCH verwenden keinen Pinsel, sondern sie schneiden eine Rinne in die Säule ein und lassen das Reagens aus einer Pipette in die Einkerbung laufen. Weiche Kolonnen halten diese Behandlung nicht aus.

Über die Sichtbarmachung *anorganischer* Adsorbate in der Aluminiumoxyd-Säule vgl. S. 280. Bemerkenswert ist dort die Verfärbung der Chlorsilberschicht durch Belichten der Säule, nach SCHWAB und DATTLER. Nach unseren Erfahrungen ist die Pinselmethode auch in der anorganischen Chromatographie verwendbar.

Spezieller Teil.

Drittes Kapitel.

Anwendungen auf natürliche Farbstoffe.

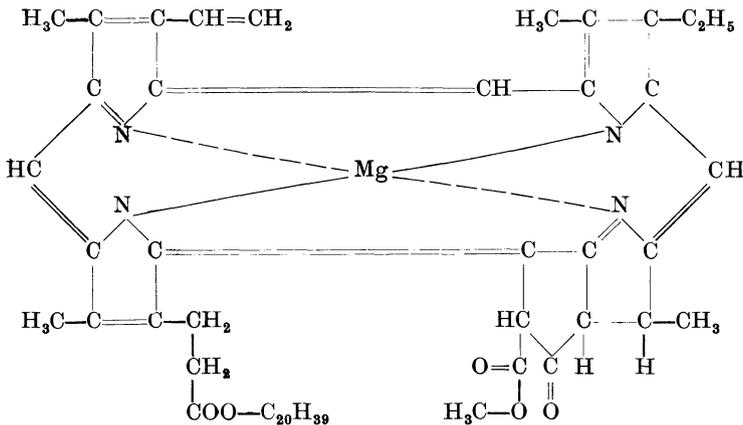
„Es ist eine natürliche Neigung unseres Geistes, allem Gefärbten besondere Aufmerksamkeit zu schenken.“ (Tswett)

1. Chlorophyll.

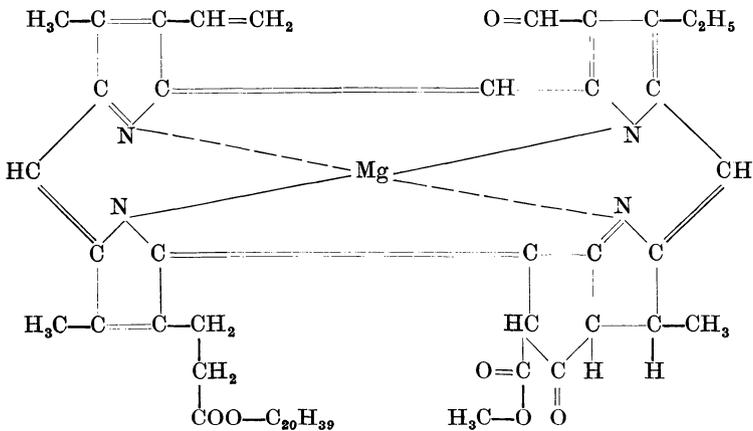
Die Verdienste von TSWETT bei der Anwendung der Adsorptionsanalyse auf das Blattgrün wurden S. 12 gewürdigt. Bereits 1911 schreibt WILLSTÄTTER (4) zusammenfassend über das Chlorophyll: „Trennung von α und β für die spektroskopische Untersuchung am besten nach TSWETT durch chromatographische Adsorptionsanalyse.“ WILLSTÄTTER und ISLER, denen die Isolierung der Chlorophylle a und b auf anderem Wege gelungen war, nehmen wie folgt zu den Arbeiten des russischen Forschers Stellung: „...seine Angaben über die Absorptionsspektren sind in allem Wesentlichen durch unsere Untersuchungen bestätigt worden. Die chromatographische Methode ist bisher nur in sehr kleinem Maßstabe angewandt worden und sie erscheint für präparative Arbeit ungeeignet. Inwieweit es TSWETT gelingt, bei der Bildung des Chromatogrammes und der Isolierung der Chlorophyllkomponenten aus demselben die Allomerisation des Chlorophylls zu verhüten, ist noch nicht bekannt; nicht die spektroskopische Untersuchung, nur die Prüfung der Phytochlorine und Phytorhodine gibt darüber Aufschluß.“

Wie es sich später zeigte, waren die Befürchtungen von WILLSTÄTTER und ISLER in bezug auf die Empfindlichkeit des adsorbierten Grüns gerechtfertigt. Die Chlorophylle erleiden, nach WINTERSTEIN und STEIN (2), in der Calciumcarbonat-, Aluminium-

umoxyd-, Fasertonerde-, Natriumsulfat-Säule usw. alsbald eine Veränderung, welche durch den Verlust der „Phasenprobe“ sich kundgibt. Wendet man jedoch den bereits von TSWETT gebrauchten Puderzucker an, der oben das Chlorophyll b (dunkelgrün), in einem tieferliegenden Bezirk das Chlorophyll a (blau) festhält, so ist die Stabilität des Farbstoffes selbst für präparative Bearbeitung hinreichend. Ähnliches gilt nach MACKINNEY (3) für Inulin, namentlich bei der Anwendung von Dichloräthan als Lösungsmittel.



Chlorophyll a (nach H. FISCHER und Mitarb.; s. auch Forschungen von A. STOLL).



Chlorophyll b (nach H. FISCHER und Mitarb.; s. auch Forschungen von A. STOLL).

Nach der Ansicht von WINTERSTEIN und STEIN (2) waren die Chlorophyll-b-Präparate von WILLSTÄTTER und STOLL noch a-haltig (15—20%), was bei chromatographisch bereiteten Endprodukten nicht der Fall ist. Nach STOLL und WIEDEMANN läßt sich indessen der höchste Reinheitsgrad auch ohne Chromatographie erreichen. Eine genaue Prüfung der alten Präparate und ihr Vergleich mit chromatographisch hergestellten Substanzen zeigt, daß die obige Angabe von WINTERSTEIN und STEIN (2) viel zu hoch liegt und daß die alten Präparate b von WILLSTÄTTER und STOLL nur eine belanglose Spur von a enthalten haben. (Das betreffende Band ist im Abbildungsmaterial von WILLSTÄTTER und STOLL absichtlich übertrieben stark dargestellt worden; vgl. STOLL).

Neuerdings hat sich auch ZSCHEILE mit der Adsorptionsanalyse des Chlorophylls beschäftigt; zur Isolierung der Komponenten a und b wurde nach der Ausführung älterer Isolierungsmethoden (WILLSTÄTTER und STOLL) noch auf Talcum chromatographiert (Lösungsmittel: Äther + Petroläther; Elution mit Äther). Der Befund von ZSCHEILE, daß außer den beiden Komponenten des Chlorophylls noch ein „Chlorophyll c“ existiere, konnte von WINTERSTEIN und SCHÖN (1) nicht bestätigt werden. Wendet man nämlich Puderzucker als Säulenmaterial an, so erscheint die c-Zone nicht. Die letztere dürfte durch einen im Talk sich abspielenden Zersetzungs Vorgang gebildet worden sein. Auch auf Inulin, das von SPOEHR dem Zucker vorgezogen wird, ergab sich in den Versuchen von MACKINNEY (3) keine Chlorophyll c-Schicht.

Zur Bestimmung des Mengenverhältnisses von Chlorophyll a und b dient die chromatographische Trennung mit nachfolgender Colorimetrie. Daß ein einfacher Vergleich der Zonenbreiten unzulässig ist, wurde schon von TSWETT (1, dort S. 123—125) betont. Nach WINTERSTEIN und STEIN (2) genügen für die Ausführung der Analyse 1 bis 2 Blätter:

Die Blätter werden mit einem dünnen Draht umwunden und (z. B. in flüssigem N₂) ausgefroren. Man zerreibt möglichst rasch mit einem großen Pistill, rührt mit 25 cm³ Benzin (Siedep. 70°) + Benzol (9 : 1) unter Zusatz von 8 cm³ Methanol an, nutsch und wäscht mit ebensoviel Lösungsmittelgemisch (Rückstand weiß). Durch vorsichtigen Wasserzusatz (nicht schütteln!) wird das Methanol im Scheidetrichter quantitativ gewegewaschen und die Pigmentlösung durch ein trockenes Faltenfilter gegossen.

Nun folgt die Adsorption auf Puderzucker (Rohrmaße 10×1 cm). Ist die Lösung fast ganz eingesickert, so wird, je nach der Geschwindigkeit des Abwärtswanderns der Zonen, mit Benzin + Benzol-Gemischen 4:1, 9:1 oder 19:1 nachgespült. Die benzolreicheren Solventen entwickeln stärker; ein zu rasches Entwickeln (breite, verwaschene Zonen) wird durch Aufgießen von Petroläther (Siedep. $30-50^{\circ}$) abgebremst. Das Carotin läuft bald durch und kann im Filtrat colorimetriert werden. Xanthophyll wird stärker fixiert, doch eilt es dem Chlorophyll a weit voraus. Um es festhalten zu können, füllt man eventuell in den unteren Teil des Rohres scharf getrocknetes CaCO_3 ein; das Carotin läßt sich, wenn nötig, mit Hilfe von Al_2O_3 abfangen: Abb. 36.

Benzin und Benzol werden mit Petroläther aus der Säule gedrängt und das Chromatogramm im CO_2 -Strom trocken gesaugt. Auspressen und Zerschneiden, wie gewöhnlich. Man eluiert mit methanolhaltigem Äther, wäscht den Alkohol weg, bringt die Eluate auf je 15 cm^3 und mißt im Stufenphotometer (Filter S 43), nach vorheriger Eichung mit reinen Chlorophyll-a- und -b-Lösungen. Die chlorophyll-b-haltige Lösung wird spektroskopisch auf etwaige Spuren von a geprüft, welche dann bei der Berechnung vom b-Gehalt abzuziehen sind. Beispielsweise gefunden $b : a = 1 : 2,96$, in jungem Klee.

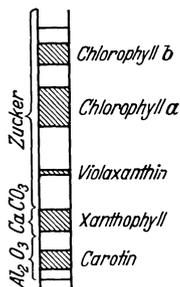


Abb. 36. Chromatogramm des Blattauszuges¹, nach WINTERSTEIN.

Isolierung von Chlorophyll a und b aus Roh-chlorophyll.

(WINTERSTEIN und STEIN 2.)

Die nachstehende Vorschrift bezieht sich auf die Scheidung von 3 g Chlorophyllgemisch (60% a + 40% b). Zunächst gewinnt man im besten Falle 0,7 g reines a und 1,3 g Chlorophyll b, das etwa 10% a enthält. Aus dem letztgenannten Präparat wird dann die Komponente a in einem besonderen Adsorptionsversuch entfernt.

Die Füllung des Apparates mit Puderzucker geschah nach

¹ Die Identität des „Violaxanthins“ ist noch unsicher.

S. 65. 3 g Rohchlorophyll werden in 100 cm³ Benzol (thiophenfrei, pro anal. Merck) gelöst und mit Benzin (Siedep. 70°) auf 1500 cm³ verdünnt. Nachdem 200 cm³ eines Benzin + Benzol-Gemisches (14 : 1) in die Säule gebracht wurden, wird das Chlorophyll eingeführt. Ist die Lösung fast eingesaugt, so füllt man 150 cm³ Benzol + Benzin-Gemisch nach; dann wird mit Benzin etwas weiter entwickelt, schließlich die Säule mit Petroläther nachgewaschen und möglichst trocken gesaugt (Dauer 1—1½ Stunden).

Man zerlegt die Kolonne durch Abschaufeln in drei Teile: oben Chlorophyll b (90proz.), darunter ein Gemisch a + b, unten *reines a*. Jeder Anteil wird mit 1 l Aceton + Äther (1 : 1, Äther peroxydfrei) verrührt, genutscht und mit dem gleichen Solvent gewaschen, bis der Zucker (fast) weiß erscheint. Das Aceton wird im Scheidetrichter durch vorsichtiges Waschen mit Wasser entfernt (nicht schütteln!). Man gießt die ätherische Lösung durch ein mit wenig Natriumsulfat beschicktes Faltenfilter und dampft sie im Vakuum bei 25° vollständig ein. Der Rückstand wird in etwas Äther aufgenommen, filtriert, im Vakuum auf ein kleines Volumen gebracht und das Chlorophyll mit Petroläther gefällt. Man zentrifugiert nach einiger Zeit, gießt die Lösung ab, löst den Rückstand in wenig Äther, verdampft im Vakuum vollständig und evakuiert den Kolben längere Zeit. Das Chlorophyll läßt sich gut herauskratzen.

Zwecks Reindarstellung von *Chlorophyll b* aus dem 90proz. Material werden 0,2 g in 15 cm³ Benzol gelöst und mit Benzin auf 150 cm³ gebracht. Man adsorbiert an Zucker (Rohr 12 × 5,5 cm), wäscht die Kolonne mehrfach mit Benzin + Benzol (14 : 1), schließlich mit Petroläther und saugt sie trocken. Es wird nur die Hauptzone verarbeitet, und zwar wie oben eluiert usw. Zur weiteren Reinigung werden die Präparate aus 4—5 Adsorptionsversuchen vereinigt, in wenig Äther gelöst und mit Petroläther gefällt. Das Abtrennen des Niederschlages geschieht in der Zentrifuge. Nach 2—3 Umfällungen ist das Chlorophyll b rein.

Die *Trennung von Phäophytin a und b* läßt sich gleichfalls chromatographisch durchführen, wenn auch diese Abbauprodukte von Zucker nicht so stark festgehalten werden als die Chlorophylle selbst. Mischungen wie Zucker + Talcum dürften geeigneter sein.

Bakterien-chlorophyll

kann ebenfalls chromatographisch herausgearbeitet werden. GAFRON (2) hat Thiocystisbakterien in der Talcum-Säule nacheinander mit Alkohol, Aceton und Äther ausgezogen und die Bildung einer grünen, einer gelben und einer roten Zone beobachtet. Der grüne Pigmentanteil ist Bacterio-chlorophyll. Abbauprodukte des letzteren wurden von FISCHER und HASENKAMP (1) studiert (Näheres S. 96).

Tierische Chlorophylle.

Auf diesem Gebiete wurde schon frühzeitig (1916) die TSWETTSCHE Methode angewandt, und zwar von DHÉRÉ und VEGEZZI (s. auch VEGEZZI), gelegentlich der Untersuchung des Pigments der Weinbergschnecken-leber (*Helix pomatia*). Bei dem Aufgießen eines Benzinextraktes auf Calciumcarbonat und reichlichem Nachwaschen bilden sich vier Zonen:

Oben: gelb, Xanthophylle,
 grünlich (Doppelscheibe),
 graustichig,
 unten: gelb, Carotin, läuft durch.

Die Untersuchung zeigt, daß das von dem Tier aus pflanzlicher Quelle bezogene Pigment angegriffen wurde, indem es unter der Einwirkung von Säuren in Phäophytin a und b (oder in ähnliche Stoffe) überging. Die letzteren Abbauprodukte haben sich in den beiden mittleren Scheiben des Chromatogramms angereichert.

Derivate und Abbauprodukte des Chlorophylls.

Vorstufe des Chlorophylls. Die interessante Frage, ob den beiden Chlorophyllen a und b ein *gemeinsames* natürliches *Protochlorophyll* zugrunde liegt, aus welchem die beiden grünen Farbstoffe durch Oxydation entstehen, oder ob bereits vor diesem Vorgang ein Gemisch von *zwei* Proto-chlorophyllen in der Pflanze vorliegt, konnte von SEYBOLD im Sinne der letzteren Möglichkeit entschieden werden.

Als Ausgangsmaterial diente eine Kürbisart, deren Samen schalenlos sind. Mittels eines Messers ließen sich die grünen, inneren Samenhäutchen abschaben. Man extrahiert sie mit einem Gemisch von Benzin + Methanol, treibt das gesamte Pigment mit

Wasser in Benzin, engt die Lösung im Stickstoffstrom stark ein und chromatographiert sie auf Puderzucker. Wie im Falle von Rohchlorophyll, haftet oben ein grüner Anteil, während ein gelber carotinoider Farbstoff schlecht adsorbiert wird und durch Aufgießen von Benzin sich abtrennen läßt. Zur Entfernung der Fette wäscht man die Säule zehnmal mit Benzin und entwickelt sie mit Benzol oder Benzin + Benzin-Gemischen. Dabei wandert ein zweites Carotinoid aus dem Grün aus, und gleichzeitig nimmt man die Scheidung des Hauptfarbstoffes in eine gelbgrüne (oben) und eine bläulichgrüne Komponente (unten) wahr. Sie werden gesondert mit Methanol + Äther eluiert. Nach dem Wegwaschen des Alkohols zeigen die Lösungen ebenso verschiedene Farben, wie Chlorophyll a und b, so daß man den letzteren wahrscheinlich je ein Protochlorophyll zuordnen darf. Die Fluoreszenz von b ist schwächer; seine optischen Schwerpunkte sind langwelliger. Die Lage der Bänder unterscheidet sich nur wenig, so daß man die Protochlorophylle in einer Mischlösung nicht auseinanderhalten kann. Wohl deswegen konnte die Existenz der beiden Vorstufen ohne Anwendung der TSWERTSchen Methodik bisher nicht nachgewiesen werden.

Umkehrbare Reduktion. Nach KUHN und WINTERSTEIN (2) lassen sich die Chlorophylle a und b durch Behandlung mit Zinkstaub in Pyridin, unter Zusatz von etwas Essigsäure, in *Leukoverbindungen* überführen. Bei Luftzutritt regeneriert das braune Filtrat rasch unversehrtes Chlorophyll, von welchem die begleitenden Zersetzungsprodukte folgend abgetrennt wurden: Nach Zusatz von Benzin wird das Pyridin gewaschen und die Lösung auf Puderzucker chromatographiert (Entwickeln mit Benzin). Bei der Verarbeitung von Chlorophyll a erschienen drei Zonen:

Oben: schmal, schwarz; unbekannte Zersetzungsprodukte,
 rein blau; Chlorophyll a (70—80% des Rohpigments),
 unten: hellgrau, wahrscheinlich Phäophytin.

Das aus Chlorophyll b bereitete Reaktionsgemisch liefert eine grüngelbe Scheibe im oberen Teil des Rohres.

Gelegentlich analytischer und synthetischer Arbeiten auf diesem Gebiete diente die Chromatographie im Laboratorium von H. FISCHER öfters als Hilfsmittel:

Bacterio-phäophytin. FISCHER und HASENKAMP (1) haben den purpurfarbenen Thiocystis-Bakterienbrei (aus 150 l Kulturlösung)

mit Aceton verrieben, 1 Tag stehengelassen und dreimal mit 80proz. Aceton extrahiert. Man gießt die Auszüge in Äther, wäscht mit gut destilliertem Wasser wiederholt aus und schüttelt mit 10proz. HCl durch. Nun wurde die ätherische Lösung auf 20 cm³ gebracht, das ausgefallene Bacterio-phäophytin abfiltriert und die Mutterlauge auf eine Talcum-Säule gegossen. Dann hat man das oben festgehaltene Pigmentgemisch mit Aceton entwickelt. Es konnte dabei in geringer Menge ein phorbidähnlicher Körper abgetrennt werden (Komponente b?), der von dem niedergeschlagenen Hauptprodukt spektroskopisch abweicht.

Versuchsführung in kleinerem Maßstab: GAFFRON (1).

Versuche mit Phorbiden. a) FISCHER und HASENKAMP (2) konnten ihr *Dihydro-phäophorbid a* in der Talcum-Säule wirksam von Phäophorbid a befreien, das früher Träger der im Original beschriebenen Oxoreaktion war, nun aber im oberen Bezirk der Kolonne hängen blieb. Das Chromatogramm wurde aus einer gesättigten Ätherlösung bereitet, zum Nachwaschen diente Aceton + Äther.

b) Aus frischem Schafkot erhaltene „*Probophorbid*“-Präparate lassen sich nach FISCHER und STADLER in Aceton, auf Talcum chromatographieren. Entwickelt man mit Äther, so erscheinen zwei Farbschichten: in der unteren ist das *Dihydro-pyrophäophorbid a* weitgehend angereichert. Die Uneinheitlichkeit des sog. Probophorbids wurde hier adsorptionsanalytisch bestätigt.

c) Eine chromatographische Reinigung des *Phäophorbid-a-geranylestere* C₄₅H₅₂O₅N₄ haben FISCHER und SCHMIDT versucht.

d) Das bei der *Anlagerung von Diazoessigester an Methylphäophorbid a* entstehende Reaktionsgemisch kann nach entsprechender Aufarbeitung gleichfalls chromatographiert werden (FISCHER und MEDICK). Die Substanz wird in Äther + Aceton-Lösung, die bis zur eben beginnenden Fällung mit Petroläther versetzt worden ist, auf eine mit Petroläther vorbereitete Talcum-Säule unter mäßigem Saugen gegossen und mit Äther + Petroläther (5 : 2) entwickelt. Man erhält eine gelbgrüne, darunter eine gelblichgraue und schließlich eine rein graue Zone, von denen die letztere kleine Mengen des krystallisierten Anlagerungsproduktes C₃₉H₄₂O₇N₄ liefert, falls mit Äther eluiert wird.

e) Bei der *Überführung von Phäophorbid b* in das entsprechende *Chlorophyllid* (mittels GRIGNARDScher Lösung) haben FISCHER und

SPIELBERGER die aus 0,5 g Phäophorbid erhaltene Pyridin + Äther-Lösung gewaschen, auf 70 cm³ eingeengt und auf eine (mit Äther + Petroläther hergestellte) Talkschiicht (8 × 5 cm) gegossen. 3 mg durchgelaufenes Chlorophyllid schieden sich beim Eindunsten der Lösung (über Wasser) krystallinisch aus, während der im Adsorbens festgehaltene Farbstoffanteil, welcher mit Aceton + Pyridin sich eluieren läßt, nicht krystallisierte.

f) *Reinigung von 2- α -Oxy-meso-chlorin-e₆-trimethylester* (FISCHER, LAUTSCH und LIN). Das aus Chlorin-e₆-trimethylester durch HBr-Anlagerung, Hydrolyse und Veresterung gewonnene Rohprodukt (2 g) wurde in etwas mehr als der erforderlichen Methanolmenge gelöst und auf Talcum (40—50 × 2—3 cm) chromatographiert (vorheriges Anfeuchten sowie Entwickeln mit Methanol). Gelbe Zersetzungsprodukte bleiben oben hängen; der tiefblaue Durchlauf wird im Vakuum abgedampft, der Rest in Eisessig gelöst und mit Petroläther (Siedep. 30—50°) auskrystallisiert. Blaue Prismen, die viermal umgeschieden, bei 215° schmelzen.

Siehe auch die neue Arbeit von FISCHER und LAUBEREAU.

2. Hämin.

BARKAN und SCHALES (1—3) haben aus verschiedenen Blutarten ein wasserlösliches *c-Hämin* erhalten, das nach Auffassung der Entdecker sich vom Protohämin durch das Fehlen einer Methinbrücke unterscheidet und dessen Eiweißverbindung ein Zwischenprodukt der Umwandlung von Blut- in Gallenfarbstoff im strömenden Blut zu sein scheint. Nach SCHALES wird die neue Häminart folgendermaßen angereichert.

Eine Lösung von Oxyhämoglobinkristallen (Pferd), mit einem Gehalt von 4,5% Farbstoff in 300 cm³, wird mit 300 cm³ 0,8proz. HCl, in der 0,6 g Pepsin (*Witte*) gelöst worden sind, versetzt und nach 48stündigem Verweilen bei 38°, mit Äther im Scheidetrichter gewaschen (Wasserzusatz erleichtert die Trennung). Beim Ablassen der Unterschicht verwirft man die an der Grenzfläche ausgeschiedenen braunen Flocken. Die Ätherbehandlung der wäßrigen Phase wird dreimal wiederholt, zum Schluß ist der Äther farblos. Man befreit die wäßrige Lösung (1, 3 l) vom Äther am Wasserbade, kühlt ab, filtriert, neutralisiert die nun protohämin-

freie Lösung mit Kaliumkarbonat genau, verdampft im Vakuum und trocknet den Rest über P_2O_5 (11,7 g).

8,3 g des lehmfarbigen Produktes, in 60 cm³ Wasser gelöst, wurden mit einem Gemisch von 20 cm³ m/15-Phosphatpuffer ($p_H = 8$), 4 cm³ Pyridin und etwas Natriumhyposulfit versetzt. Man saugt die rötliche Lösung langsam durch eine Aluminiumoxyd-Säule (nach BROCKMANN, 16 × 3 cm). Nach $\frac{3}{4}$ Stunden, wenn die Gesamtlösung eingesickert ist, sieht man etwa 1,5 cm vom oberen Rand entfernt, einen scharfbegrenzten dunkelroten Ring von 1—2 mm Breite, während darunter gelbe bis braune Stoffe hängen. 6 cm vom oberen Rand steht eine diffus-gelbgrüne Zone, das Gebiet darüber ist rötlichbraun, darunter gelblich. Beim Entwickeln mit 25 cm³ hyposulfithaltigem Lösungsmittelgemisch wird die Umgebung des roten Bezirkes nahezu weiß, das Filtrat wird gelb bis hellbraun und ist frei von c-Hämin. Man saugt die Säule trocken, schneidet die infolge der Luftwirkung braun gewordene rote Hauptzone heraus, eluiert sie zweimal mit $\frac{2}{3}$ n-HCl und neutralisiert die vereinigten braunen Eluate genau mit Soda. Es erscheinen braune Flocken, die nach kurzem Stehen zentrifugiert werden (Lösung wasserhell). Waschen mit Aceton und Äther, Nutschen, Trocknen im Vakuum über P_2O_5 . Ausbeute etwa 0,2 g c-Hämin. Dunkelbraunes Pulver. Löst man etwas in HCl, macht mit NaOH alkalisch, setzt Pyridin zu und reduziert mit Hyposulfit, so erscheinen die Bänder: 553,8—545,6 und 519,1 $\mu\mu$.

3. Porphyrine.

Harn-porphyrine.

Normaler Harn. Die Farbstärke des normalen Harnes wird bei der Filtration durch die Aluminiumoxyd-Säule nicht vermindert, während eine alkoholische Urochromlösung als braungelbe Zone hängen bleibt; mit Wasser läßt sich das Urochrom restlos eluieren (WALDENSTRÖM).

Das im normalen Harn, in einer Verdünnung 1 : 10⁸ stets vorkommende *Koproporphyrin I* wurde von FINK (1, 2) im Wege einer adsorptiven Filtration durch Baumwollfasern + Asbest angereichert. Bei der angewandten Wasserstoffionenkonzentration $p_H = 3,6$ besitzt das kolloidal gelöste Porphyrin nach FINK einen positiven, die Filtermasse einen negativen Ladungssinn (s. auch HOERBURGER). ZEILE und RAU haben dasselbe Koproporphyrin

nach dem unten angegebenen Verfahren von WALDENSTRÖM aus Harn gewonnen.

Pathologischer Harn. Für die Untersuchung der bei gewissen Erkrankungen (Porphyrinurie, Bleivergiftung) in relativ größeren Mengen auftretenden *roten Harnfarbstoffe* wurde die Chromatographie von WALDENSTRÖM (1, 2) nutzbar gemacht. Das meist angewandte Aluminium oxydatum anhydr. puriss. Merck läßt die normalen Pigmente des Harnes durch, es bindet jedoch die Porphyrine, nebst anderen Farbstoffen pathologischer Herkunft. Es eignet sich demnach sehr gut zur Pigmentanreicherung. Der Vorgang verläuft günstiger als die bisher geübten Analysenmethoden, mit welchen manchmal eine Kombination möglich ist (zunächst Adsorption, dann Verarbeitung auf anderem Wege).

Die Stoffaufnahme erfolgt direkt aus dem Harn, also aus wäßriger Lösung. Das Chromatogramm wird nicht ausgepreßt, sondern man befreit die Säule durch energisches Durchspülen von ihrem Pigmentgehalt.

Apparatur. An einem 1-l-Scheidetrichter ist ein Abflußrohr ($20 \times 3,5$ cm) angeschmolzen, das unten mit einem Hahn endigt (Lochdurchmesser 0,8 cm). Man drückt über dem Loch einen feuchten Wattebausch fest, gießt das Adsorbens 5—10 cm hoch in das Rohr und schwemmt durch Schütteln mit Wasser gut auf. Nach dem Absetzen wird der Apparat auf eine Saugflasche montiert und das Wasser (bis auf eine 1-cm-Schicht) langsam durchgesaugt.

Man stellt den gesamten Harn genau auf einen Gehalt von 1 bis 2% freier Essigsäure ein und läßt ihn entlang eines fast bis zum Adsorbens reichenden Glasstabes vorsichtig einfließen. Dann wird der unten angebrachte Hahn geöffnet und die Flüssigkeit durchsickern gelassen, eventuell unter sehr schwachem Saugen.

Beispiel. Diagnose: *akute Porphyrurie*. Harn (730 cm³) neutral, dunkelrot, Aldehydreaktion (EHRlich) negativ. Der essigsauer gemachte Harn wird mit Äther ausgezogen, wobei etwas Koproporphyrin in Lösung geht. Man filtriert vom gleichzeitig entstandenen Niederschlag ab und chromatographiert das Filtrat wie beschrieben. Es zeigt sich zuerst im oberen Bezirk der Al₂O₃-Säule eine rotbraune Zone, die nach unten wandert. Die Schicht zwischen ungefärbter und dunkelroter Masse wird gelbbraun, der oberste Teil färbt sich allmählich kräftig schwarzrot. Man wäscht zum Schluß mit 1proz. Essigsäure nach und eluiert mit 20proz. Essigsäure. Die braune Zwischenschicht und dann das rote Pig-

ment werden getrennt aufgefangen; sie sind porphyrinfrei. Man wäscht die Kolonne mit viel Eisessig und saugt, wobei alle Farbstoffe mit Ausnahme des obersten Ringes eluiert werden. Diese Fraktion ist stark porphyrinhaltig. Nach dem Waschen mit Wasser (wobei eine schmale, rote, porphyrinhaltige Zone nach unten geht) werden mittels 12proz. Ammoniak die restlichen Pigmente als dunkelrote Fraktion herausgelöst; das Al_2O_3 entfärbt sich. Die NH_3 -Lösung zeigt einen sehr hohen Gehalt an Porphyrinen. Sie wurde schwach essigsauer gemacht und, da der Farbstoff nicht ausfiel, die Chromatographie wiederholt. Nachher konnte das Pigment mit Essigsäure ausgeflockt und der Bestimmung zugeführt werden.

Man sieht, daß eine Fällung ohne zweimalige Chromatographie überhaupt nicht entstanden wäre und daß nur die Adsorptionmethode die Gewinnung dieser Fraktion ermöglicht hat. Nach durchgeführter Chromatographie ist der Harn hellgelb gefärbt, die spektroskopische Kontrolle des Porphyringehaltes daher einfach. Die Methode eignet sich auch für kleine Urinmengen (10 cm^3) sowie für porphyrinarme Harne.

Bekanntlich wird die rote Farbe des Harnes in Fällen von akuter Porphyrie hauptsächlich von *Begleitern* bedingt, die nicht zu den Porphyrinen zählen. Zur näheren Prüfung dieser noch *ungeklärten Pigmente* wurde der Harn wie beschrieben adsorbiert. Der Porphyringehalt bleibt oben hängen, außerdem entsteht eine rote Zone, die recht rasch abwärts wandert. Man leitet den Versuch so, daß die letztere Fraktion durchlaufe. Der abfließende Harn ist nun dunkelrot, aber trotzdem porphyrinfrei. Man nimmt damit eine zweite Chromatographie vor, wäscht die Säule mit Methanol aus, dann mit methylalkoholischem NH_3 und eluiert schließlich das Pigment mit Hilfe von stark verdünntem Ammoniak.

Nachweis von zwei isomeren Uroporphyrinen im Harn des an kongenitaler Porphyrie erkrankten Patienten Petry (FISCHER und HOFMANN). Ein Uroporphyrinpräparat (PETRY) vom Schmelzpt. 286° wird in Chloroform + Methanol (1 : 1) möglichst konzentriert gelöst und auf eine mit dem gleichen Solventgemisch bereitete Talcum-Säule gegossen. Die zunächst einheitlich erscheinende rosa Zone zerfällt beim Entwickeln mit Chloroform in eine obere, dünne, braunrote und in eine gut abgetrennte rosa Schicht. Die beiden Spektren sind in Pyridin + Äther identisch. Man treibt die untere Farbschicht in das Filtrat, das beim Einengen Nadeln ab-

scheidet, Schmelzp. 300—302° (unkorr.). Da eine zweite Chromatographie zu keiner Aufteilung mehr führte, ist dieser Anteil (Uroporphyrin I des PETRY-Harnes) einheitlich.

Zur Isolierung des Inhaltes der braunen Zone (Uroporphyrin vom Typus III) geht man von mehr Substanz aus und verwendet Chloroform + Methanol im Verhältnis 7 : 3. Der 8 cm breite braunrote Bezirk wurde längere Zeit mit Eisessig geschüttelt, die Lösung mit 3 Vol. Wasser verdünnt und das Porphyrin mit Essigester quantitativ ausgezogen. Man wäscht säurefrei, trocknet durch wiederholtes Filtrieren, engt auf 4 cm³ ein, zentrifugiert, dekantiert und engt weiter ein. Nadeln, Schmelzp. und Misch-schmelzp. mit Uroporphyrin III (Präparat von WALDENSTRÖM) 257°.

Nach der Methode von WALDENSTRÖM (s. oben) hat TURNER im normalen Harn des Eichhörnchens (*Sciurus niger*) Porphyrin vom Typus I nachgewiesen.

Porphyrine aus Kot.

Diagnose: Fall PETRY. Aus dem getrockneten und fein gemahlene Kot hat WALDENSTRÖM einen Eisessig + Äther-Auszug bereitet, das Porphyrin in HCl getrieben, diese mit Acetat bis zur Kongo-negativität abgestumpft und die Lösung auf die Al₂O₃-Säule gebracht. Es läuft eine gelbrote Lösung durch, das Porphyrin bleibt oben hängen. Nach dem Waschen mit Wasser und dann mit Äther wird Eisessig aufgegossen. Das Porphyrin geht, ohne sich aufzuteilen, in Lösung, die man mit viel Äther vermengt. Die Essigsäure wird mit Wasser gewaschen und die nur schwach saure Lösung adsorbiert. Mit Hilfe von stärker essigsauerm Äther (1%) erhält man nun ein richtiges Chromatogramm. Zunächst wandert eine schwächere grüne Zone nach unten (ein Koproporphyrin) und dann der überwiegende Anteil des Porphyrin-gehaltes.

Befreiung der Kot-porphyrine von Protoporphyrin. In einem Fall von Porphyrie ohne Porphyrinurie haben GROTEPASS und DEFALQUE die wie üblich aus dem Kot extrahierten und durch mehrmalige Überführung in essigsäurehaltigen Äther und Ausschütteln mit 5proz. Salzsäure vorgereinigten Porphyrine in der letztgenannten Säure gelöst und durch eine 2 mm dicke Talcumschicht filtrierte. Wäscht man mit 10proz. HCl nach, bis diese farblos durchläuft, so verbleiben störende Farbstoffe im Adsorbens.

Nun folgt dreimalige Reinigung über Äther. Zur weiteren Scheidung dient eine 15 cm hohe Säule von *Infusorienerde*, die vorher durch wiederholtes Waschen mit warmer 5proz. Salzsäure von Eisen befreit wurde. Ganz oben wird ein brauner, 3 cm tiefer ein roter Farbstoff abgelagert. Man wäscht mit 5proz. HCl so lange, bis der Durchlauf rot und dann wieder farblos geworden ist. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Filtration ist auch die letzte Spur des Protoporphyrins entfernt, was aus der Spektroskopie einer in essigsäuren Äther übergeführten Probe hervorgeht. Nun steht das Material für die Abscheidung weiterer Porphyrine nach den gangbaren Methoden bereit.

Künstlich bereitete Porphyrinpräparate.

a) Synthetische *Koproporphyrine* I und III lassen sich nach WALDENSTRÖM trennen.

b) *Synthese des Desoxy-phyllerythro-ätioporphyrins* $C_{32}H_{36}N_2$ (FISCHER und HOFMANN, 1). Diese Verbindung wurde auf folgendem Weg aus dem Porphyringemisch herausgearbeitet. Eine möglichst konzentrierte ätherische Lösung (3 g in 15 l) wird in einem konischen Glasrohr (70 × 12 cm) im Verlauf von mehreren Tagen durch Talcum gesaugt und das im oberen Drittel fixierte gesamte Porphyrin mit Äther + Chloroform (10 : 1) entwickelt. Das Ätioporphyrin wandert langsam nach unten, während das Desoxyphyllerythro-ätioporphyrin oben festgehalten wird. Dieser obere Teil der Säule wird abgetrennt und durch Digerieren mit viel Pyridin eluiert. Man dampft im Vakuum ein, löst in möglichst wenig Äther und chromatographiert nochmals, wodurch geringe Ätioporphyrinreste entfernt werden. Zwischen den beiden Zonen entsteht ein rein weißer Bezirk. Man eluiert das Hauptprodukt mit Pyridin, engt ein, nimmt mit Äther auf und wäscht Pyridinreste weg. Beim Konzentrieren erscheinen feine Nadeln.

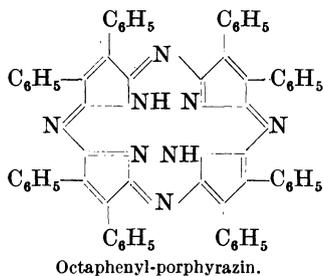
c) *Reinigung von Phylloporphyrinester*, die durch Ameisensäureabbau des Phytochlorins erhalten wurden: FISCHER und BAUER (Talcum; Elution mit Pyridin + Äther).

d) *Eisen-II-salz des Tetrabenzomonooza-porphins* $C_{35}H_{19}N_5Fe$. Die Pyridinmutterlaugen der von HELBERGER, REBAY und HEVER aus o-Cyanacetophenon und Eisenpulver aufgebauten

Diazaverbindung $C_{34}H_{18}N_6Fe$ wurden mit Äther verdünnt, auf Al_2O_3 aufgeteilt und mit 5% Pyridin enthaltendem Äther entwickelt. Oben sieht man drei braungrün verschmutzte Nebenringe, darunter liegt ein breiter Bezirk, der aus drei völlig ineinander übergehenden Streifen besteht: das Blau nimmt nach unten violetten Ton an. Dieser Säulenteil enthält den entsprechenden Diaza-, darunter den Monoazakörper und zutiefst das Eisensalz des Tetrabenzoporphins $C_{36}H_{20}N_4Fe$. Der ganze Streifen wurde in das Filtrat gewaschen und dabei nach dem Spektrum aufgeteilt. Jeweils beim Auftreten eines neuen, langwelligeren Bandes im Rot wechselt man die Vorlage: 1. Fraktion: 600 $\mu\mu$, 2. Fraktion: 620 und 600 $\mu\mu$, 3. Fraktion: 650, 620 und 600 $\mu\mu$. Die Mittelfraktion wurde nach dem Einengen nochmals chromatographiert. Es traten wieder die Fraktionen 1 und 2 auf, zuletzt erschien ein Nachlauf, welcher bei 600 $\mu\mu$ nur mehr sehr schwach adsorbierte. Sammelt man solche Anteile, engt stark ein und fällt mit heißem Methanol, so erhält man große violette Rauten, nämlich die Verbindung des Monoazakörpers mit 2 Mol. Pyridin.

Das Magnesium-Komplexsalz des Tetrabenzoporphins wurde ebenfalls auf Al_2O_3 gereinigt und mit Pyridin + Äther (1 : 4) entwickelt.

e) *Porphyrazine*. COOK und LINSTEAD haben durch Erhitzen von Diphenyl-maleinnitril $(C_6H_5)(CN)C=C(CN)(C_6H_5)$ mit Magnesium das Magnesium-octaphenyl-porphyrazin erhalten. Eine



Lösung des purpurschwarzen Pulvers (0,6 g) in 300 cm³ Benzol wurde durch Al_2O_3 (BROCKMANN, $20 \times 1,5$ cm) filtriert. Man sah einen breiten grünen Ring und kleine Mengen brauner Verunreinigungen. Elution der Hauptzone mit Pyridin, Fällen der eingeeengten Lösung mit Wasser. Ähnlich wird das mit HCl erhaltliche, freie *Octaphenyl-porphyrazin*

gereinigt, das weniger stark adsorbiert wird, wie Spuren der darin enthaltenen Magnesiumverbindung. Führt man die Synthese mit Kupferbronze durch, so entsteht die krystallisierbare Cu-Verbindung, welche sich, wie beschrieben, chromatographisch reinigen läßt.

4. Gallenfarbstoffe.

Auf diesem Gebiete hat die Chromatographie bisher nur spärlich Anwendung gefunden.

a) Photochemische Überführung des Ätio-porphyrins I in bilirubinoide Farbstoffe (FISCHER und HERRLE).

Eine Lösung von 2g Ätioporphyrin in 4l Pyridin wurde mit 10proz. Natriumäthylat versetzt, bis das ganze Material als Komplexsalz vorlag (Spektrum: 591,4, 555,5, 445,3 $\mu\mu$). Man gibt die gleiche Menge Äthylat zu und leitet die Lösung durch eine Glasschlange, deren Windungen um eine 500-Watt-Sofittenlampe führen. Umschlag der roten Flüssigkeit in Blau und Tiefgrün. Man engt im Vakuum stark ein, gießt in 3 l Äther, zieht unverändertes Ausgangsmaterial mit 7proz. HCl und ein neues Porphyrin mit 12 bis 15proz. HCl aus, adsorbiert an Al_2O_3 und entwickelt mit Äther. Im allgemeinen zeigt sich ein der Abb. 37 ähnliches Chromatogramm. Die Aufteilung wird, wenn nötig wiederholt.

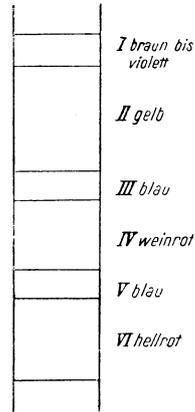
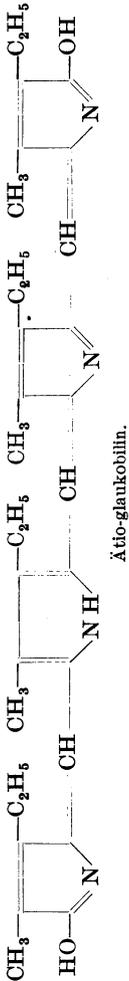
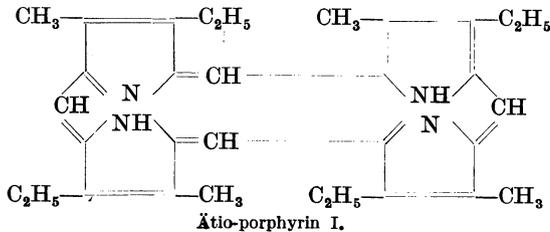


Abb. 37. Chromatogramm des Bestrahlungsproduktes von Ätioporphyrin.

Schicht II enthält einen neuen Körper $C_{16}H_{20}O_2N_2$ der durch Wiederholung der Adsorption sich isolieren läßt. In Schicht III ist Ätio-glaucobilin $C_{31}H_{38}O_2N_4$ enthalten, das nach dem Extrahieren mit Äther und Eindampfen unmittelbar auskrystalli-



siert; Schmelzp. 238°. Aus Schicht IV wurde nach Wiederholung der Adsorptionsanalyse ein rotes Keton $C_{31}H_{36}O_3N_4$ erhalten. Schmelzp. 244°; vielleicht liegt Ätio-mesobilirubinogen vor.

b) Verhalten des Blutserum-Bilirubins. Trennung von den Carotinoiden des Serums.

Nach SÜLLMANN, SZÉCSÉNYI-NAGY und VERZÁR wird Bilirubin aus seiner Petrolätherlösung (durch Ausschütteln einer angesäuerten wäßrig-alkoholischen Lösung bereitet) von wasserfreiem Natriumsulfat adsorbiert, und zwar bedeutend stärker als Lutein. Das Filtrat ist farblos. Diese Methode versagt jedoch im Falle von Serumextrakten, wahrscheinlich unter dem Einfluß von Lipoiden, indem überhaupt kein Pigment adsorbiert wird. Dasselbe beobachtet man nach dem Versetzen einer petrolätherischen Lösung von reinem Bilirubin + Lutein mit Cholesterin.

Viel geeigneter ist Aluminiumoxyd (Merck, für Adsorptionszwecke), welches Bilirubin (und noch stärker die Produkte, die durch Ultraviolettbestrahlung von Natrium-bilirubin in Weingeist entstehen) aus alkoholischer Lösung festhält.

Zur Trennung von *Bilirubin und Lipochrom des menschlichen Blutserums* verfährt man wie folgt: Je 10 cm³ Serum werden in 75 cm³ Alkohol gebracht, 1/2 Stunde im Dunkeln stehengelassen und durch einen Glasfiltertiegel (G_3) filtriert. Man wäscht die Fällung zweimal mit Alkohol nach, das zweitemal unter Zusatz von etwas Petroläther. Die aus dem Extrakt nach dem Ansäuern in Petroläther übergeführten Serumfarbstoffe wurden auf Al_2O_3 chromatographiert:

Oben: gelb, mit Petroläther unelulierbar, nach Sprit-elution diazotierbar: *Bilirubin*,

rotgelb, mit Alkohol leicht elulierbar. Bei der Verteilung zwischen Petroläther und 87proz. Alkohol hypophasisch: *Xanthophylle*,

unten: rotgelb, bei der Entmischung epiphasisch: *Carotine*.

Eine feinere Aufteilung war hier, im Hinblick auf die sehr geringe Serummenge, nicht zu erwarten. Die Fraktionen können quantitativ bestimmt werden.

c) Harn.

Das *Urobilin* wird, analog dem Urochrom (S. 99), nur aus den ersten Kubikzentimetern des schwach essigsauren Harnes von

Al₂O₃ zurückgehalten. Aus gallenfarbstoffhaltigen Harnen werden Bilirubin und Biliverdin adsorbiert (WALDENSTRÖM).

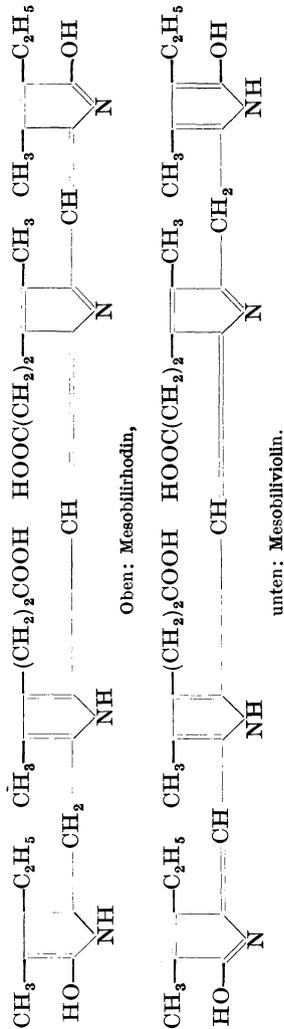
d) Abbauprodukte.

Der aus Mesobilirubinogen durch Ferrichlorid-oxydation erhaltene Farbstoff wurde von SIEDEL in Chloroform übergeführt und die stark eingengte Lösung nach Zusatz von 1 Vol. Äther auf Talcum aufgeteilt (Entwickeln mit Chloroform + Äther 2 : 1). Es bildeten sich zwei scharf abgegrenzte Zonen aus: oben hellrot, unten violett (Hauptanteil). Der rote Farbstoff wurde *Mesobilirhodin* genannt, der violette ist *Mesobiliviolin*. Die Formeln zeigen, daß kleine Varianten im Molekülbau in der Adsorptionsanalyse sich stark auswirken.

e) Synthetische Hexa-pyrrene.

Ein von FISCHER und REINECKE aufgebautes „Hexapyrren“, das Kondensationsprodukt von Neoxanthobilirubinsäure und 3,3'-Dimethyl-4,4'-dipropionsäure-5,5'-dibrommethylpyromethen-bromhydrat, ein nach dem „Bilirubin-Urobilin-Modell“ der genannten Forscher gebaute Stoff, erleidet beim Stehen in Methanol + HBr Dehydrierung. Nach dem Eingießen in Chloroform und mehrmaligem Auswaschen wurde an Aluminiumoxyd adsorbiert und mit Aceton entwickelt:

- Oben: Zone I, orange,
- Zone II, violett,
- Zone III, blau,
- Zone IV, violett, } ohne weiße Zwischenräume.
- unten: Zone V, grün



Die Säule wurde zerschnitten und jeder Säulenteil nach dem Eluieren mit Methanol nochmals aus Chloroform + Aceton chromatographiert.

Zone I. In Äther Endabsorption von $530 \mu\mu$ an. Mit Ammoniak und Zinkacetat in Alkohol Rotviolett färbung: 645 (schwach), $595 \mu\mu$ (stark).

Zone II. Violette Gmelinstufe eines vierkernigen Bilirubinoïdes, Geht violett in 2proz. HCl. Mit Zinkacetat in Alkohol: 628, 576, $515 \mu\mu$.

Zone III. Krystallisiert, Schmelzp. 238° ; identisch mit *Glucobilin-dimethylester* aus Neoxantho-bilirubinsäure und Formyl-neoxantho-bilirubinsäure.

Zone IV. Geht blauviolett in 15proz. HCl. Dehydrierungsprodukt des Ausgangsmaterials.

Zone V. In Lösung grün; gibt weder Gmelin- noch Zinkacetatreaktion.

Wird das obige Hexapyrren (als freie Base) in Chloroform stehen gelassen, so färbt sich die Lösung durch Luftoxydation violett und es kann auf Al_2O_3 eine Aufteilung vorgenommen werden: während ein orangegelber Farbstoff sich stark festhält, läuft ein violetter fast unadsorbiert durch. Auch bei der Verarbeitung des mit Hydroxylamin erhältlichen Dehydrierungsgemisches war (nach Veresterung) die Al_2O_3 -Säule brauchbar.

5. Carotinoide.

Das Gebiet der auf S. 27 definierten Carotinoide ist, wie erwähnt, ein klassischer Anwendungsbereich des TSWERTSchen Verfahrens, nicht nur weil die moderne, präparative Arbeit gerade hier eingeezt hat (Geschichtliches: S. 13), sondern auch aus folgendem Grunde. Der analoge Molekülbau der natürlichen Polyene bedingt ein sehr weitgehend ähnliches Verhalten in bezug auf Löslichkeit und Krystallisierbarkeit der Vertreter von gewissen Carotinoidklassen, wogegen die Adsorptionsaffinitäten, wie auf S. 27 bereits vermerkt, sehr fein abgestuft sind. Während man daher innerhalb mancher anderer Körpergruppen oft auch mit Hilfe älterer Methoden eine Reindarstellung erreichen kann, gibt es in bezug auf carotinartige Farbstoffe eine Fülle von Aufgaben, welche ohne Anwendung der Chromatographie ungelöst geblieben wären.

Ist in einer Droge ein Hauptcarotinoid enthalten, dessen Menge

stark überwiegt (Tomaten-Lycopin), so kann dasselbe freilich auch ohne Adsorptionsanalyse leicht isoliert werden. Schwierigkeiten entstehen erst bei der Diagnose und Abscheidung von geringfügigen Nebenfarbstoffen, die in der Mutterlauge verbleiben. Meist wird indessen das native Pigment verwickelter zusammengesetzt sein, so daß gewisse Komponenten entweder gar nicht in feste Form zu bringen sind oder ein Mischkrystallisat bilden. Ebenso ist ein Adsorptionsversuch unerlässlich, wenn es sich nicht um die Isolierung handelt, sondern um den Nachweis bzw. colorimetrische Bestimmung der einzelnen Polyene, welche im Pflanzenmaterial oder in tierischen Organen und Flüssigkeiten nebeneinander vorliegen.

Vorbereitende Operationen.

Die Scheidung vieler Einzelfarbstoffe in derselben Säule ist unzweckmäßig und aus praktischen Gründen nicht immer leicht durchführbar. In komplizierteren Fällen zerlege man daher das Gesamtpigment zunächst in einige Hauptanteile, den Unterklassen der Carotinoide entsprechend, und bereite dann mit jeder Fraktion ein besonderes Chromatogramm auf dem jeweils geeigneten Adsorbens. Wie auf vielen anderen Gebieten der Naturforschung, wird auch hier eine schwierige Analyse durch mehrere leichtere ersetzt.

Entmischung.

Als ein vortreffliches Hilfsmittel dient hierzu der altbewährte Entmischungsversuch, nämlich die Verteilung des Gesamtfarbstoffes zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Lösungsmitteln: meist Petroläther (evtl. mit Äther vermengt), die Oberschicht bildend, und wäßriger Methanol (z. B. 90proz.) als untere Phase (vgl. WILLSTÄTTER und STOLL). Schon TSWETT (1) unterscheidet „*epiphasische*“ und „*hypophasische*“ Farbstoffe, je nachdem die Hauptmenge, nach dem Durchschütteln, oben oder unten im Scheidetrichter vorzufinden ist. Die wichtigsten Carotinoide verteilen sich in charakteristischer Art und können, wenn nötig, nach wiederholter Erneuerung derjenigen Schicht, welche sie größtenteils aufnimmt, quantitativ abgetrennt werden.

Epiphasische Carotinoide: Polyen-kohlenwasserstoffe $C_{40}H_{56}$.

Hypophasische Carotinoide: Die freien Polyen-alkohole und die Oxyketone, z. B. Capsanthin und Capsorubin. Das Diketon

Rhodoxanthin geht hälftig in beide Schichten. Krypto- und Rubixanthin verhalten sich nur hypophasisch, wenn der Alkohol mindestens 95proz. ist; von einem schwächeren Alkohol werden sie der Oberschicht überlassen.

Epiphasische, nach dem Verseifen aber hypophasische Carotinoide: Farbwachse. Ihr Entmischungsverhalten wird durch Behandlung mit methyllkoholischem Kali umgekehrt.

In manchen Fällen läßt sich eine noch weiter gehende Fraktionierung erreichen:

a) Schüttelt man eine äther-petrolätherische Lösung (1 : 1) von Xanthophyll + Fucoxanthin dreimal mit 70proz. Methyllkohol, so gelangt alles Fucoxanthin, aber nur wenig Xanthophyll in die untere Phase (WILLSTÄTTER und PAGE).

b) Unterscheidung von Lutein und Violaxanthin (KUHN und WINTERSTEIN 1). Schüttelt man 10 cm³ der äther-petrolätherischen Lösung (1 : 1) viermal mit je 2 cm³ 70proz. Methanol, so geht doppelt soviel Violaxanthin als Lutein in die Unterschicht. Zapft man die letztere ab und schüttelt sie mit 5 cm³ Äther + Petroläther durch, so sucht das Lutein quantitativ, das Violaxanthin nur zum Teil die obere Schicht auf.

Wie ersichtlich, stehen mehrere *günstige Kombinationen als Vorbereitung der Adsorptionsanalyse* zur Verfügung:

1. Man entmischt den Gesamtauszug und treibt so die freien Polyenalkohole in die untere Phase. Die Oberschicht wird abgehoben, über konz. methanolischem Kali 1 Tag stehengelassen, alkalifrei gewaschen und mit schwach wasserhaltigem Methanol geschüttelt. Die im Gewebe als Ester vorgelegenen Polyenalkohole wandern nun nach unten und werden für sich abgetrennt. Mit den drei Anteilen nimmt man gesondert Adsorptionsanalysen vor.

2. Häufig ist es hinreichend und empfehlenswert, das native Pigment mit Äther auszuziehen oder in Äther überzuführen, welcher dann $\frac{1}{2}$ —1 Tag mit 30proz. methanolischem Kali bei Luftabschluß stehengelassen wird. Man versetzt die Flüssigkeit mit viel Wasser, wäscht die Oberschicht alkalifrei und entmischt dieselbe, nach Zusatz von Petroläther, mit wasserhaltigem Methanol. Die oben verbliebenen Farbstoffe werden gesondert chromatographiert, ebenso auch die hypophasischen. Die letzteren führt man mit Wasser in Petroläther oder Äther über, trocknet die Lösung mit Natriumsulfat, dampft sie im Vakuum ab, nimmt

den Rückstand mit einem geeigneten Solvent auf und zerteilt ihn in der Adsorptionssäule.

3. Es sollte stets auch versucht werden, ob das native, noch nicht entmischte Pigment sich direkt chromatographisch festhalten und aufteilen läßt, eventuell unter Anwendung von zwei Adsorptionsmitteln im gleichen Rohr (ein Beispiel: S. 122). Diese Arbeitsweise, bei welcher man zunächst keinen Farbstoff verliert, wird namentlich für pflanzliche Extrakte anwendbar sein, seltener bei der Verarbeitung von tierischem Lipochrom. Nach dem Ausschneiden und der Elution einzelner Bezirke folgen Entmischungs- oder sonstige Reinigungsoperationen.

4. Wie aus den unten mitgeteilten Beispielen hervorgeht, gibt es noch eine weitere Anzahl von Varianten der Arbeitsweise. Liegt sehr wenig Farbstoff in großer Verdünnung vor, so kann man zunächst das gesamte Pigment in einem stark wirkenden Adsorptionsmittel, z. B. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oder Al_2O_3 summarisch festhalten. Entweder erhält man sofort ein Chromatogramm oder wird so das Eluat von farblosen Begleitern weitgehend befreit und in einem neuen Versuch aufgeteilt, eventuell erst nach Durchführung einer vorbereitenden Operation.

Anwendung von Lösungs- und Adsorptionsmitteln. Elution.

Auf dem Polyengebiet wird man mit einigen Materialien auskommen. Die drei Carotine α , β und γ scheiden sich am besten aus petrolätherischer Lösung, auf Calciumhydroxyd (KARRER und WALKER); auch Aluminiumoxyd und Benzin oder Benzol + Benzin sind für Polyen-kohlenwasserstoffe und für die Farbwachse verwendbar. Verschiebt man dabei das Mengenverhältnis mehr zugunsten des Benzols, so läßt sich ein selektiveres Säulenbild erzielen, aber weniger Farbstoff in der gleichen Menge des Adsorptionsmittels verarbeiten. Ein Gemisch von Polyen-alkoholen wird zweckmäßig aus Schwefelkohlenstoff in der Calciumcarbonat-Säule zerlegt. In Benzollösung kann man auch die sauerstoffhaltigen Carotinoide auf Calciumhydroxyd bearbeiten, mit dem Vorteil, daß größere Farbstoffmengen in das Rohr eingeführt werden können. Die Elution ist allerdings manchmal erschwert und geschieht dann in der Wärme.

Zur Elution von Polyenen dient allgemein Methyl- oder

Äthylalkohol; meist genügt ein kleiner Zusatz davon ($\frac{1}{2}$ —1%) zum Benzol, Benzin, usw., um die Adsorptionskräfte aufzuheben.

Kurze Angaben über das Adsorptionsverhalten einiger Carotinoide (s. die Formeln auf S. 30—32).

α -, β - und γ -Carotin. α zeigt die schwächste, γ die stärkste Adsorptionsaffinität. Die drei Carotine werden auf Aluminiumoxyd, z. B. aus Benzin, einzeln festgehalten, besonders gut differenziert auf Calciumhydroxyd. Nach TSWERT (22) ist Carotin der einzige Farbstoff des grünen Blattes, der aus Petroläther von Saccharose, Inulin oder Calciumcarbonat sich nicht adsorbieren läßt. Das gleiche gilt für die Kombination CaCO_3 -Schwefelkohlenstoff.

Lycopin hängt, wie die isomeren Carotine, auf Calciumcarbonat kaum hängen (nur im Falle hoher Dispersität des Pulvers), obzwar es an Adsorbierbarkeit die Carotine übertrifft. Sehr geeignet sind Aluminiumoxyd, Magnesiumoxyd und Calciumhydroxyd (Lösungsmittel: Benzol oder Benzin).

Kryptoxanthin. Man verwende Calciumhydroxyd oder Calciumcarbonat und z. B. Benzin; Entwickeln mit Benzol + Benzin. Das Kryptoxanthin $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}$ nimmt stets einen tieferen Platz in der Säule ein als die Xanthophylle $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$.

Rubixanthin verhält sich wie Kryptoxanthin und wird davon auf chromatographischem Wege kaum getrennt.

Lycioxanthin und **Lycophyll** lassen sich auf CaCO_3 festhalten, und zwar aus Benzin. Nimmt man jedoch Benzol, so genügt die Carbonat-Säule nicht mehr und man muß $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oder Al_2O_3 anwenden. So wie das Lycopin stärker adsorbiert wird als β -Carotin, so wird auch das Lycioxanthin (Oxy-lycopin) oberhalb des Kryptoxanthins (Oxy- β -carotin), das Lycophyll (Dioxy-lycopin) oberhalb des Zeaxanthins (Dioxy- β -carotin) fixiert.

Lutein (Xanthophyll) bleibt aus CS_2 oder Benzin auf Calciumcarbonat hängen und nimmt die S. 28 verzeichnete Lage ein. Das A-Vitamin, oder die Polyen-kohlenwasserstoffe passieren die Säule.

Zeaxanthin. Verhalten dem Lutein ähnlich. Von β -Carotin und Kryptoxanthin, welche das gleiche Spektrum zeigen, scheidet sich das Zeaxanthin auf CaCO_3 mittels CS_2 oder Benzol + Benzin (1 : 5) und nimmt den obersten Platz ein.

Antheraxanthin, Petaloxanthin und **Flavoxanthin** (alle mit 3 OH-Gruppen) belegen in dieser Reihenfolge Zonen von oben nach unten. Anthera- und Petaloxanthin schienen zunächst identisch zu sein und wurden ausschließlich auf chromatographischem Wege differenziert.

Fucoxanthin, Violaxanthin und **Taraxanthin**, mit 6, 4, 4 O-Atomen, sind der chromatographischen Scheidung zugänglich, z. B. aus Benzin + Benzol, auf Al_2O_3 oder CaCO_3 .

Rhodoxanthin wird aus Benzin an Calciumcarbonat schlecht

adsorbiert; es bildet unterhalb der Polyen-alkohole eine Zone, welche sich auswaschen läßt. Dagegen nimmt es Al_2O_3 aus Benzin oder aus Benzin + Benzol als tiefviolette Scheibe auf.

Capsanthin und **Capsorubin** werden in der CaCO_3 -Säule aus CS_2 oder Benzin gut fixiert; auch die Scheidung der beiden Farbstoffe erfolgt zufriedenstellend. Die Capsanthin-ester stehen im CaCO_3 -Chromatogramm (Benzin) höher als Zeaxanthin- und Lutein-Farbwachse.

Bei der *quantitativen Bestimmung der Carotinoide* sind ähnliche Gesichtspunkte entscheidend wie bei der Isolierung. An die Elution der abgetrennten Pigmentanteile schließt sich hier eine colorimetrische Messung an. Nach KUHN und BROCKMANN (3), die für die Bestimmung der wichtigsten Vertreter der Reihe einen systematischen Arbeitsgang beschrieben haben, geschieht die Messung am besten im Mikrocolorimeter.

Als Standard (10-mm-Schicht) dient eine Lösung von 14,5 mg reinem *Azobenzol* in 100 cm^3 96proz. Alkohol. Die Farbgleichheit zeigt in je 1 cm^3 Benzin (Siedep. $70-80^\circ$) an: 0,00235 mg α - oder β -Carotin, 0,00242 mg Kryptoxanthin, 0,00252 mg Lutein (Xanthophyll) oder Zeaxanthin, 0,0027 mg Tara- oder Violaxanthin, 0,0046 mg Physalien oder Helenien. — Eine zehnmal stärkere Azobenzollösung indiziert 0,0078 mg Lycopin bzw. 0,0095 mg Capsanthin oder 0,0098 mg Capsorubin pro Kubikzentimeter.

Die Identifizierung der einzelnen Carotinoide,

welche chromatographisch aus einem Gemenge herausgearbeitet wurden, stützt sich vor allem auf die *spektroskopische Messung*. Diese ist in zahlreichen Fällen zuverlässig, namentlich wenn auch das sonstige Verhalten des betreffenden Farbstoffes in Betracht gezogen wird (Entmischungsprobe, Nuance in Lösung und auf der Säule, relative Stellung im Adsorbens, Farbreaktionen usw.). Es sei indessen auch hier daran erinnert, daß für das Zustandekommen des Spektrums nicht das Gesamt-molekül verantwortlich ist, sondern nur die chromophore Gruppierung. Verschiedene Polyene mit dem gleichen Chromophor zeigen daher die nämlichen optischen Schwerpunkte; so sind z. B. β -Carotin, Kryptoxanthin und Zeaxanthin optisch nicht zu unterscheiden (vgl. die Strukturformeln S. 30—32), wohl aber durch ihr abweichendes Verhalten bei der Entmischung.

Zeigt die Lage des Spektrums eine bedeutende Verschiebung gegenüber dem Erwarteten, so ist Nicht-identität bewiesen, die

chromatographische Einheitlichkeit vorausgesetzt. Andererseits wird man aber das letzte Wort über eine im Spektroskop gefundene Identität zweier Polyene erst auf Grund des Misch-chromatogramms (S. 8) aussprechen oder, wenn tunlich, nach der Abscheidung eines krystallisierten Präparates. Gerade dadurch, daß die letztere Operation nicht vorgenommen wurde, ist manche, an sich wohl gute Angabe der älteren Literatur mit einer mehr oder minder großen Unsicherheit belastet.

Es besteht, analoge Struktur vorausgesetzt, ein *einfacher Zusammenhang zwischen Spektrum und Adsorptionsverhalten* mancher Carotinoide (S. 27; vgl. WINTERSTEIN 1): Je länger das konjugierte Doppelbindungssystem ist, um so stärker gibt sich die Adsorptionsaffinität kund, aber um so mehr werden auch die Extinktionsmaxima nach dem Langwelligen verschoben. Dies zeigt sich in vielen Fällen sehr eindrucksvoll bei der Betrachtung des Chromatogramms, in welchem die Farbtiefe von oben nach unten abnimmt, z. B.:

Oben: Lycopin $C_{40}H_{56}$, 13 F (11 konj.): 548, 507 $\mu\mu$ (in CS_2),
 γ -Carotin $C_{40}H_{56}$, 12 F (11 konj.): 533,5, 496 $\mu\mu$,
 β -Carotin $C_{40}H_{56}$, 11 F (11 konj.): 521, 485,5 $\mu\mu$,
 unten: α -Carotin $C_{40}H_{56}$, 11 F (10 konj.): 509, 477 $\mu\mu$.

Bei den *sauerstoffhaltigen* Carotinoiden liegen die Verhältnisse nicht immer so einfach, namentlich weil der, in der Säule dem Farbstoff relativ zukommende Platz von der adsorptiv außerordentlich stark wirksamen Hydroxylgruppe entscheidend bestimmt wird. So steht z. B. das Zeaxanthin (2 OH-) höher als Kryptoxanthin (1 OH-), obzwar die optischen Schwerpunkte zusammenfallen (519, 483 $\mu\mu$, in CS_2). Hingegen werden die rot-violetten Oxyketone Capsanthin und Capsorubin an einer höher liegenden Stelle adsorbiert als die orangegelben und gelben Polyenalkohole (vgl. S. 119).

Isomerisierung von Carotinoiden.

Der Ausgangspunkt der Untersuchungen von GILLAM und EL RIDI (1, 3) sowie von GILLAM, EL RIDI und KON war die Beobachtung, daß der α -Carotiningehalt der Butter in der Aluminiumoxyd-Säule sich stets als höher erwies, als wenn die Adsorption auf Magnesiumoxyd vorgenommen wurde. Eine genauere Prüfung

zeigte dann, daß das β -Carotin sich teilweise *isomerisiert*. Dabei erscheint, wenn lange genug entwickelt wird, unterhalb der Hauptzone eine gelbe Schicht, welche jedoch kein α -Carotin, sondern ein neues Polyen, das sog. *Pseudo- α -carotin* $C_{40}H_{56}$ enthält. Obzwar die optischen Schwerpunkte zusammenfallen, erwiesen sich die beiden Kohlenwasserstoffe in wichtigen Punkten als voneinander abweichend (Tabelle 10).

Tabelle 10. Vergleich von α -Carotin und Pseudo- α -carotin.

	α -Carotin	Pseudo- α -carotin
Formel	$C_{40}H_{56}$	$C_{40}H_{56}$
Schmelzpunkt	166° (unkorr.)	187° (unkorr.)
Spez. Drehung (Cd-Licht)	+ 380°	0°
Adsorption auf Al_2O_3 gibt (teilweise) . . .	„Neo-carotin“	β -Carotin oder ähnliches

Das Pseudo- α -carotin stimmt in bezug auf Zusammensetzung, Wasserstoffaufnahme, Spektrum, Provitamin-A-Wirkung mit dem natürlichen α -Carotin überein. Es wird von GILLAM und EL RIDI (3) angenommen, daß hier entweder eine cis-trans-Umlagerung stattfindet oder der Platzwechsel einer Doppelbindung. Es ist aber auch die Möglichkeit noch nicht ganz auszuschließen, daß das Pseudo- α -carotin racemisches α -Carotin ist.

Ausgehend von α -Carotin haben GILLAM, EL RIDI und KON auf Aluminiumoxyd (gewöhnliches und BROCKMANN'SCHES 1 : 1) zunächst eine homogene Schicht erhalten, auch wenn mit sehr viel benzolhaltigem Petroläther entwickelt wurde. Nach erfolgter Elution und Readsorption konnten jedoch zwei Farbbezirke beobachtet werden. Die untere Lage enthielt *Neo- α -carotin* $C_{40}H_{56}$ (Schmelzpt. 172°, uncorr., Schwerpunkte in Petroläther 476, 447 $\mu\mu$, in Benzol 487, 457 $\mu\mu$, in CS_2 509, 476,5 $\mu\mu$; $[\alpha]_{Cd} = +220^\circ$).

Alle diese Vorgänge sind umkehrbar.

Während die GILLAM'SCHE Schule die *Wirkung des Adsorptionsmittels* für die beschriebenen Vorgänge verantwortlich macht, handelt es sich beim β -Carotin und Lycopin nach ZECHMEISTER und TUZSON (16, 17) um eine *spontane Isomerisierung*, die beim *Stehen* oder *Erwärmen* der Lösungen alsbald einsetzt und *mit der*

Chromatographie grundsätzlich nichts zu tun hat. Die TSWERTSche Säule bietet nur ein einfaches Hilfsmittel zur Zerlegung des Gleichgewichtsgemisches (Abb. 66—67, S. 296), doch kann die Isomerisierung auch mit Hilfe colorimetrischer und spektroskopischer Meßmethoden, wenn auch weniger bequem, in der Lösung verfolgt werden. Ähnliches gilt für Kryptoxanthin. In Kenntnis dieser Sachlage ist die Anwendung der Adsorptionssäule unbedenklich, wenn die Arbeitsbedingungen entsprechend geregelt werden.

*Darstellung von kristallisiertem Pseudo- α -carotin $C_{40}H_{56}$
aus β -Carotin $C_{40}H_{56}$, nach GILLAM und EL RIDI (3).*

200 mg reines β -Carotin (aus Gras, optisch inaktiv) wurde in Petroläther (Siedep. 70—80°) gelöst, auf eine Al_2O_3 -Säule gegossen (50 × 6 cm; 1 Teil nach BROCKMANN standardisiert, Merck + 3 Teile unaktiviertes Oxyd) und mit Petroläther (oder Petroläther + Benzol) nachgewaschen. Diese erste Adsorption zeigt in der Regel keine merkbare Aufteilung des Farbstoffes. Als man jedoch den angefarbten Säulenteil mit alkoholhaltigem Petroläther eluierte und das gewaschene, getrocknete Eluat nochmals adsorbierte, erfolgte Zerfall in zwei Scheiben. Bei fortgesetzter Entwicklung gelangte dann die tiefer liegende Zone in das Filtrat und wurde gesondert aufgefangen. Nun hat man das unveränderte β -Carotin (oberer Farbring) wie angegeben eluiert und noch vier- bis fünfmal adsorbiert, um eine möglichst vollständige Isomerisation zu erzielen. Schließlich lieferten 200 mg β -Carotin 80—100 mg Pseudo- α -carotin (in etwa 4 l Flüssigkeit), während das Defizit durch Oxydation, unvollständige Elution usw. verloren ging. Die durchgesickerte Lösung wurde im Vakuum (N_2) eingeeengt und von etwas Al_2O_3 filtriert. Sie lieferte beim Abkühlen ein Kristallinat, das aus Petroläther umgeschieden wurde. Schwerpunkte in Schwefelkohlenstoff: 507, 477 $\mu\mu$, in Benzin: 477, 446 $\mu\mu$ (fast genau das Spektrum des α -Carotins).

Wir haben den obigen Versuch mit 100 mg reinstem β -Carotin auf Al_2O_3 wiederholt, konnten aber mit unseren Materialien selbst nach sechsmaliger, rasch ausgeführter Chromatographie nur eine ganz belanglose Zone unten erhalten, die das Spektrum des Pseudo- α -carotins besaß. Die opt. Schwerpunkte des zurückgewonnenen β -Carotins waren unverändert und scharf ausgeprägt.

Es wird im hiesigen Institut geprüft, inwiefern die spontane Isomerisierung von Polyenen eine cis-trans-Erscheinung ist und dem Verhalten des Azobenzols ähnelt (S. 24).

A. Beispiele zur Verarbeitung von Pflanzen-carotinoiden.

(Vgl. auch Tabelle 11, S. 128 und 12, S. 135.)

Trennung von α -, β - und γ -Carotin.

Nach KARRER und WALKER (1) gelingt die Trennung der Carotine am besten auf käuflichem, fein gemahlenem, gelöschtem Kalk, z. B. in Petrolätherlösung. Reihenfolge von oben nach unten: γ -, β -, α -Carotin (s. auch KARRER und SCHLIENTZ). Das Lycopin steht noch höher als γ -Carotin.

KUHN und BROCKMANN (8) haben aus einem *Karotten-Handelspräparat*, dessen Pigment etwa 15% α -, 85% β - und 0,1% γ -Carotin enthalten hat, das in 1000facher Verdünnung vorgelegene γ -Carotin folgendermaßen isoliert: Das dreimal aus Benzol + Methanol und dann aus Benzol + Benzin umkrystallisierte und vor jeder Umscheidung zweimal mit reinstem Methanol ausgekochte Ausgangsmaterial (3 g) wurde in 300 cm³ reinstem Benzol gelöst, mit 900 cm³ reinem Benzin (Siedep. 70—80°) verdünnt und durch eine Säule aus Fasertonerde (17 × 5 cm; 500 g) filtriert. Das γ -Isomere bleibt am stärksten haften, während die übrigen rascher abwärts wandern. Man wäscht z. B. mit 1 l Benzol + Benzin (1 : 4) so lange nach, bis sich eine deutlich abgegrenzte, rötliche Zone von γ -Carotin gebildet hat und die tiefer liegenden Bezirke der Säule nur noch schwach angefärbt sind. Man eluiert die rotgelbe Schicht, unter Verwerfung der Ränder, sofort mit methanolhaltigem Benzin, wäscht den Alkohol gründlich weg, trocknet und wiederholt die Adsorption samt nachfolgenden Operationen noch zweimal in einem kleineren Rohr. Schließlich saugt man das Eluat durch ein Glassinterfilter, dampft es im Vakuum ab, kocht den Rest zweimal mit Methylalkohol aus und krystallisiert das Ungelöste aus wenig Benzol + Methanol (1 : 1) um. Rohausbeute 1 mg γ -Isomeres pro Gramm Gesamtcarotin. Zur Reinigung wurde dreimal aus Benzol + Methanol (2 : 1) umkrystallisiert; man kocht jedesmal mit Methanol aus und wäscht die Krystalle mit Petroläther.

Kryptoxanthin aus Mais (KUHN und GRUNDMANN 5).

Das sehr fein gemahlene und gebeutelte Mehl wurde abwechselnd, einige Male mit Alkohol und mit Benzin ausgezogen

und der Gesamtfarbstoff aus den vereinigten Extrakten mit Wasser in Benzin getrieben, welcher den Zeaxanthin-Gehalt an 90proz. Methanol abgab. Nun wurde die Lösung verseift (5proz. methanolisches KOH, 4 Stunden, 35°), mit 90proz. Methanol ausgeschüttelt, gewaschen, getrocknet und auf aktiviertem Al_2O_3 chromatographiert (Entwickeln mit Benzin + Benzol 1 : 1). Eine geringe gelbe Carotinzone ging in das Filtrat, während das Kryptoxanthin als allmählich sich ausdehnende, nur langsam wandernde, orangegelbe Schicht haften blieb. Durch Elution mit Alkohol läßt sich z. B. 1 mg Kryptoxanthin aus 700 g gelbem, italienischem Mais krystallisiert erhalten. Das Verfahren ist auch zur colorimetrischen Bestimmung geeignet (Messung gegen Azobenzol, S. 113).

Isolierung von Taraxanthin aus dem Rohkrystallisat der *Taraxacum-officinale*-Xanthophylle (K UHN und LEDERER 2).

Dieses Beispiel soll zeigen, wie die *spektroskopische* Messung wegleitend sein kann, falls in der Säule mehrere Pigmentkomponenten zu einer gemeinsamen Zone sich vereinigt haben. 40 mg Farbstoff wurden in 25 cm³ Benzol + 75 cm³ Benzin gelöst und durch CaCO_3 (15 × 10 cm) gesaugt. Nach dem Entwickeln mit 2 l Solventgemisch hat man die einheitliche, 100 mm hohe Farbscheibe willkürlich in 5 Abschnitte zerteilt, deren Polyen das folgende Spektrum zeigte:

Oben:	502, 472 $\mu\mu$	(in Schwefelkohlenstoff gemessen),
	502, 469 $\mu\mu$	(,, ,, ,,),
	504, 471 $\mu\mu$	(,, ,, ,,),
	507, 474 $\mu\mu$	(,, ,, ,,),
unten:	508, 475 $\mu\mu$	(,, ,, ,,).

Das Methanol-eluat der beiden oberen Bezirke wurde unter Benzin mit Wasser ausgefällt und der Farbstoff, wie beschrieben, nochmals chromatographiert:

Oben:	501, 474 $\mu\mu$	(CS_2),
	501,5, 470 $\mu\mu$,	
	501,5, 469 $\mu\mu$,	
	501, 469 $\mu\mu$,	
unten:	500,5, 468 $\mu\mu$.	

Man sieht, daß das Lutein (508, 475 $\mu\mu$) bereits entfernt ist. Der Farbstoff aus der 2. bis 5. Zone wurde wie oben an-

gegeben gefällt und aus Methanol umkrystallisiert. Ausbeute: 8 mg Taraxanthin. Zur weiteren Prüfung der Einheitlichkeit diente wieder die Chromatographie; mit Ausnahme einer belanglosen oberen Zone (500, 473 $\mu\mu$) war das Präparat nun einheitlich (vier empirisch gewählte Bezirke: 501, 468,5 $\mu\mu$, in CS_2).

Isolierung der Paprika-farbstoffe.

Als Beispiel dafür, wie man einen verwickelt zusammengesetzten Naturstoff mit Hilfe mehrerer Ausführungsformen der Chromatographie studieren kann, deren Ergebnisse sich gegenseitig ergänzen und kontrollieren, sei die Aufteilung des *Capsicum-annuum*-Pigments beschrieben. Es wurden vier Wege befolgt (ZECHMEISTER und CHOLNOKY 2):

a) Bezüglich der Chromatographie von Rohkrystallisaten des Capsanthins sei, was Einzelheiten betrifft, auf das Original verwiesen; dieser Arbeitsgang erbrachte die Isolierung von *Capsanthin*, *Capsorubin*, *Zeaxanthin* und *Lutein*.

Ohne Anwendung der Adsorptionsanalyse kommt man zwar zu schön aussehenden und scheinbar einheitlichen Capsanthin-Präparaten, die aber in Schwefelkohlenstoff, auf Calciumcarbonat z. B. das folgende Bild zeigen (links Dicke der Zonen in mm):

7 rotbraun	} nicht krystallisierbar,
3 rot	
2 dunkelviolet	: Capsorubin,
3 kanariengelb	: unbekannt,
28 violettrot	: Capsanthin,
1 gelb	} unbekannt,
1 violett	
1 gelb	
1 dunkelviolet	
4 zitronengelb	
9 orangegelb	: Xanthophylle,
3 hellrosa	: unbekannt.

b) Adsorptionsanalyse von verseiften Gesamtextrakten. 200 g Paprikahäute wurden mit 1,5 l leichtem Petroläther perkoliert und der Auszug, nach dem Überführen in Äther, mit methanolischem Kali verseift. Der Abdampfrückstand des alkalifrei gewaschenen Äthers lieferte in CS_2 , auf $CaCO_3$ (10 Rohre) das folgende Bild:

5	braun,
20	rötlichbraun,
0,2	gelber Strich,

- 5 violett: Capsorubin,
- 5 kanariengelb (in CS₂: 508, 476 $\mu\mu$; in Äther mit HCl blau),
- 20 violett: Capsanthin,
- fünf verschiedenfarbige, dünne Striche,
- 5 orangegelb: Zeaxanthin,
- 0,2 violett,
- 10 orangegelb: Kryptoxanthin,
- im Filtrat: Carotin.

Das Herauslösen mit alkoholhaltigem Äther, Verdampfen und Umkrystallisieren ergab aus den zehn entsprechenden Zonen: 150 mg reines *Capsanthin* und 18 mg *Zeaxanthin*. Die zehn Capsorubinschichten wurden ebenso behandelt, nur mußte man das Endprodukt noch einmal in CS₂ aufnehmen und auf CaCO₃ unterteilen: jetzt bildete das *Capsorubin* die Hauptzone und war lediglich von einem dünnen Capsanthin-Strich, der tiefer lag, begleitet. Es wurde eluiert, in Äther übergeführt und nach dem Abdampfen aus CS₂ umkrystallisiert. Auch der Farbstoffinhalt der *Kryptoxanthin*-Zonen mußte ein zweites Mal, aus Benzin chromatographiert werden, wozu CaCO₃ diente (grob:fein = 10:1). Die Hauptmenge des Kryptoxanthins blieb als eine sehr breite, gelborange Zone hängen, darüber sah man etwas Zeaxanthin, tief unten ein wenig Carotin. Nach der Elution des Mittelteiles wurde eine dritte Adsorption vorgenommen (CaCO₃ 7:3) und das nach der Verwerfung der Grenzbezirke gewonnene Eluat in Benzol übergeführt. Wird diese Lösung öfters mit destilliertem Wasser geschüttelt, auf 2 cm³ eingedampft und mit 10 cm³ Methanol versetzt, so erscheinen 20 mg Kryptoxanthin.

c) **Chromatographie des nativen Farbwachses, mit nachfolgender Verseifung einzelner Komponenten.** Das frische, fleischige Ausgangsmaterial wurde unter CO₂, in Alkohol entwässert, getrocknet, vermahlen und das Pulver (20 g) mit 500 cm³ Benzin (Siedep. 70—80°) bei 50° erschöpft. Chromatogramm auf CaCO₃ (1/4 fein; drei Rohre):

- Fünf dünne Striche: wohl Oxydationsprodukte,
- 2 gelb,
- 5 violett
- 25 heller violett } Ester des Capsorubins,
- 20 dunkelvioletrot: Capsanthinester-gemisch,
- 2 hellgelb: unbekannt,
- vier zwirndünne Striche,
- Filtrat: rötlichgelb.

Die Grenzlinie zwischen fixierten und durchgelassenen Pigmentanteilen liegt bei dieser Ausführungsform der Analyse ganz anderswo als bisher, indem der Hauptanteil der Zeaxanthin-ester in das Filtrat gelangt und dort von dem Lutein- und Kryptoxanthin-Farbwachs, nebst Carotin begleitet wird.

Die hängen gebliebenen Hauptzonen wurden mit sprithaltigem Petroläther eluiert. Aus der 20-mm-Scheibe ließ sich ein kristallisiertes Gemisch von *Capsanthin-estern* erhalten, das von Alkali in ein schönes Capsanthin-Präparat verwandelt wird, aus welchem chromatographisch nur noch ein wenig Zeaxanthin herauszuholen war. Der Farbstoffinhalt der 5 + 25-mm-Zonen war nicht deutlich kristallinisch, er lieferte jedoch nach erfolgter Verseifung wohlkristallisiertes *Capsorubin*. — Das durch die Säule gelaufene, rötlichgelbe Filtrat wurde ebenfalls alkalisch behandelt und dann für sich chromatographiert (CaCO_3 , CS_2):

- 10 gelb: unbekannt,
- 20 orangegelb: Zeaxanthin,
- 30 orangegelb: Kryptoxanthin.

Die beiden letzten Komponenten kristallisieren leicht. Durch die Säule ging hier nur der Polyen-kohlenwasserstoff-Anteil, welcher, nachdem im Calciumhydroxyd-Chromatogramm (Benzin) eine Spur unbekanntes Farbstoffes entfernt wurde, kristallisiertes *β -Carotin* liefert.

d) **Chromatographie von verseiftem und re-esterifiziertem Polyenwachs.** Während bei der Aufteilung des nativen Farbwachses das Bild dadurch verwickelt werden kann, daß derselbe Polyen-alkohol mit verschiedenen Fettsäuren verknüpft vorliegt, erlangt man gewisse präparative Vorteile, wenn, nach erfolgter Freilegung der Hydroxyle, von neuem eine Veresterung des gesamten Materials, aber jetzt mit einer einheitlichen Säure, durchgeführt wird. Erst dann schreitet man zur Chromatographie und gelangt leicht zu guten Präparaten. Die in der Säule beobachtete Reihenfolge der Carotinoide ist von der Wahl der angewandten Fettsäure unabhängig.

Eine Lösung, von 400 mg synthetisch aus Rohcapsanthin bereitetem Caprinatgemisch in 800 cm³ Benzin lieferte auf CaCO_3 das folgende Chromatogramm, nachdem mit Benzin reichlich nachentwickelt wurde (8 Rohre):

- 8 blaustichig rosa: Capsorubin-caprinat,
- 5 kanariengelb: unbekannt,
- 60 bräunlichrot: Capsanthin-caprinat,
- 10 braun: unbekannt,
- 10 zitronengelb: Zeaxanthin-caprinat.

Die Hauptzone wurde nochmals ebenso chromatographiert: es zeigte sich ein sprunghafter Fortschritt, indem keine Spur Zeaxanthinester mehr zugegen war. Nun hat man den Farbstoff mit methanolhaltigem Benzol eluiert und die ausgewaschene Lösung im Vakuum auf ein kleines Volumen gebracht. Nach Zusatz von 4 Raumteilen abs. Methanols krystallisierten innerhalb eines Tages 240 mg *Capsanthin-dicaprinat* aus. Schmelzp. 109° (korr.).

Quantitative Bestimmung der Paprika-farbstoffe

(CHOLNOKY 3).

Auf einem analytischen Glastrichter (Schott und Gen., Jena, Durchmesser 5 cm) wird ein kleiner Wattebausch festgedrückt, auf welchen 1—3 g mehlfein gemahlene Paprikahaut geschichtet wird. Man extrahiert die Farbstoffe durch öfteres Aufgießen von je 5 cm³ heißem Benzin (Siedep. 60—80°), insgesamt etwa 200 cm³, und wartet in jedem Falle 5 Minuten, bevor die nächste Portion des Lösungsmittels eingeführt wird. Läuft die Flüssigkeit nach 10 Minuten Warten und Aufgießen von frischem Benzin farblos ab, so ist die Extraktion beendet. Zur Chromatographie füllt man ein Rohr (20 × 4,5 cm) mit zwei Adsorbentien: die untere Hälfte mit Calciumhydroxyd, die obere mit Calciumcarbonat ($\frac{1}{5}$ fein, vgl. S. 44). Nachwaschen mit 500—700 cm³ Benzin, bis die folgende Aufteilung schön sichtbar wird (Abb. 56, S. 292):

Mehrere braune und gelbe, haardünne Striche,	}	auf CaCO ₃ ;
5 rot,		
5 rot: Capsorubin-ester,		
mehrere gelbe und rote Striche,		
30 rot: Capsanthin-ester,		
10 rotbraun,	}	auf Ca(OH) ₂ .
1 gelb,		
5 orangegelb: Zeaxanthin-ester,		
2 zitronengelb,		
5 orangegelb: Kryptoxanthin-ester,		
2 zitronengelb,		
$\frac{1}{2}$ orangegelb: γ -Carotin (?),		
10 orangegelb: β -Carotin,		
$\frac{1}{2}$ ockergelb: α -Carotin,		
2 zitronengelb.		

Man zerschneidet die Säule (die Carotine bleiben zusammen), eluiert mit sprithaltigem Benzin, wäscht den Alkohol weg, verdünnt entsprechend und colorimetriert gegen Azobenzol (S. 113). Die Capsorubinwerte schwanken um 10—20%, sonst ist das Ergebnis recht genau.

Isolierung von Lycoxanthin $C_{40}H_{55}OH$ und Lycophyll $C_{40}H_{54}(OH)_2$ neben viel Lycopin $C_{40}H_{56}$.

17 kg frische *Solanum-dulcamara*-Beeren (Bittersüß) wurden in 200-g-Anteilen mit Seesand zu einer dünnen Paste verrieben, die man absaugt und zweimal mit Alkohol auf der Nutsche abdeckt. Nun folgt die Extraktion mit peroxydfreiem Äther, bis dieser farblos tropft. Die schwachgefärbten Auszüge sind weiter verwendbar (Gesamtbedarf 15 l Äther). Man wäscht die vereinigten Extrakte spritfrei, verjagt den Äther (Vakuum, N_2), dampft den Rückstand zweimal mit Benzol ebenso ab, nimmt ihn in 3 l warmem Benzol auf und filtriert nach dem Erkalten von etwas Harz (ein Verseifen ist überflüssig). Das Chromatogramm (30 Rohre mit je $20 \times 5,5$ cm Calciumhydroxyd) wird mit viel Benzol entwickelt, jedoch nur so lange, bis zwischen dem Lycopin und den höher liegenden Farbschichten eine breite weiße Zone entstanden ist. Scharfe Trennung aller Bestandteile ist hier noch unnötig.

