

Chromatographie*

Theoretische Grundlagen der Chromatographie

Von R. SIGNER

Chemisches Institut der Universität Bern

I. Die Scheidetrichterreihe als Modell der Chromatographiesäulen

Im folgenden wird versucht, die verschiedenen Chromatographieverfahren auf gemeinsame und wohlbekannte einfache Erscheinungen zurückzuführen.

Vieles läßt sich an einer Scheidetrichterreihe erläutern, wie sie in Abb. 1 dargestellt ist. Jeder Kreis bedeutet

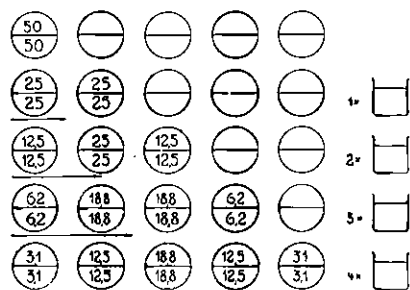


Abb. 1. Konzentrationen in einer Scheidetrichterreihe

einen Trichter mit je 100 cm^3 leichter und 100 cm^3 schwerer Phase. In den ersten sollen 100 mg eines in beiden Phasen löslichen und mit dem Verteilungskoeffizienten 1 versehenen Stoffes gegeben werden. Nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes finden sich in der untern und obern Phase je 50 mg dieser Substanz, wie dies die Zahlen zuäusserst links in der obersten Reihe der Figur andeuten. Nun soll die schwere Phase aller Trichter um eine Einheit nach rechts verschoben werden. Man beginnt mit der Operation am rechten Ende und gießt die 100 cm^3 schwere Phase aus dem letzten Trichter in ein erstes Becherglas. Die schwere Phase des zweitletzten Trichters kommt in den letzten, die des drittletzten in den zweitletzten und so fort. Am linken Ende der Reihe fügt man in den ersten Trichter 100 cm^3 neue schwere Phase. Die zweite Zeile zeigt die Verteilung der 100 mg gelöster Substanz in den zwei ersten Trichtern nach Beendigung dieser Operation. Eine weitere Ver-

schiebung von 100 cm^3 der schweren Phase durch die ganze Reihe ergibt die Substanzverteilung der dritten Zeile in Abb. 1, während die folgenden Zeilen den Ort der Stoffanteile in beiden Phasen nach je einer weiteren Verschiebung anzeigen. Das in Abb. 1 festgehaltene Experiment zeigt folgende sehr wesentliche Eigenarten der Verteilung des gelösten Stoffes.

1. Der Stoff verteilt sich mit jeder weiteren Verschiebungsoperation auf eine größere Zahl von Scheidetrichtern. Am Anfang war alles in einem Trichter, nach einer Verschiebung in zweien, nach der zweiten Verschiebung in dreien usw.
2. Die Konzentrationsverteilung in der Scheidetrichterreihe ergibt nach einigen Verschiebungen eine symmetrische Glockenkurve. Nach fünf Verschiebungen finden wir in den fünf Trichtern 6,2, 25, 37,6, 25 und 6,2 mg Gelöstes.
3. Das Maximum der Glockenkurve wandert den halben Weg, um den man die Phasen verschoben hat. Die Pfeillängen unter den Reihen der Abb. 1 geben die Lagen der Glockenkurvenmaxima an. Bei der Verschiebung der schweren Phase über einen Trichter ist das Maximum zwischen erstem und zweitem Trichter; bei der Verschiebung über zwei Trichter ist es um eine Trichtereinheit gewandert, bei der Verschiebung um drei über anderthalb Einheiten.
4. Die Verteilung des gelösten Stoffes zwischen den beiden Phasen in der Scheidetrichterreihe läßt sich auf zwei verschiedene Arten bestimmen. Man kann entweder nach einer relativ kleinen Anzahl von Verschiebungen die Menge des Gelösten in jedem Trichter bestimmen oder man verschiebt die Phase so viele Male, bis das Gelöste praktisch vollständig aus der Reihe der Trichter in die Reihe von Bechergläsern ausgetreten ist, und bestimmt in diesen die Konzentration.