- 3 braun: Autoxydiertes (ohne Spektrum),
 - 2 tiefbraun: Autoxydiertes (ohne Spektrum),
 - 5 rot: Lycophyll (503, 473, 444 $\mu\mu$, in Hexan),
 - 2 braun: nicht krystallisierbar,
 - 8 rot: Lycoxanthin (503, 473, 444 $\mu\mu$),
 - 2 gelblichrot: unbekannt (494, 461, 433 $\mu\mu$; Rubixanthin?),
 - 10 gelb: nicht geprüft,
 - 100 rot: Lycopin (503, 473, 444 $\mu\mu$),
 - 10 gelblichrot (493, 462, 432 $\mu\mu$, γ -Carotin?),
- hellgelbes Filtrat.

Die drei roten Farbstoffe wurden einzeln herausgeschnitten und mit Benzol + Methanol (3:1) auf Glasnutschen eluiert. Dies gelang leicht, mit Ausnahme des Lycophylls, von welchem die Hälfte im Kalk verblieben ist. Die Eluate wurden filtriert, gewaschen, getrocknet. Es war nötig, das rohe Lycophyll noch dreimal, das Lycoxanthin zweimal, das Lycopin einmal zu chromatographieren, bis sich Homogenität einstellte. Zum Schlusse

genügen für die beiden ersteren 1 bzw. 3 Rohre. Man verdampft die benzolischen Endeluat nach dem Waschen und Trocknen völlig, löst den Rest in wenig heißem Benzol, setzt abs. Methanol hinzu und erhält rote Nadelchen. Ausbeute 920 mg Lycopin, 125 mg Lycoxanthin (Schmelzp. 168°, korr.) und 9 mg Lycophyll (Schmelzpunkt 179°), nämlich: 77, 61 bzw. 13% der in den Beeren colorimetrisch bestimmten Mengen (ZECHMEISTER und CHOLNOKY 6).

Isolierung von Fucoxanthin $C_{40}H_{56}O_6$ aus Braunalgen (HEILBRON und PHIPERS).

50 kg *frisches*, zerkhacktes Material (*Fucus vesiculosus*) wurden zweimal $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde lang in je 50 l 40proz. Aceton eingelegt (häufig umrühren). Man saugt ab und entfernt die schleimige Flüssigkeit durch scharfes Abpressen. Nun wurde das fein zermahlene Material unter gelegentlichem Rühren 24 Stunden mit Holzgeist ausgezogen. Den filtrierten Extrakt (40 l) haben die Autoren, nach dem Verdünnen mit 10 l Wasser, mit Petroläther (Siedep. 40—60°) erschöpft (Extrakt „A“). Nach dem Zusatz von 1 Raumteil Wasser wurde nun die zurückgebliebene alkoholische Unterschicht ausgeäthert, der Äther gewaschen, entwässert, auf 2 l eingengt und schließlich durch Destillation mit 1 Raumteil Benzol vollends getrocknet.

Zur Chromatographie der Benzollösung (3 l) dienten 15 Rohre (50 × 5 cm), welche mit teilweise desaktiviertem (S. 43) Aluminiumoxyd gefüllt waren¹. Entwickeln mit Benzol + Petroläther 1:1, zum Schlusse Auswaschen mit Petroläther (Siedepunkt 40—60°). Es erschienen drei Zonen:

- Oben: tief olivgrün (verändertes Chlorophyll),
 crimsonrot (enthält das Fucoxanthin),
- unten: orange (Zersetzungsprodukte + wenig Fucoxanthin).

Die Mittelschicht wurde mit Methanol eluiert, die tiefrote Lösung mit 1 Vol. Wasser versetzt und zur Fernhaltung des Luftsauerstoffes mit einer dünnen Lage von Petroläther überschichtet. Der in der Grenzzone beim Stehen langsam ausgeschiedene, halbkristallinische Farbstoff ließ sich nach dem Absaugen im Vakuum über Natriumsulfat trocknen und aus Äther + Petroläther umschcheiden. Aggregate, aus tief orangeroten Nadeln be-

¹ Allzu aktives Adsorbens vereitelt die Trennung der Bezirke.

stehend, Schmelzp. 166—168° (unkorr.), Schwerpunkte in CS₂: 510, 477, 445 μ . Ausbeute 1—1,5 g *Fucoxanthin*; identisch mit dem Präparat von WILLSTÄTTER und PAGE.

Aus der untersten Zone wurde das Pigment in Petroläther übergeführt und auf Fullererde aufgeteilt. Man erhielt zwei Komponenten: die eine identisch mit *Fucoxanthin* (2 mg), die andere, nichtkrystallisierbar, vielleicht „ β -*Fucoxanthin*“.

Aus getrocknetem, altem Ausgangsmaterial konnte *kein Fucoxanthin* erhalten werden, sondern 2 g *Zeaxanthin*.

Der *Extrakt* „A“ wurde unter Stickstoff auf 3 l eingedampft und diese Petrolätherlösung in 12 Anteilen, auf partiell desaktiviertem Aluminiumoxyd chromatographiert:

- Oben: tief olivgrün (verändertes Chlorophyll),
 rötlichbraun (Pektine, Fucosterin, *Fucoxanthin*),
 crimsonrot (Fucosterin, *Fucoxanthin*),
 weiße Zwischenzone,
 bläulichgrün (Chlorophyll a),
 weiße Zwischenzone,
 unten: gelb (Hentriakontan, Terpene, β -Carotin).

Nachweis und Isolierung von Bakterien-carotinoiden.

Einschlägige, meist qualitative Beobachtungen stammen von PETTER (1, 2); CHARGAFF (1, 2), CHARGAFF und LEDERER; GAFRON (1, 2), VAN NIEL und SMITH; SCHNEIDER; s. auch FISCHER und HASENKAMP 1; SIEDEL, GRUNDMANN und TAKEDA; Zusammenfassendes: WILLSTAEDT 2; vgl. Tabelle 12, S. 135.

Am weitesten sind die Untersuchungen von KARRER und SOLMSEN (1, 2, 3, 6) gediehen, welche nachstehend referiert werden (s. auch KARRER, SOLMSEN und KOENIG sowie SOLMSEN).

Aus *Thiocystis*-bakterien, die zu den roten Schwefelbakterien gehören, konnte etwas Lycopin (oder sehr ähnliches), ferner Rhodoviolascin abgeschieden werden. Das Chromatogramm der restlichen Carotinoide gleicht weitgehend dem *Rhodovibrio*-Pigment (s. unten).

Zu *Großversuchen* diente eine Zucht von *Rhodovibrio*-bakterien (1200 l reife Nährlösung; Angaben über die Züchtung im Original), welche vielleicht auch kleine Mengen des *Bact. chromatium* enthielt.

Die mit Sprit verriebene und genutschte Bakterienmasse wurde im Soxhlet mit CS₂ erschöpft, der tiefrote Auszug im Vakuum verdampft und sein Rückstand mit Ligroin + Methanol auf-

genommen. Durch Zusatz von wenig Wasser wurde *entmischt*, wobei Bacterio-chlorophyll nach unten, das Polyen nach oben geht. Mit beiden getrennten Schichten wiederholt man öfters die Entmischung, wäscht dann die obere Phase und verdampft sie zur Trockene. Beim Entmischen fielen an der Grenzzone rote Krystalle aus, die gesondert in heißem Benzol gelöst wurden. Die letztere Lösung dient dazu, auch den erwähnten Trockenrückstand der Ligroinlösung aufzunehmen. Die so gewonnene Flüssigkeit überführt man zweckmäßig in Ampullen, wo man sie im Vakuum verdampft; der Rückstand wird bis zur Weiterarbeit zugeschmolzen. Man behandelt die letztere Substanz mit Petroläther, welcher einen Teil mit braunschwarzer Färbung löst und rohes *Rhodoviolascin* $C_{40}H_{54}(OCH_3)_2$ zurückläßt (aus Benzol zweimal umkrystallisiert: 20 mg; 573, 534, 496 $\mu\mu$, in CS_2).

Die Petrolätherlösung wurde auf Calciumhydroxyd aufgeteilt und mit demselben Solvent entwickelt. Das erste Chromatogramm ergibt folgende Schichtung (die Pfeile bedeuten weitere Reinigungsoperationen, die opt. Schwerpunkte beziehen sich auf CS_2):

Oben: braun	→	Rhodovibrin	556, 517 $\mu\mu$,
rotbraun	→	Rhodopin	547, 508 $\mu\mu$,
lachsrot	→	Rhodoviolascin	573, 534 $\mu\mu$,
rot	→	Rhodopurpurin	550, 511 $\mu\mu$,
dunkelgelb	→	β -Carotin (?)	521, 485 $\mu\mu$,
unten: hellgelb	→	Flavorhodin	502, 472 $\mu\mu$.

Das *Rhodopin* wurde mittels Petroläther + Methanol, eventuell unter Benzolzusatz, eluiert, die Flüssigkeit gewaschen und eingedampft. Umkrystallisieren aus Ligroin + wenig Benzol, dann aus abs. Alkohol. Das Rhodopin muß durch wiederholte Adsorption auf $Ca(OH)_2$ gereinigt werden (Entwickeln mit Petroläther + Benzol 1:1 oder 1:2). Trennt man selbst eine sehr weitgehend gereinigte Rhodopinzone willkürlich in drei gleiche Teile, so liefert das oberste Drittel *Rhodovibrin* (Krystalldrüsen, Schmelzp. 168°), während das unterste Drittel die Rhodopinfraktion ergibt. Durch wiederholtes Chromatographieren erhielten KARRER, SOLMSEN und KOENIG schließlich reines *Rhodopin*, Schmelzp. 171°.

Das *Rhodopurpurin* wurde aus der betreffenden Zone durch Eluieren, Überführen in Petroläther und Einengen erhalten. Nadeln, Schmelzp. 161—162°.

B. Beispiele für die Verarbeitung von tierischen Carotinoiden.

(Vgl. auch die Tabellen 13, S. 138 und 14, S. 140 sowie die Monographie von ZECHMEISTER 6).

Bestimmung des Lipochroms in der menschlichen Leber.

Das frische, gehackte und durch wiederholtes Einlegen in Weingeist entwässerte Material gibt über Nacht seine Carotinoide größtenteils an kalten Äther ab; der Rest wird der getrockneten und gemahlene Masse mit dem gleichen Solvent leicht entzogen. Man verseift die Lösung zweimal mit konz. methylalkoholischem Kali je 16—20 Stunden, unter Stickstoff, wäscht gut aus und löst den Abdampfrückstand der getrockneten Ätherschicht in Benzin. Nun folgt eine Entmischung mit Methanol, worauf die hypophasischen Bestandteile mit Hilfe von Wasser gleichfalls in Benzin übergeführt werden. Die beiden Benzinlösungen lassen sich in der Calciumhydroxyd-Säule aufteilen, die Einzelringe werden mit holzgeisthaltigem Äther eluiert. Den Abdampfrückstand des getrockneten Äthers nimmt man jeweils in Benzin auf und vergleicht seine Farbstärke mit Azobenzol (S. 113).

Der epiphassische Anteil zerfällt meist in zwei Ringe: oben Lycopin, darunter Carotin; auch das Chromatogramm des Hypophasischen ist im wesentlichen zweischichtig: oben Xanthophyll, unten unbekannte Zersetzungsprodukte. Eine spektroskopische Kontrolle wird erleichtert, wenn man die betreffende Farbschicht nochmals chromatographiert, die Bänder werden dann schärfer sichtbar. Gefunden z. B.: 1,6 mg Carotin, je 0,5 mg Lycopin bzw. Xanthophyll und 0,05 mg unbekanntes Polyen pro Kilogramm Frischleber (ZECHMEISTER und TUZSON 9).

Jüngst haben WILLSTAEDT und LINDQUIST durch Aufteilung in einer Aluminiumoxyd-Säule, nach einer grundsätzlich ähnlichen Methodik, Carotin, Lycopin, Zeaxanthin und Xanthophyll (vielleicht auch Violaxanthin) in der menschlichen Leber ermittelt. Daneben fanden sich unbekannte, farbige Komponenten vor (Abbauprodukte von Polyenen).

Chromatographie des Blutserum-lipochroms.

Im Blutserum zahlreicher Tiere sind Carotinoide enthalten, welche, nach Freilegung aus einer Paarung mit Eiweiß, adsorptions-

Tabelle 11. Beispiele für die Chromatographie von Polymeren aus höheren Pflanzen.
(Zunächst werden Polymen-kohlenwasserstoffe, dann Polymen-alkohole, Polymen-ketone und zum Schluß Farbstoffe mit weniger als C_{40} angeführt.)

Pflanze	Organ	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Daucus carota</i> (Mohrrübe)	Wurzel	α -, β -Carotin	Fasertonerde	Benzin	KUHN und LEEDERER (1)
<i>Daucus carota</i> (Mohrrübe)	Wurzel	α -, β -Carotin	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und WALKER (1)
<i>Daucus carota</i> (Mohrrübe)	Wurzel	α -, β -Carotin (unbekanntes Polymeren)	Fasertonerde	Petroläther	KARRER, SCHÖPP und MORF
<i>Daucus carota</i> (Mohrrübe)	Wurzel	α -, β -, γ -Carotin	Al_2O_3	Benzin, Benzol	KUHN und BROCKMANN (7, 8)
<i>Daucus carota</i> (Mohrrübe)	Wurzel, Blatt	α -, β -Carotin	MgO	Petroläther	STRAIN (1, 2)
<i>Daucus carota</i> (Mohrrübe)	Blatt	(Carotine)	Norit A	Dichlormethan	MACKINNEY und MILNER
<i>Aesculus hippocastanum</i> (Roßkastanie)	grünes und herbstliches Blatt	β -Carotin (unbekannte Polyene)	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und WALKER (2)
<i>Urtica dioica</i> (Brennnessel)	Blatt	α -, β -Carotin	$Ca(OH)_2$	Benzin	KARRER und SCHLIENTZ
<i>Capsicum annuum</i> (Paprika)	Frucht	α -Carotin	$Ca(OH)_2$	Benzin	KARRER und SCHLIENTZ

<i>Ipomoea batatas</i> (Batate)	Knolle	β -Carotin	Ca(OH) ₂	Benzin	MATLACK (2)
<i>Spinacia oleracea</i> (Spinat)	Blatt	α -, β -Carotin	Ca(OH) ₂	Benzin	KARRER und SCHLENTZ
<i>Spinacia oleracea</i> (Spinat, gekocht)	Blatt	β -Carotin	Al ₂ O ₃	Benzin	WILLSTAEDT und BEHRNTS- JENSEN (1)
59 verschiedene Pflanzen	Blatt	α -, β -Carotin	MgO	Petroläther	MACKINNEY (1)
<i>Palme</i>	Öl	α -, β -Carotin	MgO	Petroläther	STRAIN (1, 2)
<i>Acacia acuminata</i>	Holzöl	β -Carotin	Al ₂ O ₃	Benzin	TRIKOJUS und DRUMMOND
<i>Gonocaryum pyri- forme</i>	Frucht	α -, β -, γ -Carotin, Lycopin	Al ₂ O ₃ Fasertonerde	Petroläther Benzin	WINTERSTEIN (2, 3)
<i>Prunus armeniaca</i> (Aprikose)	Frucht	β -Carotin, Lycopin, (γ -Carotin)	Al ₂ O ₃	Benzin	BROCKMANN (1)
<i>Tagetes erecta</i>	Blüte	(Lycopin), (Caro- tin)	CaCO ₃	Petroläther	COWARD
<i>Citrus grandis</i> (Pink grapefruits)	Frucht	β -Carotin, Lycopin	Fasertonerde	Benzin	MATLACK
<i>Solanum dulcamara</i> (Bittersüß)	Beere	Lycopin, Lycopan- thyll, Lycocoxan- thin	Ca(OH) ₂	Benzol	ZECHMEISTER und CHOLNOKY (6)
<i>Tropaeolum, Kirsche, Kastanie</i>	grüne und gel- be Blätter	(Xanthophyll), (Xanthophyll- ester), (Carotin)	CaCO ₃	Benzin	KUHN und BROCK- MANN (3)

Pflanze	Organ	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Physalis Franchetti</i> (Judenkirsche)	grüne, gelbe und rote Kelchblätter; alter Kelch; Fruchtfleisch; grüne und vergilbte Blätter	(Xanthophyll), (Physalien), (Carotin)	CaCO ₃	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)
<i>Genista tridentata</i>	Blüten	β-Carotin, Lutein	Al ₂ O ₃	Benzin	SCHÖN und MESQUITA
<i>Aesculus hippocastanum</i> (Roßkastanie)	gelbe Blätter	β-Carotin, ein Xanthophyll (unbekannte Farbstoffe)	Ca(OH) ₂	Petroläther	KARRER und WALKER (2)
<i>Citrus aurantium</i> (Orange)	Schale und Fruchtfleisch	„Carotin“ und „Xanthophyll“			VERMAST
Weizen	Korn	„Xanthophyll“	Al ₂ O ₃	Petroläther	MALMBERG und EULER
Weizen	Keimöl	Lutein, Kryptoxanthin	Al ₂ O ₃	Petroläther	DRUMMOND, SINGER und MACWALTER
Roggen	Keimöl	(α-, β-Carotin, Lutein, Zeaxanthin)	MgO, Al ₂ O ₃ , Zucker	Petroläther	SCHUETTE und PALMER
<i>Lycopersium esculentum</i> (Tomate)	Frucht	Lycopin, Carotine, Zeaxanthin, Lutein	Al ₂ O ₃ , CaCO ₃	Benzin	KUHN und GRUNDMANN (1)

<i>Physalis Franchetii</i>	Kelchblatt, Beere	Zeaxanthin, Kryp- toxanthin (ver- estert)	Al ₂ O ₃	Benzol + Benzin	KUHN und GRUND- MANN (3)
<i>Zea mays</i> (Mais)	Korn	Zeaxanthin, Kryp- toxanthin	Al ₂ O ₃	Benzol + Benzin	KUHN und GRUND- MANN (5)
<i>Rosa rugosa</i>	Frucht	Rubixanthin, („Xanthophylle“, Lycopin, α-, β-, γ- Carotin)	Al ₂ O ₃	Benzol + Benzin	WILLSTAEDT (5)
<i>Rubus chamaemorus</i> (Torfbeere)	Beere	Zeaxanthin, neues Xanthophyll (β-, γ-Carotin, Rubi- xanthin, Lycopin [?], Kryptoxan- thanthin [?])	Al ₂ O ₃ Ca(OH) ₂	Benzin, Benzol	WILLSTAEDT (9)
<i>Vaccinium vitis</i> <i>idaea</i> (Preißel- beere)	Beere	(Lycopin, β-Carotin oder Kryptoxan- thanthin, Zeaxanthin, Xanthophyll)	Al ₂ O ₃ Ca(OH) ₂	Benzin, Benzol	WILLSTAEDT (8)
<i>Cuscuta subinclusa</i> , <i>C. salina</i>	Blüte	Rubixanthin, Lycopin, α-, β-, γ-Carotin	MgO	Petroläther	MACKINNEY (2)
<i>Leonodon autumn-</i> <i>nalis</i>	Blütenblätter	Lutein, Taraxan- thin	CaCO ₃		KUHN und LEDE- RER (5)
<i>Rosa rubinosa</i>	Frucht	Rubixanthin (α-, β- Carotin, Zeaxan- thanthin, Lutein, Ta- raxanthin)	Al ₂ O ₃	Benzol, Benzin	KUHN und GRUND- MANN (4) s. auch WILLSTAEDT und WITH (1)

Pflanze	Organ	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Blatt	Lutein, Violaxanthin	CaCO ₃	CS ₂	KUHN, WINTERSTEIN und LEDERER
<i>Cucurbita maxima</i> (Riesenkürbis)	Frucht	α-, β-Carotin, Lutein, Violaxanthin	Ca(OH) ₂ CaCO ₃	Benzin, CS ₂	ZECHMEISTER und TUZSON (3)
<i>Rhabarber, Platane, Pappel, Buche, Ahorn, Birke, Trauerweide</i>	grüne und gelbe Laubblätter	(Violaxanthin, Zeaxanthin, Lutein und deren Ester, Carotin)	CaCO ₃	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)
<i>Helianthus annuus</i> (Sonnenblume)	Blütenblatt	Lutein, Taraxanthin (Carotin, Kryptoxanthin, Violaxanthin?)	CaCO ₃	CS ₂	ZECHMEISTER und TUZSON (2)
<i>Taraxacum officinale</i> (Löwenzahn)	Blütenblatt	Taraxanthin, Lutein (Violaxanthin?)	CaCO ₃	Benzin	KUHN und LEDERER (2)
<i>Ranunculus acer</i> (Hahnenfuß)	Blütenblatt	Lutein, Taraxanthin, Violaxanthin, Flavoxanthin (β-Xanthophyll?)	CaCO ₃	Benzin	KUHN und BROCKMANN (5)
<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)	Blüte	Carotin, Lutein (iso?), Viola- und Taraxanthin	Al ₂ O ₃ CaCO ₃	Petroläther Benzol + Petroläther	SCHÖN

<i>Citrus madurensis</i> (Mandarine)	Frucht	β -Carotin, Kryptoxanthin, Lutein, (Violaxanthin?)	CaCO_3 Ca(OH)_2	Benzin, CS_2	ZECHMEISTER und TUZSON (13)
<i>Diospyros costata</i>	Frucht	(α -), β -Carotin, Zeaxanthin, Lycopin, Zeaxanthin und Violaxanthin	Al_2O_3 CaCO_3	Petroläther, CS_2	SCHÖN
<i>Arbutus unedo</i>	Frucht	α - und β -Carotin, (Lycopin), Kryptoxanthin, Zeaxanthin, Zeaxanthin, Lutein	Al_2O_3	Petroläther	SCHÖN
<i>Cucurbita pepo</i> (Kürbis)	Blütenblatt	Petaloxanthin, Kryptoxanthin, Zeaxanthin, Lutein, Carotin	CaCO_3	CS_2	ZECHMEISTER, BÉRES und UJHE- LYI (1, 2)
<i>Eschscholtzia californica</i>	Blütenblatt	Eschscholtzoxanthin, (Flavo- Zeaxanthin, Lutein, Carotin)	MgO , Siliciumerde	1,2-Dichlor- äthan	STRAIN (7)
<i>Thuja</i> usw.	Blatt	(Rhodoxanthin, Carotin, Xanthophyll)	CaCO_3	Benzin CS_2	LIPMAA
<i>Taxus baccata</i> (Eibe)	Arillus	Rhodoxanthin, Lycopin, β -Carotin, Zeaxanthin	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCK- MANN (9)

Pflanze	Organ	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Capsicum annuum</i> (Paprika)	Fruchthaut	Capsanthin, Capso- rubin, Zeaxan- thin, Lutein, Kryptoxanthin, α -, β -Carotin	CaCO_3 Ca(OH)_2	CS_2 Benzin	ZECHMEISTER und CHOLNOKY (3, 4)
<i>Lilium tigrinum</i>	Staubbeutel	Capsanthin, Antera- xanthin	Ca(OH)_2	Benzol	KARRER und Os- WALD (1)
<i>Citrus aurantium</i> (Orange)	Fruchtschale	Citraurin, Viola- xanthin, Lutein, Zeaxanthin, Kryptoxanthin, (Carotin)	CaCO_3 Ca(OH)_2	CS_2 Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (14, 15), TUZSON (2)
<i>Crocus sativus</i> (Safran)	Blütenblatt	Crocein, α -, β -, γ - Carotin, Lycopin, Zeaxanthin	Al_2O_3	Benzin	KUHN und WINTER- STEIN (4)
<i>Escobedia scabrifolia</i> u. <i>E. linearis</i> (Azafranillo)	Wurzel	Azafrin	CaCO_3	Benzol Benzin	KUHN und DEUTSCH
<i>Bixa orellana</i> (Orlean)	Samen	„Bixol“	Al_2O_3		BACHSTEZ und CAVALLINI
<i>Gingko biloba</i>	gelbe Herbst- blätter	(unbekannte Poly- ene)	Ca(OH)_2	Petroläther	KARRER und WAL- KER (2)
<i>Ulmus campestris</i>	grüne Herbst- blätter	(unbekannte Poly- ene)	Ca(OH)_2	Petroläther	KARRER und WAL- KER (2)
<i>Eloдея canadensis</i> (Wasserpest)		Carotin, Eloxanthin	Al_2O_3	Benzol + Benzin	HEY

Tabelle 12. Beispiele für die Chromatographie von Algen, Pilz- und Bakterien-Polyenen.

Ausgangsmaterial	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Fucus vesiculosus</i>	Fucoxanthin, Zeaxanthin, β -Carotin	Al_2O_3	Petroläther	HEILBRON und PHIPERS
<i>Cladophora sauteri</i> <i>Nitella opaca</i>	β -Carotin, Lutein, Taraxanthin	$CaCO_3$, Al_2O_3	Benzol, Benzin	HEILBRON, PARRY und PHIPERS
<i>Oscillatoria rubrescens</i>	Myxoxanthin, Myxoxanthophyll	$CaCO_3$, Al_2O_3	Chloroform Benzin	HEILBRON und LYTH-GOE
<i>Oedogonium</i>	α -, β -Carotin, Lutein, Taraxanthin	$CaCO_3$, Al_2O_3	Benzol, Benzin	HEILBRON, PARRY und PHIPERS
<i>Rhodomyenia palmata</i>	β -Carotin, Lutein, Taraxanthin	$CaCO_3$, Al_2O_3	Benzol, Benzin	HEILBRON, PARRY und PHIPERS
<i>Englena heliorubescens</i>	Euglenarhodon, (β -Carotin, Lutein, Zeaxanthin, verestert)	Al_2O_3	Äther	TISCHER (1)
<i>Trentepohlia iolithus</i>	α -, β -Carotin (Lutein, Zeaxanthin)	Al_2O_3 , $Ca(OH)_2$	Benzin	TISCHER (2)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Hämatoxanthin, Euglenarhodon, Lutein (Zeaxanthin), Dipalmitat und andere Ester; α -, β -Carotin	$CaCO_3$, $Ca(OH)_2$, Al_2O_3	Benzin Benzin + Äther Chloroform	TISCHER (3)

Ausgangsmaterial	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	β -Carotin, Aphanin, Aphanicin, Flavacin, Aphanizophyll	Al_2O_3 , $Ca(OH)_2$, $N_2S_2O_4$	Benzin, Äther	TISCHER (4)
<i>Cantharellus cibarius</i> (Pifferling), <i>C. lutescens</i> , <i>C. infundibuliformis</i>	β -Carotin (α -Carotin, Lycopin, γ -Carotin ?)	Al_2O_3 , $CaCO_3$	Benzin, Benzol	WILLSTAEDT (10)
<i>Torula rubra</i> (rote Hefe)	Torulen, β -Carotin	Al_2O_3	Benzin	LEDERER (4)
<i>Spirillum rubrum</i>	unbekanntes Polyein, Spirilloxanthin	MgO , Silicaerde	Dichloräthan	VAN NIEL und SMITH
<i>Sarcina lutea</i>	(Sarcenin, Xanthophyll)	Al_2O_3	Benzin	CHARGAFF und DIERYCK
<i>Pilobolus Kleinii</i> , <i>Phycomyces Blakesleanus</i>	β -Carotin	CaO	Benzin, CS_2	BÜNNING (1, 2)
<i>Sarcina lutea</i>	(Sarcenin, ein Xanthophyll)	Fasertonerde	Benzin	CHARGAFF (1)
<i>Sarcina aurantiaca</i>	β -Carotin, Zeaxanthin	Al_2O_3	Benzin	CHARGAFF (1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Zeaxanthin	Al_2O_3	Benzin	CHARGAFF (1)

<i>Mycobacterium phlei</i>	β - und γ -Carotin, Lutein	Al_2O_3	Benzin	CHARGAFF (1)
<i>Mycobacterium phlei</i>	α -, β -Carotin, Kryptoxanthin (Lutein-, Zeaxanthin- und Azafrinester)	MgO	Petroläther	INGRAHAM und STEENBOCK
<i>Rhodovibrio-bakterien</i>	Rhodoviolascin, Rhododopin, Rhodopurpurin, Flavohodin, β -Carotin, Lycopin, Rhodovibrin	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und SOLMSEN (1, 2, 3, 6) KARRER, SOLMSEN und KOENIG SOLMSEN
<i>Bacterium halobium</i>	α - und β -Bacterioruberin	$CaCO_3$	CS_2	PETTER (1, 2)
<i>Thiocystis-bakterien</i>	Lycopin, Rhodoviolascin	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und SOLMSEN (1, 2, 3, 6); SOLMSEN
<i>Bacillus Lombardo Pellegrini</i>	(β - und γ -Carotin)	Al_2O_3 , $CaCO_3$	Benzin usw.	CHARGAFF und LEDERER
<i>Bacillus Grassbergeri</i>	(β - und γ -Carotin, Lycopin, Xanthophyll)	Al_2O_3 , $CaCO_3$	Benzol, Benzin	CHARGAFF und LEDERER
Säurefeste Bakterien [aus infektiösem Material von Leprakranken]	Leptrotin	Al_2O_3	Benzin	GRUNDMANN und TAKEDA

Tabelle 13. Beispiele für die Chromatographie von Polyenen des menschlichen Organismus.

Rohstoff	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Blutserum	(Lycopin, Carotin, Xanthophylle)	Ca(OH) ₂	Benzin	DÁNIEL und SCHEFF; DÁNIEL und BÉRES
Blutserum	(Carotine, Xanthophylle)	Al ₂ O ₃	Benzin	SÜLLMANN, SZÉCSÉNYI-NAGY und VERZÁR
Blutserum	(Carotin, Lycopin, Zeaxanthin, unbekanntes Xanthophyll)	Al ₂ O ₃	Benzin	WILLSTAEDT und LINDQUIST
Blutserum	(Carotine, Kryptoxanthin)	Al ₂ O ₃	Petroläther	VAN VEEN und LANZING
Blutserum	(β-Carotin, Xanthophylle)	Al ₂ O ₃	Benzin + Benzol	WILLSTAEDT und WITTH (1)
Milch	(β-Carotin, Xanthophylle)	Al ₂ O ₃	Benzin + Benzol	WILLSTAEDT und WITTH (2)
Leber	(Carotin), (Lycopin), (Xanthophyll)	Ca(OH) ₂	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (9)
Leber	(Carotin, Lycopin, Zeaxanthin, Lutein, Violaxanthin)	Al ₂ O ₃	Benzin	WILLSTAEDT und LINDQUIST
Depotfett	β-Carotin (Lycopin, Capsanthin, Xanthophyll)	Ca(OH) ₂	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (8)
Placenta	(Xanthophylle, Xanthophyllester, Carotin)	CaCO ₃	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)
Faeces	(Carotin, Xanthophyll)	Al ₂ O ₃	Benzin	VAN EEKELN und PANNEVIS

analytisch aufgeteilt und bestimmt werden können. Die ältesten, wichtigen Versuche dieser Art stammen von PALMER und ECKLES und betreffen das zirkulierende Lipochrom der Kuh, in

welchem GILLAM und EL RIDI (1, 2) neben viel Carotin auch etwas Lutein und Kryptoxanthin (sowie Vitamin A) feststellten. Im Pferdeserum wurde vorwiegend Carotin chromatographisch nachgewiesen, nebst farbigen Abbauprodukten der Nahrungspolyene (ZECHMEISTER und TUZSON 10).

Aufteilung der menschlichen Blutserum-carotinoide. Die in der Literatur zuweilen vorgenommene Auswertung des ätherlöslichen Serumfarbstoffes als „Carotin“ ist nach neueren Untersuchungen auch hier unrichtig (DÁNIEL und SCHEFF; DÁNIEL und BÉRES). Vielmehr muß mit dem Gesamtpolyen eine Entmischung und, namentlich wenn das farbkräftige Lycopin von der Diät nicht ausgeschlossen war, auch die Chromatographie vorgenommen werden, da sonst die Provitamin-A-Werte viel zu hoch ausfallen. 31 menschliches Blutserum wurden mit 1 Raumteil Alkohol gefällt und der abzentrifugierte Niederschlag mit peroxydfreiem Äther erschöpft. Man verseifte den Extrakt mit methanolischem Kali während 2 Tage, unter N₂ und entmischte das in Benzin übergeführte Pigment mit 90proz. Holzgeist. Das Epiphasische wurde, nach dem Ausfrieren von viel Cholesterin, auf Calciumhydroxyd chromatographiert, mit nachfolgender Mikrocolorimetrie der Bestandteile.

Oben: gelblichbraun: unbekannt (0,3 mg, als „Carotin“ berechnet),
rosafarbig: Lycopin (0,15 mg),
hellgelb: unbekannt (0,08 mg),
unten: orangegelb: β - (und α -) Carotin (0,28 mg).

Der hypophasische Anteil enthielt 0,84 mg „Lutein“.

Es folgt aus diesen Angaben, daß, falls bei klinischen Untersuchungen nur eine, zur Adsorptionsanalyse unzureichende Blutmenge verfügbar ist, genaue Carotinwerte nicht ermittelt werden können.

Nach WILLSTÄEDT und LINDQUIST genügt hierzu 140—250 cm³ Blutserum. Diese Autoren dampfen die Ätherextrakte im N₂-Strom ein, nehmen den sterinreichen Rückstand in Petroläther auf und schütteln die Lösung mit 90proz. Methanol aus. Die Chromatographie beider Fraktionen wird aus Benzin + Benzol auf Aluminiumoxyd vorgenommen. Elution und Mikrocolorimetrie der abgetrennten Komponenten, wie üblich.

Im epiphasischen Anteil wurde Carotin (Menge etwa wie

Tabelle 14. Beispiele für die Chromatographie von tierischen Polyenen.

Tier	Organ usw.	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Kuh</i>	Blutserum	(Carotin, Xanthophyll)	CaCO ₃	CS ₂	PALMER und ECKLES
<i>Kuh</i>	Talg	Carotin	Ca(OH) ₂	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (1)
<i>Kuh</i>	Corpus luteum	(α -, β -Carotin)	CaCO ₃	Benzin	KARER und SCHLIENTZ
<i>Kuh</i>	Corpus rubrum	β -Carotin	Fasertonerde + Al ₂ O ₃		KUHN und BROCKMANN (3)
<i>Kuh</i>	Milch	(Lycopin, Carotin)	Al ₂ O ₃	Benzin + Benzol	VAN WILSTAEDE und WITTH (1, 2)
<i>Kuh</i>	Butter	Xanthophyll (Lutein), Zeaxanthin, Carotin, (Vitamin A)	CaCO ₃ , Al ₂ O ₃	Petroläther	KARER und SCHÖPP (1)
<i>Kuh</i>	Butter	(Carotin, Lycopin, Xanthophyll, Kryptoxanthin)	Al ₂ O ₃	Benzin	GILLAM und HEILBRON (1)
<i>Kuh</i>	Butter	β -Carotin	MgO + Hyflo Supercel	Benzin	GILLAM und EL RIDI (4)
<i>Kuh</i>	Butter	(Carotin, Xanthophyll)	CaCO ₃	CS ₂	PALMER und ECKLES

<i>Kuh</i>	Mist	(Carotin, Xanthophyll)	CaCO ₃	CS ₂	PALMER und ECKLES
<i>Rind</i>	Netzhaut	(β -Carotin)	Al ₂ O ₃	Benzin	BRUNNER, BARONI und KLEINAU
<i>Ochs</i>	Blutserum	(β -, α -Carotin)	Al ₃ O ₃	Benzin + Benzol	WILLSTADT und WITB
<i>Schwein</i>	Netzhaut	(β -Carotin)	Al ₂ O ₃	Benzin	BRUNNER, BARONI und KLEINAU
<i>Pferd</i>	Blutserum, Leber, Fettschewebe, Niere, Nebenniere, Lunge, Milz	(Carotin, Abbauprodukte)	Ca(OH) ₂	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (10)
<i>Pferd</i>	Fett	(α -), β -Carotin	Ca(OH) ₂	Benzin	Dieselben (4)
<i>Pferd</i>	Mist	(α -Carotin), β -Carotin	CaCO ₃ Ca(OH) ₂	Benzin CS ₂	Dieselben (5)
<i>Schwein</i>	Leber	(Ergebnis negativ)	Ca(OH) ₂	Benzin	Dieselben (12)
<i>Ratte</i>	Mist	(Physalinen, Zeaxanthin)	CaCO ₃	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)
<i>Wal</i>	Öl	Astacin	Al ₂ O ₃ Fullerde	Benzin	BURKHARDT, HEILBRON, JACKSON, PARRY und LOVERN

Tier	Organ usw.	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Balaenoptera musculus</i> (Blauwal)	Öl	(Carotinoid)	Talcum, CaCO ₃	Benzin	SCHMIDT-NIELSEN, SÖRENSEN und TRUMPY (2)
Huhn	Fett	(Carotin, Violaxanthin) Xanthophyll	CaCO ₃	CS ₂	ZECHMEISTER und TUZSON (4)
Huhn	Eidotter	Lutein, Zeaxanthin	CaCO ₃	CS ₂	KUHN, WINTERSTEIN und LEDE- RER
Huhn	Eidotter	(Lutein, verestertes Lutein, Carotin)	CaCO ₃	Benzin	KUHN und BROCK- MANN (3)
Huhn	Eidotter	(Carotin, Kryptoxanthin, Xanthophylle, Vitamin A)	CaCO ₃ , Al ₂ O ₃	Benzin	GILLAM und HEIL- BRON (2)
Huhn	Eidotter	(Xanthophylle)	Al ₂ O ₃	Benzin	WILLSTAEDT und WITH (1)
Huhn	Eidotter	Lutein, Zeaxanthin	MgCO ₃		EULER und GARD
Huhn	Netzhaut	Polyen-kohlenwasserstoff, Xanthophyll, Astacin	CaO, CaCO ₃ , Al ₂ O ₃	Benzin	WALD und ZUSSMAN

<i>Huhn, Gans, Ente</i>	Tarsalhaut	(Lutein-ester, „Kanariën-xanthophyll“)	CaCO ₃	Benzin	BROCKMANN und VÖLKER
<i>Gans</i>	Schnabel-epidermis	(Lutein-ester, „Kanariën-xanthophyll“, Carotin)	CaCO ₃	Benzin	BROCKMANN und VÖLKER
<i>Haustaube</i>	Tarsalhaut	(Zeaxanthin, Lutein, rote Zersetzungspolymere)	CaCO ₃	Benzin	BROCKMANN und VÖLKER
Zahlreiche Vogelarten	Gefieder	(Lutein, Zeaxanthin, „Kanariën-xanthophyll“, Picofulvin, Zersetzungspolymere)	CaCO ₃	Benzin	BROCKMANN und VÖLKER; VÖLKER
<i>Rana esculenta</i> (Wasserfrosch)	Leber, Haut, Ovarien, Fettkörper	α -, β -Carotin, Lutein, Zeaxanthin	Ca(OH) ₂	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (11)
<i>Rana esculenta</i> (Wasserfrosch)	Leber, Haut, Ovarien, Fettkörper	(β -Carotin, Lutein)	CaCO ₃		BRUNNER und STEIN
<i>Rana catesbiana</i> (Ochsenfrosch)	Netzhaut	Xanthophyll	CaCO ₃ , Al ₂ O ₃	Benzin	WALD

Tier	Organ usw.	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Regalecus glesne</i> (Heringskönig)	Lebertran	Carotinoid	CaCO ₃	Benzin	SCHMIDT-NIELSEN, SÖRENSEN und TRUMFY (1)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (Heilbutt)	Rogen	(Xanthophyll, Zeaxanthin)	CaCO ₃	CS ₂	EULER, GARD und HELLSTRÖM
<i>Lophius piscatorius</i> (Seeteufel)	Leber	(unbekannte Carotinoide)	CaCO ₃	CS ₂	SÖRENSEN (2)
<i>Lophius piscatorius</i> (Seeteufel)	Lebertran	(Astacin, Taraxanthin?)	Al ₂ O ₃	Benzin	BURKHARDT, HEILBRON, JACKSON, PARRY und LOVERN
<i>Nephrops norvegicus</i> (Steingarnele)	Gesamt tier	Astacin	Al ₂ O ₃	Benzin	BURKHARDT, HEILBRON, JACKSON, PARRY und LOVERN
<i>Orthogoriscus mola</i> (Klumpfisch)	Leber	(α - und β -Carotin, unbekannte Polyene)	Al ₂ O ₃	Benzin	SÖRENSEN (1)
<i>Salmo salar</i> (Lachs)	Muskel	Salmensäure	Al ₂ O ₃	Benzin	EMMERIE, VAN EKELEN, JOSEPHY und WOLFF
<i>Hypopsops rubicunda</i> (ein Meeressäugfisch)		Xanthophyll	CaCO ₃	Ligroin	FOX (1)

<i>Botryllus Schlosseri</i>		Pectenoxanthin, Capsorubin, Capsanthin, Lycopin, β -Carotin	CaCO ₃	Benzin + Benzol	LEDERER (7)
<i>Dendrodoa grossularia</i>		Astacinester	CaCO ₃	Benzin + Benzol	LEDERER (7)
<i>Halocynthia papillosa (Cynthia pap.)</i>		Astacinester, „Cynthiaxanthin“	CaCO ₃	Benzin + Benzol	LEDERER (7)
<i>Maja squinado</i> (See-spinne)	Eier	(„Vitellorubin“, Carotin)	CaCO ₃	Benzin	DHÉRÉ und VEGEZZI; vgl. VEGEZZI
<i>Mytilus californianus</i> (kalifornische Miesmuschel)	Faeces	(Carotin, Xanthophyll)	CaCO ₃	Petroläther	FOX (2)
<i>Pecten maximus</i> (Kammuschel)	Sexualorgan	Pectenoxanthin	CaCO ₃		LEDERER (8)
<i>Cardium tuberculatum</i> (Herzmuschel)		(unbekannte Polyene)	Ca(OH) ₂	Benzol	KARRER und SOLMSEN (5)
<i>Echinus esculentus</i> (Seeigel)	Sexualdrüsen	Echinenon	Ca(OH) ₂ Al ₂ O ₃	Benzin	LEDERER (10); LEDERER u. MOORE

Tier	Organ usw.	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
<i>Echinus esculentus</i> (Seeigel)	ganzes Tier	Pentaxanthin	Al_2O_3 , $CaCO_3$	Benzol	LEDERER (8)
<i>Tealia felina</i>		Actinio-erythrin (β)- ester (Carotin)	Al_2O_3 , $CaCO_3$	Benzol	HEILBRON, JACK- SON und JONES
<i>Actinoloba dianthus</i> (Seenelke)		neue Polyensäure	$Ca(OH)_2$	Petroläther	HEILBRON, JACK- SON und JONES
<i>Anemonia sulcata</i> (Seerose)		Sulcatoxanthin (Carotin)	Al_2O_3	Benzol	HEILBRON, JACK- SON und JONES
<i>Actinia equina</i>		Actinio-erythrin	$CaCO_3$	Benzin	FABRE und LEDE- RER; LEDERER (5)
<i>Actinia equina</i>		Actinio-erythrin	Al_2O_3	Petroläther	HEILBRON, JACK- SON und JONES
<i>Axinella cristagalli</i>		Astacin (unbekann- te Farbstoffe)	$CaCO_3$	Benzol	KARRER und SOLMS- SEN (5)
<i>Coccinella septem- punctata</i>	Flügeldecke	(Lycopin, Carotine)	Al_2O_3	Benzin	LEDERER (6)
<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Flügeldecke	(Lycopin)	Al_2O_3	Benzin	LEDERER (6)
<i>Oedipoda miniata</i>	Flügeldecke	(β-Carotin)	CaO	Benzin	LEDERER (6)

oben verzeichnet), eventuell auch Lycopin gefunden. Zwischen den beiden Schichten liegen noch zwei unbekannte Abbau-Produkte und bilden je einen rosafarbenen bzw. braungelben Ring (in Petroläther 498, 468, 442 bzw. 478, 459 $\mu\mu$). Die vollständige Trennung gelingt hier erst bei wiederholter Chromatographie, nach energischem Entwickeln mit Benzol + Benzin (4:1). Im hypophasischen Anteil wurden regelmäßig Zeaxanthin und Xanthophyll ermittelt.

Die chromatographische Bestimmung der *Serum-carotinoide neben Bilirubin* s. unter Gallenfarbstoffe (S. 105; SÜLLMANN, SZÉCSÉNYI-NAGY und VERZÁR).

Isolierung von Carotin aus Pferdefett.

2 kg zerhacktes Material wurden in eine Lösung von 500 g KOH in 3 l 96proz. Alkohol gelegt und 15 Minuten auf 50° erwärmt. Man versetzt die klare, 25° warme Lösung mit 8 l Äther und dann anteilsweise, vorsichtig mit Wasser, gerade bis sich die Schichten trennen. Die abgelassene untere Phase wird behutsam, ohne stark zu schwenken, mit Äther extrahiert und der Auszug zur ätherischen Hauptlösung gefügt, worauf man dieselbe einen Tag über konz. methanolischem Kali stehen läßt. Nun wurde das Pigment mit Wasser wieder in Äther getrieben, der letztere alkali-frei gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und verdampft. Man verteilt den Rückstand zwischen Petroläther (Siedep. 30—60°) und ebensoviel 90proz. Methanol, wobei die Hauptmenge des Farbstoffes sich epiphasisch verhält.

Die gewaschene und getrocknete Petrolätherlösung wurde nun auf Calciumhydroxyd (18 × 4 cm) chromatographiert. In der oberen Hälfte der Säule häufen sich farblose Begleiter an; der Farbstoff dringt beim Nachwaschen mit Benzin tiefer vor und beginnt, nachdem die halbe Höhe passiert ist, in zwei Farbringe zu zerfallen. Oben: 10 mm dick, orangegelb, β -Carotin; tiefer: 5 mm, zitronengelb, α -Carotin. Man eluiert die Hauptschicht mit methanolhaltigem Äther, wäscht, trocknet und dampft ab. Der Rückstand lieferte, aus 0,3 cm³ Benzol und einigen Kubikzentimetern Methanol umgeschieden, 3 mg wohlkristallisiertes β -Carotin = 25% der im Fett colorimetrisch ermittelten Menge (ZECHMEISTER und TUZSON 4).

Tabelle 15. Beispiele für die Chromatographie von Umwandlungs- und Abbauprodukten der Carotinoide.

Ausgangsmaterial (Ansatz)	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
β -Carotin, Isomerisierung	Pseudo- α -carotin	Al_2O_3	Petroläther	GILLAM und EL RIDI (1, 3)
β -Carotin + Jod + Thio-sulfat	β -Carotin, Isocarotin	Fasertonerde + Al_2O_3	Benzin	KUHN und LEDEBER (4)
β -Carotin + Benzoper-säure	Carotinoxid	Fasertonerde	Petroläther	EULER, KÄRRER und WALKER
β -Carotin + Chromsäure	Semi- β -carotin, β -Carotinin, β -Carotin	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (10)
β -Carotin + Chromsäure	β -Oxy-carotin, β -Carotinin	Al_2O_3 , $CaCO_3$	Benzin, Petrol-äther	KUHN und BROCKMANN (6)
β -Carotin + Chromsäure	β -Carotin, β -Oxy-carotin, Semi- β -carotin, β -Oxy-semi-carotin, β -Carotinon-aldehyd	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (14)

β -Carotin + Chromsäure	Neo- β -oxycarotin, Semi- β -carotinon	Al_2O_3	Benzol	KARER und SOLMSEN (1)
β -Carotin + Permanganat	β -Carotinal	$Ca(OH)_2$	Ligroin	KARER und SOLMSEN (7)
β -Carotin + Permanganat	β -Apo-4-carotinal	Al_2O_3	Petroläther + Benzol	KARER, SOLMSEN und GUGELMANN
β -Apo-2-carotinal, reduziert	β -Apo-2-carotinal	$Ca(OH)_2$	Petroläther + Benzol	EULER, KARER und SOLMSEN
α -Carotin, Isomerisierung	Neo- α -carotin	Al_2O_3	Benzin	GILLAM, EL RIDI und KON
α -Carotin + Permanganat	α -Apo-2-carotinal	$Ca(OH)_2$	Petroläther	EULER, KARER und SOLMSEN
α -Carotin + Chromsäure	α -Oxycarotin, α -Caroton			KARER, SALOMON und SCHÖPP
α -Carotin + Chromsäure	α -Oxycarotin, α -Caroton, Semi- α -carotinon	Al_2O_3	Benzol + Ligroin	KARER, EULER und SOLMSEN
β -Oxycarotin + Chromsäure	Azafrinon-aldehyd	$CaCO_3$	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (13)
β -Carotinon + Chromsäure	β -Carotinon-aldehyd	$CaCO_3$ + Talk Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (14)

Ausgangsmaterial (Ansatz)	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
β -Carotinon-aldehyd	Oxime	CaCO_3	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
β -Carotinon + methylalkoholisches Kali	Bisanhydro- β -carotinon	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (14)
Anhydro- β -carotinon	Oxim	Al_2O_3	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Lycopin, Isomerisierung	(Neo-lycopin)	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Benzol + Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (16, 17)
Lycopin + Chromsäure	Bixin-dialdehyd	CaCO_3	Benzin	KUHN und GRUNDMANN (1)
Lycopin + Chromsäure	Lycopinal	Fasertonerde + Al_2O_3	Benzin	KUHN und GRUNDMANN (2)
Lycopinal	Oxim	CaCO_3	Benzin	KUHN und GRUNDMANN (2)
Kryptoxanthin, Isomerisierung	(Neo-kryptoxanthin)	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (17)
Physalinen + Chromsäure	Physalienen			KARRER, SALOMON und SCHÖPP

Xanthophyll-acetat + Permanganat	α -Citraurin	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Petroläther + Benzol	KARRER, KOENIG und SOLMSEN
Zeaxanthin-acetat + Permanganat	β -Citraurin	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Petroläther + Benzol	KARRER, RUEGGER und SOLMSEN
Dihydro-rhodoxanthin + Al-isopropylat	Zeaxanthin	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Benzol	KARRER und SOLMSEN (4)
Capsanthin-ester	(Reinigung)	CaCO_3	Benzin	ZECHMEISTER und CHOLNOKY (2)
Capsanthin + Al-isopropylat	Capsanthol	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Benzol	KARRER und HÜBNER
Capsanthin-diacetat + Chromsäure	4-Oxy- β -carotinon-aldehyd-oxim	CaCO_3	Benzol	ZECHMEISTER und CHOLNOKY (4)
Capsanthin-diacetat + Chromsäure	Capsylaldehyd-oxim	CaCO_3	Benzol + Benzin	Dieselben (4)
Capsanthin-diacetat + Chromsäure	Capsanthinon, 4-Oxy- β -carotinon-aldehyd, Capsylaldehyd, Capsanthylal	CaCO_3	Benzol + Benzin	Dieselben (4)
Capsanthylal	Oxim	CaCO_3	Benzol	Dieselben (4)
Capsanthin + alkoholisches Kali	Citraurin	CaCO_3	Benzol + Benzin	Dieselben (7)

Ausgangsmaterial (Ansatz)	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Capsanthinon + methylalkoholisches Kali	Anhydro-capsanthinon (unbekannte Farbstoffe)	CaCO_3	Benzol + Benzin	ZECHMEISTER und CHOLNOKY (4)
Capsorubin-diacetat	(Reinigung)	CaCO_3	Benzin	Dieselben (3)
Bixin-methylester (labil) + Permanganat	Apo-3-norbixinal-methylester	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Benzol + Petrol-äther	KARRER und SOLMSEN (8)
Bixin-methylester (stabil) + Permanganat	Apo-3-norbixinal-methylester, Apo-2-norbixinal-methylester	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Benzol + Petrol-äther	KARRER und SOLMSEN (8)
Bixin (labil) + Permanganat	Apo-1-norbixinal-methylester	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Benzol + Petrol-äther	KARRER und SOLMSEN (8)
Bixin (stabil) + Permanganat	Apo-1-norbixinal-methylester	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Benzol + Petrol-äther	KARRER und SOLMSEN (8)
Crocecin-dimethylester	(Reinigung)	Al_2O_3	Benzin	KUHN und WINTERSTEIN (3)
Crocecin-dimethylester, thermisch zersetzt	Octatetraen-dicarbonsäure-dimethylester, Tricyclo-crocecinester, 2,6-Dimethyl-naph-talin usw.	Al_2O_3	Benzin	KUHN und WINTERSTEIN (3)

Azafrin	Apo-I-azafrinal	Ca(OH) ₂	Benzol + Petrol- äther	KARRER, OBST und SOLMSEN
Azafrin-methylester + Chromsäure	Azafrinon-methylester	Al ₂ O ₃	Benzin	KUHN und DEUTSCH
Azafrin-methylester + Chromsäure	Azafrinon-methylester, Azafrinal-I-methyl- ester, Azafrinal-II- methylester	Al ₂ O ₃	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Azafrinon	Amid	CaCO ₃	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Anhydro-azafrinonamid	(Reinigung)	CaCO ₃	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Anhydro-azafrinon- methylester	Oxim	Al ₂ O ₃	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Azafrinal-I-methylester	Oxim	Al ₂ O ₃	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Azafrinal-I-methyl- ester-oxim	Nitril	Al ₂ O ₃	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Azafrinal-II-methyl- ester-oxim	Nitril	Al ₂ O ₃	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)

Carotin und Xanthophyll (Lutein) aus Pferdemist.

2 kg frisches Material wurden 3 Stunden unter 3 l 5proz. alkoholischem Kali stehen gelassen, koliert, mit Alkohol gewaschen und mit 3 l Äther gründlich nachextrahiert. Den aus dem Alkali in Äther getriebenen Farbstoff hat man mit dem Ätherauszug vereinigt und dessen Abdampfrückstand mehrmals zwischen a) Benzin und b) 90proz. Methanol verteilt.

a) Die Benzinlösung wurde zweimal auf $\text{Ca}(\text{OH})_2$ chromatographiert. Abgesehen von etwas α -Carotin, erschien eine breite, gelbe Zone, aus der sich das β -Carotin mit methanolhaltigem Äther eluieren ließ. Zum Abdampfrückstand des Eluates fügte man etwas Benzol, dann Holzgeist und wenig abs. Alkohol. Von Sterinfraktionen wurde nun filtriert und das Carotin im Eisschrank zum Krystallisieren gebracht (Ausbeute 8,6 mg).

b) Die Polyen-alkohole führt man aus der Methanolschicht in CS_2 über und gießt die Lösung auf CaCO_3 . Der Hauptanteil bildete einen tief-orangegelben Bezirk, mit dem die Chromatographie wiederholt wurde. Man eluiert wie oben, nimmt den Trockenrückstand des Äthers in 1 cm³ Chloroform auf und setzt viel Petroläther hinzu. Über Nacht, bei 0°, schieden sich 32 mg Xanthophyll aus. Man löst das krystallinische Präparat in viel heißem Methanol, filtriert bei 20° von farblosen Begleitern, reinigt den Farbstoff erforderlichenfalls in der Carbonat-Säule und scheidet ihn schließlich aus Chloroform und Petroläther um. Ausbeuten 50—60% des colorimetrisch ermittelten Betrages (ZECHMEISTER und TUZSON 5).

Isolierung von Actinio-erythrin aus Actinia equina

(FABRE und LEDERER).

Bei der nachfolgenden Vorschrift handelt es sich um die Absehung eines tierischen Polyens mit Esterstruktur. Legt man die zerhackten Tiere (rote Varietät) wiederholt in Aceton ein, so entsteht eine rotviolette Flüssigkeit, deren Pigment mit Wasser in Petroläther übergeführt wird. Nun schüttelt man die Lösung mit Wasser, dann mit 90proz. Methylalkohol (bleibt farblos) und wäscht mit Wasser den Alkoholgehalt weg. Von den im Eisschrank beim Stehen sich abgeschiedenen Wassertröpfchen wird dekantiert und die Lösung auf eine Calciumcarbonat-Säule ge-

gossen. Der oben sichtbare, rotviolette Bezirk wandert beim Nachwaschen mit Petroläther langsam nach unten und zerfällt zugleich in drei Schichten. Man eluiert die Hauptzone mit methanolhaltigem Petroläther (1:100), filtriert, dampft im Vakuum ein und nimmt den dunklen, mikrokrystallinischen Rückstand in abs. Alkohol auf. Nach dem Zutropfen von Wasser bis zur beginnenden Trübung, scheidet die Flüssigkeit im Eisschrank violettgraue Nadeln ab. Ausbeute aus 30 Tieren: 1,5 mg Actinioerythrin, etwa 30% des Farbstoffgehaltes.

Tiefseeschlamm- und Meerwasser-carotinoide

(teilweise wohl pflanzlichen Ursprungs; Fox 3).

Rund 200 g feinsten Schlammes aus 2000 m Tiefe wurden mit Methanol ausgezogen und entmischt. Die verseifte, epiphasische Fraktion zeigte in der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Säule hauptsächlich α - und β -Carotin an, während aus dem Hypophasischen ein mit Lutein wahrscheinlich identisches Polyen auf CaCO_3 festgehalten wurde. Auch das beim Filtrieren von 4000 l Seewasser durch Baumwolle gewonnene Material war zu orientierenden Adsorptionsversuchen geeignet. Hier deutet das Verhalten gegen CaCO_3 auf die Anwesenheit von Farbwachs.

Trennung von Carotinoiden und Vitamin A: S. 234.

C. Beispiele für die Verarbeitung von künstlichen Umwandlungsprodukten der Carotinoide.

(Vgl. auch Tabelle 15, S. 148.)

Trennung von Carotin und Isocarotin.

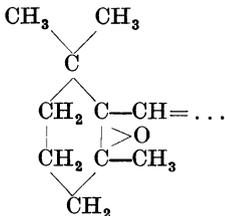
Das unbekannt konstituierte Kunstprodukt Isocarotin $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ (Literaturzusammenstellung bei ZECHMEISTER 1, dort S. 147), welches z. B. durch Jodieren und Regenerieren mit Thiosulfat aus dem natürlichen Carotin entsteht, kann nach KUHN und LEDERER (4) von β -Carotin in einer aus 1 Teil Fasertonerde und 2—4 Teilen Al_2O_3 (Merck) bereiteten Säule getrennt werden (Benzin). Das Isocarotin zeigt die stärkere Adsorbierbarkeit und verhält sich dem Lycopin recht ähnlich, während β -Carotin eine tiefere Lage einnimmt.

Darstellung von Neo-lycopin, Trennung von Lycopin.

Untersucht man eine aus reinen Lycopinkristallen frisch bereitete Benzollösung auf Calciumhydroxyd, so besteht das Chromatogramm aus einer breiten, einheitlichen, rosafarbigen Scheibe, die höchstens von Spuren anderer Polyene begleitet wird. Werden jedoch z. B. 35 mg Lycopin in 50 cm³ Benzol gelöst und eine halbe Stunde in einem Kolben mit angeschliffenem Rückflußkühler gekocht, so bildet sich reichlich Neo-lycopin. Man kühlt die Lösung ab, versetzt sie mit etwa 25 cm³ Benzin, chromatographiert auf Ca(OH)₂ und entwickelt mit Benzin + Benzol (1 : 3), bis die unterhalb der Lycopinzone gebildete bräunlichgelbe Schicht des Neo-lycopins durch einen weißen Zwischenraum abgetrennt ist. Die Menge des neuen Farbstoffs beträgt 50—55% des Ausgangsmaterials (Schwerpunkte in CS₂ 536, 498, 466 $\mu\mu$, in Benzol 512, 479, 450 $\mu\mu$, in Benzin 499,5, 468, 439 $\mu\mu$; 0,0032 mg in 1 cm³ Benzin ist farbgleich mit einer Lösung von 14,5 mg Azobenzol in 100 cm³ Alkohol). Eluiert man die Neo-lycopinzone mit alkoholhaltigem Benzin, wäscht und trocknet die Flüssigkeit, läßt sie stehen und gießt sie auf eine Kolonne, so erscheint wieder Lycopin oberhalb des Isomeren (ZECHMEISTER und TUZSON 16, 17, Abb. 66—67, S. 296).

β -Carotin-monoxyd (EULER, KARRER und WALKER).

Eine Lösung von 0,536 g Carotin in 100 cm³ Chloroform wurde mit etwa 5 cm³ Benzopersäurelösung (= 0,166 g akt. O) versetzt und 36 Stunden im Dunkeln stehengelassen. Nun hat man die bräunlichrot gewordene Flüssigkeit zweimal mit sehr verdünntem Bicarbonat geschüttelt, durch mehrere Faltenfilter gegossen (Trocknung) und im Vakuum abgedampft. Man nimmt den Rückstand mit Benzol auf, versetzt die Flüssigkeit mit Methanol bis zur ersten Trübung, saugt die abgeschiedenen Krystalle nach zwölfstündigem Stehen bei



Wahrscheinliches Ringsystem des β -Carotin-monoxyds.

0° ab, wäscht mit Methanol nach, löst in 50 cm³ Petroläther und chromatographiert auf Fasertonerde:

Oben: 10 rötlichgelb, nicht krystallisierbar,
45 gelb, Carotinmonoxyd,

unten: 25 lachsrot (wenig Isocarotin? 542, 503, 472 $\mu\mu$, in CS₂),
gelbrot, auswaschbar (Filtrat).

Die 45-mm-Zone wurde mit 90proz. Methanol eluiert, ihr Farbstoff in Petroläther übergeführt und der Abdampfrückstand des letzteren aus Benzol + Methanol, dann mehrmals aus Petroläther umkrystallisiert. Ausbeute 30—70 mg Carotinoxid $C_{40}H_{56}O$, Schmelzpt. 160—161°; Extinctionsmaxima in CS_2 : 486, 456, (427) $\mu\mu$.

Darstellung von β -Oxycarotin, β -Carotinon und Semi- β -carotinon aus β -Carotin

(KUH N und BROCKMANN 6, 10, 13, 14; Formeln: S. 33).

Man löst 3 g Carotin in Portionen von 50 mg in je 15 cm³ Benzol, verdünnt mit 25 cm³ Eisessig und versetzt mit 3 cm³ 0,1n-Chromsäure, tropfenweise, unter starkem Rühren. Nach Zusatz von 1 Vol. Benzin (Siedep. 70—80°), gießt man die Flüssigkeit in Wasser, wäscht die Oberschicht aus, trocknet und bringt die Lösung (Benzol + Benzin 1 : 1) auf Al_2O_3 (Merck, nach BROCKMANN). Durch Entwickeln mit reinem Benzol wurde das folgende Chromatogramm erhalten (60 Rohre):

Oben: braunrot (472, 443, 423 $\mu\mu$, in Benzin),
 rotviolett (502, 470, 446 $\mu\mu$): β -Carotinon,
 gelbrot (478, 448, 420 $\mu\mu$): β -Oxy-carotin,
 rotviolett (502, 470, 446 $\mu\mu$): Semi- β -carotinon, gelb (453,
 425 $\mu\mu$),

unten: Filtrat: unverändertes Carotin.

Man eluiert die Hauptzonen einzeln mit methanolhaltigem Benzol, wäscht aus, dampft ab und krystallisiert das erhaltene β -Carotinon (110 mg) aus Benzol und Benzin, das β -Oxycarotin (285 mg) aus Benzol + Methanol, schließlich das Semi- β -carotinon (nach nochmaliger Chromatographie 240 mg) aus Methanol um. Vom Filtrat ließen sich 500 mg β -Carotin zurückgewinnen.

Lycopinal aus Lycopin (KUH N und GRUNDMANN 2).

Eine Lösung von 100 mg Farbstoff in 70 cm³ reinstem Benzol wurde mit 100 cm³ Eisessig (über $KMnO_4$ dest.) und dann, Tropfen für Tropfen, unter energischem Rühren mit 11,2 cm³ 0,1n-Chromsäure versetzt. Man entmischt mit 200 cm³ Benzin (Siedep. 70 bis 80°) und 0,5 l doppelt destilliertem Wasser, wäscht die Benzinschicht säurefrei und schüttelt sie zehnmal mit je 20 cm³ 90proz. Methanol. Nach dem wiederholten

zende Blättchen ab (Ausbeute 65%), welche, aus Benzol + Methanol umkrystallisiert, bei 219° schmelzen.

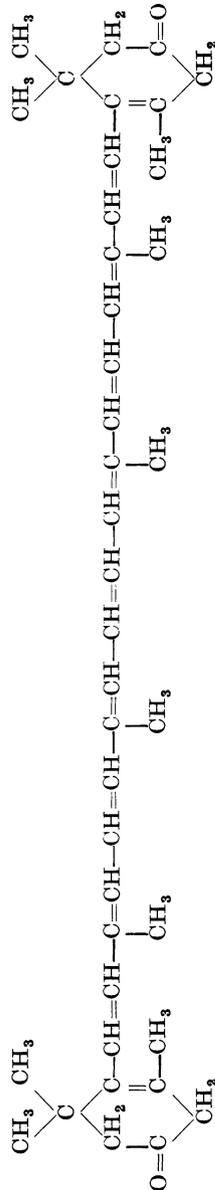
65 mg Dihydro-rhodoxanthin wurden in 15 cm³ Benzol gelöst und mit 20 cm³ abs. Isopropylalkohol, dann mit 2 g Aluminiumisopropylat versetzt, hierauf 24 Stunden gekocht (100-cm³-Rundkolben; hohe Fraktioniersäule mit Drahtspirale; Temperatur am oberen Ende, von wo ein absteigender Kühler ausgeht, höchstens 40°; trockener N₂-Strom). Man zersetzt das überschüssige Isopropylat durch Erwärmen mit 20 cm³ 10proz. KOH, treibt den Farbstoff in Äther, wäscht, trocknet, dampft ab. Der Rückstand lieferte in Benzol, auf Ca(OH)₂ das folgende Chromatogramm:

Oben: gelborange (510, 480 μμ, in CS₂),
gelb,
gelb (uneinheitlich),
unten: gelborange (515, 485 μμ).

Die unterste Scheibe, welche die Hauptmenge des Pigments enthielt, wurde mit Benzol + Methanol eluiert. Man wäscht mit Wasser, dampft im Vakuum ein und krystallisiert den Trockenrest aus Methylalkohol um. Ausbeute 8 mg Zeaxanthin, Schmelzp. 204—205° (unkorr.); Extinktionsmaxima in CS₂ 518, 483 μμ.

D. Beispiele für die Mikro-chromatographie von Carotinoiden.

Mit Hilfe der auf S. 67 abgebildeten Apparatur haben WILLSTAEDT und WITH (1) die Trennung und teils die Bestimmung von einigen Polyenen untersucht. Es hat sich herausgestellt, daß bei Gesamtmengen, die unter 30 γ liegen, nur eine grobe Schätzung möglich ist. Geht man von



30—150 γ Farbstoff aus, so beträgt der unvermeidliche Fehler etwa 20—50%. Die größten Verluste treten bei stark adsorbierbaren Polyenen auf. Die Benzinlösung wird durch einen Trichter oder mit einer Pasteurpipette eingebracht; zum Entwickeln dienen geeignete Gemische von Benzol + Benzin. Man eluiert mit Methanol, wäscht den Alkohol weg, saugt die Lösung durch eine kleine Glassinternutsche, die mit wasserfreiem Natriumsulfat bedeckt ist, wäscht das letztere nach und füllt die Lösung in einem Meßkölbchen auf. Die Colorimetrie geschah im Stufenphotometer Zeiß (Schichtdicke 0,5 cm, Filter S 43).

Trennung von Xanthophyll und Lycopin. Maße der Säule: 10 \times 1 cm; Al_2O_3 , reinst, wasserfrei. Angewandt ein künstliches Gemisch von 33 γ Xanthophyll + 36 γ Lycopin. Nach Entwicklung mit Benzin + Benzol (1 : 4) bildete das Xanthophyll ganz oben eine 1 cm breite Scheibe, etwa 5 cm tiefer sah man den Bezirk des Lycopins, gegen 0,5 cm breit. Die colorimetrische Bestimmung zeigte 15,8 γ bzw. 28 γ Farbstoff an, die Verluste betragen also 53% des Xanthophylls und 22% des Lycopins.

Trennung von Xanthophyll und β -Carotin. Adsorptionsrohr und Füllung wie oben; angewandt 24,5 γ Xanthophyll und 20,5 γ Carotin, mit Benzin + Benzol (1 : 1) entwickelt. Oben blieb die 1 cm breite Xanthophyllzone, 5 cm tiefer die 2 cm breite Carotinschicht hängen. Wiedergefunden: je 13 γ Farbstoff, in Verlust geraten: 45% des Polyenalkohols und 30% des Kohlenwasserstoffes.

Trennung von Lycopin und β -Carotin. Verfahren, wie oben beschrieben. Der Versuch a wurde mit Al_2O_3 reinst, wasserfrei, b mit standardisiertem Aluminiumoxyd durchgeführt:

a)	Angewandt 43,7 γ ,	wiedergefunden 37,4 γ Lycopin,	Verlust 14%,
	„ 38,4 γ ,	„ 36,2 γ β -Carotin,	„ 6%.
b)	Angewandt 58,4 γ ,	„ 49,3 γ Lycopin,	„ 17%,
	„ 38,4 γ ,	„ 35,6 γ β -Carotin,	„ 7%.

Mit der Mikro-chromatographie von Blutserum-Polyenen haben sich auch VAN VEEN und LANZING beschäftigt.

Anhang: Synthetische Polyene.

KUHN und GRUNDMANN (7—9) haben die Chromatographie z. B. in den folgenden Fällen angewandt.

a) Zur Reinigung des aus Oxalsäureester und Octatriensäure-

methylester erhaltenen, rohen *Oxalo-octatrien-carbonsäure-diäthylesters* $C_{14}H_{18}O_5$ wurde das rote Öl, in Äther + Benzol gelöst, auf Calciumcarbonat puriss. Merck gegossen und mit Äther + Benzol (1 : 1) gewaschen. Zahlreiche mißfarbene Begleiter blieben hängen, während das Filtrat, im Vakuum verdampft, einen orangegelben, bereits größtenteils krystallinischen Rückstand hinterließ, der aus 80proz. Methanol umkrystallisiert werden konnte.

b) 36,6 g Octatrienal + 30 g Crotonaldehyd + 1 cm³ Piperidin puriss. Merck + 1 cm³ Eisessig werden im evakuierten Kōlbchen bei 15—20° 18 Stunden aufbewahrt. Man nimmt die erstarrte Masse mit 1,5 l Äther auf, saugt von Flocken ab und wäscht die hellrote Lösung gründlich mit Wasser. Nach dem Trocknen ($CaCl_2$) wird sie auf Al_2O_3 gegossen (25 × 7 cm) und mit Äther entwickelt. Nach einem Vorlauf von Octatrienal wandert das gebildete *Dodecapentaen-(2,4,6,8,10)-al-(1)* $CH_3 \cdot (CH=CH)_5 \cdot CHO$ als unscharf begrenzte, orangegelbe Zone ins Filtrat, während in den oberen zwei Dritteln der Säule braune bis rote Kondensationsprodukte hängen bleiben. Die Lösung hinterläßt beim Abdampfen ein bereits krystallisiertes Dodecapentaneal-präparat vom Schmelzpt. 155° (rein: 166°).

c) 90 mg Des-dihydro-crocin-diäthylester wurden in 20 cm³ Pyridin gelöst und 0,5 cm³ 10proz. Natriumäthylatlösung zugegeben (Farbumschlag in Tiefblau). Beim Schütteln an der Luft hellt sich die Farbe in einigen Minuten nach Rot wieder auf. Nun verdünnt man mit 200 cm³ Chloroform, wäscht mehrmals mit 2 n-Schwefelsäure und Wasser und gießt die getrocknete Lösung auf Al_2O_3 (10 × 2,5 cm).

Beim Entwickeln mit Chloroform wandert der gebildete *Des-crocin-diäthylester* $C_2H_5OOC \cdot (CH=CH)_7 \cdot COOC_2H_5$ als orangegelbe Zone langsam in das Filtrat; Nebenprodukte bleiben ganz oben hängen. Man verdampft im Vakuum, krystallisiert aus 10 cm³ Eisessig und gewinnt metallglänzende Blättchen; Schmelzpt. 217°.

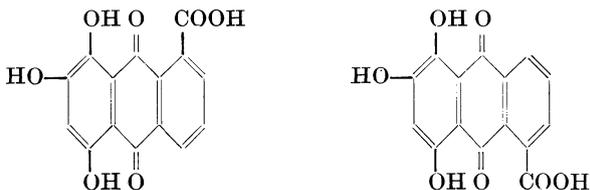
d) *Oxalo-polyensäuren* $HOOC \cdot CO \cdot CH_2 \cdot (CH=CH)_n \cdot COOH$ wurden in Form ihrer Diäthylester von GRUNDMANN aus Ätherlösung auf Calciumcarbonat gereinigt. Das Hauptprodukt sickert durch, während eine schmale, schmutziggbraune Zone im Adsorbens hängen bleibt.

Kumulene. Als „Kumulene“ werden von KUH N und WALLENFELS Kunstprodukte bezeichnet, in denen sich eine größere Anzahl

von Kohlenstoff-doppelbindungen in ununterbrochener Folge aneinanderreihet. Das hierher gehörende *1,1,6,6-Tetraphenyl-hexapentaen* $(C_6H_5)_2C=C=C=C=C(C_6H_5)_2$ wurde aus dem entsprechenden Tetraphenyl-hexa-diin-(2,4)-diol-(1,6) und Phosphordijodid bereitet. Die orangefarbigen Krystalle sahen einheitlich aus, schmolzen aber unscharf zwischen 110° und 125° . 8 g Rohprodukt in 500 cm^3 Benzol wurden auf Al_2O_3 ($20 \times 5\text{ cm}$) gegossen. Das Kumulen wanderte ins Filtrat, das einen tiefroten Abdampfrückstand hinterläßt, während sämtliche farblosen Begleiter adsorbiert wurden. Umscheiden aus Eisessig + Chloroform, Schmelzpt. 302° (nach Sinterung).

6. Naphtochinon- und Anthrachinonfarbstoffe.

a) Der in die *Chinizarinreihe* gehörende Pilzfarbstoff *Boletol* (aus *Boletus satanas* oder *B. badius*) wurde von KÖGL und DEIJS synthetisch erhalten und von dem begleitenden Isooletol chromatographisch getrennt. Welches der beiden nachstehenden Symbole dem natürlichen Boletol und welches dem Isomeren zukommt, ist noch ungewiß; jedenfalls bedingt der mäßige Unterschied in dem Molekülbau eine namhafte Verschiebung der Adsorptionsaffinität.



Nachdem die Chinizarin- α -carbonsäure mit Hilfe von Bleitetraacetat zum entsprechenden Dichinon dehydriert wurde, hat man 100 mg Rohprodukt mit 8 cm^3 Acetanhydrid und einigen Tropfen konz. Schwefelsäure 10 Minuten gekocht (Eintritt von 2 Acetyl- sowie 1 Acetoxy-Gruppe in den Kern) und das Filtrat vom Bleisulfat vorsichtig mit Wasser versetzt. Die entstandene gelbbraune Fällung wurde mit 5proz. alkoholischem Kali $\frac{1}{2}$ Stunde am Wasserbad erwärmt, nach dem Ansäuern ausgeäthert und die alkoholische Lösung des Abdampfrückstandes auf käuflichem

Al_2O_3 (35×2 cm) chromatographiert; Entwickeln nacheinander mit Alkohol, Benzol und Xylol.

Oben: breit, rotbraun: enthält Hauptmenge der Boletole,	} Begleiter.
gelbbraun: enthält wenig Boletole,	
gelbgrün,	
dunkel blaßgrün,	
unten: grau,	

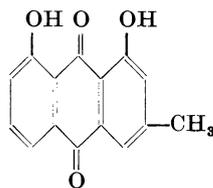
Die Elution erfolgt hier jeweils mit 1proz. KOH, worauf man die Lösung ansäuert und ausäthert. Die beiden oberen Fraktionen wurden vereinigt, erneut chromatographiert, dabei mit Alkohol, Aceton und schließlich mit 50proz. Aceton nachentwickelt. Es entstanden zwei leicht trennbare Ringe, deren Pigmentinhalt wie soeben beschrieben sich isolieren ließ.

Über Dichlor-chinizarinchinon s. bei CRIGEE.

b) Auch in der Reihe des *Chrysarobins* läßt sich die Chromatographie verwenden. Nach LEDERER (Privatmitteilung) erhält man reine Farbstoffe auf Calciumcarbonat oder Magnesiumoxyd aus Benzollösung verhältnismäßig leicht, die Präparate erwiesen sich jedoch als Gemische, z. B. von Chrysophanol (Chrysophansäure) $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ mit einem seiner Monomethyläther, welche an den genannten Adsorbentien zunächst sich nicht trennen lassen.

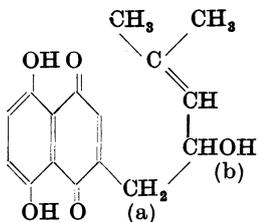
Die Farbstoffe der Wandflechte *Xanthoria parietina* sind der Methode gleichfalls zugänglich (Hauptfarbstoff *Parietin*).

c) *Alkannin*. Dieses aus *Alkanna tinctoria* gewonnene Naphtochinonderivat $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ wird von dem Nebenfarbstoff *Alkannan* $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (3-Isohexyl-naphtazarin) begleitet, das von BROCKMANN (2) bei der in Benzin auf Kieselgur ausgeführten Adsorptionsanalyse vorgefunden wurde. Entwickelt man mit Benzin, so bildet sich eine hellrote Zone unterhalb der roten Hauptschicht aus. Man eluiert mit methanolhaltigem Benzin, wiederholt den Adsorptionsversuch, dampft das Eluat ein und krystallisiert die Rückstände aus 80proz. Methylalkohol um. Mengenverhältnis Alkannan : Alkannin = 1 : 1900.



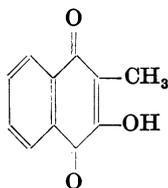
Chrysophanol
(1,8-Dioxy-3-methyl-
anthrachinon).

Nach der katalytischen *Hydrierung* von Alkannin-methyläther mit 2 H_2 ließ sich das in Benzin gelöste Reaktionsprodukt im



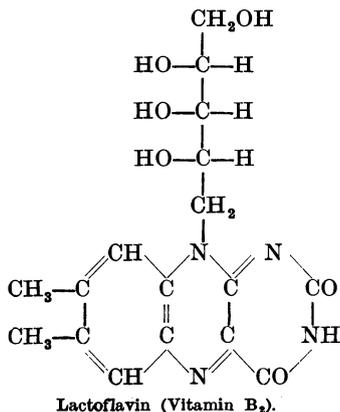
Alkannin
(möglicherweise steht CHOH
bei a und CH₂ bei b).

Trockne und filtriert die Benzinlösung des Rückstandes durch eine Säule von CaCO₃. Der Abdampferest des Filtrats liefert beim Umlösen aus verdünntem Methanol rote Tröpfchen, im Eisschrank Nadelchen, Schmelzp. 50 bis 51°.



Phticol.

d) *Phticol*. Das aus hitze-getöteten Tuberkelbazillen erhältliche, acetonlösliche Fett besitzt eine dunkelbraune Farbe, die teilweise von Phticol herrührt. Das letztere wird aus Benzol an Al₂O₃ (nach BROCKMANN) adsorbiert und kann daraus durch Wasser, Alkohol oder verdünntem Alkali herausgelöst werden (WAGNER-JAUREGG).



Lactoflavin (Vitamin B₂).

7. Flavine (Lyochrome).

Bei der Isolierung von Flavin aus pflanzlichen und tierischen Organen dienen zur Anreicherung des Pigments öfters Adsorptionsmethoden, jedoch nicht in der von TSWETT vorgeschlagenen Form. Als Beispiele seien u. a. die Arbeiten von ELLINGER und KOSCHARA, von KUHN, GYÖRGY und WAGNER-JAUREGG (1—3), von KUHN, WAGNER-JAUREGG und KALTSCHMITT (Adsorbens Fullererde), von KARRER, SALOMON und SCHÖPP (Bleisulfid, Frankonit), von KARRER und SCHÖPP (3), von GREENE und BLACK angeführt. KARRER und SCHÖPP (3) sowie EULER, KARRER,

ADLER und MALMBERG reinigen ihre Präparate schließlich chromatographisch, nach der Überführung in die Acetate, welche dann auf einer Aluminiumoxyd-Säule aus Benzol festgehalten werden. Elution mit Methanol + Benzol.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Flavine entweder in wäßriger Lösung, in nativem Zustand chromatographiert werden können, oder aber nimmt man eine Acylierung vor und arbeitet dann in wasserfreiem Medium. Beide Ausführungsformen werden nachfolgend mit Beispielen belegt.

Isolierung von Tetraacetyl-lactoflavin aus Heu.

KUHN und KALTSCHMITT haben die umständliche Gewinnung des Flavins aus 103 kg Heumehl (kalifornische Luzerne) folgendermaßen ausgeführt.

Das mit Hilfe anderer Methoden recht weitgehend vorge-reinigte und *acetylierte* Rohprodukt wurde in trockenes Chloroform getrieben, das 100 mg Farbstoff enthielt. Den braunen Abdampfrest des Chloroforms löste man in alkoholfreiem Essigester, goß die Flüssigkeit auf eine Al_2O_3 -Säule (standardisiert nach BROCKMANN) und entwickelte das Chromatogramm mit dem erwähnten Solvent. Die lebhaft gelbe Hauptzone ließ sich mit Essigester + Methanol (4 : 1) eluieren. Man wiederholt den Adsorptionsversuch mit dem Abdampfrückstand des Eluates und beobachtet als Ergebnis, daß das Pigment in zwei Komponenten zerfällt.

Die obere Scheibe wurde mit Wasser ausgezogen und das Eluat mehrmals mit Essigester durchgeschüttelt, wobei das Wasser viel Farbstoff, nämlich verseiftes Flavinacetat zurückhält. Man vereinigt die Essigesterauszüge mit dem aus der unteren Scheibe erhaltenen Acetylflavin: Dieser untere Farbring wurde mit Essigester + Methanol (4 : 1) eluiert, die Lösung im Vakuum verdampft und der hellgelbe Rückstand (30 mg) zweimal aus abs. Alkohol, sodann zweimal aus Wasser umkrystallisiert. Der entsprechende Bezirk des zweiten Chromatogramms lieferte weitere 17 mg Acetat. Gelbe Prismen, Schmelzp. 235° (Zersetzung).

Nach einem ähnlichen Verfahren ließ sich acetyliertes Lactoflavin auch aus der Süßwasseralge *Cladophora sauteri* isolieren: HELBRON, PARRY und PHIPERS.

Noch nicht näher gekennzeichnete, im Quarzlicht lebhaft fluoreszierende Bestandteile von *Blättern* wurden von STRAIN (2) chromatographisch nachgewiesen (Lösungsmittel: Petroläther, Adsorbens: Magnesiumoxyd + Siliciumerde).

Über ein noch nicht aufgeklärtes, flavinartiges Pigment, dessen Eigenschaften teils an Pterine erinnern, hat GIRAL berichtet. Der Farbstoff kommt in fluoreszierenden Mikroorganismen vor (*Bacillus pyocyanus* GESS., *B. fluorescens liquefaciens* PIORK., *B. putidus*) und wird von aktiver Kohle sehr gut, von Frankonit KL gut, von Aluminiumoxyd unregelmäßig adsorbiert. Eluentien: aus Kohle 30proz. Aceton, aus Frankonit 80—90proz. Pyridin, aus Al_2O_3 : Kohlensäure. Fluoreszenz in NH_3 blaugrün, in Mineralsäure intensiv violett. Chromatographisch trennbarer Begleiter: ein roter, blau fluoreszierender Farbstoff, vielleicht identisch mit Pyorubin.

Eine blau fluoreszierende Substanz, deren Zusammenhang mit dem Lactoflavin ebenfalls noch unklar ist, haben EULER und BRANDT (1, 2) aus dem *Corpus luteum* erhalten. Man extrahiert das Material mit Aceton, hierauf mit 70proz. Aceton, dampft die Lösung auf $\frac{1}{3}$ ein und reinigt sie durch Ausschütteln mit Äther, dann mit Chloroform. Die Chromatographie wurde aus Wasser auf Frankonit vorgenommen und lieferte vier Schichten. Beim Entwickeln mit schwachem Alkali ($p_H = 9$) wandert die blau fluoreszierende Substanz in das gelbe Filtrat.

Synthetische Flavine.

KUHN und WEYGAND (1) haben die bei der Synthese des *6,7-Dimethyl-9-n-amyflavins* auftretenden Nebenprodukte folgend ausgeschaltet: Trockenem 1,2-Dimethyl-4-amino-5-[n-amylo-amino]benzol wurde in Eisessig gelöst, mit überschüssigem Alloxan versetzt und einige Minuten gekocht. Nach dem Verdünnen mit Wasser extrahiert man das Flavin vollkommen mit Chloroform, trocknet und verdampft den Auszug. Das Rohprodukt wird mit Aluminiumoxyd verrieben und das Gemisch in den Oberteil einer Al_2O_3 -Säule eingestampft. Beim Aufgießen von Xylol + Methanol lassen sich die Begleiter rasch auswaschen, während das Flavin nur langsam abwärts wandert.

Reinigung von synthetisch vorbereitetem *6,7-Dimethylflavin-9-essigsäure-methylester*: KUHN und RUDY (Chloroform, Aluminiumoxyd-Säule, Elution mit Chloroform + Methanol 10 : 1). Ähnlich verlief die Reinigung von *6,7-Tetramethylen-9-l-araboflavin-tetraacetat*. Beim Entwickeln mit Chloroform wandert das Flavin von der Al_2O_3 -Säule in das Filtrat, dunkle Nebenprodukte werden zurückgehalten. Nach dem Verdampfen und zweimaligem Um-

krystallisieren aus 15proz. Alkohol: orangegelbe Sterne, Schmelzpt. 243°. Dies Verfahren ist auch auf *6,7-Trimethylen-9-l-araboflavin-tetraacetat* anwendbar, das schließlich aus Wasser umkrystallisiert wird (KUHNS, VETTER und RZEPPA).

Zwischenprodukte von Flavinsynthesen: S. 198.

Die Flavine (Lyochrome) des Harnes (KOSCHARA 1—3).

a) **Darstellung von Uroflavin aus Männerharn.** Das „Uroflavin“, das in den meisten Eigenschaften mit dem Lactoflavin übereinstimmt, besteht etwa hälftig aus Lactoflavin und einem O-reicheren Lyochrom. Es wurde aus 5000 l Harn isoliert:

Anreicherung. Die Vorschrift für die einleitenden Operationen ist S. 174, unter „Uropterin“ abgedruckt, bis zum Absaugen der sog. Purinfraktion (1,2 kg). Das Filtrat wird mit 12 l einer Lösung, enthaltend 600 g Bleiacetat und 420 g Bleihydroxyd, gefällt. Nach dem Absitzen über Nacht wird abgehebert und der Niederschlag genutscht. Man vermengt das Filtrat mit 1,2 l 10proz. Bleizucker und sättigt es mit H₂S. Nach dem Absitzen wird gehebert, das PbS abfiltriert und mit wenig Wasser nachgewaschen. Man eluiert es mit insgesamt 50 l eines heißen Gemisches von Wasser + Pyridin + Eisessig (9 : 1 : 0,2), dampft im Vakuum auf 8 l ein, äthert 24 Stunden aus, filtriert von einer geringen Fällung und bringt die wäßrige Lösung auf 4,2 l. Dieses *Konzentrat* enthält 700 mg Lyochrome (etwa 100 mg sind abgefallen).

Die chromatographische Isolierung geschieht in zwei Stufen, auf Floridin-Bleicherde XXF. Im ersten Chromatogramm (Flavin oben festgehalten) wird zunächst das Aquoflavin (S. 168, b) mit dem Waschwasser abgetrennt und dann das Lyochromgemisch mit Methanol + Pyridin + Wasser (3 : 1 : 1) eluiert (stark gefärbte Verunreinigungen bleiben in der Erde zurück). Bei einem zweiten Chromatogramm entfernt intensives Waschen weitere Begleitfarbstoffe, worauf die Lyochrome mit Methanol + Pyridin + Wasser abermals entwickelt werden. Nachdem die Hauptmenge des Farbstoffes eluiert worden, krystallisiert aus dieser Fraktion nach dem Einengen das *Uroflavin* aus und wird zweimal aus n-Essigsäure umgeschieden. Feine Nadelchen, Ausbeute 220 mg.

In der Säule verbleiben zwei Farbscheiben („drittes“ und „viertes“ Harnlyochrom), die mit 5proz. Pyridin gemeinsam entwickelt und in einem weiteren Chromatogramm sich scheiden lassen.

Reinigungsversuche. In Wasser konnte chromatographisch ein blau fluoreszierender Farbstoff abgetrennt werden, doch sind die Ergebnisse noch nicht endgültig. Man verwendet hier am besten die gröber disperse Bleicherde XS, da an XXF (anders als bei Rohlösungen) ein Farbstoffanteil allzu fest haftet und Fraktionierung vortäuschen könnte.

Zusammenfassend sei festgestellt daß die Säule die Anwesenheit von vier Farbstoffen verraten hat:

Oben: „drittes“ Harnlyochrom }
 „viertes“ Harnlyochrom }
 Uroflavin (Gemisch; 95% der Gesamtlyochrome).
 unten: Aquoflavin, schon mit Wasser auswaschbar.

b) Aquoflavin und Lumi-aquoflavin (KOSCHARA 2). Das *Aquoflavin* wird, wie erwähnt, mit Wasser von der Bleicherde abgelöst. Man engt ein, versetzt mit $\frac{1}{5}$ Vol. 2n-Schwefelsäure und adsorbiert nochmals. Waschen mit Wasser entfernt zuerst Begleiter und entwickelt dann langsam die gelbrote fluoreszierende Aquoflavinzone. Braune Farbstoffe bleiben im Adsorbens zurück.

10 cm³ Aquoflavinlösung (1,3 mg Farbstoff) wurden mit 2 cm³ 2n-NaOH versetzt und in einer Petrischale auf weißem Grund mit der 75-Watt-Metallfadenlampe bestrahlt (Abstand 10 cm, Dauer 55 Minuten). Man gibt 4 cm³ der Schwefelsäure zu, schüttelt mit Chloroform aus, befreit die wäßrige Lösung im Vakuum von CHCl₃-Resten und chromatographiert sie auf Bleicherde XXF (2,8 × 2 cm). Das *Lumi-aquoflavin* wird ganz oben fixiert und läßt sich, im Gegensatz zum Aquoflavin, mit Wasser nicht entwickeln. Elution mit 5proz. wäßrigem Pyridin.

c) Quantitative Bestimmung der Flavine (Lyochrome) im Harn (KOSCHARA 3).

250 cm³ Harn werden unter Zusatz von Octylalkohol im Vakuum auf 50 cm³ eingengt, mit 0,5 cm³ konz. HCl versetzt und ohne Rücksicht auf eine Fällung chromatographiert (4 × 2 cm Bleicherde XS, mit Säure vorbehandelt). Man wäscht die Säule mit 20 cm³ 0,1n-HCl, eluiert mit Wasser + Pyridin + Eisessig (9:1:0,2), bis das Filtrat farblos abtropft, welches dann im Vakuum, zum Schluß unter Zusatz von Bariumcarbonat, eingengt wird. Nun wird filtriert und die Lösung (20 cm³) mit 5 Tropfen Eisessig angesäuert. Man kühlt in Eis, setzt 6 Tropfen kaltgesättigtes Permanganat zu und zerstört den Permanganatüberschuß 1 Minute später mit 1 Tropfen 3proz. H₂O₂.

Nach dieser Bleiche gibt sich das Lyochrom durch grüne Fluoreszenz im Quarzlicht zu erkennen. (Fluoresziert die Lösung rein blau, so ist eine weitere Reinigung zwecklos, da dann der Flavinegehalt unter 10 γ -% liegt.) Nun folgt wieder eine Adsorption an Bleicherde XS (2 cm hoch). Man wäscht mit Wasser, trennt mit 2proz. wäßrigem Pyridin einen blau fluoreszierenden Anteil ab, eluiert die Flavine mit Methanol + Pyridin + Wasser (3 : 1 : 1) und kontrolliert die Vollständigkeit der Elution mit Pyridin + Essigsäure-Gemischen. Schließlich engt man das Eluat auf 5 cm³ ein und mißt es im Stufenphotometer.

Das Verfahren ist auch auf andere Flüssigkeiten anwendbar.

Bestimmung in Harn-Konzentraten (4,2 l aus 5000 l) s. bei KOSCHARA (3).

8. Pterine.

Die Pterine bilden eine besondere, u. a. in den Insekten weit verbreitete Farbstoffgruppe, deren Vertreter, im Hinblick auf den hohen Stickstoffgehalt, eine pyrimidin- oder purinartige Struktur besitzen werden (Definition: WIELAND und SCHÖPF; SCHÖPF und BECKER). Die nachstehenden Angaben über die Chromatographie von Insekten-, namentlich von Schmetterling-pterinen stammen aus der umfangreichen Arbeit von SCHÖPF und BECKER sowie von BECKER und SCHÖPF. Die chromatographische Isolierung von Uropterin aus Menschenharn wird nach KOSCHARA (5) auf S. 174 beschrieben.

Das Adsorptionsverhalten der wichtigsten Pterintypen (wahrscheinlich Gemische) ergibt das folgende Bild:

Erythropterin wird aus sehr verdünntem, wäßrigem oder methanolischem n/250-HCl viel besser adsorbiert als *Xanthopterin* C₁₉H₁₈O₆N₁₆ und bleibt als schmale Zone hängen, während das Xanthopterin aus wäßrigem HCl nur sehr schwach, aus methanolischem etwas stärker festgehalten wird. Man kann (vorteilhaft im Mikroadsorptionsrohr, S. 67) Xanthopterinpräparate in wäßriger Salzsäure auf Erythropterin, sowie Erythropterin in methanolischem HCl auf Xanthopterin prüfen (Al₂O₃). Im ersten Fall bleibt das Erythropterin oben hängen (rote Farbe, im Quarzlicht dunkel-samtbraun leuchtend), im zweiten Fall erblickt man unterhalb des roten Erythropterins das Xanthopterin als schmale, gelbe Zone (Fluoreszenz gelbgrün). Adsorbiert man aus schwach saurer Lösung, so werden im Al₂O₃ beide Farbstoffe allmählich zerstört:

der Xanthopterinring wird beim Entwickeln mit wäßrigem oder methanolischem HCl immer schwächer und verschwindet schließlich; der Durchlauf zeigt blaue Fluoreszenz.

Betreffend Erythropterin und Xanthopterin seien noch die folgenden Einzelheiten der erwähnten Arbeit von SCHÖPF und BECKER entnommen.

An Al_2O_3 und Floridin XXF wurde *Erythropterin* aus stark verdünnten Lösungen in n/250—n/500-HCl, an Frankonit aus Essigsäure + Natriumacetat adsorbiert; man eluiert aus Aluminiumoxyd mit 0,5n-NH₃, sonst mit 4proz. Pyridinwasser. Auf Frankonit KL zeigt Erythropterin in Essigsäure + Natriumacetat scheinbare Heterogenität, welche vielleicht von der Uneinheitlichkeit des Adsorptionsmittels hervorgerufen wird.

Xanthopterin. Aus wäßriger Lösung wird es bei neutraler oder schwach saurer Reaktion von Al_2O_3 , Frankonit KL oder Floridin XXF gebunden; bei etwas stärkerer Acidität wandert es rasch durch das Aluminiumoxyd. Von gereinigtem Floridin (S. 50) wird das Xanthopterin wie Erythropterin aus n/250—n/500-HCl aufgenommen. Frankonit KL bindet es aus essigsäuren oder neutralen Medien zu einem sehr konzentrierten Adsorbat an der oberen Endfläche der Säule. Nach dem Waschen mit Wasser eluiert es 0,5 n-NH₃ glatt. — Adsorption aus absolut-methanolischer Lösung: Auf Aluminiumoxyd wird Xanthopterin aus seiner Lösung in 0,01proz. methanolischem Chlorwasserstoff gut festgehalten, es blaßt jedoch in einer hohen Säule beim lange fortgesetzten Entwickeln allmählich aus. An Bariumsulfat wird Xanthopterin aus methanolischem Pyridin nicht fixiert, in Gegensatz zu Erythropterin.

Das *Chrysopterin* wird von Aluminiumoxyd aus n/250-Salzsäure (in der es, wie in 0,5 n-Essigsäure, violettblau fluoresziert) stärker festgehalten als Xanthopterin, und zwar mit gelbgrüner Fluoreszenz. Bei der Adsorption aus methanolischem HCl besteht kein so charakteristischer Unterschied. Das farblose und nicht fluoreszierende *Guanopterin* läßt sich, wie Xanthopterin, aus schwach saurer, verdünnt-wäßriger Lösung auf Frankonit KL festhalten und wird von 0,5 n-Ammoniak eluiert.

Weitere, zahlreiche Einzelheiten betreffend Adsorptionsverhalten s. im Original.

Darstellung von Roh-xanthopterin aus *Appias nero* (eine Pieride aus Java). Die Flügel von 2000 Tieren (32,2 g) wurden mit Äther entfettet, mit Alkohol vorbehandelt, mit Ammoniak ausgezogen und die Lösungen mit Salzsäure fraktioniert (Näheres im Original). Ein Teil des Farbstoffes gelangte in salzsaure Mutterlaugen (5 l) und ließ sich adsorptionsanalytisch weiter verarbeiten:

Die Lösung wurde mit gesättigtem Natriumacetat vorsichtig so weit abgestumpft, daß die Reaktion gegen Kongopapier etwa einer n/300-Salzsäure entsprach, dann ohne Filtration durch eine 20-mm-Schicht von Al_2O_3 (puriss. Merck) gesaugt (Jenaer Glas-Büchner-Trichter mit Schlitzsieb „S 70“). Man spült mit wenig Wasser nach. Oben sitzt ein dunkelrotvioletter Belag (1 mm), darunter eine stark rotbraune Zone (Erythropterin); der Rest des Adsorptionsmittels war schwach rosa gefärbt.

Die durchlaufende, honiggelbe Xanthopterinlösung trübte sich nach 24 Stunden bräunlich und wurde durch 10 mm Al_2O_3 gesaugt. Man verwarf das braune Adsorbat und schickte das mit 25 cm³ gesättigtem Natriumacetat völlig abgestumpfte Filtrat ein drittes Mal durch das Oxyd (10 mm). Der kräftig-gelbe Durchlauf fluoreszierte jetzt im Uviollicht gelbgrün und schied bald eine zitronengelbe Trübung ab. Er wurde nun auf eine 10 mm hohe *Frankonit-KL*-Säule gegossen, wo der Farbstoff sich festhielt (5 mm breit; Filtrat verworfen).

Man räumt die tiefgelbe Schicht ab, wäscht sie in der Zentrifuge einmal mit Wasser und eluiert dreimal mit je 100 cm³, dann fünfmal mit je 50 cm³ 0,5 n-NH₃. Die sehr trübe, schmutziggelbe Lösung saugt man durch 5 mm festgestampfte Asbestwolle (Glas-Büchner-Trichter „S 55“), welche grauviolette Stoffe zurückhält, und fällt die klare, goldgelbe Lösung mit Eisessig. Der Niederschlag wurde zentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und je sechsmal mit 100 cm³ bzw. mit 50 cm³ 0,25 n-HCl ausgezogen. Beim Abstumpfen mit gesättigtem Natriumacetat erhält man aus den einzelnen Extrakten hell-goldgelbe Fällungen des rohen Xanthopterin, welche gemeinsam zentrifugiert und mit Wasser bis zu Beginn der kolloidalen Auflösung gewaschen werden (1,3 g).

Das Flügelpigment der Kohlweißlinge (*Pieris brassicae* und *P. napi*) enthält neben Leukopterin (weiß) einen wasserlöslichen Farbstoff, und zwar nach WIELAND und KOTZSCHMAR ein grünes Chromoproteid, daneben eine gelbe Komponente. Auf Aluminiumoxyd, aus Wasser: oben: gelb, darunter: grün.

Mikro-chromatographie von Pterinen.

Diese Methodik wurde von BECKER und SCHÖPF ausgearbeitet, unter Verwendung des auf S. 67, Abb. 27 wiedergegebenen Mikro-adsorptionsrohres. Einschlägige Erfahrungen werden auch auf

anderen Gebieten verwertbar sein. Die Substanzmengen, mit welchen man hier arbeitet, liegen in einer Größenordnung, hinunter bis zu wenigen γ . Die nachstehenden Vorschriften beziehen sich zunächst auf reine Pterinlösungen und behandeln dann Insektenrohextrakte (weitere Beispiele im Original).

Xanthopterin. Aus einer Lösung von Xanthopterin in 0,01proz. methanolischer Salzsäure wird der Farbstoff auf Aluminiumoxyd als scharfe, gelbe Zone festgehalten. Die Probe gelingt auch dann, wenn das Xanthopterin nur als geringfügige Komponente eines Stoffgemisches vorliegt. Im ultravioletten Licht beobachtet man eine lebhaft gelbgrüne Fluoreszenz. Es ist wichtig, den Farbstoff nicht weiter zu entwickeln, als bis er das 3—4fache der Zonenhöhe durchwandert, da sonst Zersetzung eintritt. Wird dies durch Einschränkung des Lösungsmittels vermieden, so läßt sich auf Grund der Höhe auch die Menge des Xanthopterins abschätzen. Erfassungsgrenze 1 γ . Der letztgenannte Farbstoff ist neben Erythropterin, das von Aluminiumoxyd kräftiger adsorbiert wird, sehr gut nachweisbar. Aus der ersten und dritten Spalte von Tabelle 16 ist ersichtlich, daß eine annähernde Proportionalität zwischen der Xanthopterinmenge und der Scheibenhöhe besteht. Eine Entwicklung wurde hier nicht durchgeführt; Gesamtvolumen der Lösung: je 5 cm³.

Tabelle 16. Schätzung des Xanthopterins im Gemisch mit Erythropterin (Mikro-adsorptionsrohr, Aluminiumoxyd).

5 cm ³ 0,01proz. methanolische Salzsäure enthielten		Höhe der Xanthopterinzone (mm)	Aussehen des Chromatogramms
Xanthopterin (γ)	Erythropterin (γ)		
0	40	—	Breite, orangerote Zone. Xanthopterinband (gelb) im Quarzlicht gelbgrün.
5	0	2	
10	0	4	
0,4	40	0,2	Oben rot, darunter gelb (nur im Uviollicht erkennbar). Dasselbe.
2	40	fast 1	
40	2	15	Über dem Xanthopterin orangerotes Erythropterin. Dasselbe.
40	4	15	

Aus wäßriger n/250-Salzsäure wird das Xanthopterin von Aluminiumoxyd schwächer adsorbiert als aus methyllalkoholischem

HCl. Man erhält bei Anwesenheit von 0,5—1 γ in 0,5—1 cm^3 breite Adsorbate, die im Tageslicht unsichtbar sind, aber unter der Quarzlampe hell gelbgrün leuchten. Ist die Pigmentmenge etwas größer, so fluoresziert fast die ganze Säule. Steht noch mehr Rohfarbstoff zur Verfügung, so kann man ähnlich verfahren wie KOSCHARA (4, 5) bei der Isolierung des Uropterins (Adsorption aus Pufferlösung an Frankonit, waschen, mit Puffer eluieren usw., vgl. S. 174).

Im Aluminiumoxyd wäre eine Verwechslung des Xanthopterins mit Lactoflavin möglich, doch unterscheidet die Fluoreszenz der Adsorbate. Lactoflavin: warmer, fast orangegelber Farbton, Xanthopterin: kalt-gelblichgrüne Nuance.

Erythropterin. Zum mikrochemischen Nachweis dieses roten Farbstoffes sind n/250-Salzsäure und Al_2O_3 geeignet, da nur aus wäßriger Lösung eine scharfe Zone sich ausbildet, welche mit der erwähnten Säure als Ganzes abgetrennt werden kann. Farbe des Adsorbats schön orangerot, Uviolfluoreszenz samtbraun. Erfassungsgrenze: 5 γ Erythropterin in 5 cm^3 Lösung; man erhält dann eine weniger als 1 mm hohe Schicht im Mikroadsorptionsrohr.

Mikro-chromatographischer Nachweis von Pterinen in Insekten.

Nach BECKER und SCHÖPF wird das Pigment zweimal mit 0,5 n- und eventuell noch einmal mit 2 n-Ammoniak kalt ausgezogen. Man zentrifugiert die vereinigten Extrakte klar, dunstet sie über Ätzkali und Schwefelsäure im Exsiccator ein und untersucht den Rückstand.

Gonepteryx rhamni (Zitronenfalter). 20 Discoidalflecke von den Flügeln von 5 Männchen wurden mit dem Korkbohrer ausgestochen und wie oben behandelt. Man nimmt das Material mit 1 cm^3 n/250-wäßriger Salzsäure auf, saugt es im Mikrorohr auf Al_2O_3 und wäscht mit 0,75 cm^3 Säure nach. Chromatogramm:

- Oben: 3 grau (Verunreinigungen),
- 1,5 orangerot: *Erythropterin* (im Uviollicht braune Fluoreszenz),
- 4 fast farblos, im Uviollicht blau (Zersetzungsprodukt),
- unten: bis an das untere Ende fast weiß, gelbgrün leuchtend: *Xanthopterin*.

Beim Weibchen sah das Bild etwas anders aus.

Vespa crabro (Hornisse). Die Abdominal-integumente (25 mg) wurden zweimal mit je 1 cm³ 0,5 n-NH₃ ausgezogen und der durch Eindunsten gewonnene Rückstand mit 1 cm³ 0,01proz. methanolischem HCl verrieben. Man filtriert die vorsichtig abgehobene Lösung im STRZYZOWSKI-Trichter durch Watte und chromatographiert sie auf Al₂O₃; 5 mm unter der Oberfläche erschien eine 7 mm breite, gelbe Xanthopterinzone, im Quarzlicht hell-gelbgrün fluoreszierend. Wiederholt man die Behandlung des eingangs erwähnten Rückstandes mit n/250-wäßriger Salzsäure, so liefert dieser Auszug das folgende Bild:

- Oben: grau (Verunreinigungen),
 2,5 blaue Fluoreszenz: Zersetzungsprodukte des adsorbierten Xanthopterin,
 unten: den Rest der Säule bedeckend: Xanthopterin, leuchtet hellgrün.

Die Exkremente von *Gonepteryx rhamni* sowie von *Vespa crabro* erwiesen sich bei der mikro-chromatographischen Prüfung als pterin-frei (BECKER).

Isolierung von Uropterin aus Menschenharn.

Dieser gelbe Farbstoff, der dem Xanthopterin des Zitronenfalters (*Gonepteryx rhamni*) nahesteht, positive Murexidprobe gibt und im Harn in einer Verdünnung von 1 : 1000000 vorkommt, ist dort von KOSCHARA (5) entdeckt und isoliert worden. Die Arbeit bietet ein schönes Beispiel für das Zusammenwirken von Fluoreszenzbeobachtung und Adsorptionsanalyse.

Anreicherung vor der Chromatographie. Es wurden täglich 200 l Harn in 3 l 25proz. HCl aufgefangen. Zunächst hat man 10 Min. lang mit 4 kg Bleicherde XXF verrührt, abgehebert und das Sediment abgesaugt, das (ohne Waschen) mit 10—15 l 20proz. wäßrigem Pyridin eluiert wurde. Nach dem Vakuum-Einengen der Eluate aus 5000 l Harn bis zu 60 l wurden die folgenden Operationen vorgenommen: Fällung absaugen (Purinfraktion = 1,2 kg), je 50 g dieser trockenen Fraktion mit 500 cm³ n-NaOH 1 Stunde schütteln, Ungelöstes abzentrifugieren und die Behandlung wiederholen. Alkalische Lösung einlaufen lassen in 1 l kochende 2 n-HCl; auf 60—70° halten, bis der tiefgefärbte, amorphe Niederschlag durchkrystallisiert ist (2—3 Minuten). Nach dem Kühlen das braune Krystallmehl (30 g Harnsäure) absaugen, das Filtrat (Xanthinbasen) mit 170 g Bleicherde verrühren; abnutschen, die Bleicherde säurefrei waschen, mit 1,2 l 5proz. Pyridin eluieren und das Eluat auf 0,4 l einengen. Man versetzt mit 60 cm³ konz. NH₃ und 20 g NH₄Cl (Gesamtvolumen

550 cm³), verrührt mit 30 cm³ 5proz. AgNO₃-Lösung, zentrifugiert die Xanthinbasen ab und fällt die Mutterlauge erneuert mit 240 cm³ Silbernitrat. Die letztere Fällung, die den *Farbstoff* enthält, wird auf der Zentrifuge, ohne zu waschen, mit n-HCl verrührt, wodurch der Farbstoff sich löst. Man versetzt die Lösung mit Bleicherde, wäscht die letztere säurefrei, eluiert sie mit Pyridin, entfernt das letztere im Vakuum und nimmt die pyridinfreie Farbstofflösung in 500 cm³ Phosphatpuffer auf (p_H 7,6).

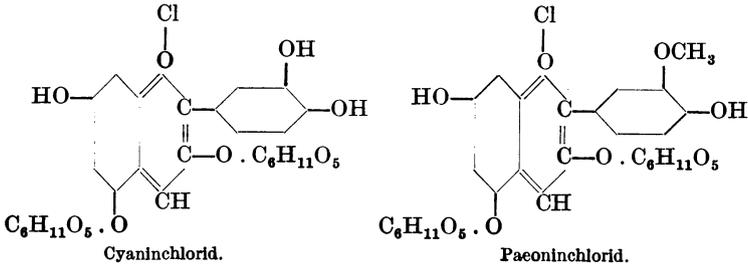
Adsorptionsanalyse. 90 g Frankonit KL werden mit 250 cm³ Phosphatpuffer (p_H 7,6) verrührt. Man gießt den Schlamm bei ganz schwachem Saugen auf eine Nutsche, Durchmesser 12,3 cm (zwischen Ansetzen des Schlammes und dem Aufgießen: mindestens 1 Stunde). Es wird sehr vorsichtig gesaugt und nach Ausbildung der Kolonne die Lösung des Farbstoffes in dem Phosphatpuffer (500 cm³) aufgegossen. Man saugt anfangs mit einem Unterdruck von 5 cm Wassersäule, welcher allmählich auf 30 cm gesteigert wird. Später kann höheres Vakuum angeschlossen werden. Nach dem Durchlaufen der Farbstofflösung wird mit 250 cm³ Phosphatpuffer (p_H 7,6) und dann mit 800 cm³ sek. Natriumphosphat ($\frac{1}{15}$ -molar; p_H 8,3) gewaschen. Dadurch wird nur wenig Begleitstoff entfernt, doch ist das intensive Waschen nötig, da die Säule nur so zur Entwicklung vorbereitet wird.

Nun eluiert man mit Boratpuffer (p_H 9,2): nach etwa 300 cm³ Puffer erscheint im Filtrat der erste Farbstoff. Die Abgrenzung der Uropterinfraktion (im allgemeinen 200 cm³) von nachfolgenden Farbstoffen ist schwierig. Sie ist gegenüber den letzteren ausgezeichnet durch ihre größere Leuchtkraft im Tageslicht und durch Stärke der Rotfluoreszenz unter der Quarzlampe. Beim Stehen über Nacht, in Eis krystallisieren gelbe Warzen: ein Salz mit einem Bestandteil der Bleicherde (30 mg).

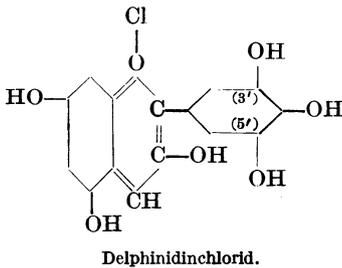
Das Krystallisat wird mit Lauge extrahiert, auf n-NH₃ gebracht und — ebenso wie die Mutterlauge — aus ammoniakalischer Lösung mit AgNO₃ gefällt. Silbersalz einmal mit n-NH₃, einmal mit Wasser waschen, mit 10 cm³ n-HCl zerlegen, zentrifugieren und filtrieren; AgCl mit 5 cm³ HCl nachwaschen. Man kühlt die salzsaure Lösung in Eis, stumpft sie mit gesättigtem Natriumacetat ab und zentrifugiert die amorphe, rotgelbe Fällung nach 1 Stunde. Dreimaliges Waschen mit 5 cm³ Eiswasser. Von dem amorphen Farbstoff (40 mg) wurden 7,5 mg in 10 cm³ n-NH₃ gelöst, mit 10 cm³ n-Essigsäure versetzt, gekocht und filtriert. Im Filtrat erschienen rotgelbe Krystallkugeln und später beim Stehen sah man eine grüne Krystallhaut: zusammen 3,8 mg.

9. Anthocyane.

Die Chromatographie von Anthocyanen wurde bereits von TSWETT (9; 1, dort S. 229) versucht, jedoch wieder aufgegeben,



weil diese Farbstoffe in Benzin, Schwefelkohlenstoff usw. unlöslich sind. Die neuen Arbeiten von KARRER und STRONG (1)



bzw. von KARRER und WEBER haben dann an zwei Beispielen gezeigt, daß man diese Schwierigkeit umgehen kann. KARRER und STRONG (1) nehmen die Bearbeitung in wäßriger Lösung vor, auf einer Aluminiumoxyd-Kolonnen, die mit Leitungswasser nach RUGGLI und JENSEN (1) schwach aktiviert ist.

Es sei bemerkt, daß auch ein homogenes Anthocyan in rote, blaue, eventuell blaugrüne Zonen zerfallen kann, da das basisch wirkende Adsorptionsmittel einen Teil des Oxoniumsalzes umsetzt, unter Bildung von Carbinolbase und Phenolbetain. Das Aufteilen der Säule führt dann nicht zu verschiedenen Pigmentarten. Andererseits können einheitlich aussehende Zonen unter Umständen heterogen sein. So haben PRICE und ROBINSON ihr aus *Bougainvillea glabra* gewonnenes Rohpräparat in der Aluminiumoxyd-Säule vergeblich zu reinigen versucht. Es bildeten sich zwar zwei wohldefinierte Farbscheiben aus (oben: purpur, darunter: leuchtend gelb), doch erwies sich die untere Zone als ein Gemisch eines Glucosids mit seinem Aglucon.

Aus der erwähnten Untersuchung von KARRER und WEBER folgt, daß der Farbstoff der schwarzen Malve, das sog. „Althaein“,

uneinheitlich ist, nämlich ein Gemisch von Monoglucosiden des Delphinidin-3',5'-dimethyläthers (Syringidin), des Delphinidin-3'-monomethyläthers und des Delphinidins. Das erstgenannte Glucosid erwies sich mit dem Weinfarbstoff Oenin als identisch. Die chromatographisch gewonnenen Fraktionen wurden über die Pikrate weiter gereinigt.

a) *Trennung von Cyanin- und Paeoninchlorid.* (KARRER und STRONG). Paeonin ist ein Methyläther des Cyanins und zeigt erheblich geringere Adsorbierbarkeit als der Farbstoff mit 3 freien Hydroxylen. Ein aus der rotblühenden Paeonie bereitetes, rohes Paeoninchlorid wurde auf nachstehendem Wege von etwas begleitendem Cyaninchlorid befreit und so in ausgezeichnetem Reinheitsgrad erhalten. Die Farbe des gewonnenen Endproduktes schlägt in verdünntem Alkohol auf Zusatz von Ferrichlorid nicht in Violett um; diese Reaktion der, bisher ohne Chromatographie bereiteten Paeoninpräparate ist also auf beigemischtes Cyanin zurückzuführen.

Die Lösung von 1,5 g *Rohpaeonin* in 200 cm³ warmem Wasser wurde auf aktiviertem Al₂O₃ adsorbiert und mit Wasser entwickelt. Oben: purpurfarbige Scheibe, darunter: hellblau; ein beträchtlicher Farbstoffanteil (Paeoninchlorid) ging durch die Säule, als man mit Wasser nachwusch, was bis zur Farblosigkeit des Filtrats fortzusetzen ist. Der oberste Anthocyanring wurde mit etwas HCl-haltigem, warmem Wasser 10—12mal (noch unvollkommen) eluiert und das Eluat im Vakuum auf zirka 20 cm³ gebracht. Den dabei ausgeschiedenen, flockigen Farbstoff hat man mit Wasser, Aceton und Äther nachgewaschen, wieder in Wasser gelöst und nochmals chromatographiert; das Bild war das beschriebene. Die bei dem Konzentrieren des Eluates der obersten Zone erhaltene Farbstoff-Fällung wurde 10—15 Sekunden mit 20 cm³ 0,5 n-HCl aufgeköcht, wobei Lösung eintrat. Nach rascher Filtration erschienen bei 0° Krystalle, die aber noch etwas methoxylhaltig waren und deshalb zum dritten Male chromatographiert wurden. Das schließlich gewonnene Krystallisat (110 mg) ging beim Erwärmen mit 0,5 n-Salzsäure nur zum kleineren Teil in Lösung; der Rest wurde mit 10 cm³ Wasser aufgeköcht und das Filtrat mit 0,6 cm³ konz. Salzsäure versetzt. Im Eisschrank krystallisierten 76 mg reines, methoxylfreies *Cyaninchlorid* aus.

Zur Isolierung des *Paeoninchlorids* wurden die während des

ersten und zweiten Adsorptionsversuches durch die Kolonne gelaufenen Filtrate gemeinsam bei 30° im Vakuum auf 20 cm³ eingengt. Man filtriert den dabei entstandenen krystallisierten Niederschlag ab und scheidet ihn aus 50 cm³ 0,5 n-Salzsäure unter kurzem Aufkochen um. Nach dem Waschen mit Wasser, Aceton und Äther wird das Präparat an der Luft getrocknet. Feine, rote Nadeln, Ausbeute 0,55 g.

b) *Aufteilung des „Althaeins“* (KARRER und WEBER). Eine wäßrige Lösung von 2 g Althaeinchlorid wurde durch eine 80 cm hohe Schicht von wasserhaltigem Gips gesaugt. Eine Pigmentfraktion blieb oben hängen, eine andere lief beim Nachspülen durch. Die letztere Lösung wurde im Vakuum bei 30° stark eingengt (Fraktion I). Der fixierte Farbstoffanteil konnte mit sehr verdünnter, warmer Salzsäure eluiert werden. Nach dem Abstumpfen des Säureüberschusses und Konzentrieren im Vakuum wurde nochmals auf Gips chromatographiert. Nun erfolgte eine Scheidung in zwei deutlich verschiedenfarbige Zonen, die im höchsten Bezirk der Säule unmittelbar aufeinanderfolgten (oben: II., darunter III. Fraktion). In das Filtrat gelangte jetzt nichts. Elution wie angegeben; die Eluate werden Vakuum bei 30° stark konzentriert.

Die drei so gewonnenen Farbstofflösungen wurden mit wäßriger Pikrinsäure gefällt und die Pikrate aus kochendem Wasser mehrmals umkrystallisiert. Sie gaben beim Lösen in 2proz. methanolischer Salzsäure und Fällen mit Äther krystallisierte Anthocyanchloride zurück.

Fraktion I erwies sich als das analysenreine Monoglucosid eines Delphinidin-dimethyläthers und wurde mit *Oenin* identifiziert (11,5% OCH₃). Sie löst sich mit roter Farbe in Wasser und gibt keinen Farbumschlag mit Ferrichlorid. Die Fraktionen II und III waren noch nicht ganz einheitlich, sie scheinen ein Monoglucosid des *Delphinidin-3'-methyläthers* zu sein, mit einer Beimengung von Delphinidin-glucosid, wodurch die Methoxylzahl herabgedrückt wird (gefunden 5—6% OCH₃). Ferrichloridprobe positiv.

Anhang. Kurze Angabe über die Trennung von *Flavanon*-Abkömmlingen: FUJISE und NAGASAKI.

Weinfarbstoffe. Nachweis von Verfälschungen.

Die nachfolgend referierte Arbeit von MOHLER und HÄMMERLE (1, 2) zeigt deutlich, daß der Chromatographie auch auf

dem Gebiet der *Nahrungs- und Genußmittel* mannigfaltige Anwendungen bevorstehen (siehe auch S. 269 und 279).

Die Versuche wurden in den Apparaten Abb. 15, S. 61, auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) ausgeführt. Man stellt vorher den Wein durch Zusatz von absolutem Alkohol auf einen 50proz. Spritgehalt ein (z. B. 40 cm³ Wein + 35 cm³ Alkohol). Die Säule wird vor dem Versuch mit 50proz. Alkohol unter Saugen durchtränkt; die Entwicklung geschieht mit demselben Lösungsmittel (20 cm³). Ein unverfälschter Rotwein lieferte das in Abb. 38

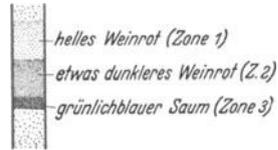


Abb. 38. Chromatogramm eines Rotweines.

wiedergegebene Chromatogramm, dessen Zone 3 durch die alkalische Wirkung des Adsorbens hervorgerufen wurde; das Filtrat zeigte äußerst schwache Blaufärbung. Die Zonen 1 und 2 wurden gemeinsam, mit Hilfe einer 2proz. Weinsäurelösung in 50proz. Alkohol, fünfmal eluiert und der colorimetrischen sowie der spektrophotometrischen Messung unterzogen.

Tabelle 17. Chromatographisches Verhalten von Bordeauxrot in 50proz. alkoholischer Lösung, in Gegenwart von Weinsäure und Tannin.

Gehalt der Lösung an			Ergebnis
Weinsäure ‰	Tannin ‰	Farbstoff ‰	
5	0	0,025	Keine Adsorption.
5	1	0,025	
5	2,5	0,025	Nur Tannin wird fixiert. Farbstoff und Tannin größtenteils adsorbiert; nur der erstere mit 50proz. Alkohol eluierbar.
5	4	0,025	
10	4	0,025	
10	4	0,050	Farbstoff und Tannin adsorbiert; Farbstoff mit 50proz. Alkohol kaum eluierbar.

Der *Nachweis von zugesetztem Teerfarbstoff* (Bordeauxrot) gelingt in einem analog geleiteten Versuch, wobei das fremde Pigment durch die Säule geht und im Filtrat quantitativ bestimmt werden kann. Eine besondere Voraussetzung hierfür ist der richtige Gesamtsäuregehalt des Weines (berechnet als „Weinsäure“), welcher entsprechend einzustellen ist. Beträgt z. B. die Konzen-

tration des zugesetzten Bordeauxrots $0,025\text{‰}$, so darf die Weinsäure-Konzentration nicht über 5‰ liegen, da sonst auch der Teerfarbstoff mit adsorbiert wird und eine Lage unterhalb der natürlich vorkommenden Anthocyane einnimmt. Auch von Gerbsäure wird das chromatographische Verhalten beeinflusst (Tabelle 17, S. 179).

In einem Falle konnte der Zusatz von Weißwein zum Rotwein, welcher mit Hilfe eines Teerfarbstoffes überdeckt war, chromatographisch erwiesen werden, nämlich durch die abnormal niedrigen Farbstärken der Zonen 1 und 2 (Abb. 38, S. 179), nachdem das Kunstprodukt ins Filtrat gegangen war.

10. Sonstige natürliche Farbstoffe.

(Über Indirubin s. S. 225.)

Pilzfarbstoffe.

Aus dem echten Reizker (Wacholder-Milchling, *Lactarius deliciosus*) hat WILLSTAEDT (6, 7) auf chromatographischem Wege zwei Pigmentkomponenten gewonnen; der Hauptfarbstoff ist *Lactaro-violin* $C_{15}H_{14}O$. Ferner wurde ein flüssiger Kohlenwasserstoff, nämlich ein blaues *Azulen* $C_{15}H_{18}$ herausgearbeitet, das, im Wege einer Al_2O_3 -Chromatographie, auch aus Kamillenöl (in Petroläther) erhalten werden kann („Chamazulen“). Das letztgenannte Pigment hat sich wohl erst im Verlaufe der Bearbeitung des Pilzes an der Luft gebildet.

Lactaro-violin. 3 kg Pilze werden zerrieben, 1 Tag in 2 l Alkohol stehen gelassen, durch ein Tuch filtriert und gepreßt. Wiederholung mit 1 l Alkohol. Man gießt die Lösung durch Faltenfilter, versetzt sie mit $\frac{1}{2}$ Vol. Äther + Wasser und läßt die rote Ätherlösung mit $\frac{1}{20}$ Vol. alkoholischem Natron über Nacht stehen, wobei eine farblose, flockig-krystallinische Masse erscheint. Man dekantiert die Ätherlösung, wäscht sie alkalifrei, trocknet, dampft ab und nimmt den Rückstand mit Petroläther auf. Die filtrierte Lösung wird dann auf Aluminiumoxyd (standardisiert, nach BROCKMANN) aufgeteilt; entwickeln mit Benzol + Petroläther 1 : 5. Oben: schmal, grünlichgrau, darunter der rote Hauptfarbstoff, aus welchem beim Entwickeln eine rein blaue Komponente nach unten wandert. Man eluiert die Hauptzone mit Petroläther + Methanol und chromatographiert sie nochmals. Wird

das mit Wasser gewaschene, rotviolette zweite Eluat stark eingengt, so krystallisiert im Eisschrank das Lactaro-violin aus. Umscheiden aus Petroläther + etwas Benzol. Stäbe, Schmelzp. 53°.

Azulene. Die zweimal mit Sprit extrahierten Pilzschnitzel (S. 150) werden mit Aceton übergossen (Blaufärbung), nach 1 Tag abgepreßt und nochmals mit Aceton extrahiert. Man emischt die tiefblaue Lösung mit Benzin und Wasser, schüttelt die untere Phase nochmals mit Benzin und wäscht die blauen Benzinauszüge acetonfrei. Die getrocknete Lösung wurde in der Aluminiumoxyd-Säule verarbeitet:

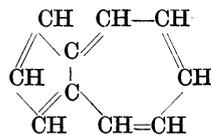
Oben: dünne Ringe: violett, braungelb, schwarz, purpur (Lactaro-violin), olivgrün,
breit, hellblau: „Azulen II“,
breit, intensiv blau: Lactar-azulen (Hauptfraktion),
unten: orange, geht leicht in den Durchlauf.

Man eluiert die Hauptfraktion mit Petroläther + Holzgeist, wäscht den Alkohol weg, verjagt den Petroläther im Stickstoffstrom und destilliert das *Lactar-azulen* $C_{15}H_{18}$ in gutem Vakuum. Siedep. 155 bis 160°, bei 2,5—3 mm. Gibt in Alkohol mit 1,3,5-Trinitrobenzol tief-schwarze Nadeln (Additionsprodukt): 4,5 g, aus 30 kg frischem Pilz.

Ferner lassen sich die bei der Schwefel- oder Selen-*Dehydrierung* aus Sesquiterpenen entstehenden Rohazulene chromatographisch reinigen (PFAU und PLATTNER).

Beispiel. Das aus Cyclopentano-cycloheptanon mit Mg + Brombenzol erhaltene Gemisch wurde mit S dehydriert (170—240°, 100 mm, $\frac{3}{4}$ Stunden) und der destillierbare Teil zweimal chromatographiert (Petroläther, Al_2O_3). Braune Begleiter blieben hängen; das rein blaue Filtrat enthielt *Azulen* und farblose Kohlenwasserstoffe (WILLSTAEDT 6, 7).

Interessant ist die chromatographische Darstellung des *Grundkörpers der Azulene*, des Azulens $C_{10}H_8$, nach PLATTNER und PFAU. Dieses ließ sich nach Dehydrierung eines Cyclopentano-cycloheptanols als Trinitrobenzolatz fassen. Die Zerlegung des Additionsproduktes wurde zunächst durch fraktionierte Sublimation versucht, wobei es aber unmöglich war, das Azulen von Trinitrobenzolspuren zu befreien. Dagegen gelingt die Spaltung in der Aluminiumoxyd-Säule glatt, unter der Wirkung des Adsorbens:



Azulen: Bicyclo-(0, 3, 5)-decapentaen-(1, 3, 5, 7, 9).

Auf die Säule (nach BROCKMANN, $18 \times 1,7$ cm) wurden zunächst 0,4 g Azulen-trinitrobenzolat aufgeschüttet. Man wäscht mit 50 cm³ Cyclohexan + Benzol (1 : 1), dann mit 30 cm³ Cyclohexan nach. Das Trinitrobenzol blieb als braune Zone hängen, während das Azulen leicht durchlief. Die angegebene Menge an Adsorptionsmittel genügt knapp. Aus dem tiefblauen Filtrat wird das Cyclohexan in einer gut wirkenden Kolonne abdestilliert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels, Ausbeute 0,137 g (= 92%) an krystallisiertem Anzulen. Aus Alkohol: blaue Blättchen, Schmelzp. 98,5—99°.

Zerlegung weiterer Additionsverbindungen im Chromatogramm. *Guajazulen-trinitrobenzolat* wird wie oben beschrieben verarbeitet. 0,577 g *Vetivazulen-pikrat* auf Al₂O₃ ($17 \times 1,7$ cm) mit 40 cm³ Cyclohexan + Benzol (1 : 1), dann mit Benzol nachgewaschen. Die Pikrinsäure bleibt hängen (zum Schluß 2 cm breit), das Vetivazulen krystallisiert beim Abdampfen des Durchlaufes. Ausbeute 95%, Schmelzp. 32 bis 33°.

Harzfarbstoffe.

Aus indischem *Palm-drachenblut* (*Sanguis draconis*), einem pflanzlichen Exkret, das bei der Lackfabrikation verwendet wird, haben BROCKMANN und HAASE (1, 2) den tiefroten Hauptfarbstoff *Dracorubin* C₃₂H₂₄O₅ auf folgendem Wege gewonnen.

1 kg feinpulvriges Material (Merck) wurde in 250-g-Portionen mit 1,5 l Benzol ausgekocht und nach dem Erkalten filtriert (Rückstand 90 g). Das Filtrat blieb nach Zusatz von 10 g Pikrinsäure über Nacht stehen. Man saugt das braune Pikrat ab, kocht es gründlich mit Benzol aus, schüttelt es zweimal je 1 Stunde mit Benzol auf der Maschine, nutschts und trocknet an der Luft. Die Niederschläge aus 1 kg Harz wurden in 1/2 l Methanol suspendiert, am Wasserbad erwärmt und mit 40 g KOH in 100 cm³ Wasser versetzt. Nach kurzem Erwärmen saugt man das freigelegte, rohe Dracorubin ab, wäscht es mit Wasser gut aus, suspendiert es nochmals in Wasser und trocknet die Krystalle im Vakuum über CaCl₂. Ausbeute 36 g, Schmelzp. 287°.

Zur Reinigung wurde in Chloroform, auf Aluminiumhydroxyd III chromatographiert. Die unterste, schmale, braune Zone des mehrschichtigen Chromatogramms wurde mit Chloroform aus der Säule gewaschen und darauf das Dracorubin aus dem Mittelteil der leuchtend roten Hauptschicht mit methanolhaltigem

Chloroform eluiert. Man dampft ab, löst den krystallisierten Rest in CHCl_3 und wiederholt die Chromatographie zweimal. Granatrote Prismen, Schmelzp. 315° ; chromatographisch einheitlich.

Das aus Dracorubin künstlich bereitete β -Hydrodracorubin ließ sich im Wege einer Filtration durch die Aluminiumhydroxyd-III-Säule reinigen (Benzol, 2% Methanol enthaltend).

Gleichzeitig mit BROCKMANN und HAASE hat sich auch HESSE mit dem Drachenblutpigment beschäftigt. Zu seiner nachstehend referierten Untersuchung sei vermerkt, daß dort der Hauptfarbstoff als „Dracocarmin“ ($\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{O}_5$) und ein Nebenfarbstoff als „Dracorubin“ ($\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_7$) bezeichnet wird, nach einer Mitteilung von Herrn HESSE soll jedoch in Zukunft der ältere Name *Dracorubin*, in Einklang mit der von BROCKMANN und HAASE gebrauchten Nomenklatur, beibehalten werden.

580 g Harzpulver (Caesar und Loretz) wurden im Extraktor mit Äther erschöpft und die Lösung mit 1 Raumteil Petroläther gefällt. Man löst den dunkelroten Niederschlag in 500 cm^3 Amylalkohol und schüttelt die Flüssigkeit abwechselnd mit n-Soda und mit Wasser, bis ihr nichts mehr entzogen wird. Beim nachherigen Schütteln mit 2 n-HCl schlägt die tiefrote Farbe in Braun um. Man engt die amyalkoholische Lösung im Vakuum auf 200 cm^3 ein und fällt mit Äther die Farbstoff-chlorhydrate aus (hellbraun, 15 g). Die letzteren werden in 200 cm^3 Chloroform aufgenommen und mit 2 n-Soda durchgeschüttelt (Farbe wieder tiefrot). Man filtriert von einem geringen Niederschlag, trocknet und chromatographiert die Lösung auf Al_2O_3 (nach BROCKMANN, $35 \times 4,5\text{ cm}$):

Oben: (braun),
 ganz dunkel rot,
 rot, enthält den Hauptfarbstoff „Dracocarmin“ = Dracorubin,
 (gelbrot),
 (rosa),
 unten: (braun).

Die drei untersten Bezirke lassen sich mit Chloroform in das Filtrat treiben; man wechselt die Vorlage und wäscht die breite Hauptzone durch die Säule. Dieser Pigmentanteil krystallisiert sofort, wenn man den Abdampfrückstand der Chloroformlösung mit wenig Chloroform oder Alkohol aufkocht. Glitzernde Krystalle,

Schmelzp. 293°; Krystall-chloroform bzw. -alkohol anwesend. Die Verbindung bildet ein orangegelbes Chlorhydrat.

Ein weiteres Entwickeln mit Chloroform ändert am Chromatogramm nichts Wesentliches, wäscht man aber die Säule mit Chloroform + Alkohol (1 : 1), so löst sich eine tiefrote Schicht von dem dunklen Bezirk ab und wandert in das Filtrat: „Dracocorubin“ (= Dracocarmin von BROCKMANN und HAASE). Sehr schwer löslich, wird aus Alkohol krystallisiert, besser über das Chlorhydrat gereinigt. In der Säule bleiben sechs verschieden gefärbte Zonen zurück, die diffus ineinander fließen und teilweise krystallisierbaren Farbstoff enthalten.

Anhang. Farblose Harzbestandteile.

Lariciresinol C₂₀H₂₄O₆ wurde von HAWORTH und KELLY auf folgendem Wege aus dem „Überwallungsharz“ der Lärche (*Larix decidua*) gewonnen.

2,5 kg frisches Harz (viskös, cremefarbig) wurden zweimal mit siedendem Sprit (8 l) ausgezogen und der Extrakt im Vakuum möglichst eingedampft. Man löst den braunen, viskösen Abdampfrückstand (1,5 kg) in 1 l heißem Alkohol und rührt eine Lösung von 900 g KOH in 300 cm³ Wasser ein. Das Kaliumsalz des Lariciresinols schied sich aus der dunkel gewordenen Lösung beim Abkühlen langsam ab. Es wurde nach 12 Stunden gesammelt, in Wasser gelöst und filtriert. Man beseitigt Verunreinigungen mit Äther, säuert mit konz. HCl an (Kongo) und neutralisiert den Überschuß der Säure sofort mit Natriumbicarbonat. Das braune Gummi, das beim Stehen fest geworden ist, wird nach 12 Stunden abgenutscht und durch wiederholtes Waschen mit warmem Bicarbonat von gefärbten Begleitstoffen größtenteils befreit. Man löst die feste, bräunlichgelbe Substanz (270 g) in 1,5 l warmem Methanol, filtriert durch eine Aluminiumoxyd-Säule und engt auf 400 cm³ ein. Nach 12 Stunden waren 170 g fast reines Lariciresinol abgeschieden, Schmelzp. 164—166°. Verfilzte Nadeln, die zweimal aus Methanol umkrystallisiert werden. Schmelzp. 167—168°.

Fruchtfarbstoffe.

Osajin. WALTER, WOLFROM und HESS haben die zerschnittene und bei 80—90° getrocknete Frucht der *Maclura pomifera* RAF. (Osage-Orange) mit heißem Petroläther erschöpft und das Osajin mit Äther ausgezogen. Nach einer Behandlung mit Holzkohle genügt eine Filtration durch Holzkohle + Fullererde zum Ausrystallisieren des reinen Farbstoffes aus der eingeengten Ätherlösung. Eine Adsorption an akt. Al₂O₃ und die (schwierige)

Elution mit Eisessig führte zu keiner weiteren Reinigung mehr.

Gesamtertrag 93 g aus 1,6 kg trockenes Material, Schmelzpt. 182—186°, Zusammensetzung etwa $C_{25}H_{24}O_5$; besitzt Phenolcharakter.

Rottlerin. Der gelbe Farbstoff aus der Droge „Kamala“ (bereitet aus Drüsen der Fruchtepidermis von *Rottlera tinctoria* ROXB.) besitzt nach BROCKMANN und MAIER die Zusammensetzung $C_{30}H_{28}O_8$. Der Schmelzpunkt 201—202° wurde durch fraktionierte Adsorption an Calciumcarbonat, aus Benzol + Benzin nicht erhöht.

Iso-rottlerin. $C_{30}H_{28}O_8$. 4 g Rottlerin in 500 cm³ Alkohol wurden 96 Stunden unter Rückfluß gekocht (Farbaufhellung). Man dampft ab, wiederholt das Abdampfen zweimal mit Benzol + Benzin (1:1), zieht dann den Rest mit dem gleichen Solvent aus und chromatographiert die schmutziggelbe Lösung auf Calciumcarbonat (Merck). Beim Nachwaschen erscheint oben eine bräunlichgelbe, darunter eine blaßgelbe Zone, von welchen die letztere beim längeren Entwickeln mit Benzol + Benzin (1:1) durchläuft. Man verdampft diese Fraktion im Vakuum und krystallisiert die Substanz aus Benzol + Methanol, dann aus Methanol um. Ausbeute 1,6 g. Schwefelgelbe, derbe Krystalle; Schmelzpunkt, nach dem Erhitzen auf 135° im Vakuum: 180°.

Viertes Kapitel.

Anwendungen auf künstliche Farbstoffe.

Teerfarbstoffe verschiedener Art haben RUGGLI und JENSEN (1, 2; vgl. auch JENSEN) untersucht. Die theoretischen Ergebnisse dieser Arbeit wurden S. 38 besprochen.

a) Adsorptionsverhalten einiger basischer Farbstoffe, in wäßriger Lösung, auf aktiviertem Aluminiumoxyd:

Stärkste Ads.	Viktoriablau B, Methylenblau D, Patentphosphin G, Krystallviolett 5 BO, Fuchsin G, Safranin OO, Brillantgrün, Malachitgrün,
↓	
schwächste Ads.	Auramin O.

Diese 9 Farbstoffe wurden in den möglichen 36 Zweierkombinationen untersucht, von denen in 32 Fällen scharfe Trennung sich erzielen ließ. Ungünstig fiel die Probe nur bei den folgenden 4 Paaren aus: Auramin + Malachitgrün, Brillantgrün + Malachitgrün, Patentphosphin + Methylenblau und Fuchsin G + Safranin.

In manchen Fällen gelingt auch die Trennung von Dreiergemischen (farbige Abbildungen im Original), z. B.:

Oben: schwarzblau: Viktoriablauf } scharfe, dünne Zonen,
 violettblau: Methylenblau }
 unten: gelb, ausgebreitet, wegwaschbar: Auramin O.

Ersetzt man das Methylenblau mit Fuchsin, so entsteht ein analoges Säulenbild.

b) Bei einer Anzahl von Säurefarbstoffen ergab sich die folgende Reihe (die Pfeile zeigen die Kupplungsrichtung an):

Stärkste Ads.	}	Tuchehtschwarz B (1-Naphtylamin-5-sulfosäure →
		α-Naphtylamin → Phenyl-peri-Säure) und
	}	Tuchehtblau B (Anilin → Cleve-Säure → Phenyl-
		peri-Säure),
		(betr. Adsorbierbarkeit mit dem Vorgehenden
		fast identisch),
		(Helvetiablauf (Triphenylosanilin-trisulfosäure) und
		(Orange II (Sulfanilsäure → β-Naphtol),
		Naphtolgelb S (7-Sulfosäure des Martiusgelb),
		(Erioglaucin supra (saurer Triphenylmethan-Farb-
		stoff) und
↓		
schwächste Ads.		Xylenrot B (sulfoniertes Rhodamin).

c) Substantive Farbstoffe. Mono- und Disazofarbstoffe.

Diaminrosa FFB (Dehydro-thiotoluidin → 1-Chlor-8-naphtol-3,6-disulfosäure): dünne violette Zone, violett und schwach violett, die letzteren gut auswaschbar („Filtrate“)¹.

Erika G extra (Dehydro-thioxylydin → G-Säure): breit hellrot, dann blaues, karminrotes, violettes „Filtrat“, mit weißen Zwischenräumen.

Erika B (Dehydro-thioxylydin → ε-Säure): schmutzig-gelbe Zone, dann Filtrate: violett, rosa, rosa (Formeln S. 41).

Als Beispiel für die *Chromatographie eines bekannten Handelsfarbstoffes* sei das *Kongorot technisch* angeführt. Nach RUGGLI und JENSEN (1) liefert es in Pyridin ein zusammengedrückteres Bild, in Wasser eine mehr auseinander gezogene Schichtung. Die Zonenfolge war stets die gleiche:

¹ Als „Filtrate“ werden schwach fixierte, leicht auswaschbare Komponenten bezeichnet, und zwar auch dann, wenn sie vorübergehend eine gut definierte Farbschicht bilden. Charakteristisch für solche Anteile ist das rasche Abwärtswandern.

100 cm³ der 2proz. Lösung wurden allmählich in die Al₂O₃-Säule eingeführt und mit 1,5 l Wasser entwickelt.

- Oben: a) schmal, rotviolett,
 b) rosafarbig, breit,
 c) stark rote Hauptzone,
 unten: d) breit, gelborange.

Nach dem Zerschneiden wurden die einzelnen Anteile mit kochendem Wasser eluiert und verdampft. Die Isolierung erfolgte teils direkt, teils durch *Auffärben* auf mercerisierte Baumwolle, Abziehen mit kochendem Wasser, Eindampfen und Umkrystallisieren aus Methanol. Die Operationen wurden nach Bedarf wiederholt und variiert. Zone *a* gab wenig dunkelrotes Pulver, das auf mercerisierter Baumwolle eine kräftige bräunlichrote Färbung zeigt; *b* liefert ein dunkelrotes Pulver, Ausfärbung rot, säureempfindlich; aus *c*: dreimal umkrystallisiert, rotes Pulver (Hauptmenge), Ausfärbung starkes, reines Rot, säureempfindlich; *d*: etwas orangefarbiges Pulver, auf Baumwolle gelborange, beständig gegen verdünnte Essigsäure; wird mit 5proz. HCl nur rotviolett.

Das *Kongorot rein* (dreimal aus Wasser + Alkohol umkrystallisiert, salzfrei) war chromatographisch einheitlich. Nach Zusatz von *Salz* (2 g NaCl zu $\frac{1}{3}$ g Farbstoff in 100 cm³ Wasser) bildete das meiste gleichfalls eine wandernde Schicht, die etwas mehr als sonst zusammengedrängt war. Oben verblieb nur eine dünne Zone.

Benzopurpurin 4 B (Tolidin → 2 Mole Naphtionsäure) war adsorptiv einheitlicher als Kongorot.

Benzoazurin G (Dianisidin → 2 Mole 1-Naphtol-4-sulfosäure):

- Oben: dunkelblau } Ausfärbung wie das Handelsprodukt,
 hellblau, breit }
 graublaues Filtrat, liefert violette Färbung, bügelechter
 als das Handelsprodukt,
 unten: rotes Filtrat, gibt braunviolette Ausfärbung.

Die Verschiebung der Nuance nach Rot ist vielleicht auf Polydispersität zurückzuführen, da der gleiche Effekt auch durch Bügeln der Ausfärbung, Erhitzen der Lösung oder Zusatz von Alkohol erzielt werden kann.

Direkthimmelblau grünlich (= Diaminreinblau; Dianisidin → 2 Mole 1-Amino-8-naphtol-2,4-disulfosäure). 100 cm³ 2proz. Lösung in der Al₂O₃-Säule (21 × 6,5 cm), mit 1,5 l Wasser entwickelt:

Oben: blaugrün, nach unten schwächer, grünstichig-blaue Ausfärbung,
 kräftig violettes Filtrat, Ausfärbung blauviolett, bügelunecht,
 unten: kräftig blaues Filtrat (Hauptmenge), auf Baumwolle tiefblau.

Bei den folgenden Trisazo- und Tetrakisazo-Farbstoffen zeigten sich verwickeltere Chromatogramme (Reihenfolge der Zonen von oben nach unten);

Dianilschwarz PR (*m*-Phenylendiamin \leftarrow γ -Säure \leftarrow Benzidin-monosulfosäure \rightarrow γ -Säure \rightarrow *m*-Phenylendiamin): schwarz, blauschwarz, weiß, schmutzig-hellgelbes Filtrat, weiß, fleischfarbig, dann gelber Ring (beide leicht auswaschbar).

Cupranilbraun B: schokoladebraun, anschließend gelbbraun, weiß, rotgelbes Filtrat, weiß, violett, gelb, weiß, hell gelbbraun, leicht auswaschbar.

Hessisch Braun 2 BN (Sulfanilsäure \rightarrow Resorcin \leftarrow Benzidin \rightarrow Resorcin \leftarrow Sulfanilsäure): gelbbraun, violett, weiß, rotgelb, gelbes, dann violettes Filtrat.

Direktbraun J (*m*-Aminobenzoesäure \rightarrow *m*-Phenylendiamin \leftarrow *m*-Phenylendiamin \rightarrow *m*-Phenylendiamin \leftarrow *m*-Aminobenzoesäure): tiefbraun, gelbbraun, schwachbraun, rotbraunes Filtrat, weiß, rotgelbes Filtrat, schwach gelb, kanariengelb, weiß, braungelbes Filtrat.

Gemische der obigen Farbstoffe. Wie schon S. 38 erwähnt, gelingt die Trennung im allgemeinen gut, wenn die Anzahl der Azogruppen verschieden ist (z. B. Kongorot + Diaminrosa FFB), hingegen versagt die Methode bei sehr ähnlichen Komponenten, wie Erika B + Erika G extra, oder Kongorot + Benzopurpurin. Direkthimmelblau grünlich bleibt im Chromatogramm höher hängen als Direktblau 2 B (Strukturformeln auf S. 41).

Da die Adsorption von Direktblau 2 B an Baumwolle bekanntlich stark vom *Salzzusatz* abhängt, haben RUGGLI und JENSEN (1) untersucht, ob etwa auch das Chromatogramm sich umkehrt, wenn z. B. eine 8proz. NaCl-Lösung statt Wasser verwendet wird. Dies war jedoch nicht der Fall, man sah lediglich ein Zusammendrängen der Hauptzonen, bis zur Untrennbarkeit.

Über Sudanrot vgl. S. 50.

Pharmazeutisch wichtige Farbstoffe. Die folgenden Handelspräparate erwiesen sich nach FRANCK in der Aluminiumoxyd-Säule als uneinheitlich: Trypaflavin (3,6-Diamino-acridin), Rivanol

(2-Äthoxy-6,9-Diamino-acridin), Chrysarobin (3-Methyl-1,8-dioxy-anthranol), Cignolin (1,8-Dioxyanthranol) und Pellidol (Diacetyl-amino-azotoluol).

Fünftes Kapitel.

Anwendungen auf farblose und schwachgefärbte Substanzen.

1. Verschiedene aliphatische Verbindungen.

a) Reinigung des Hentriakontans $C_{31}H_{64}$ von Spuren des Dipalmitylketons $C_{15}H_{31} \cdot CO \cdot C_{15}H_{31}$ (WINTERSTEIN und STEIN 1).

Im unverseifbaren Anteil von zahlreichen Pflanzenextrakten kommen diese Stoffe gemeinsam vor und können sonst nur auf umständlichem Wege geschieden werden. Dagegen gelingt die Trennung leicht im chromatographischen Versuch. Man sieht auch hier, daß der Reinheitsgrad von Substanzen, die auf Grund anderer Methoden bereits als „chemisch rein“ bezeichnet werden, unter Umständen noch erhöht werden kann.

300 mg Hentriakontan (Schmelzpunkt und Elementarzusammensetzung richtig) wurden in 100 cm³ Benzin gelöst und durch eine Säule (6 × 1 cm) von Aluminiumoxyd + Fasertonerde (5 : 1) sickern lassen. Nachwaschen mit 200 cm³ Benzin. Der Kohlenwasserstoff lief durch die Säule, die dann mit methanolhaltigem Petroläther einige Zeit stehen gelassen und mit Petroläther + Methanol nachgewaschen wurde. Der Trockenrückstand des Eluats bestand aus 2 mg Dipalmitylketon; der Schmelzpunkt des regenerierten Hentriakontans war deutlich schärfer als derjenige des Ausgangsproduktes.

b) Isolierung eines Pflanzenparaffins.

SIMPSON und WILLIAMS haben aus der mexikanischen Sarsaparillawurzel nach Ausschaltung freier Säuren und der Saponine ein krystallisiertes Gemisch erhalten (1,55 g, Schmelzp. gegen 70—75°). Die Lösung in Chloroform + Petroläther + Benzol (2:2:1, insgesamt 250 cm³) wurde durch BROCKMANN'Sches Al₂O₃ geschickt. Etwa 90% des Materials krystallisierten aus dem Durch-

lauf und zeigten die Zusammensetzung $C_{23}H_{48}$, Schmelzp. 61—62°. Nach dem Durchspülen mit 75 cm³ Chloroform + Benzol (1:1) wurden die unteren zwei Drittel der Säule mit leichtem Benzin + Methanol eluiert. Ergebnis: Krystalle von der Zusammensetzung $C_{20}H_{42}O$, Schmelzp. 82°. Im oberen Drittel des Adsorbens war in sehr kleinen Mengen noch eine Substanz enthalten, die bei 102—104° schmolz.

c) Fettsäuren und Derivate.

Ein orientierender Versuch zur Trennung von *freier* Ölsäure und Palmitin- (oder Stearin-) säure wurde von KONDO beschrieben: Je 0,5 g Säure in 40 cm³ Benzol + Benzin (1:1), auf 20 × 1,2 cm Al₂O₃, mit 500 cm³ Benzol entwickelt. Elution mit je 30 cm³ Äther + Alkohol (1:1). Die Ölsäure war in den oberen 6 cm der in drei Teile zerschnittenen Säule enthalten, die Palmitinsäure in den untersten 8 cm; dazwischen lag ein Mischgebiet.

Das Tribromanilid der *Tuberkelsäure* $C_{28}H_{57} \cdot COOH$ wird nach WAGNER-JAUREGG (2) im Wege einer Filtration der Benzollösung durch Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) gereinigt und dann mehrmals umkrystallisiert. Schmelzp. 66—68°.

Säurenitrile, z. B. *Valero- oder Lauronitril*, können nach RALSTON, HARWOOD und POOL von Kohlenwasserstoffen auf Silicagel im flüssigen Chromatogramm getrennt werden, aus leichtem Petroläther werden nämlich die Nitrile weit stärker festgehalten. Apparat: Abb. 23, S. 65.

d) Die Trennung von Zuckerarten

ist noch kaum bearbeitet. Aus einer Mitteilung von HAYASHI folgt, daß z. B. die Scheidung von Rohr- und Traubenzucker auf Blutkohle in alkoholischer Lösung möglich wäre.

e) Acetylcellulose.

Die nachstehend referierte Arbeit von MARK und SAITO eröffnet den Weg zur Untersuchung und Aufteilung von *hochpolymeren Substanzen* in der Adsorptionskolonne. Als erstes Beispiel wurde technisches Celluloseacetat (Cellit) geprüft. Es zeigte sich, daß derartige Stoffe in Komponenten zerfallen, welche durch *abweichende Viskositäten* gekennzeichnet sind. Da der Acetyl-

gehalt nicht variiert, erfolgte die Fraktionierung hauptsächlich nach den verschiedenen *Kettenlängen* der Polymerhomologen.

Auf ein Glasrohr (42×3 cm) wurde eine Kappe aus Messingdrahtnetz angepaßt, Glaswolle und Asbest eingelegt und als Füllmasse dreimal 10 g Blutkohle (Kahlbaum) verwendet; zwischen je zwei Portionen des Adsorbens befanden sich runde Leinwandstücke. Man behandelt die Säule mit Preßluft (zirka 1 Atm.), gießt 300 cm^3 0,5proz. acetonische Cellitlösung ein und setzt wieder die Preßluft an. Die Adsorption des Acetons ist mit einer fühlbaren Wärmeentwicklung verbunden; wurde die Kohle vorher mit dem Lösungsmittel befeuchtet, so verläuft das Durchsickern zwar gleichmäßiger, doch wird die adsorbierte Cellitmenge zu gering. Man entwickelt so lange mit Aceton, bis keine Acetylcellulose mehr in das Filtrat geht, dessen Abdampfrückstand dann getrocknet wird.

Die drei abgeteilten Bezirke der Kolonne werden für sich getrocknet und mit je 50 cm^3 Dioxan $(\text{CH}_2)_4\text{O}_2$ eluiert (Schütteln, eintägiges Stehen). Die schwierige Filtration ließ sich durch ein $1,5 \text{ cm}$ breites Glasrohr ausführen, das mit Glaswolle, Asbest und 7 g Stärke fest gestopft war. Man dampft die Eluate bei 60° ein und läßt den Rest im Vakuumexsiccator über P_2O_5 und Blutkohle stehen. Nun ist das Material für die Viskositätsmessung bereit.

Tabelle 18 zeigt, daß hier in der Tat eine Fraktionierung gelungen ist: niedriger-viskose Anteile werden im oberen Drittel der Füllmasse festgehalten, während die höchst-viskose Komponente in das Filtrat geht.

Tabelle 18. Aufteilung von Cellit und relative Viskosität der Fraktionen, in 0,1proz. Acetonlösung (für Aceton $\eta_r = 1,122$), nach MARK und SAITO.

	Cellit „L 700“ ($\eta_r = 1,090$)		Cellit „L 1000“ ($\eta_r = 1,163$)	
	Enthält Prozent des Ausgangs- stoffes	Viskosität	Enthält Prozent des Ausgangs- stoffes	Viskosität
Oberste Zone	30—35	1,049	30—35	1,101
Mittlere Zone	30—35	1,065	25—35	1,135
Unterste Zone	20—25	1,067	20—30	1,138
Filtrat	5—10	1,097	10—15	1,198

Die Ergebnisse von MARK und SAITO wurden von LEVI und GIERA an Cellulosediacetaten bestätigt, während gewisse Triacetatpräparate zwar eine Aufteilung, jedoch keine Verschiebung der Viskositäten zeigten.

2. Terpene. Ätherische Öle.

a) Trennung von Geraniol $C_{10}H_{17}OH$ und Limonen $C_{10}H_{16}$ (WINTERSTEIN und STEIN 1).

Das Gemisch von je 4 g wurde in 700 cm³ Benzin (Siedep. 70°) gelöst und auf aktiviertem Aluminiumoxyd chromatographiert (12 × 5,5 cm). Entwickeln mit 300 cm³ Benzin. Den adsorbierten Anteil eluiert man mit methanolhaltigem Petroläther (Siedep. 30 bis 50°). Sowohl das Filtrat als auch das Eluat wurden unter Anwendung einer WIDMER-Spirale auf dem Wasserbad möglichst vom Benzin befreit, das restliche Lösungsmittel vorsichtig bis auf etwa 100° abgetrieben und der Rückstand, ohne einen Vorlauf abzutrennen, überdestilliert. Aus dem Filtrat ließ sich auf diesem Wege Limonen gewinnen, aus dem Eluat Geraniol.

Die Trennung von *Cineol* $C_{10}H_{18}O$ und *Dipenten* $C_{10}H_{16}$ gelingt nach demselben Verfahren.

b) Aliphatische Terpenhalogenide.

Zur Reinigung von *Citronellyl-chlorid* und *-bromid* schalten WAGNER-JAUREGG und ARNOLD zwischen zwei Destillationen eine Filtration durch Al_2O_3 (nach BROCKMANN) ein. Es werden so aus petrolätherischer Lösung die von der Synthese herstammenden, phosphorhaltigen Verunreinigungen zurückgehalten. Das Verfahren versagt bei Geranyl bromid, das mit dem Oxyd unter Erhitzung reagiert.

c) Cyclische Terpene.

Aluminiumoxyd wurde als Reinigungsmittel von HUBER an mehreren *cyclischen* Terpenen angewandt. Das Benzoat des *2-Oxy-10-methyl- $\Delta^{1:9}$ -oktalin*s $C_{11}H_{18}O$ wird aus wenig Benzol an Al_2O_3 (nach BROCKMANN, 15 × 1,5 cm) adsorbiert und mit viel Benzol in den Durchlauf getrieben. Oben verbleibt ein braungelber Bezirk, das Benzoat befindet sich bei Ansätzen von 1 g in den ersten 60 cm³. Ähnlich verfährt man mit dem Dinitro-

benzoat, ferner u. a. mit dem Benzoat des *9-Oxy-13-methyl- $\Delta^{10:11}$ -dodekahydro-phenanthrens* $C_{15}H_{24}O$. Auch das rohe *9-Keto-13-methyl- $\Delta^{10:11}$ -dodekahydro-phenanthren* $C_{15}H_{22}O$ ließ sich ebenso reinigen (Durchspülen mit methanolhaltigem Benzol).

Der *Tetraoxy-abietinsäure-methylester* $C_{21}H_{36}O_6$ wurde von RUZICKA und STERNBACH im Wege einer Filtration durch die Aluminiumoxyd-Säule gereinigt (Benzol). Ähnlich verfährt man mit dem Tetramethylester einer, durch Abbau der obigen Säure gewonnenen Tetracarbonsäure $C_{15}H_{22}O_8$. Das angewandte Adsorbens betrug hier nur das Fünffache der Substanz.

Trennung von β -Amyrin $C_{30}H_{50}O$ und *Erythro-diol* $C_{30}H_{50}O_2$ (RUZICKA und SCHELLENBERG). Das rohe Gemisch wurde in Benzol + Petroläther (Siedep. 40—70°) (1:1) an Al_2O_3 (nach BROCKMANN) adsorbiert. Durch Nachspülen mit Benzol treibt man das β -Amyrin ins Filtrat. Schmelzp., zweimal aus Alkohol umkrystallisiert, 198—199°, während ein nachfolgendes Entwickeln mit Äther das Erythro-diol aus der Säule herausholt, Schmelzp. roh 230°, gereinigt 232—233°.

Triterpenoide Flechtenstoffe.

ASAHINA und AKAGI haben die in Japan einheimische Flechte *Parmelia leucotyliza* NYL. kontinuierlich mit Äther extrahiert und aus dem Auszug schon in der Wärme Krystalle erhalten. Das durch Einengen des Filtrates gewonnene zweite Präparat wurde mit dem ersten vereinigt und aus Methanol fraktioniert umkrystallisiert. Der schwerlösliche Anteil bestand aus Antranorin. Beim Abdampfen des Filtrates erhält man einen krystallinischen Rückstand, der mit kaltem 10proz. Kali tüchtig umgerührt wird. Man saugt scharf ab und löst die Krystalle einige Male aus Methanol um. Die in einer Ausbeute von 0,5% erhaltene neutrale Substanz (Nadeln, Schmelzp. 260°) ließ sich chromatographisch in zwei Bestandteile zerlegen.

Man löste 2 g in 1 l Benzol und goß die Flüssigkeit auf Al_2O_3 (nach BROCKMANN, $25 \times 1,8$ cm). Die Füllmasse wird mit Benzol nachgespült, in fünf gleiche Teile zerschnitten und jeweils mit Methanol extrahiert. Das oberste erste Fünftel lieferte 0,5 g *Leucotylin* $C_{30}H_{52}O_3$ (Schmelzp. 330°), das zweite größtenteils *Leucotylin* (0,6 g), das dritte ein hälftiges Gemisch derselben

Verbindung mit Zeorin und die vierte 0,4 g *Zeorin* $C_{30}H_{52}O_2$ (Schmelzp. 250°). Durch Wiederholen der Adsorptionsaufteilung lassen sich auch die Mischfraktionen zerlegen. Da *Leucotylin* höchstwahrscheinlich ein Oxy-zeorin ist, erfolgte hier die Scheidung auf Grund des durch das Hydroxyl bewirkten Ansteigens der Adsorptionsaffinität.

d) Ätherische Öle.

Viele natürliche flüchtige Öle enthalten außer den stabilen Bestandteilen Stoffe, z. B. Geraniol, Pinen, Dipenten, Limonen, die bei der Adsorption auf Ton katalytisch verändert werden können. Dabei beobachtet man eine Wärmetönung, die weit über die übliche Adsorptionswärme hinausgeht. Diese Verhältnisse wurden jüngst von CARLSOHN und MÜLLER (2) untersucht (dort weitere Literatur). Die Arbeit hat gezeigt, daß die chromatographische Trennung, die in vielen Fällen mit Vorteil ausgeführt werden kann, auf natürlichen Bleicherden vorgenommen werden muß. Hochaktive künstliche Erden entfalten nämlich eine viel zu starke katalytische Wirksamkeit, die zu tiefgreifenden Änderungen führen kann. Allerdings wird dieser Eingriff durch stark adsorbierbare Begleiter, z. B. durch Alkohole, in hohem Maße gehemmt. In Gegenwart von Äthyl-, Methylalkohol oder Aceton bleibt er aus.

Tabelle 19. Temperaturerhöhungen von Bestandteilen ätherischer Öle unter der Einwirkung von Frankonit (CARLSOHN und MÜLLER 2).

Verbindung	Temperaturerhöhung	Beobachtung
Linalool	60°	schwach verfärbt
Geranylacetat	30°	verfärbt
Linalylacetat	76°	„
Citronellal	72°	schwach verfärbt
d-Limonen	114°	braun, Cymolgeruch
l-Limonen.	112°	„ „
Dipenten	99°	stark verfärbt
Pinen.	166°	braun

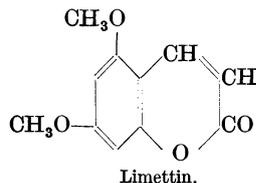
Die erwähnte katalytische Wirkung von *Frankonit* ist am größten, wenn der Ton bei Raumtemperatur und 1 mm Druck

über P_2O_5 oder H_2SO_4 entwässert wurde. Zur orientierenden Prüfung der Wärmeeffekte, die mit der chemischen Veränderung parallel gehen, versetzt man 1 cm³ Substanz mit 0,5 g Frankonit in wärme-isoliertem Reagirrohr und mißt die Maximaltemperatur. Bei der Anwendung von gangbaren Solventien beträgt die Temperatursteigerung etwa 3—12°. Bei chromatographischen Versuchen mit ätherischem Öl berücksichtige man hingegen die auszugsweise wiedergegebene Tabelle 19, S. 194.

Zur *Zerlegung* von ätherischen Ölen wurde auf Grund der erwähnten Befunde das folgende Verfahren befolgt. Das Gemisch von 50 g Floridin XXF (in handelsüblichem Zustand, Wassergehalt 17%) und von 150 g Floridin XS bildete eine Säule im Ausmaß von 12 × 8 cm. Man befeuchtet die Rohrfüllung mit 500 cm³ Benzin (Siedep. 60—70°), gießt die Lösung von 50 g Öl in 500 cm³ Benzin auf und entwickelt mit 500 cm³ Petroläther (Siedep. 30—50°). Sobald im Durchlauf ein Riechstoff erschienen ist, werden 250-cm³-Fraktionen aufgefangen; das Lösungsmittel wird jeweils am Wasserbad verjagt und der Rest im Vakuum abdestilliert. Die Anzahl der Fraktionen betrug 3—4. Die Säule wurde im Tages- und im Uviollicht untersucht; leuchtende Bestandteile arbeitet man gesondert auf. Den Rest der Säule haben schließlich die Autoren einer Wasserdampfdestillation unterworfen. In dieser letzten Fraktion fand man stark adsorbierbare Komponenten, die zum Teil auch als Schutzstoffe gegen die erwähnte Katalyse wirksam sind.

Nähere Angaben werden von den Verfassern in Aussicht gestellt.

Bergamottöl. Eine von SPÄTH und KAINRATH vorgenommene, neuartige Bearbeitung des calabrischen Bergamottöls ergab u. a. eine zwischen 110—140° siedende Fraktion, die sich nicht befriedigend reinigen ließ. Sie wurde daher aus Benzol + Petroläther (Siedep. 50—70°) an Aluminiumoxyd adsorbiert und mit demselben Solventgemisch, dem 1% Methanol zugesetzt war, entwickelt. Im Uviollicht sah man vier Schichten, deren unterste (blau fluoreszierend) bei der Ätherextraktion Krystalle ergab. Nach mehrfachem Umlösen und Destillieren, Schmelzp. 146—147°: *Limettin* C₁₁H₁₀O₄.



3. Benzol- und Naphtalinreihe.

a) Das Verhalten einiger Phenole und Phenolderivate.

Nach GRASSMANN und LANG zeigen in methanolischer Lösung z. B. die folgenden Phenole fluoreszierende, einheitliche Ultrachromatogramme:

Phenol oder Brenzcatechin: auf Al_2O_3 oder MgO schwach violett.

Resorcin: auf Al_2O_3 oder MgO hell blauviolett.

Gallussäure: auf Al_2O_3 oder MgO tiefviolett.

Phloroglucin: auf Al_2O_3 gelb (braunstichig), auf MgO gelb.

Chromatographie nach Zusatz von FeCl_3 : S. 82.

Durohydrochinon-monocetyläther $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{O}_2$ (JOHN, DIETZEL und GÜNTHER). Durohydrochinon $(\text{OH})_2\text{C}_6(\text{CH}_3)_4$ wird in abs. Alkohol mit je 1 Mol Cetyl bromid und NaOH in Alkohol 4 Stunden im N_2 -Strom, unter kräftigem Rühren am Wasserbad erhitzt. Der beim Erkalten entstandene Krystallbrei wird mit Wasser gewaschen und in Aceton gelöst (das Unlösliche ist der Di-äther). Aus den Mutterlaugen krystallisiert der Mono-äther sehr langsam in Kugelform. Die vereinigten alkoholischen und acetoneischen Mutterlaugen werden zur Entfernung von unverändertem Durohydrochinon mit CLAISEN-Lauge ausgeschüttelt und in Benzol auf Al_2O_3 aufgeteilt. Noch vorhandener Di-äther gelangt ins Filtrat, während der Mono-äther hängen bleibt und mit Alkohol + Äther eluiert wird (Schmelzp. $99,5^\circ$). Ganz oben enthält die Säule Verunreinigungen.

Das bei der HJ-Spaltung des Endproduktes entstehende Cetyljodid wurde bei der Filtration durch eine kurze Al_2O_3 -Säule rein erhalten (Petroläther).

Trennung von Phenacetin und Acetanilid (KONDO). Eine Lösung von je 0,5 g in etwa 100 g Benzol wurde auf Al_2O_3 ($4 \times 1,8$ cm) mit 200 cm^3 Benzol entwickelt. Man zerschneidet die Säule in 5 Teile, eluierte jeden mit 20 cm^3 Äther + Methanol (7:3) und krystallisierte die Eindampfrückstände aus Wasser um. Aus den beiden obersten Fünfteln wurde reines Phenacetin, aus dem untersten Säulenabschnitt Acetanilid erhalten.

b) Nitraniline.

Trennung von o-, m- und p-Nitranilin sowie der Nitrophenole
(KARRER und NIELSEN).

Je 0,15 g wurden gemeinsam in Petroläther gelöst, auf Calciumhydroxyd gegossen und mit Petroläther zum Chromatogramm entwickelt:

Oben: hellgelb, enthält *p*-Nitranilin,
gelb: *m*-Nitranilin,
unten: dunkelgelb bis bräunlich: *o*-Nitranilin.

Die Isolierung geschah durch Eluieren mit methanolhaltigem Benzol, Eindampfen und erneuerte Adsorptionsanalyse des Rückstandes.

Zur Reinigung von technischem *o*-Nitranilin oder von Nitroxylidin (4,5-Dimethyl-*o*-nitranilin) krystallisiert man das Material nach KUHN und STRÖBELE aus Benzol um, löst 50 g in 300 cm³ Benzol und filtriert heiß durch Al₂O₃ (5 × 5 cm). Zur Verhinderung einer vorzeitigen Ausscheidung ist das Adsorptionsrohr von einem Mantel mit 70° warmem Wasser umgeben. Braune Begleiter bleiben oben haften, während der Durchlauf reine Präparate liefert.

Ähnlich, wie oben bei KARRER und NIELSEN angeführt, lassen sich auch die drei Nitrophenole trennen (Benzol, Aluminiumoxyd- oder Calciumcarbonat-Säule), falls der Versuch wiederholt wird. Die von oben nach unten geltende Reihenfolge ist auch hier: *p*-, *m*-, *o*-Verbindung.

3,5-Dimethyl-6-nitroanilin aus *3,5-Dimethyl-anilin*. KARRER und STRONG (2) haben die Lösung von 8,3 g 3,5-Dimethyl-anilin in 45 cm³ konz. Schwefelsäure zwischen 0° und 5° mit 6,64 g HNO₃ ($d = 1,4$) + 7 cm³ konz. H₂SO₄ nitriert. Beim Aufgießen auf Eis: orangegelbe Fällung. Man macht die Suspension mit starkem KOH alkalisch und extrahiert den gelben Niederschlag mit Äther. Der letztere wird gewaschen, mit Pottasche getrocknet, filtriert und verdampft. Man zieht den öligen Rest mit 2 × 400 cm³ siedendem Petroläther aus.

Der Extrakt wurde auf Calciumhydroxyd chromatographiert und so lange mit Petroläther nachentwickelt, bis der größte Teil der farbigen Verbindungen durch die Säule ging; nur im obersten Bezirk verblieb eine schmale, gelbe Schicht. Der Abdampfrück-

stand des Filtrates wurde mehrmals mit je 100 cm³ Petroläther erschöpft, welcher filtriert und eingengt, beim Abkühlen 3,5-Dimethyl-6-nitroanilin abschied. Ausbeute 4,8 g. Gelbe Nadeln, Schmelzp. etwa 45° (noch nicht ganz rein).

KUHN, DESNUELLE und WEYGAND haben zu 2 g Amin + 20 g konz. Schwefelsäure bei -10° im Verlaufe von 5 Minuten eine Mischung von 1,2 cm³ HNO₃ (d = 1,38) und 1,7 cm³ konz. H₂SO₄ gegeben. Man gießt sofort auf Eiswasser, filtriert, wäscht mit Wasser und trocknet auf Ton. Die Substanz wird in Benzol gelöst, auf Aluminiumoxyd gegossen, mit Methanol eluiert und aus verd. Alkohol krystallisiert. Ertrag aus 25 g Xylidin: 12 g. Schmelzp. 53°.

c) Zwischenprodukte von Flavinsynthesen.

Schiffsche Base aus 3,5-Dimethyl-6-nitroanilin und l-Arabinose (KARRER und STRONG 2). 16 g Zucker, 4 g Nitrokörper und 200 cm³ abs. Methanol wurden in der Druckflasche 6 Stunden auf 105—115° erhitzt (Auflösen). Man ließ stehen, filtrierte die dabei auskrystallisierte, unveränderte Arabinose ab und chromatographierte das Filtrat auf Aluminiumoxyd; Nachwaschen mit abs. Alkohol. Unverändertes Nitroanilin lief durch die Kolonne, welche eine ausgebreitete gelbe Schicht zurückhielt. Die letztere ließ sich mit viel heißem 80proz. Methanol eluieren. Nach dem Einengen im Vakuum schießt die SCHIFFSche Base hervor und wird aus Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute 1 g, Schmelzp. 165—166°.

Schiffsche Base aus 4,5-Dimethyl-2-nitroanilin und l-Arabinose. KUHN, REINEMUND, WEYGAND und STRÖBELE haben Pentosen mit einem Nitroxylidin (1,2-Dimethyl-4-nitro-5-aminobenzol) kondensiert. 0,5 g l-Arabinose und 2,2 g Nitroxylidin wurden mit 30 cm³ abs. Alkohol 6 Stunden auf 110—120° erhitzt. Die erkaltete, orangefarbene Lösung saugte man durch eine Al₂O₃-Säule (Merck) und entwickelte das Chromatogramm mit wasserfreiem Alkohol. Das im Überschuß angewandte Nitroxylidin ging leicht in das Filtrat und krystallisierte aus. Die breite orangefarbige Scheibe des Kondensationsproduktes wurde mit 80proz. Methanol eluiert, das Eluat auf $\frac{1}{5}$ eingengt und das Ausgefällene aus Wasser umkrystallisiert. Ertrag 0,58 g, Schmelzp. 166°, orangegelbe Prismen. Zusammensetzung C₁₃H₁₈O₆N₂. Hier konnten die unver-

änderten Ausgangsmaterialien nach einmaliger Chromatographie quantitativ zurückgewonnen und von neuem verwendet werden.

1,2-Dimethyl-4-nitro-5-amino-benzol-d-glucosid. Die Isolierung dieses durch Umglucosidierung entstehenden Nitroxylidin-glucosides gelingt nach KUHN und DANSI folgend: 1,35 g *p*-Toluidin-glucosid und 4 g 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-aminobenzol wurden in 150 cm³ abs. Alkohol 8 Stunden am Rückfluß gekocht und die orangefarbene Lösung auf eine Al₂O₃-Säule gegossen. Man eluiert die obere, orangefarbene Zone mit Pyridin + Methanol + Wasser, verdampft die Flüssigkeit im Vakuum und kristallisiert den Rest aus Alkohol. Ertrag 0,15 g, Schmelzp. 213° (Zersetzung). Zusammensetzung C₁₄H₂₀O₇N₂.

1,3-Dimethyl-4-d-arabitylamino-5-nitrobenzol C₁₃H₂₀O₆N₂ (KUHN, DESNUELLE und WEYGAND). 1,6 g l-Arabinamin und 1 g 1,3-Dimethyl-4,5-dinitrobenzol wurden in 10 cm³ 80proz. Alkohol 10 Stunden auf 135° erhitzt. Nach dem Erkalten war der Rohrinhalt erstarrt. Man verjagt das Lösungsmittel im Vakuum, rührt den Rest mit 10 cm³ Wasser und 30 cm³ Äther an und trocknet das Ausrückstallisierte auf Ton. Schmelzp. 130°. Zur Reinigung wird die Substanz aus Alkohol an Aluminiumoxyd adsorbiert und mit Methanol + Wasser + Pyridin eluiert. Umkristallisieren aus Wasser, Schmelzp. 141°. Ähnlich lautet die Darstellung- und Reinigungsvorschrift für *1,3-Dimethyl-4-d-ribitylamino-5-nitrobenzol* C₁₃H₂₀O₆N₂.

l-Arabinose-2-nitro-3,5-dimethylanilid C₁₃H₁₈O₆N₂ (KUHN, DESNUELLE und WEYGAND). 4 g l-Arabinose, 8 g 1,3-Dimethyl-4-nitro-5-aminobenzol und 0,3 g Ammoniumchlorid wurden in 65 cm³ abs. Alkohol 1 Stunde unter Rückfluß erhitzt. Nach 1/2 Stunde war der Zucker gelöst. Auf der Al₂O₃-Säule wanderte das überschüssige Xylidin rasch nach unten. Die oben festgehaltene, breite gelbe Zone wurde ausgeschnitten und mit einer heißen Mischung von Pyridin + Methanol + Wasser eluiert. Man verdampft im Vakuum, entfernt das Pyridin durch öfteres Nachdampfen mit abs. Alkohol und kristallisiert den Rückstand aus Wasser um. Ausbeute 4,1 g, Schmelzp. 171°.

2-Nitro-3-amino-5,6,7,8-tetrahydro-naphtalin-N-l-arabinosid C₁₅H₂₀O₆N₂ (KUHN, VETTER und RZEPPA). 3,8 g 2-Nitro-3-amino-5,6,7,8-tetrahydro-naphtalin werden mit 3 g l-Arabinose + 0,3 g Ammoniumchlorid 5/4 Stunden in 100 cm³ abs. Alkohol zum Sieden

erhitzt. Man dampft die gelbrote Lösung im Vakuum ein, nimmt den Rest in 100 cm³ heißem Benzol auf und chromatographiert die Lösung auf Al₂O₃. Beim Entwickeln mit Benzol wandert unverändertes Nitroamin in das Filtrat, das Arabinosid bleibt als oberste orangegelbe Zone hängen. Elution mit Pyridin + Methanol + Wasser (1:2:1). Man dampft im Vakuum ab und krystallisiert den Sirup aus 50 cm³ Alkohol um. Goldgelbe Nadeln (1 g); das Triacetat schmilzt bei 217°.

d-Arabinose-2-nitro-4,5-dimethyl-anilid C₁₃H₁₈O₆N₂ (KUHNS und STRÖBELE). Man kocht 5 g reine d-Arabinose, 25 g 2-Nitro-4,5-dimethylanilin und 0,5 g Ammoniumchlorid in 120 cm³ abs. Alkohol im siedenden Wasserbad kräftig 2 Stunden. Alles geht in Lösung. Die rote Flüssigkeit wird mit 100 cm³ heißem abs. Alkohol verdünnt und heiß durch eine Al₂O₃-Säule (30 × 5 cm, mit 75° warmem Wasser umgeben) filtriert. Unverändertes Nitroxyldin läuft durch und krystallisiert aus, während das Arabinosid haften bleibt. Man wäscht bis zur Farblosigkeit des Alkohols, eluiert die breite gelbe Zone mit Methanol (reinst) + Pyridin (reinst) + Wasser (2:1:1), dampft im Vakuum ab, wiederholt das Abdampfen mit 2 × 10 cm³ abs. Alkohol und krystallisiert das Präparat aus abs. Alkohol um. Ausbeute 8 g.

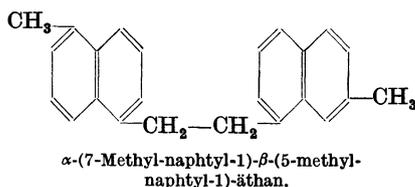
d-Ribose-2-nitro-4,5-dimethyl-anilid C₁₃H₁₈O₆N₂. Verfahren wie oben. Adsorption bei Zimmertemperatur an Al₂O₃; unverändertes Nitroxyldin wird mit Benzol weggespült. Elution wie oben. — *d-Glucose-2-nitro-anilid* C₁₂H₁₆O₇N₂. Adsorption aus Benzol an Al₂O₃, Durchwaschen mit Benzol, Elution wie oben. — *Trityl-d-mannose-2-nitro-4,5-dimethyl-anilid* C₃₃H₃₄O₇N₂. Adsorption an Al₂O₃, aus Benzol. Elution der Tritylverbindung mit Benzol + Alkohol (1:1), wobei die Säule braune Verunreinigungen zurückhält (KUHNS und STRÖBELE).

4. Di- und Triaryl-alkyle.

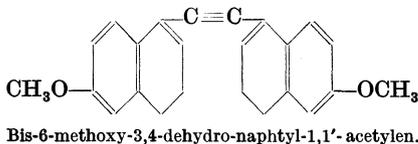
a) *Triphenyl-methan* und *Triphenyl-carbinol* können nach WIELAND, PLOETZ und INDEST aus Petrolätherlösung auf Aluminiumoxyd getrennt werden. Der Kohlenwasserstoff wird nur schwach adsorbiert, während das Carbinol eine gut begrenzte, im Uviollicht fluoreszierende Zone bildet, aus welcher man mit Äther im Extraktionsapparat fast reine Substanz herauslöst. *Tetraphenyl-methan* (in Benzol + Petroläther 1:1), läuft durch die Al₂O₃-Säule und läßt sich von anderen Stoffen trennen.

b) α -(7-Methyl-naphtyl-1)- β -(5-methyl-naphtyl-1)-äthan $C_{24}H_{22}$ (RUZICKA und HOFMANN). Das durch Dehydrierung gewonnene Rohprodukt zeigte einen unscharfen Schmelzpunkt.