Wenn man die Voraussetzungen, die der Abb. 1 zugrunde liegen, ändert, ergeben sich weitere Gesetze für die Stoffverteilung, Gesetze, die auch bei den verschiedenen Chromatographiearten gelten.

* Die folgenden drei Referate wurden am 21. April 1951 in Bern vor dem Schweizerischen Chemiker-Verband gehalten.

1. Veränderung der Länge der Trichterreihe

Es werde mit Reihen von 10, 100 und 1000 Trichtern und einem Stoff mit dem Verteilungskoeffizienten 1 gearbeitet. In der ersten Reihe wird 9mal, in der zweiten 99 und in der dritten 999mal verschoben. Die entsprechenden Glockenkurven der Konzentrationen zeigt Abb. 2, und zwar entspricht die Kurve *A* der Reihe mit

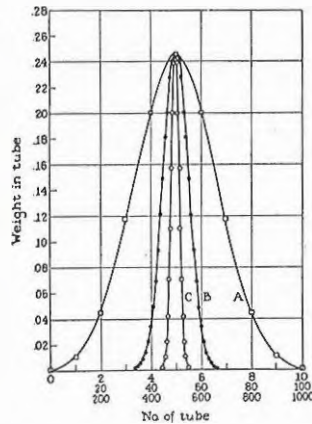


Abb. 2. Konzentrationsverteilung bei verschiedenen langen Scheidetrichterreihen

10 Trichtern, die Kurve *B* derjenigen mit 100 und die Kurve *C* der längsten Reihe mit 1000 Trichtern. Je länger die Reihe, um so größer die Zahl der Trichter, in denen der gelöste Stoff verteilt ist. Vergleicht man aber die Zahl der Trichter mit Substanz mit der Gesamtzahl aller Trichter der Reihe, so erkennt man, daß die Glockenkurve mit zunehmender Länge der Trichterreihe eine immer schmalere Grundlinie aufweist. Je länger die Reihe, um so kürzer das Reihenstück, in dem sich der ganze gelöste Stoff befindet.

2. Veränderung des Verteilungskoeffizienten

Bisher wurde dem gelösten Stoff der Verteilungskoeffizient 1 zugeteilt und an Abb. 1 abgeleitet, daß die Glockenkurve halb so rasch durch die Reihe wandert wie die bewegte untere Phase. Beim Verteilungskoeffizient ∞ , also bei einem Stoff, der sich nur in der oberen Phase löst, bleibt bei dem Versuch der Abb. 1 die gesamte gelöste Menge im ersten Scheidetrichter, die Wanderungsgeschwindigkeit ist 0. Der Verteilungskoeffizient 0 ist vorhanden bei einem Stoff, der sich nur in der untern Phase löst. Er wird sich mit der Geschwindigkeit 1 durch die Reihe bewegen, d. h. so rasch wie die untere Phase. Die Geschwindigkeit, mit der sich der gelöste Stoff durch die Trichterreihe verschiebt, läßt sich also aus dem Verteilungskoeffizienten, der Geschwindigkeit der bewegten Phase und den Phasenvolumina berechnen.

3. Veränderung der Zahl gelöster Stoffe

Löst man im ersten Scheidetrichter der Abb. 1 mehrere Stoffe mit verschiedenen Verteilungskoeffizienten (Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure und Valerian-

säure), so findet man nach 25 Phasenverschiebungen eine Verteilung gemäß Abb. 3. Bei einer längeren Scheidetrichterreihe tritt im Gegensatz zu Abb. 3 eine vollständige Trennung ein, indem die Glockenkurven sich nicht mehr überschneiden.