Es wurde in Benzollösung durch Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) filtriert, wobei man nur die rascher durchlaufenden, blau fluoreszierenden Anteile verwendet, die langsam wandernden, gelben Produkte vernachlässigt. Schmelzpt. (aus Methanol) 74—75°, Nadelchen. Ähnlich wird das α -(5-Methyl-6-methoxy-naphtyl-1)- β -(7-methyl-naphtyl-1)-äthan $C_{25}H_{24}O$ gereinigt.



c) Aus dem Bis-6-methoxy-3,4-dihydro-naphtyl-1,1'-acetylen wird durch Adsorption der Anisollösung an Al_2O_3 eine rote



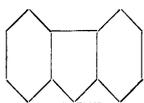
Beimengung entfernt. Die Lösung läuft hellgelb durch die Kolonne und wird beim Stehen wieder rot (DANE, HÖSS, BINDSEIL und SCHMITT).

5. Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe mit kondensierten Kernen und verwandte Substanzen.

A. Die Reinigung sowie die Scheidung von Vertretern dieser Körperklasse, welche dem Steinkohlenteer entstammt, wird, wenn nichts anderes vermerkt ist, auf Grund der Angaben von WINTERSTEIN und SCHÖN (2, 3), von WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER, von WINTERSTEIN und VETTER sowie von WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER beschrieben. Betreffend Zusammenhang zwischen Adsorptionsaffinität und Struktur sowie Konstitutionsformeln vgl. S. 34—38. Zunächst sieht man aus dem nachfolgenden Versuchsmaterial, daß selbst reinste Handelsprodukte im Quarzlicht-chromatogramm Begleiter verraten können.

Reinigung des Anthracens. a) 6 g Anthracen Riedel „für wissenschaftliche Zwecke“ wurden aus Benzin an eine aktive Aluminiumoxyd-Säule (25×6 cm) adsorbiert. Beim Entwickeln

mit Benzin bildeten sich im obersten Bezirk einige schmutziggelbe Zonen, die keine Krystalle liefern. Im Quarzlicht sah man weiter unten einen schmalen, hellblau fluoreszierenden, tiefer einen gelben und unten einen blau fluoreszierenden, breiten Bezirk. Bei längerem Waschen ging das Anthracen größtenteils ins Filtrat, dessen erste Anteile paraffinähnliche Substanzen enthielten. Beim Einengen krystallisiert das Anthracen. Die oberste Zone wurde mit Äther eluiert, der Trockenrückstand des letzteren im Vakuum (0,5 mm) bei 150—170° sublimiert und die Substanz aus Benzol unter Zusatz von Benzin umgeschieden. Farblose Blättchen: 350 mg *Carbazol* = 5,8% des Ausgangsmaterials.



Carbazol.

Das erhaltene Anthracen zeigt intensiv blaue Fluorescenz, die schon durch einen Zusatz von $\frac{1}{30000}$ % Naphtacen gelöscht wird.

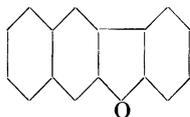
b) 10 g Anthracen „Kahlbaum“ wurden, wie beschrieben, adsorbiert. Beim Entwickeln gingen 6 g in das Filtrat. Der Rohrinhalt wurde mit Benzin + Methanol eluiert, das Methanol gewaschen und die getrocknete Benzinlösung nochmals auf Al_2O_3 gegossen. Beim Entwickeln passierten 3 g reines Anthracen die Säule. Der wie angegeben eluierte und verarbeitete Rohrinhalt wurde nochmals adsorbiert (Säule 8×4 cm). Nach dem Entwickeln mit viel Benzin zeigt die Quarzlampe im obersten Teil zwei äußerst schmale, hellgelbe (unerforschte) Zonen an, darunter einen hellblau fluoreszierenden Bezirk; aus welchem, nach der Elution mit Äther, schwach-gelbe Krystalle gewonnen wurden. Sublimieren im Vakuum und Umkrystallisieren aus Benzol lieferten 5 mg (0,05%) reines *Carbazol* (glänzende, hellblau fluoreszierende Blättchen). Dicht unter dem Carbazol befand sich eine schmale, gelb aufleuchtende *Naphtacen*-Scheibe und darunter eine dunkelblau fluoreszierende, aus der sich etwas *Anthrachinon* isolieren ließ.

Über die Gewinnung des *Naphtacens* aus einer technischen Anthracenöl-Fraktion vgl. das Original. — Trennung von Anthracen und Phenanthren: ARDASCHEW.

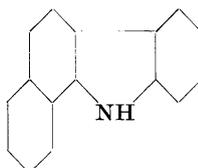
Reinigung des Chrysens (Formel auf S. 34), *Isolierung von 1,2-Benzocarbazol*. 5 g reinstes Handelsprodukt, in 600 cm³ Benzin + Benzol (10 : 1) gelöst, wurden an Al_2O_3 ($14 \times 4,5$ cm) adsorbiert. Beim Entwickeln mit 500 cm³ Benzin entsteht oben eine

1 cm breite, hellblau fluoreszierende Zone, darunter eine schmale, die gelb aufleuchtet, während die unterste Scheibe sowie das Filtrat stark blau fluoreszieren. Die oberste Zone wird mit Äther eluiert; krystallisiert man dessen Abdampfrückstand aus Hexan und Eisessig um, so erscheint *1,2-Benzcarbazol* (Ausbeute 15 mg = 0,3%). Die zweite Zone enthält *Naphtacen*, die unterste liefert vollkommen farbloses Chrysen, welches trotz scheinbarer Homogenität Spuren von Schwefel enthält. Bei der Wiederholung der Chromatographie hat sich die *Schwefelverbindung* in den ersten 75% des Filtrates angereichert und nur die letzte Fraktion (0,5 g) war vollständig S-frei. Man bemerkt die außerordentliche Ähnlichkeit der Adsorptionsaffinitäten von Chrysen und des schwefelhaltigen Körpers.

Auf prinzipiell ähnlichem Wege wurde aus *Pyren* „rein“ 0,1% *Brasan* isoliert (2,3,5,6-Dibenzo-cumaron), das von *Naphtacen* und 2,3-(1',2'-Naphto)-anthracen begleitet wird (Formeln auf



Brasan.



1,2-Benzcarbazol.

S. 34). Es empfiehlt sich hier, über die Al_2O_3 -Schicht eine schmale Lage eines Aluminiumoxyd + Carboraffin-Gemisches zu geben, welche die Verunreinigungen besser zurückhält.

Die chromatographische Reinigung von Roh-*Picen* nimmt einen komplizierten Verlauf und führt zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis.

Aus käuflichem *Acridin* werden nach WAGNER-JAUREGG, beim Filtrieren der Benzollösung durch Al_2O_3 , Verunreinigungen entfernt und in der Säule zurückgehalten, welche das Acridin passiert. Das Rohprodukt fluoreszierte fahlblau, die reine Substanz gelb.

Während das Vorstehende sich auf Handelsprodukte bezieht, folgen nun (nach WINTERSTEIN und Mitarbeitern) einige Beispiele, aus welchen die Leistungsfähigkeit des befolgten Verfahrens bei der Aufteilung von *künstlichen Gemischen* hervorgehen soll.

Trennung von Naphtalin und Anthracen. Eine petrolätherische

Lösung (200 cm³) von 50 mg Anthracen + 150 mg Naphtalin wurde an 150 g aktiviertes Aluminiumoxyd adsorbiert und mit 500 cm³ Petroläther entwickelt. Das Anthracen befindet sich in der oberen Säulenhälfte und wird mit Äther eluiert, der beim Verdampfen den reinen Kohlenwasserstoff hinterläßt. Der Trockenrückstand des Filtrates besteht aus reinem Naphtalin.

Trennung von Anthracen und Chrysen (Formel auf S. 34). Eine Benzinlösung, je 50 mg enthaltend, wurde, wie beschrieben, adsorbiert und mit Benzin so lange entwickelt, bis ein Teil der Substanz in das Filtrat übergegangen war. Im Rohre bildeten sich zwei Zonen aus, von welchen die obere (bei Quarzlicht-bestrahlung dunkelblau leuchtend) fast reines Chrysen enthielt. In den ersten Anteilen des Filtrates lag reines Anthracen vor.

Die Scheidung von *Anthracen* und *Pyren* gelang nicht.

Trennung von Phenanthren und Pyren (Formel auf S. 34). Verfährt man wie beschrieben und fängt das Filtrat in vier Anteilen auf, so enthält die letzte Portion fast reines Pyren.

Die *Trennung des Chrysens von Pyren* (Formeln: S. 34) oder von *1,2-Benzpyren* gelang auf ähnlichem Wege.

Reihe des Benzpyrens.

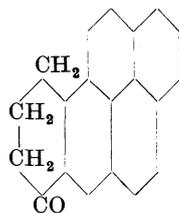
Trennung von Perylen und 1,2-Benzpyren (Formeln: S. 37). Nach der Entwicklung beobachtet man im Uviollicht ein breites, gelb leuchtendes Band, darunter eine hellblau fluoreszierende Zone ($\frac{1}{5}$ der ersteren). Der Rohrinhalt wurde in fünf Teile zerschnitten: der unterste liefert reines 1,2-Benzpyren, die übrigen gaben Gemische, und zwar überwog Perylen in den oberen, Benzpyren in den tieferliegenden Bezirken.

Im Hinblick auf die von COOK, HEWETT und HIEGER entdeckte, von SCHÜRCH und WINTERSTEIN näher studierte *krebserregende Wirkung* des 1,2-Benzpyrens (wird auch „3,4-Benzpyren“ genannt) soll hier die künstliche Darstellung dieses Kohlenwasserstoffes (Formel: S. 37) beschrieben werden, da die chromatographisch gelungene Reinigung für das Studium maligner Tumoren von Wichtigkeit ist.

50 g 4'-Keto-1',2',3',4'-tetrahydro-1,2-benzpyren (Formel S. 205, dargestellt unter Zuhilfenahme der Chromatographie, von WINTERSTEIN, VETTER und SCHÖN) + 30 g Selen wurden 12 Stunden auf

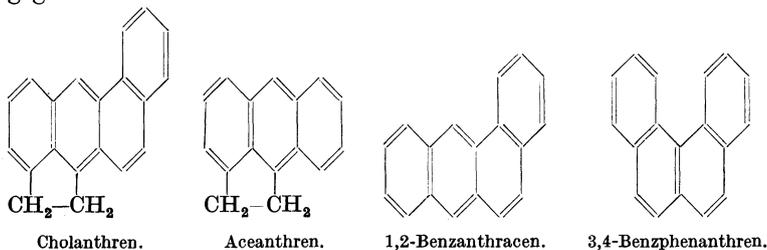
320—340° erhitzt. Man gießt die flüssige Masse in eine große Reibschale, pulverisiert sie nach dem Erkalten fein und kocht das Material mit 1 l Benzol aus. Der bis zu 500 cm³ eingengte Extrakt wird in einer 15 cm hohen Al₂O₃-Schicht adsorbiert, auf welche man eine 5-cm-Lage von Aluminiumoxyd + Carboraffin (2 : 1) gibt. Entwicklung mit Benzin + Benzol (5 : 1). Das 1,2-Benzpyren ging rasch in das Filtrat über. Es wurde so lange nachgewaschen, bis aus der Kohleschicht eine grüne und eine braune Zone ausgetreten waren. Beim Einengen des Filtrates auf ein kleines Volumen und Zusatz von Petroläther fiel reines 1,2-Benzpyren aus. Gelbgrüne Nadelchen, Schmelzp. 177° (korr.). Ausbeute 22 g = 47% der Theorie.

Derivate des 3,4-Benzpyrens (Formel S. 37; WINDAUS und RENNHAKE). *Mononitro-benzpyren* C₂₀H₂₁O₂N. Das Rohprodukt (Schmelzp. gegen 225°) wird aus möglichst wenig Benzol an geglühtes Al₂O₃ adsorbiert (20 × 5 cm). Oben sieht man mehrere dunkelrote und grünschwärze Begleiter, darunter die breite, orangegelbe Schicht des Hauptproduktes, das beim Waschen mit Benzol rasch ins Filtrat übergeht. Aus den ersten 750 cm³ Waschbenzol krystallisiert in der Kälte der Nitrokörper unmittelbar aus, die nächsten 600 cm³ müssen eingengt werden. Bronze-glänzende Nadeln. Schmelzp. 250—251°. (Man unterbricht das Waschen, wenn die Nebenprodukte sich der Säulenbasis nähern.) Auf ähnlichem Wege wurden gereinigt: *Acetyl-amino-benzpyren*, *Benzpyren-monosulfosäure-methylester* und *Benzpyren-monocarbon-säure-methylester*. Zur Darstellung des *Acetyl-benzpyrens* C₂₂H₁₄O wird der Benzolauszug (100 cm³) des aus 1,26 g Benzpyren, Aluminiumchlorid und Acetanhydrid erhaltenen Reaktionsproduktes ebenfalls auf Al₂O₃ aufgeteilt (20 × 3 cm). Man erblickt oben mehrere graubraune Ringe, darunter eine sehr breite, graubraune Schicht. Man entwickelt mit hochsiedendem Petroläther (zirka 600 cm³) so lange, bis das Filtrat noch gefärbt ist, setzt dann das Waschen mit Benzol + Petroläther (1 : 5) fort und schließlich mit einem ähnlichen Gemisch 1 : 2. Die letzte, orangerote Fraktion enthält den Inhalt der sehr breiten Farbschicht und liefert beim Einengen Acetyl-benzpyren. Orangerote Nadeln, Schmelzp. 186—186,5°.



4'-Keto-1,2,3,4'-tetrahydro-1,2-benzpyren.

Aceanthren-, Benzanthracen-, Benzphenanthren- und Fluoren-Derivate werden im Wege einer Filtration durch die Aluminiumoxyd-Säule, gewöhnlich in Benzollösung, gereinigt, in manchen Fällen dann noch in die Pikrate übergeführt (FIESER und HERSHBERG 1—5; BRUCE und FIESER; FIESER und RIEGEL; FIESER und SELIGMAN). Diese Reinigung ist u. a. in den folgenden Fällen geglückt:



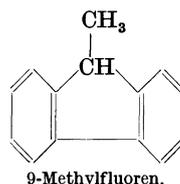
1,2-Cyclopenteno-5,10-aceanthren, 1,2-Dimethyl-5,10-aceanthren, 1-Methyl-5,6-cyclopenteno-anthracen, 15,20-Dimethyl-cholanthren (zweimal chromatographiert, dann Sublimation), 1',2',3',4'-Tetrahydro-10-isopropyl-1,2-benzanthracen (Schmelzpt. nach der Reinigung $82-82,5^{\circ}$ statt $72,5-73,5^{\circ}$), 1',2',3',4'-Tetrahydro-1,2-benzanthracen, 1',2',3',4',9,10-Hexahydro-1,2-benzanthracen, 1,2,3,4-Tetrahydro-10-methyl-1,2-benzanthracen, 3-Methoxy-20-methylcholanthren, 4'-Brom-7-methyl-8,9-dimethylen-1,2-benzanthracen, 1'-Methyl-1,2-benzanthracen, 1'-Methyl-1,2-benzanthrachinon, 1',10-Dimethyl-1,2-benzanthracen. Über 10-Alkyl-1,2-benzanthracene sowie 10-Methoxy-1,2-benzanthracen s. bei FIESER und HERSHBERG (4). Ähnlich werden verarbeitet: 7-Cyano-10-methyl-1,2-benzanthracen (NEWMAN und ORCHIN), 3,4-Benzphenanthren, 2,9-Diäthyl-3,4-benzphenanthren (NEWMAN und JOSHEL). Synthese von 9,10-Dialkyl-benzanthracenen: NEWMAN; BACHMANN und CHEMERDA.

Trennung von zwei Dinitro-methylcholanthrenen $\text{C}_{21}\text{H}_{14}(\text{NO}_2)_2$ (ROSSNER). Das krystallisierte Nitrierungsprodukt wurde aus Benzol an aktives Al_2O_3 adsorbiert und mit Benzol + Petroläther (1:1) entwickelt. Oben sah man eine dunkelrote, darunter eine orange Zone, welche die beiden Isomeren vom Schmelzpt. 257° bzw. 224° enthielten. Ähnlich läßt sich auch das Methylcholanthren selbst reinigen.

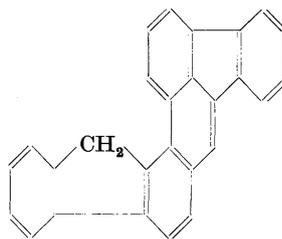
Amino-cholanthren $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}$. Dehydriert man das Einwirkungsprodukt $\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{N}$ von Cholestan-3-on auf Phenylhydrazin mit Selen kurz bei 160° , dann 16 Stunden bei 320° , schließlich 30 Stunden bei 340° und sublimiert den Inhalt des Ätherauszuges im

Hochvakuum, so geht zwischen 180° und 200° eine Fraktion über, die nicht krystallisiert und luftempfindlich ist (Behandlung unter CO₂). Die Aufteilung auf Al₂O₃ aus Benzol + Petroläther (1:1) ermöglichte die Trennung von 10 Fraktionen. Die mittleren, die tiefgelb waren und am stärksten fluoreszierten, liefern nach einer Hochvakuum-Sublimation Krystalle aus Benzol, Schmelzpt. 225°. — Ähnliche Verarbeitung anderer Dehydrierungsprodukte s. bei ROSSNER.

Trennung eines isomorph krystallisierenden Gemisches von Fluoren und 9-Methylfluoren (WIELAND und PROBST). Die Einheitlichkeit des Präparates schien u. a. durch den konstanten Schmelzpunkt der Dibromverbindung als gewährleistet. In einer 1 m hohen Al₂O₃-Säule (Durchmesser 1 cm) zeigte sich indessen Heterogenität: das Fluoren wurde stärker festgehalten als sein Methylderivat. Man wiederhole die Chromatographie öfters. Das dann erhaltene Fluoren fluoresziert im Uviollicht kaum, führt also seinen Namen zu Unrecht.



Kohlenwasserstoff C₂₇H₁₆. Diese Verbindung wurde von WIELAND und PROBST gelegentlich der im Hochvakuum vorgenommenen thermischen Zersetzung des polymeren Biphenylen-äthylens erhalten. Bei der Aufteilung der Benzollösung auf Aluminiumoxyd blieben dunkle Begleiter oben hängen, während der hellgelbe Kohlenwasserstoff leicht durchgewaschen werden konnte. Später wurde Chloroform als Lösungsmittel benutzt, und so konnte durch abwechselnde Krystallisation und Adsorptionsanalyse der Körper schließlich rein erhalten werden. Hellgelbe Blättchen, Schmelzpt. 198—199°.

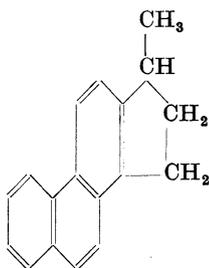


Kohlenwasserstoff C₂₇H₁₆
(wahrscheinliche Formel).

2-Nitro-3-amino-hydrinden läßt sich nach einer kurzen Angabe von KUHN, VETTER und DESNUELLE chromatographisch reinigen (Filtration der Benzollösung durch Aluminiumoxyd).

B. Im Anschluß an das soeben gegebene Versuchsmaterial, folgen nun drei Beispiele über die Chromatographie von Substanzen, welche durch **Dehydrierung** von Naturstoffen erhältlich sind.

a) *Reinigung eines aus Cholesterin gewonnenen Kohlenwasserstoffes* $C_{18}H_{16}$ (γ -Methyl-cyclopenteno-phenanthren) nach DIELS und RICKERT. Das aus Cholesteryl-chlorid mit Hilfe von Selen dargestellte, aus Alkohol prächtig krystallisierende Produkt erwies



γ -Methyl-cyclopenteno-phenanthren.

sich, trotz des schönen Aussehens, in der Aluminiumoxyd-Säule als uneinheitlich und ließ sowohl feste als auch ölige Beimengungen entfernen. Merkwürdigerweise wurde hierdurch der Schmelzpunkt nicht fühlbar abgeändert.

Als Apparat diente die Vorrichtung von WINTERSTEIN und STEIN (1; S. 59) mit einem am Vorstoß angebrachten Sperrhahn, als Lösungs- und Waschmittel Petroläther (Siedep. 70—80°). Etwa 3 g vorgereinigte Substanz, gelöst in 95 cm³ bei 15—20°, wurden unter schwachem Saugen langsam auf die durch Einschlämmen mit Petroläther bereitete Säule getropft (20 × 2 cm). Ein gelber, ölhaltiger Ring wanderte langsam nach unten und war am Ende des Versuches 8—10 cm tief vorgedrungen. Nach dem Austreten der Lösung aus dem Tropftrichter wird mit 3—4 cm³ mehr Petroläther als bei Raumtemperatur zum Auflösen des Ausgangspräparates erforderlich sind, entwickelt. Man sperrt dann den Hahn und wechselt rasch die Saugflasche.

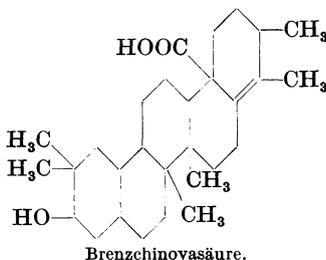
Sobald die Lösung des Kohlenwasserstoffes in die Vorlage zu tropfen beginnt (Schlierenbildung und blaue Fluoreszenz des Filtrates im Quarzlicht), fängt man 10 Tropfen gesondert auf und erneuert wieder die Vorlage, in die nun das Hauptprodukt fließt. Der Versuch ist beendet, sobald die Entwicklungsflüssigkeit aus dem Tropftrichter ausgetreten ist und bei gleichgehaltenem Vakuum nichts mehr in die Vorlage gelangt. Durch Eindampfen der stark fluoreszierenden Lösung auf dem Wasserbade (schließlich im Vakuum) und Wiederholen der Adsorptionsanalyse in einem kleineren Maßstab (wobei nur mehr wenig Gelbes haften blieb und höchstens 2 cm nach unten wanderte), wird 1,9 g γ -Methyl-cyclopenteno-phenanthren gewonnen. Weiße, hellblau fluoreszierende Blättchen, Schmelzp. 124—125°.

Nach Beendigung des Reinigungsverfahrens zeigt die Quarzlampe an der Stelle des ölhaltigen gelben Ringes stark hellgrüne Fluoreszenz

und, von diesem Bezirk abwärts, das bis zum unteren Rohrende sich verstärkende blaue Leuchten des Hauptproduktes. Auf Grund dieser Beobachtung ließen sich zwei kristallisierte Begleiter (Kohlenwasserstoffe) gewinnen.

b) Ein durch Dehydrierung von *Ergosterin* erhaltener Kohlenwasserstoff $C_{26}H_{26}$ (24) lieferte bei der Chromsäure-oxydation das Gemisch eines hellgelben *Ketons* $C_{26}H_{24}O$ und eines roten Chinons, die durch Umkristallisieren sich nicht trennen ließen. RUZICKA und GOLDBERG gossen die Benzollösung dieses Präparates auf eine Aluminiumoxyd-Säule. Das Chinon wurde in schmaler Schicht adsorbiert, und aus dem Durchlauf erhielt man durch Verdampfen das Keton, welches mehrmals umkristallisiert bei $175-175,5^{\circ}$ schmolz. Ähnlich ließ sich ein Kohlenwasserstoff $C_{27}H_{28}$ (26) verarbeiten.

c) Bei der Selen-dehydrierung der *Chinovasäure* (Aglykon des Chinarinden-bitterstoffes Chinovin) und besonders der *Brenzchinovasäure* haben WIELAND, HARTMANN und DIETRICH die vollkommene Reinigung der gebildeten Kohlenwasserstoffe C_nH_n und $C_{25}H_{20}$ nur auf chromatographischem Wege erreichen können, nämlich durch Filtrieren der Benzollösung (150 mg in 25 cm^3) durch aktiviertes Aluminiumoxyd ($15 \times 1\text{ cm}$). Der übergegangene Kohlenwasserstoff $C_{25}H_{20}$ wurde dann nach folgender Vorschrift in ein *Chinon* verwandelt. Die Suspension von 0,25 g in 50 cm^3 stabilem Eisessig wird mit 0,2 g CrO_3 3 Stunden am Rückfluß gekocht. Von geringfügigen ungelösten Resten saugt man heiß ab und fällt das Oxydationsprodukt mit Wasser. Nach zweimaligem Zentrifugieren wird das ziegelrote Chinon genutscht, gründlich gewaschen und auf Ton getrocknet. Krystallisierungsansätze verliefen zunächst negativ, erst die Reinigung durch Adsorption brachte einen Erfolg:



200 mg Rohchinon in 120 cm^3 Benzol lieferten bei der Aufteilung auf aktivem Al_2O_3 (15 cm hoch) ein farbloses Filtrat, welches alsbald unveränderten Kohlenwasserstoff abschied; aus der Entwicklungsflüssigkeit ($150-200\text{ cm}^3$ Benzol) gewinnt man

noch etwas davon (Schmelzp. 295°). In der Säule blieb eine 4 cm hohe, rote Chinon-Schicht hängen. Sie wurde mit Benzol extrahiert, aus welchem beim längeren Stehen harte, glänzende, rote Blättchen hervorschoßen. Man krystallisiert sie aus Benzol und dann aus Pyridin um. Schmelzp. unscharf $252\text{--}255^{\circ}$.

6. Sterine. Gallensäuren.

Auf dem Gebiet der Sterine stehen der Chromatographie noch mannigfache Anwendungsmöglichkeiten bevor. Man kann sagen, daß die in bezug auf viele, in der Literatur beschriebenen Sterinpräparate bestehende Unsicherheit nicht entstanden wäre, wenn man das Verfahren von TSWETT früher verwertet hätte, namentlich zur Überprüfung der Homogenität.

Pflanzen-sterine.

Sitosterin aus dem Pollen von Typha-Arten. Das Rohsterin wird nach KUWADA und MORIMOTO aus Petroläther, auf Aluminiumoxyd adsorbiert. Nach einer solchen Reinigung erwies sich das „ α -Typhasterin“ einfach als *Sitosterin* $C_{29}H_{50}O$. Der Abdampfrest des Durchlaufes lieferte, aus Aceton umgeschieden, glänzende Schuppen von *Pentakosan* $C_{25}H_{52}$.

Nebensterine der Hefe. Das *Kryptosterin* $C_{30}H_{48}\cdot OH$ verbleibt nach dem Fraktionieren der Sterine des Hefefett-Unverseifbaren in den letzten Mutterlaugen, deren Rückstand ein dunkles, zähes Material bildet. WIELAND, PASEDACH und BALLAUF haben 500 g davon in 1 l Benzol durch eine 1,2 m lange Aluminiumoxyd-Säule filtriert (1,5 kg Al_2O_3). Beim Nachwaschen mit Benzol erhält man zunächst Filtrate, deren Abdampfückstand ölig und in Methylalkohol unlöslich ist; die folgenden Anteile waren braun, ihr Abdampfrest lieferte aus Methanol krystallisiertes Kryptosterin (Schmelzp. $134\text{--}136^{\circ}$). Aus dem nächsten, hellgelben Durchlauf erhält man ein viel niedriger schmelzendes Steringemisch. Das rohe Kryptosterin wurde in möglichst wenig Benzol an die zehnfache Gewichtsmenge von Al_2O_3 adsorbiert. Ein Teil des Kryptosterins ließ sich aus den Filtraten gewinnen, das meiste aber aus der in mehreren Schichten geteilten Kolonne mit Äther, im Heißextraktor. Ausbeute 25 g reine Substanz, Schmelzp. $138\text{--}140^{\circ}$ (ohne Chromatographie wird dieser Schmelz-

punkt nie erreicht). Die unteren Schichten der 1,2 m langen Säule enthielten ein untrennbares Steringemisch, die mittleren Zonen u. a. Ergosterin, die obersten zwei Fünftel andersartige Körper.

Auch das *Acetat* kann auf ähnlichem Wege gereinigt werden, es haftet am Oxyd noch schwächer als das freie Sterin. Ebenso isoliert man das Oxydationsprodukt des Dihydro-kryptosterins, das *Kryptostenon* $C_{30}H_{50}O$, sowie das *Chlor-kryptostenon* $C_{30}H_{49}OCl$.

Kryptostadienon, ein zweifach ungesättigtes Keton $C_{30}H_{48}O$ wurde auf folgendem Wege aus Kryptosterin erhalten. Die Lösung von 1,05 g Sterin in 30 cm³ warmem, stabilem Eisessig hat man mit 0,6 g Chromsäure (in wenig Wasser) versetzt, 3 Minuten auf 70—80° erwärmt und in Wasser gegossen. Man zieht die Oxydationsprodukte mit Äther aus, den man mit Soda ausschüttelt, trocknet und verdampft. Das zurückbleibende gelbe Öl (860 mg) konnte nicht zur Krystallisation gebracht werden. 1,9 g wurden in 20 cm³ Benzol auf Al_2O_3 (40 × 0,7 cm) gegossen. Das zuerst durchgelaufene Filtrat lieferte keinen Abdampfrückstand. Nun wusch man mit je 10 cm³ Benzol die Säule nach, welche oben gelbe Verunreinigungen aufwies, jedoch nicht scharf geschichtet war. Das zweite Filtrat enthielt 410 mg, das zehnte nur mehr 2 mg Substanz, die Gesamtmenge betrug 800 mg. Beim Lösen in Aceton + Methanol und Reiben krystallisierten alle diese Öle. Schmelzpunkt des Kryptostadienons nach dreimaliger Umscheidung 65,5—67°.

Die Reinigung zweier weiteren Nebensterine der Hefe, der beiden Isomeren, *Zymo-* und *Ascosterin* $C_{27}H_{43} \cdot OH$, die auf anderem Wege gewonnen wurden, konnte auf Al_2O_3 vervollständig werden (WIELAND und KANAOKA).

Tritisterine. Diese von KARRER und SALOMON (1) im Weizenkeimöl (*Triticum*) entdeckten Sterine bilden eine besondere Klasse, die u. a. durch die überraschend große Löslichkeit und amorphe Beschaffenheit der Digitonide ausgezeichnet ist. Zur Isolierung der wohlkrystallisierten Tritisterine wird zunächst nach den Richtlinien von DRUMMOND, SINGER und MACWALTER adsorptionsanalytisch verfahren, worauf die Abscheidung der Digitonide folgt. Wir geben lediglich den auf die Chromatographie bezüglichen Abschnitt des Arbeitsganges wieder.

75—80 g Unverseifbares werden mit 3—3,5 l Methanol am Rückfluß gekocht, bis nur Spuren ungelöst bleiben. Die rotgelbe

Lösung scheidet bei -10° bis -15° über Nacht Sterinkrystallite ab, die man entfernt, auspreßt und mit Methanol bis zur Farblosigkeit wäscht. Konzentrieren im Vakuum bis zur Trübung, Überführung noch warm in einen Erlenmeyerkolben, Ergänzen mit Methanol auf 250—300 cm³. Über Nacht scheidet sich im Kälteraum, am Boden eine halb feste rote Schicht ab, an den Wandungen sieht man Sterinkrystalle, die abgenommen und durch rasches Filtrieren der noch kalten Lösung entfernt werden. Das Öl wird einige Male mit Methanol digeriert, die Lösung abgegossen und zum Waschen der Sterine benutzt. Man befreit die Methanol-mutterlauge im Vakuum vom Lösungsmittel, nimmt das dunkle Öl in Petroläther auf, der zweimal mit wenig Wasser durchgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet wird.

Die Lösung wird an Al₂O₃ (nach BROCKMANN, 70 × 3,5 cm) adsorbiert und das Chromatogramm mit viel Ligroin (Siedep. 60 bis 90°) entwickelt. Zuerst passiert eine farblose Fraktion „A“, dann eine stark gelber Anteil die Säule; man setze das Spülen fort, bis der Durchlauf wieder farblos geworden ist und erhält so Fraktion „B“ (Weiterverarbeitung S. 249). Die entwickelte Säule sah folgendermaßen aus (Dicke der Schichten in Millimeter):

- Oben: 20—30 grünlichgelb,
100 sandfarbig,
150—180 ohne scharfe Grenze, unten dunkelgelb, Oberteil rotbraun (Schicht „D“),
- unten: 350—400 hell sandfarbig; Hauptschicht, entspricht der Fraktion „C“ von DRUMMOND, SINGER und MACWALTER.

Die Tritisterine finden sich in „C“ und in zweiter Linie in „D“. Elution dieser Zonen mit Methanol + Äther (4:1). Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels erhält man aus „C“ ein rotbraunes Öl (25% des Ausgangsmaterials). Mehrere solche Fraktionen, insgesamt 25 g, wurden in Petroläther nochmals chromatographiert:

- Oben: 10—20 stark gelb (< 1 g),
150 bräunlichgelb, Fraktion „D“ (5 g),
- unten: 500 sandfarbig, Fraktion „C“ (15 g).

Die Fraktion „C“ enthält nur mehr Spuren „normaler“ Sterine und wird nach einem neuen Digitonidverfahren weiter verarbeitet (s. im Original).

Sterine aus Reiskeimöl. Auf ähnlichem Wege, wie KARRER

und SALOMON (1), haben TODD, BERGEL, WALDMANN und WORK Weizenkeimöl und Reiskeimöl verarbeitet. Aus dem letzteren Material wurden die drei Isomeren α -, β - und γ -*Orysterin* $C_{30}H_{50}O$ isoliert, die den Tritisterinen sehr nahestehen; vielleicht sind β -*Orysterin* und α -Tritisterin identisch.

2 kg Reiskeimöl wurden 5 Stunden mit 15proz. methanolischem Kali verseift. Nach dem Fällen der Fettsäuren als Barytsalze, Ausziehen des Unverseifbaren mit Äther, wurde aus dem Abdampfrückstand (37,9 g) ein Teil der gewöhnlichen Sterine durch Krystallisieren aus Methylalkohol bei 0° entfernt (22,7 g), ebenso eine kleinere Portion (2 g) in Form krystallisierter Digitonide. Der Rest wog 13,2 g. Davon wurden 11 g unter 0,1—0,2 mm Druck fraktioniert (nicht unbedingt erforderlich) und der zwischen 190° und 275° übergehende Anteil (7,1 g) in 750 cm³ Petroläther (Siedep. 40—60°) auf aktiviertem Al_2O_3 verarbeitet (31 × 3,5 cm). Entwickeln mit Petroläther + etwas Benzol:

Oben: 23 gelbbraun (0,22 g),
110 im Uviollicht grünlich leuchtend (3,74 g),
55 intensiv blaue Fluorescenz (0,6),
unten: 115 blaue Fluorescenz (0,33 g).

Elution der grün leuchtenden Zone mit Methanol + peroxyd-freiem Äther (4 : 1), Abdampfen, Lösen in Pyridin und Kochen mit p-Nitrobenzoylchlorid während 2 Stunden. Man läßt über Nacht stehen, gießt auf Eis, säuert mit Schwefelsäure an und extrahiert den klebrigen, getrockneten Niederschlag a) mit 500 cm³ heißem Petroläther und b) mit ebensoviel peroxydfreiem Äther.

a) Nachdem die p-Nitrobenzoesäure mit Alkali entfernt wurde, ließ sich der Ester aus Aceton mehrmals umkrystallisieren und bildete farblose Nadeln, die durch zweistündiges Kochen mit 10proz. butylalkoholischem Kali hydrolysiert wurden. Man verjagt den Alkohol mit Dampf, nimmt die flockige Fällung in Äther auf und krystallisiert das steife Gel aus Alkohol + Wasser + Eisessig (5 : 1 : 4); β -*Orysterin*, Schmelzp. 113—114°.

b) Der Extraktstoff wurde in einen gelatinösen, leichter löslichen und in einen schwerer löslichen Anteil zerlegt. Man chromatographierte die erstgenannte Fraktion (1,13 g) aus Petroläther + Benzol (9 : 1) auf aktiviertem Aluminiumoxyd. Nachwaschen mit 1 l des Solventgemisches. Die mittlere Zone, deren Inhalt

starke Extinktion im Ultraviolett aufwies, wurde mit peroxyd-freiem Äther eluiert: halbkristallinische, gelbliche Masse, 0,95 g. Hydrolyse des Esters mit heißem methanolischem Kali (10%, 2 Stunden), Krystallisieren des α -Orysterins durch langsames Einengen seiner alkoholischen Lösung über P_2O_5 . Schmelzpt. 121 bis 122°.

Tierische Sterine.

γ -Sitosterin $C_{29}H_{50}O$ aus dem Giftsekret der Kröte (*Bufo vulgaris*).

HÜTTEL und BEHRINGER haben die Petrolätherauszüge von der Giftgewinnung abgedampft und den Rest wiederholt mit Methylalkohol ausgekocht, der beim Erkalten ein Rohsterin abschied. Nach einer Adsorption aus Benzol an Aluminiumoxyd, erfolgte die Zerteilung der Säule auf Grund der LIEBERMANN-Reaktion des Adsorbates sowie des Leuchtens unter der Quarzlampe. Das Sitosterin war in der Hauptschicht enthalten, deren Inhalt nach Wiederholung der Chromatographie rein war. Ausbeute 2,5 g aus 33000 Kröten.

Lanosterin. Nach einer kurzen Angabe von DORÉE und PETROW kann das im Schafwollfett vorkommende *Lanosterin* $C_{30}H_{50}O$ chromatographisch gereinigt werden.

Das von DANE und WANG aus Cholesterin-dibromid bereitete *Cholestadienol* $C_{27}H_{42}O$ wurde auf Aluminiumoxyd zu Komponenten aufgeteilt, die alle konjugierte Doppelbindungen enthalten, jedoch verschiedene Spektren zeigen. Nähere Angaben werden für später in Aussicht gestellt. — Zur endgültigen Reinigung von 2,4-Dibromcholestenon $C_{27}H_{40}OBr_2$ ist Al_2O_3 geeignet; der Schmelzpunkt stieg dabei von 191° auf 203° (DANE, WANG und SCHULTE). — Ein Isomeres des Cholestadienons, das *Iso-ergosteron* $C_{28}H_{42}O$ wurde von WETTER und DIMROTH aus den Mutterlaugen des Ergosterons chromatographisch gewonnen (hochsiedender Petroläther, Al_2O_3).

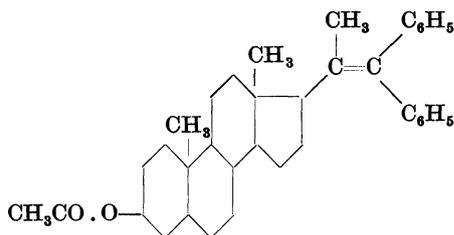
Dehydrierungsprodukte von Sterinen: S. 208.

Gallensäuren.

a) Ein von SAWLEWICZ und REICHSTEIN auf dem Wege von der Litcholsäure zur Ätio-litcholsäure erhaltenes Zwischenprodukt, das *1,1-Diphenyl-methyl-(3-acetoxy-ätiocholyl)-äthylen* $C_{36}H_{46}O_2$ konnte zunächst nicht krystallisiert werden. Etwa 1 g wurde in 200 cm³ Pentan gelöst, durch eine aus 20 g Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) mit Pentan hergestellte Säule filtriert und mit Portionen von je 150 cm³ Pentan nachgewaschen, welche

einzel abgedampft und geprüft wurden. Das erste Filtrat und die erste Waschlösung enthielten nur etwas Diphenyl, die folgenden sieben Lösungen gaben einen harzig aussehenden, farblosen Rückstand (insgesamt 0,5 g), der nach Zusatz weniger Tropfen Eisessig allmählich kristallisierte. Waschen mit etwas Eisessig, Ausbeute 0,32 g, Schmelzpt. 161 bis 163° (Sintern bei 157°).

b) Die durch Wasserentzug aus der 6-Oxyallocholansäure erhaltlichen isomeren *Cholensäuren* können nach WIELAND, KRAUS, KELLER und OTTAWA



1,1-Diphenyl-methyl-(3-acetoxy-ätlocholy)-äthylen.

zumindest partiell voneinander getrennt werden (Alkohol, Aluminiumoxyd). Unter der Quarzlampe zeigten sich vier undeutliche Fluorescenzonen, in denen das Mengenverhältnis der Isomeren stufenweise verschoben war.

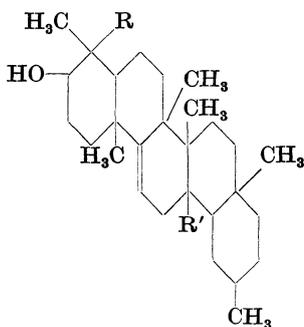
7. Sapogenine.

a) *Die Reinigung des rohen Sarsa-sapogenins* (aus *Radix Sarsaparillae*) gelingt nach ASKEW, FARMER und KON am besten, wenn eine 4—5proz. Benzollösung durch eine aktivierte Al_2O_3 -Säule (Merck) gesaugt wird. Verunreinigungen bleiben im Adsorbens zurück. Der Vakuum-abdampfückstand des Filtrats wird aus Aceton umkristallisiert. Schmelzpt. 197—198°, $[\alpha]_{\text{D}} = -75^\circ$. Dieselbe Arbeitsweise wurde auch von FIESER und JACOBSEN übernommen.

b) *Isolierung der Sojabohnen-Sapogenole A, B, C und D* (OCHIAI, TSUDA und KITAGAWA 1,2). 100 g kristallisiertes Saponin wurden mit 200 cm³ konz. HCl + 1,2 l Methanol 30 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Einengen im Vakuum wurde in Wasser gegossen und abgesaugt. Extraktion der Fällung mit Äther. Man löst den Abdampfückstand des letzteren in 2 l Benzol: beim Stehen über Nacht schieden sich 20 g Substanz aus; Schmelzpt. 248—252° (*Kryst. B*). Man gießt das Filtrat auf aktivierte Al_2O_3 (60 × 3 cm), entwickelt mit 1 l Benzol, zerlegt die

Säule in 4 Teile und eluiert sie einzeln mit Methanol. Zone I (oben): 1,5 g *Kryst. A.*, Schmelztp. 265—280°. Die aus den Zonen II + III erhaltenen Krystalle werden mit heißem Methanol behandelt: der leichter lösliche Anteil lieferte 8 g *Kryst. C.*, Schmelztp. 233 bis 235°, der schwerer lösliche (mehrmals aus Methanol umgefällt) 0,5 g *Kryst. D.*, Schmelztp. 295—298°.

Soja-Sapogenol A, $C_{30}H_{50}O_4$. Die Lösung von 1,5 g „*Kryst. A*“ in 500 cm³ Benzol wurde auf Al_2O_3 ($30 \times 1,5$ cm) gegossen und mit 200 cm³ Benzol entwickelt. Man eluiert das oberste Säulenviertel mit Methanol und löst die Substanz zweimal aus Methanol um. Blätter, Schmelztp. 308—312°, rechtsdrehend.



Grundskelett der Sapogenole,
nach Ruzicka.

Soja-Sapogenol B, $C_{30}H_{50}O_3$. Die Lösung von mehrmals aus Methanol umkrystallisiertem „*Kryst. B*“ in 21 Benzol wurde durch Al_2O_3 (nach BROCKMANN, $28 \times 1,7$ cm) filtriert. Man entfernt je ein Siebentel der Säule oben und unten, eluiert den Hauptanteil wie beschrieben und krystallisiert die Substanz aus Methanol um. Nadeln, Schmelztp. 258 bis 259°, rechtsdrehend.

Soja-Sapogenol C, $C_{30}H_{50}O_2$. Chromatographie von 1 g „*Kryst. C*“ in 100 cm³ Benzol auf Al_2O_3 (nach BROCKMANN, 25×1 cm), Entwickeln mit 100 cm³ Benzol + Chloroform (1 : 1). Man nimmt den Abdampfrückstand des Durchlaufes in Methanol auf, engt die Lösung ein und fällt die ausgeschiedenen Krystalle zweimal um. Nadeln, Schmelztp. 238—239°, rechtsdrehend.

Soja-Sapogenol D, $C_{30}H_{50}O_3$. „*Kryst. D*“ aus Aceton + Methanol umgeschieden. Körnige Prismen, Schmelztp. 298—299°, linksdrehend.

c) *Derivate und Abbauprodukte des Soja-Sapogenols B* (OCHIAI, TSUDA und KITAGAWA 1, 2; TSUDA und KITAGAWA). Zur Reindarstellung des Acetats wird die Benzollösung zweimal durch aktiviertes Al_2O_3 filtriert. — Ebenso reinigt man das Produkt der Chromsäure-oxydation $C_{29}H_{44}O_2$; die ersten Anteile des Filtrats liefern nach dem Abdampfen und Umlösen aus Aceton reine Prismen vom Schmelztp. 254—256°. Der durch Selen-De-

hydrierung erhältliche Kohlenwasserstoff $C_{13}H_{14}$ liefert ein kristallisiertes Pikrat. Treibt man die 1proz. Benzollösung des letzteren durch eine Aluminiumoxyd-Säule, so wird das Pikrat zerlegt; die gereinigte, freie Verbindung kann dann als Styphnat abgetrennt werden.

Kurze Angaben über die Chromatographie von Abbauprodukten des Sarsa-Sapogenins und Smilagenins findet man bei FARMER und KON.

d) *Trennung von Oleanol* $C_{29}H_{47}OH$ und *Oleanylen* $C_{29}H_{46}$ (WINTERSTEIN und STEIN 1).

Das Decarboxylierungsprodukt der Oleanolsäure wurde in Benzin gelöst, von unveränderter Säure abgetrennt und durch dreimaliges Waschen mit gesättigter Barytlösung entsäuert. Man saugt die getrocknete Lösung durch aktiviertes Aluminiumoxyd ($14 \times 4,5$ cm) und spült die Säule mit etwa 400 cm^3 Benzin nach. Das Filtrat lieferte nach dem Eindampfen und Umkristallisieren aus Aceton 2,5 g Oleanylen. Das adsorbierte Oleanol wurde mit Äther + Methanol aus der Säule eluiert und sein Abdampfrückstand gleichfalls aus Aceton kristallisiert. Ausbeute 2,5 g, Schmelzp. $212-216^\circ$.

8. Pflanzliche und tierische Gifte mit sterinartigem Gerüst.

Pflanzliche Herzgifte.

a) *Wirkstoffe des Strophantus.*

Jüngst haben TSCHESCHE und BOHLE aus käuflichen *Strophanthus*-Samen (wahrscheinlich *S. Preussii* und *S. Barteri*) den in Chloroform löslichen Anteil der herzwirksamen Glucoside mit Hilfe der Adsorptionsmethodik zum Krystallisieren gebracht. Das Präparat erwies sich mit dem *Sarmentocymarin* $C_{30}H_{46}O_8$ von JACOBS und HEIDELBERGER als identisch.

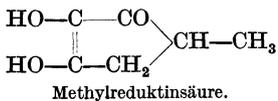
5 kg gemahlene Samen wurden im Soxhlet mit Petroläther entfettet, an der Luft getrocknet und mit Methanol ausgezogen. Man dampft am Wasserbade ab, nimmt mit Wasser auf, äthert die Lösung aus und schüttelt die wäßrige Schicht 10mal mit je 300 cm^3 Chloroform. Der Abdampfrückstand des Chloroforms (hellbraunes Öl, 17 g) wird im Exsiccator getrocknet und in

170 cm³ Chloroform gelöst. Man fügt 1 Vol. Benzol zu und gießt die Flüssigkeit auf Al₂O₃ (nach BROCKMANN). Die Säule ist so lange mit Chloroform + Benzol (1:1) nachzuwaschen, bis das Filtrat farblos abläuft. Nun wird das letztere verdampft und sein Rückstand mit Methanol aufgenommen. Die über Nacht ausgeschiedenen Krystalle lassen sich aus Methanol, hierauf aus wäßrigem Äthylalkohol umschneiden und schmelzen dann bei 136—137°.

Das aus *Sarmentogenin* C₂₃H₃₄O₅, einem weiteren Genin des *Strophanthus* von TSCHESCHE und BOHLE bereitete *gesättigte Lacton* erwies sich als identisch mit dem bekannten Lacton aus *Digitoxigenin* C₂₃H₃₆O₂. Der Schmelzpunkt des letzteren wird durch fraktionierte Adsorption an Aluminiumoxyd bis zu 188—189° erhöht.

b) *Calotropin, ein afrikanisches Pfeilgift.*

Der Giftstoff des *Calotropis procera* (Mudar-Pflanze) wurde von WIELAND isoliert (unveröff.) und besitzt die ungefähre Zusammensetzung C₂₉H₄₀₋₄₂O₉. HESSE und REICHENEDER haben je 0,2 g Calotropin unter 0,05 mm Druck rasch auf 230° erhitzt. Bald destillierte ein farbloses Öl (Methylreduktinsäure), das



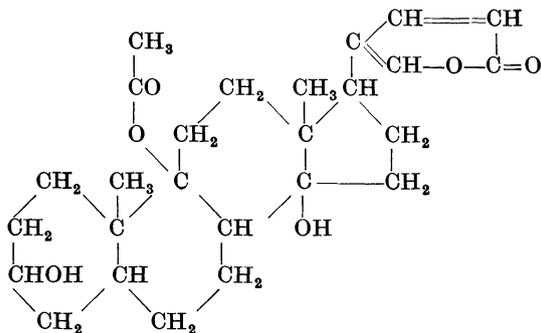
zu Krystallen erstarrte. Das aus 2 g Ausgangssubstanz zurückbleibende Material widerstand jedoch allen Krystallisationsversuchen, es wurde daher in Chloroform gelöst und auf geglühtem

Aluminiumoxyd (15 × 1,8 cm) chromatographiert; Entwickeln mit Chloroform. Im Quarzlicht sah man zwei gut getrennte, fluoreszierende Zonen, die positive Legalprobe gaben. Beide lieferten nach der Elution mit abs. Alkohol und dem Einengen unmittelbar Krystalle. Das Hauptprodukt, das *Calotropagenin* C₂₃H₃₂O₆ entstammt der unteren, breiteren Fluoreszenzschicht. Nadeln, Schmelzpunkt, nach öfterem Umkrystallisieren 240°. Die nicht fluoreszierenden Zwischenschichten lieferten kein Krystallinat.

Krötengift.

Die Isolierung des *Hauptgiftes der einheimischen Kröte (Bufo vulgaris)*, des *Bufotalins* C₂₆H₃₆O₆, konnte von WIELAND, HESSE

und HÜTTEL auf chromatographischem Wege einfacher und mit weit besserem Ertrag erreicht werden als nach älteren Verfahren.



Bufotalin (wahrscheinliche Formel).

Das Gift von rund 33000 Tieren wurde durch Ausdrücken der Parotiden mit Pinzetten gewonnen und das in Watte aufgesaugte Sekret (netto 439 g), nach dem Trocknen über P₂O₅, in drei Anteilen verarbeitet. Man hat das Material im Soxhlet innerhalb 4—5 Tagen mit alkoholfreiem Chloroform erschöpft, die Extrakte im Vakuum stark eingengt und durch Schütteln mit n-Soda entsäuert (meist Fällung). Nun wird die Chloroformlösung samt entstandenem Niederschlag in viel Petroläther eingerührt und die krümelige, gut getrocknete Fällung aus Aceton, auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) chromatographiert. Schon eine einzige Adsorption führt zu der fast quantitativen Trennung von Bufotalin und von Nebengiften, während eine weitere Aufteilung der letzteren auf diesem Wege nicht möglich war. Beispiel:

Die mit Petroläther wie beschrieben erzielte trockene Fällung wog 35 g; sie wurde in 10 Teilen Aceton gelöst, filtriert und auf die Säule gegossen (16 × 7 cm). Ein natürlicher gelber Farbstoff, der ebenso festgehalten wird wie das Bufotalin, diente als *Adsorptions-indicator*. Man entwickelt so lange mit Chloroform, bis fast das gesamte gelbe Pigment durchgewaschen ist und zerteilt dann die Säule auf Grund ihres Aussehens, der Uviollicht-Fluoreszenz sowie der LIEBERMANN-Reaktion (links Dicken in Millimeter):

Oben: 10 I. Zone, braun, fluoresziert blau, Farbreaktion schwach (verworfen).

90 II. Zone, farblos, fluoresziert grün, LIEBERMANN-Reaktion rosa-blau-blaugrün.

40 III. Zone, enthielt das obere Ende des fast ganz durchgewaschenen gelben Farbstoffes. Keine Fluorescenz. LIEBERMANN-Reaktion derjenigen des Bufotalins sehr ähnlich.

unten: 20 IV. LIEBERMANN-Reaktion des reinen Bufotalins: rotviolett-blau-grün.

Aus der II. Zone wurden, nach der Elution mit warmem Chloroform + Methanol (1 : 1), 3,2 g Nebengiftgemisch auskristallisiert (Schmelzp. 210°); auch III. enthält im wesentlichen noch Nebengifte (2,2 g), während die IV. Zone 3,2 g Bufotalin liefert (Schmelzp. 147°). Aus dem gelben Filtrat wurde die größte Menge des krystallinischen Hauptgiftes isoliert, nämlich 5,4 g Bufotalin vom Schmelzp. (148°) 222° und 0,6 g, Schmelzp. 146°.

Aus der ganzen Sekretmenge ließen sich in einem Arbeitsgang 27,4 g Bufotalin und 15,3 g Nebengiftgemisch fassen.

Zur raschen *Reinigung* von Bufotalin-Präparaten ist ebenfalls die Chromatographie geeignet: Bufotalin (Schmelzp. 145°) kann durch einmalige Adsorption aus Aceton und Nachentwickeln mit Chloroform in ein Präparat mit dem Schmelzp. (148°) 222° übergeführt werden. Ausbeuten: 85% reines Bufotalin und 10% Nebengifte.

Die nicht mehr krystallisierenden Mutterlaugen der Genine werden vereinigt und eintrocknen gelassen, worauf man die zähe Schmiere mit Chloroform aufnimmt, mit Sodalösung und Wasser schüttelt, mit viel Petroläther fällt und den Niederschlag wie oben chromatographiert. Roherträge: 8,1 g Bufotalin und 13,5 g Nebengiftgemisch. Die beschriebenen Operationen können noch öfters wiederholt werden, allerdings sinken die Ausbeuten rasch. (Eine Behandlung mit Petroläther ist hier unnötig.)

Auch die Gewinnung des *Cinobufagins* $C_{25}H_{32}O_6$ aus einer chinesischen Droge („Ch'an Su“), welche aus dem Parotissekret der chinesischen Kröte (*Bufo gargarizans*) erzeugt wird, gelingt nach TSCHESCHE und OFFE (1, 2) am besten chromatographisch.

Man extrahiert das Material im Soxhlet-Apparat mit Chloroform, bis das Lösungsmittel farblos abläuft, dampft den Extrakt auf dem Wasserbad bis zu einem dicken Öl ein und versetzt das letztere mit Benzol, solange kein Niederschlag entsteht. Gießt man nun die Lösung auf eine Aluminiumoxyd-Säule (nach BROCKMANN), so zeigen sich 3—4 gelbe Scheiben im oberen Viertel der Füllmasse, welche langsam nach unten wandern. In der Gegend

des ersten Ringes befand sich der Hauptanteil des Bufagins. Man arbeitet mit derselben Säule weiter, bis eine dunkle Zone fast das untere Ende des Rohres erreicht hatte, dampft dann das goldgelbe Filtrat zur Trockne, rührt den Rest mit wenig Essigester an, reibt oder impft. Die erhaltenen Krystalle werden wiederholt aus Alkohol umgelöst. Endertrag 15 g Cinobufagin aus 2,5 kg Droge, Schmelzp. 223°. Man kann den letzterwähnten Trockenrückstand auch direkt acetylieren.

Nach den Versuchen von KOTAKE und KUWADA (1, 2) ist das aus *Ch'an Su* gewonnene Cinobufagin (Schmelzp. 220°) nicht ganz einheitlich. Wird nämlich die Chloroformlösung auf Aluminiumoxyd verarbeitet, so enthält der Durchlauf, wie auch der untere Säulenbezirk, Cinobufagin (Hauptbestandteil, Schmelzp. 212—213°), während man aus dem oberen Teil des Adsorbens „*Cinobufotalin*“ isolieren kann, dessen Schmelzpunkt bei der Wiederholung des Versuches von 237—242° bis zu 248—249,5° angestiegen ist.

Auch das WIELANDSche γ -*Bufogenin* ließ sich aus alkoholischen Extrakten des *Ch'an Su* abscheiden (Chloroform, Al_2O_3 , in Anlehnung an die Arbeiten von TSCHESCHE und OFFE 1, 2).

S. auch die neue Untersuchung von KONDO und OHNO.

Reinigung der Desacetyl-hexahydro-cinobufagonsäure: TSCHESCHE und OFFE (2).

Angaben über Adsorptions- und Elutionsverhältnisse eines *Schlammgiftes*: TSUCHIYA.

9. Heterocyclische Basen. Alkaloide.

Auf diesem Gebiete eröffnen sich mannigfache Verwendungsmöglichkeiten für das TSWETTSche Verfahren, welche noch bei weitem nicht ausgenutzt sind. Man wird in zahlreichen Fällen entweder die Alkaloidsalze in wasserhaltigem bzw. wäßrigem Medium untersuchen können oder aber die Basen selbst, in wasserfreien Lösungsmitteln. Für den letzteren Fall ist die Füllung des Rohres mit einem sauren Adsorbens naheliegend, jedoch nicht unbedingt erforderlich.

Einfache heterocyclische Substanzen.

Die folgenden, orientierenden Versuche wurden von KONDO ausgeführt.

Trennung von Pyridin und α -Picolin. 1proz. Benzinlösungen

beider Basen (je 50 cm³) wurden auf Al₂O₃ (20 × 1,5 cm) chromatographiert und mit 200 cm³ Benzin entwickelt. Man zerschneidet die Kolonne in fünf Teile, eluierte dieselben mit 20 cm³ Äther + 10 cm³ Methanol, schüttelte mit verd. HCl aus und prüfte die Chlorhydrate mit Sublimat. Das oberste Säulenfünftel ergab ein Pyridindoppelsalz, Schmelzpt. 176—177°, das dritte bis fünfte Fünftel ein Picolindoppelsalz, Schmelzpt. 153—154°, während im zweiten Fünftel beide Basen enthalten waren.

Trennung von Chinolin und 8-Oxychinolin. 40 cm³ einer Benzinlösung, je 0,4 g enthaltend, auf Al₂O₃ (30 × 1,2 cm). Beim Entwickeln mit Äther ging Chinolin in das Filtrat; Schmelzpunkt des Pikrates 202—203°. In der Säule verblieb ein gelbgefärbter Lack, der mit Sprit nicht zu eluieren war.

Trennung von Antipyrin und Chloralhydrat. 0,7 g Hypnal (1 Mol Antipyrin + 2 Mole Chloralhydrat) wurden in 40 cm³ Benzol + Aceton (4 : 1) durch Al₂O₃ (12 × 1,2 cm) filtriert und mit Benzol entwickelt. Aus dem Durchlauf krystallisierte Antipyrin, Schmelzpt. 113°.

Trennung von Pyramidon und Veronal. Versuchsansatz wie oben beschrieben. Beim ausgiebigen Entwickeln mit Benzol wandert das Pyramidon ins Filtrat, während das Veronal sich namentlich in den oberen Bezirken der Säule ansammelt und von dort mit Sprit eluiert werden kann.

Über *Carbazol*, *1,2-Benzcarbazol* und *Acridin* vgl. S. 202—203.

China-alkaloide.

Die *Anreicherung von Cinchonin* aus 100 cm³ einer Lösung des Sulfates 1 : 1000000 ist von FINK (2) vorgenommen worden. Man gießt die mit sek. Natriumphosphat auf p_H = 8,2 gebrachte wäßrige Lösung durch 1,5—2 g einer Filtermasse, bestehend aus 1 Teil Asbest und 3 Teilen Kaolin. Elution mit verd. Salzsäure.

KARRER und NIELSEN ist die *Trennung von Chinin und Cinchonin* in einer Floridin-XXF-Säule gelungen. Man löst je 100 mg Base in Chloroform + Benzol (1 : 1) und chromatographiert in einer Uviolglasröhre, wobei mit Chloroform + Benzol (jetzt 4 : 1) entwickelt wird. Im Lichte der Quarzlampe sah man drei Schichten fluoreszieren: oben: hell-lila, dann: silberglänzend, unten: braun. Die oberste Zone gab an siedenden Alkohol eine Substanz ab, die bei 208° schmolz, die mittlere eine solche mit dem Schmelzpt. 50°, der unterste, dunklere Bezirk gar nichts. Die erstere Fraktion zerfiel bei erneuerter Chromatographie in drei Scheiben, von welchen die oberste reines Cinchonin (Schmelzpt. 254°) liefert, während das zweite Präparat ein Chromatogramm ergab,

aus dessen mittlerem Anteil reines Chinin gewonnen wurde (Schmelzp.: wasserhaltig 56°, wasserfrei 177°).

Nach unveröffentlichten Versuchen trennt man China-alkaloide, z. B. Chinin und Cinchonin, vorteilhaft auf Calciumhydroxyd, aus Chloroform. Nach dem Entwickeln mit Alkohol wird ein schönes Fluoreszenzbild erhalten (FREHDEN). Ähnlich trennen wir andere Paare dieser Reihe.

Strychnos-alkaloide.

a) *Anreicherung des Strychnins.* 100 cm³ einer wäßrigen Strychninlösung 1 : 1000000, welche mit sek. Natriumphosphat auf $p_H = 8,0$ eingestellt war, wurde von FINK (2) durch Asbest + Kaolin (1 : 3) gegossen. Das Alkaloid blieb quantitativ in der Filtermasse zurück und ließ sich mit verd. Salpetersäure eluieren.

b) Bei der Reinigung von *Abbauprodukten des Vomicidins* C₂₂H₂₆O₃N₂ haben WIELAND und HORNER ätherische Lösungen durch eine Aluminiumoxyd-Säule filtriert, wobei farbige Verunreinigungen hängen blieben. Es wurden so verarbeitet: 1. Ein rohes, öliges Dehydrierungsprodukt der Base C₁₆H₂₄O₂N₂, welches durch Eindampfen des Filtrats prachtvolle Krystalle des *Vomipyrrins* C₁₅H₁₆N₂ ergab; 2. ein weiteres Dehydrierungsprodukt C₁₃H₁₇N sowie 3. ein Hydrierungsprodukt der Base C₁₅H₁₆N₂, von der Zusammensetzung C₁₅H₂₀N₂. Ebenfalls chromatographisch wurde das thermische Zersetzungsprodukt der durch Oxydation des Vomicidins erhältlichen Säure C₁₉H₂₄O₇N₂ bzw. sein Ester behandelt (Al₂O₃, Chloroform), doch war das Krystalliat hier nicht einheitlich.

Opium-alkaloide.

Die folgenden, künstlich gemischten Paare wurden von KONDO auf Aluminiumoxyd zerlegt:

Trennung von Morphin und Thebain. Gemisch von 1proz. Acetonlösungen, Entwickeln mit Benzol. Das Morphin wurde im oberen Bezirk der Säule festgehalten, während das Thebain aus dem Durchlauf isoliert werden konnte: Krystalle, Schmelzp. 191°.

Trennung von Kodein und Thebain. Auch Kodein ist leichter adsorbierbar als Thebain. Als Lösungsmittel dienten 100 cm³ Äther für je 0,1 g Substanz. Nach dem Entwickeln mit 40 cm³ Äther war Thebain im Durchlauf nachweisbar.

Narcotin und Thebain. Je 0,2 g Substanz in 60 cm³ Benzol + 50 cm³ Äther. Säulenmaße 20 × 1 cm, Entwickler 50 cm³ Äther. Das gesamte Filtrat enthielt 0,1 g Thebain, das oberste Viertel der Säule 0,05 g rohes Narcotin (elulierbar mit 50 cm³ Aceton). Die unzerschnittene Säule zeigte bei der Bepinselung mit konz. Schwefelsäure eine obere grüne Schicht (Narcotin) und eine tiefer liegende, gelbrote (Thebain).

Curare-alkaloide.

Aus dem Calebassen-Curare, einer der stärksten südamerikanischen Pfeilgiftdrogen, haben WIELAND, KONZ und SONDERHOFF eine neue Base, das *Toxiferin*, gewonnen. Das Rohprodukt, durch Methanol-Extraktion, Sublimat-Fällung und Zersetzen mit Schwefelwasserstoff erhalten, wurde in Form des *Reineckates* wie folgt, fraktioniert (Reinecke-säure: $\text{H}(\text{NH}_3)_2\text{Cr}(\text{SCN})_4$).

5 g Substanz lieferten mit reiner Reineckesäure 2,67 g Salz, das in 800 cm³ Aceton puriss. gelöst und durch eine 15 cm hohe Säule von Al_2O_3 (100 g) getrieben wurde. Nachwaschen mit 150 cm³ Aceton. Oben verbleiben braune, unwirksame Begleiter. Man engt den Durchlauf im Vakuum auf 50 cm³ ein, versetzt ihn mit 1 Raumteil Wasser, macht mit 2n-HCl schwach kongosauer und entfernt die Reineckesäure mit Äther. (Etwa sich ausscheidendes Reineckat wird durch tropfenweisen Zusatz von Aceton gelöst. Da in der acetonhaltigen Ätherlösung noch Reineckat enthalten ist, muß dieser Anteil im Vakuum verdampft und wiederholt wie beschrieben verarbeitet werden.) Die rötlichbraune wäßrige Lösung wird im Vakuumexsiccator über H_2SO_4 und NaOH eingetrocknet und gibt 0,9 g eines braunen Lacks; Wirksamkeit: 40 γ pro Froscheinheit. Das so gewonnene, hochwirksame Chlorhydrat krystallisiert zwar noch nicht, doch kann es durch fraktionierte Fällung mit Äther aus Alkohol + Aceton weiter gereinigt werden und liefert dann ein wohlkrystallisiertes Antrachinon- β -sulfonat (20—30 γ pro Froscheinheit), ferner ein ebensolches Pikrat. Zusammensetzung noch nicht festgelegt.

Man kann auch das *Perchlorat* der Rohbase aus Aceton auf Al_2O_3 verarbeiten und mit Aceton + Methanol eluieren. Dem adsorbierten Perchlorat liegt eine andere Base zugrunde als dem nichtadsorbierten.

Sanguinaria-alkaloide.

Nach einer kurzen Angabe von SPÄTH, SCHLEMMER, SCHENCK und GEMPP, konnte aus der Blutwurzel (*Sanguinaria canadensis*) mit Hilfe der Aufteilung auf Aluminiumoxyd aus Chloroform *Oxy-sanguinarin* $C_{20}H_{13}O_5N$ isoliert werden. Schmelzp. 360—361° (korr.).

Lupinen-alkaloide.

Nach Vorversuchen von KONDO wird *d-Lupanin* aus Benzol viel fester auf Al_2O_3 festgehalten als Spartein (Nachwaschen mit Benzol + Benzin 1:1, dann mit Benzol). Im obersten Teil der Säule war, nach einer Methanol-elution, das Lupanin als Pikrat nachweisbar, während die Durchläufe kristallisiertes *Spartein-methyljodid* lieferten.

Sinomenium- und Cocculus-alkaloide.

KONDO, TOMITA und UYEO haben aus der Rohbase des *Cis-sampelos insularis* Makino (Menispermaceae) ein Nebenalkaloid isoliert, das sich mit *Methyl-isochondodendrin* $C_{38}H_{42}O_6N_2$ als identisch erwies. 2 g der durch Ausschütteln mit NaOH von Phenolen befreiten Rohbase wurden in 50 cm³ Benzol gelöst und tropfenweise durch eine 20 cm hohe Al_2O_3 -Säule (BROCKMANN) geschickt. Das erste Filtrat enthielt nur Spuren einer Schmiere. Beim Entwickeln mit Benzol ging langsam eine Alkaloidfraktion ins Filtrat, welche nach dem Abdampfen kristallisierte. Man setze das Entwickeln so lange fort, bis sich beim Einengen des Durchlaufs und Animpfen kein Krystalliat mehr erscheint. Der Abdampfrest der vereinigten Filtrate wird in wenig Aceton gelöst. Man saugt das ausgeschiedene Alkaloid nach einigem Stehen ab. Ausbeute 0,15 g, lange, flache Prismen (aus Aceton), Schmelzp. 272—273° (unter Rotfärbung).

Mutterkorn-alkaloide.

Es bedeutet einen großen Fortschritt, daß es der *Chemischen Fabrik vorm. Sandoz* gelungen ist, die Trennung, Zerlegung und Reindarstellung von sehr empfindlichen Alkaloiden des Mutterkorns (*Claviceps purpurea*) durchzuführen. Es handelt sich hier um *Ergotamin* $C_{33}H_{35}O_5N_5$, *Ergotaminin* $C_{33}H_{35}O_5N_5$, ferner um *Ergotinin* $C_{35}H_{39}O_5N_5$ und sein Isomeres *Ergotoxin* $C_{35}H_{39}O_5N_5$.

Von der Adsorptionssäule werden nicht etwa die schwerer löslichen, physiologisch wenig wirksamen Alkaloide *Ergotaminin* bzw. *Ergotinin* zurückgehalten, sondern die viel leichter löslichen Träger der Mutterkornwirkung, nämlich *Ergotamin* und *Ergotoxin*. Ferner gelang nicht nur die Zerlegung von ballastfreien Ergotamin + Ergotaminin- und von Ergotoxin + Ergotinin-Gemischen sowie die Isolierung der Ergotoxin-Base in kristallisierter Form, sondern auch die Verarbeitung von Rohextrakten. Endlich erwiesen sich die früher bekannten Präparate „Sensibamin“ und „Ergoclavin“ (Brit. P. 388529, DRP. 606778) in der TSWERTTschens Säule als uneinheitlich.

Reindarstellung von Ergotamin aus einem Rohextrakt. 100 cm³ ergotaminhaltiger Rohauszug (Benzol) wurden durch eine mit Benzol angefeuchtete Milchsüßzuckersäule (120 g) geschickt. Beim Nachwaschen mit Benzol läuft zuerst eine alkaloidfreie, ölhaltige Lösung ab, dann eine solche mit Spuren von rechtsdrehendem Ergotaminin, schließlich die Hauptfraktion, linksdrehendes *Ergotamin* von hohem Reinheitsgrad enthaltend. Man dampft bei tiefer Temperatur im Vakuum ein, nimmt den Rest mit wasserhaltigem Aceton auf und erhält fast wasserhelle, rhombische Prismen und Tafeln.

Kristallisiertes Ergotoxin aus dem Gesamtalkaloid. 1 g in 50 cm³ Chloroform wird durch Al₂O₃ (nach BROCKMANN) geschickt. Beim Entwickeln der Schichten und Ausziehen gehen zuerst alkaloidfreie Substanzen ab, dann eine rechtsdrehende Alkaloidlösung, aus welcher, je nach Herkunft und Verarbeitung der Droge, mehr oder weniger Ergotin-Kristalle isoliert werden können. Später durchlaufende Anteile drehen nach links und gaben beim sorgfältigen Abdampfen (Raumtemperatur) einen Rückstand, der aus Benzol sofort kristallisierte und sich als reine *Ergotoxin-Base* erwies.

Trennung eines Gemisches von Ergotamin und Ergotaminin. 120 g Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) werden in einem Rohr (40 × 2,2 cm) mit reinem Chloroform durchtränkt und dann je 0,5 g der beiden Alkaloide in 100 cm³ Chloroform eingeführt. Man entwickelt mit demselben Solvent und erkennt eine Schichtung unter der Quarzlampe. Eine schmalere, stark alkaloidhaltige Zone läuft zuerst ab, dann folgt eine alkaloidarme Fraktion, während der obere Bezirk der Kolonne lebhaft violettweiß fluores-

ziert. Die ersten Filtratanteile (50 cm^3) drehen nach rechts ($\alpha_D = + 8,38^\circ$, im 2-dm-Rohr), bei den weiteren 200 cm^3 geht die Rechtsdrehung ständig zurück und es folgt, nach sehr alkaloidarmen Zwischenfraktionen, die linksdrehende Lösung des Ergotamins. Die rechtsdrehenden Anteile werden im Vakuum eingedampft ($0,52 \text{ g}$); durch einmaliges Umkrystallisieren aus Pyridin erhält man reines *Ergotaminin* in hoher Ausbeute. Die linksdrehenden Extrakte gaben $0,33 \text{ g}$ reines *Ergotamin*, das aus wasserhaltigem Aceton auskrystallisiert.

Trennung eines Gemisches von Ergotoxin und Ergotin. Je $0,5 \text{ g}$ amorphe Ergotoxin-Base und krystallisiertes Ergotin werden, wie soeben beschrieben, verarbeitet. Beim Entwickeln und Ausziehen der Adsorptionsschichten erhält man auch hier zuerst rechtsdrehende Fraktionen, die wohlkrystallisiertes Ergotin liefern. Der Trockenrückstand der linksdrehenden Anteile wird in möglichst wenig Benzol gelöst; beim Stehen erscheint krystallisierte Ergotoxin-Base in guter Ausbeute, trotzdem die Ausgangssubstanz amorph war.

Die Aufteilung des „Sensibamins“ (1 g in 100 cm^3 Chloroform) gelang auf ähnlichem Wege. Nach dem Entwickeln und Ausziehen tropft zuerst eine rechtsdrehende Flüssigkeit ab (sie liefert *Ergotaminin*-Krystalle aus Pyridin), dann folgt die Lösung des linksdrehenden *Ergotamins* (isolierbar aus wäßrigem Aceton). Das „*Ergoclavin*“ kann ebenso aufgeteilt werden, wenn nötig, unter Wiederholung des Adsorptionsversuches.

Partialsynthese des Ergobasinins $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_2\text{N}_3$. STOLL und HOFMANN haben ausgehend von Lysergsäure $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2$ das Ergobasin und das isomere Ergobasin synthetisch aufgebaut. Sie erhielten mit d-2-Aminopropanol-(1) $\text{HOCH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{CH}_3$ das isomorphe Gemisch von d-Isolysergsäure-d-isopropanolamid und l-Isolysergsäure-d-isopropanolamid, welches weder durch Krystallisations- noch durch Salzbildungsmethoden in seine Komponenten zu zerlegen war.

$0,2 \text{ g}$ dieses Gemisches wurden in 10 cm^3 Aceton gelöst und auf eine mit Aceton befeuchtete Säule aus Aluminiumoxyd gegossen (nach BROCKMANN, $50 \times 2 \text{ cm}$). Entwickeln mit Aceton. Im Uviollicht zeigen alle den Lysergsäurerest enthaltenden Stoffe eine schöne, blauviolette Fluoreszenz. Die anfangs schmale, leuchtende Zone breitet sich langsam über die ganze Säule aus,

ohne daß Schichtentrennung erfolgt. Der Durchlauf wird anteilsweise aufgefangen und im Vakuum zum Sirup verdampft. (Die letzten Reste des Lösungsmittels destillieren erst bei höherer Temperatur ab, da das Aceton durch Al_2O_3 kondensiert wird; vgl. S. 6.)

Der Rückstand der Spitzenfraktion krystallisierte beim Aufnehmen mit wenig Aceton und Animpfen mit natürlichem Ergobasinin sogleich (35 mg). Nach dem Umkrystallisieren: Schmelzp. 196° (korr.), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +416^\circ$ (d-Isolysergsäure-d-isopropanolamid). — Die nachfolgenden Fraktionen, die beim Eluieren des Chromatogramms mit Aceton erhalten wurden, drehten immer schwächer positiv und schließlich negativ. Aus der Endfraktion wurde reines l-Isolysergsäure-d-isopropanolamid erhalten, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -342^\circ$, nicht krystallisierend; Schmelzp. des Perchlorats 212° (korr.).

Amanita-toxin.

Mit der Chromatographie von Giftstoffen des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) hat sich bereits RENZ beschäftigt. Die folgenden Angaben stammen aus einer neuen Arbeit von LYNEN und WIELAND, in welcher dargelegt wird, daß die hier behandelten Giftstoffe vielleicht Zwischenglieder in der Reihe von den einfachen Alkaloiden zu den komplizierten Eiweißgiften sind. Insgesamt wurden drei Toxine nachgewiesen: Gift I, Gift II (= Phalloidin, krystallinisch) und Gift III.

a) *Gesamt-trennungsgang der Gifte.* Die durch Auspressen, Methanolextraktion, Bleiessigfällung und Aussalzen mit Ammonsulfat erhaltene sog. „Primärsubstanz“ (30—35fach angereichert, trocken haltbar, zirka 27 g) wurde in 80 cm^3 butylalkoholischem Wasser gelöst und viermal mit je 400 cm^3 wäßrigem Butylalkohol ausgeschüttelt. Man engt die 1600 cm^3 auf 110 cm^3 im Vakuum ein, versetzt sofort, vorsichtig mit genau soviel Wasser, daß die beim Eindampfen ausgeschiedenen Flocken in Lösung gehen, fügt $\frac{1}{2}$ Vol. abs. Alkohol hinzu und gießt die Flüssigkeit auf Al_2O_3 ($55 \times 3 \text{ cm}$).

a) Nachwaschen mit 250 cm^3 eines Gemisches von 68 Teilen wäßrigem Butylalkohol und 36 Teilen abs. Alkohol: der Durchlauf enthält 2,850 g Substanz; Mäuseeinheit 50 γ (schnell wirkend). Frei von Gift I.

b) Mit 150 cm³ abs. Alkohol nachgewaschen: 0,721 g (25 γ , langsam wirkend): frei von Gift I; Hauptmenge von Gift III.

c) Mit so viel Methanol + Wasser (1 : 1) weiter entwickelt, daß eine sich bald ausbildende scharfe Grenze (oben graubraun, unten weiß) an das untere Ende der Säule gelangt ist: 6,283 g (15 γ , langsam wirkend). Enthält Gift I.

d) Mit dem gleichen Gemisch erschöpfend eluiert: 0,841 g (90 γ , langsam wirkend).

In diesem Versuch wurde Gift I mit einer 70proz. Ausbeute angereichert und von Gift II und in der Hauptsache auch von Gift III getrennt. Löst man die Inhaltsstoffe der Filtrate a + b in Wasser, so läßt sich nach dem Animpfen kristallisiertes *Phalloidin* erhalten.

b) *Trennung der Gifte I und II.* 33 g „Primärschubstanz“ (S. 228) wurden so oft mit abs. Alkohol (insgesamt 700 cm³) angerieben, bis der letztere nur mehr wenig gefärbt war und fast nichts mehr aufnahm. Die Hälfte der Lösung (Trockensubstanz 8,4 g) wurde auf Al₂O₃ gegossen (26 × 3 cm). Nachwaschen zuerst mit 20 cm³, dann separat mit 200 cm³ Äthanol + Methanol (9 : 2). Im letzteren Filtratanteil findet man den rasch wirkenden Giftstoff II (tödliche Mäuseeinheit 50 γ). In der unteren Hälfte der Säule, an der man auch im Uviollicht keine Schichtenbildung sah, ist das Gift I angereichert und kann mit Methanol + Wasser + Pyridin (4 : 4 : 1) eluiert werden, während die obere Hälfte unwirksame Begleiter festhält.

Ermittlung des Alkaloidgehaltes galenischer Präparate: S. 277. — Koffeinbestimmung in geröstetem Kaffee: S. 279.

10. Vitamine.

Vitamin A.

Nachweis. Dieser lipidlösliche Wachstumsfaktor, der sich im Tierkörper bekanntlich aus dem Carotingehalt der pflanzlichen Nahrung bildet, wird reichlich von Lebern gewisser Fische dargeboten und ist ein Wirkstoff vieler pharmazeutischer Präparate. Der übliche Nachweis durch die CARR-PRICE-Reaktion ist nur in Abwesenheit von Carotinoiden brauchbar. Lagen solche nicht vor, oder sind dieselben chromatographisch entfernt worden,

so kann die Pinselmethode angewandt werden (ZECHMEISTER, CHOLNOKY und UJHELYI, S. 88, Abb. 69, S. 297). Statt der dort vorgeschlagenen Bepinselung mit SbCl_3 in Chloroform, haben WILLSTAEDT und WITH (1) dasselbe Reagens auf eine ausgepreßte Mikrosäule aus einer feinen Pasteur-pipette aufgetropft. Zur Identifizierung des Vitamins A kann ferner nach KUHN und MORRIS auch die Misch-chromatographie dienen: man benutzt eine Aluminiumoxyd-Säule und Benzin oder Benzol + Benzin als Lösungsmittel. Die Quarzlampe leistet hier gute Dienste.

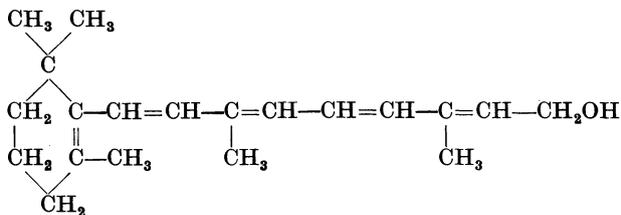
Isolierung. Aus den Leberölen von *Hippoglossus hippoglossus* (Heilbutt) bzw. von *Scombrox saurus* (Makrelenhecht) haben KARRER, MORF und SCHÖPP einen Auszug mit tiefsiedendem Petroläther bereitet, der mittels 12proz. alkoholischem Kali, bei 60° , unter Stickstoff, innerhalb 1 Stunde verseift wurde. Der mit Petroläther extrahierte, unverseifbare Anteil enthält bedeutende Sterinmengen und wird beim Verdampfen des Lösungsmittels nahezu fest. Durch Auflösen in heißem Methanol und mehrstündiges Aufbewahren bei -15° krystallisierten die Sterine fast vollständig aus. Sie wurden bei -15° abgesaugt; aus dem Filtrat konnte nach längerem Stehen im Kälteraum noch etwas Sterin entfernt werden. Eine weitere Reinigung wird durch Ausfrieren von Flocken aus Methanol, in Kohlendioxyd-Acetonmischung erzielt. Das Vitamin bleibt dabei in Lösung. Nun verdünnt man die Flüssigkeit mit Wasser und erschöpft sie mit leichtem Petroläther.

Schon die beschriebenen Operationen bedingen eine weitgehende Anreicherung von Vitamin, dessen Reindarstellung jedoch erst im Wege der *Chromatographie* gelingt:

Die Petrolätherlösung wurde durch eine Säule von Fasertonerde (Merck) gesaugt, wobei das Vitamin in einer mittleren Schicht hängen blieb (darüber: Spur Sterin, tief unten: niedermolekulare Begleiter). Man eluiert die Hauptzone zweckmäßig mit Methanol, führt den Stoffinhalt in Petroläther über und wiederholt die Adsorptionsanalyse noch zweimal. Der Petroläther läßt schließlich ein außerordentlich reines Vitamin-A-Präparat $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$ zurück, dessen CLO-Zahl bis zu 10500 reicht. Die letztere Konstante ließ sich durch weitere Adsorptionen oder durch Acetylierung und Regenerieren nicht mehr erhöhen.

Erst die Chromatographie verhalf also zu analysenreinen Pro-

dukten und führte zur Aufstellung der folgenden Strukturformel:



Vitamin A (nach KARRER, MORF und SCHÖPP).

Während die Leistungsfähigkeit der Tonerde-Säule mit den obigen Ergebnissen erschöpft war, konnten KARRER und MORF (s. auch KARRER, WALKER, SCHÖPP und MORF) noch einen Schritt weiter vordringen, als sie das Al_2O_3 durch eine Calciumhydroxyd-Säule ersetzten. Nun zerfiel ihr bestes Präparat in zwei ungleiche Schichten:

- Oben: β -Fraktion des A-Vitamins (Hauptanteil): zeigt scharf die Zusammensetzung $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$ und das charakteristische Lichtabsorptionsmaximum bei $325\text{--}328 \mu\mu$; $\epsilon_{325\mu\mu} = \text{ca. } 1700$ (1proz. Lösung); sie löst sich in Antimontrichlorid + Chloroform mit tiefblauer Farbe (optischer Schwerpunkt bei $622\mu\mu$).
- unten: α -Fraktion, nur einige Prozente, vielleicht ein Oxydationsprodukt; enthält weniger Kohlenstoff, zeigt ein Maximum gegen $270 \mu\mu$ und gibt mit dem CARR-PRICE-Reagens eine violette Lösung ($580 \mu\mu$).

Durch Adsorptionen an Fullererde haben VAN EEKELLEN, EMMERIE, JULIUS und WOLFF schon früher eine Scheidung des Vitamins in zwei Anteile vorgenommen.

Es sei vermerkt, daß man nach HELBRON, HESLOP, MORTON, WEBSTER, REA und DRUMMOND auch im Wege von Hochvakuumdestillationen zu reinen Vitamin-A-Präparaten gelangen kann, deren Kennzahlen mit Hilfe der TSWETTschen Methodik kaum mehr abgeändert werden.

Zu solchen Versuchen wurde die auf S. 60, Abb. 11 wiedergegebene Vorrichtung angewandt, welche mit einer 75 cm hohen Schicht von Fasertonerde gefüllt war. Vorher haben die Autoren das Adsorbens zwischen $150\text{--}200^\circ$ in reinem Stickstoffstrom getrocknet, den Apparat gleichfalls mit N_2 gründlich durchspült, worauf eine Lösung von 2,5 g Vitamin A in 25 cm^3 leichtem Petroläther langsam eingesickert wurde. Nach dem Entwickeln mit dem gleichen Solvent hat man das Glasrohr in drei Teile zerschnitten, die Fraktionen mit

je 50 cm³ heißem Holzgeist eluiert und dessen Inhaltsstoff, nach dem Verdünnen mit je 200 cm³ Wasser, in Petroläther zurückgeführt.

Chromatographische Gewinnung von A-Präparaten aus dem Leberöl der *Theragra chalcogramma*: HAMANO. Untersuchung über den A-Gehalt geräucherter Fische: WILLSTAEDT und BEHRNTS-JENSEN (2).

Während die KARRERSchen Versuche, wie erwähnt, zur Aufteilung der höchstkonzentrierten A-Präparate in zwei Komponenten geführt haben, ergab sich bei den Versuchen von CASTLE, GILLAM, HEILBRON und THOMPSON ein verwickelteres Bild. Die Lösung von 0,5 g Konzentrat in Benzin (Siedep. 60—80°) wurde in einer hohen Calciumhydroxyd-Säule (51 × 4 cm) chromatographiert und mit einigen Litern des genannten Solvents gewaschen. Als bald erschien eine hellgelb-bräunliche Zone, die schließlich bis zur halben Höhe gesunken war, und dann aus zwei breiteren, schokoladebraunen Bezirken sowie aus einigen dünnen Strichen bestand (Abb. bei CASTLE, GILLAM, HEILBRON und THOMPSON). Insgesamt zeigte das Rohr fünf verschiedenartige Abschnitte:

- Oben: Oxydationsprodukt des Vitamins (kaum gefärbt),
- Hauptschicht: Vitamin A = β -Vitamin A von KARRER, etwas rotes Material (s. oben), wahrscheinlich während der Adsorption gebildet, vielleicht Polymerisate enthaltend,
- eine Schicht, dem KARRERSchen α -Vitamin A entsprechend („Hepaxanthin“, vielleicht ein Zersetzungsprodukt),
- unten: gelbe Nebenzone, unerforscht (389, 369, 348 $\mu\mu$, in Alkohol).

Die Darstellung von hochgereinigten A-Präparaten nach dem Prinzip des „flüssigen Chromatogrammes“ gelang HOLMES, CASIDY, MANLY und HARTZLER. Nachdem Cholesterin und andere Begleiter aus einer Pentanlösung des unverseifbaren Heilbuttleberöl-Anteiles ausgefroren wurden, haben die Autoren die Adsorption zuerst auf Norit A (aktiviert im N₂-Strom), sodann in der Magnesiumoxyd-Säule vorgenommen, welche zur Beschleunigung der Filtration mit 1 Teil Silicaerde „Hyflo Super Cel“ verdünnt war.

In den auf S. 60 erwähnten Apparat (Abb. 12), der ständig mit reinem Stickstoff gefüllt ist, wurde eine dünne Suspension von Norit in Pentan eingeführt und Gasbläschen durch Klopfen daraus entfernt. Maße des Adsorbens 23 × 2,5 cm (40 g); aufgeteilt wurden je 6 g Konzentrat in 50 cm³ Pentan. Die Einzelfiltrate lagen zwischen 50 und 150 cm³. Durch entsprechendes Öffnen und Schließen der

Sperrhähne wurde erreicht, daß die Luft auch während des Wechsels der Vorlage ausgeschlossen blieb; ferner wurden stets mit Stickstoff vorgefüllte Vorlagen angehängt. Das reine Endprodukt war in bezug auf den Blauwert 14000mal kräftiger als das angewandte Leberöl.

Nach einem Patent der PARKE, DAVIS U. CO. (übertragen von HOLMES) gelangt man auf einem ähnlichen Wege zu krystallisierbaren A-Präparaten.

PRITCHARD, WILKINSON, EDISBURY und MORTON haben durch Extraktion von sterinfreien Säugetier-leberkonzentraten mit 83proz. Alkohol das Vitamin A größtenteils entfernt und einen rotbraunen, A-wirksamen Rückstand erhalten, in welchem ein bei 285—290 $\mu\mu$ maximal adsorbierender Stoff enthalten war. Die Aufteilung von 2,5 g auf Al_2O_3 (BROCKMANN) aus Benzin ergab:

Oben: rot (0,726 g),	Jodzahl 211,	Blauwert 2480,
rotgelb (0,489 g),	„ 154,	„ 610,
hellgelb (0,5 g),	„ 136,	„ 2630,
unten: blaßgelb (0,402 g),	„ 129,	„ 3000.

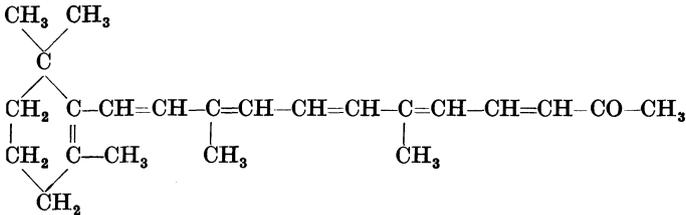
Ein besonderer Vorteil erwuchs hier aus der Anwendung der Chromatographie nicht, und Ähnliches gilt für die Abtrennung des 693- $\mu\mu$ -Chromogens (Vitamin A_2 ?), nach GILLAM, HEILBRON, JONES und LEDEKER.

Keton aus Vitamin A

(BATTY, BURAWOY, HARPER, HEILBRON und JONES).

Eine Lösung von 18,5 g reichem Konzentrat in 500 cm³ trockenem, reinem Benzin und 200 cm³ Aceton (über Permanganat destilliert, mit K_2CO_3 getrocknet) wurde mit 20 g frischem Aluminium-tert. butylat 30 Stunden unter Rückfluß gekocht. Man verdünnt die tiefrote Lösung mit Wasser, filtriert, wäscht die Benzolschicht und trocknet sie über Natriumsulfat. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum verjagt wurde, löst man das zurückbleibende rote Öl in leichtem Benzin, das auf Aluminiumoxyd gegossen wird. Beim Nachspülen wandert eine rötlichbraune Zone langsam nach unten. Man eluiert sie mit methanolhaltigem Benzin, wäscht und trocknet das Eluat. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die noch A-haltige Substanz in einem Gemisch von 200 cm³ abs. Alkohol + 20 cm³ Eisessig gelöst und mit Acethydrazid-pyridiniumchlorid (GIRARD-Reagens P) 1 Stunde am Rückfluß erhitzt. Man gießt die Flüssigkeit in Wasser, stumpft 90% der Säure mit Bicarbonat ab und zieht die Lösung öfters mit Äther aus. Die wäßrige Schicht wird mit einer gesättigten Lösung von 20 g Oxalsäure während $\frac{1}{2}$ Stunde bei 50—60°

gehalten und das so regenerierte Keton ausgeäthert. Orangegelbes, im Hochvakuum destillierbares Öl. Gibt ein krystallisiertes Semicarbazon (Schmelzp. 193°).



Keton aus Vitamin A.

Trennung von Vitamin A und Carotinoiden.

Wie KARRER und SCHÖPP finden, gelingt diese Scheidung sowohl in Anwesenheit von Carotin als auch von Xanthophyll sehr glatt. Das Vitamin A wird nämlich zufolge seines Alkoholcharakters stärker adsorbiert als Carotin, jedoch viel schwächer als Xanthophyll, welche ein längeres Chromophor und 2 OH-Gruppen besitzen.

a) *Trennung von Vitamin A und Carotin.* Man saugt die Petrolätherlösung durch eine Fasertonerde-Säule und spült mit Petroläther nach. Die oberen Bezirke enthalten nur das Vitamin, darunter sieht man die Carotinzone, eventuell noch A-Spuren enthaltend, welche aber bei einer Wiederholung des Versuches sich leicht ausschalten lassen. Elution mit Petroläther + Methanol 9:1.

b) *Trennung von Vitamin A und Xanthophyll* (oder Zeaxanthin usw.). Man schiebt die Lösung (Benzin oder Benzol + + Benzin) durch Calciumcarbonat, wobei das Vitamin vollständig in das Filtrat gelangt. Ein Ansatz genügt.

WALD hat diese Methode mit Erfolg angewandt, und zwar zur Trennung des im Pigmentepithel vom Ochsenfrosch (*Rana catesbiana*) enthaltenen A-Vitamins vom Xanthophyll (s. auch WALD und ZUSSMAN). Ebenfalls auf diesem Wege konnten GILLAM und HELBRON das Vorkommen von Vitamin A im *Eidotter* beweisen. Die Ätherauszüge werden verseift, von Sterinen befreit und zwischen Petroläther sowie 90—92proz. Methanol entmischt, worauf man die hypophysischen Stoffe mit Wasser in Benzin überführt und nach b) aufteilt.

Es sei auch auf einige Angaben von HOLMES, LAVA, DELFS und CASSIDY verwiesen. Allgemeines über das Adsorptionsverhalten des Vitamins A im Vergleich zum Carotin, namentlich auf Blutkohle: BOWDEN und BASTOW.

Im Anschluß an das A-Vitamin wird ferner die folgende Literaturstelle erwähnt: Nach EMMERIE läßt sich, durch energische Behandlung der aus Lebertran erhaltenen Fettsäuren mit kochendem alkoholischem Kali, eine gelbe, amorphe Substanz chromatographisch isolieren (akt. Al_2O_3 , Benzin; Waschen mit Sprit, Elution mit verdünntem alkoholischem KOH), die mit dem CARR-PRICE-Reagens eine violette Farbreaktion gibt. Ausbeute: wenige Milligramme aus 15 g Fettsäuregemisch.

Bestimmung des Provitamin-A-Gehaltes von Pflanzen- und Tierstoffen.

Das pflanzliche oder tierische Ausgangsmaterial wird entsprechend fein verteilt, entwässert und mit Äther erschöpft. Man verseift den Auszug durch Stehenlassen über 30proz. methylalkoholischem Kali während 24 Stunden, gibt viel Wasser zu, zapft die Unterschicht ab, wiederholt, wenn nötig die alkalische Behandlung und wäscht den Äther schließlich alkalifrei. Handelt es sich um ein Fett oder ein fettreiches Organ, so kann dasselbe in der Maschine zerhackt und direkt in methanolische Kalilauge eingelegt werden, worauf man das verseifte Material mit Wasser versetzt und die gebildete Oberschicht gründlich auswäscht.

Der ätherische Extrakt wird (nach dem Trocknen mit Natriumsulfat) verdampft und sein in leichtem Benzin aufgenommener Trockenrückstand dreimal mit je 1 Vol. 85proz. Methylalkohol ausgeschüttelt. Man wäscht die abgehobene Oberschicht mit Wasser methanolfrei und gießt sie (nach dem Trocknen) auf eine Calciumhydroxyd- oder Aluminiumoxyd-Säule. Reichliches Nachspülen mit Benzin:

Oben: Kryptoxanthin,
Lycopin (wird verworfen),
 γ -Carotin,
 β -Carotin,
unten: α -Carotin.

Nach dem Zerschneiden der Kolonne werden die einzelnen Säulenteile zerdrückt und in methanolhaltiges Benzin geworfen. Die Elution erfolgt sehr rasch; man saugt ab, wäscht nach, entfernt den Methanolgehalt mit Wasser und colorimetriert die getrocknete Farbstofflösung nach der bekannten Mikromethode von KUHN und BROCKMANN (3).

Oft ist das Verteilen zwischen Benzin und 85proz. Methylalkohol vor der Chromatographie entbehrlich. In diesem Falle zeigt das Chromatogramm ein verwickelteres Bild. Durch Aufgießen von Benzin hat man es jedoch meist in der Hand, die beiden Farbstoffklassen räumlich so weit zu trennen, daß die als Provitamin unwirksamen

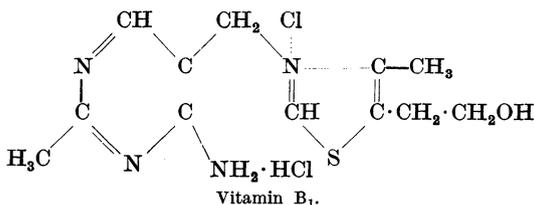
Vertreter mit dem Messer entfernt werden können. Zu beachten ist die Mittelstellung des Kryptoxanthins.

Die Identifizierung der Farbstoffschichten ist von Bedeutung. Hat man ein Rohmaterial in dieser Hinsicht einmal untersucht, z. B. die Farbstoffe auskristallisiert, so wird man bei allen weiteren Ansätzen zuverlässig orientiert sein. Ist dies nicht der Fall, so gibt die spektroskopische Messung gute, aber nicht endgültige Anhaltspunkte. Ein schönes Hilfsmittel bietet die Misch-chromatographie (S. 8).

Die Kontrolle versagt allerdings, wenn das Kryptoxanthin von seinem physiologisch unwirksamen Isomeren Rubixanthin unterschieden werden soll, doch kommt das letztere Polyen sehr selten vor. Das gleiche gilt für Echinon (ZECHEMEISTER 5).

Vitamin B₁.

Die *Anreicherung* des Aneurins aus Reisschalen-, Bierhefe- oder Weizenkorn-auszügen erfolgte bei CERECEDO und HENNESSY, CERECEDO und KASZUBA bzw. CERECEDO und THORNTON im Wege einer Filtration durch eine Kolonne, welche aus künstlichem



Zeolith bestand. So wurde z. B. die Handelsware „Decalso“ (The Permutit Cie., New York) einige Male mit Wasser sowie mit Schwefelsäure bei $p_H = 4,0$ angerührt, in einen Metallturm (150 × 28 cm) gefüllt (Schichthöhe des Adsorbens 46 cm), schließlich durch Passieren von heißem Wasser auf 75° gebracht. Ebenfalls 75° warm war der mit Baryt vorgereinigte Auszug von 30 kg Reisschalen (etwa 300 l, $p_H = 4,5$), welcher mit einer Geschwindigkeit von 1 l/Min. durchlief. Waschen des Adsorbats mit 4 × 38 l heißem Wasser. Auf diesem Wege konnte nahezu der gesamte Aneurin Gehalt in der Kolonne festgehalten werden. Zur Elution diente eine heiße, molare Ammonnitratlösung (76 l, Durchlaufgeschwindigkeit: 1/2 l/Min.) und ein Nachwaschen mit 19 l heißem Wasser. Das erkaltete Filtrat wurde mit Ammoniak auf $p_H = 7,5$ gestellt und das darin enthaltene Vitamin auf dem Wege über das Silbersalz gereinigt. Reinausbeute rund 40 mg Aneurin.

Nachweis und Bestimmung. Nach WILLSTAEDT (11, vgl. auch WILLSTAEDT und BÁRÁNY) wird Vitamin B₁ durch diazotiertes 2,4-Dichloranilin in einen gelbroten, ätherlöslichen Farbstoff übergeführt, der aus diesem Solvens an eine Calciumhydroxyd-Säule abgegeben wird. Die einheitlich aussehende, violettstichig-rosa Zone kann dann mit Alkohol eluiert werden.

Reagens: 0,8 g zerriebenes 2,4-Dichloranilin mit 10 cm³ konz. HCl aufgekocht, dann in heißem Wasser gelöst und auf 500 cm³ aufgefüllt. Man versetzt je 10 cm³ mit je 20 cm³ einer Lösung von 0,5 g NaNO₂ in 500 cm³ Wasser. Zur Überführung in den Farbstoff wird die Lösung, die 40—100 γ Vitamin B₁ in 20—70 cm³ enthalten soll, mit 1—2 cm³ 20proz. Soda und mit 5 cm³ der Diazoniumlösung versetzt. Nach 20 Minuten: Zusatz von 1 cm³ konz. HCl und Durchmischen. Man äthert aus und trocknet mit Natriumsulfat.

Die Farbstoffbildung ermöglicht auch den Nachweis des Vitamins B₁ nach der Pinselmethode: Man adsorbiert das Aneurin aus Wasser auf Aluminiumoxyd und bestreicht die Säule mit der carbonat-alkalischen Diazoniumlösung.

Anlässlich einiger Versuche über den *Nachweis des Vitamins B₁ im Harn* finden WIDENBAUER, HUHNS und BECKER, daß die Überführung in das blaufluoreszierende Thiochrom — im Wege einer alkalischen Oxydation mit Ferricyankalium — von den Urinfarbstoffen vereitelt wird. Filtriert man jedoch den Harn durch eine Tonerdesäule (Merck) bei p_H = 5, spült die Kolonne vor und nach dem Aufgießen bei demselben p_H, so bleiben die Pigmente oben hängen. Die erwähnte Reaktion fiel mit den höchsten Schichten negativ aus, während die tiefer liegenden, die weniger gefärbt sind, sich in steigendem Maße positiv verhalten; die untersten Bezirke reagieren nicht. Prüft man die reaktionshemmende Wirkung der einzelnen Lagen mit Hilfe künstlich bereiteter B₁-Lösungen, so ergibt sich eine sehr starke Hemmung seitens der gefärbten Schichten. Offenbar kann eine quantitative, fluorometrische Bestimmung des Vitamins nach chromatographischer Ausschaltung des Pigments vorgenommen werden, doch ist die ganze Methode für einen allgemeinen klinischen Gebrauch noch ausbaubedürftig.

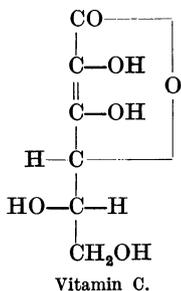
Vitami

wurde als Farbstoff bereits
auch die Strukturformel.

Vitamin C.

Dieses antiskorbutische Vitamin (*l*-Ascorbinsäure) wurde bekanntlich von SZENT-GYÖRGYI entdeckt.

Isolierung des 2,4-dinitrophenylhydrazons der Dehydro-ascorbinsäure aus Harn. DRUMM, SCARBOROUGH und STEWART geben hierzu die folgende Vorschrift. 12 l frischer Harn wurden durch



Zusatz von Oxalsäure auf einen Säuregehalt von 4% eingestellt, unter CO₂ auf 2 l eingedampft und am folgenden Tage filtriert. Durch zweimalige Behandlung des Konzentrates mit je 25 g Norit, in der Kälte, wird das Vitamin zu Dehydro-ascorbinsäure oxydiert. Nun hätte bereits die Darstellung des Hydrazons erfolgen können, zwecks analytischer Untersuchung wurde jedoch die strohgelbe Lösung 48 Stunden in eine H₂S-Atmosphäre gestellt, um die Dehydro-ascorbinsäure zu reduzieren. Nach dem

Verjagen des H₂S mittels CO₂ wurde der Überschuß der Oxalsäure mit einer aus 60 g Ca(OH)₂ bereiteten, dünnen Paste gefällt und, nachdem der Neutralpunkt fast erreicht war, mit festem CaCO₃. Nach einer neuerlichen Behandlung des Filtrats mit H₂S wurde es auf 2,5 n-HCl eingestellt und dann n-Jod bis zur schwachblauen Stärkereaktion einlaufen gelassen.

Hierauf setzte man eine Lösung von 16 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin (in 500 cm³ heißem 2,5 n-HCl gelöst) zu und ließ die Flüssigkeit 4 Tage bei 40° stehen. Abkühlen während 24 Stunden. Die rötlichbraune Fällung wurde filtriert, zweimal mit 2,5 n-HCl ausgekocht, mit warmem Wasser säurefrei gewaschen und im Vakuum getrocknet (4 g). Man zog das Hydrazinderivat mit 2 l kaltem abs. Alkohol + abs. Aceton (1:1) aus und chromatographierte es auf 5 Al₂O₃-Säulen (nach BROCKMANN; 14 × 3 cm), die vorher mit dem Solventgemisch angefeuchtet wurden. Oben erschien ein dünner, ziegelroter, darunter, schlecht differenziert, ein breiter, tiefpurpur gefärbter Bezirk. Entwickeln mit Aceton bis zur Farblosigkeit des Filtrats, gemeinsame Elution der beiden Zonen mit heißem Eisessig. Man konzentrierte das Eluat im Vakuum und ließ es über Nacht stehen. Der purpurrote Niederschlag wurde filtriert und mit Wasser gewaschen (1,4 g). Durch

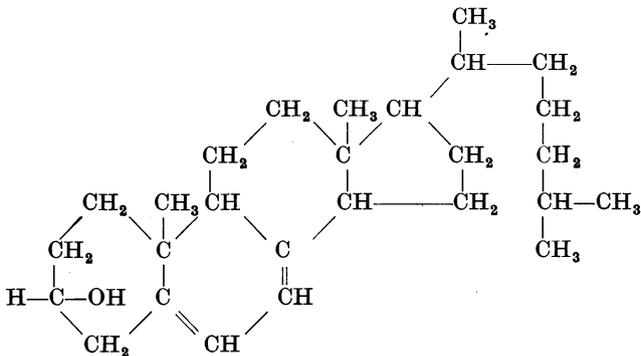
Einengen der Mutterlauge bzw. Eingießen in Wasser ließen sich in mehreren Fraktionen insgesamt weitere 1,62 g gewinnen.

Die vereinigten Aceton + Alkoholauszüge aller Präparate wurden erneut chromatographiert und gaben ungefähr das eben beschriebene Bild. Die beiden Farbstoffe wurden gesondert eluiert und aus dem Eisessig mit 2 Vol. Wasser gefällt (3 Tage stehen lassen). Durch dreimalige Wiederholung der Adsorptionen konnten die beiden Pigmente (ziegelrot und purpur) schließlich sauber voneinander geschieden werden. Der purpurrote Anteil ergab nach dem Umkrystallisieren aus Aceton + Alkohol 20 mg reines Hydrazon; Schmelzp. 279° (Zers.), Zusammensetzung $C_6H_6O_4[N \cdot NH \cdot C_6H_3(NO_2)_2]_2$.

Im Original wird die chromatographische Isolierung eines anderen, noch nicht identifizierten Dinitrophenylhydrazons ebenfalls beschrieben.

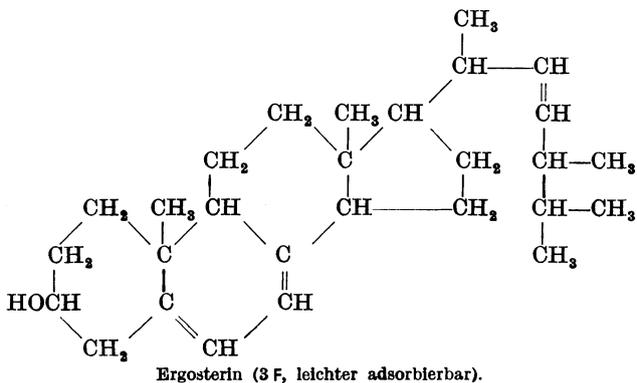
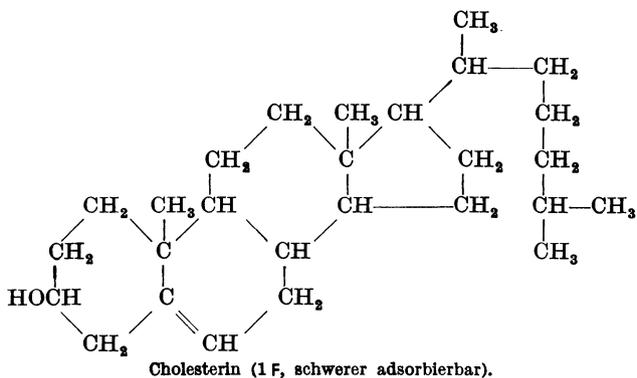
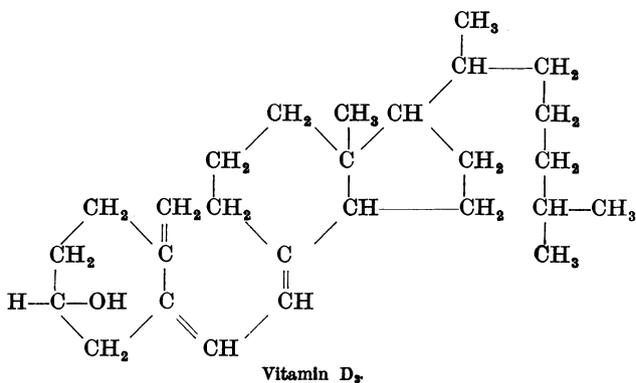
Vitamin D.

Das antirachitisch wirksame *Vitamin D₃* wurde als Bestrahlungsprodukt des 7-Dehydro-cholesterins von WINDAUS, SCHENCK und WERDER isoliert und gleichzeitig von BROCKMANN (3, 4) aus dem Leberöl des Thunfisches und des Heilbutts herausgearbeitet. Im Verlaufe beider, so verschiedenen Arbeitswege verhalf die Chromatographie zum Erfolg (s. auch S. 243 sowie die unvollständig gebliebene Arbeit von NERACHER und REICHSTEIN).



7-Dehydro-cholesterin.

Die Untersuchungen sind von methodischem Standpunkt aus u. a. deshalb interessant, weil zunächst ein Ester bereitet, chromato-



graphiert und kristallisiert wurde, nach dessen Aufteilung das eigentliche, reine Vitamin sich freilegen ließ. Zur Isolierung aus

Thunfischleberöl diente einleitend ein mehrfältiges Entmischungsverfahren; hierauf nahm man die weitgehende, chromatographische Anreicherung des Vitamins vor. Bemerkenswert ist auch die Verwendung eines Farbstoffes zur Markierung der D_3 -Zone. Die Arbeit von BROCKMANN (3) bringt gleichzeitig eine Trennung der im Leberöl enthaltenen Vitamine A und D.

a) Vitamin D_3 aus 7-Dehydro-cholesterin (WINDAUS, SCHENCK und WERDER). Die Benzollösung von 6,3 g 7-Dehydro-cholesterin wurde $3\frac{3}{4}$ Stunden in einer kleinen Quarzwalze mit Mg-Funken bestrahlt. Nach dem Verjagen des Benzols im Vakuum löst man den Rückstand in 60 cm³ Alkohol, versetzt ihn mit einer Lösung von 8 g Digitonin in 120 cm³ siedendem Alkohol, dampft (ohne Rücksicht auf den Niederschlag) zur Trockne und extrahiert den Rest mehrmals mit kochendem Petroläther. Der Auszug wird wieder abgedampft, das Hinterbliebene mit 15 cm³ Petroläther und 2 cm³ Citraconsäure-anhydrid versetzt, dann mit so viel abs. Äther, daß klare Lösung entsteht. Nach 6tägigem Aufbewahren bei 20° gibt man 40 cm³ 10proz. methanolisches Kali zu, läßt 12 Stunden stehen, verdünnt mit Wasser, schüttelt die Flüssigkeit mit Petroläther aus, trocknet und verdampft den Auszug im Vakuum. Es hinterblieb ein hellgelbes Harz, das ebensowenig krystallisierte, wie das aus einer Probe bereitete 3,5-Dinitrobenzoat.

Zur Reinigung wurde das in Benzin + Benzol (4 : 1) gelöste Harz auf Aluminiumoxyd verarbeitet. Elution mit methanolhaltigem Benzol. So wurden drei Anteile gewonnen und jeder mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in Pyridin verestert. Das aus dem mittleren Säulenbezirk stammende Reaktionsgemisch schied allmählich gelbe Nadeln des Vitamin- D_3 -dinitrobenzoates $C_{34}H_{46}O_6N_2$ ab, welche, mehrmals umkrystallisiert, bei 129° schmolzen. Nach dem Verseifen mit methanolischem KOH wurde das Vitamin in Form eines Öles gewonnen. Antirachitische Grenzdosierung an der Ratte: 0,05 γ , Spektrum: wie Vitamin D_2 .

b) Isolierung des Vitamins D_3 aus Thunfisch- und Heilbuttleberöl (BROCKMANN 3,4).

Alle Lösungsmittel sind sorgsam zu reinigen. Die einzelnen Fraktionen des Anreicherungsversuches wurden nach dem Entfernen des Lösungsmittels sofort in Exsiccatoren gebracht, die man viermal auf 1 mm evakuiert und jedesmal mit O-freiem CO_2 durchspült.

„A“ bedeutet Vitamin-A-Gehalt, ausgedrückt in CLO-Einheiten.

„D“ bedeutet Vitamin-D-Gehalt, ausgedrückt in internationalen Einheiten (IE) pro Milligramm Substanz.

Je 100 g *Thunfisch-konzentrat* (Vitamin-D-Gehalt 0,32%; A = 2900 CLO; D = 80 IE pro Milligramm) wurden in 2 l Normalbenzin (Kahlbaum) 16mal mit je 500 cm³ 90proz. Methanol ausgeschüttelt. Die Unterschicht wurde bis zu einem 50proz. Methanolgehalt mit Wasser verdünnt und mit Benzin erschöpft. Im letzteren Auszug: 50,5 g Substanz, A = 580, D = 140. Man verdünnt mit Benzin auf 1,5 l und schüttelt 12mal mit je 500 cm³ 95proz. Methanol. Aus den vereinigten methylalkoholischen Phasen wurde (nach dem Verdünnen zu 50% CH₃OH) ein Benzinauszug bereitet; derselbe enthielt 30 g Substanz, A = 500, D = 280.

Je 20 g des letzteren Präparates löst man in einem Gemisch von 100 cm³ Benzol + 400 cm³ Normalbenzin und filtriert es durch eine Säule von „Aluminiumhydroxyd III“. Nachwaschen mit 1,2 l Lösungsmittel. Im Filtrat: 5,8 g Öl, A = 550, D = 800. Je 10 g dieses Präparates wurden zusammen mit 100 mg *Indicatorrot 33* in 600 cm³ Benzol + Benzin (1 : 4) aufgenommen und durch eine *Aluminiumhydroxyd-III-Säule* filtriert. Beim Nachwaschen mit 3 l Lösungsmittel entstand das folgende Bild:

Oben: hellgelb,
 rosa,
 rot, enthält 2,9 g Öl, D = 2000 IE (und Indicatorrot),
 unten: bräunlichgelb.

Man hat das Öl (2,9 g) in 200 cm³ Benzol + Benzin (1 : 4) gelöst, von auskrystallisiertem Indicatorrot filtriert und die Chromatographie wiederholt. Nachwaschen mit 1,5 l Lösungsmittel:

Oben: hellgelb,
 rot, enthält 0,9 g Öl, D = 5500 IE (und Indicatorrot),
 unten: gelb.

Das vom Solvent befreite Öl (0,9 g) wurde in 50 cm³ Benzin aufgenommen und so lange mit 20proz. methanolischem Kali (80 Vol.-% CH₃OH) durchgeschüttelt, bis die Benzinschicht farbstoff-frei geworden ist. Das durch Abdampfen des Benzins gewonnene Öl löste sich in wenig heißem Methanol, aus welchem beim Erkalten die Hauptmenge des Cholesterins sich abschied. Das Filtrat wurde mit Digitonin aufgekocht, zur Trockne ver-

dampft und der Rückstand mit heißem Benzin erschöpft. Das Benzin hinterließ beim Verjagen eine cholesterinfreie Fraktion, $D = 6700$.

750 mg des letzteren Präparates wurden in 4 cm³ reinstem Pyridin (über BaO getrocknet) gelöst und mit einer Lösung von frisch destilliertem 3,5-Dinitro-benzoylchlorid in 3 cm³ Pyridin versetzt. Nach kurzem Erwärmen am Wasserbad stand das Gemisch 2 Tage bei 20°, unter CO₂, und wurde dann in Natriumbicarbonatlösung gegossen. Man schüttelt die Flüssigkeit mit Benzol durch, wäscht den Auszug mit Bicarbonat, mit verd. Essigsäure, schließlich mit Wasser, verdampft das Benzol, löst seinen Rückstand in 70 cm³ Benzol + Benzin 1 : 4 (eine kleine Menge hinterbleibt), gießt die Flüssigkeit auf eine Aluminiumhydroxyd-III-Säule und wäscht das Adsorbens mit dem gleichen Lösungsmittel nach. 4 Zonen. Das Eluat der untersten Scheibe zeigt nach dem Verdampfen 10000 IE. Dieses Öl wurde in wenig heißem Aceton gelöst und mit Methanol bis zur beginnenden Trübung versetzt. Das zunächst ausgefallene Öl schied büschelig vereinigte, gelbe Nadeln ab. Nach längerem Stehen im Eisschrank wurde die Mutterlauge abgegossen und der ölige Anteil mit leicht siedendem Petroläther von den Krystallen abgelöst. Zweimaliges Umkrystallisieren aus Aceton + Methanol. Schmelzpt. 128—129°, identisch mit dem unter a) beschriebenen Ester. Durch Verseifen (Kochen mit 5proz. methanolischem Kali, 1/2 Stunde, unter N₂) entsteht das ölige *Vitamin D₃*, mit einem D-Wert = 25000 IE (Ratte).

Heilbuttleberöl. Nach dem beschriebenen Verfahren wurde ein Konzentrat von 15 kg Öl verarbeitet (120 I. E.). Der isolierte D₃-3,5-dinitrobenzoesäure-ester war mit dem aus Thunfisch erhaltenen Präparat identisch.

e) Isolierung des Vitamins D₃ aus Bluefin Thune-leberöl (BROCKMANN und BUSSE).

Im allgemeinen wurde die oben beschriebene Methode befolgt, mit der Vereinfachung, daß die zweite Verteilung zwischen Benzin und 95proz. Methanol wegfiel. Eventuell wird an Stelle dieser Operation der Rückstand der Benzinlösung wiederholt mit 99proz. kaltem Methylalkohol ausgezogen: Das Vitamin geht in das Methanol, Kohlenwasserstoffe bleiben im Öl zurück. Der Abdampfrückstand des Methanolextraktes wird zur Adsorption verwendet.

Aus 5 kg Leberöl ($D = 100$ IE) wurde das Unverseifbare (285 g), wie soeben erwähnt, angereichert und die Lösung von 98 g Unverseifbarem in 2 l Normalbenzin 16mal mit je 500 cm³ 90proz. Methanol ausgeschüttelt. Die Benzinschicht enthielt 50,3 g Substanz ($D = 200$ I. E.), von welchem 28,2 g + 0,5 g Indicatorrot 33 aus 350 cm³ Benzol + Benzin (1 : 4) an Aluminiumhydroxyd III adsorbiert wurden. Nach dem Entwickeln mit 800 cm³ Lösungsmittel:

Oben: rotbraun,
rot, enthielt 6,3 g Öl, (D) = 800 IE,
braun,
unten: hellgelb.

20,6 g aus der roten Schicht gewonnenes Material in 750 cm³ Benzol + Benzin (1 : 4) an Aluminiumhydroxyd III adsorbiert und mit 6 l Lösungsmittel nachgewaschen:

Oben: hellgelb,
rot, enthielt 9,65 g Öl, (D) = 1600 IE,
unten: braungelb.

Man wiederholte die Adsorption mit der Mittelschicht (9,65 g Substanz, 0,2 g Indicatorrot, 600 cm³ Benzol + Benzin 1 : 4, Nachwaschen mit 3,5 l):

Oben: gelbrot,
rot, enthielt 3,11 g Öl nach Entfernen des Farbstoffes,
(D) = 4000 IE,
unten: braungelb, enthielt 0,863 g Öl, (D) = 4000 I.E.

Aus den beiden wirksamen Fraktionen wurden die Sterine sowie der Rest des Farbstoffs entfernt, worauf eine Veresterung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid folgte (S. 243). Der rohe Ester wurde in Aceton + Methanol auf Aluminiumhydroxyd III chromatographiert. Aus der untersten Zone ließ sich ein Öl isolieren, das aus Aceton + Methanol kristallisierte. Nach Umscheidungen aus Aceton, Schmelzp. 128—129°.

Isolierung von Provitaminen D.

Die Provitamine *Ergosterin* sowie *7-Dehydro-cholesterin* enthalten nach den S. 239 und 240 abgedruckten Strukturformeln 3 bzw. 2 Doppelbindungen und sind stärker adsorbierbar als Cholesterin (1 F) oder ähnlich gebaute Sterine.

a) Eine mäßige Anreicherung des Ergosterins aus *Handels-cholesterin* gelang bereits WINTERSTEIN und STEIN (1), nämlich

durch Chromatographie von 20 g Rohprodukt (enthaltend 5,6 mg Ergosterin) in 300 cm³ Benzin + Hexan 1 : 1, auf aktiviertem Aluminiumoxyd (15 × 5,5 cm). Nach dem Entwickeln mit demselben Solvent und dem Zerschneiden der Säule in fünf gleiche Teile, wurde der Ergosteringehalt spektrographisch bestimmt:

Oben: I. Zone, enthält 4,1 g Substanz, davon 4 mg Ergosterin,
 II. Zone, enthält 4,55 g Substanz, davon 1,6 mg Ergosterin,
 unten: III.—V. enthalten ca. 10 g Substanz; frei von Ergosterin.

Die Ergosterin-Konzentration hat sich in der I. Schicht 3,5fach, nach einem zweiten Adsorptionsversuch 6fach angereichert.

b) *Künstliche Gemische*. KARRER und NIELSEN zerlegen die Benzollösung eines Gemisches von 50 mg Cholesterin + 100 mg Ergosterin auf Al₂O₃ und waschen die Säule mit 1 l Benzol nach. So ließen sich im Quarzlicht mehrere fluoreszierende Bezirke unterscheiden, welche getrennt und jeweils mit kochendem Äthanol + Benzol (3 : 7) eluiert wurden. Nach dem Abdampfen kristallisierte man die Rückstände aus Weingeist um.

Oben: I. keine Substanz,
 II. wenig, (Schmelzp. 149°),
 III. mehr, („ 145°),
 IV. mehr, („ 139°),
 V. Spuren,
 unten: VI. leer.

Der Stoffinhalt der Schichten III sowie IV wurde nochmals chromatographiert: die erstere Zone lieferte ein Präparat mit dem Schmelzp. 156° (Ergosterin schmilzt bei 157°), die zweite ein solches vom Schmelzp. 143° (Cholesterin: 146°). Das Ergosterin war fast rein, die Cholesterin-Fraktion noch etwas ergosterinhaltig.

c) Nach einem Patent der *Philips Gloeilampenfabriken* geht man bei der Verarbeitung natürlicher Gemische vom Acetat des Gesamtsterins aus, das aus Benzol + Petroläther (1 : 1) auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) chromatographiert wird. Elution mit Benzol + Methanol, Umkrystallisieren aus Methylalkohol. Das so gewonnene Ergosterin-acetat schmolz bei 160 bis 161°, das freie Sterin bei 149,5—150°.

d) *Ergosterin aus dem Sterin des Eigelbs* (WINDAUS und STANGE). Als Ausgangsmaterial dienten 5 kg Cholesterin aus chinesischem

Trockeneigelb, dessen Ultraviolettaborption 0,18% Provitamin verriet. Je 35 g wurden aus 460 cm³ Benzin + Benzol (1 : 1) an Al₂O₃ (65 × 5 cm; Wassergehalt 3%) adsorbiert. Man wäscht mit Benzin + Benzol + Methanol (250 : 250 : 1,2) so lange nach, bis das Cholesterin im Durchlauf wieder erscheint. Zum vollständigen Herauslösen braucht man 14—15 l. In dem ersten 10-l-Filtrat, das in 22 Stunden gesammelt wurde, lagen 25 g Cholesterin vor, in den nächsten 1,516 g mit 0,5% Provitamin und in den folgenden 214 g mit 1,2%. In monatelanger Arbeit wurde von diesem letzteren 1,2proz. Material 250 g bereitet, das, wie oben behandelt, 35 g Cholesterin mit 4,5% Provitamin lieferte. Durch weitere Wiederholungen der beschriebenen Arbeitsweise kam man stufenweise zu dem folgenden Ergebnis: 4,2 g mit 19,4% Provitamin, dann 0,745 g 81,4proz. und schließlich 0,423 g reines *Ergosterin*. Aus Äther + Methanol umgeschieden, Schmelzp. 163°.

e) *Ergosterin aus Baumwollsaatöl* (WINDAUS und BOCK 2). 45 g braungefärbtes Rohsterin wurden wie soeben angegeben, verarbeitet. Das Provitamin ließ sich in einem einzigen Arbeitsgang leicht von den übrigen Sterinen und von sonstigen Begleitern trennen. Die ersten 11 l des Durchlaufes können vernachlässigt werden, der zwölfte Liter enthielt ein 95,5proz. Präparat (0,93 g), die folgenden Fraktionen waren wieder provitaminärmer. Das gereinigte Hauptprodukt war mit *Ergosterin* identisch.

f) *7-Dehydro-cholesterin aus der Schweineschwarte* (WINDAUS und BOCK 1). Es wurden aus 100 kg Schwarte fabriksmäßig 30 g Rohsterine bereitet, mit einem Provitamingehalt von 4%. Die Verarbeitung geschah durch Adsorption an Al₂O₃, aus Benzin +

Liter Filtrat	Steringehalt (g)	Provitamingehalt des Präparates (%)
10	4,3	0
3	10,92	0,1
1	6,60	0,5
0,5	3,23	4,3
0,5	2,42	8,7
0,5	1,73	17,3
0,5	0,73	71,0

+ Benzol (1 : 1). Beim Waschen mit einem Benzin + Benzol + Methanol-Gemisch (250 : 250 : 1,2) wurden nacheinander die nebenstehenden Filtrate gesammelt.

Die letzte Fraktion lieferte in einer kleinen Säule, nach zweimaliger Wiederholung des Verfahrens 0,379 g Substanz mit 91% Provitamin. Über das 3,5-Dinitrobenzoat

gereinigt, gab dieses Präparat reines *7-Dehydro-cholesterin*; Schmelzp. des Acetats 130°.

g) Ein Bestrahlungsprodukt des 7-Dehydro-cholesterins, das *Lumisterin₃*, wurde in Form seines Dinitrobenzoates in Benzol durch Al₂O₃ geschickt. Die Lösung war nun farblos und lieferte reines Dinitrobenzoat. Ähnlich läßt sich auch das Lumisterin₃-acetat reinigen (WINDAUS, DEPPE und WUNDERLICH.).

Vitamin E.

Dieses Antisterilitäts-vitamin kann durch fraktionierte Adsorption im unverseifbaren Rest des Weizenkeimöles, nach DRUMMOND, SINGER und MACWALTER (1, 2), weitgehend angereichert werden. 33 g eines solchen Restes (gelb, ölig), aus welchem die Sterine vorher größtenteils entfernt wurden, hat man in 500 cm³ Petroläther gelöst. Beim Stehen krystallisierte Lutein aus, dessen Filtrat auf Aluminiumoxyd chromatographiert wurde (standardisiert nach BROCKMANN). Reichliches Nachwaschen mit dem genannten Solvent. Zunächst lief Farbloses hindurch, dann wanderte eine gelbe, kryptoxanthinhaltige Zone langsam nach unten; beide waren im Rattentest inaktiv. Nun sah das Säulenbild z. B. folgendermaßen aus:

- Oben: bräunlichgelb, biologisch unwirksam,
sandgelb, kaum wirksam bei einer Tagesdosis von 2—5 mg,
dunkler gefärbt, schwach wirksam,
- unten: blaß, relativ am stärksten aktiv, wirksame Tagesdosis
1 mg.

Durch öfters wiederholte Adsorption der beiden untersten Lagen konnte die Antisterilitäts-tagesgabe auf 0,1 mg herabgedrückt werden (Ratte). Ein noch günstigeres Ergebnis liefert Baumwollsamensöl; allerdings ist das Endpräparat auch dort nicht einheitlich.

Über den Gang des chromatographischen Versuches, welche in Anlehnung an die Vorschrift von DRUMMOND, SINGER und MACWALTER, von KARRER und SALOMON (2) durchgeführt wurde, s. auch unter „Sterine“, S. 211.

Nach neueren Untersuchungen sind *im Weizenkeimöl* (und in manchen anderen ähnlichen Ölen) *mehrere E-aktive Substanzen* enthalten, von denen der stärkste Wirkstoff, *α-Tocopherol* C₂₉H₅₀O₂ genannt wurde. EVANS, EMERSON und EMERSON haben diese

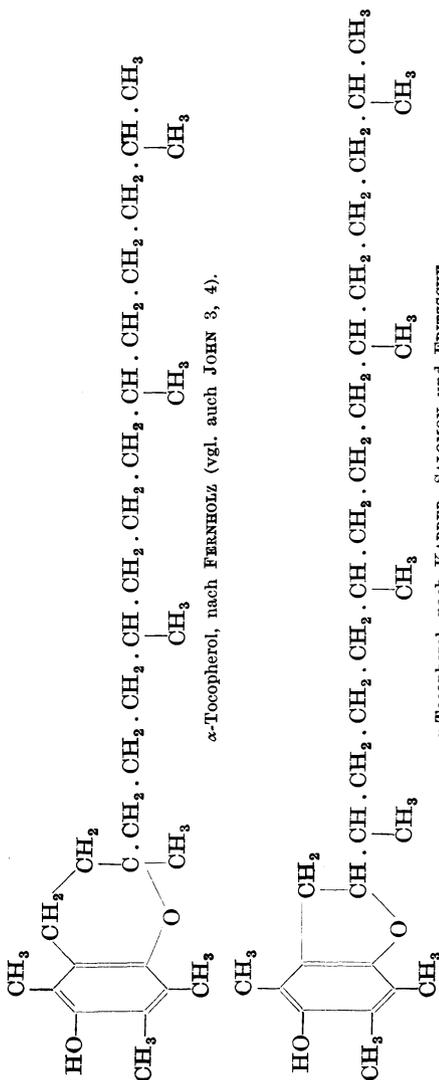
Substanz in Form des Allophanates isoliert. Der Alkohol hebt durch einmalige Gabe von 3 mg die Sterilität der Ratte auf.

Die Einheitlichkeit ihres Allophanat-Präparats (Schmelztp. 156--157°) haben die genannten Verfasser chromatographisch überprüft.

Mit 100 g CaCO₃ (vorher 3 Stunden auf 150° erhitzt) wurde ein 3,5 cm breites Rohr beschickt, die Lösung von 106 mg Substanz in wenig Benzol wurde aufgegossen und die Säule mit 1150 cm³ Benzol gespült. Dabei wurden 26 mg Allophanat aus dem Adsorbens entfernt, welches man in drei Teile zerschneidet. Die am stärksten adsorbierte Fraktion wirkte im Rattenversuch ebenso stark wie der Stoffinhalt des Durchlaufes.

Gleichfalls als Allophanat läßt sich das isomere *β-Tocopherol* C₂₉H₅₀O₂ herausarbeiten, was bereits aus einer früheren Patentschrift der *I. G. Farbenindustrie* hervorgeht.

Nach der Ansicht von JOHN (2) ist das *β-Tocopherol* ein nächstniedrigeres Homologe (C₂₈H₄₈O₂) der *α*-Verbindung,



wahrscheinlich auch mit dem Neo-tocopherol von KARRER,

SALOMON und FRITZSCHE. Erwähnt sei noch das γ -Tocopherol von EMERSON, EMERSON, MOHAMMAD und EVANS (s. auch DRUMMOND und HOOVER). Neue Zusammenfassung: JOHN (4).

Methodische Beispiele aus dem Gebiet der Tocopherole.

a) *Trennung der Allophanate von zwei E-wirksamen Alkoholen (I. G. Farbenindustrie).* „10 g eines Vitamin-E-Präparats, das durch Entfernung der Hauptmenge des Sitosterins aus dem Unverseifbaren von Weizenkeimöl gewonnen wurde, werden in 250 cm³ trockenem Petroläther gelöst. In die Lösung wird unter starker Kühlung die aus 30 g Cyanursäure entwickelte Cyansäure eingeleitet. Nach Stehen über Nacht wird zur Trockne gebracht und mit Äther extrahiert. Der Rückstand der Ätherlösung wird in 100 cm³ Leichtbenzin aufgenommen, wobei etwas Sitosterinallophanat ungelöst bleibt. Nun wird die Lösung durch eine Säule von Aluminiumoxyd von etwa 2 cm Durchmesser und 15 cm Höhe gesaugt und mit 500 cm³ Leichtbenzin nachgewaschen. Man läßt trocken saugen und eluiert mit einem Gemisch von Methylalkohol und Äther 4 : 1. Nach dem Einengen der Lösung krystallisiert zuerst ein schwer lösliches Allophanat vom Schmelzp. 160°, aus der Mutterlauge nach weiterem Konzentrieren ein leichter lösliches isomeres Allophanat vom Schmelzp. 135 bis 138°. Der aus dem Allophanat vom Schmelzp. 160° durch Verseifung erhaltene Alkohol hat die Zusammensetzung C₂₉H₅₀O₂ und enthält in 2—3 mg 1 Ratteneinheit.“

In der obigen Patentschrift wird betont, daß die chromatographische Methode nicht nur auf das Allophanat angewandt werden kann, sondern auch auf andere krystallisierbare Derivate, welche mit Hilfe von Säurechloriden, Säureanhydriden usw. aus Alkoholen in der üblichen Weise bereitet werden können.

b) *Isolierung von α -Tocopherol*, nach KARRER und SALOMON (2). Die aus Weizenkeimöl, nach S. 212 gewonnene „Fraktion B“ enthält fast die Gesamtmenge des α -Tocopherols. Nach dem Abdestillieren des Petroläthers hinterbleibt ein orangefarbiges Öl. 30 g davon wurden in der beschriebenen Weise an Al₂O₃ adsorbiert. Diese Wiederholung bezweckt, E-unwirksame Bestandteile zu entfernen, die bedeutend weniger stark an dem Adsorbens haften. Da bei dieser zweiten Adsorption die Petroläther-waschflüssigkeit sofort gelbfärbt abfließt, darf man hier nicht so lange waschen,

bis sie farblos geworden ist, da sonst allmählich bedeutende Mengen reduzierender Tocopherole durchgespült werden. Meist braucht man 3 l Petroläther für 30 g Öl, um die Hauptmenge der E-inaktiven Substanz durchzutreiben, ohne daß das Filtrat schon größere Reduktionskraft aufweist (gegenüber methanolischem Silbernitrat).

Das Chromatogramm ist in der 70 cm hohen Säule wenig differenziert und zeigt ein nach unten dunkler werdendes, blaßgelbliches Adsorbat, das oben von einer 2—3 cm breiten mißfarbigen Schicht bedeckt wird; die letztere wird verworfen. Da das α -Tocopherol recht gleichmäßig verteilt ist, wird die Säule ansonsten nicht zerschnitten, sondern mit Methanol + Äther (4 : 1) eluiert. Man dampft im Vakuum ein, nimmt den Rest in Petroläther auf, schüttelt einige Male mit Wasser, trocknet mit Natriumsulfat, destilliert den Petroläther unter Feuchtigkeitsabschluß im Vakuum ab, nimmt je 10 g Öl in 250 cm³ trockenem Benzol auf und sättigt diese Lösung mit, aus 15 g Cyanursäure gewonnener Cyansäure. Nach 10—12tägigem Stehen bei 5°, Absaugen auf einer Glasnutsche, Waschen mit warmem Benzol, Eindampfen im Vakuum. Das zurückbleibende Öl wird in heißem Aceton gelöst (60—70 cm³ pro 10 g) und von einer geringen Gallerte noch in der Wärme filtriert. Alsbald beginnt die Krystallabscheidung. Gelbliche Krusten, die man nach 24 Stunden abnutscht. Ausbeute 1,5—1,75 g aus 10 g Öl der Fraktion „B“, Schmelzp. 152—154°. Zweimal aus Essigester umkrystallisiert, schmilzt α -Tocopherol-allophanat bei 159—160°.

Produkte des *thermischen Abbaues* von α -Tocopherol hat FERNHOLZ chromatographiert: 2,1 g Substanz wurden 6 Stunden bei 335° gehalten. Im Retortenhals sammelten sich 0,257 g Durohydrochinon und eine rote Flüssigkeit an. Die letztere wurde mit 100 cm³ Petroläther verdünnt und durch eine 20 cm hohe, aktivierte Aluminiumoxyd-Säule filtriert, welche man mit dem gleichen Solvent gründlich nachwusch. Der nun farblose Durchlauf lieferte beim Abdampfen einen Kohlenwasserstoff C₁₈H₃₆. Ausbeute 1,17 g.

c) *Isolierung von β -Tocopherol* (TODD, BERGEL und WORK). 250 g eines Konzentrats des Weizenkeimöl-Unverseifbaren (wirksame Dosis 125 mg) wurden in 2 l Benzin (Siedep. 100—120°) gelöst, mit 92proz. Methanol gewaschen und nach der Methode von EVANS, EMERSON und EMERSON zwischen leichtem Benzin und abs. Methylalkohol verteilt (10 × 500 cm³ Methanol). Das

aus dem letzteren erhaltene Öl stand, in 750 cm³ Methylalkohol gelöst, während 24 Stunden bei 0°. Man filtriert die ausgeschiedene dunkle, halbkristallinische Masse ab (40 g) und erhält durch Eindampfen des Filtrats 58 g dunkelbraunes Öl, das auf drei Säulen (35 × 4,5 cm) chromatographiert wird (aktiviertes Al₂O₃, Merck, Petroläther, Siedep. 40—60°, Entwicklung mit 5 l; links Dicken in mm). Im Uviollicht:

Oben: 25 orange, Fraktion A, enthält ein Carotinoid,

60 { gelb
sandig, } Fraktion B,

140 { weiß, breit,
orange-gelb } Fraktion C,

unten: blau fluoreszierend + Durchlauf = Fraktion D.

Die Elution erfolgte mit Benzol + Aceton + Methanol (8 : 1 : 1). Für die Gewinnung von β -Tocopherol kamen nur die Anteile B und C in Betracht (14,7 g bzw. 25,5 g Öl).

Frakt. B. Ihre Lösung in 100 cm³ Methanol schied in 24 Stunden 1,4 g Sterin ab. Man nahm den öligen Abdamprest des Filtrats in 250 cm³ 90proz. Spirit auf und entfernte die Tritisterine nach KARRER und SALOMON (1) durch Fällung mit insgesamt 14 g Digonin. Den durch Vakuum-abdampfen der Lösung erhältlichen Rest löst man in Benzol, filtriert vom Digonin ab und dampft ein. Heildosis des erhaltenen Öles (9,5 g): 15 mg.

Seine Lösung in rund 250 cm³ trockenem Benzol wurde bei 0° bis 5° mit Cyansäure gesättigt (15 g Cyanursäure, erhitzt im langsamen CO₂-Strom) und nach dem 48stündigen Stehen bei 5° aufgeköcht, dann filtriert; wiederholtes Nachwaschen des Cyanmelids mit heißem Benzol. Man behandelt den Abdamprest der vereinigten Lösungen mit 100 cm³ kaltem Aceton, filtriert vom Ungelösten, verjagt das Aceton, löst das zurückbleibende Öl in Petroläther (Siedep. 60—80°) und chromatographiert es auf aktiviertem Al₂O₃, Merck. Die dadurch verursachte Schwierigkeit, daß sich ein fester Stoff in der Kolonne abscheidet, wurde so umgangen, daß man die Lösung zunächst mit 30 g Al₂O₃-Pulver schüttelte (Fraktion 1) und erst dann das Filtrat auf die Säule goß (30 × 2 cm):

Oben: 120 blaßbraun, }
30 orange, } davon je 75 mm Fraktion 2 bzw. 3,

unten: 120 farblos, Fraktion 4 (vernachlässigt).

Elution jeweils mit Benzol + Aceton + Methanol (8 : 1 : 1). Die Methanollösung der Fraktion 1 (50 cm³) schied im Eisschrank eine bräunliche feste Substanz ab, die abgesaugt und mit kaltem Aceton gerührt wurde. Man verdampft das Filtrat und löst den Rest in warmem Methylalkohol. Von einer Spur α -Tocopherylallophanat (?) wurde filtriert, worauf 550 mg β -Tocopherylallophanat sich abschieden; gelbliche Krystalle, Schmelzp. 137 bis 142°. Fraktion 2 lieferte auf ähnlichem Wege weitere 130 mg. Die vereinigten, nicht krystallisierten Anteile von 1 und 2 wurden in Benzin (Siedep. 100—120°) gelöst und wie oben chromatographiert. Säulenbild, wie beschrieben. Die untere Hälfte der oben haftenden bräunlichen Zone (120 mm) ergab hier 250 mg β -Allophanat, Schmelzp. 134—137°.

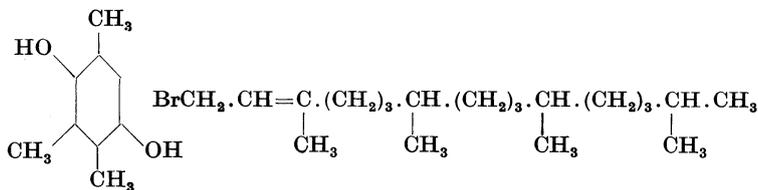
Frakt. C. Die mit Petroläther (Siedep. 40—60°) bereitete Lösung von 26 g Öl zeigte auf Al₂O₃ (40 × 5 cm), nach dem Entwickeln mit 3 l des Solvents, ein 7-schichtiges Ultra-chromatogramm. Aufteilung der Säule: a) 30 mm (gelblich), b) 70 mm, c) 170 mm und d) 70 mm (orange). Das aus der Zone b) gewonnene Öl schied beim Stehen in Methanol Sterine ab; aus deren Filtrat wurden die Tritisterine mit 4 g Digitonin entfernt, worauf man das gewonnene Öl (3,5 g) mit Cyansäure behandelt. Die Chromatographie des so entstandenen Allophanatgemisches lieferte schließlich (aus der obersten Zone) 150 mg β -Tocopherylallophanat, Schmelzp. 137—142°.

Gesamtertrag: Aus 250 g Ausgangsmaterial 1,08 g β -Tocopherylallophanat, daneben 1 g Allophanat, Schmelzp. 250° und 0,7 g Allophanat, Schmelzp. 70°.

d) *Reinigung des β -Tocopherols (Cumo-tocopherols) über das p-Nitrobenzoat* (JOHN 2). 125 mg Allophanat wurden unter N₂ mit 10proz. methanolischem Kali 1/2 Stunde bei Siedehitze verseift, das ölige Tocopherol gut getrocknet, mit 1,5 Mol p-Nitrobenzoylchlorid in abs. Pyridin 24 Stunden stehengelassen, dann 1/2 Stunde am Wasserbad erwärmt. Man löst das gewonnene gelbe Öl in trockenem Benzol. Auf Aluminiumoxyd (Merck) zeigten sich beim Entwickeln 2 Zonen: oben schmal, dunkler gelb (Verunreinigungen), darunter breit, hellgelb. Die letztere, 130 mg Substanz enthaltend, wurde ins Filtrat gewaschen. Man verdampft, löst in Aceton, versetzt mit abs. Alkohol und erhält im Eisschrank ein zitronengelbes Pulver von gefiederter Struktur,

Schmelzp. unscharf, 38—40° (konstant). Liefert ein Allophanat mit den Eigenschaften des Ausgangsmaterials.

e) *Kondensationsprodukt von Trimethyl-hydrochinon und Phitylbromid* (wahrscheinlich racem. α -Tocopherol), nach KARRER, FRITZSCHE, RINGIER und SALOMON. Zum Aufbau des Tocopherolmoleküls wurden 1,7 g Trimethylverbindung mit 10 cm³ trockenem Benzin (Siedep. 80—100°) übergossen, mit 1 g wasserfreiem ZnCl₂ und 4,8 g Phitylbromid versetzt und im N₂-Strom auf 60—70° erwärmt. Die heftige HBr-Entwicklung klingt in 1/2 Stunde ab, worauf man weitere 1 1/2 Stunden erhitzt, Wasser zufügt, die Benzinschicht mit verd. Lauge und Wasser wäscht, trocknet und auf Al₂O₃ chromatographiert. Nach dem Entwickeln sah die Säule bis in die tiefsten Bezirke grau aus, nur unten lag eine kleine, gelbliche Zone. Man eluiert die graue Hauptschicht mit Methanol + + Äther, verdunstet das Eluat und wiederholt die Aufteilung, wobei eine kleine, höherstehende Schicht ausgeschaltet wird. Ergebnis: hellgelbliches Öl C₂₉H₅₀O₂, Ausbeute fast quantitativ, Schmelzp. des Allophanats 172°.



Trimethyl-hydrochinon.

Phitylbromid.

Vitamin K.

DAM und SCHÖNHEYDER haben es versucht, diesen anti-hämorrhagisch wirkenden Faktor aus Alfalfa zu gewinnen bzw. anzureichern. Zur Chromatographie wurden Benzin und Puderzucker verwendet. Nachdem die Farbstoffe beim Waschen mit dem erwähnten Solvent eben durch die Säule gelaufen waren, wurde der Zucker in Wasser gelöst und die Substanz mit leichtem Benzin wiederholt ausgeschüttelt. Zunächst schien auch Calciumcarbonat als Säulenfüllung geeignet zu sein, doch erwiesen sich diese Trennungsversuche als unreproduzierbar. Durch Adsorption aus Benzin an stark bindende Stoffe, wie Al₂O₃ oder MgO wird das Vitamin K zerstört (DAM und LEWIS).

11. Hormone.

Adrenalin.

Anreicherung des Adrenalins (FINK 2). Aus einer salzsauren Lösung ($p_H = 7,2-7,3$), mit 0,15 g Adrenalin in 1 l, wird das Hormon von einer aus Asbest und Kaolin zusammengesetzten Filtermasse quantitativ zurückgehalten, aus welcher man es mit HCl herauslösen kann.

Bestimmung des Adrenalins im Blut (WHITEHORN). 7—10 cm³ frisches Blut werden ohne Verzug in 10 Vol. 3proz. Trichloroessigsäure gegossen. Man läßt 15 Minuten bis einige Stunden stehen, filtriert oder zentrifugiert und saugt das Klare durch eine Säule von reiner Kieselsäure (Acidum silicicum, Rohrmaße 20 × 2 cm), welche vorher mit 5proz. Schwefelsäure $\frac{1}{4}$ Stunde ausgekocht und 10—12mal mit Wasser dekantiert wurde. Die Kolonne wird zunächst mit Wasser gewaschen, dann mit 1—3 cm³ Natriumbisulfit (5 g wasserfreies Salz in 50 cm³ Wasser), bis das Abtropfende neutral oder alkalisch auf Bromthymolblau reagiert. Andererseits wird das Filtrat von der Trichloroessigsäurefällung (entsprechend 5 cm³ Blut) mit n-NaOH auf ungefähre Neutralität eingestellt (Bromthymolblau) und mit 1 cm³ Pufferlösung versetzt (17,4 g Dikalium- und 6,8 g Monokaliumphosphat in 100 cm³ Wasser). Man saugt diese, vorher filtrierte Flüssigkeit durch das Rohr (3 Tropfen/Sek.) und entwickelt dreimal mit je 8 cm³ frisch aufgekochtem und abgekühltem dest. Wasser. Unter den angegebenen Bedingungen wird das Adrenalin (Epinephrin) adsorbiert, während Glutathion und andere nicht basische oder zu schwach basische Stoffe ins Filtrat gelangen. Man eluiert das Adrenalin mit 5 cm³ $\frac{2}{3}$ n-Schwefelsäure und bestimmt seine Menge nach den üblichen Methoden.

Sexualhormone und verwandte Körper.

Isolierung aus Pferdeharn.

a) *Folliculin (Oestron) und Equilenin* (DUSCHINSKY und LEDERER). Folliculin. Den angesäuerten Harn von trächtigen Stuten hat man, wie üblich, mit Benzol extrahiert und den Hormongehalt durch Entmischen zwischen wäßrigem Alkohol und Petroläther vereinigt; der Wirkstoff sucht die Unterschicht auf. 5 g Konzentrat (dunkle, harzartige Masse, entspricht insgesamt

3750000 internationalen Einheiten, IE) wurden in 250 cm³ Benzol gelöst und in einer Ca(OH)₂-Säule zerlegt (Glasrohr 25 × 4,5 cm, unten mit einer Jenaer Glassinterplatte abgeschlossen). Ein Anteil des Pigments bleibt oben hängen (braun), während eine rotviolette Scheibe, die sich langsam senkt, als „Indicator“ dienen kann; der folliculinreiche Bezirk befindet sich nämlich stets unmittelbar darüber und reicht zuweilen in den Farbring hinein. Nach dem Entwickeln mit 175 cm³ Benzol erblickte man die Farbscheibe schon fast ganz unten. Das Chromatogramm sah dann folgendermaßen aus:

Oben: 10 dunkelbraun,	
25 gelb,	
50 weiß,	
55 weiß	} enthalten die Hälfte
60 violettrotlich	
unten: 30 gelb.	} des Gesamthormons,

Die folliculinreiche Zone liefert nach der Elution (Aceton, oder Lösen des Kalkes in HCl und Ausäthern) und der Behandlung mit Äther und Alkohol 140 mg Rohprodukt (6500000 IE), aus dem durch Umkrystallisieren aus Alkohol ein farbloses, reines Folliculinpräparat C₁₈H₂₂O₂ hervorging: Schmelzp. 258°; enthält 10000000 IE.

Equilenin. Das auf Aluminiumoxyd (Al₂O₃ nach BROCKMANN: Fasertonerde = 10:1) bereitete Chromatogramm enthält besser ausgebildete Farbstoffstreifen als bei der Anwendung von Kalk. Oben sieht man eine rotviolette Zone, aus der durch Acetonelution und Umkrystallisieren (Cyclohexanon) *Indirubin* C₁₆H₁₀O₂N₂ isoliert wurde¹: rötlichbraune Nadeln, Schmelzp. 315°. Unter diesem Farbstoff breitet sich der hormonreichste Säulenteil aus. Die obere Hälfte des letzteren ergab nach der Elution ein Rohprodukt, von welchem 45 mg, in 2 cm³ Alkohol gelöst, mit 2,5 cm³ 10proz. alkoholischer Pikrinsäure versetzt wurden. Alsbald

¹ Anhang. *Indirubin* wurde von MUSAJO aus dem Harn von hyperproteinisch ernährten Ratten oder Kaninchen isoliert. 10 l Harn (alkalisch) ließ sich in 1-l-Anteilen monatelang von Toluol extrahieren. Der hochrote Auszug zeigt auf aktivem Al₂O₃ 4 Zonen: gelbbraun, rotviolett, aschgrau und hellgrau (Entwickeln mit Benzol). Man eluiert den rotvioletten Bezirk mit Aceton, nimmt dessen Abdampfrückstand mit Äther auf und erhält feine Nadeln. Ausbeute (aus Cyclohexanon umkrystallisiert): 11 mg, Schmelzp. über 340°.

krystallisierte das *Equilenin-Pikrat*: rote Nadeln, nach dem Umscheiden Schmelzp. 204—206°. Schmelzpunkt des daraus bereiteten freien Equilenins 256—258°; weiße Nadeln.

b) Zur Darstellung des internationalen *Standardpräparates* von *Oestron* wird in einer Patentanmeldung der *Hofmann-La Roche A. G.* die Chromatographie empfohlen, ohne nähere Angaben über den Gang der Adsorptionsanalyse. Als Ausgangsmaterial diente 100 l *Hengstenharn*, der nach der sauren Hydrolyse mehrere Male mit Benzol ausgezogen wird. Man wäscht die mäßig eingeeengten Extrakte mit Soda, dampft ab und unterwirft den Rückstand einer nochmaligen Hydrolyse mit HCl, hierauf der Dampfdestillation. Das zurückbleibende Harz wird in Äther gelöst, die Lösung wiederholt mit NaOH angerührt und das Oestron mit Benzol der Lauge entzogen. Beim Konzentrieren erhält man 1 g 90proz. Oestron. Zur weiteren Reinigung wird chromatographiert, was sofort zu einem reinen Produkt führt. Schmelzp. 259—260°, $[\alpha]_D = +160^\circ$ (in Chloroform).

c) *17-Dihydroequilenin*, β -*Oestradiol* und „*Compound 3*“ nach HIRSCHMANN und WINTERSTEINER. Ein rohes, aus dem Harn trächtiger Stuten gewonnenes β -Oestradiolpräparat, das frei von Dihydroequilenin war, konnte von einem Gehalt an „*Compound 3*“ (6%) nur adsorptionsanalytisch nahezu befreit werden. Die genannten Autoren stützten sich dabei auf die Angaben von DUSCHINSKY und LEDERER. 67 mg Material wurden in 45 cm³ Benzol langsam durch BROCKMANN'Sches Aluminiumoxyd (12,5 × 0,6 cm) filtriert und mit ebensoviel Benzol entwickelt. Ungesättigtere Begleiter, wie „*Compound 3*“, blieben oben hängen, während das β -Oestradiol tiefer vordrang. Zur Lokalisierung der Schichtenfolge diente die Farbreaktion mit p-Nitro-diazobenzol: man zieht ein wenig Adsorbens mit einigen Tropfen Alkohol aus und fügt das Reagens zu. „*Compound 3*“ zeigt eine gelbe Farbe, während β -Oestradiol und Dihydroequilenin erst nach Alkalisierung mit NaOH und Ansäuern mit Essigsäure eine gelbe bzw. rote Färbung entwickeln. Elution des Oestradiols mit 95proz. Spirit, im Soxhlet. Ausbeute 48 mg. Zur Zerlegung von Präparaten, die hauptsächlich aus „*Compound 3*“ C₁₈H₂₂O₂ bestehen, mit einem kleinen Gehalt an Dihydroequilenin, ist eine ähnliche Methode geeignet. (Wiederholte Adsorption an Al₂O₃ aus Benzol + Aceton 30:1, Farbreagens wie oben.)

Umwandlungsprodukte von Sexualhormonen.

a) *Disproportionierung des Dihydroequilins* (SERINI und LOGEMANN¹). Wird 0,5 g Dihydroequilin $C_{18}H_{22}O_2$ in 30 cm³ Methanol 1 Stunde mit dem Nickelkatalysator nach RANEY in H-Atmosphäre geschüttelt, so tritt kein Wasserstoff in das Molekül ein, sondern man erhält das Dehydrierungsprodukt *Dihydroequilenin* $C_{18}H_{20}O_2$ und das Hydrierungsprodukt *Iso-oestradiol* $C_{18}H_{24}O_2$. Zur Trennung wird der Abdampfrückstand der filtrierten Lösung in Benzol und Äther gelöst und auf Al_2O_3 (nach BROCKMANN) gegossen. Man spült die Säule zunächst mit Benzol + Aceton (5:1) durch und erhält beim Verdampfen des Durchlaufes, nach mehrfachem Umkrystallisieren aus verd. Methanol sowie aus Chloroform das *Iso-oestradiol* rein (Schmelzp. 181°). Sodann wird Methylalkohol auf die Adsorptionssäule gegossen und aus dieser Fraktion Dihydroequilenin isoliert: Schmelzpunkt nach dem Umkrystallisieren aus Methanol 245°.

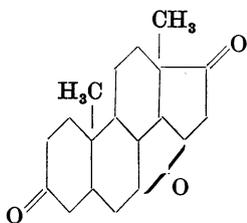
b) *Partielle Hydrierung von Pregnandion zum epi-Pregnanol-(3)-on-(20)* nach BUTENANDT und MÜLLER. 1 g Platinschwarz wurde unter Äther $\frac{1}{2}$ Stunde mit Luft und dann mit Wasserstoff gesättigt. Man gibt 1 g Pregnandion $C_{21}H_{32}O_2$ in Alkohol zu, hydriert bis zur Aufnahme von 1 H₂ und krystallisiert das Reaktionsprodukt aus verd. Methanol um. Aus fünf Ansätzen (4,8 g Dion) wurden als schwerstlöslicher Anteil 510 mg *n*-Pregnanol-(3)-on-(20) abgetrennt, während eine Krystallisation der Mutterlaugensubstanz aus verd. Aceton 300 mg *epi*-Pregnanol-(3)-on-(20) ergab. Die Hauptmenge des Hydrierungsproduktes, etwa 4 g, erwies sich als ein unscharf schmelzendes Gemisch, dessen Trennung durch Krystallisieren oder Sublimieren schwierig ist. Hingegen wurden durch Adsorption an Al_2O_3 aus Aceton + Petroläther (1:5) als leicht adsorbierbare Anteile weitere 1,32 g an dem reinen *epi*-Pregnanolon $C_{21}H_{34}O_2$ erhalten, Schmelzp. 148 bis 149°.

c) *20,21-Mono-aceton- Δ^4 -pregnen-diol-(20,21)-on-(3)* $C_{24}H_{36}O_3$ aus dem *Mono-aceton-pregnen-triol* (STEIGER und REICHSTEIN²). Das durch Einwirkung von Aluminium-tert.-butylat auf 0,375 g Triol erhaltene, im Hochvakuum vorfraktionierte Öl (0,39 g) wurde in 5 cm³ Pentan durch eine mit Pentan bereitete Säule

von 5 g Al_2O_3 filtriert. Nachwaschen zweimal mit je der doppelten Säulenlänge. Filtrat verworfen. Nachspülen mit Benzol + Pentan (1:4); dieser Durchlauf war ebenfalls arm an Substanz. Hierauf wäscht man die Säule so lange mit abs. Benzol + Pentan (1:1), bis das Filtrat fast keinen Abdampfrückstand mehr hinterläßt. Die Trockensubstanz der letzteren Fraktion krystallisierte beim Stehen mit wenig Pentan. Man krystallisiert das Präparat aus Pentan um und gewinnt so die α -Form des Oxydationsproduktes. Die tiefer schmelzenden und die klebrigen Anteile werden auf 4 g Al_2O_3 chromatographiert; allmählich ging das gesamte Material mit Benzol + Pentan (1:1) ins Filtrat. Gesamtausbeute 245 mg, Schmelzp. 124—125°. — Die Mutterlaugen der α -Form aus zwei Versuchen wurden nochmals der Einwirkung des Aluminium-tert.-butylates unterworfen und lieferten nach einem analogen chromatographischen Arbeitsgang die reine β -Form, Schmelzp. 132°.

$\Delta^{5,6}$ -Pregnen-tetrol-(3, 17, 20, 21)-triacetat-(3, 20, 21) wurde von SERINI und LOGEMANN (2) zur Reinigung aus Benzol an Aluminiumoxyd adsorbiert. Eluiert man anteilsweise mit Benzol + Aceton 20:1, so enthalten die ersten Fraktionen die Hauptmenge, die sich beim Abdampfen und Stehen krystallinisch abscheidet. Aus Benzol + Petroläther umkrystallisiert, Schmelzp. 166—167°.

d) Das durch Hydrierung von 40 mg nicht ganz reinem *Andrenosteron* von STEIGER und REICHSTEIN (1) erhaltene Rohprodukt schmolz zwischen 170° und 182°. Eine saubere Trennung von Begleitstoffen konnte, wie folgt, erzielt werden. Das Material wurde in wenig abs. Benzol gelöst, mit Pentan verdünnt und auf eine mit Pentan hergestellte Al_2O_3 -Säule (nach BROCKMANN, $1,6 \times 0,8$ cm) gegossen. Das Filtrat enthielt 8 mg sirupöse Substanz. Durch Waschen mit abs. Äther wurde die Hauptmenge vom Adsorbens abgelöst. Nach dem Einengen und Zusatz von Pentan: 15 mg Triketon



Hydrierungsprodukt des
Andrenosterons.

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3$, Blättchen, Schmelzp. 178 bis 180° (korr.).

e) *Darstellung des 17-Vinyl-testosterons* (RUZICKA, HOFMANN und MEHLDAHL). 200 mg Δ^5 -17-Vinyl-3-trans,17-dioxy-androsten

wurden in 10 cm³ trockenem Aceton mit 400 mg tert.-Al-butylat in 10 cm³ trockenem Benzol 20 Stunden unter Rückfluß gekocht. Man entfernt das Aceton im Vakuum möglichst vollständig, versetzt den Rest mit Äther und wäscht mehrmals mit verd. Schwefelsäure und mit Wasser. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat und Vakuum-Abdampfen resultierte ein von Krystallen durchsetztes farbloses Öl (250 mg), das in 20 cm³ Benzol gelöst und auf eine aus 5 g Al₂O₃ (BROCKMANN) mit Benzol hergestellte Säule gegossen wurde. Waschen mit 2 × 10 cm³ Benzol. Die Filtrate enthielten nur eine Spur Öl. Das mit Benzol + Äther (2,5:1) bereitete Eluat hinterließ beim Verdampfen 130 mg Öl, das nach Zusatz von etwas Äther durchkrystallisierte. Beim weiteren Waschen der Säule mit Äther wurden noch 60 mg Krystalle gewonnen. Umscheidung des 17-Vinyltestosterons C₂₁H₃₀O₂ aus Äther + Pentan. Nadeln, Schmelzpt. 140—141°.

Ähnlich verläuft die Reinigung des 17-Äthyl-testosterons C₂₁H₃₂O₂.

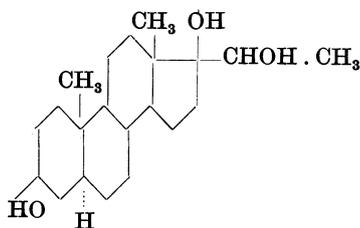
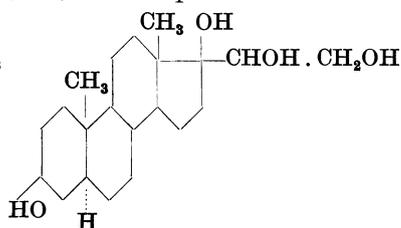
Fraktionierung einiger Bestandteile der Nebennierenrinde (STEIGER und REICHSTEIN 3). Im Verlaufe der ausgedehnten Arbeiten der REICHSTEINSCHEN Schule über Wirkstoffe und andere Bestandteile der Nebennierenrinde wurde u. a. ein Rohkrystallinat erhalten, in welchem ein Gemisch mehrwertiger Alkohole der *Allo-pregnan-Reihe* vorlag. Da die fraktionierte Krystallisation hier nicht zum Ziel führt, wurde das acetylierte Gemisch einer mehrfachen Adsorptionsanalyse unterzogen, mit dem Ergebnis der Isolierung von vier einheitlichen Substanzen. Wir vermögen den gesamten Arbeitsgang von STEIGER und REICHSTEIN (3) hier nicht wiederzugeben, sondern nur einen kleineren Teil davon, der für die Technik des flüssigen Chromatogrammes ein schönes Beispiel enthält.

Krystallfraktion „B“. 350 mg wurden mit 6 cm³ Pyridin und 5 cm³ Acetanhydrid 30 Stunden stehen gelassen, im Vakuum eingedampft, in Äther gelöst, mit verd. HCl, Soda und Wasser gewaschen, getrocknet, verdampft und im Molekularkolben sublimiert (0,001 mm, Bad 155°). Man löst das Sublimat in etwas Benzol, verdünnt mit 10 Teilen Pentan und erzeugt auf einer mit Pentan und 12 g Al₂O₃ bereiteten Säule ein flüssiges Chromatogramm (Tabelle 20, S. 260).

Tabelle 20. Trennung von Allo-pregnan-triol-(3, 17, 20) und Allo-pregnan-tetrol-(3, 17, 20, 21) im flüssigen Chromatogramm (STEIGER und REICHSTEIN 3).

Fraktion	Entwickelt mit	Eigenschaften des Abdampfrückstandes, nach Zusatz von Äther + Pentan
1	40 cm ³ Pentan	Spuren Öl
2	20 „ Benzol-Pentan 1:4	Spuren Krystalle
3	20 „ „ „ 1:4	Spuren Krystalle
4	20 „ „ „ 1:1	Krystalle, Schmelzp. 160°
5	20 „ „ „ 1:1	„ „ 161°
6	20 „ „ „ 1:1	„ „ 161°
7	20 „ „ „ 1:1	„ „ 161°
8	20 „ „ „ 1:1	„ „ 161°
9	20 „ Benzol (abs.)	„ „ 161°
10	40 „ „	„ „ 161°
11	60 „ „	„ (Spuren), „ 161°
12	40 „ Äther (abs.)	„ „ 175°
13	40 „ „	„ „ 174°
14	60 „ „	„ (Spuren), „ 172°
15	40 „ Aceton	„ Schmelzp. 154—175°
16	40 „ „	(Spuren)
17	20 „ „	frei von Substanz

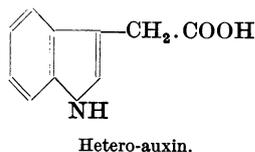
Die Fraktionen 2—11 gaben beim Umkrystallisieren aus Äther + Pentan 205 mg reines Diacetat des Körpers „J“, Schmelzp. 161—162° (korr.), die Fraktionen 12—14 sofort 57 mg reines Triacetat der Substanz „K“, Schmelzp. 177°.

Allo-pregnan-triol-(3, 17, 20)
(Substanz „J“).Allo-pregnan-tetrol-(3, 17, 20, 21)
(Substanz „K“)

Auxine.

Reinigung von Hetero-auxin von einem Begleiter (KÖGL, HAAGEN-SMIT und ERXLEBEN). Der von den genannten Forschern im Harn entdeckte Pflanzenwuchsstoff Hetero-auxin erwies sich

in allen Punkten als identisch mit der synthetischen β -Indolyl-essigsäure $C_{10}H_9O_2N$, er zeigte jedoch ein Drehungsvermögen. Die Identität der beiden Substanzen vorausgesetzt, mußte dem Naturprodukt eine linksdrehende Verunreinigung beigemischt sein. Tatsächlich gelang es, diesen Begleiter im Adsorptionsversuch zu entfernen. Wegleitend waren dabei die Farbreaktion mit Eisenchlorid-Salzsäure sowie die polarimetrische Messung.



Eine Lösung von 50 mg Hetero-auxin (aus Harn) in 50 cm³ Benzol wurde durch eine Calciumcarbonat-Säule (40 × 4,5 cm) gesaugt. Man entwickelt nacheinander: mit 50 cm³ Benzol, mit 30 cm³ Benzol + Alkohol (10 : 1) und schließlich mit 30 cm³ Benzol + Alkohol (2 : 1). Die erwähnte Farbreaktion verlief im Filtrat negativ. Die gut trocken gesaugte Säule wurde empirisch in sechs Bezirke zerschnitten und jeder dreimal mit kaltem Alkohol extrahiert. Man verdampft die Äthanolzüge einzeln zur Trockne:

- Oben: a) 2,9 mg, Farbreaktion negativ,
 b) 9 „ schwache Farbreaktion, keine Drehung,
 c) 18 „ starke Farbreaktion, keine Drehung,
 d) 14 „ deutliche Farbreaktion, keine Drehung,
 e) 3 „ schwache Farbreaktion,
 unten: f) kein nennenswerter Trockenrückstand.

Der Adsorptionsansatz wurde wiederholt, die aus den beiden Versuchen stammenden Abdampfrückstände der Schichten b) bis e) vereinigt und gemeinsam aus Wasser umkrystallisiert. Gesamtausbeute 89 mg, Schmelzp. 165°: reines, optisch *inaktives* Hetero-auxin. Die beiden Fraktionen a) wurden ebenfalls vereinigt: 6,1 mg Substanz, linksdrehend, $[\alpha]_D^{20} = -34,3^{\circ}$ (in Alkohol); Schmelzp. 167°, mit dem reinen Produkt jedoch keine Depression. Im WENTschen Pflanzentest war dieser Begleitstoff unwirksam.

12. Enzyme, Co-enzyme, biochemische Aktivatoren.

Zur Frühgeschichte der Enzymadsorption s. bei WILLSTÄTTER (2).

Die chromatographische Methode ist auch auf diesem Gebiete noch weitaus ungenügend verwertet worden. Daß aber die Ansichten nicht schlecht sind, geht aus den Enzymforschungen von WILLSTÄTTER hervor, in welchen Adsorptionen und Elutionen bekanntlich die entscheidende Rolle gespielt haben. Es handelt

sich also nur darum, die besonderen Vorteile auszunützen, welche von der TSWETTSCHE Arbeitstechnik geboten werden. Tastversuche der Literatur deuten hier auf einen baldigen Fortschritt.

ADLER und MICHAELIS ist zwar die Trennung von Dehydrase und Flavinenzym auf Aluminiumoxyd nicht gelungen, da die beiden Komponenten sich diffus über die Säule verteilten, immerhin fand im unteren Bezirk des Adsorbens eine Verarmung an Flavin und Anreicherung der Dehydrase statt.

Trennung von Co-Zymase und Co-Dehydrase II, nach EULER und ADLER.

Die genannten Forscher fanden in der Hefe zwei Co-Dehydrasen vor, nämlich:

Co-Zymase: notwendige Komponente des Systems der Alkoholdehydrase aus Hefe, aber im System der ROBISON-Ester-Dehydrierung unwirksam;

Co-Dehydrase II: umgekehrtes Verhalten.

In wäßriger Lösung, auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) chromatographiert, läßt sich die Co-Dehydrase II im obersten Teil der Säule festhalten, während die Co-Zymase beim Entwickeln in das Filtrat gelangt. Zur Untersuchung der einzelnen Säulenteile mußte hier empirisch verfahren werden: man prüfte die Teileluate in den Systemen der ROBISON-Ester-Dehydrierung sowie der Alkoholdehydrierung und der alkoholischen Gärung. Die Ultra-chromatographie versagt, da gewisse Begleiter fluoreszieren.

100 mg eines mittelguten Präparates (erhalten aus der Cuprofällungs-Mutterlauge einer Co-Zymasedarstellung) wurden in 10 cm³ Wasser gelöst, filtriert und in der Al₂O₃-Säule (8 × 0,7 cm; durch Aufschütten einer wäßrigen Suspension bereitet) zerteilt. Unter schwachem Saugen wurde zuerst mit 15 cm³ Wasser nachgewaschen und das erste Filtrat gesondert aufgefangen (21 cm³), worauf man weitere 100 cm³ Wasser nachgoß („Waschwasser“ 94 cm³). Versuchsdauer 2 Stunden. Der obere (fluoreszierende) Säulenteil wurde in kleinere, der übrige in größere Stücke zerschnitten, die im Vakuum getrocknet und gewogen wurden. Man prüft die Adsorbate nach der Gärungsmethode auf ihren Co-Zymasegehalt und ferner wird ihre Wirksamkeit in den Systemen der Alkohol-sowie der ROBISON-Ester-Dehydrase untersucht (THUNBERG-Versuch). Ergebnis: von den 2260 Co-Zymase-Einheiten

befanden sich 1890 im Waschwasser, während von den 452 Co-Dehydrase-II-Einheiten die drei obersten Bezirke des Adsorbens 294, 140 bzw. 18 enthielten; die übrigen Zonen sowie Filtrat und Waschwasser waren davon frei. Es hat also eine gute Trennung stattgefunden.

Die *Co-Dehydrase II* ließ sich auch in der Rinderleber nachweisen (DAS). 10 cm³ einer Lösung von HARRISONSCHEM Co-fermentpräparat (entsprechend 50 g Aceton-Trockenleber) wurden auf BROCKMANNSCHEM Aluminiumoxyd (5 × 0,7 cm) gegossen und mit 50 cm³ Wasser nachgespült. Zerschneiden in fünf gleiche Teile. Die drei obersten Fünfteln enthielten die Co-Dehydrase II, sie waren aber frei von der Co-Zymase. Prüfung wie oben.

Reindarstellung der Co-Zymase aus Hefe (EULER und SCHLENK 2). Nachdem schon ein hoher Reinheitsgrad des Präparates erreicht worden ist, kann die Isolierung chromatographisch beendet werden; es zeigte sich nämlich, daß die Co-Zymase auch in präparativem Maßstab aus der Aluminiumoxyd-Säule eluierbar ist. Man kann die Säulenordnung nicht durch Schütteln mit dem Adsorbens ersetzen, denn bei jeder Elution wird nur ein Teil der Co-Zymase frei, wobei man auch immer Verunreinigungen miteluiert. Die Vornahme der Elution bei einer anderen Acidität kommt hier nicht in Frage.

Die umständliche Reinigung, welche dem chromatographischen Versuch vorangehen muß, kann hier nicht ausführlich beschrieben werden. 1 g Co-Zymase (ACo = 400000) wird in 25 cm³ Wasser gelöst, von einem Rückstand, wenn nötig, in der Zentrifuge getrennt und die Lösung unter Kühlen und Rühren mit gesättigtem Baryt bis pH = 6,5 versetzt. Den flockigen Niederschlag zentrifugiert man nach 10 Minuten ab, wäscht ihn mit 5 cm³ 10proz. Bariumacetat und entfernt das Bariumion aus Waschflüssigkeit und Mutterlauge durch Eintropfen von eiskalter 0,5n-Schwefelsäure (alles unter Kühlung). Das Bariumsulfat wird mit 5 cm³ Wasser gewaschen und dieses mit der Hauptlösung vereinigt.

Vorbereitung der Säule. Ein Glasrohr von 7—8 mm lichter Weite wird unten so aufgebogen, daß man ein darüber gestülptes, weiches Stück Kupferdrahtnetz mit Draht befestigen könne. Ein durchfeuchteter Wattebausch wird hinuntergeschoben und am Drahtnetz festgestampft. Das Rohr ragt in eine Saugflasche. Man füllt das Rohr mit Wasser und gießt frisch bereiteten Al₂O₃-Schlamm (BROCKMANN) nach, sobald das Niveau der ersten Wasser-

füllung die Watte fast erreicht hat. Ist die Adsorptionsschicht 9—10 cm hoch, so bricht man die Zugabe ab. So wird Luftbläschenbildung vermieden und eine gleichmäßige Packung erzielt. Bisher saugte man noch nicht. Ist fast alles Wasser durchgelaufen, so entleert man schnell die Vorlage und füllt die Co-Zymaselösung nach. Sinkt die Ablaufgeschwindigkeit, so wird mit schwachem Saugen begonnen. Je 10 cm³ Filtratanteile werden im Eisschrank gesondert aufbewahrt und der Gärungsprobe unterworfen. Die ersten 20 cm³ enthalten meist keine Co-Zymase, dann steigt der Gehalt plötzlich und die Hauptmenge kommt. Inzwischen hat man begonnen, mit Wasser nachzuwaschen (das Adsorbens darf auch vorübergehend nicht trocken liegen). Hat man die Säule mit etwa 100 cm³ Wasser durchgespült, so enthalten die Fraktionen so wenig Co-Zymase, daß man die Flüssigkeiten — nach erfolgter Gärprobe — verwerfen kann. Die Durchgangszeit der eigentlichen Lösung soll $\frac{1}{2}$ Stunde nicht überschreiten, das Waschen dauert 1 Stunde. Dabei wird das Saugen allmählich mäßig verstärkt. Da jede Gärungsprobe 2—3 Stunden beansprucht, ist es für alle Fälle ratsam, mit einem Überschuß von Wasser nachzuwaschen. Die Fraktionen mit mehr als 100 Co/cm³ werden vereinigt, ihr Volumen beträgt 80—100 cm³. Eine leichte Trübung wird abzentrifugiert und die Lösung mit 10 Vol. eiskaltem Alkohol langsam gefällt (Einzelheiten der letzteren Operation s. im Original). Ausbeute 300—400 mg, ACo = 600000—630000.

Die durch Adsorption gereinigten Präparate enthalten Aluminium, das mit 0,5n-Ammoniak bis zu $p_H = 7$ als Hydroxyd gefällt werden kann.

Chromatographische Trennung von einigen Enzymen des Emulsins. Nach unveröffentlichten Versuchen von ZECHMEISTER, TÓTH und BÁLINT verhalten sich wässrige Lösungen von Emulsiq Merck auf der Bauxitsäule folgendermassen. Unter bestimmten Bedingungen (Acetatpuffer, $p_H \approx 4,7$) wird die β -Glucosidase leicht und vollständig adsorbiert und kann mit 0,1proz. Ammoniak eluiert werden. Hingegen gelangen die α -Galaktosidase und die Chitinase (Substrate: Raffinose bzw. Chitodextrin) in das Filtrat. Durch diese Behandlung wurde der Bestand an Begleitstoffen der Lösung so verändert, daß bei einem zweiten, analog durchgeführten Adsorptionsversuch nun auch die α -Galaktosidase festgehalten und von der Chitinase

getrennt wird. Elution wie oben. Über das chromatographische Verhalten anderer Enzymgemische sind in unserem Institut Arbeiten in Gang.

Inhibitor der Blutkoagulation (CHARGAFF 3). Ein Gemisch von 3,5 l Schafblut und einer Lösung von 9,4 g Natriumoxalat in 1,2 l isotonischer Salzlösung wurde 30 Minuten zentrifugiert, worauf man die sedimentierten Blutzellen mehrere Male in der Kälte mit der letzteren Salzlösung (0,1% Oxalat enthaltend), schließlich mit der reinen Salzlösung wusch. Hierauf folgten Extraktionen mit Aceton, mit Äther und dann mit Methanol + + Chloroform (3:1) (Glaseextraktor, Sinterplatte). Man zieht die Blutzellen zweimal mit insgesamt 1 l siedendem abs. Alkohol aus und erhält 0,46 g eines braunen Pulvers. Die nachfolgende Behandlung mit warmem Eisessig läßt etwas ungelöst, und aus der Lösung kann ein aktives Material erhalten werden (rund 0,2 g), das in Chloroform + Essigester (1:3) löslich ist. Filtriert man die verdünnte Methanol + Ligroin-Lösung (9:1) langsam durch eine Aluminiumoxyd-Säule (nach BROCKMANN), so bleiben farbige Begleiter hängen. Der Inhibitor selbst wird nicht adsorbiert.

Sechstes Kapitel.

Anwendungen in der Warenkunde.

1. Technische Gerbstoffextrakte.

Die Chromatographie solcher Lösungen wird von GRASSMANN sowie von GRASSMANN und LANG ausgeführt und bezweckt zunächst die Charakterisierung und praktische Unterscheidung der verwickelt zusammengesetzten Inhaltsstoffe. Man kann auch durch Untersuchung des auswaschbaren Bestandteiles von Ledern auf die Art des verwendeten Gerbmaterials Rückschlüsse ziehen. In allen diesen Fällen kommt man mit Hilfe der Fluoreszenz-chromatographie am besten vorwärts.

Rein wäßrige Lösungen sind weniger günstig. Man versetzt z. B. 3 cm³ konzentrierten wäßrigen Rohauszug (Trockensubstanz 20—30%) mit zwei Raumteilen Methylalkohol und saugt oder zentrifugiert, wenn nötig, die Fällung ab. Im bereits abgebildeten

Apparat (S. 83) wird dann die Verteilung auf Aluminiumoxyd (auch Tonsil) oder MgO vorgenommen, indem man die fest eingestampfte Kolonne zunächst mit 2 cm³ Methanol befeuchtet und ohne zu saugen ebensoviel Gerbextrakt nachgießt. Als Waschflüssigkeit dient z. B. 3—4 cm³ Essigester oder Methanol + Essigester 1 : 3. Prüfung im Uviollicht.

Fichtenrinden-auszug, auf Al₂O₃. Nach einem dunkleren Säulenteil (braungrau) folgt eine hell gelbgrüne Zone, sodann eine schmale, stark leuchtende gelbe Schicht, der sich unmittelbar ein ziemlich hoher, leuchtend blauer Bezirk anschließt. Saure Reaktion erhöht die Leuchtkraft des ganzen Chromatogramms, das Umgekehrte tritt im Falle einer Alkalisierung ein. Bei p_H = 2,2 erscheint oben eine schwach apfelgrüne, bei 7,7 eine schwach blaue Färbung.

Eichenholz-auszug (Al₂O₃) zeigt eine ziemlich hohe, dunkelbraune, nicht fluoreszierende Schicht, dann ein helles, grünstichiges Blau. Meist sind die beiden durch einen schmalen gelbgrünen Ring getrennt.

Quebrachoholz-auszug (neutral oder schwach sauer). Auf Al₂O₃ oben eine starke Zone mit zitronen- bis ockergelber Fluoreszenz; ganz unten: grün oder schwach stahlblau. Die beiden sind durch ein schwarzes oder schmutzigbraunes, hohes Zwischenstück getrennt. Bei stärker saurer Reaktion wird die erste Zone leuchtend hellgrün, die nächste (dunklere) sienabraun oder grünlichbraun. Meist folgt noch eine grünlich- oder graublauere Nebenschicht.