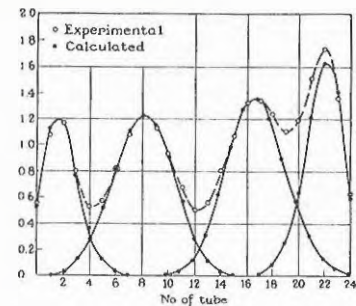


Abb. 3. Konzentrationsverteilung mehrerer Komponenten in der Scheidetrichterreihe

4. Konzentrationsabhängige Verteilungskoeffizienten

Den bisherigen Betrachtungen liegt ein konzentrationsunabhängiger Verteilungskoeffizient entsprechend der Kurve *a* in Abb. 4 zugrunde. Viele Stoffe liegen in der einen oder andern Phase in konzentrationsabhängiger Form vor, sei es in einem Assoziations- oder Dissoziationsgleichgewicht. Dann ist die Verteilung zwischen den beiden Phasen meist auch konzentrationsabhängig, entsprechend den Kurven *b* oder *c* der Abb. 4. Eine Substanz mit der Konzentrationsverteilung *b* gibt eine asymmetrische Glockenkurve im Versuch gemäß Abb. 1, und zwar fällt der rechte Ast steiler ab als der linke. Bei einer Konzentrationsverteilung entsprechend Kurve *c* in Abb. 4 ist der linke Ast der Glockenkurve steiler als der rechte.

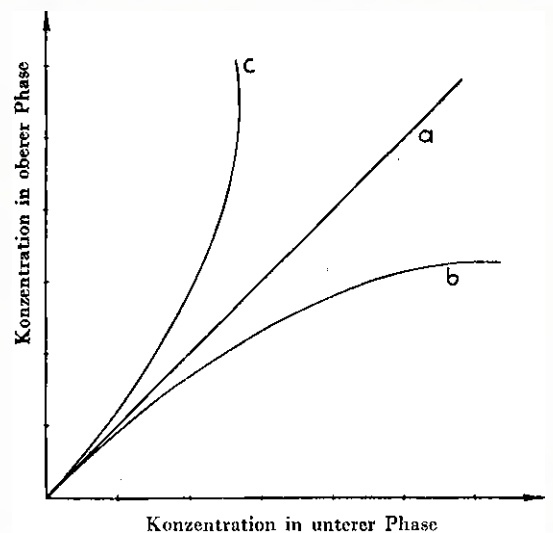


Abb. 4. Verschiedene Funktionen der Verteilungskoeffizienten mit der Konzentration

Im folgenden soll gezeigt werden, daß die Erscheinungen mit Scheidetrichterreihen die Vorgänge bei den verschiedenen Chromatographieverfahren verständlich machen.

II. Einzelne Chromatographieverfahren

1. Diskontinuierliche Gegenstromextraktion

L. C. CRAIG¹ hat in den letzten Jahren verschiedene Apparattypen hierzu entwickelt und ihre Leistungsfähigkeit bei Trennproblemen der organischen Chemie gezeigt. Es sind im Prinzip verschieden lange, mehr oder weniger automatisch arbeitende Scheidetrichterreihen, wie sie im ersten Teil des Vortrages zu theoretischen Betrachtungen herangezogen wurden. In einer großen Zahl von zylindrischen Gefäßen befinden sich die zwei flüssigen Phasen, im ersten Gefäß zudem die zu zerlegende Stoffmischung. Eine Kippbewegung aller Gefäße sorgt für rasche Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes. Hierauf wird die eine Phase in der ganzen Gefäßreihe verschoben. Ein neuer Phasenanteil tritt am Anfang der Reihe in die Apparatur ein, am Ende der Reihe fällt eine erste Fraktion dieser Phase an. In wenigen Stunden ergibt sich eine große Reihe von Fraktionen. In jeder wird die gelöste Substanz als Trockengehalt oder kolorimetrisch oder mit einer andern quantitativen Methode festgestellt. Komponenten des Gemisches, die in den beiden Phasen ziemlich verschiedene Verteilungskoeffizienten besitzen, liegen in der Fraktionenreihe vollständig getrennt vor. Trägt man die Konzentration des Gelösten in jeder Fraktion gegen die Fraktionsnummer auf, so ergibt sich für jede Komponente die aus dem Verteilungskoeffizienten berechnete Glockenkurve und die Glocken liegen ganz nebeneinander. Sehr verwandte Stoffe ergeben zufolge der noch beschränkten Zahl von Gefäßen (200 bei den größten Apparaturen) Überschneidungen. Die CRAIGSche Apparatur hat bereits vorzügliche Dienste bei Trennungen und bei Prüfungen auf Einheitlichkeit geleistet, insbesondere im Gebiet der Peptide. Den chromatographischen Verfahren gegenüber hat sie den Vorteil, größere Mengen bis zu einigen Gramm zu verarbeiten zu können, die Trennschärfe ist wegen der begrenzten Stufenzahl dagegen geringer.