Unterscheidung von Kastanien- und Eichenholz-auszug. Man versetzt den Extrakt (Trockensubstanz 20—30%) mit Bromwasser bis zum bleibenden Br-Geruch, erwärmt die Flüssigkeit am Wasserbad, bis zum Verschwinden desselben, verdünnt mit 2 Raumteilen Methanol und filtriert. Die Chromatogramme wurden zwar abgeschwächt, doch sieht man bei der Eiche eine blaugrüne, bei der Kastanie eine rein blaue Fluoreszenz.

Tannin (zur Analyse, Kahlbaum) zeigt in Methanol auf MgO oder Al₂O₃ indigoblaue, einheitliche Fluoreszenz.

Katechin aus Gambir, mehrmals umkrystallisiert, gibt auf Al₂O₃ eine grüne, auf MgO eine schwach stahlblaue Fluoreszenz.

Tanigan O (synthetisches Gerbmittel), auf Al₂O₃: schwarz, schwefelgelb, dunkelbraun, rotbraun, schwefelgelb, hell gelbgrün, hell violett.

Weitere Angaben s. im Original.

2. Technische Öle und Fette. Butter.

Zur Charakterisierung von *Handelsölen* sowie zum Nachweis von künstlich zugesetztem Farbstoff ist die Adsorptionsmethode sehr geeignet. Nach BOEKENOOGEN (1, 2 und Privatmitt.) lassen sich manche Pflanzenöle sogar ohne Verdünnung auf die Alumi-

niumoxyd-Säule (Merck) gießen und mit leichtem Benzin (oder Schwefelkohlenstoff) nachwaschen. In einzelnen Fällen, z. B. bei Leinöl, welches ein verwickelteres Chromatogramm liefert, mischt man eventuell den unteren Teil des Oxyds mit Frankonit H und kann so alle Pigmentanteile festhalten. Im allgemeinen liefern Naturöle verwickeltere Säulenbilder, während Öle, die durch die technische Adsorptionsbleiche gegangen sind und den größten Anteil des Pigments bereits verloren haben, ein einfacheres Chromatogramm zeigen. Chlorophyll, oder ein Derivat, ist auf Grund des Spektrums als ein Bestandteil mehrerer Handelsöle anzusprechen, z. B. von Baumwollsamensamen-, Palm-, Sonnenblumen- und Teesamenöl. Verhältnismäßig größer ist der Gehalt an Grün im Leinöl, Leindotteröl, Olivenöl, Rüböl, Senföl und Sojaöl. Man findet oft auch Farbstoffe, die noch nicht identifiziert sind (vgl. Tabelle 21).

Tabelle 21. Verhalten einiger Handelsöle auf Aluminiumoxyd, mit Benzin oder Schwefelkohlenstoff entwickelt, nach BOEKENOOGEN (1).

Rohöl	Chromatogramm	Filtrat
Erdnußöl	gelbe Zone, wandert langsam nach unten	farblos
Sesamöl	oben violettrot, darunter braungelb	blaßgelb
Palmöl	Oberfläche grün, darunter braungelb, weiter unten die ganze Säule rosa	orangerot
Olivenöl	Oberfläche grün und braun, kein deutliches Chromatogramm	gelb
Sonnenblumenöl	grüne, darunter braungelbe Zone	gelb
Leinöl	Oberfläche grün, dann breite gelbe Zone, tiefer grünlich werdend, darunter schwach gefärbte Bezirke	gelb
Rüböl	ähnlich wie beim Leinöl	gelb

Mit dem Nachweis von *zugewetztem Färbemittel* hat sich gleichzeitig mit BOEKENOOGEN namentlich THALER (1, 2) beschäftigt. Die Chromatographie wurde auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) sowie auf einer Bleicherde (Clarit) ausgeführt; Lösungs- und Waschmittel: Benzol (Tabelle 22, S. 268). Die Empfindlichkeit des Nachweises ist recht groß, indessen je nach der Art des Pigments schwankend. Dimethylgelb oder p-Aminoazobenzol können in einer Menge von 0,01 mg pro 10 g Fett noch gut beobachtet werden, auch Bixin ist in sehr geringen Mengen nachweisbar. Im

allgemeinen werden die sauren Farbstoffe auf dem Oxyd, die basischen auf der Bleicherde besser festgehalten. Die Beurteilung der Clarit-Chromatogramme erfolgt nach dem Trocknen, im Hinblick auf die Eigenfarbe des feuchten Adsorbens.

Tabelle 22. Nachweis von künstlich zugesetzten Fettfärbemitteln, nach THALER (1).

(Je 10 g Mandelöl oder Kokosfett; Benzol.)

Färbemittel	Aluminiumoxyd-Säule	Clarit-Säule
Carotin, rein	zartgelbe Zone; Filtrat gelb	Oberfläche feucht: schwarzgrün; trocken: graublau
Carotin, techn.	Oberfläche hellgelb, darunter dünn orange; Filtrat gelb	Oberfl. trocken: moosgrün, tiefer breit grau-grün
Carrot oil, techn.	Oberfl. gelb, dann schmal hellgelb, übriges Adsorbens rosa	Oberfl. feucht: schwarzgrün; trocken: blau-grün
Xanthophyll	Oberfl. sehr schwach rötlichgrau	Oberfl. trocken: grau
Anatto in Sojaöl	Oberfl. stark orangerot	Oberfl. hell grasgrün, übriger Rohrinhalt grau
Bixin, rein	wie Anatto	Oberfl. dunkel rotbraun
Safran-auszug (Benzol)	Oberfl. orange gelb, darunter hellgelb	Oberfl. trocken: dunkel gelbgrün, anschließend hellblau
Calendula-auszug (Benzol)	Oberfl. hellgelb, dann gelb, rosa und 4 himbeerrote Scheiben	Oberfl. trocken: schwarzgrün, anschließend schmal hellblau
Curcuma-auszug (Benzol)	Oberfl. orangerot, darunter orangerote Zone	Oberfl. feucht: blutrot; trocken: hellbraun
Alkannin (techn.)	Oberfl. violett, dann blaßgelb	Oberfl. trocken: hell-lila
Dimethylgelb	keine Adsorption	Oberfl. trocken: blutrot
p-Aminoazobenzol	gelber Ring, rasch wandernd	Oberfl. trocken: blutrot
Martiusgelb	Oberfl. orange gelb	keine Adsorption
Sudan III	rote, rasch wandernde Zone, darunter gelb und rosa	breit violett, übriger Rohrinhalt rot
Scharlach R	rotbraun, langsam wandernd	breit himmelblau, breit rosa
Fettponceau	himbeerrote Zone	breit hellblau

Butter. Das Verhalten von Sommerbutter wurde von THALER (2) untersucht. Man löst 20 g in 50 cm³ Benzol bei höchstens 35° und gießt die filtrierte Flüssigkeit auf eine Aluminiumoxyd- oder Clarit-Säule. Zum Entwickeln dienten 20—30 cm³ Benzol. So werden zartgetönte, für die Naturbutter charakteristische Chromatogramme erhalten, deren Habitus auch im Uviol-

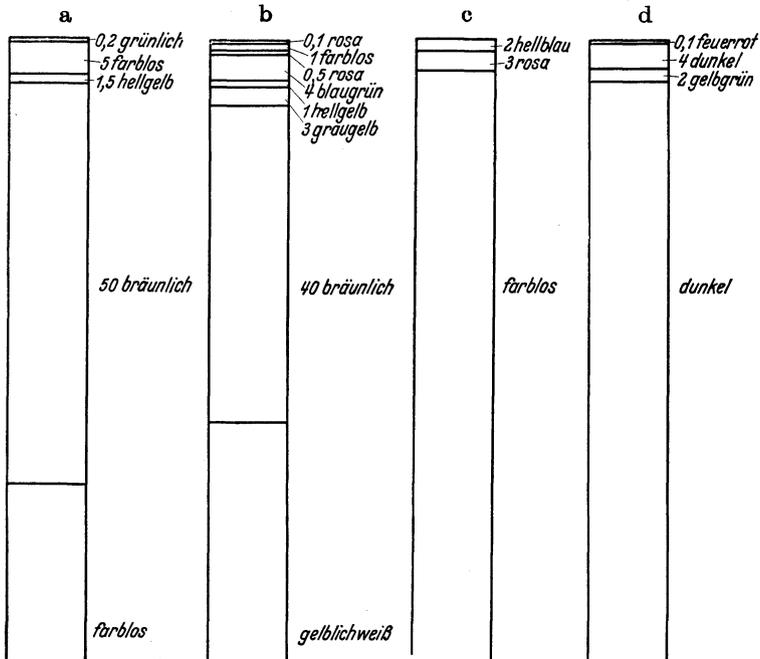


Abb. 39. Chromatogramm von ungefärbter Sommerbutter: a auf Al₂O₃ bei Tageslicht, b dasselbe bei Uviollicht; c auf Clarit bei Tageslicht, d dasselbe bei Uviollicht.

licht sehr kennzeichnend ist (Abb. 39). Bereits ein geringer Zusatz von Farbstoff ruft fremde Zonen und ein bunteres und lebhafteres Chromatogramm hervor, so daß die Adsorptionsmethode zum Nachweis derartiger Zusätze geeignet ist, selbst wenn die Butter eine Anfärbung mit Carotinoiden erfahren hat, welche im Milchfett vorkommen.

Untersuchung des unverseifbaren Restes von Ölen und Fetten.

Zur Bearbeitung derartiger Gemische ist die selektive Adsorption oft angewandt worden, namentlich aus Benzin- oder

4. Zone, Gew. 2,18 g, Jodzahl 82,5 (gelbliches, dickes Öl)
unten: im Filtrat, „ 1,74 g, „ 152,5 (dünn, kaum gefärbt).

Die ziemlich gut erkennbaren Zonen ließen sich mit Methanol + Äther eluieren. Durch Umscheiden aus Methanol isolierte man aus Zone 1 etwas *Batylalkohol* und aus 2 ein wenig Sterin, doch bestand hier der Hauptanteil des adsorbierten Materials aus dem ungesättigten *Selachylalkohol* $C_{21}H_{40}O_3$. Nachdem nämlich alle feste Substanz mit Hilfe von Methanol, wie erwähnt, entfernt wurde, ergab die katalytische Hydrierung des Restes quantitativ *Batylalkohol*. — Die hohe Jodzahl des Filtrats deutet auf *Squalen*, und tatsächlich konnte das Chlorhydrat desselben durch Behandlung mit HCl in trockenem Aceton erhalten werden (typische Krystalle, Schmelzp. 112—114°).

Man sieht, daß die Chromatographie des unverseifbaren Restes von Fetten noch verbesserungsbedürftig ist, namentlich in bezug auf den präparativen Ertrag.

3. Pharmazeutisch verwendbare Drogen. Galenische Präparate.

Ähnlich wie Gerbstoffauszüge lassen sich auch Extrakte aus physiologisch wirksamen Drogen, ferner galenische Präparate, Genußmittel usw. in vielen Fällen adsorptionsanalytisch prüfen. Das Chromatogramm oder Ultra-chromatogramm gibt über die Provenienz bzw. Herstellungsart und Qualität rasch Aufschluß. Nicht selten sind Verfälschungen auf diesem Wege nachweisbar, auch kann man den Wirkstoff quantitativ ermitteln. Frühzeitig hat VALENTIN (1) an den Beispielen des *Perubalsams* und der *Digitalistinktur* die Wichtigkeit des TSWERTSchen Verfahrens in der praktischen Pharmazie gezeigt, unter Benutzung einer Aluminiumoxyd-Säule.

Aus dem *Perubalsam* wurden 0,5proz. alkoholische Lösungen, ferner Petrolätherlösungen bereitet (der letztere Solvens hinterläßt einen Rückstand). Die Unterschiede zwischen natürlichem und künstlichem Balsam sind aus Abb. 40—41, S. 272, ersichtlich. Zur Extraktion der *Digitalisblätter* (Abb. 42) diente entweder absoluter oder verdünnter Weingeist (*Spiritus dilutus*); die erstere Arbeitsweise entspricht der offiziellen. Illustrierte Angaben über die Chromatographie von *Tinctura Digitalis* findet man auch bei FRANCK.

Cantharidentinktur. Chromatographiert man die officinelle Tinktur unter den nachfolgenden Bedingungen, so entsteht nach VALENTIN und FRANCK die in Abb. 43 a—b, S. 274, wiedergegebene Schichtenfolge, während Tinkturen aus nicht einwandfreiem Material oder verfälschte Präparate ein wesentlich anderes Bild

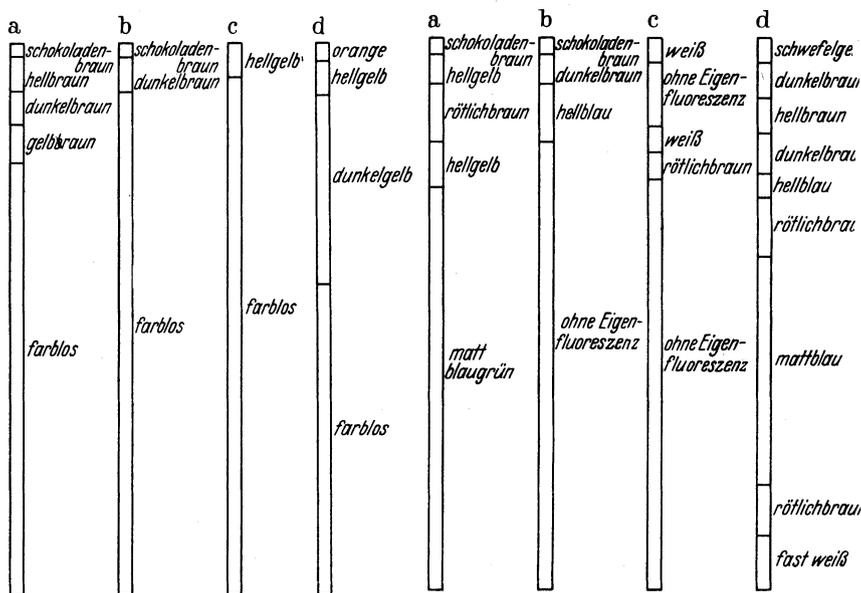


Abb. 40. Chromatogramm des Perubalsams in gewöhnlichem Licht: a natürlicher, b künstlicher Perubalsam in Alkohol; c natürlicher, d künstlicher Perubalsam in Petroläther.

Abb. 41. Chromatogramm des Perubalsams in ultraviolettem Licht: a—d wie in Abb. 40.

geben, z. B. Abb. 43 c—d (S. 274). Für die *Gehaltsbestimmung* der officinellen Tinktur empfehlen die genannten Verfasser das folgende Verfahren:

Nachdem das S. 61, Abb. 13 wiedergegebene Rohr mit einem dickflüssigen Gemisch von reinstem Aluminiumoxyd (Merck) und Aceton gefüllt, das überschüssige Lösungsmittel abgesaugt und etwa hindurchgetretene Tonerde entfernt worden ist, saugt man 20 g Tinktur durch das Rohr (höchstens 2 Tropfen Filtrat pro Sekunde!). Waschen mit 10 cm³ Aceton + Chloroform (1 : 1), dann mit 20 cm³ Chloroform. Das *Cantharidin* gelangt in das Filtrat, während die Säule das richtige Bild zeigt (Abb. 43). Man läßt (nach Entfernung

des Adsorptionsrohres) den Inhalt des Scheidetrichters in einen gewogenen Soxhletkolben fließen, spült mit 5 cm³ Chloroform nach, destilliert bis auf wenige Kubikzentimeter ab und verdunstet den Rest bei mäßiger Wärme. Nachdem die letzten Anteile des Chloroforms durch einen Luftstrom entfernt worden sind, übergießt man den Rückstand mit einem Gemisch von 9,5 cm³ Petroläther + 0,5 cm³ Alkohol und läßt die Flüssigkeit verschlossen 12 Stunden stehen.

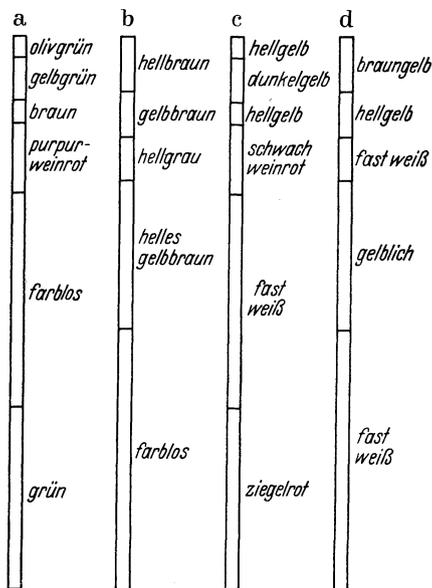


Abb. 42. Chromatogramm der Digitalistinktur: a mit absolutem, b mit verdünntem Alkohol bereitet, beide in gewöhnlichem Licht; c mit absolutem und d mit verdünntem Alkohol bereitet, beide in ultraviolettem Licht.

Sie wird dann auf einen, mit Wattebausch versehenen Trichter gegossen, etwa viermal mit je 5 cm³ des letztgenannten Lösungsmittelgemisches gewaschen, bis dieses farblos abläuft. Die auf der Watte liegenden Krystalle löst man mit 5 cm³ Chloroform ab und gibt die Lösung in das Kölbchen zurück. Verdunsten unter gelindem Erwärmen, Trocknen im Exsiccator während 12 Stunden. Das Gewicht der weißen Krystalle muß mindestens 0,014 g betragen (= 0,07% Cantharidin), Schmelzp. etwa 211°.

Oleum Hyoscyami. Adsorbiert man eine petrolätherische Lösung des Öls (1:1) an Aluminiumoxyd (reinst, wasserfrei, Merck) und wäscht die Säule mit Petroläther nach, so läßt sich ein aus frischen Bilsenkrautblättern nach Vorschrift des Schweizer

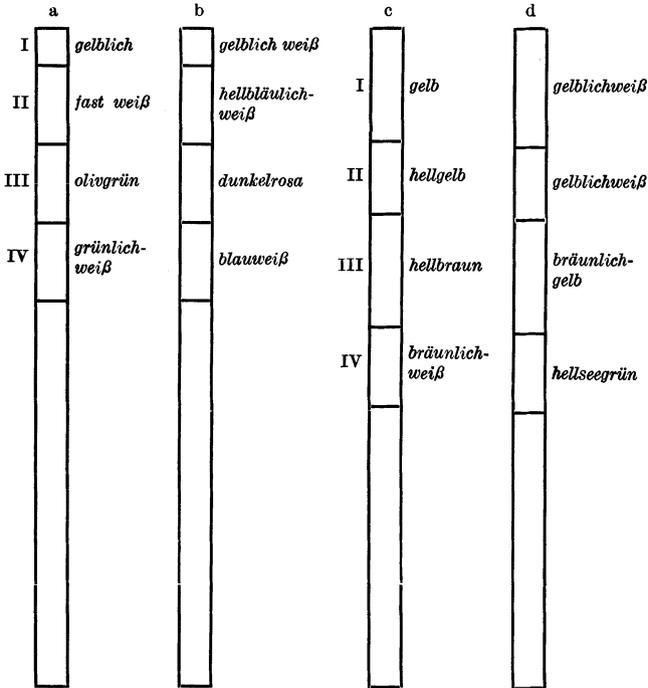


Abb. 43. Cantharidentinktur. a—b nach Vorschrift des Arzneibuches, c—d unvorschriftsmäßig bereitet; a und c in gewöhnlichem Licht, b und d in ultraviolettem Licht.

Arzneibuches hergestelltes Präparat von einer Verdünnung des zehnfach konzentrierten Handelsproduktes leicht unterscheiden (Abb. 44; FRANCK).

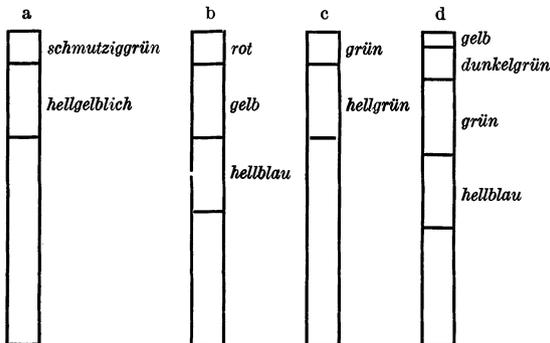


Abb. 44. Oleum Hyoscyami aus frischen Blättern, a im Tageslicht, b im Uviollicht. Dasselbe, durch Verdünnen des Ol. Hyoscyami decöplex“ bereitet, c im Tageslicht, d im Uviollicht.

Safran. Eine Verfälschung mit Flores Calendulae ist chromatographisch nachweisbar, wenn der mit 5 g 70proz. Alkohol bereitete Extrakt aus $\frac{1}{4}$ g auf Al_2O_3 mit demselben Lösungsmittel (10 cm^3) entwickelt wird. Die minderwertige Droge ist schichtenreicher (Abb. 45).

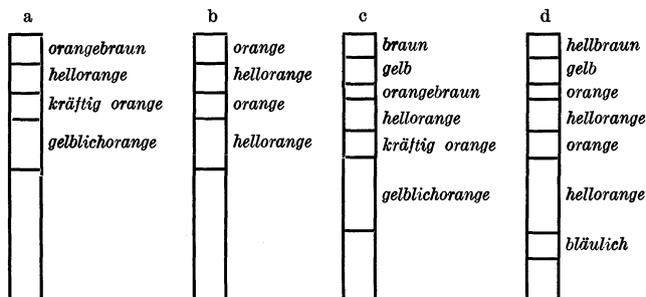


Abb. 45. Crocus-auszug, a im Tageslicht, b im Uviollicht. Dasselbe mit Flores Calendulae verfälscht, c im Tageslicht, d im Uviollicht.

Bei FRANCK findet man noch Angaben über: Vinum Condurango, Tinctura Absinthii, Tinctura Strophanthi und Tinctura Digitalis.

Anthrachinon-drogen.

Hierüber liegt eine Untersuchung von ERNST und WEINER vor. Die Extrakte von je 4 g gepulverter Droge wurden mit 40 cm^3 96proz. kaltem Alkohol durch 24stündiges Digerieren bereitet. Die Magnesiumoxyd-Säule war 25 cm hoch und 1,3 cm breit. Man tropft zuerst 1 cm^3 Wasser aus einer Pipette auf die Säule und schichtet 10 cm^3 Extrakt ebenfalls aus einer Pipette, vorsichtig, tropfenweise darüber. Entwickelt wird durch Auftropfen von 10 cm^3 Alkohol nach dem Einsinken des Extrakts und von 10 cm^3 Wasser nach dem Einsinken des Alkohols.

Die Verwendung von Magnesiumoxyd bietet hier den Vorteil, daß es, infolge seiner Alkalinität, die emodinhaltenen Schichten als rot erscheinen läßt; in der Regel ist dies, nach Tabelle 23, S. 276, im obersten Säulenbezirk der Fall. Hingegen enthalten die Chromatogramme von Frangula, Araroba, Senna usw. ganz unten eine schwachgelbe, im Uviollicht grünlichgelb fluoreszierende Schicht, in welcher Anthranole vorkommen. Das leuchtende Rot z. B. bei Fructus Sennae, das im Uviollicht die letztgenannte Schicht überdeckt, enthält Chlorophyll.

Tabelle 23. Chromatogramme von Anthrachinondrogen, nach OSTWALDS

	Aloe	Araroba depur.	Cascara Sagrada	Cassia fistula	Frangulae Cort.
bei Tageslicht	150 gelb ne 08 12 lgr ne 96 3 gelb ia 00 40 gelb ia 04	40 rot ni 25 10 kreß ni 17 10 gelb ia 08 50 kreß ia 13 70 kreß ea 17	10 rot ie 29 10 gelb ia 08 Rest weiß	5 rot ie 20 3 kreß ie 21 Rest weiß	30 rot ne 29 20 lgr ie 96 80 grau b 30 gelbea 04
	45 weiß MgO	70 weiß MgO	MgO	MgO	90 weiß MgO
im Uviollicht (Lichtfilter)	160 kreß na 13 2 gelb na 00 3 ubl ea 58 ¹ 40 ubl ia 58	40 veil ni 46 10 ubl ni 50 10 kreß ia 17 50 gelb na 08 70 lgr ea 96	10 kreß ne 21 10 gelb na 00 5 lgr na 96 155 ubl ea 58 ²	8 kreß ne 21 2 rot ne 25 60 ubl ea 58 ¹ 80 rot ea 33	30 kreß ne 23 20 gelb na 00 20 ubl ea 58 90 gelb ea 00
	45 blgr MgO	70 blgr MgO	70 blgr MgO	100 blgr MgO	90 blgr MgO

Identitätsproben der MgO-Adsorbate. 1. Oxymethyl-anthrachinone.

a) Im Tageslicht rotbraun, im Quarzlicht ebenso leuchtend. — b) Etwas Adsorbat mit KOH betupft: rot. — c) Mit Äther eluiert: gelbe Lösung, mit 1 Vol. 5proz. Ammoniak geschüttelt: Unterschicht kirschrot. — d) Verdunstungsrückstand des Äther-eluates mikrosublimiert: gelbe Nadeln, in 1 Tropfen KOH: rote Lösung. — e) Prüfung auf *Chrysophansäure* (1,8-Dioxy-3-methylantrachinon): Adsorbat mit 15proz. Soda kochen, filtrieren, das Filtrat mit 3 Vol. Petroläther ausschütteln. Man versetzt 2 cm³ der gelben Petrolätherlösung mit ebensoviel Ammoniak, schüttelt durch: Unterschicht violett. — f) Prüfung auf *Frangula-emodin* (1,6,8-Trioxy-3-methylantrachinon): Adsorbat mit wenig KOH kochen, verdünnen, filtrieren, Filtrat mit verd. Schwefelsäure ansäuern und mit 3 Vol. Benzol schütteln, in welches das Emodin mit gelber Farbe übergeht. 2 cm³ Benzollösung werden mit ebensoviel Ammoniak durchgeschüttelt: Unterschicht purpurrot.

2. *Anthranole*. a) Im Tageslicht blaßgelb, im Quarzlicht gelblich-grüne Fluoreszenz, Aussehen glasig. — b) Wäßrige Eluate leuchten gelbgrün. — c) Man schüttelt das Adsorbat mit Petroläther, dampft ab und betupft den Rückstand mit MECKES Reagens (1,5 g Selenigsäure auf 100 g konz. Schwefelsäure): schwarz. — d) Das Mikro-

¹ Kräftig leuchtend.² Verschiedene Schattierungen.

nach ERNST und WEINER (links Schichtdicken in mm; Farbenangabe Farbenlehre).

Rhamn. cath. Fr.	Rhei Austr. Rad.	Rhei Chin. Rad.	Sennae Folium	Sennae Fructus
5 lgr ie 92 35 gelb na 08 120 grau b 30 gelb ea 04	55 rot ie 29 ² 70 kreß ea 13 ⁴ 55 weiß	80 rot ie 29 ² 35 kreß ea 13 ⁴ 65 weiß ³	10 kreß ne 13 10 gelb ne 08 1 rot ie 29 4 rot ea 29 130 lgr ia 96 20 gelb ia 00	5 kreß ne 17 3 gelb ia 08 2 rot ie 29 10 rot ea 29 55 grau b 100 gelb ea 04 75 weiß MgO
60 weiß MgO	70 weiß MgO	70 weiß MgO	75 weiß MgO	75 weiß MgO
40 gelb na 00 40 ebl ea 63 10 veil ie 46 80 rot na 29 10 lgr ea 96	55 rot ne 33 50 ubl ie 50 17 lgr ea 88 3 ubl ea 58 55 ubl ea 50	80 rot ne 33 25 ubl ie 50 ⁵ 65 ubl ea 50	10 kreß ne 13 15 gelb ia 13 3 rot ne 29 12 veil ea 46 80 rot ne 29 40 kreß ia 21 15 lgr ia 96	5 kreß na 17 3 gelb ia 13 2 rot ia 29 50 ubl ea 54 100 rot ia 29 15 ubl ea 54 75 grbl MgO
70 blgr MgO	70 grbl MgO	80 grbl MgO	75 grblg MO	75 grbl MgO

sublimat des erwähnten Abdampfrestes zeigt fast farblose Nadelchen, die positive Anthranolreaktion geben.

Die Untersuchung von Chromatogramm und Ultrachromatogramm des *Cortex Frangulae* gestattet auch, die praktisch wichtige Unterscheidung von frisch getrockneter und abgelagerter Droge vorzunehmen, während die auf verschiedene Arten bereiteten Alkoholauszüge derselben Rinde ungefähr dasselbe Bild zeigen. Zu den Versuchen dienten MgO-Rohre (30 × 2,5 cm), in denen je 40 cm³ Extrakt verarbeitet werden konnte; Entwickeln mit 50 cm³ Alkohol und dann mit 50 cm³ Wasser ergab das Bild der Tabelle 24, S 278.

Bestimmung des Alkaloidgehaltes galenischer Präparate.

Nach MERZ und FRANCK geben eine Reihe von Galenicis, welche nach der Vorschrift des Deutschen Arzneibuches bereitet wurden, auf Al₂O₃ kennzeichnende Chromatogramme und Ultra-

³ Dazwischen wenig unterschiedene Streifen.

⁴ Dazwischen hellere und dunklere Streifen.

⁵ Offenkundige Verfälschung mit Rheum austriacum oder minderwertige Sorte (Tientsin).

Tabelle 24. Alkoholische Auszüge von *Cortex Frangulae*, auf MgO, nach ERNST und WEINER (links Schichtdicken in mm; Farbenangabe nach OSTWALDS Farbenlehre).

Abgelagerte Droge		Frische Droge	
Tageslicht	Uviollicht	Tageslicht	Uviollicht
15 rot ni 25	15 kreß ni 21	20 rot ni 23	10 grau i
6 kreß ni 21	8 kreß ni 13	5 kreß ni 13	15 gelb ni 04
4 kreß ni 13	5 gelb na 00	15 veil ni 46	5 lgr ni 92
5 gelb ea 04	1 kreß ni 13	25 lgr ie 92	8 kreß ni 13
110 gelb ea 04	2 gelb ni 7	5 sgr ia 83	2 gelb ie 08
110 weiß	4 ubl ea 58	80 lgr ea 96	10 veil na 38
	35 veil ea 38	110 gelb ia 04	50 rot ia 25
	70 MgO		50 lgr ea 88
	110 gelb ea 00		110 gelb ia 00
50 MgO	50 MgO	40 MgO	40 MgO

chromatogramme, die man mit 70proz. Alkohol entwickelt. Als Beispiele dienen die Abb. 46—49. Die *quantitative* Ermittlung des *Alkaloidgehaltes*, welche sich in $\frac{1}{2}$ Stunde ausführen läßt,



Abb. 46. Tinctura Chinae, a im Tageslicht, b im Uviollicht.

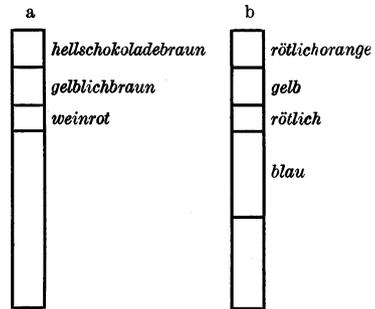


Abb. 47. Extractum Chinae spir., a im Tageslicht, b im Uviollicht.

wird dadurch erleichtert, daß unter den angegebenen Bedingungen die freie Base in das Filtrat geht und unmittelbar titriert werden kann (Ausnahme: Tinct. Belladonnae). Apparatur: Abb. 13, S. 61; Adsorbens: Aluminiumoxyd, reinst, wasserfrei, Merck (das nach BROCKMANN standardisierte Präparat hat sich hier nicht bewährt).

Extractum Chinae spir. 0,5—1 g Extrakt wurden in 10 cm³ 70proz. Alkohol gelöst, chromatographiert und mit ebensolchem Sprit nachgewaschen. Man verwendet die ersten 50 g des Filtrats, verjagt sein Lösungsmittel am Wasserbad bis zur Trübung, nimmt den Rest in 10 cm³ 0,1n-HCl auf und titriert mit 0,1n-NaOH zurück (Methylrot).

Extractum Chinae fluidum. Angewandt 10 cm³, nachgewaschen mit 40 cm³ 70proz. Alkohol, Behandlung von 50 cm³ Filtrat wie oben.

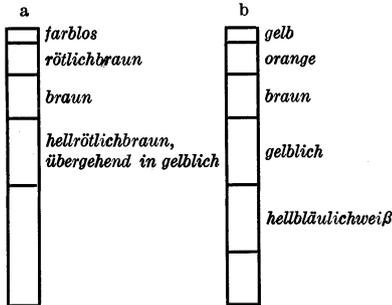


Abb. 48. *Tinctura Ipecacuanhae*, a im Tageslicht, b im Uviollicht.

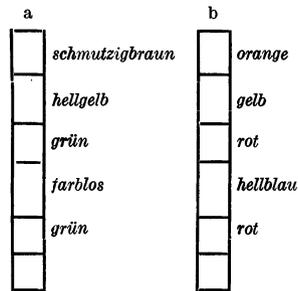


Abb. 49. *Tinctura Belladonnae*, a im Tageslicht, b im Uviollicht.

Tinctura Strychni. 10 g Tinktur wurden so lange mit 70proz. Alkohol entwickelt, bis 40 cm³ Filtrat entstand. Weiteres wie bei *Extractum Chinae spir.* — Das Chromatogramm zeigt hier eine schmutzigbraune, dann eine hellgelbe Schicht, im Uviollicht: hellbräunlich, gelb, weißblau.

Tinctura Ipecacuanhae. 10 cm³ Tinktur, so lange mit 70proz. Alkohol entwickelt, bis 45—50 cm³ Filtrat entstand (Abb. 48). Weiteres wie bei *Extractum Chinae spir.*

Tinctura Belladonnae. 10 cm³ wurden mit 40 cm³ absolutem Alkohol entwickelt (Abb. 49). Man befreit das Filtrat (50 cm³) am Wasserbade von Alkohol, versetzt es mit etwa 50 g Äther, schüttelt, fügt 3,5 g Ammoniak hinzu, hebt die Ätherschicht ab und verdunstet sie. Das nun frei vorliegende Alkaloid wird wie üblich titriert.

Kaffee-aufgüsse. Es wurde von VALENTIN (2) untersucht, inwiefern die Adsorptionsmethode zur Unterscheidung von Handelssorten von Kaffee geeignet ist. Dieser Teil der Arbeit verlief indessen negativ und ergab für verschiedene Ausgangsstoffe recht einheitlich das in Abb. 50, S. 280, wiedergegebene Bild.

Je 10 g des gerösteten, feingemahlene Kaffees wurden mit 100 cm³ kochendem Wasser übergossen, 5 Minuten in schwachem Sieden gehalten und nach dem Erkalten durch Watte filtriert. Angewandt: 10 cm³ Lösung, Adsorbens: Aluminiumoxyd (Merck); Nachwaschen mit 40 cm³ heißem Wasser. Zur *Bestimmung des*

Koffeins dampft man das Filtrat + Waschwasser in einer Porzellanschale ein, zieht den Rest viermal mit je 10 cm³ Chloroform auf dem Wasserbade aus, verjagt das Lösungsmittel in einem tarierten Kölbchen, trocknet den Rückstand bei 100° und wägt ihn nach dem Er-

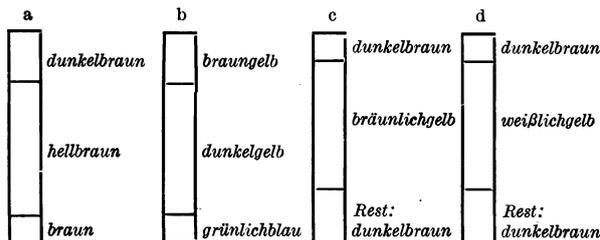


Abb. 50. Chromatogramme von Kaffee-aufgüssen, nach VALENTIN: a Bohnenkaffee im Tageslicht, b derselbe im Uviollicht, c Malzkaffee im Tageslicht, d derselbe im Uviollicht.

kalten im Exsiccator. Eine rohe Orientierung ergibt sich übrigens schon dadurch, daß die untere, hellviolette Fluorescenz bei koffeinfreien Waren auffallend schwach ist.

Durch Versetzen der Chromatogramme mit 1proz. Ferrichlorid bzw. mit FeCl₃ und dann mit 1proz. Soda wird das Säulenbild wesentlich verändert (Abbildungen im Original).

Siebentes Kapitel.

Anorganische Chromatographie.

(Hiezu die Abb. 70—74, S. 297).

Die Aufteilung anorganischer Substanz in der TSWETTSCHE Säule eröffnet ein vor kurzem noch unbekanntes und auch heute nur zum kleinen Teil durchgearbeitetes Gebiet, das nach mehreren Richtungen interessante Ausblicke verspricht.

Die chromatographische Methode wurde von LANGE und NAGEL zur Trennung seltener Erden empfohlen, doch kam der Vorschlag unseres Wissens nie zur Ausführung. Im Wege des Experiments sind SCHWAB und JOCKERS (1, 2) 1937 mit Erfolg in die Chromatographie unorganischer Stoffe eingedrungen und sie haben namentlich den Nachweis und die Scheidung von dreiwertigen und zweiwertigen Metallionen studiert. Kurz darauf erschien die Arbeit von SCHWAB und DATLER über das Verhalten einiger

Anionen in der Adsorptionssäule (s. auch SCHWAB). Die bisherigen Ergebnisse dieser Forschungen werden nachstehend zusammengefaßt.

Versuchstechnik.

Man gießt die wäßrige Lösung auf Aluminiumoxyd und spült meist mit Wasser nach, wobei die Zonen gebildet oder auseinandergezogen werden. Leider entstehen leere Zwischenräume in der Regel nicht. Jetzt erst folgt das „Entwickeln“, nämlich das Einsaugen eines entsprechenden Reagens, welches die Schichtung (besser) sichtbar macht. Zum Nachweis von Schwermetallionen verwendet man als Entwickler u. a. Ammoniumsulfid oder Schwefelwasserstoff (den letzteren auch in Gasform), während eine Ferricyanid- oder Chromatzone z. B. mit Silbernitrat behandelt wird. Einen neuartigen Behelf bringt die Belichtung von farblosen, chlor-silberhaltigen Säulenbezirken, welche eine violette Farbe annehmen.

Apparatur. Bei den bisherigen Versuchen kam das S. 67 abgebildete Mikrorohr von HESSE (1, 2) zur Verwendung, mit einer lichten Weite von 4—7 mm; zweckmäßig breitet man die Röhren oben etwas aus. Das Adsorbens wird als dicke, wäßrige Suspension eingefüllt, die man vorher durch Erhitzen auf 70—80° luftfrei gemacht hat. Durch abwechselndes scharfes Saugen und Klopfen wird eine möglichst dichte Füllung erreicht. Im Falle einer molaren Lösung muß die Rohrlänge so gewählt werden, daß die zuerst entstandene Zone auf das Siebenfache gebracht werden könne. Das Einlaufen der Lösung erfolgt ohne Saugen.

Adsorptionsmittel. Es wurde Aluminiumoxyd, standardisiert nach BROCKMANN, verwendet oder, ebenso gut, selbst entwässertes technisches Aluminiumhydroxyd. Vorteilhaft ist eine feinsandige Struktur. Nicht bewährt haben sich: Baryumsulfat, Zinndioxyd, Titandioxyd, Thoriumdioxyd, Berylliumoxyd, Glasstaub, Quarz-pulver, Magnesiumoxyd, Zinkoxyd, Cellulose, Bakelit. Manche Bleicherden sind wegen der Eigenfarbe unverwertbar. Kieselsäuren zeigen je nach der Herstellung ein schwankendes Verhalten, die besten Sorten stammen aus Silicagel.

Waschen und Entwickeln. Trennt man Kationen aus einer molaren Lösung, so ist die 10fache Menge an Waschflüssigkeit erforderlich, beträgt die Konzentration $m/10$, so kommt man mit 3—4 Vol. aus. Der Entwickler soll kleinere Adsorptionsaffinität

besitzen als das zu entwickelnde Ion. Verwendet man Ammonium-sulfid, so muß es vollkommen mit H_2S gesättigt sein, da sonst (u. a. bei Kupfer und Silber) Amminkomplexe entstehen. Übersättigt man aber den Entwickler mit Schwefelwasserstoff, so macht sich eine störende Blasenbildung bemerkbar. Es ist günstig, daß auch die „schwarzen“ Metallsulfide im Adsorbat eine Eigenfarbe zeigen.

Trennung von Kationen.

Aus wäßriger Lösung werden die wichtigsten zwei- und dreiwertigen Metallionen, sowie die einwertigen Ione Ag^+ und Tl^+ , gemäß

Oben:	As^{+++} Sb^{+++} Bi^{+++} Cr^{+++} , Fe^{+++} , Hg^{++} UO_2^{++} Pb^{++} Cu^{++} Ag^+ Zn^{++} Co^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} , Fe^{++} Tl^+	<p>der nebenstehenden <i>Adsorptionsrangordnung</i> in der Aluminiumoxyd-Säule festgehalten.</p> <p>Man sieht, daß die dreifach geladenen Ionen die stärkste Affinität aufweisen. Es ergibt sich auch aus der Reihenfolge, daß Chromi-, Ferri- und Mercurionen, ferner Cobalto-, Nickel-, Cadmium- und Ferroionen innerhalb dieser Untergruppen voneinander schlecht</p>
unten:	Mn^{++}	<p>trennbar sind. In der Tat erhält man hier mehr oder minder differenzierbare Mischzonen. Je weiter zwei Metalle in der Adsorptionsreihe voneinander liegen, um so leichter und schöner gelingt im allgemeinen ihre Scheidung.</p> <p>Zur Demonstration des Verfahrens eignen sich u. a. die beiden folgenden Versuche:</p> <p>a) Molare Lösungen von Ferri-, Cupri- und Cobaltonitrat werden auf Aluminiumoxyd chromatographiert und mit Wasser nachgewaschen:</p> <p>Oben: braun: Eisen, blau: Kupfer, unten: rosa: Cobalt.</p> <p>Nach dem Entwickeln mit Kaliumferrocyanid:</p> <p>Oben: berlinerblau: Eisen, braun: Kupfer, grünlich: Cobalt.</p>

b) Nitrate von Pb^{++} , Ag^+ , Zn^{++} , Cd^{++} und Mn^{++} . Man wäscht die Säule mit Wasser, entwickelt sie mit Ammoniumsulfid und erhält das folgende Bild:

Oben: schwarz: Blei,
 grau: Silber,
 weiß: Zink,
 gelb: Cadmium,
unten: fleischfarbig: Mangan.

Zur Kennzeichnung der meist geringeren Trennschärfe von *Reihen-nachbarn* dient die Tabelle 25, S. 285.

Bemerkungen zu Tabelle 25 (S. 285).

Nr. 1. Die Säule muß mit Salzsäure angesäuert werden, um das Ausfallen von basischen Salzen zu vermeiden. Ein gewisser Nachteil einer solchen sauren Säule besteht darin, daß die Adsorption der Kationen hier viel weniger dicht erfolgt als an der normalen Säule. Die Entwicklung schreitet ziemlich langsam vor, wohl wegen des geringen Gehaltes von H_2S im Schwefelwasserstoffwasser. Es empfiehlt sich deshalb, von vornherein nur eine kleine Lösungsmenge zu benutzen. Nach der Entwicklung zeigen sich zwei deutlich getrennte Zonen, oben eine gelbe von Arsensulfid und darunter eine orangerote von Antimonsulfid. Bei längerem Waschen mit verd. Salzsäure kann die Trennung so weit gesteigert werden, daß man zwei fast vollkommen getrennte Zonen erhält.

Nr. 2. Die Entwicklung zeigt eine schöne und scharfe Trennung von Antimonsulfid (orangerot, oben) und Wismutsulfid (schwarzbraun, unten). Allerdings wandert hier auf der sauren Säule das Wismut schon so schnell und die Entwicklung mit Schwefelwasserstoffwasser erfolgt so langsam, daß der letzte Rest von Wismut nur schwer eingeholt wird.

Nr. 3. Um schon gleich beim Eintritt in die Säule ein etwaiges Ausfallen von basischem Wismutnitrat zu vermeiden, wird der Anfang der Säule etwas angesäuert. Ein graugrüner Ring wandert in die Säule und löst sich beim Waschen von der Oberfläche los. Hier muß vor der Entwicklung mit Ammonsulfid zuerst mit Ammoniak fixiert werden, da sich sonst in der Säule eine störende Gasentwicklung bemerkbar macht. Bei der Entwicklung mit Ammonsulfid entsteht oben eine ziemlich weiße Zone, anschließend eine Zone von Wismutsulfid, die dort endet, wo der graugüne Ring von Chromihydroxyd beginnt. Der obere weiße Ring wird durch die in der ursprünglichen Lösung vorhandene freie Säure verursacht.

Nr. 4. Die Eisenschicht wird erst im basischen Teil der Säule bemerkbar. Bei der Nachentwicklung mit Ammonsulfid entsteht oben wieder eine fast weiße Zone, dann folgt nach unten eine schwarzbraune von Wismutsulfid. Darunter sitzt die Ferrizone, die mit

Ammonsulfid ein grünschwarzes Eisensulfid ergibt. Beim Durchspülen der Kolonne mit verd. Schwefelsäure kann man die Eisensulfidzone herauslösen; Wismutsulfid bleibt.

Nr. 5. Bei der Entwicklung mit Natronlauge entsteht eine gelbe Lage von Quecksilberoxyd, die vom oberen Rand durch eine breite weiße Zone abgetrennt ist. Durch die Nachentwicklung mit Ammonsulfid oder Schwefelwasserstoff wird die obere weiße Zone tiefbraun, abgesehen von einem obersten weißen Rand, in welchem die freie Säure adsorbiert wurde; die gelbe Zone wird tiefschwarz. Hier verwendet man besser Schwefelwasserstoffgas, welches man durch die Säule saugt; was wegen der vorhergegangenen Fixierung mit NaOH keine Zonenverzerrung mehr hervorrufen kann. Bei der Verwendung von Ammonsulfid wandert aus der schwarzen Quecksilbersulfidzone ein Teil grauschwarz und verwaschen nach unten.

Nr. 6. Oben sitzt eine graugüne Zone, die nach unten allmählich in eine gelbe übergeht. Die Trennung ist nicht vollkommen, sie kann aber durch längeres Waschen verbessert werden. Die Entwicklung zeigt oben eine graugüne Zone von Chromhydroxyd, darunter eine braune von Uranylsulfid.

Nr. 7. Oben: brauner Ring, darunter eine deutlich gelbere Schicht. Beim Entwickeln entsteht oben Berlinerblau und unten braunes Uranylferrocyanid. Auch hier adsorbiert das ausfallende Eisenhydroxyd einen Teil des Uranylions, und die Trennung wird nicht gut, wenn Ferrinitrat im Unterschub vorhanden war.

Nr. 8. Ein gelber Ring löst sich von der Oberfläche. Längeres Waschen färbt die oben entstandene weiße Zone durch Hydrolyse von Mercurisalz gelb bis rötlich. Bei der Entwicklung wird die obere Zone schwarz von HgS und die tiefer liegende gelbe Schicht braun von Uranylsulfid. Durch $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ wird HgS kolloidal verwaschen, was man dadurch vermeidet, daß mit $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ fixiert und dann H_2S -Gas durchgesaugt wird.

Nr. 9. Die gelbe Uranzone löst sich nicht von der Oberfläche. Bei der Entwicklung entsteht oben keine rein braune Uranylsulfidschicht, sondern sie ist, besonders an der unteren Grenze, schwärzlich. Unter der früher gelb gewesenen Uranylzone entsteht ein reiner Bezirk von Bleisulfid. Die Trennung ist also unvollkommen; sie wird durch längeres Waschen verbessert.

Nr. 10. Die blaue Kupferzone löst sich nicht ganz von der Oberfläche der Säule, jedoch sitzt die Hauptmenge unten. Entwicklung: Die schwarze Bleisulfidzone entsteht oben, also dort, wo noch etwas Kupfer sitzt; darunter sieht man eine grünschwarze CuS -Schicht.

Nr. 11. Die blaue Kupferzone löst sich nicht von der Oberfläche. Beim Entwickeln entsteht unter dem Kupfer ein brauner Ag_2O -Ring.

Nr. 12. Der Entwickler, der mit H_2S gesättigt sein muß, erzeugt am oberen Ende der Säule einen grauen Ag_2S -Ring. Die Kolonne wurde an der unteren Grenzfläche dieser Silberzone abgeschnitten und der obere Teil der Restsäule mit Salzsäure digeriert. Im Filtrat

Tabelle 25. Paarweise Trennung von benachbarten Kationen in der Aluminiumoxyd-Säule, nach SCHWAB und JOCKERS (2). Molare bis m/10-Lösungen. (Bemerkungen: S. 283f., 286.)

Nr.	Kationen	Verbindungsform	Säule	Waschflüssigkeit	Entwickler
1	As ⁺⁺⁺ und Sb ⁺⁺⁺	AsCl ₃ + SbCl ₃ , mit Weinsäure versetzt, mit H ₂ O verdünnt	mit verdünnter HCl angesäuert	verdünnte HCl	H ₂ S-Wasser
2	Sb ⁺⁺⁺ und Bi ⁺⁺⁺	SbCl ₃ + Bi(NO ₃) ₃ , mit Weinsäure versetzt, mit H ₂ O verdünnt	mit verdünnter HCl angesäuert	verdünnte HCl	H ₂ S-Wasser
3	Bi ⁺⁺⁺ und Cr ⁺⁺⁺	Bi(NO ₃) ₃ + Cr(NO ₃) ₃ , mit verdünnter HNO ₃ verdünnt	oberste Zone mit einigen Tropfen verdünnter HNO ₃ angesäuert	zuerst einige Tropfen verdünnter HNO ₃ , dann H ₂ O	NH ₃ und (NH ₄) ₂ S
4	Bi ⁺⁺⁺ und Fe ⁺⁺⁺	Bi(NO ₃) ₃ + Fe(NO ₃) ₃ , mit verdünnter HNO ₃ verdünnt	oberste Zone mit verdünnter HNO ₃ angesäuert	zuerst einige Tropfen verdünnter HNO ₃ , dann H ₂ O	NaOH und (NH ₄) ₂ S
5	Bi ⁺⁺⁺ und Hg ⁺⁺	Bi(NO ₃) ₃ + Hg(NO ₃) ₂ , mit wenig verdünnter HNO ₃ verdünnt	am oberen Ende etwas angesäuert	zuerst einige Tropfen verdünnter HNO ₃ , dann H ₂ O	NaOH und (NH ₄) ₂ S bzw. H ₂ S
6	Cr ⁺⁺⁺ und UO ₂ ⁺⁺	Cr(NO ₃) ₃ + UO ₂ (NO ₃) ₂	ohne Behandlung	H ₂ O	(NH ₄) ₂ S
7	Fe ⁺⁺⁺ und UO ₂ ⁺⁺	Fe(NO ₃) ₃ + UO ₂ (NO ₃) ₂	„	H ₂ O	K ₄ [Fe(CN) ₆]
8	Hg ⁺⁺ und UO ₂ ⁺⁺	Hg(NO ₃) ₂ + UO ₂ (NO ₃) ₂	„	H ₂ O	(NH ₄) ₂ S
9	UO ₂ ⁺⁺ und Pb ⁺⁺	UO ₂ (NO ₃) ₂ + Pb(NO ₃) ₂	„	H ₂ O	(NH ₄) ₂ S
10	Pb ⁺⁺ und Cu ⁺	Pb(NO ₃) ₂ + Cu(NO ₃) ₂	„	H ₂ O	(NH ₄) ₂ S
11	Cu ⁺⁺ und Ag ⁺	Cu(NO ₃) ₂ + AgNO ₃	„	H ₂ O	NaOH
12	Ag ⁺ und Zn ⁺⁺	AgNO ₃ + Zn(NO ₃) ₂	„	H ₂ O	NaOH
13	Zn ⁺⁺ und Cd ⁺⁺	Zn(NO ₃) ₂ + Cd(NO ₃) ₂	„	H ₂ O	(NH ₄) ₂ S

konnte, nach dem Abstumpfen mit Natriumacetat, Zink als Sulfid nachgewiesen werden.

Nr. 13. Beim Entwickeln entsteht oben eine weiße Zone, auf die mit scharfem Rand eine gelbe von CdS folgt. In der oberen Schicht wurde Zn wie beschrieben nachgewiesen. Das Zink macht sich also durch das Auftreten einer weißen Zone zwischen seinen (eventuell zuzusetzenden) Nachbarn Silber und Cadmium bemerkbar, da leere weiße Zonen nie auftreten.

Für die qualitative Trennung der Metalle ergibt sich dadurch ein gewisserer Vorteil, daß die S. 282 *verzeichnete Adsorptionsrangordnung von der Art des Anions weitgehend unabhängig ist.* (Wird die Versuchsführung von schwerlöslichen Salzen gestört, so hält man die letzteren mit Hilfe freier Säure in Lösung.) Auch durch die Anwesenheit von fremden Salzen wird das Säulenbild meist nicht wesentlich verändert.

Ausnahmefall: Silber und Thallium sitzen beim Waschen mit konz. Kalium- oder Natriumnitrat abnormal tief in der Säule. Man findet dann Tl unter Mn und Ag im Zn oder auch noch im Co. Diese Beobachtung gestattet die scharfe Trennung von Tl einerseits und Cd oder Mn andererseits. — Der soeben erwähnte Einfluß von Natriumnitrat tritt nur beim Waschen ein, aber nicht, wenn die Säule mit der Nitratlösung bloß angefeuchtet wird.

Einflüsse des basischen Charakters der Al_2O_3 -Säule auf den Versuchsablauf. Derartige Störungen sind mannigfaltig, wie dies aus den folgenden Beispielen hervorgeht.

a) In der Anwesenheit von freier Säure erscheint über den Metallschichten eine farblose Zone, welche durch Adsorption von Wasserstoffionen zustande kam und für Metallionen nicht aufnahmefähig ist.

b) Das Mercurioion kann nicht verarbeitet werden, da es zu Hg und Hg^{++} disproportioniert wird (graue Quecksilberzone). In einem angesäuerten Säulenbezirk unterbleibt zwar diese Störung, doch eilt dann das Mercurioion viel zu rasch nach unten.

c) Neutrale Mangano- und Silberlösungen setzen sich zu Silber und Mangandioxydhydrat um. Ähnliche Störungen beobachtete man auch bei den Paaren Cu^{++} und Fe^{++} sowie Hg^{++} und Pd^{++} , wo ebenfalls der eine Partner oxydiert, der andere reduziert wurde. Durch Beimengung einer, in der Adsorptionsreihe zwischen den beiden Metallionen stehenden Komponente wird diese Schwierigkeit meist umgangen.

d) Das Ferriion wird in der Säule leicht als Hydroxyd ausgefällt und verursacht dann eine starke Störung, besonders da es selbst adsorbierend wirkt. In Anwesenheit von überschüssigem Eisen entsteht z. B. eine viel kleinere Kupferzone als sonst.

Trennung von Kationen als Ammin-komplexe. Wird das Wasser durch Ammoniak ersetzt, der sowohl als Benetzungs- als auch als Waschflüssigkeit dient, dann ändert sich die Adsorptionsrangordnung in charakteristischer Art. So nimmt z. B. Silber, das einen besonders beständigen Amminkomplex bildet, eine tiefere Lage ein, als diejenigen Ionen, welche sonst unter ihm stehen:

Oben:	Co ⁺⁺
	Zn ⁺⁺
	Cd ⁺⁺ , Cu ⁺⁺
	Ni ⁺⁺
unten:	Ag ⁺

Einen praktischen Wert besitzt die Verwendung ammoniakalischer Lösungen bei der Trennung der Paare Co und Ni, Co und Cd sowie Cd und Ni, namentlich unter Zwischenschaltung von Zink.

Trennung von Cobalt und Nickel. Man löst die Nitrate, ferner viel Zinknitrat in überschüssigem konz. Ammoniak, spült die Säule mit dem letzteren vor und wäscht das Chromatogramm ebenfalls mit konz. NH₄OH. Beim Waschen verbleibt die braune Cobaltschicht oben, von der, durch eine weiße Zinkzone getrennt, viel tiefer das Nickel hängen bleibt. Durch die Entwicklung mit farblosem Ammonsulfid erzeugt man zwei schwarze Zonen, die mittels einer weißen geschieden sind. Zwecks Trennung von Co und Ni zerschneide man die Säule in der Zinkzone.

Trennung von Kationen als Tartrato-komplexe. Auch hier erblickt man eine besondere Rangordnung:

Oben:	Mn ⁺⁺
	Cd ⁺⁺
	Zn ⁺⁺ , Pb ⁺⁺ , Cu ⁺⁺ , Bi ⁺⁺⁺ , Fe ⁺⁺⁺ , Cr ⁺⁺⁺
	Co ⁺⁺
unten:	Ni ⁺⁺

Das Verfahren ist namentlich zur sauberen Scheidung von Ferri- und Chromiion anwendbar, was in wäßriger Lösung nicht glatt gelingt (starkes Haften, hydrolytische Ausfällung).

Trennung von Ferri- und Chromiion. Ansatz: Ferri- und Chrominitrat + Natronlauge, mit basischem Tartrat in Lösung gehalten. Zur Vorbehandlung der Säule sowie zum Waschen dient basisches Tartrat. Nur die Chromizone ist wahrnehmbar: beim Waschen wandert sie rasch von der Oberfläche der Säule in das Adsorbens hinein. Nach der mit Ammonsulfid vorgenommenen Entwicklung

sieht man oben eine grünschwarze Eisensulfidzone, die nach unten schwächer wird und an der grünen Chromschicht aufhört.

Quantitatives. Das Verfahren besitzt mikroanalytische Empfindlichkeit für den Nachweis spurenhafter Beimengungen von, in der Adsorptionsreihe oben stehenden Elementen. So läßt sich z. B. Ferrieisen aus $0,2 \text{ cm}^3 \text{ } m/_{10000}$ -Lösung, d. h. in einer Menge von etwa 1γ , durch Entwicklung mit Kaliumferrocyanid noch neben anderen Metallen in $m/_{1}$ -Lösung, wie Kupfer oder Cobalt nachweisen, ebenso $1 \gamma \text{ Cu}$ in einer $m/_{1}$ -Lösung von Cobalt oder Cadmium. Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß eine $m/_{100}$ -Lösung des Unterschuß-elementes in Zehnerstufen mit einer schwach angesäuerten $m/_{1}$ -Lösung des Überschuß-elementes verdünnt wurde; von jeder Stufe hat man dann $0,2 \text{ cm}^3$ auf eine Säule gegossen (innerer Durchmesser 3—4 mm). Entwickelt wurde mit Kaliumferrocyanid. Das Ansäuern hatte den Zweck, daß die Zone des Unterschuß-metalle nicht ganz oben sitze und die Empfindlichkeit der Berlinerblaureaktion gesteigert werde. Auf der letzten, noch gerade sichtbaren Verdünnungsstufe war oben ein scharfer, einige $1/_{10}$ mm breiter, blauer bzw. brauner Ring sichtbar, bei der nächstgrößeren Verdünnung ergab sich kein wesentlicher Unterschied mehr gegen den Blindversuch.

Auch eine Verwendung zur makroskopisch-quantitativen Analyse ist denkbar. Da alles darauf hindeutet, daß es sich um Austausch-adsorption handelt, ist wegen der konstanten Zahl von austauschfähigen Plätzen pro Längeneinheit und wegen der starken Verdrängung bei der Adsorption, die Länge einer Zone oft ein Maß für die Zahl der anwesenden Äquivalente. Es gibt zwar Abweichungen, doch ist, nach einer empirischen Eichung, eine Schätzung prozentischer Zusammensetzungen möglich.

Trennung von Anionen.

Nach der Untersuchung von SCHWAB und DATTLER ist die chromatographische Scheidung von Anionen nur in bestimmten Spezialfällen nützlich. Ein systematischer Arbeitsgang kommt für die Analyse von verwickelten Säuregemischen nicht in Betracht, schon deshalb nicht, weil die Entwicklung mancher farblosen Anionen zu einer sichtbaren Scheibe unausführbar ist. Für die mit verdünnter Salpetersäure vorbehandelte Aluminiumoxyd-Säule wurde die nachfolgende *Adsorptionsrangordnung* festgelegt.

Vorbereitung des Adsorbens. Man saugt durch eine Al_2O_3 -Säule ($8 \times 0,5$ cm) $2,5$ cm³ n-Salpetersäure, und zwar so rasch, daß niemals Sättigung mit CO_2 auftritt. Zur Entfernung des Säureüberschusses wird dann $2,5$ cm³ Wasser durchgesaugt. Man wäscht die Kolonne, nach dem Aufgießen der zu untersuchenden Alkalisalze, in jedem Fall mit Wasser.

Trennung von Phosphat und Fluorid (Na_2HPO_4 und NH_4F). Bei dem Entwickeln mit salpetersaurer Silbernitratlösung entsteht oben am Rand gelbes Ag_3PO_4 , ebenso tritt bei der Anwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ in HNO_3 oben eine gelbe Zone auf.

Oben: OH^-
 PO_4^{---}
 F^-
 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{----}$, CrO_4^{--}
 SO_4^{--}
 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{----}$, $\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$
 Cl^-
 NO_3^-
 MnO_4^-
 ClO_4^-

Trennung von Chromat und Sulfat (K_2CrO_4 und Na_2SO_4). Es

unten: S^{--}

entsteht in der Säule, wenn Chromat adsorbiert wird, immer ein gelber Chromat- und darunter ein orangefarbiger Bichromatring, deren Mengenverhältnis vom örtlichen p_{H} abhängt. Im vorliegenden Fall geht die gelbe Zone unscharf in die weiße Sulfatschicht über, nach der die scharf abgegrenzte Bichromatzone folgt. Mit Silbernitrat entwickelt: oben rotbraun (Ag_2CrO_4), dann schwach rötlich (Sulfatzone) und zu tiefst stark rotbraun ($\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

Trennung von Sulfat und Ferricyanid (Na_2SO_4 und $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). Noch vor einer Entwicklung wandert beim Waschen das gelbe Ferricyanid nach unten; wird mit AgNO_3 entwickelt, so sieht man oben eine weiße Zone (Sulfat), darunter scharf umrissen, eine orangefarbige: $\text{Ag}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Trennung von Chromat und Chlorid (K_2CrO_4 und NaCl). Es entsteht oben, am Rand eine gelbe, tiefer eine orangefarbige Zone (Chromat und Bichromat). Die obere wird, wenn man mit AgNO_3 entwickelt, rotbraun (Ag_2CrO_4), die untere etwas dunkler ($\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Auf *Belichtung* tritt noch tiefer ein violetter Bezirk auf (Zersetzung von AgCl). Zwischen $\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ und AgCl sieht man eine schmale weiße Schicht, entstanden durch die hemmende Wirkung von Chromat auf die Photolyse des Silberchlorids.

Trennung von Ferricyanid und Chlorid ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ und NaCl). Das gelbe Ferricyanid haftet oben und wird unter der Einwirkung von Silbernitrat orangefarbig; das Chlorid ist tiefer vorgedrungen und wird, nach der Entwicklung mit AgNO_3 , beim Belichten violett.

Reinigung anorganischer Stoffe.

Diese präparative Arbeitsweise wird besonders dann vorteilhaft verwendbar sein, wenn aus einer Lösung kleine Mengen von Ionen zu entfernen sind, welche eine größere Adsorptionsaffinität

besitzen als die Hauptsubstanz. Sie werden dann in dem oberen Bezirk der Säule fixiert. SCHWAB und JOCKERS (2) mußten ihre meisten Reagenzien einer chromatographischen Reinigung unterziehen, und so entfernten sie mühelos Spuren von Eisen, ferner von Blei, Kupfer oder Aluminium. Auch Säurespuren werden auf diesem Wege ausgeschaltet, während ein Alkalimetall in der Aluminiumoxyd-Säule sich nicht entfernen ließ.

Eine weitere Ausarbeitung dieses Gebietes wäre dringend erwünscht, um schwerfällige, ältere Methoden zu ersetzen.

Photographische Aufnahmen von Chromatogrammen.

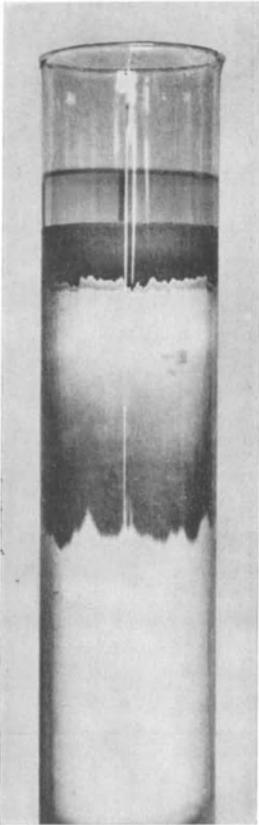


Abb. 51.

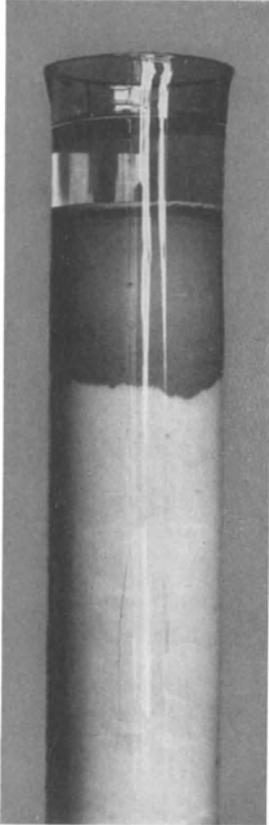


Abb. 52.

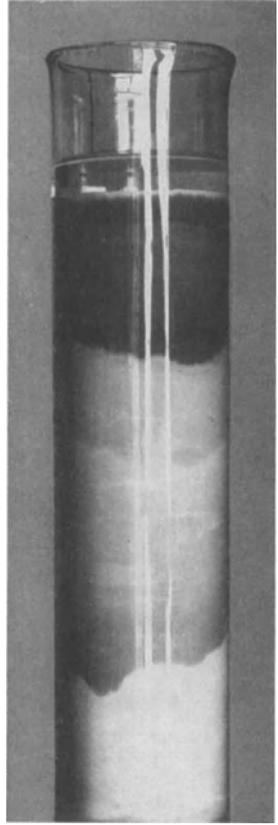


Abb. 53.

Einfaches Chromatogramm. Abb. 51: Zeaxanthin (oben) und β -Carotin (unten), aus Benzin, auf $\text{Ca}(\text{OH})_2$. — Verdrängungsvorgang. Abb. 52: Eine gelbe Zeaxanthinlösung in Benzol + Benzin (1:4) auf CaCO_3 . Abb. 53: Auf dieselbe Säule wurde eine rote Capsanthinlösung gegossen, welche beim Entwickeln das Zeaxanthin nach unten verdrängt hat und nun dessen frühere Lage einnimmt.

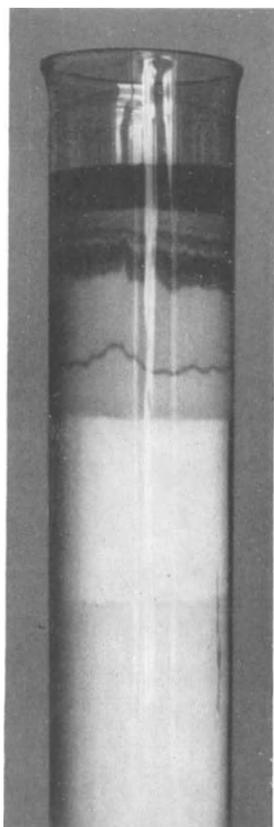


Abb. 54.

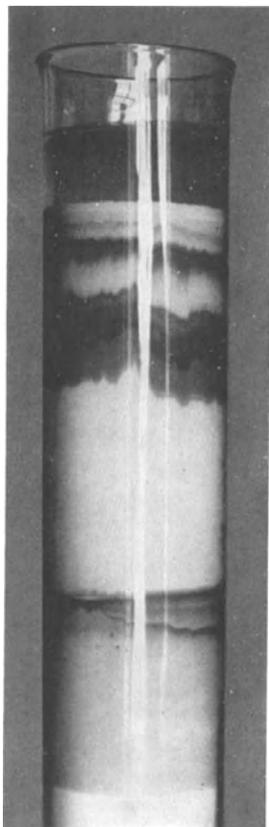


Abb. 55.

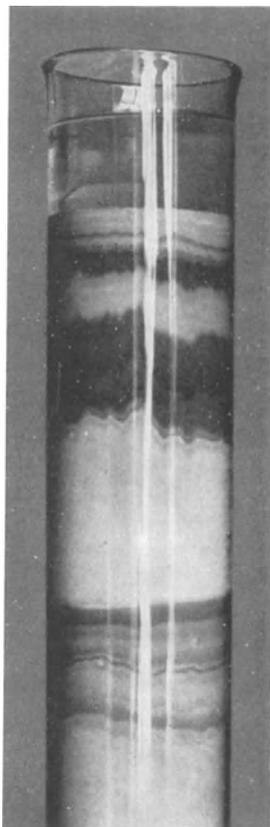


Abb. 56.

Ausbildung eines Chromatogramms (Paprika-Rohauszug, Benzin; das Rohr oben mit CaCO_3 , unten mit Ca(OH)_2 gefüllt). Abb. 54: Sofort nach dem Aufgießen. Abb. 55: Späteres Stadium, noch ungenügend mit Benzin entwickelt. Abb. 56: Fertig entwickelt.

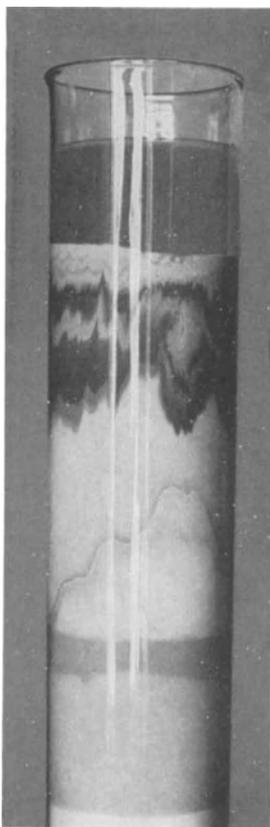


Abb. 57.

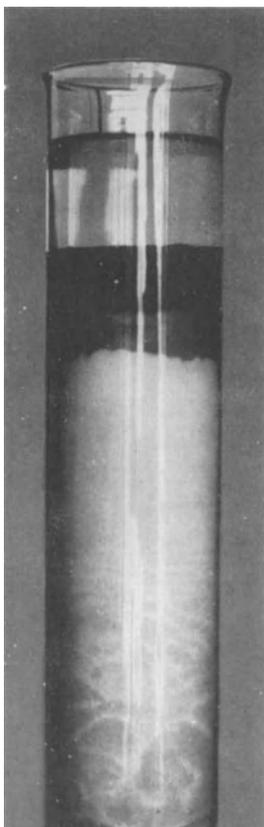


Abb. 58.

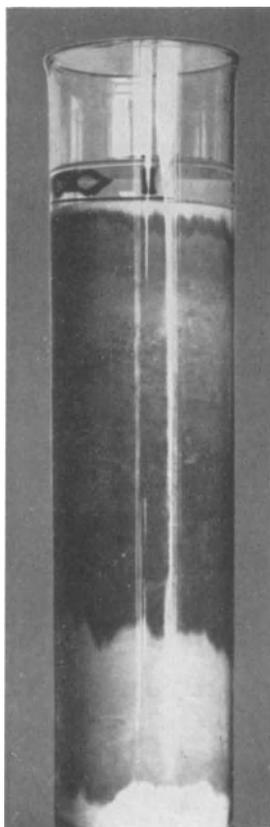


Abb. 59.

Unzweckmäßige Ansätze. Abb. 57: Paprika-Auszug wie Abb. 56, S. 292, das Adsorbens ungleichmäßig eingestampft. — Abb. 58: Capsanthin + Zeaxanthin (Benzol, $\text{Ca}(\text{OH})_2$), Füllmasse schlecht gewählt, Adsorption zu stark, Entwicklung erschwert. Abb. 59: Dasselbe auf CaCO_3 , Adsorption zu schwach, Farbstofflage allzu ausgebreitet, Verhältnis zwischen Adsorbens- und Pigmentmenge ungünstig. (Die Abb. 58—62 beziehen sich auf dasselbe Farbstoff-Gemisch.)

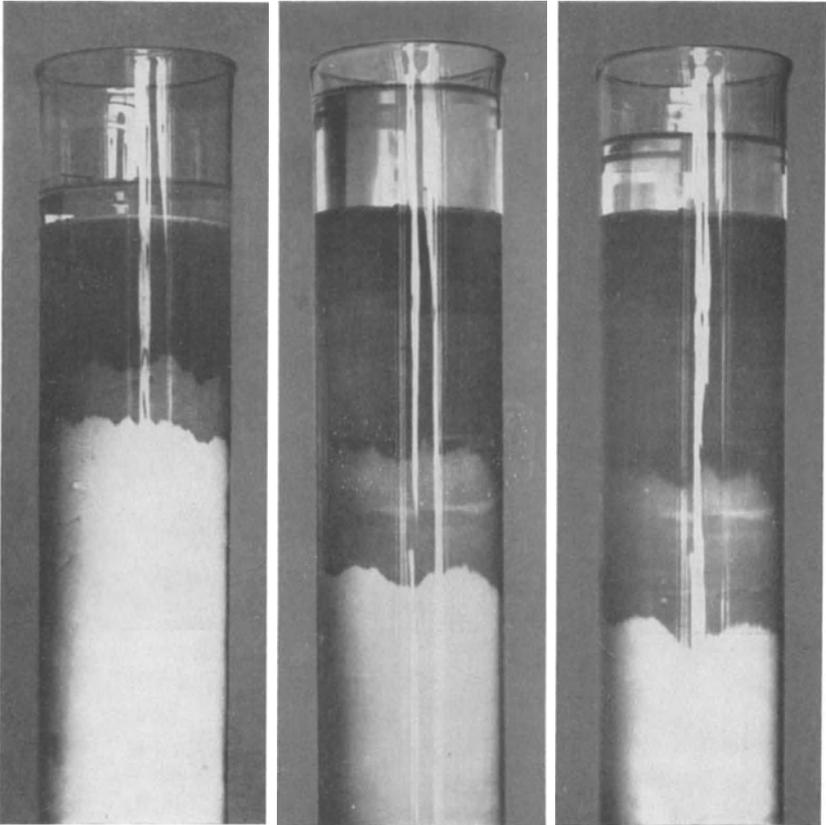


Abb. 60.

Abb. 61.

Abb. 62.

Einfluß des Lösungs- und Entwicklungsmittels. Capsanthin + Zeaxanthin auf CaCO_3 . Abb. 60: Benzol + Benzin (1:10) entwickeln unzureichend. Abb. 61: Benzol + Benzin (1:4), richtig entwickelt. — Abb. 62: mit Schwefelkohlenstoff richtig entwickelt. (Die Abb. 58—62 beziehen sich auf dasselbe Farbstoffgemisch.)

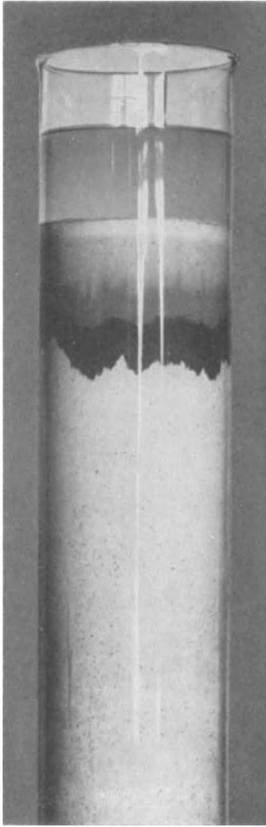


Abb. 63.

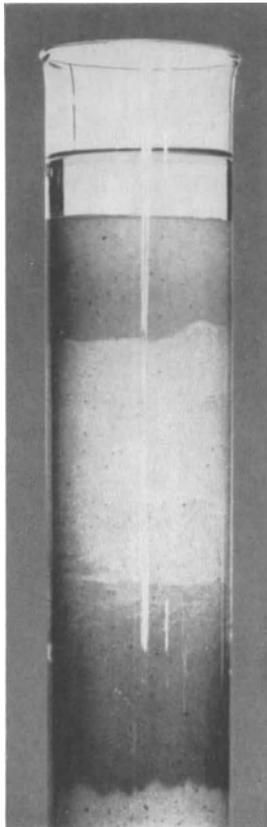


Abb. 64.

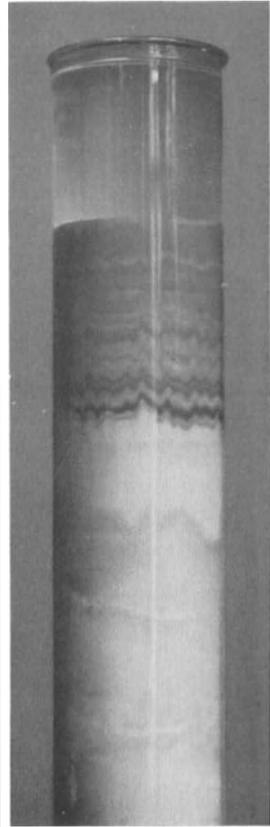


Abb. 65.

Einfluß von Verunreinigungen. Abb. 63: Lycopinhaltiger Pflanzenextrakt (Benzin, $\text{Ca}(\text{OH})_2$). Abb. 64: Dasselbe, vor dem Aufgießen mit Schweinefettlösung versetzt. — Abb. 65: Rohauszug der Orangenschale (CS_2 , CaCO_3); die natürlichen Begleiter des Lipochroms gestatten hier die unmittelbare Ausbildung eines feindifferenzierten Säulenbildes.

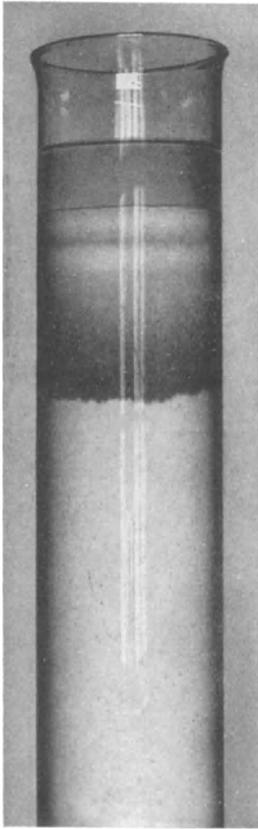


Abb. 66.

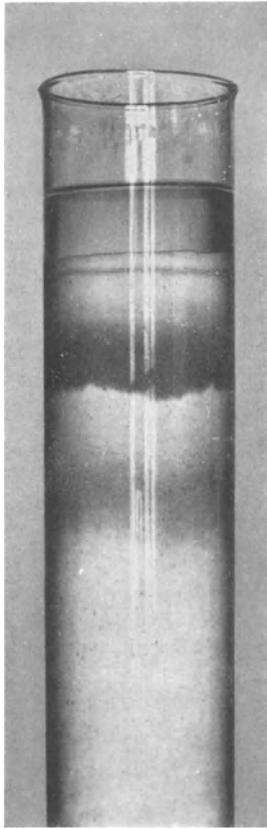


Abb. 67.

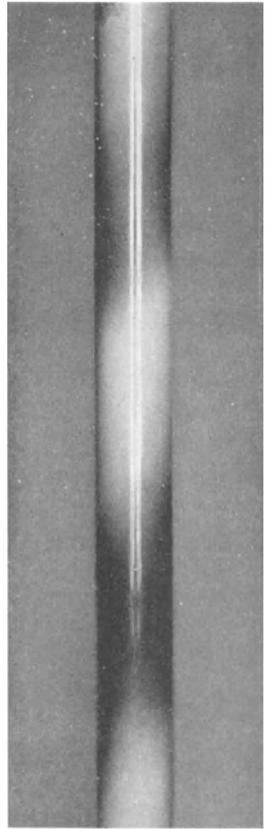


Abb. 68.

Nachweis einer Isomerisierung. Abb. 66: Chromatogramm einer frisch bereiteten Lycopinlösung in Benzol + Benzin (3:1) auf $\text{Ca}(\text{OH})_2$; abgesehen von einem belanglosen Begleiter (Strich oben), ist das Bild homogen. Abb. 67: Eine Probe derselben Lösung 30 Minuten am Rückfluß gekocht, erst dann chromatographiert; eine neue, starke Neolycopinzone unterhalb des Lycopins erschienen (S. 115, 156; ZECHMEISTER und TUZSON 16, 17). — Abb. 68: Trennung von cis- und trans-Azobenzol aus Benzollösung, in einer Al_2O_3 -Säule (ZECHMEISTER, FREHDEN und FISCHER JÖRGENSEN).

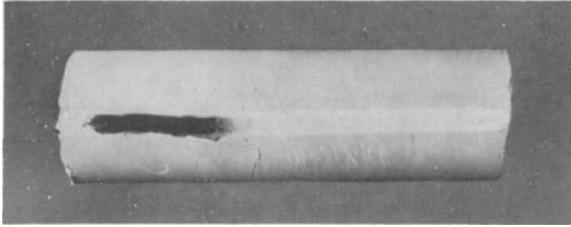


Abb. 69.

Pinseimethode. Nachweis des Vitamins A. Die Benzinlösung wurde auf $\text{Ca}(\text{OH})_2$ chromatographiert und die ausgepreßte, farblos gebliebene Säule mit dem CARR-PRICE-Reagens bestrichen.

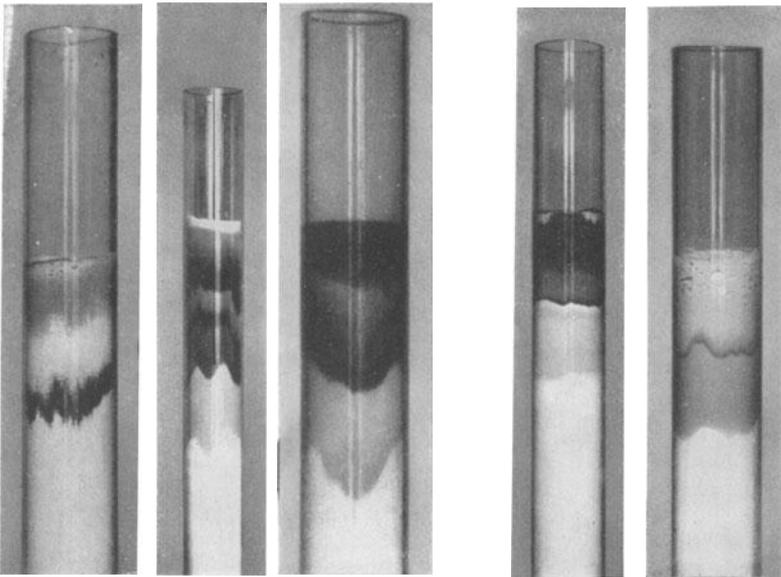


Abb. 70.

Abb. 71.

Abb. 72.

Trennung von anorganischen Kationen in der Al_2O_3 -Säule. Abb. 70. Ferri-, Blei- und Silbernitrat, mit NaOH entwickelt; oben braun (Fe), in der Mitte graustichig weiß (Pb), unten schwarz (Ag). — Abb. 71. Ferri-, Kupfer- und Silbernitrat, mit NaOH entwickelt, Säule nicht belichtet; oben rotbraun (Fe), in der Mitte blau (Cu), unten bläulichgrau (Ag). Abb. 72. Ferri-, Cupri- und Cobaltnitrat, mit Kaliumferrocyanid entwickelt; oben dunkelblau (Fe), in der Mitte ziegelrot (Cu), unten grünstichig grau (Co). (Die Abb. 70—72 wurden auf

Grund der Abhandlung von SCHWAB und JOCKERS 2 angefertigt.)

Abb. 73.

Abb. 74.

Trennung von anorganischen Anionen in der Al_2O_3 -Säule. Abb. 73. Natriumchromat und Natriumchlorid, mit AgNO_3 entwickelt; oben mattrot (Silberchromat), unten hellgrau (Silberchlorid). Abb. 74. Kaliumchromat und Kaliumferricyanid, mit Wasser gewaschen, nicht entwickelt; oben gelb (Chromat), unten grünlich (Ferricyanid). (Die Abb. 73 bis 74 wurden auf Grund der Abhandlung von SCHWAB und DATTLER angefertigt.)

Literaturverzeichnis.

Die Zusammenstellung reicht bis zum Sommer 1938, sie erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Während der Drucklegung erschienene Arbeiten konnten im Haupttext nicht mehr gebührend berücksichtigt werden.

- ACKERMANN, D. u. H. G. FUCHS: Zur Adsorption stickstoffhaltiger Substanzen aus wäßrigen Lösungen. *Ztschr. physiol. Chem.* **240**, 198 (1936).
- ADLER, E. u. M. MICHAELIS: Über die Komponenten der Dehydrase-systeme. X. Zur Kenntnis der Milchsäurehydrase und der Apfelsäuredehydrase aus Herzmuskel. *Ztschr. physiol. Chem.* **238**, 261 (1936).
- ALMASY, F.: Über die Isolierung krebserregender Substanzen unter Verwendung spektographischer Hilfsmethoden. *Biochem. Ztschr.* **291**, 421 (1937).
- AMMUNDSEN, E.: Untersuchungen über das Unverseifbare aus Rattenfaeces. *Biochem. Ztschr.* **284**, 313 (1936).
- ARDASCHEW, B. I.; Zur Methodik der Untersuchung von Roh-anthracen. *Ind. org. Chem.* **1**, 353 (1936) [russ.].
- ARMSTRONG, K. F.: Neue Gebiete in der organischen Chemie. *Chem. Age* **31**, 590 (1934).
- ASAHINA, Y. u. H. AKAGI: Untersuchungen über Flechtenstoffe. LXXXVIII. Über die Zeorin-Gruppe. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **71**, 980 (1938).
- ASKEW, F. A., S. N. FARMER u. G. A. R. KON: Sapogenine. I. Die Sapogenine der Sarsaparilla-Wurzel. *Journ. chem. Soc. London* **1936**, 1399.
- AXELROD, E.: Dissertation. Zürich, 1935.
- BACHMANN, W. E. u. J. M. CHEMERDA: Die Synthese von 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen, 9,10-Diäthyl-1,2-benzanthracen und 5,9,10-trimethyl-1,2-benzanthracen. *Journ. Amer. chem. Soc.* **60**, 1023 (1938).
- BACHSTEZ, M. u. G. CAVALLINI: Beitrag zur Kenntnis südamerikanischer Drogen. I. Über „Bixol“, ein neuer Alkohol aus dem Öl von *Bixa Orellana*. — II. Über die chemische Zusammensetzung von *Convallaria obtusifolia*. *Chim. et Ind.* **17**, 650 (1935).
- BARKAN, G. u. O. SCHALES: (1) Hämoglobin und „leicht abspaltbares“ Eisen bei der Adsorption und bei der Kataphorese. *Ztschr. physiol. Chem.* **244**, 257 (1936).

- BARKAN, G. u. O. SCHALES: (2) Ein wasserlösliches c-Hämin aus Blut. *Ztschr. physiol. Chem.* **246**, 181 (1937).
- (3) Chemischer Aufbau und physiologische Bedeutung des „leicht abspaltbaren“ Bluteisens. *Ztschr. physiol. Chem.* **240**, 96 (1937).
- BATTY, J. W., A. BURAWOY, S. H. HARPER, I. M. HEILBRON u. W. E. JONES: Die Einwirkung des OPPENAUERSchen Reagens' auf primäre Alkohole, Vitamin A inbegriffen. *Journ. chem. Soc. London* **1938**, 175.
- BECKER, E.: Das Fehlen der Pterine in den Exkrementen pterinführender Insekten. *Ztschr. physiol. Chem.* **246**, 177 (1937).
- BECKER, E. u. C. SCHÖPF: Der mikrochemische Nachweis der Pterine in Insekten. *Liebigs Ann.* **524**, 124 (1936).
- BERGEL, F., A. R. TODD u. T. S. WORK: Untersuchungen über Vitamin E. III. Beobachtungen über die Struktur von α - und β -Tocopherol. *Journ. chem. Soc. London* **1938**, 253.
- BERNHAEUER, K.: Einführung in die organisch-chemische Laboratoriumstechnik. Berlin: Julius Springer. 1934.
- BERTHO, A. u. W. GRASSMANN: Biochemisches Praktikum. Leipzig: Walter de Gruyter. 1936.
- BOEKENOOGEN, H. A.: (1) Zur Kenntnis der Ölfarbstoffe. Die Anwendung der Chromatographie in der Fettchemie. *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **56**, 351 (1937).
- (2) Die Chromatographie und ihre Anwendung auf die Untersuchung von Leinöl. *Verfkroniek* **10**, 143 (1937).
- BOWDEN, F. P. u. S. H. BASTOW: Physikochemische Untersuchungen komplexer organischer Moleküle. III. Oberflächeneigenschaften von Vitamin-A-Konzentraten. *Proceed. Roy. Soc., London, Serie B*, **116**, 27 (1934).
- BROCKMANN, H.: (1) Die Carotinoide der Aprikose (*Prunus armeniaca*). *Ztschr. physiol. Chem.* **216**, 45 (1933).
- (2) Die Konstitution des Alkannins, Shikonins und Alkannans. *Liebigs Ann.* **521**, 1 (1936).
- (3) Die Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Thunfischleberöl. *Ztschr. physiol. Chem.* **241**, 104 (1936).
- (4) Die Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Heilbutt-leberöl. *Ztschr. physiol. Chem.* **245**, 96 (1937).
- BROCKMANN, H. u. A. BUSSE: Über das antirachitische Vitamin aus Bluefin Thunleberöl. *Ztschr. physiol. Chem.* **249**, 176 (1937).
- BROCKMANN, H. u. R. HAASE: (1) Über Dracorubin, den roten Farbstoff des „Drachenblutes“. I. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **69**, 1950 (1936).
- (2) Über das Dracorubin. II. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 1733 (1937).
- BROCKMANN, H. u. K. MAIER: Über das Rottlerin. *Liebigs Ann.* **535**, 149 (1938).
- BROCKMANN, H. u. M. L. TECKLEBURG: Der A-Vitamingehalt der Rattenleber nach Fütterung mit α -, β - und γ -Carotin und die

- Antimontrichloridreaktion von A-Vitaminpräparaten. *Ztschr. physiol. Chem.* **221**, 117 (1933).
- BROCKMANN, H. u. O. VÖLKER: Der gelbe Federfarbstoff des Kanarienvogels [*Serinus canaria canaria* (L.)] und das Vorkommen von Carotinoiden bei Vögeln. *Ztschr. physiol. Chem.* **224**, 193 (1934).
- BRUCE, W. F. u. L. F. FIESER: Krebseregende Kohlenwasserstoffe. *Journ. Amer. chem. Soc.* **59**, 479 (1937).
- BRUNNER, O.: Die Farbstoffe der Netzhaut. *Österr. Chemiker-Ztg.* **40**, 203 (1937).
- BRUNNER, O. u. E. BARONI: Zur Kenntnis der Netzhautstoffe. IV. Über die Flavine der Netzhaut. *Monatsh. Chem.* **68**, 264 (1936).
- BRUNNER, O., E. BARONI u. W. KLEINAU: Zur Kenntnis des Sehporpurs. *Ztschr. physiol. Chem.* **236**, 257 (1935).
- BRUNNER, O. u. R. STEIN: Über die Carotinoide von *Rana esculenta*. *Biochem. Ztschr.* **282**, 47 (1935).
- BÜNNING, E. (1) Phototropismus und Carotinoide. I. Phototropische Wirksamkeit von Strahlen verschiedener Wellenlänge und Strahlungsabsorption im Pigment bei *Pilobolus*. *Planta* **26**, 719 (1937).
- (2) Phototropismus und Carotinoide. II. Das Carotin der Reizaufnahmezonen von *Pilobolus*, *Phycomyces* und *Avena*. *Planta* **27**, 148 (1937).
- BUKIN, W. N. u. I. K. MURRI: Chemische Methoden der Bestimmung der Vitamine C und A (Carotin). *Bull. appl. Bot. Genetics Plant Breeding*. Nr. 8, 39 (1935) [russ.].
- BURKHARDT, G. N., I. M. HEILBRON, H. JACKSON, E. G. PARRY u. J. A. LOVERN: Gefärbte Seetieröle. I. Farbstoffe des Seeteufels (*Lophius piscatorius*), der Steingarnele (*Nephrops norvegicus*) und des Wals. *Biochemical Journ.* **28**, 1698 (1934).
- BUTENANDT, A. u. G. MÜLLER: Über Pregnanolen-(3, 20). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **71**, 191 (1938).
- CAHN, R. S. u. R. F. PHIPERS: Durch „aktiviertes“ Aluminium bedingte Reaktionen. *Nature* (London) **139**, 717 (1937).
- CARLSOHN, H. u. G. MÜLLER: (1) Zur Chemie des Tones. I.: Über das Verhalten von Farbstoffen und von zur Farbsalzbildung befähigten organischen Verbindungen an Ton und verwandten Stoffen. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **71**, 858 (1938).
- (2) Zur Chemie des Tones. II.: Über das Verhalten von ätherischen Ölen und deren Bestandteilen an Ton und verwandten Substanzen. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **71**, 863 (1938).
- CASTLE, D. C., A. E. GILLAM, I. M. HEILBRON u. H. W. THOMPSON: Adsorptionsversuche mit Vitamin-A-Konzentraten. *Biochemical Journ.* **28**, 1702 (1934).
- CELSI, S. A.: Die chromatographische Analyse. *An. Farmac. Bioquim.* **8**, 65 (1937).
- CERECEDO, L. R. u. D. J. HENNESSY: Die Anwendung synthetischer Zeolithe bei der Isolierung von Vitamin B₁. I. Versuche mit Reishäuten. *Journ. Amer. chem. Soc.* **59**, 1617 (1937).

- CERECEDO, L. R. u. F. J. KASZUBA: Die Anwendung synthetischer Zeolithe bei der Isolierung von Vitamin B₁. II. Versuche mit Brauereihefe. *Journ. Amer. chem. Soc.* **59**, 1619 (1937).
- CERECEDO, L. R. u. J. J. THORNTON: Die Anwendung synthetischer Zeolithe bei der Isolierung von Vitamin B₁. III. Versuche mit Weizenkeimen. *Journ. Amer. chem. Soc.* **59**, 1621 (1937).
- CHARGAFF, E.: (1) Über die Carotinoide der Bakterien. *Compt. rend. Acad. Sciences* **197**, 946 (1933).
- (2) Untersuchung der Carotinoidpigmente einiger Bakterien. *Ann. Inst. Pasteur* **52**, 415 (1934).
- (3) Studien über die Chemie der Blutkoagulation. IV. Lipid-Inhibitoren der Blutgerinnung, vorkommend im Säugetiergewebe. *Journ. biol. Chemistry* **121**, 175 (1937).
- CHARGAFF, E. u. J. DIERYCK: Die Pigmente der *Sarcina lutea*. *Naturwiss.* **20**, 872 (1932).
- CHARGAFF, E. u. E. LEDERER: Über die carotinoiden Farbstoffe von zwei säurebeständigen Bakterien. *Ann. Inst. Pasteur* **54**, 393 (1935).
- CHOLNOKY, L. v.: (1) Die Verwendung der fraktionierten Adsorption bei der Isolierung natürlicher, organischer Verbindungen. *Magyar chem. Foly.* **39**, 138 (1933) (ungar.).
- (2) Untersuchung des Capsicum annum-Pigments mit Hilfe von Adsorptionsmethoden. *Ber. ung. pharmaz. Ges.* **9**, 400 (1933) (ungar.).
- (3) Die Paprika-farbstoffe und ihre Vitamin-A-Wirkung. *Kisérletügyi közlemények*, **40** (1938) [ungar.].
- CLAR, E.: Über eine Gesetzmäßigkeit im Aufbau der Absorptionsspektren aromatischer Kohlenwasserstoffe. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **66**, 202 (1933).
- COFFARI, E.: Chromatographische Analyse. *Chim. et Ind. (Milano)* **19**, 255 (1937).
- COOK, A. H.: (1) Chromatographische Analyse. *Chem. and Ind.* **55**, 724 (1936).
- (2) Die Darstellung einiger cis-Azoverbindungen. *Journ. chem. Soc. London* **1938**, 877.
- COOK, A. H. u. R. P. LINSTEAD: Phthalocyanine. XI. Die Darstellung von Octaphenylporphyrzinen aus Diphenylmaleinnitril. *Journ. chem. Soc. London* **1937**, 929.
- COOK, J. W., C. L. HEWETT u. I. HIEGER: Die Isolierung eines krebs-erzeugenden Kohlenwasserstoffes aus Steinkohlenteer. *Journ. chem. Soc. London* **1933**, 395.
- COWARD, K. H.: Einige Beobachtungen über die Extraktion und Schätzung der Lipochrome aus tierischen und pflanzlichen Geweben. *Biochemical Journ.* **18**, 1114 (1924).
- CRIEGEE, R.: Zwischenprodukte bei Dehydrierungen mit Chinonen. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **69**, 2758 (1936).
- DAM, H.: Die chromatographische Adsorptionsanalyse. *Kem. Maanord. Handelsbl. kem. Ind.* **16**, 121 (1935) (dän.).

- DAM, H. u. L. LEWIS: Die chemische Anreicherung des Vitamins K. *Biochemical Journ.* **31**, 17 (1937).
- DAM, H. u. F. SCHÖNHEYDER: Das Vorkommen und die chemische Natur des Vitamins K. *Biochemical Journ.* **30**, 897 (1936).
- DANCKWORTT, P. W.: Luminiszenzanalyse im filtrierten ultravioletten Licht. Leipzig: Akad. Verlagsges. 1934.
- DANE, E., O. HÖSS, A. W. BINDSEIL u. J. SCHMITT: Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. II. Die Diensynthese von Derivaten des 1-Äthiny-3,4-dihydronaphthalins und des 1-Vinyl-3,4-dihydro-naphthalins. *Liebigs Ann.* **532**, 39 (1937).
- DANE, E. u. Y. WANG: Die Einführung von Doppelbindungen in Gallensäuren und Sterine. II. Darstellung von Cholestadienol. *Ztschr. physiol. Chem.* **248**, 1 (1937).
- DANE, E., Y. WANG u. W. SCHULTE: Die Einführung von Doppelbindungen in Gallensäuren und Sterine. I. Die Bromierung der 3-Keto-cholansäure und des Cholestenons. *Ztschr. physiol. Chem.* **245**, 80 (1937).
- DÁNIEL, E. v. u. T. BÉRES: Zur Kenntnis des Lipochroms im menschlichen Blutserum. *Ztschr. physiol. Chem.* **238**, 160 (1936).
- DÁNIEL, E. v. u. G. J. SCHEFF: Eine verbesserte Methode zur Bestimmung des Blut-Carotins. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.* **33**, 26 (1935).
- DAS, N.: Über die Komponenten der Dehydrasesysteme. XI. Zur Kenntnis der Glucosedehydrase aus Leber. *Ztschr. physiol. Chem.* **238**, 269 (1936).
- DHÉRÉ, CH.: (1) Umwandlung von Helicohaematin zu Haematorporphyrin. *Journ. Physiol. et Pathol. gén.* **1917**, 67.
- (2) La fluorescence en biochimie. Paris: Presses universitaires. 1937.
- DHÉRÉ, CH. u. A. RAFFY: Untersuchungen über die Fluoreszenz-Spektrochemie der Chlorophyll-Farbstoffe. *Bull. Soc. Chim. biol.* **17**, 1385 (1935).
- DHÉRÉ, CH. u. G. VEGEZZI: (1) Über die pigmentäre Zusammensetzung des Hepatochlorophylls. *Compt. rend. Acad. Sciences* (2), **1916**, 399.
- (2) Über das Helicorubin. *Compt. rend. Acad. Sciences* (1) **1917**, 869.
- (3) Untersuchungen über das Helicorubin. *Journ. Physiol. et Pathol. gén.* **1917**, 44, 53.
- DIELS, O. u. H. F. RICKERT: Über den Identitäts-Nachweis des Dehydrierungs-Kohlenwasserstoffes $C_{18}H_{16}$ aus Sterinen und Geninen mit γ -Methyl-cyclopentano-phenanthren. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **68**, 267 (1935).
- DORÉE, Ch. u. V. A. PETROW: Lanosterin. *Journ. chem. Soc. London* **1936**, 1562.
- DRUMM, P. J., H. SCARBOROUGH u. C. P. STEWART: Die chemische Identifizierung der Ascorbinsäure im Harn. *Biochemical Journ.* **31**, 1874 (1937).

- DRUMMOND, J. C. u. A. A. HOOVER: Studien über Vitamin E (Tocopherol). *Biochemical Journ.* **31**, 1852 (1937).
- DRUMMOND, J. C., A. S. RUIZ u. T. THORBJARNARSON: Anwendung der chromatographischen Adsorptionsanalyse zur Untersuchung der Zusammensetzung des unverseifbaren Rückstandes von Fischölen. *Anales Soc. Española Física Quim.* **33**, 680 (1935).
- DRUMMOND, J. C., E. SINGER u. R. J. MACWALTER: (1) Eine Untersuchung über die unverseifbare Fraktion von Weizenkeimöl, mit besonderer Berücksichtigung von Vitamin E. *Biochemical Journ.* **29**, 456 (1935).
- (2) Weitere Beobachtungen an den Bestandteilen der unverseifbaren Fraktion von Weizenkeimöl, mit besonderer Berücksichtigung von Vitamin E. *Biochemical Journ.* **29**, 2510 (1935).
- DUSCHINSKY, R. u. E. LEDERER: Isolierung des Follikulins und des Equilenins durch chromatographische Adsorption. *Bull. Soc. Chim. biol.* **17**, 1534 (1935).
- ECKART, O.: Die Verfahren zur Aufbereitung gebrauchter Bleicherden. *Chem.-Ztg.* **60**, 153 (1936).
- EDISBURY, J. R. u. R. A. MORTON: Unstimmigkeit zwischen biologischen Versuchen und anderen Methoden der Bestimmung des Vitamins A. II. *Biochemical Journ.* **31**, 258 (1937).
- EKELEN, M. van, A. EMMERIE, H. W. JULIUS u. L. K. WOLFF: Scheidung von Formen des A-Vitamins, gegründet auf die Antimontrichloridreaktion. *Nature* **132**, 171 (1933).
- EKELEN, M. van u. W. PANNEVIS: Resorption von Carotinoiden aus dem Darm des Menschen. *Nature (London)* **141**, 203 (1938).
- ELLINGER, PH. u. W. KOSCHARA: Über eine neue Gruppe tierischer Farbstoffe (Lyochrome). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **66**, 315 (1933).
- EMERSON, O. H., G. A. EMERSON, A. MOHAMMAD u. H. M. EVANS: Die Chemie des Vitamins E. Tocopherole aus verschiedenen Quellen. *Journ. biol. Chemistry* **122**, 99 (1937).
- EMMERIE, A.: Die Carr-Price-Reaktion der Fettsäuren des Dorschlebertranes nach energischer Verseifung. *Nature* **136**, 183 (1935).
- EMMERIE, A., M. VAN EKELEN, B. JOSEPHY u. L. K. WOLFF: Salmensäure, ein Carotinoid aus dem Lachs. *Acta Brevia neerl. Physiol.* **4**, 139 (1934).
- ERNST, P. u. G. WEINER: Chromatogramme und Ultrachromatogramme pharmazeutischer Drogen. *Scientia pharmac., Beilage zur Pharmaz. Presse*, April 1937.
- EULER, H. v. u. E. ADLER: Über die Komponenten der Dehydrase-systeme. IX. Die Co-Dehydrasen- und „Co-Dehydrase II“. Co-Zymase als Wasserstoffüberträger. *Ztschr. physiol. Chem.* **238**, 233 (1936).
- EULER, H. v. u. K. M. BRANDT: Blaufluoreszierende Substanz im Corpus luteum. *Naturwiss.* **23**, 544 (1935); *Ark. Kemi, Mineral. Geol. (B)*, **11**, Nr. 51 (1935).

- EULER, H. v. u. U. GARD: Adsorptionsversuche an Carotinoiden. Ark. Kemi, Mineral. Geol. (B), **10**, Nr. **19** (1931).
- EULER, H. v., U. GARD u. H. HELLSTRÖM: Carotinoide und Vitamin A in tierischen und pflanzlichen Organen. Svensk Kem. Tidskr. **44**, 191 (1932).
- EULER, H. v., P. KARRER, E. ADLER u. M. MALMBERG: Über die Wachstumswirkung der Flavine. Helv. chim. Acta **17**, 1157 (1934).
- EULER, H. v., P. KARRER u. O. WALKER: Über ein Oxyd des Carotins. Helv. chim. Acta **15**, 1507 (1932).
- EULER, H. v., P. KARRER u. U. SOLMSEN: Homologe des Vitamins A (Axeophytols) und ein Abbauprodukt des α -Carotins, α -Apo-2-carotinal. Helv. chim. Acta **21**, 211 (1938).
- EULER, H. v. u. M. MALMBERG: (1) Ascorbinsäure im Diabetikerharn. Svensk Kem. Tidskr. **47**, 55 (1935).
- (2) Vitamine und Katalysatoren in Weizen-Embryonen. Ark. Kemi, Mineral. Geol. (B), **12**, Nr. **14** (1936).
- EULER, H. v. u. F. SCHLENK: (1) Zusammensetzung des Co-Zymasemoleküls. Svensk Kem. Tidskr. **48**, 135 (1936).
- (2) Co-Zymase. Ztschr. physiol. Chem. **246**, 64 (1937).
- EVANS, H. M., O. H. EMERSON u. G. A. EMERSON: Die Isolierung eines Alkohols, α -Tocopherol aus Weizenkeimöl, welcher die Eigenschaften von Vitamin E besitzt. Journ. biol. Chemistry **113**, 319 (1936).
- FABRE, R. u. E. LEDERER: (1) Notiz über die Anwesenheit von Astacin in den Crustaceaen. Compt. rend. Soc. Biologie **113**, 344 (1933).
- (2) Beitrag zum Studium der tierischen Lipochrome. Bull. Soc. Chim. biol. **16**, 105 (1934).
- FARMER, S. N. u. G. A. R. KON: Sapsogenine. II. Sarsasapogenin und Smilagenin. Journ. chem. Soc. London **1937**, 414.
- FERNHOLZ, E.: Über die Konstitution von α -Tocopherol. Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 700 (1938).
- FIESER, L. F. u. E. B. HERSHBERG: (1) Anthracenderivate, verwandt mit Cholanthren. Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 394 (1937).
- (2) 1',2',3',4'-Tetrahydro-10-isopropyl-1,2-benzanthracen. Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 2331 (1937).
- (3) Reduktion und Hydrogenierung von Verbindungen der 1,2-Benzanthracenreihe. Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 2502 (1937).
- (4) 10-substituierte 1,2-Benzanthracenderivate. Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 1028 (1937).
- (5) Reduktion und Hydrogenierung des Methylcholanthrens. Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 940 (1938).
- FIESER, L. F. u. R. P. JACOBSEN: Sarsasapogenin. I. Eine Untersuchung über die Seitenkette. Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 28 (1938).

- FIESER, L. F. u. B. RIEGEL: Die Synthese von 3-substituierten Derivaten des Methylcholanthrens. Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 2561 (1937).
- FIESER, L. F. u. A. M. SELIGMAN: 1'-Methyl- und 1',10-Dimethyl-1,2-benzanthracen. Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 170 (1938).
- FINK, H.: (1) Über die Isolierung der natürlichen Harnporphyrine. Ber. Dtsch. chem. Ges. **70**, 1477 (1937).
- (2) Verfahren zur Gewinnung bzw. Isolierung von feindispers verteilten, eine elektrische Ladung besitzenden Substanzen aus stark verdünnten Lösungen. Österr. Pat. Nr. 143762 (1935).
- FISCHER, H. u. K. BAUER: Purpurine, Rhodine und Rhodinoporphyrine aus Chlorophyll b. Neue Analogien zwischen Chlorophyll a und b. Liebigs Ann. **523**, 235 (1936).
- FISCHER, H. u. J. HASENKAMP: (1) Über die Konstitution des Farbstoffes der Purpurbakterien und über 9-Oxy-desoxo-phäoporphyrin a₈. Liebigs Ann. **515**, 148 (1935).
- (2) Überführung der Vinylgruppe des Chlorophylls und seiner Derivate in den Oxäthyl-rest sowie über Oxo-pyrroporphyrin. Liebigs Ann. **519**, 42 (1935).
- FISCHER, H. u. K. HERRLE: Einwirkung von Licht auf Porphyrine. I. Überführung von Ätio-porphyrin I in bilirubinoide Farbstoffe. Ztschr. physiol. Chem. **251**, 85 (1938).
- FISCHER, H. u. H. J. HOFMANN: (1) Synthese des Desoxo-phyllerythro-ätioporphyrins. Liebigs Ann. **517**, 274 (1935).
- (2) Über die Konstitution des Uro- und Muschelschalen-porphyrins. Nachweis von Uroporphyrin III bei kongenitaler Porphyrurie. Ztschr. physiol. Chem. **246**, 15 (1937).
- FISCHER, H. u. O. LAUBEREAU: Über die Teilsynthese des Meso-pyro-phäophorbids und weitere synthetische Versuche in der Chlorophyll-Reihe. Liebigs Ann. **535**, 17 (1938).
- FISCHER, H., W. LAUTSCH u. K.-H. LIN: Teilsynthesen von Dehydrobacterio-chlorin. Liebigs Ann. **534**, 1 (1938).
- FISCHER, H. u. H. MEDICK: Über die Einwirkung von Diazo-essig-ester auf einige Chlorophyllderivate. Liebigs Ann. **517**, 245 (1935).
- FISCHER, H. u. H. REINECKE: Über Hexa-pyrrene. Ztschr. physiol. Chem. **251**, 204 (1938).
- FISCHER, H. u. W. SCHMIDT: Teilsynthese des Phäophytins und einiger weiterer Phäophorbid-ester. Liebigs Ann. **519**, 244 (1935).
- FISCHER, H. u. G. SPIELBERGER: Teilsynthese von Äthyl-chlorophyllid b sowie über 10-Äthoxy-methylphäophorbid b. Liebigs Ann. **515**, 130 (1935).
- FISCHER, H. u. F. STADLER: Gewinnung von Dihydropyrro-phäophorbid a und Pyro-phäophorbid b aus Schafkot. Ztschr. physiol. Chem. **239**, 167 (1936).
- FOX, D. L.: (1) Weitere Studien der Carotinoide von zwei Fischen des Pazifik, *Fundulus parvipinnis* und *Hypsypops rubicunda*, und Zechmeister-Cholnoky, Chrom. Adsorptionsmethode. 2. Aufl. 20

- von einer Meeres-annelide, *Thoracophelia* sp. *Proceed. National Acad. Sciences, Washington* **22**, 50 (1936).
- FOX, D. L.: (2) Fundort und Nahrung der californischen Seemuschel. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.* **4**, 1 (1936).
- (3) Carotinoide und andere lipidlösliche Farbstoffe im Meere und im Tiefseeschlamm. *Proceed. National Acad. Sciences, Washington* **23**, 295 (1937).
- FRANCK, R.: Chromatographische Adsorptionsanalyse in der Pharmazie. III. Qualitative Untersuchung einiger Arzneistoffe und Arzneizubereitungen. *Arch. Pharmaz. u. Ber. Dtsch. pharmaz. Ges.* **275**, 125 (1937).
- FRISCH, CH., E. LEDERER u. L. WILHEIM: Lipochrome und Glykolyse. *Bull. Soc. Chim. biol.* **18**, 401 (1936).
- FUJISE, SH. u. A. NAGASAKI: Über optisch-aktive Flavanone. II. Die optische Spaltung von Oxy-flavanonen. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **69**, 1893 (1936).
- GAFFRON, H.: (1) Über den Mechanismus der Sauerstoff-Aktivierung durch belichtete Farbstoffe. II. Photooxydation im nahen Infrarot. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **68**, 1409 (1935).
- (2) Über die Kohlensäureassimilation der roten Schwefelbakterien II. *Biochem. Ztschr.* **279**, 1 (1935).
- GATTERMANN, L. u. H. WIELAND: Die Praxis des organischen Chemikers, 24. Aufl. Berlin-Leipzig: Walter de Gruyter. 1936.
- GILLAM, A. E. u. I. M. HEILBRON: (1) Die Carotinoide der Butter. *Biochemical Journ.* **29**, 834 (1935).
- (2) Vitamin-A-aktive Substanzen im Eidotter. *Biochemical Journ.* **29**, 1064 (1935).
- GILLAM, A. E., I. M. HEILBRON, W. E. JONES u. E. LEDERER: Über das Vorkommen und Konstitution des 693-m μ -Chromogens (Vitamin A₂?) von Fischleberölen. *Biochemical Journ.* **32**, 405 (1938).
- GILLAM, A. E. u. M. S. EL RIDI: (1) Die Adsorption von Grass- und Buttercarotin an Tonerde. *Nature* **136**, 914 (1935).
- (2) Carotinoide und Vitamin A im Blutserum der Kuh. *Biochemical Journ.* **29**, 2465 (1935).
- (3) Die Isomerisation von Carotinen durch chromatographische Adsorption. I. Pseudo- α -Carotin. *Biochemical Journ.* **30**, 1735 (1936).
- (4) Das Carotin von Milchfett (Butter). *Biochemical Journ.* **31**, 251 (1937).
- GILLAM, A. E., M. S. EL RIDI u. S. K. KON: Die Isomerisierung von Carotinen durch chromatographische Adsorption. II. Neo- α -carotin. *Biochemical Journ.* **31**, 1605 (1937).
- GIRAL, F.: Über die charakteristischen Lyochrome der Gruppe der fluoreszierenden Bakterien. *An. Soc. espan. Fisica Quim.* **34**, 667 (1936).

- GOPPELSROEDER, F.: Anregung zum Studium der Capillaranalyse. Basel. 1906.
- GRASSMANN, W.: Über chromatographische Adsorptionsanalyse von Gerbstoffen. *Collegium* **9**, 401 (1935).
- GRASSMANN, W. u. O. LANG: Über die chromatographische Adsorptionsanalyse von Gerbstoffen. *Collegium* **9**, 114 (1935).
- GREENE, R. D. u. A. BLACK: (1) Die Extraktion von Vitamin B₁ aus Adsorbaten. *Science* **84**, 185 (1936).
- (2) Die Bereitung von reinem d-Riboflavin aus natürlichen Quellen. *Journ. Amer. chem. Soc.* **59**, 1820 (1937).
- GROTEPASS, W. u. A. DEFALQUE: Über die Porphyrine bei einem Fall von Porphyrurie ohne Porphyrinurie. *Ztschr. physiol. Chem.* **252**, 155 (1938).
- GRUNDMANN, CH.: Synthese von Vinylenhomologen der Glutaconsäure. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 1148 (1937).
- GRUNDMANN, CH. u. Y. TAKEDA: Ein neues Bakterien-carotinoid, Leprotin. *Naturwiss.* **25**, 27 (1937).
- HATINGER, M.: Die Fluoreszenzanalyse in der Mikrochemie. Wien-Leipzig: Emil Haas u. Co. 1937.
- HAMANO, S.: *Bull. Inst. phys. chem. Res. (Abstr.)*, Tokyo **13**, 89 (1934).
- HARTLEY, G. S.: (1) Die cis-Form des Azobenzols. *Nature (London)* **40**, 281 (1937).
- (2) Die cis-Form des Azobenzols und die Geschwindigkeit der thermalen cis → trans-Umwandlung des Azobenzols und einiger Derivate. *Journ. chem. Soc. London* **1938**, 633.
- HAWORTH, R. D. u. W. KELLY: Die Bestandteile von natürlichen Phenolharzen. VIII. Lariciresinol, Cubebin und einige stereochemische Zusammenhänge. *Journ. chem. Soc. London* **1937**, 384.
- HAYASHI, F.: Adsorption von Zuckern an Aktivkohle. *Journ. Biochemistry* **16**, 1 (1932).
- HEILBRON, I. M., R. N. HESLOP, R. A. MORTON, E. T. WEBSTER, J. L. REA u. J. C. DRUMMOND: Charakterisierung hochaktiver Vitamin-A-Präparate. *Biochemical Journ.* **26**, 1178 (1932).
- HEILBRON, I. M., H. JACKSON u. R. N. JONES: Die Lipochrome von See-Anemonen. I. Carotinoide Pigmente von *Actinia equina*, *Anemonia sulcata*, *Actinoloba dianthus* und *Tealia felina*. *Biochemical Journ.* **29**, 1384 (1935).
- HEILBRON, I. M. u. B. LYTHGOE: Die Chemie der Algen. II. Die carotinoiden Pigmente der *Oscillatoria rubrescens*. *Journ. chem. Soc. London* **1936**, 1376.
- HEILBRON, I. M., E. G. PARRY u. R. F. PHIPERS: (1) Die Algen. II. Die Verwandtschaft zwischen gewissen Gehaltsstoffen von Algen. *Biochemical Journ.* **29**, 1376 (1935).
- (2) Die Algen. III. Die Isolierung von Lactoflavin. *Biochemical Journ.* **29**, 1382 (1935).
- HEILBRON, I. M. u. R. F. PHIPERS: Die Algen. I. Die Lipochrome des *Fucus vesiculosus*. *Biochemical Journ.* **29**, 1369 (1935).

- HELBERGER, J. H., A. v. REBAY u. D. B. HEVÉR: Über die Einwirkung von Metallen auf o-Cyanacetophenon sowie auf 3-Methylphthalimidin; Synthese des Tetrabenzoporphins. III. Mitt. zur Kenntnis der Benzoporphine. Liebigs Ann. **533**, 197 (1938).
- HENDERSON, G. M. u. H. G. RULE: Eine neue Methode zur Spaltung einer Racemverbindung. Nature (London) **141**, 917 (1936).
- HESSE, G.: (1) Über physikalische Methoden im chemischen Laboratorium. Die chromatographische Analyse und ihre Anwendung. Angew. Chem. **49**, 315 (1936).
- (2) Über das Drachenblut. Liebigs Ann. **524**, 14 (1936).
- HESSE, G. u. F. REICHENEDER: Über das afrikanische Pfeilgift Calotropin. I. Liebigs Ann. **526**, 252 (1936).
- HEY, D.: Eloxanthin — ein neuer Carotinoidfarbstoff aus dem Laichkraut *Elodea canadensis*. Biochemical Journ. **31**, 532 (1937).
- HILLEMANN, H.: Zur Kenntnis des „Sterinkohlenwasserstoffs C₁₈H₁₆“ und über zwei Isomere desselben. Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 2610 (1936).
- HIRSCHMANN, H. u. O. WINTERSTEINER: Die Isolierung von oestrogenen Diolen aus dem Harn trächtiger Stuten. Journ. biol. Chemistry **122**, 303 (1938).
- HOERBURGER, W.: Zur Kenntnis der Porphyrinfluorescenz und deren Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. Diss. Erlangen 1933.
- HOFFMANN LA ROCHE u. Co. A. S. (Basel): Verfahren zur Darstellung des internationalen Standardpräparates von Oestron. D. R. P. Ann. Kl. 12p, 17/10, eingetr. 13. VII. 36.
- HOFMEIER, H., S. WISSELINCK u. A. MÜLLER: Versuche zur Entschwefelung eines rohen Braunkohlenleichtöls mit Hilfe von Adsorptionsmitteln. Angew. Chem. **47**, 513 (1934).
- HOLMES, H. N. u. J. A. ANDERSON: Eine neue Art von Kieselsäuregel. Ind. engin. Chem. **17**, 280 (1925).
- HOLMES, H. N., H. CASSIDY, R. S. MANLY u. E. R. HARTZLER: Darstellung eines kräftig wirkenden Vitamin-A-Konzentrats. Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 1990 (1935).
- HOLMES, H. N., V. G. LAVA, E. DELFS u. H. G. CASSIDY: Vergleichende Untersuchungen über das Adsorptionsverhalten von rohem Vitamin A, Carotin und Cholesterin. Journ. biol. Chemistry **99**, 417 (1933).
- HUBER, W.: Über einige synthetische Versuche an Polyterpenen. Ber. Dtsch. chem. Ges. **71**, 725 (1938).
- HÜTTEL, R. u. H. BEHRINGER: Über das Vorkommen von Pflanzensterinen in Kröten. Ztschr. physiol. Chem. **245**, 175 (1937).
- I. G. Farbenindustrie A. G.: Kristallisierte Derivate des Vitamins E. D. R. P. 651474 (1937).
- INGRAHAM, M. A. u. H. STEENBOCK: Die Beziehung von Mikroorganismen zu Carotinoiden und Vitamin A. II. Die Erzeugung von

- Carotinoiden durch *Mycobacterium Phlei*. *Biochemical Journ.* **29**, 2553 (1935).
- ITO, T., H. SUGNOME, K. UENO u. SH. WATABANE: Über die Farbstoffe des Goldröschens, *Kerria Japonica* DC. *Bull. chem. Soc. Japan* **11**, 770 (1936).
- JACOBS, W. A. u. M. HEIDELBERGER: Sarmenocymarin und Sarmenogenin. *Journ. biol. Chemistry* **81**, 765 (1929).
- JENSEN, P.: Die Bedeutung der chromatographischen Adsorptionsanalyse für die Untersuchung von Teerfarbstoffen und Zwischenprodukten. Dissertation, Eidg. Techn. Hochschule Zürich, 1936.
- JOHN, W.: (1) Über das Cumo-tocopherol, einen neuen Faktor der Vitamin E-Gruppe. *Ztschr. physiol. Chem.* **250**, 11 (1937).
- (2) Über die Identität von Cumo-tocopherol und β -Tocopherol. *Ztschr. physiol. Chem.* **252**, 201 (1938).
- (3) Notiz über die Konstitution des α -Tocopherols. *Ztschr. physiol. Chem.* **252**, 222 (1938).
- (4) Über die Konstitutionsaufklärung des Vitamins E. *Naturwiss.* **26**, 449 (1938).
- JOHN, W., E. DIETZEL u. PH. GÜNTHER: Über die Jodwasserstoffspaltung der Tocopherole. *Ztschr. physiol. Chem.* **252**, 208 (1938).
- KARRER, P.: Chemie der Vitamine A und C. *Chem. Reviews* **14**, 17 (1934).
- KARRER, P., H. v. EULER u. U. SOLMSEN: Oxydationsprodukte des α -Carotins. Über Zusammenhänge zwischen Konstitution und Vitamin-A-Wirkung. *Helv. chim. Acta* **17**, 1169 (1934).
- KARRER, P., H. FRITZSCHE, B. H. RINGIER u. H. SALOMON: α -Tocopherol. *Helv. chim. Acta* **21**, 520 (1938).
- KARRER, P. u. H. HÜBNER: Capsanthol, ein Reduktionsprodukt des Capsanthins. *Helv. chim. Acta* **19**, 474 (1936).
- KARRER, P., H. KOENIG u. U. SOLMSEN: α -Citaurin, ein Abbauprodukt des Xanthophylls. *Helv. chim. Acta* **21**, 445 (1938).
- KARRER, P. u. R. MORF: Synthese des Perhydrovitamins A. Reinigung der Vitamin-A-Präparate. *Helv. chim. Acta* **16**, 625 (1933)
- KARRER, P., R. MORF u. K. SCHÖPP: Zur Kenntnis des Vitamins A aus Fischtranen. *Helv. chim. Acta* **14**, 1036, 1431 (1931).
- KARRER, P., R. MORF u. O. WALKER: (1) Konstitution des α -Carotins. *Nature (London)* **132**, 171 (1933).
- (2) Konstitution des α -Carotins. *Helv. chim. Acta* **16**, 975 (1933).
- KARRER, P. u. N. NIELSEN: Trennung von Substanzgemischen im Chromatogramm und Ultrachromatogramm. Zangger-Festschrift, S. 954. Zürich: Rascher & Co. 1934.
- KARRER, P., H. OBST u. U. SOLMSEN: Partieller Abbau des Azafrins mit Kaliumpermanganat. *Helv. chim. Acta* **21**, 451 (1938).
- KARRER, P. u. A. OSWALD: Carotinoide aus den Staubbeuteln von *Lilium tigrinum*. Ein neues Carotinoid: Antheraxanthin. *Helv. chim. Acta* **18**, 1303 (1935).

- KARRER, P., A. RÜEGGER u. U. SOLMSEN: β -Citraurin, ein Abbauprodukt des Zeaxanthins. *Helv. chim. Acta* **21**, 448 (1938).
- KARRER, P. u. H. SALOMON: (1) Bestandteile von Pflanzenkeimlingen I. Über neue Verbindungen aus den unverseifbaren Anteilen des Weizenkeimlingsöls. *Helv. chim. Acta* **20**, 424 (1937).
- (2) Die Isolierung der Tocopherole aus Weizenkeimlingsöl. *Helv. chim. Acta* **21**, 514 (1938).
- KARRER, P., H. SALOMON u. H. FRITZSCHE: Zur Kenntnis des Vitamins E. *Helv. chim. Acta* **21**, 309 (1938).
- KARRER, P., H. SALOMON u. K. SCHÖPP: Isolierung des Hepaflavins. *Helv. chim. Acta* **17**, 419 (1934).
- KARRER, P. u. W. SCHLIENTZ: Zum Vorkommen von α - und β -Carotin in verschiedenen Naturprodukten. *Helv. chim. Acta* **17**, 7 (1934).
- KARRER, P. u. K. SCHÖPP: (1) Trennung von Vitamin A, Carotin und Xanthophyllen. *Helv. chim. Acta* **15**, 745 (1932).
- (2) Filtrationen bei tiefer Temperatur. Chromatographische Analyse farbloser Substanzen (Ultrachromatogramm). *Helv. chim. Acta* **17**, 693 (1934).
- (3) Isolierung des Lyochroms aus Eigelb (Ovoflavin g). *Helv. chim. Acta* **17**, 735 (1934).
- (4) Isolierung eines pflanzlichen Flavins. *Helv. chim. Acta* **17**, 771 (1934).
- KARRER, P., K. SCHÖPP u. R. MORF: Zur Kenntnis der isomeren Carotine und ihre Beziehungen zum Wachstumsvitamin A. *Helv. chim. Acta* **15**, 1158 (1932).
- KARRER, P. u. U. SOLMSEN: (1) Zur Kenntnis der Oxydationsprodukte der Carotine. Das Carotinoide der *Thiocystis*-Bakterien. *Helv. chim. Acta* **18**, 25 (1935).
- (2) Die Carotinoide der Purpurbakterien I. *Helv. chim. Acta* **18**, 1306 (1935).
- (3) Die Carotinoide der Purpurbakterien. II. Über Rhodoviolascin. *Helv. chim. Acta* **19**, 3 (1936).
- (4) Überführung von Rhodoxanthin in Zeaxanthin. *Helv. chim. Acta* **18**, 477 (1935).
- (5) Über das Vorkommen von Carotinoiden bei einigen Meeresstieren. *Helv. chim. Acta* **18**, 915 (1935).
- (6) Carotinoide aus Purpurbakterien. III. *Helv. chim. Acta* **19**, 1019 (1936).
- (7) β -Carotinal, ein Abbauprodukt des β -Carotins. *Helv. chim. Acta* **20**, 682 (1937).
- (8) Stufenweiser Abbau des labilen und stabilen Bixins. Zur Stereochemie der Carotinoide. *Helv. chim. Acta* **20**, 1936 (1937).
- KARRER, P., U. SOLMSEN u. W. GUGELMANN: β -Apo-4-carotinal, ein weiteres Abbauprodukt des β -Carotins. *Helv. chim. Acta* **20**, 1020 (1937).
- KARRER, P., U. SOLMSEN u. H. KOENIG: Carotinoide aus Purpurbakterien. IV. *Helv. chim. Acta* **21**, 454 (1938).

- KARRER, P., U. SOLMSSSEN u. O. WALKER: Vorläufige Mitteilung über neue Oxydationsprodukte aus α -Carotin und Physalinen. α -Carotindijodid. *Helv. chim. Acta* **17**, 417 (1934).
- KARRER, P. u. F. M. STRONG: (1) Reindarstellung von Anthocyanen durch chromatographische Analyse. *Helv. chim. Acta* **19**, 25 (1936).
— (2) Synthetische Versuche in der Flavinreihe. *Helv. chim. Acta* **19**, 483 (1936).
- KARRER, P. u. O. WALKER: (1) Reines α -Carotin. *Helv. chim. Acta* **16**, 641 (1933).
— (2) Untersuchungen über die herbstlichen Färbungen der Blätter. *Helv. chim. Acta* **17**, 43 (1934).
- KARRER, P., O. WALKER, K. SCHÖPP u. R. MORF: Isomere Formen des Carotins und die weitere Reinigung von Vitamin A. *Nature (London)* **132**, 26 (1933).
- KARRER, P. u. H. M. WEBER: Zerlegung natürlicher Anthocyan-gemische durch chromatographische Adsorptionsanalyse. II. Über „Althaein“. *Helv. chim. Acta* **19**, 1025 (1936).
- KARRER, P. u. H. WEHRLI: 25 Jahre Vitamin-A-Forschung. *Nova Acta Leopoldina (Halle a. S.), N. F.* **1**, 175—275 (1933).
- KÖGL, F. u. W. B. DEIJS: Untersuchungen über Pilzfarbstoffe. XII. Die Synthese von Boletol und Isoboletol. *Liebigs Ann.* **515**, 23 (1935).
- KÖGL, F., A. J. HAAGEN-SMIT u. H. ERXLEBEN: Über ein neues Auxin (Hetero-auxin) aus Harn. *Ztschr. physiol. Chem.* **228**, 90 (1934).
- KOLTHOFF, I. M., W. v. FISCHER u. CH. ROSENBLUM: Die Adsorption von Wollviolett (4 BN) durch Bleisulfat und der Einfluß des adsorbierten Farbstoffs auf die Geschwindigkeit des kinetischen Austausches. *Journ. Amer. chem. Soc.* **56**, 832 (1934).
- KOLTHOFF, I. M. u. CH. ROSENBLUM: Die spezifische Oberfläche und die Adsorptionseigenschaften von Bleisulfat. *Journ. Amer. chem. Soc.* **55**, 851, s. auch 2664 (1933).
- KONDO, H.: Chromatographische Analyse der organischen Molekülverbindungen. *Journ. pharmac. Soc. Japan Trans.* **57**, 218 (1937).
- KONDO, H. u. S. OHNO: Untersuchung über die Bestandteile des „Senso“. *Journ. pharmac. Soc. Japan Trans.* **58**, 15 (1938).
- KONDO, H., M. TOMITA u. S. UYEO: Über das Methyl-isochondodendrin (XLVI. Mitt. über Sinomenium- und Cocculus-Alkaloide). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 1890 (1937).
- KOSCHARA, W.: (1) Über ein Lyochrom aus Harn (Uro-flavin). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **67**, 761 (1934).
— (2) Über die Einwirkung von Licht auf Lyochrome. *Ztschr. physiol. Chem.* **229**, 103 (1934).
— (3) Über Harnlyochrome. *Ztschr. physiol. Chem.* **232**, 101 (1935).
— (4) Adsorptionsanalyse wäßriger Lösungen. *Ztschr. physiol. Chem.* **239**, 89 (1936).

- KOSCHARA, W.: (5) Isolierung eines gelben Farbstoffes (Uropterin) aus Menschenharn. *Ztschr. physiol. Chem.* **240**, 127 (1936).
- (6) Die TSWETSche Adsorptionsanalyse. *Chem.-Ztg.* **61**, 185 (1937).
- KOTAKE, M. u. K. KUWADA: (1) Chemische Versuche über Krötengift. VII. Zur Kenntnis der Bestandteile des Ch' an Su sowie der Konstitution des Cinobufagins und des Cinobufotalins. *Scient. Papers Inst. physical chem. Res.* **32**, 79 (1937).
- (2) Chemische Versuche über Krötengift. VI. Zur Kenntnis der Bestandteile des Ch' an Su (Senso). *Scient. Papers Inst. physical chem. Res.* **32**, 1 (1937).
- KRÄNZLIN: Anatomische und farbstoffanalytische Untersuchungen an panachierten Pflanzen. *Dissertation*. Berlin, 1908.
- KRAUT, H.: Methoden der Adsorption und Elution. In OPPENHEIMER-PINKUSSEN, *Methodik der Fermente*. Leipzig: Georg Thieme. 1929.
- KUHN, R. u. H. BROCKMANN: (1) α -Carotin aus Palmöl. *Ztschr. physiol. Chem.* **200**, 255 (1931).
- (2) Prüfung von α - und β -Carotin an der Ratte (Über das Vitamin des Wachstums, II. Mitt.). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **64**, 1859 (1931).
- (3) Bestimmung von Carotinoiden. *Ztschr. physiol. Chem.* **206**, 41 (1932).
- (4) Hydrierungs- und Oxydationsprodukte der Carotine als Vorstufen des A-Vitamins. *Ztschr. physiol. Chem.* **213**, 1 (1932).
- (5) Flavoxanthin. *Ztschr. physiol. Chem.* **213**, 192 (1932).
- (6) Über die ersten Oxydationsprodukte des β -Carotins. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **65**, 894 (1932).
- (7) Über ein neues Carotin. *Naturwiss.* **21**, 44 (1933).
- (8) γ -Carotin (Über das Vitamin des Wachstums, IV. Mitt.). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **66**, 407 (1933).
- (9) Über Rhodoxanthin, den Arillus-Farbstoff der Eibe (*Taxus baccata*). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **66**, 828 (1933).
- (10) Semi- β -carotinon; ein Verfahren zur Ausführung chemischer Reaktionen. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **66**, 1319 (1933).
- (11) Über die Wachstumswirkung der Carotine und Xanthophylle. *Ztschr. physiol. Chem.* **221**, 129 (1933).
- (12) Die Konstitution des β -Carotins. (Vorläuf. Mitt.) *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **67**, 885 (1934).
- (13) Über das β -Oxy-carotin. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **67**, 1408 (1934).
- (14) Über den stufenweisen Abbau und die Konstitution des β -Carotins. *Liebigs Ann.* **516**, 95 (1935).
- KUHN, R. u. A. DANSI: Über eine molekulare Umlagerung von N-Glucosiden. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **69**, 1745 (1936).
- KUHN, R., P. DESNUELLE u. F. WEYGAND: Zur Spezifität des Lactoflavins; die Bedeutung der Stellung der Methylgruppen. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 1293 (1937).

- KUHN, R. u. A. DEUTSCH: Die Konstitution des Azafrins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 883 (1933).
- KUHN, R. u. CH. GRUNDMANN: (1) Die Konstitution des Lycopins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **65**, 1880 (1932).
- (2) Die ersten Oxydationsprodukte des Lycopins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **65**, 898 (1932).
- (3) Über Kryptoxanthin, ein Xanthophyll der Formel $C_{40}H_{56}O$ (Über das Vitamin des Wachstums, V. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 1746 (1933).
- (4) Über Rubixanthin, ein neues Xanthophyll der Formel $C_{40}H_{56}O$. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 339 (1934).
- (5) Kryptoxanthin aus gelbem Mais (Über das Vitamin des Wachstums, VI. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 593 (1934).
- (6) Über die sterischen Reihen der Xanthophylle. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 596 (1934).
- (7) Über einen neuen Weg zum Aufbau von Polyenen; Synthese der Hexatrien-1.6- und Oktatetraen-1.8-dicarbonensäure. Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 1757 (1936).
- (8) Synthese von Des-crocetin (Tetradecaheptaen-[1, 3, 5, 7, 11, 13]-dicarbonensäure-[1, 14]). Ber. Dtsch. chem. Ges. **70**, 1318 (1937).
- (9) Über die Synthese von 1,6-Dimethyl-hexatrien, 1,8-Dimethyloktatetraen und 1,12-Dimethyl-dodecahexaen. Ber. Dtsch. chem. Ges. **71**, 442 (1938).
- KUHN, R., P. GYÖRGY u. TH. WAGNER-JAUREGG: (1) Über eine neue Klasse von Naturfarbstoffen. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 317 (1933).
- (2) Über Ovoflavin, den Farbstoff des Eiklars. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 576 (1933).
- (3) Über Lactoflavin, den Farbstoff der Molke. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 1034 (1933).
- KUHN, R. u. H. KALTSCHMITT: Isolierung von Lactoflavin (Vitamin B_2) aus Heu. Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 128 (1935).
- KUHN, R. u. E. LEDERER: (1) Zerlegung des Carotins in seine Komponenten (Über das Vitamin des Wachstums, I. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **64**, 1349 (1931).
- (2) Taraxanthin, ein neues Xanthophyll mit 4 Sauerstoffatomen. Ztschr. physiol. Chem. **200**, 108 (1931).
- (3) Über α - und β -Carotin. Ztschr. physiol. Chem. **200**, 246 (1931).
- (4) Iso-carotin (Über das Vitamin des Wachstums, III. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **65**, 637 (1932).
- (5) Über Taraxanthin. Ztschr. physiol. Chem. **213**, 188 (1932).
- KUHN, R., E. LEDERER u. A. DEUTSCH: Astacin aus den Eiern der Seespinne (Maja squinado). Ztschr. physiol. Chem. **220**, 229 (1933).
- KUHN, R. u. C. J. O. R. MORRIS: Synthese von Vitamin A. Ber. Dtsch. chem. Ges. **70**, 853 (1937).
- KUHN, R., K. REINEMUND, F. WEYGAND u. R. STRÖBELE: Über die Synthese des Lactoflavins (Vitamin B_2). Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 1765 (1935).

- KUHN, R. u. H. RUDY: 6,7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure. Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 300 (1935).
- KUHN, R. u. A. SMAKULA: Spektrophotometrische Analyse des Eidotterfarbstoffes. Ztschr. physiol. Chem. **197**, 161 (1931).
- KUHN, R. u. R. STRÖBELE: Über o-Nitranilin-glucoside. Ber. Dtsch. chem. Ges. **70**, 773 (1937).
- KUHN, R., H. VETTER u. P. DESNUELLE: Homologe des o-Nitrophenyl-hydroxylamins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **70**, 1315 (1937).
- KUHN, R., H. VETTER u. H. W. RZEPPA: Zur Spezifität des Lactoflavins; Ersatz der Methylgruppe durch den Tetramethylen- und Trimethylen-Ring. Ber. Dtsch. chem. Ges. **70**, 1302 (1937).
- KUHN, R., TH. WAGNER-JAUREGG u. H. KALTSCHMITT: Über die Verbreitung der Flavine im Pflanzenreich. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 1452 (1934).
- KUHN, R. u. K. WALLENFELS: Über Kumulene I.; Synthese von Tetraphenyl-hexapentaen und Di-biphenylen-hexapentaen. Ber. Dtsch. chem. Ges. **71**, 783 (1938), siehe auch S. 1510.
- KUHN, R. u. F. WEYGAND: Synthese des 6,7-Dimethyl-9-n-amyflavins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 1941 (1934).
- KUHN, R. u. A. WINTERSTEIN: (1) Viola-xanthin, das Xanthophyll des gelben Stiefmütterchens (*Viola tricolor*). Ber. Dtsch. chem. Ges. **64**, 326 (1931).
- (2) Reduktion mit Zinkstaub in Pyridin (III. Mitt.). Unkehrbare Hydrierung und Dehydrierung der Chlorophylle. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 1741 (1933).
- (3) Ketten-Verkürzung und Cyclisierung beim thermischen Abbau natürlicher Polyen-Farbstoffe. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 1733 (1933).
- (4) Über die Konstitution des Pikrocrocins und seine Beziehung zu den Carotin-Farbstoffen des Safrans. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 344 (1934).
- (5) Über konjugierte Doppelbindungen I—IV. Helv. chim. Acta **11**, 87, 116, 123, 144 (1928).
- (6) Zur Kenntnis der Äthylengruppe als Chromophor. Helv. chim. Acta **12**, 899 (1929).
- KUHN, R., A. WINTERSTEIN u. E. LEDERER: Zur Kenntnis der Xanthophylle. Ztschr. physiol. Chem. **197**, 141 (1931).
- KUWADA, S. u. S. MORIMOTO: Untersuchungen über Sterine. V. Identifizierung des α -Typhasterins mit Sitosterin. Journ. pharmac. Soc. Japan **57**, 62 (1937).
- LANGE, E. u. K. NAGEL: Vorschlag einer Trennung der seltenen Erden durch chromatographische Adsorptionsanalyse. Ztschr. Elektr. angew. physik. Chem. **42**, 210 (1936).
- LEDERER, E.: (1) Die chromatographische Adsorption und ihre Anwendungen. Chim. et Ind. **33**, 1072 (1935).
- (2) Les caroténoïdes des plantes. Paris: Herrmann et Cie. 1934.
- (3) Les caroténoïdes des animaux. Paris: Herrmann et Cie. 1935.

- LEDERER, E.: (4) Über die Carotinoide einer roten Hefe (*Torula rubra*). *Compt. rend. Acad. Sciences* **197**, 1694 (1933).
- (5) Notiz über die Lipochrome der *Actinia equina* (L.). *Compt. rend. Soc. Biologie* **113**, 1391 (1933).
- (6) Über die Carotinoide des Teguments einiger Insekten (*Coccinella septempunctata*, *Pyrrhocoris apterus*, *Oedipoda miniata*). *Compt. rend. Soc. Biologie* **117**, 413 (1934).
- (7) Über die Carotinoide von drei Ascidien (*Halocynthia papillosa*, *Dendrodoa grossularia*, *Botryllus Schlosseri*). *Compt. rend. Soc. Biologie* **117**, 1083 (1934).
- (8) Über ein neues Carotinoid, gefunden in der Jacobsmuschel (*Pecten maximus*). *Compt. rend. Soc. Biologie* **116**, 150 (1934).
- (9) Über die Carotinoide von einigen Pilzen. *Compt. rend. Soc. Biologie* **117**, 1083 (1935).
- (10) Echinenon und Pentaxanthin; zwei neue Carotinoide, gefunden im Seeigel (*Echinus esculentus*). *Compt. rend. Acad. Sciences* **201**, 300 (1935).
- (11) Die chromatographische Adsorption und ihre Anwendungen. *Shurn. obschtschei Chim.* **6**, 499 (1936) (russ.).
- (12) Recherches sur les caroténoïdes des animaux inférieurs et des cryptogames. Lons-le-Saunier: Declume 1938.
- LEDERER, E. u. T. MOORE: Echinenon als Provitamin A. *Nature* (London) **137**, 996 (1936).
- LEVI, G. R. u. A. GIERA: Chromatographie von Acetylcellulosen. *Gazz. chim. Ital.* **67**, 719 (1937).
- LIPMAA, TH.: Über die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Rhodoxanthins. *Compt. rend. Acad. Sciences* **182**, 867 (1926).
- LOU, C. H.: Chromatogramme von biologischen Farbstoffen auf sauren und basischen Adsorbentien. *Stain Technol.* **12**, 119 (1937).
- LYNEN, F. u. U. WIELAND: Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. IV. *Liebigs Ann.* **533**, 93 (1937).
- MACKINNEY, G.: (1) Blattearotine. *Journ. biol. Chemistry* **111**, 75 (1935).
- (2) Über die Plastidpigmente der Sumpf-Flachsseide. *Journ. biol. Chemistry* **112**, 421 (1935).
- (3) Einige Absorptionsspektren von Blattextrakten. *Plant Physiol.* **13**, 123 (1938).
- MACKINNEY, G. u. H. W. MILNER: Karottenblatt-Carotin. *Journ. Amer. chem. Soc.* **55**, 4728 (1933).
- MALMBERG, M. u. H. v. EULER: Körpergewichtszunahme durch Körner von Weizen, Hafer und Gerste bei Vitamin-A-frei ernährten Ratten. *Biochem. Ztschr.* **284**, 238 (1936).
- MÄRCHLEWSKI, L.: (1) Zur Chemie des Chlorophylls. *Biochem. Ztschr.* **5**, 344 (1907).
- (2) Zur Phylloxanthinfrage. *Biochem. Ztschr.* **7**, 284 (1908).

- MARCHLEWSKI, L.: (3) Über die Dualität der Chlorophyllane. *Biochem. Ztschr.* **32**, 332 (1911).
- MARK, H. u. G. SAITO: Fraktionierung hochpolymerer Stoffe durch die chromatographische Adsorptionsanalyse. I. Fraktionierung von Acetylcellulose. *Monatsh. Chem.* **68**, 237 (1936).
- MATLACK, M. B.: (1) Die Pigmente der roten Grapefruits, *Citrus grandis* (L., Osbeck). *Journ. biol. Chemistry* **110**, 249 (1935).
— (2) Die carotinoiden Farbstoffe der Batate (*Ipomoea batatas*, Poir). *Journ. Washington Acad. Sciences* **27**, 493 (1937).
- MERZ, K. W. u. R. FRANK: Chromatographische Adsorptionsanalyse in der Pharmazie. IV. Quantitative Untersuchung einiger alkaloidhaltiger Arzneizubereitungen. *Arch. Pharmaz. u. Ber. Dtsch. pharmaz. Ges.* **275**, 345 (1937).
- MILLER, E. S.: Verbesserte Methoden zur Reinigung der gewöhnlichen Carotinoide und die quantitative Messung ihrer Adsorptionsspektren. *Bot. Gaz.* **96**, 447 (1935).
- MOHLER, H. u. W. HÄMMERLE: (1) Chromatographischer und spektrophotometrischer Nachweis von künstlicher Färbung in Wein. *Ztschr. Unters. Lebensmittel* **70**, 193 (1933).
— (2) Über den Nachweis von Weißwein in Rotwein. *Ztschr. Unters. Lebensmittel* **71**, 186 (1936).
- MOLODENSKI, W. S.: Adsorption von aliphatischen Säuregemischen. *Chimtsch. Schurn. W.* **2**, 125 (1931) (russ.).
- MUSAJO, L.: (1) Über die Synthese der Xanthurensäure und über chromatographische Untersuchungen. *Ric. sci. Progresso tecn. Econ. naz.* [2] **7**, II. 95 (1936).
— (2) Chromatographische Isolierung von Harnindirubin. VII. Untersuchungen über die Xanthurensäure. *Gazz. chim. Ital.* **67**, 235 (1937).
- NERACHER, O. u. T. REICHSTEIN: Anreicherung von Vitamin D aus Thunfischleberöl. *Helv. chim. Acta* **19**, 1382 (1936).
- NEWMAN, M. S.: (1) Die Synthese von 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen. *Journ. Amer. chem. Soc.* **60**, 1141 (1938).
— (2) Die Synthese von 5-Chlor-10-methyl-1,2-benzanthracen und von verwandten Verbindungen. *Journ. Amer. chem. Soc.* **60**, 1368 (1938).
- NEWMAN, M. S. u. L. M. JOSHEL: Eine neue Synthese von 3,4-Benzphenanthren. *Journ. Amer. chem. Soc.* **60**, 485 (1938).
- NEWMAN, M. S. u. M. ORCHIN: Die Synthese von 7-Chlor-10-methyl-1,2-benzanthracen und verwandten Verbindungen. *Journ. Amer. chem. Soc.* **60**, 586 (1938).
- NIEL, C. B. VAN u. J. H. C. SMITH: Studien über die Pigmente der Purpurbakterien I. *Arch. Mikrobiol.* **6**, 219 (1935).
- OCHIAI, E., K. TSUDA u. S. KITAGAWA: (1) Über Sojabohnensaponin. I. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 2083 (1937).
— (2) Selendehydrierung des Sojasapogenols B. II. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 2093 (1937).

- PALMER, L. S.: (1) Carotinoids and related pigments. New York: The chemical Catalog Co. 1922.
- (2) Carotin, der natürliche, gelbe Hauptfarbstoff des Milchfettes. Dissertation. Univ. Missouri, 1913.
- PALMER, L. S. u. C. H. ECKLES: (1) Chemische und physiologische Beziehungen der Milchfettpigmente zum Carotin und Xanthophyll der grünen Pflanzen. Journ. biol. Chemistry **17**, 191, 211, 223, 237, 245 (1914).
- (2) Carotin, der natürliche, gelbe Hauptfarbstoff des Milchfettes. Missouri Agr. exper. Stat. **9**, 313; **10**, 339; **11**, 391; **12**, 415 (1914).
- PARKE, DAVIS u. Co. (Detroit): Gereinigtes Vitamin A aus Fischleberöl. A. M. P. 2 111 049 (1934, 1938).
- PETTER, H. F. M.: (1) Über Bakterien von gesalzenem Fisch. Amsterd. Akad. Wiss. **34**, Nr. 10 (1931).
- (2) Über rote und andere Bakterien von gesalzenem Fisch. Dissertation. Sandpoort, 1932 (holl.).
- PFAU, A. ST. u. P. A. PLATTNER: Zur Kenntnis der flüchtigen Pflanzenfarbstoffe. IV. Über die Konstitution der Azulene. Helv. chim. Acta **19**, 858 (1936).
- PHILIP'S Gloeilampenfabriken (Eindhoven): Provitamin D enthaltende Präparate. E. P. 477 283 (1938).
- PLATTNER, P. A. u. A. ST. PFAU: Zur Kenntnis der flüchtigen Pflanzenstoffe. V. Über die Darstellung des Grundkörpers der Azulenreihe. Helv. chim. Acta **20**, 224 (1937).
- POTTS, A. M. u. F. C. KOCH: Ein neuer Apparat und eine verbesserte Methode zur chromatographischen Adsorption. Proc. Soc. exp. Biol. **37**, 300 (1937).
- PRICE, J. R. u. R. ROBINSON: Stickstoffhaltige Anthocyanine. IV. Der Farbstoff aus *Bougainvillaea glabra*. Journ. chem. Soc. London **1937**, 449.
- PRITCHARD H., H. WILKINSON, J. R. EDISBURY u. R. A. MORTON: Eine Unstimmigkeit zwischen biologischen Bestimmungen und anderen Methoden der Vitamin-A-Bestimmung. Biochemical Journ. **31**, 258 (1937).
- RALSTON, A. W., H. J. HARWOOD u. W. O. POOL: Die Darstellung und Verkrackung von hochmolekularen Nitrilen. Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 986 (1937).
- RENZ, J.: Über das Amanitatoxin. Ztschr. physiol. Chem. **230**, 245 (1934).
- ŘETOVSKY, R.: Atmungsmodelle mit dem System Sonnenblumenöl + Carotinoide. Bull. Soc. Chim. biol. **17**, 1614 (1935).
- ŘETOVSKY, R. u. A. URBAN: Das Pigment des Sonnenblumenöles aus subkarpathischem Rußland. Die chromatographische Methode in der Chemie der Öle. Chem. Obzor Nr. 12 (1934) (tschech.).
- ROGOWSKI, W. DE: Untersuchungen über die ultravioletten Absorptionsspektren und über die Fluoreszenz-Emissionsspektren der Chlorophyll-Farbstoffe. Dissertation. Fribourg, 1912; Varsovie, 1914.

- ROSSNER, W.: Über neue Derivate des Methyl-cholanthrens und über einige vom Cholesterin abgeleitete heterocyclische Verbindungen. *Ztschr. physiol. Chem.* **249**, 267 (1937).
- RUDY, H.: Die Adsorptionsanalyse von Haptengemischen. *Biochem. Ztschr.* **253**, 204 (1932).
- RUGGLI, P. u. P. JENSEN: (1) Die chromatographische Adsorptionsanalyse in Anwendung auf wässrige Lösungen künstlicher organischer Farbstoffe. *Helv. chim. Acta* **18**, 624 (1935).
- (2) Chromatographische Adsorption von Teerfarbstoffen und Zwischenprodukten. II. Derivate des α - und β -Naphthols. *Helv. chim. Acta* **19**, 64 (1936).
- RUZICKA, L. u. M. W. GOLDBERG: Polyterpene und Polyterpenoide CXVII. Zur Kenntnis der Bedingungen und des Mechanismus der Dehydrierung der homologen Sterine und der Cholsäure. *Helv. chim. Acta* **20**, 1245 (1937).
- RUZICKA, L. u. K. HOFMANN: Polyterpene und Polyterpenoide CXV. Synthese des 1,8-Dimethyl-picens und des 1,8-Dimethyl-2-methoxy-picens und ihre Identifizierung mit Dehydrierungsprodukten pentacyclischer Triterpene. *Helv. chim. Acta* **20**, 1155 (1937).
- RUZICKA, L., K. HOFMANN u. H. F. MELDAHL: Über Steroide und Sexualhormone (43. Mitteil.). Herstellung des 17-Vinyl-testosterons. *Helv. chim. Acta* **21**, 597 (1938).
- RUZICKA, L., P. A. PLATTNER u. R. AESCHBACHER: Über Steroide und Sexualhormone (44. Mitteil.). *Helv. chim. Acta* **21**, 866 (1938).
- RUZICKA, L. u. H. SCHELLENBERG: Umwandlung der Oleanolsäure in β -Amyrin und Erythro-diol. *Helv. chim. Acta* **20**, 1553 (1937).
- RUZICKA, L. u. L. STERNBACH: Zur Kenntnis der Diterpene (34. Mitteil.). Über Entstehung und Abbau der Tetraoxy-abietinsäure. *Helv. chim. Acta* **21**, 565 (1938).
- SANDOZ, Chem. Fabrik vorm. (Basel): Verfahren zur Trennung, Zerlegung und Reindarstellung von Mutterkornalkaloiden. DRP. 627.027 und Franz. P. 788.812 (1936).
- SANNIÉ, Ch.: Chromatographie unter Druck. *Bull. Soc. chim. France* **4**, 580 (1937).
- SAWLEWICZ, J. u. T. REICHSTEIN: Abbau der Lithocholsäure zu Ätiolithocholsäure. *Helv. chim. Acta* **20**, 949 (1937).
- SCHALES, O.: Ein wasserlösliches c-Hämin aus Blut. II. Die chromatographische Anreicherung des c-Hämins und sein Verhalten bei der Enteisenung. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 1874 (1937).
- SCHERTZ, F. M.: Die reinen Farbstoffe, Carotin und Xanthophyll und die Tswettsche Adsorptionsmethode. *Plant Physiol.* **4**, 337 (1929).
- SCHMIDT-NIELSEN, S., N. A. SÖRENSEN u. B. TRUMPY: (1) Ein rotgefärbtes Walöl. *Norsk Vidensk. Selsk. Forh.* **5**, Nr. 30 (1932).
- (2) Die Farbstoffe des Tranes von *Regalecus glesne*. *Norsk Vidensk. Selsk. Forh.* **5**, Nr. 29 (1932).

- SCHNEIDER, E.: Über die Carotinoide der Purpurbakterien. Beiträge zur Physiologie der Farbstoffe der Purpurbakterien (III. Mitteilung). *Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul* **2**, 74 (1936).
- SCHNEIDER, J. Z. u. K. WILLERT, Wasserschierling (*Cicuta virosa* L.). IV. Chromatographische Analyse der Lösungen aus den frischen Wurzeln. *Chem. Obzor*, **11**, 107 (1936).
- SCHÖN, K.: (1) Studien an Carotinoiden. I. Die Carotinoide der Diospyros-Früchte. II. Die Carotinoide der Arbutus-Früchte (*Arbutus unedo*). *Biochemical Journ.* **29**, 1779 (1935).
- (2) ... III. Die Isolierung eines Luteinisomeren aus Ginster (*Ulex europaeus*). *Biochemical Journ.* **30**, 1960 (1936).
- SCHÖN, K. u. B. MESQUITA: Studien an Carotinoiden. IV. Die Carotinoide von *Genista tridentata*. *Biochemical Journ.* **30**, 1966 (1936).
- SCHÖPF, C. u. E. BECKER: Über neue Pterine. *Liebigs Ann.* **524**, 49 (1936).
- SCHOLL, R.: Berichtigungen zu Angaben von KARL LAUER und ERICH CLAR über Benzanthron. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **71**, 400 (1938).
- SCHÜRCH, O. u. A. WINTERSTEIN: Über die krebserregende Wirkung aromatischer Kohlenwasserstoffe. *Ztschr. physiol. Chem.* **236**, 79 (1935); s. auch *Ztschr. Krebsforsch.* **42**, 76 (1935).
- SCHUETTE, H. A. u. R. G. PALMER: Pigmente des Roggenkeimöles. *Oil a. Soap* **14**, 295 (1937).
- SCHWAB, G. M. (1): Die chromatographische Adsorptionsmethode. *Forsch. u. Fortschr.* **13**, 345 (1937).
- (2) Die Chromatographie als neues Hilfsmittel der analytischen Chemie. *Ztschr. Elektrochem. angew. physikal. Chem.* **43**, 791 (1937).
- SCHWAB, G. M. u. G. DATTLER: Anorganische Chromatographie. II. Säuretrennung. *Angew. Chem.* **50**, 691 (1937).
- SCHWAB, G. M. u. K. JOCKERS (1): Anorganische Chromatographie. *Naturwiss.* **25**, 44 (1937).
- (2) Anorganische Chromatographie. I. *Angew. Chem.* **50**, 546 (1937).
- SERINI, A. u. W. LOGEMANN: (1) Über das Equilin und seine Hydrierung. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **71**, 186 (1938).
- (2) Darstellung von Polyoxypregnan-Verbindungen. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **71**, 1362 (1938).
- SEYBOLD, A.: Zur Kenntnis des Protochlorophylls. *Planta* **26**, 712 (1937).
- SIEDEL, W.: Synthese des Glaukobilins, sowie über Urobilin und Mesobiliviolin. *Ztschr. physiol. Chem.* **237**, 8 (1935).
- SIMPSON, J. C. E. u. N. E. WILLIAMS: Die ätherlöslichen Bestandteile von Sarsaparillawurzel. *Journ. chem. Soc. London* **1937**, 733.
- SÖRENSEN, N. A.: (1) Die Farbstoffe des Tranes von *Orthogoriscus mola*. *Norske Vidensk. Selsk. Forh.* **6**, 154 (1933).
- (2) Die Leberpigmente des Seeteufels (*Lophius piscatorius*). *Norske Vidensk. Selsk. Skr.* **1934**, Nr. 1.

- SÖRENSEN, N. A.: (3) Chromatographische Adsorptionsanalyse. *Tidskr. Kemi Bergvaesen* **15**, 53 (1935).
- SPÄTH, E. u. P. KAINRATH: Über Bergamottin und über die Auffindung von Limettin im Bergamottöl. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 2272 (1937).
- SPÄTH, E., F. SCHLEMMER, G. SCHENCK u. A. GEMPP: Über einen neuen stickstoffhaltigen Inhaltsstoff von *Sanguinaria canadensis*. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 1677 (1937).
- SOLMSEN, U.: Untersuchungen über Carotinoide. *Diss. Berlin*, 1936.
- SPOEHR, H. A.: Darstellung von Inulin zum Gebrauch in Adsorptionssäulen. *Plant Physiol.* **13**, 207 (1938).
- STEIGER, M. u. T. REICHSTEIN: (1) Über Bestandteile der Nebennierenrinde, IX. (Die Funktion des letzten Sauerstoffatoms.) *Helv. chim. Acta* **20**, 817 (1937).
- (2) Über Bestandteile der Nebennierenrinde XVI. und Synthese des Δ^4 -Pregnen-diol-20,21-ons-3. *Helv. chim. Acta* **21**, 171 (1938).
- (3) Über Bestandteile der Nebennierenrinde. *Helv. chim. Acta* **21**, 546 (1938).
- (4) Ein neuer Abbau des Digoxigenins. *Helv. chim. Acta* **21**, 828 (1938).
- STIX, W.: Die chromatographische Adsorptionsanalyse. *Uspechi Chimii* **5**, 4 (1936) (russ.).
- STOKLASA, J., V. BRDLIK u. A. ERNEST: Zur Frage des Phosphorgehaltes des Chlorophylls. *Ber. Dtsch. botan. Ges.* **27**, 10 (1909).
- STOLL, A.: Ein Gang durch biochemische Forschungsarbeiten. *Berlin: Julius Springer*. 1933.
- STOLL, A. u. A. HOFMANN: Partialsynthese des Ergobasins, eines natürlichen Mutterkornalkaloids, sowie seines optischen Antipoden. *Ztschr. physiol. Chem.* **251**, 155 (1938).
- STOLL, A. u. E. WIEDEMANN: (1) Über Chlorophyll a, seine phasepositiven Derivate und seine Allomerisation. *Helv. chim. Acta* **16**, 739 (1933).
- (2) Chlorophyll. *Fortschritte Chem. org. Naturstoffe* **1** (1938). [Im Druck.]
- STRAIN, H. H.: (1) Die Trennung von Carotinen durch Adsorption auf Magnesiumoxyd. *Science* **79**, 325 (1934).
- (2) Carotin. VIII. Trennung von Carotinen durch Adsorption. *Journ. biol. Chemistry* **105**, 523 (1934).
- (3) Carotin. IX. Carotine aus verschiedenen Quellen und einige Eigenschaften von α - und β -Carotin. *Journ. biol. Chemistry* **111**, 85 (1935).
- (4) Blatt-Xanthophylle. *Science* **83**, 241 (1936).
- (5) 3-Nitrobenzohydrazone, 2,4-Dinitrophenylhydrazone und die Trennung von Hydrazonen durch Adsorption. *Journ. Amer. chem. Soc.* **57**, 758 (1935).

- STRAIN, H. H.: (6) Petrolätherlösliche, fluoreszierende Bestandteile von Blättern. *Nature* (London) **137**, 946 (1936).
- (7) Eschscholtz-xanthin: ein neues Xanthophyll aus den Blütenblättern des kalifornischen Mohnes, *Eschscholtzia californica*. *Journ. biol. Chemistry* **123**, 425 (1938).
- SUMNER, F. B. u. D. L. FOX: Studien über carotinoide Pigmente in Fischen. III. Die Einflüsse von eingeführten Carotinoiden auf den Xanthophyllgehalt von *Fundulus parvipinnis*. *Proceed. National Acad. Sciences, Washington* **21**, 330 (1935).
- SÜLLMANN, H., E. SZÉCSÉNYI-NAGY u. F. VERZÁR: Differenzierung der Serumfarbstoffe des Menschen. *Biochem. Ztschr.* **283**, 263 (1936).
- TAUBER, H.: Die selektive Adsorption von Enzymen durch Cellulose. *Journ. biol. Chemistry* **113**, 754 (1936).
- TAYLOR, W. J. u. E. M. W. LAVINGTON: Die heterogene Katalyse von stereoisomerem Wechsel bei Oximen. *Journ. chem. Soc. London* **1934**, 980.
- THALER, H. (1): Über Verwendbarkeit der chromatographischen Analyse zum Nachweis der künstlichen Färbung von Fetten und Ölen. *Fette u. Seifen* **44**, 38 (1937).
- (2) Über den Nachweis der künstlichen Färbung der Butter mittels der chromatographischen Adsorptionsanalyse. *Ztschr. Unters. Lebensmittel* **75**, 130 (1938).
- THORBJARNARSON, T. u. J. C. DRUMMOND: Vorkommen eines ungesättigten Kohlenwasserstoffs in Olivenöl. *Analyst* **60**, 23 (1935).
- THORBJARNARSON, T., A. S. RUIZ u. J. C. DRUMMOND: Selektive Adsorption in der Untersuchung der unverseifbaren Substanz von marinen Ölen. *Analyst* **60**, 382 (1935).
- TISCHER, J.: (1) Über das Euglenarhodon und andere Carotinoide einer roten Euglene (Carotinoide der Süßwasseralgen I). *Ztschr. physiol. Chem.* **239**, 257 (1936).
- (2) Über die Carotinoide und die Bildung von Jonon in *Trentepohlia*, nebst Bemerkungen über den Gehalt dieser Alge an Erythrit. *Ztschr. physiol. Chem.* **243**, 103 (1936).
- (3) Über die Carotinoide von *Haematococcus pluvoalis*. I.—II. *Ztschr. physiol. Chem.* **250**, 147 (1937), **252**, 225 (1938).
- (4) Über die Polyenpigmente der Blaualge *Aphanizomenon flos-aquae*. I. (Carotinoide der Süßwasseralgen, IV. Teil.) *Ztschr. physiol. Chem.* **251**, 109 (1938).
- TODD, A. R., F. BERGEL, H. WALDMANN u. T. S. WORK: Studien über Vitamin E. I. Die Isolierung von einigen krystallinischen Alkoholen aus der unverseifbaren Substanz von Reis- und Weizenkeimöl. *Biochemical Journ.* **31**, 2247 (1937).
- TODD, A. R., F. BERGEL u. T. S. WORK: Studien über Vitamin E. II. Die Isolierung von β -Tocopherol aus Weizenkeimöl. *Biochemical Journ.* **31**, 2257 (1937).

- TREIBS, A.: Chlorophyll- und Häminderivate in bituminösen Gesteinen, Erdölen, Erdwachsen und Asphalten. *Liebigs Ann.* **510**, 42 (1934).
- TRIKOJUS, V. M. u. J. C. DRUMMOND: Isolierung von Carotin aus einem Holzöl. *Nature (London)* **139**, 1105 (1937).
- TSCHESCHE, R. u. K. BOHLE: Über pflanzliche Herzgifte. XIII. Die Konstitution des Sarmentogenins. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **69**, 2497 (1936).
- TSCHESCHE, R. u. H. A. OFFE: (1) Über Krötengifte, I. Mitt.: Die Selen-Dehydrierung des Cinobufagins. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **68**, 1998 (1935).
- (2) Über Krötengifte, II. Mitt.: Zur Kenntnis des Cino- und Marinobufagins. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **69**, 2361 (1936).
- TSUCHIYA, Y.: Enzymchemische Untersuchungen über die Gifte der Formosa-Schlangen VI. Über die Adsorption und Elution des aktiven Bestandteiles des Giftes von Taiwankobura... *Mem. Fac. Sci. Agric. Taihoku* **9**, 309 (1936).
- TSUDA, K. u. S. KITAGAWA: Über Sojabohnen-Saponin. III. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **71**, 790 (1938).
- TSWETT, M.: (1) Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt. (Chromofilli wrastitelnom i schivotnom Mirje.) Warschau: Tipogr. Warszawskago utschehnago Okrug. 1910 (russ.).
- (2) Über die Konstitution des Farbstoffes der Blätter. *Compt. rend. Acad. Sciences* **129**, 607 (1899).
- (3) Über das blaue Chlorophyllin. *Compt. rend. Acad. Sciences* **131**, 842 (1901).
- (4) Über die Mehrzahl der Chlorophylline und über die Metachlorophylline. *Compt. rend. Acad. Sciences* **132**, 149 (1901).
- (5) Über eine neue Kategorie von Adsorptionserscheinungen und ihre Anwendung in der biochemischen Analyse. *Arb. Naturf. Ges. Warschau* **14** (1903).
- (6) Kritische Bemerkungen zu MOLISCH's Arbeit über die Phaeophyceen-Farbstoffe. *Botan. Ztg.* **63**, 273 (1905).
- (7) Zur Kenntnis der Phaeophyceen-Farbstoffe. *Ber. Dtsch. botan. Ges.* **24**, 235 (1906).
- (8) Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. *Ber. Dtsch. botan. Ges.* **24**, 316 (1906).
- (9) Beiträge zur Kenntnis der Anthocyane. Über künstliches Anthocyan. *Biochem. Ztschr.* **58**, 225 (1914).
- (10) Zur Chemie des Chlorophylls. Über Phylloxanthin, Phyllocyanin und die Chlorophyllane. *Biochem. Ztschr.* **5**, 6 (1907).
- (11) Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. *Ber. Dtsch. botan. Ges.* **24**, 384 (1906).
- (12) Zur Geschichte der Chlorophyllforschung. *Ber. Dtsch. botan. Ges.* **25**, 71 (1907).

- TSWETT, M.: (13) Spektralanalytische Untersuchungen über die Chlorophylline und deren nächste Säurederivate. Ber. Dtsch. botan. Ges. **25**, 137 (1907).
- (14) Nochmals über das Phylloxanthin. Biochem. Ztschr. **6**, 373 (1907).
- (15) Zur Chemie des Chlorophylls. Über das Phäophytin und die Chlorophylle nebst Schlußbemerkungen über das Phylloxanthin. Biochem. Ztschr. **10**, 404 (1908).
- (16) Über die Natur des sogenannten „krystallisierbaren Chlorophylls“ (Metachlorophyllins). Biochem. Ztschr. **10**, 414 (1908).
- (17) Über die nächsten Säurederivate der Chlorophylline. Ber. Dtsch. chem. Ges. **41**, 1352 (1908).
- (18) Über das Pigment des herbstlich vergilbten Laubes. Ber. Dtsch. botan. Ges. **26 a**, 94 (1908).
- (19) Ist der Phosphor an dem Aufbau der Chlorophylline beteiligt? Ber. Dtsch. botan. Ges. **26 a**, 214 (1908).
- (20) Das sogenannte „krystallisierte Chlorophyll“ — ein Gemisch. Ber. Dtsch. chem. Ges. **43**, 3139 (1910).
- (21) Über die Löslichkeitsverhältnisse der Chlorophylline und eine neue Methode zur Isolierung derselben. Ber. Dtsch. chem. Ges. **44**, 1124 (1911).
- (22) Über den makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins. Ber. Dtsch. botan. Ges. **29**, 630 (1911).
- (23) Über die Dualität der Chlorophyllane. Biochem. Ztschr. **31**, 505 (1911).
- (24) Über einen neuen Pflanzenfarbstoff, das Thujorhodin. Compt. rend. Acad. Sciences **152**, 788 (1911).
- (25) Der gegenwärtige Stand der Chlorophyllchemie. Journ. Russ. phys.-chem. Ges. **44**, 449 (1912) (russ.).
- TURNER, W. J.: Studien über Porphyrine. I. Beobachtungen am rotbraunen Eichhörnchen, *Sciurus niger*. Journ. biol. Chemistry **118**, 519 (1937).
- TUZSON, P.: (1) Untersuchungen über das Lipochrom von menschlichen und tierischen Lebern. Pécs 1936 (ungar.).
- (2) Ein neuer Farbstoff in der Schale von *Citrus aurantium*. Ber. ung. pharmaz. Ges. **13**, 631 (1937) (ungar.).
- VALENTIN, H.: (1) Chromatographische Adsorptionsanalyse in der Pharmazie I. Pharmaz. Ztg. **80**, 469 (1935).
- (2)... V. Untersuchung von Kaffeeaufgüssen. Pharmaz. Ztg. **28**, 527 (1937).
- VALENTIN, H. u. R. FRANK: Chromatographische Adsorptionsanalyse in der Pharmazie II. Bestimmung des Cantharidingehaltes in der Cantharidentinktur. Pharmaz. Ztg. **81**, 943 (1936).
- VEEN, A. G. VAN u. J. C. LANZING: Über die Analyse der Provitamine A im Blutserum. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. **40**, 779 (1937).

- VEGEZZI, G.: Untersuchungen über einige Pigmente der Invertebraten: Helicorubin, Hepatochlorophyll, Tetroneerythrin. Dissertation. Fribourg, 1916.
- VERMAST, P. G. F.: Die Carotinoide von *Citrus aurantium*. Naturwiss. **19**, 442 (1931).
- VERNE, J.: Les pigments dans l'organisme animal. Paris: Doin et Cie. 1926.
- VÖLKER, O.: Über den gelben Federfarbstoff des Wellensittichs (*Melopsittacus undulatus* [Shaw]). Journ. ornithol. **84**, 618 (1936).
- WAGNER-JAUREGG, TH.: (1) Die Acridinsalze der Adenosinpolyphosphorsäuren. Ztschr. physiol. Chem. **239**, 188 (1936).
— (2) Über die Fettsäuren der Tuberkelbazillen. Ztschr. physiol. Chem. **247**, 135 (1937).
- WAGNER-JAUREGG, TH. u. H. ARNOLD: Synthesen mit aliphatischen Monoterpenen. Liebigs Ann. **529**, 274 (1937).
- WALD, G.: Pigmente der Retina. I. Der Ochsenfrosch. Journ. gen. Physiol. **19**, 781 (1936).
- WALD, G. u. H. ZUSSMANN: Carotinoide aus der Hühnchen-Retina. Journ. biol. Chemistry **122**, 449 (1938).
- WALDENSTRÖM, J.: (1) Untersuchungen über Harnfarbstoffe, hauptsächlich Porphyrine, mittels der chromatographischen Analyse. Dtsch. Arch. klin. Med. **178**, 38 (1935); Ztschr. physiol. Chem. **239**, III (1936).
— (2) Studien über Porphyrie. Acta med. scand. Suppl. **82**, 3 (1937).
- WALTER, E. D., M. L. WOLFROM u. W. W. HESS: Ein gelber Farbstoff aus der Osage-Orange (*Maclura pomifera* Raf.). Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 574 (1938).
- WETTER, F. u. K. DIMROTH: Über die Darstellung eines Homologen des Epi-koprosterins in der Ergosterinreihe. Ber. Dtsch. chem. Ges. **70**, 1665 (1937).
- WHITEHORN, J. C.: Eine chemische Methode zur Bestimmung von Epinephrin im Blut. Journ. biol. Chemistry **108**, 633 (1934).
- WIDENBAUER, F., O. HUHN u. G. BECKER: Chemischer Nachweis und Ausscheidung von Vitamin B₁ im Harn. Ztschr. ges. exp. Mediz. **101**, 178 (1937).
- WIELAND, H., A. HARTMANN u. H. DIETRICH: Über Chinovasäure. Liebigs Ann. **522**, 191 (1936).
- WIELAND, H., G. HESSE u. R. HÜTTEL: Zur Kenntnis der Krötengiftstoffe. IX. Weiteres zur Konstitutionsfrage. Liebigs Ann. **524**, 203 (1936).
- WIELAND, H. u. L. HORNER: Zur Konstitution des Vomocins. Abbau von Vomocidin. Über Strychnos-Alkaloide. XVIII. Liebigs Ann. **528**, 73 (1937).
- WIELAND, H. u. Y. KANAOKA: Über die Nebensterine der Hefe. V. Zymosterin und Ascosterin. Liebigs Ann. **530**, 146 (1937).

- WIELAND, H., W. KONZ u. R. SONDERHOFF: Über das Curarin aus Calebassen-Curare. *Liebigs Ann.* **527**, 160 (1937).
- WIELAND, H. u. A. KOTZSCHMAR: Über das Flügelpigment der Kohlweißlinge. III. *Liebigs Ann.* **530**, 152 (1937).
- WIELAND, H., K. KRAUS, H. KELLER u. H. OTTAWA: Untersuchungen über die Konstitution der Gallensäuren (LIV. Mitt.). Über einige ungesättigte Gallensäuren. *Ztschr. physiol. Chem.* **241**, 47 (1936).
- WIELAND, H., H. PASEDACH u. A. BALLAUF: Über die Nebensterine der Hefe. IV. Kryptosterin. *Liebigs Ann.* **529**, 68 (1937).
- WIELAND, H., T. PLOETZ u. H. INDEST: Über das Auftreten freier Radikale bei chemischen Reaktionen. IX. *Liebigs Ann.* **532**, 166 (1937).
- WIELAND, H. u. O. PROBST: Einige Reaktionen des Biphenyl-äthylens. Studien in der Fluorenreihe. IV. *Liebigs Ann.* **530**, 274 (1937).
- WIELAND, H. u. C. SCHÖPF: Über den gelben Flügelfarbstoff des Citronenfalters (*Gonepteryx rhamni*). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **58**, 2178 (1925).
- WIJNGAARDEN, J. C. H. VAN: Carotin, Vitamin A und Vitamin C in der Kuhmilch. Dissertation. Utrecht, 1935 (holl.).
- WILLSTAEDT, H.: (1) Über chromatographische Analyse und ihre Anwendungen. *Svensk Kem. Tidskr.* **48**, 32 (1936).
- (2) Carotinoide, Bakterien- und Pilzfarbstoffe. Stuttgart: Ferdinand Enke. 1934.
- (3) Astacin aus den Schalen des Flußkrebse (Potamobius [*Astacus fluviatilis*]). *Svensk Kem. Tidskr.* **46**, 205, 261 (1934).
- (4) Die Vitamine. *Klin. Wchschr.* **14**, 841 (1935), **15**, 1505 (1936).
- (5) Über die Farbstoffe der Früchte von *Rosa rugosa* Thunb. *Svensk Kem. Tidskr.* **47**, 112 (1935).
- (6) Über die Farbstoffe des echten Reizkers (*Lactarius deliciosus* L.). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **68**, 333 (1935).
- (7) Über die Farbstoffe des echten Reizkers (*Lactarius deliciosus* L.) (II. Mitt.). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **69**, 997 (1936).
- (8) Über die Carotinoide der Preiselbeeren. *Svensk Kem. Tidskr.* **48**, 212 (1936).
- (9) Über die Farbstoffe der Torfbeeren. *Skand. Arch. Physiol.* **75**, 155 (1936).
- (10) Über die Carotinoide einiger *Cantharellus*-arten. *Svensk Kem. Tidskr.* **49**, 318 (1937).
- (11) Zur chemischen Bestimmung des Vitamins B₁ (Aneurin). *Naturwiss.* **25**, 682 (1937).
- (12) L'analyse chromatographique et ses applications. Paris (im Druck).
- WILLSTAEDT, H. u. F. BÁRÁNY: Eine kolorimetrische Methode für Vitamin B₁ (Aneurin). *Enzymologia* **2**, 316 (1938).
- WILLSTAEDT, H. u. H. BEHRNTS-JENSEN: (1) Über den Gehalt an Carotinoiden in rohem und gekochtem Spinat. *Svensk Kem. Tidskr.* **49**, 258 (1937).

- WILLSTAEDT, H. u. H. BEHRNTS-JENSEN: (2) Über den Vitamin-A-Gehalt einiger Sorten geräucherter Fische. *Svensk Kem. Tidskr.* **49**, 260 (1937).
- WILLSTAEDT, H. u. T. LINDQUIST: Über die Carotinoide des Serums und der Leber beim Menschen I. *Ztschr. physiol. Chem.* **240**, 10 (1936).
- WILLSTAEDT, H. u. T. K. WITH: (1) Über die chromatographische Adsorptionsanalyse kleiner Carotinoidmengen (Mikrochromatographie) mit besonderer Berücksichtigung der Carotinoide der Milch und des Serums. *Ztschr. physiol. Chem.* **253**, 40 (1938).
- (2) Über die quantitative chemische Bestimmung von Carotinoiden und Vitamin A in Milch. *Ztschr. physiol. Chem.* **253**, 133 (1938).
- WILLSTÄTTER, R.: (1) Über Pflanzenfarbstoffe. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **47**, 2831 (1914).
- (2) Bemerkungen zur Geschichte der Enzymadsorption. In: *Untersuchungen über Enzyme*, Bd. I, S. 66. Berlin: Julius Springer. 1928.
- (3) Chlorophyll und seine wichtigsten Abbauprodukte. *Handb. biochem. Arbeitsmethoden* **2**, 671. Berlin-Wien: Urban u. Schwarzenberg. 1910.
- (4) Chlorophyll. *Biochem. Handlexikon* **6**, 1. Berlin: Julius Springer. 1911.
- WILLSTÄTTER, R. u. M. ISLER: Über die zwei Komponenten des Chlorophylls. *Liebigs Ann.* **390**, 269 (1912).
- WILLSTÄTTER, R. u. H. J. PAGE: Über die Pigmente der Braunalgen. *Liebigs Ann.* **404**, 237 (1914).
- WILLSTÄTTER, R. u. A. STOLL: (1) Über die Chlorophyllide. *Liebigs Ann.* **387**, 317 (1912).
- (2) Untersuchungen über Chlorophyll. *Methoden und Ergebnisse* (S. 16, 156, 234). Berlin: Julius Springer. 1913.
- WINDAUS, A. u. F. BOCK: (1) Über das Provitamin aus dem Sterin der Schweineschwarte. *Ztschr. physiol. Chem.* **245**, 168 (1937).
- (2) Über pflanzliches Provitamin D. *Ztschr. physiol. Chem.* **250**, 258 (1937).
- WINDAUS, A., M. DEPPE u. W. WUNDERLICH: Über einige Bestrahlungsprodukte aus 7-Dehydro-cholesterin. *Liebigs Ann.* **533**, 118 (1937).
- WINDAUS, A. u. S. RENNHAKE: Über einige Derivate des 3,4-Benzpyrens. *Ztschr. physiol. Chem.* **249**, 256 (1937).
- WINDAUS, A., FR. SCHENCK u. F. v. WERDER: Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydro-cholesterin. *Ztschr. physiol. Chem.* **241**, 100 (1936).
- WINDAUS, A. u. O. STANGE: Über das Provitamin des Eiersterins. *Ztschr. physiol. Chem.* **244**, 218 (1936).
- WINTERSTEIN, A.: (1) Fraktionierung und Reindarstellung von Pflanzenfarbstoffen nach dem Prinzip der chromatographischen

- Adsorptionsanalyse. In: G. KLEINS Handb. d. Pflanzenanalyse, Bd. IV, S. 1403—1437. Wien: Julius Springer. 1933.
- WINTERSTEIN, A.: (2) Über ein Vorkommen von γ -Carotin. Ztschr. physiol. Chem. **219**, 249 (1933).
- (3) Über ein neues Provitamin A. Ztschr. physiol. Chem. **215**, 51 (1933).
- WINTERSTEIN, A. u. U. EHRENBURG: Über die Verbreitung und Natur der Carotinoide in Beeren. Ztschr. physiol. Chem. **207**, 25 (1932).
- WINTERSTEIN, A. u. C. FUNK: Vitamine. In: G. KLEINS Handb. d. Pflanzenanalyse, Bd. IV, S. 1041—1108. Wien: Julius Springer. 1933.
- WINTERSTEIN, A. u. K. SCHÖN: (1) Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. III. Mitt.: Gibt es ein Chlorophyll c? Ztschr. physiol. Chem. **230**, 139 (1934).
- (2) Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. IV. Mitt.: Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. Ztschr. physiol. Chem. **230**, 146 (1934).
- (3) Über die farbigen Kohlenwasserstoffe des Steinkohlenteers. Naturwiss. **22**, 237 (1934).
- WINTERSTEIN, A., K. SCHÖN u. H. VETTER: Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. V. Mitt.: Anthracen, Chrysen, Pyren. Ztschr. physiol. Chem. **230**, 158 (1934).
- WINTERSTEIN, A. u. G. STEIN: (1) Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. I. Mitt.: Anwendungsbereich. Ztschr. physiol. Chem. **220**, 247 (1933).
- (2) Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. II. Mitt.: Chlorophylle. Ztschr. physiol. Chem. **220**, 263 (1934).
- WINTERSTEIN, A. u. H. VETTER: Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. VI. Mitt.: 1,2-Benzpyren. Ztschr. physiol. Chem. **230**, 169 (1934).
- WINTERSTEIN, A., H. VETTER u. K. SCHÖN: Zur Synthese des krebserregenden 3,4-Benzpyrens. Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 1079 (1935).
- WISLICENUS, H.: (Wettbewerb zum Klipstein-Preis). Collegium (1906).
- YAMAMOTO, R. u. S. TIN: Über Carotinoide in der Frucht von *Citrus poonensis* Hort. Bull. Inst. physic. chem. Res. **12**, 25 (1933).
- YOUNG, R. T. u. D. L. FOX: Struktur und Funktion des Darmes in „surf perches“ (Embiotocidae) in bezug auf ihren Carotinoid-Stoffwechsel. Biol. Bull. **71**, 217 (1936).

- ZECHMEISTER, L.: (1) Carotinoide. Ein biochemischer Bericht über pflanzliche und tierische Polyenfarbstoffe. Berlin: Julius Springer. 1934.
- (2) Carotinoide höherer Pflanzen. In: G. KLEINS Handb. d. Pflanzenanalyse, Bd. III, S. 1239—1350. Wien: Julius Springer. 1932.
- (3) Lipochrom und Vitamin A. In: HEFTER-SCHÖNFELD, Chemie und Technologie der Fette und Fettprodukte, Bd. I, S. 149—193. Wien: Julius Springer. 1936.
- (4) Die Carotinoide und ihre physiologische Bedeutung. Chem.-Ztg. **60**, 505 (1936).
- (5) Über die chromatographische Bestimmung des Provitamins A. 5e Congr. intern. Ind. agric. Schévénigue (1937), S. 20.
- (6) Die Carotinoide im tierischen Stoffwechsel. *Ergebn. d. Physiol.* **39**, 117—191 (1937).
- ZECHMEISTER, L., T. BÉRES u. E. UJHELYI: Zur Pigmentierung der reifenden Kürbisblüte (*Cucurbita Pepo*). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **68**, 1321 (1935); **69**, 573 (1936).
- ZECHMEISTER, L. u. L. v. CHOLNOKY: (1) Dreißig Jahre Chromatographie. *Monatsh. Chem.* **68**, 68 (1936).
- (2) Untersuchungen über den Paprika-Farbstoff VII. Adsorptionsanalyse des Pigments. *Liebigs Ann.* **509**, 269 (1934).
- (3) Untersuchungen über den Paprika-Farbstoff VIII. Zur Konstitution des Capsanthins und Capsorubins. *Liebigs Ann.* **516**, 30 (1935).
- (4) Untersuchungen über den Paprikafarbstoff IX. Partieller Abbau des Capsanthins. *Liebigs Ann.* **523**, 101 (1936).
- (5) Über einen neuen Farbstoff mit Lycopin-Spektrum. *Naturwiss.* **23**, 407 (1935).
- (6) Lycopanthin und Lycophyll, zwei natürliche Derivate des Lycopins. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **69**, 422 (1936).
- (7) Untersuchungen über den Paprikafarbstoff. X. Citraurin aus Capsanthin. *Liebigs Ann.* **530**, 291 (1937).
- ZECHMEISTER, L., L. v. CHOLNOKY u. E. UJHELYI: Beitrag zur Chromatographie von farblosen Substanzen. *Bull. Soc. Chim. biol.* **18**, 1885 (1936).
- ZECHMEISTER, L., O. FREHDEN u. P. FISCHER JÖRGENSEN: Chromatographische Trennung von cis- und trans-Azobenzol. *Naturwiss.* **26**, 495 (1938).
- ZECHMEISTER, L. u. P. TUZSON: (1) Zur Kenntnis der tierischen Fettfarbstoffe. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **67**, 154 (1934).
- (2) Über den Farbstoff der Sonnenblume (II. Mitt.). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **67**, 170 (1934).
- (3) Das Pigment der *Cucurbita maxima* Duch. (Riesenkürbis). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **67**, 824 (1934).
- (4) Isolierung des Lipochroms aus Hühner- und Pferdefett. Einige Beobachtungen an menschlichem Fett. *Ztschr. physiol. Chem.* **225**, 189 (1934).

- ZECHMEISTER, L. u. P. TUZSON: (5) Beitrag zum Lipochrom-Stoffwechsel des Pferdes. *Ztschr. physiol. Chem.* **226**, 255 (1934).
- (6) Biochemischer Beitrag zum Studium der Farbstoffe des menschlichen Fettes. *Bull. Soc. Chim. biol.* **17**, 1110 (1935).
- (7) Zur Kenntnis des Lipochroms höherer Tiere und des Menschen. *Naturwiss.* **23**, 680 (1935).
- (8) Isolierung von Komponenten des menschlichen Lipochroms. *Ztschr. physiol. Chem.* **231**, 259 (1935).
- (9) Über den Lipochrominhalt der menschlichen Leber. *Ztschr. physiol. Chem.* **234**, 241 (1935).
- (10) Zur Kenntnis der selektiven Aufnahme von Carotinoiden im Tierkörper (zugleich II. Mitt. über den Lipochrom-Stoffwechsel des Pferdes). *Ztschr. physiol. Chem.* **234**, 235 (1935).
- (11) Über das Lipochrom des Wasserfrosches (*Rana esculenta*). *Ztschr. physiol. Chem.* **238**, 197 (1936).
- (12) Notiz über das Lipochrom der Schweineleber. *Ztschr. physiol. Chem.* **239**, 147 (1936).
- (13) Zur Kenntnis des Mandarinenpigments II. *Ztschr. physiol. Chem.* **240**, 191 (1936).
- (14) Über das Polyenpigment der Orange (I. Mitt.). *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **69**, 1878 (1936).
- (15) Über das Polyenpigment der Orange. II. Citraurin. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **70**, 1966 (1937).
- (16) Spontane Isomerisierung des Lycopins. *Nature (London)* **141**, 249 (1938).
- (17) Isomerisierung von Carotinoiden. *Biochemical Journ.* (1938) [im Druck].
- ZEILE, K. u. B. RAU: Über die Verteilung von Porphyrinen zwischen Äther und Salzsäure und ihre Anwendung zur Trennung von Porphyringemischen. *Ztschr. physiol. Chem.* **250**, 197 (1937).
- ZSCHEILE, F. P. jun.: Eine verbesserte Methode zur Reinigung des Chlorophylls a und b; quantitative Messung ihrer Adsorptionsspektren; Beweis für das Vorhandensein einer dritten Chlorophyllkomponente. *Bot. Gaz.* **95**, 529 (1934).

Namenverzeichnis.

- Ackermann, D. 298.
Adler, E. 15, 165, 262, 298, 303, 304.
Aeschbacher, R. 318.
Akagi, H. 193, 298.
Almasy, F. 86, 298.
Ammundsen, E. 298.
Anderson, J. A. 308.
Ardaschew, B. I. 202, 298.
Armstrong, K. F. 16, 298.
Arnold, H. 192, 324.
Asahina, Y. 193, 298.
Askew, F. A. 215, 298.
Axelrod, E. 298.
- Bachmann, W. E. 206, 298.
Bachstetz, M. 134, 298.
Bálint, M. 264.
Ballauf, A. 210, 325.
Balsler, G. 26.
Bárány, F. 237, 325.
Barkan G., 98, 298, 299.
Baroni, E. 141, 300.
Bastow, S. H. 21, 45, 235, 299.
Batty, J. W. 233, 299.
Bauer, K. 103, 305.
Becker, E. 6, 50, 55, 61, 65, 66, 67, 75, 169, 171, 173, 174, 299, 319, 324.
Becker, G. 237.
Behringer, H. 214, 308.
Behrnts-Jensen, H. 129, 325, 326.
Béres, T. 133, 138, 139, 302, 328.
Bergel, F. 213, 250, 299, 321,
Bernhauer, K. 16, 299.
Bertho, A. 16, 299.
Bindseil, A. W. 201, 302.
- Black, A. 164, 307.
Bock, F. 246, 326.
Boekenooogen, H. A. 12, 64, 266, 267, 299.
Bohle, K. 217, 218, 322.
Bowden, E. P. 21, 45, 235, 299.
Brandt, K. M. 166, 303.
Brdlik, V. 12, 320.
Brockmann, H. 14, 15, 27, 47, 49, 52, 59, 61, 81, 113, 117, 128, 129, 130, 132, 133, 138, 140, 141, 142, 143, 148, 149, 150, 153, 157, 158, 163, 165, 182, 183, 184, 185, 235, 239, 241, 243, 299, 300, 312.
Bruce, W. F. 206, 300.
Brunner, O. 141, 143, 300.
Bukin, W. N. 300.
Bünning, E. 136, 300.
Burawoy, A. 233, 299.
Burkhardt, G. N. 141, 144, 300.
Busse, A. 81, 243, 299.
Butenandt, A. 257, 300.
- Cahn, R. S. 6, 47, 300.
Carlsohn, H. 6, 19, 21, 50, 85, 194, 300.
Cassidy, H. 232, 308.
Cassidy, H. G. 48, 58, 60, 70, 235, 308.
Castle, D. C. 6, 70, 232, 300.
Cavallini, G. 134, 298.
Celsi, S. A. 16, 300.
Cerecedo. L. R. 51, 64, 236, 300, 301.
Chargaff, E. 14, 125, 136, 137, 265, 301.
Chemerda, J. M. 206, 298.

- Cholnoky, L. v. 45, 52, 63, 88,
 119, 122, 124, 129, 134, 151,
 152, 230, 301, 328.
 Clar, E. 36, 301.
 Coffari, E. 16, 301.
 Cook, A. H. 16, 24, 104, 301.
 Cook, J. W. 204, 301.
 Coward, K. H. 13, 129, 301.
 Criegee, R. 163, 301.

 Dam, H. 16, 253, 301, 302.
 Danckwortt, P. W. 86, 302.
 Dane, E. 201, 214, 302.
 Dániel, E. v. 138, 139, 302.
 Dansi, A. 199, 312.
 Das, N. 263, 302.
 Dattler, G. 22, 89, 280, 288, 297,
 319.
 Defalque, A. 102, 307.
 Deijs, W. B. 162, 311.
 Delfs, E. 48, 235, 308.
 Deppe, M. 247, 326.
 Desnuelle, P. 55, 198, 199, 207,
 312, 314.
 Deutsch, A. 134, 153, 313.
 Dhéré, Ch. 12, 57, 58, 86, 95,
 145, 302.
 Diels, O. 208, 302.
 Dieryck, J. 136, 301.
 Dietrich, H. 209, 324.
 Dietzel, E. 196, 309.
 Dimroth, K. 214, 324.
 Dorée, Ch. 214, 302.
 Drumm, P. J. 238, 302.
 Drummond, J. C. 58, 60, 61,
 129, 130, 211, 212, 231, 247,
 249, 270, 303, 307, 321, 322.
 Duschinsky, R. 21, 82, 254, 256,
 303.

 Eckart, O. 52, 303.
 Eckles, C. H. 13, 57, 138, 140,
 141, 317.
 Edisbury, J. R. 233, 303, 317.
 Eekelen, M. van 138, 144, 231,
 303.
 Ehrenberg, U. 327.

 Ellinger, Ph. 164, 303.
 El Ridi, M. S. 6, 114, 115, 116,
 139, 140, 148, 149, 306.
 Emerson, G. A. 247, 249, 250,
 303, 304.
 Emerson, O. H. 247, 249, 250,
 303, 304.
 Emmerie, A. 144, 231, 235, 303.
 Ernest, A. 12, 320.
 Ernst, P. 275, 277, 278, 303.
 Erxleben, H. 87, 260, 311.
 Euler, H. v. 14, 15, 45, 49, 59,
 70, 130, 142, 144, 148, 149,
 156, 164, 166, 262, 263, 303,
 304, 309, 315.
 Evans, H. M. 247, 249, 250, 303,
 304.

 Fabre, R. 146, 154, 304.
 Farmer, S. N. 215, 217, 298, 304.
 Fernholz, E. 248, 250, 304.
 Fieser, L. F. 5, 206, 215, 300,
 304, 305.
 Fink, H. 4, 15, 99, 222, 223, 254,
 305.
 Fischer, H. 14, 91, 95, 96, 97, 98,
 101, 103, 105, 107, 125, 305.
 Fischer, W. v. 22, 311.
 Fischer Jörgensen, P. 24, 296, 328.
 Fox, D. L. 144, 145, 155, 305,
 306, 321, 327.
 Franck, R. 12, 48, 59, 61, 188,
 271, 272, 274, 275, 277, 306,
 316, 323.
 Frehden, O. 24, 223, 296, 328.
 Frisch, Ch. 306.
 Fritzsche, H. 248, 249, 253, 309,
 310.
 Fuchs, H. G. 298.
 Fujise, Sh. 178, 306.
 Funk, C. 327.

 Gaffron, H. 95, 97, 125, 306.
 Gard, U. 45, 49, 142, 144, 304.
 Gattermann, L. 16, 306.
 Gempp, A. 225, 320.
 Giera, A. 192, 315.

- Gillam, A. E. 6, 70, 114, 115, 116,
139, 140, 142, 148, 149, 232,
233, 234, 300, 306.
- Giral, F. 166, 306.
- Goldberg, M. W. 209, 318.
- Goppelsroeder, F. 5, 307.
- Grassmann, W. 6, 11, 16, 61, 83,
196, 265, 299, 307.
- Greene, R. D. 164, 307.
- Grotepass, W. 102, 307.
- Grundmann, Ch. 31, 117, 125, 130,
131, 137, 150, 157, 160, 161,
307, 313.
- Gugelmann, W. 149, 310.
- Günther, Ph. 196, 309.
- György, P. 164, 313.
- Haagen-Smit, A. J. 87, 260, 311.
- Haase, R. 182, 183, 184, 299.
- Haitinger, M. 86, 307.
- Hamano, S. 232, 307.
- Hämmerle, W. 12, 61, 178, 316.
- Harper, S. H. 233, 299.
- Hartley, G. S. 24, 307.
- Hartmann, A. 209, 324.
- Hartzler, E. R. 58, 60, 70, 232,
308.
- Harwood, H. J. 64, 65, 190, 317.
- Hasenkamp, J. 95, 96, 97, 125,
305.
- Haworth, R. D. 184, 307.
- Hayashi, F. 190, 307.
- Heidelberger, M. 217, 309.
- Heilbron, I. M. 6, 14, 15, 48, 58,
60, 61, 70, 124, 135, 140, 141,
142, 144, 146, 165, 231, 232,
233, 234, 299, 300, 306, 307.
- Helberger, J. H. 103, 308.
- Hellström, H. 144, 304.
- Henderson, G. M. 24, 308.
- Hennessy, D. J. 51, 64, 236, 300.
- Herrle, K. 105, 305.
- Hershberg, E. B. 5, 206, 304.
- Heslop, R. N. 58, 60, 61, 231,
307.
- Hess, W. W. 184, 324.
- Hesse, G. 6, 16, 47, 59, 66, 67, 82,
183, 218, 281, 308, 324.
- Hevér, D. B. 103, 308.
- Hewett, C. L. 204, 301.
- Hey, D. 134, 308.
- Hieger, I. 204, 301.
- Hillemann, H. 308.
- Hirschmann, H. 256, 308.
- Hoerburger, W. 99, 308.
- Hoffmann La Roche u. Co. 256,
308.
- Hofmann, A. 6, 24, 227, 320.
- Hofmann, H. J. 101, 103, 305.
- Hofmann, K. 201, 258, 318.
- Hofmeier, H. 308.
- Holmes, H. N. 15, 48, 58, 60,
70, 232, 233, 235, 308.
- Hoover, A. A. 249, 303.
- Höss, O. 201, 302.
- Horner, L. 223, 324.
- Huber, W. 192, 308.
- Hübner, H. 151, 309.
- Huhn, O. 237, 324.
- Hüttel, R. 82, 214, 219, 308, 324.
- I. G. Farbenindustrie A. G. 248,
249, 308.
- Indest, H. 200, 325.
- Ingraham, M. A. 137, 308.
- Isler, M. 12, 90, 326.
- Ito, T. 309.
- Jackson, H. 141, 144, 146, 300,
307.
- Jacobs, W. A. 217, 309.
- Jacobsen, R. P. 215, 304.
- Jensen, P. 6, 11, 14, 21, 25, 38,
41, 42, 48, 75, 76, 87, 176,
185, 186, 232, 309, 318.
- Jockers, K. 5, 15, 16, 22, 23, 66,
70, 280, 285, 290, 297, 319.
- John, W. 196, 248, 252, 309.
- Jones, R. N. 146, 307.
- Jones, W. E. 233, 299, 306.
- Josephy, B. 144, 303.
- Joshel, L. M. 206, 316.
- Julius, H. W. 231, 303.
- Kainrath, P. 195, 320.
- Kaltschmitt, H. 164, 165, 313,
314.

- Kanaoka, Y. 211, 324.
 Karrer, P. 8, 14, 15, 45, 46, 48,
 49, 62, 83, 111, 117, 125, 126,
 128, 129, 130, 134, 137, 140, 145,
 146, 148, 149, 150, 151, 152,
 153, 156, 158, 164, 176, 177,
 178, 197, 198, 211, 212, 222,
 230, 231, 232, 234, 245, 247,
 248, 249, 253, 304, 309, 310,
 311.
 Kaszuba, F. J. 236, 301.
 Keller, H. 215, 325.
 Kelly, W. 184, 307.
 Kitagawa, S. 5, 215, 216, 316, 322.
 Kleinau, W. 141, 300.
 Koch, F. C. 73, 89, 317.
 Koenig, H. 125, 126, 137, 151,
 309, 310.
 Kögl, F. 87, 162, 260, 311.
 Körner, 72.
 Kolthoff, I. M. 22, 311.
 Kon, G. A. R. 215, 217, 298, 304.
 Kon, S. K. 6, 114, 115, 149, 306.
 Kondo, H. 5, 221, 225, 311.
 Konz, W. 224, 325.
 Koschara, W. 9, 14, 15, 16, 44,
 50, 58, 75, 78, 80, 85, 164,
 167, 168, 173, 174, 303, 311, 312.
 Kotake, M. 221, 312.
 Kotzschmar, A. 171, 325.
 Kränzlin 12, 312.
 Kraus, K. 215, 325.
 Kraut, H. 312.
 Kuhn, R. 6, 13, 14, 25, 26, 27,
 31, 52, 55, 59, 61, 64, 73, 96,
 110, 113, 117, 118, 128, 129,
 130, 131, 132, 133, 134, 138,
 140, 141, 142, 148, 149, 150,
 152, 153, 155, 157, 158, 160,
 161, 164, 165, 166, 167, 197,
 198, 199, 200, 207, 235, 312,
 313, 314.
 Kuwada, K. 221, 312.
 Kuwada, S. 210, 314.
 Lang, O. 11, 83, 196, 265, 307.
 Lange, E. 280, 314.
 Lautsch, W. 98, 305.
 Laubereau, O. 98, 305.
 Lanzing, J. C. 43, 138, 160, 323.
 Lava, V. G. 48, 235, 308.
 Lavington, E. M. W. 6, 321.
 Lederer, E. 13, 14, 16, 21, 27, 82,
 118, 125, 128, 131, 132, 136,
 137, 142, 145, 146, 148, 154,
 155, 163, 233, 254, 256, 301,
 303, 304, 306, 313, 314, 315.
 Levi, G. R. 192, 315.
 Lewis, L. 253, 302.
 Lin, K. H. 98, 305.
 Lindquist, T. 127, 138, 139, 326.
 Linstead, R. P. 104, 301.
 Lipmaa, Th. 13, 133, 315.
 Logemann, W. 257, 258, 319.
 Lou, C. H. 16, 315.
 Lovern, J. A. 141, 144, 300.
 Lynen, F. 228, 315.
 Lythgoe, B. 135, 307.
 Mackinney, G. 91, 92, 128, 129,
 131, 315.
 MacWalter, R. J. 130, 211, 212,
 247, 303.
 Maier, K. 185, 299.
 Malmberg, M. 130, 165, 304, 315.
 Manly, R. S. 58, 60, 70, 232, 308.
 Marchlewski, L. 315, 316.
 Mark, H. 73, 190, 191, 192, 316.
 Matlack, M. B. 129, 316.
 Medick, H. 97, 305.
 Meldahl, H. F. 258, 318.
 Merz, K. W. 12, 277, 316.
 Mesquita, B. 130, 319.
 Michaelis, M. 262, 298.
 Miller, E. S. 316.
 Milner, H. W. 128, 315.
 Mohammad, A. 249, 303.
 Mohler, H. 12, 61, 178, 316.
 Molodenski, W. S. 316.
 Moore, T. 145, 315.
 Morf R. 15, 128, 230, 231, 309,
 310, 311, 331.
 Morimoto, S. 210, 314.
 Morris, J. O. R. 230, 313.
 Morton R. A. 58, 60, 61, 231,
 233, 303, 307, 317.

- Müller, A. 308.
 Müller, G. 6, 19, 21, 50, 85, 194, 257, 300.
 Murri, I. K. 300.
 Musajo, L. 255, 316.
 Nagasaki, A. 178, 306.
 Nagel, K. 280, 314.
 Neracher, O. 239, 316.
 Newman, M. S. 206, 316.
 Niel, C. B. van 125, 136, 316.
 Nielsen, N. 197, 222, 245, 309.
 Obst, H. 153, 309.
 Ochiai, E. 5, 215, 216, 316.
 Offe, H. A. 82, 220, 221, 322.
 Ohno, S. 221, 311.
 Orchin, M. 206, 316.
 Ostwald, W. 276, 278.
 Oswald, A. 134, 309.
 Ottawa, H. 215, 325.
 Page, H. J. 110, 125, 326.
 Palmer, L. S. 13, 57, 138, 140, 141, 317.
 Palmer, R. G. 130, 319.
 Pannevis, W. 138, 303.
 Parke, Davis a. Co. 233, 317.
 Parry, E. G. 135, 141, 144, 165, 300, 307.
 Pasedach, H. 210, 325.
 Petrow, V. A. 214, 302.
 Petter, H. F. M. 14, 125, 137, 317.
 Pfau, A. St. 5, 181, 317.
 Philip's Gloeilampenfabriken 245, 317.
 Phipers, R. F. 6, 47, 48, 124, 135, 165, 300, 307.
 Plattner, P. A. 5, 181, 317, 318.
 Ploetz, T. 200, 325.
 Pool, W. O. 64, 65, 190, 317.
 Potts, A. M. 73, 89, 317.
 Price, J. R. 176, 317.
 Pritchard, H. 233, 317.
 Probst, O. 62, 207, 325.
 Raffy, A. 302.
 Ralston, A. W. 64, 65, 190, 317.
 Raney, 257.
 Rau, B. 99, 329.
 Rea, J. L. 58, 60, 61, 231, 307.
 Rebay, A. v. 103, 308.
 Reicheneder, F. 218, 308.
 Reichstein T. 214, 239, 257, 258, 259, 260, 316, 318, 320.
 Reinecke, H. 107, 305.
 Reinemund, K. 198, 313.
 Rennhak, S. 205, 326.
 Renz, J. 228, 317.
 Retowsky, R. 317.
 Rickert, H. F. 208, 302.
 Ridi s. El Ridi.
 Riegel, B. 206, 305.
 Ringier, B. H. 253, 309.
 Robinson, R. 176, 317.
 Rogowski, W. de 13, 57, 58, 69, 317.
 Rosenblum, Ch. 22, 311.
 Rossner, W. 206, 207, 318.
 Rudy, H. 166, 314, 318.
 Rügger, A. 151, 310.
 Ruggli, P. 6, 11, 14, 21, 25, 38, 41, 42, 48, 75, 76, 87, 176, 185, 186, 318.
 Ruiz, A. S. 270, 303, 321.
 Rule, H. G. 24, 308.
 Ruzicka, L. 193, 201, 209, 258, 318.
 Rzeppa, H. 167, 199, 314.
 Saito, G. 73, 190, 191, 192, 316.
 Salomon, H. 149, 150, 164, 211, 213, 247, 248, 249, 253, 309, 310.
 Sandoz, Chem. Fabrik vorm. 225, 259, 318.
 Sannié, Ch. 72, 73, 318.
 Sawlewicz, J. 214, 318.
 Scarborough, H. 238, 302.
 Schales, O. 98, 298, 299, 318.
 Scheff, G. J. 138, 139, 302.
 Schellenberg, H. 193, 318.
 Schenck, Fr. 15, 239, 241, 326.
 Schenck, G. 225, 320.
 Schertz, F. M. 318.
 Schlemmer, F. 225, 330.
 Schlenk, F. 15, 59, 70, 263, 304.
 Schlientz, W. 117, 128, 129, 140, 310.

- Schmidt-Nielsen, S. 142, 144, 318.
 Schmidt, W. 97, 305.
 Schmitt, J. 201, 302.
 Schneider, E. 125, 319.
 Schneider, J. Z. 319.
 Schön, K. 15, 25, 29, 34, 35, 52,
 64, 65, 66, 83, 85, 92, 130,
 132, 133, 201, 204, 319, 327.
 Schönheyder, F. 253, 302.
 Scholl, R. 36, 319.
 Schöpf, C. 6, 50, 55, 61, 65, 66,
 67, 75, 169, 171, 173, 299,
 319, 325.
 Schöpp, K. 15, 83, 128, 140,
 149, 150, 164, 230, 231, 234,
 309, 310, 311.
 Schuette, H. A. 130, 319.
 Schulte, W. 214, 302.
 Schürch, O. 204, 319.
 Schwab, G. M. 5, 15, 16, 22, 23,
 66, 70, 89, 280, 281, 285, 288,
 290, 297, 319.
 Seligman, A. M. 206, 305.
 Serini, A. 257, 258, 319.
 Seybold, A. 95, 319.
 Siedel, W. 125, 319.
 Simpson, J. C. E. 189, 319.
 Singer, E. 130, 211, 212, 247, 303.
 Smakula, A. 314.
 Smith, J. H. C. 125, 136, 316.
 Solmssen, U. 125, 126, 137, 145,
 146, 149, 151, 152, 153, 158,
 304, 309, 310, 311, 320.
 Sonderhoff, R. 224, 325.
 Sörensen, N. A. 16, 142, 144,
 318, 319, 320.
 Späth, E. 195, 225, 320.
 Spielberger, G. 98, 305.
 Spoehr, H. A. 46, 92, 320.
 Stadler, F. 97, 305.
 Stange, O. 245, 326.
 Steenbock, H. 137, 308.
 Steiger, M. 257, 258, 259, 260, 320.
 Stein, G. 6, 14, 24, 46, 58, 59,
 70, 81, 87, 90, 92, 93, 189,
 192, 208, 217, 244, 327.
 Stein, R. 143, 300.
 Sternbach, L. 193, 318.
 Stewart, C. P. 238, 302.
 Stix, W. 16, 320.
 Stoklasa, J. 12, 320.
 Stoll, A. 6, 12, 14, 24, 91, 92,
 109, 227, 320, 326.
 Strain, H. H. 48, 49, 69, 82, 128,
 129, 133, 166, 320, 321.
 Ströbele, R. 6, 64, 197, 198, 200,
 313, 314.
 Strong, F. M. 8, 14, 48, 62, 176,
 177, 197, 198, 311.
 Suginome, H. 309.
 Sumner, F. B. 321.
 Stüllmann, H. 106, 138, 147, 321.
 Szécsényi-Nagy, E. 106, 138, 147,
 321.
 Szent-Györgyi, A. 238.
 Takeda, Y. 125, 137, 307.
 Tauber, H. 321.
 Taylor, W. J. 6, 321.
 Tecklenburg, M. L. 299.
 Thaler, H. 12, 267, 268, 269, 321.
 Thompson, H. W. 6, 70, 232, 300.
 Thorbjarnarson, T. 270, 303, 321.
 Thornton, J. J. 236, 301.
 Tin, S. 327.
 Tischer, J. 135, 136, 321.
 Todd, A. R. 213, 250, 299, 321.
 Tomita, M. 225, 311.
 Tóth, G. 55, 264.
 Treibs, A. 16, 322.
 Trikojus, V. M. 129, 322.
 Trumphy, B. 142, 144, 318.
 Tschesche, R. 82, 217, 218, 220,
 221, 322.
 Tsuchiya, Y. 221, 322.
 Tsuda, K. 5, 215, 216, 316, 322.
 Tswett, M. 1, 2, 8, 12, 13, 14, 15,
 16, 19, 20, 42, 49, 54, 55, 56,
 66, 80, 81, 90, 91, 92, 109,
 112, 176, 210, 322, 323.
 Turner, W. J. 102, 323.
 Tuzson, P. 14, 115, 127, 132,
 133, 134, 138, 139, 140, 141,
 142, 143, 147, 150, 154, 156,
 270, 296, 323, 328, 329.

- Ueno, K. 309.
 Ujhelyi, E. 88, 133, 230, 328.
 Urban, A. 317.
 Uyeo, S. 225, 311.

 Valentin, H. 12, 16, 58, 61, 271, 272, 279, 323.
 Veen, A. G. van 43, 138, 160, 323.
 Vegezzi, G. 13, 58, 95, 145, 302, 324.
 Vermast, P. G. F. 130, 324.
 Verne, J. 324.
 Verzár, F. 106, 138, 147, 321.
 Vetter, H. 29, 34, 52, 85, 167, 199, 201, 204, 207, 314, 327.
 Völker, O. 143, 300, 324.

 Wagner-Jauregg, Th. 164, 190, 192, 203, 313, 314, 324.
 Wald, G. 142, 143, 234, 324.
 Waldenström, J. 99, 100, 102, 107, 324.
 Waldmann, H. 213, 321.
 Walker, O. 49, 111, 117, 128, 130, 134, 148, 156, 231, 304, 309, 311.
 Wallenfels, K. 161, 314.
 Walter, E. D. 184, 324.
 Wang, Y. 214, 302.
 Watabane, Sh. 309.
 Weber, H. M. 45, 46, 49, 176, 178, 311.
 Webster, E. T. 58, 60, 61, 231, 307.
 Wehrli, H. 311.
 Weiner, G. 275, 277, 278, 303.
 Werder, F. v. 15, 239, 241, 326.
 Wetter, F. 214, 324.
 Weygand, F. 55, 73, 166, 198, 199, 312, 313, 314.
 Whitehorn, J. C. 254, 324.
 Widenbauer, F. 237, 324.
 Wiedemann, E. 92, 320.
 Wieland, H. 16, 62, 82, 169, 171, 200, 207, 209, 210, 211, 215, 218, 223, 224, 306, 324, 325.
 Wieland, U. 228, 315.
 Wijngaarden, J. C. H. van 140, 325.
 Wilkinson, H. 233, 317.
 Willert, K. 319.
 Willheim, L. 306.
 Williams, N. E. 189, 319.
 Willstaedt, H. 14, 16, 27, 67, 125, 127, 129, 131, 136, 138, 139, 140, 141, 142, 159, 180, 181, 230, 232, 237, 325, 326.
 Willstätter, R. 3, 12, 13, 14, 78, 90, 92, 109, 110, 125, 261, 326.
 Windaus, A. 15, 205, 239, 241, 245, 246, 247, 326.
 Winterstein, A. 6, 13, 14, 15, 16, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 34, 35, 38, 46, 52, 53, 58, 59, 64, 65, 66, 70, 81, 83, 85, 87, 90, 92, 93, 96, 110, 114, 129, 132, 134, 142, 152, 189, 192, 201, 203, 204, 208, 217, 244, 256, 314, 319, 326, 327.
 Wintersteiner, O. 256, 308.
 Wislicenus, H. 46, 327.
 Wisselinck, S. 308.
 With, T. K. 67, 131, 138, 140, 141, 142, 159, 230, 326.
 Wolff, L. K. 144, 231, 303.
 Wolfrom, M. L. 184, 324.
 Work, T. S. 213, 250, 299, 321.
 Wunderlich, W. 247, 326.

 Yamamoto, R. 327.
 Young, R. T. 327.

 Zechmeister, L. 14, 16, 24, 27, 45, 63, 88, 115, 119, 124, 127, 129, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 147, 150, 151, 152, 154, 155, 156, 230, 236, 264, 270, 296, 328, 329.
 Zeile, K. 99, 329.
 Zscheile, F. P. jun. 92, 329.
 Zussmann, H. 142, 234, 324.

Sachverzeichnis.

- Acacia acuminata 129.
Aceanthren 206.
Aceanthrenderivate 206.
Acetanilid 196.
Aceton 54.
Acetylamino-benzpyren 205.
Acetyl-benzpyren 205.
Acetylcellulose 190.
Acid clay 45.
Aeridin 203, 222.
Actinia equina 146, 154.
Actinio-erythrin 146, 154.
Actinoloba dianthus 146.
Acylabspaltung 6.
Adrenalin 254.
Adsorbate, anorganische 89.
Adsorbens, Einfüllung 68.
Adsorptionsaffinität 16.
Adsorptionsanalyse 1.
Adsorptionsanalyse bei Luftab-
schluß 60.
Adsorptionsapparat 55.
Adsorption aus ruhender Lösung
4.
Adsorption aus strömender Lö-
sung 4.
Adsorptionsmittel 42, 111.
Adsorptionsmittel, Dispersität
45.
Adsorptionsprobierrohr 65.
Adsorptionsrangordnung (organ.
Subst.) 17, 30, 31, 32, 33.
Adsorptionsrangordnung (An-
ionen) 289.
Adsorptionsrangordnung (Kat-
ionen) 282, 286.
Adsorptionsrohr 57.
Adsorptionsrohr, Maße 61.
Adsorptionsrohr mit Glasschliff
59, 62, 63.
Adsorptionston 45.
Adsorptionswärme 194.
Adsorptive Filtration 4, 99.
Aesculus hippocastanum 128, 130,
132.
Ahorn 132.
Aktivierte Erden 50.
Aktivierung 43, 48.
Aldehyde 68.
Alfalfa 57.
Alfalfaheu-Auszug 57.
Algen-Polyene 135.
Aliphatische Verbindungen 189.
Alkaloide 221, 277.
Alkaloidgehalt (galenische Prä-
parate) 277.
Alkannan 163.
Alkanna tinctoria 163.
Alkannin 163, 164, 268.
Alkannin-methyläther 163.
Alkohol 54.
10-Alkyl-1,2-benzanthracen 206.
Allgemeiner Teil 1.
Allo-pregnan-Reihe 259.
Allo-pregnan-tetrol-(3, 17, 20, 21)
260.
Allo-pregnan-triol-(3, 17, 20) 260.
Aloe 276.
Althaein 176, 178.
Aluminiumhydroxyd III 49.
Aluminiumoxyd 22, 45, 46.
Aluminiumoxyd, Aktivierung 48.
Aluminium oxydatum anhydri-
cum 47.

- Aluminiumoxyd, Desaktivierung 48.
 Aluminiumoxyd, standardisiert nach Brockmann 47.
 Aluminiumphosphat 82.
 Amanita phalloides 228.
 Amanitatoxin 228.
 p-Aminobenzol 268.
 Amino-cholanthren 206.
 Amino-naphtol-sulfosäuren 38, 40.
 Amminkomplexe der Kationen 287.
 Ammoniumsulfid 281.
 β -Amyrin 193.
 Analyse, anorganische 16.
 Analysen-Quarzlampe 84.
 Anatto 268.
 Andrenosteron 258.
 Anemonia' sulcata 146.
 Aneurin 236.
 Anhydro-azafrinon-amid 153.
 Anhydro-azafrinon-methylester 153.
 Anhydro-capsanthinon 152.
 Anhydro- β -carotinon 150.
 Anionen, Trennung 288, 297.
 Anisol 54.
 Anorganische Analyse 16.
 Anorganische Chromatographie 280.
 Anorganische Ionen 22.
 Anorganische Stoffe, Reinigung 289.
 Anreicherung 9.
 Antheraxanthin 29, 112, 134.
 Anthocyane 176.
 Anthracen 34, 202, 203, 204.
 Anthrachinon 202.
 Anthrachinon-Drogen 275, 276.
 Anthrachinon-Farbstoffe 162.
 Anthranole 276.
 Anthro-dianthren 37, 38.
 Antimon 282, 285.
 Antimontrichlorid 89.
 Antipyrin 222.
 Antisterilitätsvitamin 247.
 Anwendungsbereich 5.
 Aphanicin 136.
 Aphanin 136.
 Aphanizomenon flos-aquae 136.
 Aphanizophyll 136.
 Apparat 55, 100.
 Appias nero 170.
 Aprikose 129.
 Aquoflavin 168.
 Apo-1-azafrinal 153.
 α -Apo-2-carotinal 149.
 β -Apo-2-carotinal 149.
 β -Apo-4-carotinal 149.
 Apo-1-norbixinal-methylester 152.
 Apo-2-norbixinal-methylester 152.
 Apo-3-norbixinal-methylester 152.
 l-Arabinose-2-nitro-3,5-dimethylanilid 199.
 d-Arabinose-2-nitro-4,5-dimethylanilid 200.
 Araroba depur. 275, 276.
 Arbutus unedo 133.
 Aromatische Kohlenwasserstoffe 29, 201.
 Arsen 282, 285.
 l-Ascorbinsäure 238.
 Ascosterin 211.
 Astacin 141, 142, 144, 146.
 Astacinester 145.
 Astraphloxin 26.
 Äther 54.
 Ätherische Öle 6, 192, 194.
 Ätioglucobilin 105.
 Ätioporphyrin 105.
 2-Äthoxy-6,9-diamino-acridin 189.
 Äthylalkohol 54.
 17-Äthyl-testosteron 259.
 A-Vitamin 229.
 Aufbewahrung der Rohre 64.
 Auffärben 77, 187.
 Aufnahmebuffer 79.
 Auramin O 185, 186.
 Auspressen des Adsorbens 75.

- Austauschadsorption 21.
 Auxine 260.
 Axinella cristagalli 146.
 Azafranillo 134.
 Azafrin 134, 153.
 Azafrinal-I-methylester 153.
 Azafrinal-II-methylester 153.
 Azafrinal-I-methylester-oxim 153.
 Azafrinal-II-methylester-oxim 153.
 Azafrinester 137.
 Azafrin-methylester 153.
 Azafrinon 153.
 Azafrinon-aldehyd 149.
 Azafrinon-amid 153.
 Azafrinon-methylester 153.
 cis-Azobenzol 24, 296.
 trans-Azobenzol 296.
 Azobenzol-standard 113.
 Azofarbstoffe 38.
 Azulen 180, 181.
 Azulenpikrat 5.
 Azulen-trinitrobenzolat 181.
 Bacillus fluorescens liquefaciens 166.
 Bacillus Grassbergeri 137.
 Bacillus Lombardo Pellegrini 137.
 Bacillus putidus 166.
 Bacillus pyocyaneus 166.
 Bacterio-chlorophyll 95, 126.
 Bacterio-phäoophytin 96.
 α -Bacterioruberin 137.
 β -Bacterioruberin 137.
 Bacterium chromaticum 125.
 Bacterium halobuim 137.
 Bakterien-carotinoide 125.
 Bakterien-chlorophyll 95.
 Bakterien-polyene 135.
 Balaenoptera musculus 142.
 Basen, heterocyclische 221.
 Basische Farbstoffe 185.
 Batate 129.
 Batylalkohol 271.
 Baumwolle 42.
 Baumwollsaatöl 246.
 Bauxit 264.
 Begleitstoffe 74.
 Beizen 74.
 Belichtung 89.
 Belichtung der Säule 289.
 1,2-Benzanthracen 206.
 2,3-Benzanthracen 36.
 Benzanthracenderivate 206.
 1,2-Benzcarbazol 202, 203, 222.
 1,2-Benz-5,6-(2',3'-naphtho)-anthracen 35.
 Benzanthron 85.
 Benzidin 88.
 Benzin 54.
 Benzoazurin G 187.
 Benzol 54.
 Benzolreihe 196.
 Benzopurpurin 187, 188.
 3,4-Benzphenanthren 206.
 Benzphenanthrenderivate 206.
 1,2-Benzpyren 34, 37, 204.
 3,4-Benzpyren 34, 37, 204, 205.
 Benzpyren-monocarbonsäure-methylester 205.
 Benzpyren-monosulfosäure-methylester 205.
 Bergamottöl 195.
 Bichromat 289.
 Bicyclo-(0,3,5)-deca-pentaen-(1,3,5,7,9) 181.
 Bilirubin 106, 107.
 Bilirubinoide Farbstoffe 105.
 Biliverdin 107.
 Biochemische Aktivatoren 261.
 Birke 132.
 Bisanhidro- β -carotinon 150.
 Bis-6-methoxy-3,4-dihydro-naphthyl-1,1'-acetylen 201.
 Bittersüß 123, 129.
 Bixa orellana 134.
 Bixin 268.
 cis-Bixin 24.
 trans-Bixin 24.
 Bixin-dialdehyd 150.
 Bixin-methylester (labil) 152.
 Bixin-methylester (stabil) 152.
 Bixin (labil) 152.
 Bixin (stabil) 152.

- Bixol 134.
 Blatt-chromatogramm 92.
 Blauwal 142.
 Blei 283, 287, 297.
 Bleicherde 45, 50, 78, 79.
 Bleisulfid 51.
 Bluefin Thune-Leberöl 243.
 Blut, Adrenalingehalt 254.
 Blutkoagulation, Inhibitor 265.
 Blutkohle 51.
 Blutserum-carotinoide 106, 139.
 Blutserum-bilirubin 106.
 Blutserum (Kuh) 140.
 Blutserum-lipochrom 127.
 Blutserum (Mensch) 138.
 Blutserum (Pferd) 140.
 Blutwurzel 225.
 Bohnenkaffee 280.
 Boletol 162.
 Boletus badius 162.
 Boletus satanas 162.
 Bordeauxrot 179.
 Botryllus Schlosseri 145.
 Bougainvillaea glabra 176.
 Brasan 203.
 Braunalge 124.
 Brennessel 128.
 Brenzcatechin 196.
 Brenzchinovasäure 209.
 Brillantgrün 185.
 4'-Brom-7-methyl-8,9-dimethyl-
 len-1,2-benzanthracen 206.
 Buche 132.
 Bufo gargarizans 220.
 γ -Bufogenin 221.
 Bufotalin 218, 219, 220.
 Bufo vulgaris 214, 218.
 Butter 140, 266, 269.
 B₁-Vitamin 236.
 B₂-Vitamin 164, 237.
 Cadmium 282, 283, 285, 287.
 Calciumcarbonat 49.
 Calcium carbonicum laevissimum
 45.
 Calcium carbonicum praecipita-
 tum 45.
 Calciumhydroxyd 45, 49.
 Calciumsulfat 49.
 Calendula-auszug 268.
 Calotropagenin 218.
 Calotropis 218.
 Calotropis procera 218.
 Campher 82.
 Cantharellusarten 136.
 Cantharidin 272.
 Cantharidentinktur 272, 274.
 Capillaranalyse 5.
 Capsanthin 29, 31, 113, 119, 120,
 134, 138, 145, 151, 291, 293,
 294.
 Capsanthin-acetat 151.
 Capsanthin-caprinat 122.
 Capsanthin-ester 121, 151.
 Capsanthinon 151, 152.
 Capsanthol 151.
 Capsanthylal 151.
 Capsicum annuum 128, 134.
 Capsorubin 29, 31, 113, 119, 120,
 121, 134, 145.
 Capsorubin-acetat 152.
 Capsorubin-caprinat 122.
 Capsylaldehyd 151.
 Capsylaldehyd-oxim 151.
 Carbazol 202, 222.
 Carboraffin 51.
 Cardium tuberculatum 145.
 Carotin 93, 134, 138, 145, 146,
 147, 154, 234, 268.
 α -Carotin 28, 30, 112, 115, 128,
 129, 130, 131, 132, 133, 134,
 135, 136, 137, 140, 141, 143,
 144, 235.
 β -Carotin 28, 30, 112, 115, 128,
 129, 130, 131, 132, 133, 134,
 135, 136, 137, 140, 141, 143,
 144, 145, 146, 148, 155, 157,
 160, 235, 291.
 γ -Carotin 28, 30, 112, 117, 128,
 129, 131, 137, 235.
 β -Carotinal 149.
 Carotin, iso 148, 155.
 Carotin, Isomerisierung 6, 148.
 β -Carotin-monoxyd 156.

- Carotinoide 27, 108, 234.
 Carotinoide, Bestimmung 113.
 Carotinoide, epiphasische 109.
 Carotinoide, hypophasische 109.
 Carotinoide, Identifizierung 113.
 Carotinoide, Isomerisierung 114.
 Carotinoide, Mikrochromatographie 159.
 Carotinoide, pflanzliche 117.
 Carotinoide, tierische 127.
 Carotinoide, Umwandlungsprodukte 148, 155.
 β -Carotinon 33, 148, 149, 157.
 β -Carotinon-aldehyd 148, 149, 150.
 Carotin-oxyd 148.
 β -Caroton 149.
 Carrot oil 268.
 Carr-Price-Reagens 89.
 Cascara Sagrada 276.
 Cassia fistula 276.
 Cellit 190, 191.
 Cellulose-acetat 190, 192.
 Chamazulen 180.
 Ch'an Su 221.
 Chemische Änderung in der Säule 5.
 Chimera monstrosa 270.
 China-alkaloide 222.
 Chinesische Kröte 220.
 Chinin 222, 223.
 Chinizarin- α -carbonsäure 162.
 Chinizarin-reihe 162.
 Chinolin 222.
 Chinovasäure 209.
 Chinovin 209.
 Chitinase 264.
 Chloralhydrat 222.
 Chlorid 289.
 Chlor-kryptostenon 211.
 5-Chlor-10-methyl-1,2-benz-anthracen 5.
 Chlorin-e₈-trimethylester 98.
 Chloroform 54.
 Chlorophyll 12, 90.
 Chlorophyll (Bakterien) 95.
 Chlorophyll a 91, 93.
 Chlorophyll b 91, 93, 94.
 Chlorophyll c 92.
 Chlorophyll-derivate 95.
 Chlorophyllid 97.
 Chlorophyll, krystallisiertes 12.
 Chlorophyll, tierisches 95.
 Chlorophyll-vorstufe 95.
 Cholanthren 206.
 Cholensäuren 215.
 Cholestadienol 214.
 Cholesterin 87, 240.
 Chrom 282, 285, 287.
 Chromat 289.
 Chromatogramm 2.
 Chromatogramm, Beurteilung 74.
 Chromatogramm, flüssiges 77.
 Chromatogramm, Sichtbarmachung 80.
 Chromatogramm und Konstitution 23.
 Chromatogramm, unsichtbares 80.
 Chromatographie 1.
 Chromatographie, anorganische 280.
 Chromatographie farbloser Stoffe 80.
 Chromatographisches Verfahren 1.
 Chrysarobin 163, 189.
 Chrysen 34, 36, 202, 204.
 Chrysophanol 163.
 Chrysophansäure 163, 276.
 Chrysopterin 170.
 Cignolin 189.
 Cinchonin 222, 223.
 Cineol 192.
 Cinobufagin 220.
 Cinobufotalin 221.
 Cissampellos insularis 225.
 Citraurin 134, 151.
 α -Citraurin 151.
 β -Citraurin 151.
 Citronellal 194.
 Citronellylbromid 192.
 Citronellylchlorid 192.
 Citrus aurantium 130, 134.
 Citrus grandis 129.
 Citrus madurensis 133.

- Cladophora Sauteri* 135, 165.
 Clarit 51.
Claviceps purpurea 225.
 Cobalt 282, 287, 297.
Coccinella septempunctata 146.
 Cocculus-alkaloide 225.
 Co-dehydrase 262.
 Co-enzyme 261.
 Colorimetrie 113.
 Compound „3“ 256.
Corpus luteum 140, 166.
Corpus rubrum 140.
Cortex Frangulae 277, 278.
 Co-zymase 262, 263.
 Crocetin 134.
 Crocetin-dimethylester 152.
 cis-Crocetin-dimethylester 24.
 trans-Crocetin-dimethylester 24.
Crocus sativus 134, 275.
Cucurbita maxima 132.
Cucurbita Pepo 133.
 Cumo-tocopherol 252.
 Cupranilbraun B 188.
 Cupri 297.
 Curare-alkaloide 224.
 Curcuma-auszug 268.
Cuscuta salina 131.
Cuscuta subinclusa 131.
 Cyanin-chlorid 176, 177.
 7-Cyano-10-methyl-1,2-benz-
 anthracen 206.
 1,2-Cyclopenteno-5,10-aceanthren
 206.
Cynthia papillosa 145.
 Cynthiaxonthin 145.
Daucus carota 128.
 Decalso 51, 236.
 Dehydrierungsprodukte 207.
 Dehydro-ascorbinsäure 238.
 Dehydro-ascorbinsäure-2,4-di-
 nitrophenylhydrazon 238.
 7-Dehydro-cholesterin 239, 241,
 244, 246, 247.
 Delphinidin 177.
 Delphinidin-chlorid 176.
 Delphinidin-3',5'-dimethyläther
 177.
 Delphinidin-3'-methyläther 177,
 178.
Dendrodoa grossularia 145.
 Depotfett 138.
 Desacetyl-hexahydro-cinobufa-
 gonsäure 221.
 Desaktivierung 43.
 Des-crocetin-diäthylester 161.
 Des-dihydro-crocetin-diäthylester
 161.
 Desoxo-phyllerythro-ätiopor-
 phyrin 103.
 Diaceton-alkohol 6.
 Diacetyl-amino-azotoluol 189.
 Diacetyltoxicarol 6.
 9,10-Dialkyl-benzanthracen 206.
 Diamingrün G 38.
 3,6-Diamino-acridin 188.
 Diaminreinblau 187.
 Diaminrosa FFB 38, 186, 188.
 Dianilschwarz PR 188.
 Diaryl-alkyle 200.
 2,9-Diäthyl-3,4-benzphenanthren
 206.
 Diazoreagens 88, 237, 256.
 1,2,5,6-Dibenzanthracen 35, 36,
 37.
 1,2,6,7-Dibenzanthracen 36, 37.
 Dibenzcoronen (anti-diperi) 37, 38.
 2,4-Dibromo-cholestanon 214.
 Dichloräthan 91.
 Dichlor-chinizarin-chinon 163.
 Dichlormethan 54.
 Diffusionsgeschwindigkeit 20.
 Digitalis 271.
 Digitalistinktur 273.
 Digitoxigenin, Lacton aus 218.
 Dihydroequilenin 257.
 17-Dihydroequilenin 256.
 6,7-Dihydro-20-methylchol-
 anthren 5.
 Dihydro-phäophorbid a 97.
 Dihydro-pyrophäophorbid a 97.
 Dihydro-rhodoxanthin 151, 158.
 Dimerisation 6.
 1,2-Dimethyl-5,10-aceanthren
 206.

- 6,7-Dimethyl-9-n-amyflavin
 166.
 3,5-Dimethylanilin 197.
 1,3-Dimethyl-4-d-arabitylamino-
 5-nitrobenzol 199.
 1',10-Dimethyl-1,2-benzanthra-
 cene 206.
 15,20-Dimethyl-cholanthren 206.
 6,7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure-
 methylester 166.
 Dimethylgelb 268.
 Dimethylglyoxim 89.
 2,6-Dimethylnaphtalin 152.
 4,5-Dimethyl-o-nitranilin 197.
 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-aminoben-
 zol-d-glucosid 199.
 4,5-Dimethyl-2-nitroanilin 198.
 3,5-Dimethyl-6-nitroanilin 197.
 1,3-Dimethyl-4-d-ribitylamino-5-
 nitrobenzol 199.
 1,2:2',3'-5,6:2'':3''-Dinaphtan-
 thracene 35.
 Dinitro-methylcholanthren 206.
 Dinitro-phenylhydrazon 82.
 Diospyros costata 133.
 Dioxan 191.
 1,8-Dioxyanthranol 189.
 1,8-Dioxy-3-methyl-anthrachinon
 163, 276.
 Dipalmitylketon 189.
 Dipenten 192, 194.
 Diphenyl 25.
 Diphenyl-butadien 25.
 Diphenyl-hexatrien 25.
 1,1-Diphenyl-methyl-(3-acetoxy-
 ätiocholy)-äthylen 214.
 Diphenyl-octatetraen 25.
 Diphenyl-polyene 25.
 Direktblau 2B 41.
 Direktbraun J 188.
 Direkthimmelblau, grünlich 41,
 187.
 Disazofarbstoffe 38, 186.
 Dispersität 44.
 Dodecapentaen-(2,4,6,8,10)-al-(1)
 161.
 Doppelbindungen 25.
 Drachenblut 182.
 Dracocarmin 183, 184.
 Dracorubin 182, 183, 184.
 Drogen, pharmazeutische 271.
 Durohydrochinon-monocetyl-
 äther 196.
 D-Vitamin 239.
 D₃-Vitamin 239.
 Echinon 145.
 Echinus esculentus 145, 146.
 Echtröt JTR 88.
 Eibe 133.
 Eichenholz-auszug 266.
 Eichhörnchen (Sciurus niger),
 Harn 102.
 Eidotter 142, 234.
 Eigelb-sterin 245.
 Einflüsse der Säule 5, 115.
 Einflüsse der Säule (anorg.) 286.
 Einführen der Lösung 71.
 Einfüllen des Adsorbens 68.
 Einheitlichkeitsprobe 7.
 Einheitlichkeitsprüfung 7.
 Eisen 282, 285, 287.
 Elodea canadensis 134.
 Elution 20, 111.
 Elutionsmittel 54.
 Emodin 276.
 Empirisches Verfahren 81.
 Emulsin 264.
 Ente 143.
 Entmischung 109.
 Entwickeln 18, 73, 281, 292.
 Entwicklungsmittel 294.
 Enzyme 261, 264.
 Eosin 42.
 Eosin-methylester 42.
 Epimere, Trennung 24.
 Epinephrin 254.
 Epiphatische Farbstoffe 109.
 Equilenin 254, 255.
 Equilenin-pikrat 256.
 Erdnußöl 267.
 Ergobasinin 227.
 Ergoclovin 227.
 Ergosterin 87, 209, 240, 244, 245,
 246.

- Ergotamin 225, 226, 227.
 Ergotaminin 225, 226, 227.
 Ergotin 225, 226, 227.
 Ergotoxin 225, 226, 227.
 Erika B 41, 186, 188.
 Erika G extra 41, 186, 188.
 Erioglaucin supra 186.
 Erwärmung der Säule 64.
 Erythrodiol 193.
 Erythropterin 75, 169, 170, 173.
 Erythrosin 42.
 Eschscholtzia californica 133.
 Eschscholtzoxanthin 133.
 Escobedia linearis 134.
 Escobedia scabrifolia 134.
 Euglena heliorubescens 135.
 Euglenarhodon 135.
 E-Vitamin 247.
 Extractum Chinae fluid. 279.
 Extractum Chinae spir. 278, 279.
- Faeces 138.
 Farbe 36.
 Farbe und Adsorption 36.
 Farbenlehre (Ostwald) 276, 278.
 Färbevermögen 20.
 Farblose Substanzen 14, 80.
 Farbreaktionen 87.
 Farbstoffe, basische 185.
 Farbstoffe, bilirubinoide 105.
 Farbstoffe, künstliche 185.
 Farbstoffe, natürliche 90.
 Farbstoffe, saure 186.
 Farbstoffe, substantive 186.
 Farbwachs 110.
 Fasertonerde 46.
 Ferri 297.
 Ferricyanid 289.
 Ferrocyanid 289.
 Feststampfen 69.
 Fette, technische 266.
 Fette, Unverseifbares 269.
 Fett-färbemittel 267, 268.
 Fettkörper (Frosch) 143.
 Fett (Huhn) 142.
 Fett (Mensch) 138.
 Fett (Pferd) 141, 147.
- Fettponceau 268.
 Fettsäuren 190.
 Fichtenrinden-auszug 266.
 Filtration, adsorptive 4, 99.
 Fischleberöl 144, 230, 241, 243.
 Flavacin 136.
 Flavanon 178.
 Flavanon-derivate 178.
 Flavon 73, 164.
 Flavon-acetat 165, 167.
 Flavinsynthesen, Zwischen-
 produkte 198.
 Flavon (synthetisch) 166.
 Flavorhodin 137.
 Flavoxanthin 28, 29, 112, 132.
 Flechtenstoffe 193.
 Flores Calendulae 275.
 Floridin 45.
 Floridin XS 50.
 Floridin XXF 45, 50.
 Fluoren 207.
 Fluorenderivate 206.
 Fluorescein 42.
 Fluoreszenz 83, 202.
 Fluoreszenz-chromatogramm 83.
 Fluorid 289.
 Flüssiges Chromatogramm 77.
 Folliculin 254.
 Frankonit 50, 194.
 Frangulae Cort. 275, 276.
 Frangula-emodin 276.
 Fruchtfarbstoffe 184.
 Fuchsin 186.
 Fuchsin G 185.
 Fuchsin-schweflige Säure 88.
 Fucosterin 125.
 Fucoxanthin 28, 29, 110, 112, 124,
 135.
 β -Fucoxanthin 125.
 Fucus vesiculosus 124, 135.
 Fullererde 51.
- α -Galaktosidase 264.
 Galenische Präparate 271.
 Gallenfarbstoffe 105.
 Gallensäuren 210, 214.
 Gallussäure 196.

- Gang des Versuches 68.
 Gans 143.
 Gefieder 143.
Genista tridentata 130.
 Genußmittel 179.
 Geologische Prozesse 16.
 Geraniol 192.
 Geranylacetat 194.
 Gerbstoffe 11.
 Gerbstoffextrakte 6, 265.
 Geronsäure 82.
 Geschichte 12.
 Gewachsene Tonerde 46.
 Gifte, sterinartige 217.
 Gifte, tierische 217, 218.
Ginkgo biloba 134.
 Gips 45.
 Glucobilin-dimethylester 108.
 d-Glucose-2-nitro-anilid 200.
 β -Glucosidase 264.
Gonepteryx rhamni 173, 174.
Gonocaryum pyriforme 129.
 Grundlagen-1.
 Guanopterin 170.
 Guajazulen-trinitrobenzolat 182.
- Haematococcus pluvialis* 135.
 Haematoxanthin 135.
 Hahnenfuß 132.
 Haifischleberöl 270.
Halocynthia papillosa 145.
 Hämin 98.
 c-Hämin 98.
 Handels-cholesterin 244.
 Handelsöle 267.
 Handelswaren, Kontrolle 11, 265.
 Harnfarbstoffe 100.
 Harn-flavine 167.
 Harn-hormone 254.
 Harn-lyochrom 167.
 Harn-porphyrin 99.
 Harn-pterin 174.
 Harzbestandteile, farblose 184.
 Harzfarbstoffe 182.
 Haustaube 143.
 Haut (Frosch) 143.
 Hefe-Nebensterine 210.
- Heilbutt 144, 230,
 Helenien 28.
Helianthus annuus 132.
Helix pomatia 95.
 Helvetiablau 186.
 Hentriakontan 189.
Hepaxanthin 232.
 Heringskönig 144.
 Heringsöl 270.
 Herzgifte 217.
 Herzmuschel 145.
 Hessisch Braun 2BN 188.
 Hetero-auxin 87, 260, 261.
 Heterocyclische Basen 221.
 Heterocyclische Substanzen 221.
 1',2',3',4',9,10-Hexahydro-1,2-benzanthracen 206.
 Hexapyrrrene 107.
Hippoglossus hippoglossus 144, 230.
 Holzöl 129.
 Holzpistill 69, 76.
 Hormone 254.
 Hornisse 174.
 Huhn 143.
 Huhn (Eidotter) 142.
 Hydralo 48.
 β -Hydro-dracorubin 183.
 Hydroxylgruppe 27.
 Hyflo Supercel 140.
 Hypophasische Farbstoffe 109.
Hypsypops rubicunda 144.
- Identitätsprobe 7.
 Identitätsprüfung 8.
 Indicator der Adsorption 81.
 Indicatorrot „33“ 81, 242.
 Indirubin 255.
 Indolenin-blau 26.
 Indolenin-gelb 26.
 Indolenin-rot 26.
 Indolenin-violett 26.
 β -Indolyl-essigsäure 261.
 Infusorienerde 51.
 Inhibitor (Blutkoagulation) 265.
 Insekten-pterine 173.
 Inulin 46, 91.

- Ipomoea batatas 129.
 Isoboletol 162.
 Isocarotin 148, 155.
 Isoergosteron 214.
 3-Isohexyl-naphtazarin 163.
 d-Isolysergsäure-d-isopropanol-
 amid 227.
 l-Isolysergsäure-d-isopropanol-
 amid 227.
 Isomerisierung 6, 114, 296.
 Iso-oestradiol 257.
 Isorottlerin 185.

 β -Jonon 82.
 J-Säure 38.
 Judenkirsche 130.

 Kaffeeaufgüsse 279, 280.
 Kalifornische Miesmuschel 145.
 Kalium-chromat 297.
 Kalium ferricyanid 297.
 Kalk 49.
 Kalk, Aktivierung 48.
 Kamala 185.
 Kammuschel 145.
 Kanarien-xanthophyll 143.
 Kaolin 51.
 Kastanie 129.
 Kastanien-auszug 266.
 Katalyse (Frankonit) 194.
 Katalytische Einwirkung 6, 194.
 Katechin 266.
 Kationen als Ammin-komplexe
 287.
 Kationen als Tartrato-komplexe
 287.
 Kationen, Trennung 282, 285, 297.
 9-Keto-13-methyl- $\Delta^{10:11}$ -dodeka-
 hydro-phenanthren 193.
 Keton $C_{26}H_{24}O$ 209.
 Keton aus Vitamin A 233.
 4'-Keto-1',2',3',4'-tetrahydro-1,2-
 benzpyren 205.
 Kieselgur 51.
 Kirsche 129.
 Klimatischer Einfluß 43.
 Klumpfisch 144.

 Knollenblätterpilz 228.
 Kobalt 282.
 Kodein 223.
 Koffein-Bestimmung 280.
 Kohlenpräparate 51.
 Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{16}$ 208.
 Kohlenwasserstoff $C_{25}H_{20}$ 209.
 Kohlenwasserstoff $C_{26}H_{26(24)}$ 209.
 Kohlenwasserstoff $C_{27}H_{16}$ 207.
 Kohlenwasserstoff $C_{27}H_{28}$ 209.
 Kohlenwasserstoff C_nH_n 209.
 Kohlenwasserstoffe, aromatische
 29, 201.
 Kohlenwasserstoffe, polycyclische
 201.
 Kohlweißling 171.
 Kongorot 188.
 Kongorot, rein 38, 187.
 Kongorot, technisch 186.
 Konstitution und Chromato-
 gramm 23.
 Koproporphyrine 99, 103.
 Kot-porphyrine 102.
 Kröte 214.
 Kröte, chinesische 220.
 Krötengift 82, 218, 220.
 Kryptostadienon 211.
 Kryptostenon 211.
 Kryptosterin 210.
 Kryptoxanthin 29, 32, 110, 112,
 117, 120, 121, 130, 131, 132,
 134, 137, 138, 140, 142, 150,
 235.
 Krystallviolett 5BO 185.
 Kuh 140, 141.
 Kühlung der Säule 64.
 Kumulen 161.
 Künstliche Farbstoffe 185.
 Kupfer 282, 287, 297.
 Kupfer-ion 22.
 Kupplungsstelle 40.
 Kürbis 133.
 K-Vitamin 253.

 Lachs 144.
 Lactar-azulen 181.
 Lactarius deliciosus 180.

- Lactaro-violin 180.
 Lactoflavin 165, 237.
 Lactoflavin-acetat 165.
 Lanosterin 214.
 Lärche 184.
 Lariciresinol 184.
 Larix decidua 184.
 Lävulinsäure 82.
 Lauronitril 190.
 Leber (Frosch) 143.
 Leber-lipochrom 127.
 Leber (Mensch) 127, 138,
 Leberöle 230.
 Leber (Pferd) 141.
 Leber (Schwein) 141.
 Leinöl 267.
 Leontodon autumnalis 131.
 Leprotin 137.
 Leuko-Verbindung aus Chloro-
 phyll 96.
 Light petroleum 54.
 Ligroin 54.
 Liliun tigrinum 134.
 Limettin 195.
 Limonen 192.
 d-Limonen 194.
 l-Limonen 194.
 Linalool 194.
 Linalylacetat 194.
 Lipochrom 127.
 Lipochrom des Serums 139.
 Literatur 16.
 Lloyds Reagens 51.
 Lophius piscatorius 144.
 Lösungsmittel 53, 111, 294.
 Löwenzahn 132.
 Luftausschluß 60.
 Lumi-aquoflavin 168.
 Lumisterin₃ 247.
 Lunge (Pferd) 141.
 d-Lupanin 225.
 Lupinen-alkaloide 225.
 Lutein 28, 29, 32, 110, 112, 118,
 119, 131, 132, 133, 134, 135,
 137, 142, 143, 154.
 Lycopersicum esculentum 130.
 Lycophyll 29, 31, 112, 123, 129.
 Lycopin 28, 30, 112, 123, 129, 131,
 133, 134, 137, 140, 145, 146,
 150, 156, 157, 160, 295, 296.
 Lycopinal 150, 157, 158.
 Lycopinal-oxim 158.
 Lycoxanthin 29, 32, 112, 123,
 129.
 Lyochrome 164.
 Maclura pomifera 184.
 Magnesiumoxyd 45, 49.
 Magnesiumphosphat 82.
 Mais 117, 131.
 Maja squinado 145.
 Makrelenhecht 230.
 Malachitgrün 185.
 Malzkaffee 280.
 Mandarine 133.
 Mangan 282, 283, 287.
 Markierung mit Indicator 81.
 Martiusgelb 268.
 Meerwasser-carotinoide 155.
 Mercuri-ion 282.
 Mercurio-ion 286.
 Mesobilirhodin 107.
 Mesobilirubinogen 107.
 Mesobiliviolin 107.
 Meso-Stellen 35.
 Methodik 42.
 10-Methoxy-1,2-benzanthracen
 206.
 3-Methoxy-20-methylcholanthren
 206.
 Methylalkohol 54.
 1'-Methyl-1,2-benzanthrachinon
 206.
 1'-Methyl-1,2-benzanthracen 206.
 3-Methyl-1,8-dioxyanthranol 189.
 Methylenblau 185, 186.
 9-Methylfluoren 207.
 Methyl-heptenon 158.
 Methyl-isochohondrodendrin 225.
 α -(5-Methyl-6-methoxy-naphtyl-
 1)- β -(7-methyl-naphtyl-1)-
 äthan 201.
 α -(7-Methyl-naphtyl-1)- β -(5-me-
 thyl-naphtyl-1)-äthan 201.

- Methylphäosphorbid a 97.
 1-Methyl-5,6-cyclopenteno-anthracen 206.
 γ -Methyl-cyclopenteno-phenanthren 208.
 Micron Brand Magnesium oxyde 49.
 Miesmuschel 145.
 Mikro-adsorptionsrohr 67.
 Mikro-analyse 9.
 Mikro-apparatur 66.
 Mikro-chromatogramm 66.
 Mikro-chromatographie 66, 67, 159.
 Milch 138, 140.
 Milch-carotinoide 138.
 Milhzucker 46.
 Milz (Pferd) 141.
 Misch-chromatogramm 8.
 Mist (Kuh) 141.
 Mist (Pferd) 141.
 Mist (Ratte) 141.
 Mohrrübe 117, 128.
 20,21-Monoaceton- Δ^4 -pregnen-diol(20,21)-on-(3) 257.
 Monoaceton-pregnen-triol 257.
 Monoazo-farbstoffe 38, 186.
 Mononitro-benzpyren 205.
 Moosburger Tonerde 51.
 Morphin 223.
 Mudarpflanze 218.
 Mutterkorn-alkaloide 225.
 Mycobacterium phlei 137.
 Mytillus californianus 145.
 Myxoxanthin 135.
 Myxoxanthophyll 135.

 Nahrungsmittel 179, 269.
 Naphtacen 34, 36, 202, 203.
 Naphtalin 34, 203.
 Naphtalinreihe 196.
 1,2-(2',3'-Naphto-)anthracen 37.
 Naphtochinon-Farbstoffe 162.
 α -Naphtol 88.
 β -Naphtol 88.
 Naphtolgelb S 186.
 Naphtol-sulfosäuren 39, 87, 88.

 α -Naphtylamin 88.
 Narcotin 224.
 Natriumaluminat 22.
 Natriumchlorid 297.
 Natriumchromat 297.
 Natriumsulfat 51.
 Natureerden 50.
 Natürliche Farbstoffe 90.
 Nebenniere (Pferd) 141.
 Nebennierenrinde, Wirkstoffe 259.
 Neo-carotin 115.
 Neo- α -carotin 149.
 Neo-kryptoxanthin 150.
 Neo-lycopin 150, 156, 296.
 Neo- β -oxycarotin 149.
 Neoxantho-bilirubinsäure 108.
 Nephrops norvegicus 144.
 Netzhaut 141, 142, 143.
 Neutrale Adsorption 79.
 Nickel 282, 287.
 Nickelsulfat 89.
 Niere (Pferd) 141.
 Nitella opaca 135.
 Nitraniline 197.
 Nitrat 289.
 2-Nitro-3-amino-hydrinden 207.
 2-Nitro-3-amino-5,6,7,8-tetrahydro-naphtalin-N-l-arabinosid 199.
 m-Nitrobenzaldehyd 88.
 2-Nitro-4,5-dimethylanilin 6.
 Nitrophenole 197.
 ω -Nitrostyrol 88.
 Nitroxylidin 197.
 Norit 51.
 Norit A 128.

 Ochs 141.
 Ochsenfrosch 143, 234.
 Octaphenyl-porphyrasin 104.
 Octatetraen-dicarbonsäure-dimethylester 152.
 Oedipoda miniata 146.
 Oedogonium 135.
 Oenin 177.
 β -Oestradiol 256.

- Oestron 254, 256.
 Oleanol 217.
 Oleanylen 217.
 Öle, ätherische 192, 194.
 Oleum hyoscyami 273, 274.
 Oleum hyoscyami decemplex 274.
 Öle, Unverseifbares 269.
 Olivenöl 267.
 Ölsäure 190.
 Opium-alkaloide 223.
 Optische Isomerie 24.
 Orange I 40.
 Orange II 40, 186.
 Orange (Frucht) 130, 134.
 Orangenschale 295.
 Orlean III 134.
 Orthagoriscus mola 144.
 Orysterine 213.
 α -Orysterin 213.
 β -Orysterin 213.
 γ -Orysterin 213.
 Osage-Orange 184.
 Osajin 184.
 Oscillatoria rubescens 135.
 Ovarien (Frosch) 143.
 Oxalo-octatrien-carbonsäure-
 diäthylester 161.
 Oxalo-polyensäuren 161.
 Oxyazofarbstoffe 40.
 α -Oxycarotin 149.
 β -Oxycarotin 33, 148, 149, 157.
 4-Oxy- β -carotinon-aldehyd 151.
 4-Oxy- β -carotinon-aldehyd-oxim
 151.
 8-Oxychinolin 222.
 2- α -Oxy-meso-chlorin-e₆-tri-
 methylester 98.
 Oxymethyl-anthrachinone 276.
 9-Oxy-13-methyl- $\Delta^{10:11}$ -dodeka-
 hydro-phenanthren 193.
 2-Oxy-10-methyl- $\Delta^{1:9}$ -oktalin
 192.
 Oxsanguinarin 225.
 β -Oxy-semi-carotinon 148.
 Paeoninchlorid 176, 177.
 Palmdrachenblut 182.
 Palmitinsäure 190.
 Palmöl 129, 267.
 Pappel 132.
 Paraffin 189.
 Parmelia leucotyliza 193.
 Paprika 128, 134.
 Paprika-Farbstoffe 119.
 Paprika-Farbstoffe, Bestimmung
 122.
 Paprika-rohauszug 292, 293.
 Parietin 163.
 Parotide 219.
 Partialaffinität 27.
 Patentphosphin G 185.
 Pecten maximus 145.
 Pectenoxanthin 145.
 Pektine 125.
 Pellidol 189.
 Pentakosan 210.
 Pentaxanthin 146.
 Perchlorat 289.
 Permanganat 88, 289.
 Perkolator 65.
 Perubalsam 271, 272.
 Perylen 37, 204.
 Petaloxanthin 29, 112, 133.
 Petroläther 54.
 Petry-Harn 102.
 Pfeilgift 218, 224.
 Pferd 141.
 Pferde fett 147.
 Pferdeharn 254.
 Pferdeleber 141.
 Pferdemit 154.
 Pfifferling 136.
 Pflanzen-carotinoide 117, 128,
 135.
 Pflanzen-paraffin 189.
 Pflanzen-sterine 210.
 Pflanzliche Herzgifte 217.
 Phäophorbid b 97.
 Phäophorbid-a-geranylester 97.
 Phäophytin a 94.
 Phäophytin b 94.
 Pharmazeutische Drogen 271.
 Phenacetin 196.
 Phenanthren 34, 204.
 Phenol 196.

- Phenolderivate 196.
 Phenole 82, 196.
 p-Phenylen-bis-iminocampher 24.
 Phloroglucin 196.
 Phloxin 42.
 Phorbide 97.
 Phosphat 289.
 Photographische Aufnahmen 291.
 Phtiocol 164.
 Phycomyces Blakesleanus 136.
 Phylloporphyrinester 103.
 Physalien 28, 130, 141, 150.
 Physalienon 150.
 Physalis Franchetti 130, 131.
 Phytlylbromid 253.
 Picen 203.
 Picofulvin 143.
 α -Picolin 221.
 Pieris brassicae 171.
 Pigmentepithel 234.
 Pilobolus Kleinii 136.
 Pilzfarbstoffe 180.
 Pilz-polyene 135.
 Pinen 194.
 Pinselmethode 88, 297.
 Pink grapefruits 129.
 Placenta 138.
 Platane 132.
 Polyen-alkohole 109.
 Polyene, menschliche 138.
 Polyene, natürliche 27.
 Polyene, synthetische 25, 160.
 Polyene, tierische 140.
 Polyen-kohlenwasserstoffe 109.
 Polyen-oxyketone 109.
 Polyenwachs 121.
 Polycyclische Kohlenwasserstoffe 201.
 Polymerhomologen 191.
 Porphyrasin 104.
 Porphyrin 100.
 Pregnandion 257.
 epi-Pregnanol-(3)-on(20) 257.
 $\Delta^{5,6}$ -Pregnen-tetrol-(3,17,20,21)-
 triacetat-(3,29,21) 258.
 Preiselbeere 131.
 Probophorbid 97.
 Proto-chlorophyll 95.
 Protoporphyrin 102.
 Provitamin A, Bestimmung 235.
 Provitamin D 244.
 Prüfung auf Einheitlichkeit 7.
 Prunus armeniaca 129.
 Pseudo- α -carotin 115, 116, 148.
 Pterine 6, 169.
 Pterine, Mikromethodik 171.
 Puderzucker 6, 46, 91.
 Puffergemische 78, 79.
 Pyren 34, 203, 204.
 Pyramidon 222.
 Pyridin 55, 221.
 Pyrrhocoris apterus 146.
 Quarzlampe 83.
 Quarzlampe, tragbare 84.
 Quebrachoholz-auszug 266.
 Quecksilber 282, 285.
 Racemkörper, Zerlegung 24.
 Radix Sarsaparillae 215.
 Rana catesbiana 143, 234.
 Rana esculenta 143.
 Ranunculus acer 132.
 Ratte 141.
 Rattenfischöl 270.
 Regalecus glesne 144.
 Regenerieren der Füllmasse 51.
 Reinigung 10.
 Reinigung anorg. Stoffe 289.
 Reiskeimöl 212.
 Resorcin 196.
 Rhabarber 132.
 Rhamn. cath. Fr. 277.
 Rhei Austr. Rad. 277.
 Rhei Chin. Rad. 277.
 Rhodopin 126, 137.
 Rhodopurpurin 126, 137.
 Rhodovibrin 126, 137.
 Rhodovibrio-bakterien 125, 127.
 Rhodoviolascin 126, 137.
 Rhodoxanthin 28, 29, 110, 112,
 133, 158.
 Rhodymenia palmata 135.
 d-Ribose-2-nitro-4,5-dimethyl-
 anilid 200.

- Riesen Kürbis 132.
 Rind 141.
 Rivanol 188.
 Rogen 144.
 Roggen 130.
 Roh-chlorophyll 93.
 Rohrgröße 62.
 Rosa rubinosa 131.
 Rosa rugosa 131.
 Rose bengale 42.
 Roßkastanie 130.
 Rote Hefe 136.
 Rottlera tinctoria 185.
 Rottlerin 185.
 Rotwein 179.
 Rubixanthin 29, 32, 110, 112, 131.
 Rüböl 267.
 Rubus chamaemorus 131.
- Safran 134, 275.
 Safran-auszug 268.
 Safranin OO 185.
 Salmensäure 144.
 Salmo salar 144.
 Salze, Einfluß 75.
 Salzzusatz 188.
 Sanguinaria-alkaloide 225.
 Sanguinaria canadensis 225.
 Sanguis draconis 182.
 Sapogenine 215.
 Sapogenole 5, 215.
 Sarcina aurantiaca 136.
 Sarcina lutea 136.
 Sarcinin 136.
 Sarmentocymarin 217.
 Sarmentogenin 218.
 Sarsaparillawurzel 215.
 Sarsa-sapogenin 215.
 Säule 2.
 Säule, Zerschneiden 75.
 Säurefarbstoffe 186.
 Säurefeste Bakterien 137.
 Scharlach R 268.
 Schiffische Base aus 3,5-Dimethyl-
 6-nitroanilin und l-Arabinose
 198.
- Schiffische Base aus 4,5-Dimethyl-
 2-nitroanilin und l-Arabinose
 198.
 Schiffische Basen 198.
 Schlangengift 221.
 Schliff-apparate 59.
 Schmetterling-pterine 169.
 Schnabelepidermis 143.
 Schneckenleber 95.
 Schwefelbakterien 125.
 Schwefelkohlenstoff 54.
 Schwefelwasserstoff 281.
 Schwefelwasserstoff-wasser 283.
 Schwein 141.
 Schweineleber 141.
 Schweinschwarte 246.
 Scambresox saurus 230.
 Sekundär-adsorption 75,
 Seeigel 145, 146.
 Seenelke 146.
 Seerose 146.
 Seespinne 145.
 Seeteufel 144.
 Selacylalkohol 271.
 Selbsttätige Einfüllvorrichtung
 72.
 Semi- α -carotinon 149.
 Semi- β -carotinon 33, 148, 149, 157.
 Sennae Folium 275, 276.
 Sennae Fructus 275, 277.
 Sensibamin 227.
 Serum-carotinoide 127, 139.
 Serum-lipochrom 139.
 Sesamöl 267.
 Sesquiterpene 181.
 Sexualhormone 254.
 Sichtbarmachung des Chromato-
 gramms 80.
 Silber 282, 283, 285, 287.
 Silicagel 51.
 Sinomenium-alkaloide 225.
 Sitosterin 210, 214.
 γ -Sitosterin 214.
 Sojabohnen-sapogenole 215.
 Sojasapogenol A 216.
 Sojasapogenol B 216.
 Sojasapogenol C 216.

- Sojasapogenol D 216.
Solanum dulcamara 123, 129.
 Sonnenblume 132.
 Sonnenblumenöl 267.
 Spartein 225.
 Spektro-chromatographie 86.
 Spektroskopie 113.
 Spektrum und Adsorptionsverhalten 114.
 Spezieller Teil 90.
Spinacea oleracea 129.
 Spinat 129.
 Spirilloxanthin 136.
Spirillum rubrum 136.
 Sprit-eosin 42.
 Squalen 270.
 Stampfer 69.
Staphylococcus aureus 136.
 Stearinsäure 190.
 Stechginster 132.
 Steingarnele 144.
 Stereoisomeren, Trennung 24.
 Sterinacetate 245.
 Sterine 210.
 Sterine aus Reiskeimöl 212.
 Sterin (Eigelb) 245.
 Sterine, pflanzliche 210.
 Sterine, tierische 214.
 Stilben 25.
Strophanthus-Samen 217.
 Strychnin 223.
 Strychnos-alkaloide 223.
 Substantive Farbstoffe 186.
 Sudan III 268.
 Sudanrot 50.
 Sulcatoxanthin 146.
 Sulfat 289.
 Sulfid 289.
 Suspension des Adsorptionsmittels 70.
 Synthetische Flavine 166.
 Synthetische Polyene 160.
 Syringidin 177.
Tagetes erecta 129.
 Talcum 6, 51.
 Talg (Kuh) 140.
 Tanigan O 266.
 Tannin 179, 266.
Taraxacum officinale 118, 132.
 Taraxanthin 28, 29, 112, 118, 131, 132, 135.
 Tarsalhaut 143.
 Tartratkomplexe der Kationen 287.
 Taube 143.
Taxus baccata 133.
Tealia felina 146.
 Technische Öle und Fette 266.
 Teerfarbstoffe 185.
 Teilchengröße (Adsorbens) 45.
 Terpene 192.
 Terpene, cyclische 192.
 Terpenhalogenide 192.
 Tetraacetyl-lactoflavin 165.
 Tetraalkyl-ammoniumhydroxyd 82.
 Tetrabenzomonooza-porphin 103.
 Tetrabenzoporphin 104.
 Tetrachlorkohlenstoff 54.
 1', 2', 3', 4'-Tetrahydro-1,2-benzanthracen 206.
 1', 2', 3', 4'-Tetrahydro-10-isopropyl-1,2-benzanthracen 206.
 1, 2, 3, 4-Tetrahydro-10-methyl-1,2-benzanthracen 206.
 Tetrakis-azofarbstoffe 188.
 6,7-Tetramethylen-9-*l*-araboflavin-tetraacetat 166.
 Tetraoxy-abietinsäure-methylester 193.
 1, 1, 6, 6-Tetraphenyl-hexapentaen 162.
 Tetraphenylmethan 200.
 Thallium 282, 286.
 Thebain 223, 224.
 Theoretische Grundlagen 16.
Theragra chalcogramma 232.
 Thiocystis-bakterien 125, 137.
 Thuja 133.
 Thunfischleberöl 241.
 Tiefseeschlamm-carotinoide 155.
 Tierische Carotinoide 127.
 Tierische Gifte 218.

- Tierisches Chlorophyll 95.
 Tierische Sterine 214.
 Tinctura Absinthii 275.
 Tinctura Belladonnae 279.
 Tinctura Chinae 278.
 Tinctura Digitalis 275.
 Tinctura Ipecacuanhae 279.
 Tinctura Strophanthi 275.
 Tinctura Strychni 279.
 α -Tocopherol 247, 248, 249, 253.
 β -Tocopherol 248, 250, 252.
 γ -Tocopherol 249.
 Tocopherol-allophanat 249.
 Tomate 130.
 Tonerde, gewachsene 46.
 Tonsil 51.
 Torfbeere 131.
 Torula rubra 136.
 Torulen 136.
 Toxiferin 224.
 Trauerweide 132.
 Trennung von Anionen 288, 297.
 Trennung von Kationen 282, 297.
 Trentepohlia iolithus 135.
 Triaryl-alkyle 200.
 Tricyclo-crocetinester 152.
 6, 7-Trimethylen-9-l-araboflavin-tetraacetat 167.
 Trimethyl-hydrochinon 253.
 1, 6, 8-Trioxo-3-methyl-anthra-
 chinon 276.
 Triphenylcarbinol 200.
 Triphenylmethan 200.
 Triphenylmethan-Farbstoffe 6.
 Trisazo-Farbstoffe 38, 188.
 Triticum 211.
 Tritisterine 211.
 Trityl-d-mannose-2-nitro-4,5-
 dimethylanilid 200.
 Tropaeolum 129.
 Tswetsche Chromatographie 4.
 Tuberkelbazillen 164.
 Tuberkelsäure 190.
 Tuchehtblau B 186.
 Tuchehtschwarz B 186.
 Trypaflavin 188.
 α -Typhasterin 210.
- Überdruck-Vorrichtung 73.
 Überwallungsharz 184.
 Ulex europaeus 132.
 Ulmus campestris 134.
 Ultra-chromatographie 15, 83.
 Umwandlung in gefärbte Stoffe
 82.
 Unsichtbares Chromatogramm
 80.
 Unverseifbarer Rest 269.
 Unzweckmäßige Ansätze 293.
 Uranyl 282, 285.
 Urobilin 106.
 Urochrom 99.
 Uroflavin 167.
 Uroporphyrine 101, 102.
 Uropterin 86, 174.
 Urtica dioica 128.
 Vaccinium vitis idaeae 131.
 Valeronitril 190.
 Verbindungen, aliphatische 189.
 Verbindungen, aromatische 196.
 Verbindungen, hydroaromatische
 192.
 Verdrängung 18, 21, 291.
 Verfälschung 178, 271.
 Verfälschungen des Weines 178.
 Veronal 222.
 Verunreinigungen 295.
 Vespa crabro 174.
 Vetivazulen-pikrat 182.
 Viktoriablauf B 185, 186.
 Vinum Condurango 275.
 17-Vinyl-testosteron 258.
 Violaxanthin 28, 29, 93, 110, 112,
 132, 133, 134, 138.
 Viskosität (Cellit) 190, 191.
 Vitamin A 6, 89, 140, 142, 229,
 234, 297.
 α -Vitamin A 231, 232.
 β -Vitamin A 231, 232.
 Vitamin B₁ 236.
 Vitamin B₂ 237.
 Vitamin C 238.
 Vitamin D 239.
 Vitamin D₃ 81, 239, 240, 241,
 243.

- Vitamin-D₃-dinitrobenzoat 243.
 Vitamin E 247.
 Vitamine 229.
 Vitamin K 253.
 Vitellorubin 145.
 Vogelarten, Gefieder 143.
 Vomidin 223.
 Vomipyrin 223.
 Vorrichtung nach Dhéré und Rogowski 58.
 Vorrichtung nach Dhéré und Vegezi 58.
 Vorrichtung nach Heilbron 60.
 Vorrichtung nach Hesse 59.
 Vorrichtung nach Holmes 60.
 Vorrichtung nach Kuhn und Brockmann 61.
 Vorrichtung nach Mohler 61.
 Vorrichtung nach Ralston, Harwood und Pool 65.
 Vorrichtung nach Sannié 73.
 Vorrichtung nach Schöpf und Becker 65.
 Vorrichtung von Tswett 56.
 Vorrichtung nach Valentin und Franck 61.
 Vorrichtung nach Winterstein und Schön 66.
 Vorrichtung nach Winterstein und Stein 59.
 Vorrichtung nach Zechmeister und Chelnoky 62, 63.

 Wacholder-Milchling 180.
 Walöl 141.
 Warenkunde 265.
 Wärmetönung 194.
 Waschen 281.
 Wasserfrosch 143.
 Wasserlösliche Substanzen 15.

 Wasserpest 134.
 Wasserstoffionen-konzentration 78.
 Wäßrige Lösungen 78.
 Wein 178.
 Weinbergschnecke 95.
 Weinfarbstoff 178.
 Weinsäure 179.
 Weißwein 180.
 Weizen 130.
 Weizenkeimöl 211, 247.
 Wismuth 282, 285, 287.
 Wollviolett 4BN 22.

 Xanthophyll 93, 110, 112, 138, 140, 141, 144, 154, 160, 234, 268.
 Xanthophyll-acetat 151.
 β-Xanthophyll 132.
 Xanthopterin 169, 170, 172, 173, 174.
 Xanthoria parietina 163.
 Xylenrot B 186.
 Xylol 73.

 Zea mays 131.
 Zeaxanthin 28, 29, 31, 112, 119, 120, 121, 131, 133, 134, 135, 136, 138, 141, 142, 143, 151, 158, 291, 293, 294.
 Zeaxanthin-acetat 151.
 Zeaxanthin-caprinat 122.
 Zeaxanthin-palmitat 28.
 Zeolithe 51.
 Zerlegung eines Gemisches 9.
 Zerschneiden der Säule 75, 76.
 Zink 282, 283, 285, 287.
 Zitronenfalter 173, 174.
 Zucker 46.
 Zuckerarten 190.
 Zymosterin 211.