2. Verteilungschromatographie²

Zwei Abänderungen der Scheidetrichterreihe sind nötig, um zur Verteilungschromatographie zu gelangen. I. Das Volumen des einzelnen Gefäßchens wird unendlich klein, dafür die Zahl aller Gefäße unendlich groß. Wie günstig sich dies auf die Trennung auswirkt, wurde im Abschnitt I bereits erläutert. II. Die Gleichgewichtseinstellung und die Verschiebung der einen Phase sind nicht mehr zwei zeitlich getrennte Operationen, die abwechselungsweise eine nach der andern ausgeführt werden. Man läßt vielmehr die eine Phase, die bewegte, an

der fein verteilten andern, der stationären, ununterbrochen vorbeiströmen, aber so langsam, daß die Gleichgewichtseinstellung trotz langsamer Diffusion durch die Phasengrenzfläche gewährleistet ist.

Die experimentelle Anordnung ist äußerst einfach. Feine, submikroskopisch poröse Teilchen, etwa Stärkekörner oder Cellulosefäserchen oder Silikagelkörner, werden mit der stationären Phase durchtränkt und in einer Röhre zu einer Säule geschichtet, und es wird die bewegte Phase langsam durch die Säule filtriert, nachdem sie oben mit einer geringen Menge der zu trennenden Mischung beladen wurde. Gemischkomponenten, die in der bewegten Phase viel stärker löslich sind als in der stationären, bewegen sich als schmales Band mit der Geschwindigkeit der bewegten Phase durch die Säule. Je löslicher die Stoffe in der stationären Phase sind, um so geringer ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit. Da bei genügender Feinheit der porösen Teilchen auf 1 cm Säulenlänge Hunderte von Trennstufen entfallen und man leicht mit Säulen von einigen Dezimetern Gesamtlänge arbeiten kann, ist die erstaunliche Trennschärfe leicht verständlich.

Eine besonders einfache Modifikation der Verteilungschromatographie, geeignet für kleinste Substanzmengen von Bruchteilen von Milligrammen, ist die Papierchromatographie, über die P. V. TAVEL in einem besonderen Vortrag berichtet.

Das Hauptproblem bei jeder Trennung durch Verteilungschromatographie ist das Finden eines günstigen Phasenpaares. Die Erfahrung lehrt aber, daß man für alle Stoffklassen geeignete Kombinationen findet. Es wurden schon Fett-, Zucker-, Aminosäure-, Farbstoff- und viele andere Mischungen zerlegt. Einige Mittel, um die Verteilung von Stoffen zwischen einer wässrigen und einer organischen Phase zu beeinflussen, sind:

Elektrolytzusatz,

pH-Variation,

Zusatz von Komponenten, welche die Auflösung der Phasen ineinander begünstigen, wie niedere Alkohole, Ketone usw.

3. Adsorptionschromatographie³

Auch diese älteste Chromatographieart kann aus der eingangs behandelten Scheidetrichterreihe verstanden werden. Man denke sich statt der stationären Phase einen hochdispersen festen Stoff mit Adsorptionsfähigkeit für die gelösten Moleküle. An die Stelle einer Verteilungsisotherme nach Abb. 4 tritt eine Adsorptionstherme. Auf der Ordinate ist statt Konzentration in der stationären Phase anzugeben die Gewichtsmenge Adsorbiertes pro Gramm des dispersen Stoffes. Auch bei der Adsorption ist ein Gleichgewicht zwischen der an der Oberfläche gebundenen Menge und der in Lösung befindlichen vorhanden und es treten die drei Kurventypen der Abb. 4

¹ L. C. CRAIG und D. CRAIG, Abschnitt *Extraction and Distribution in Technique of Organic Chemistry*, Bd. III. Herausgegeben von ARNOLD WEISSBERGER, Interscience Publishers, New York und London 1950. Dem Artikel von CRAIG sind auch die Abbildungen 2 und 3 dieses Aufsatzes entnommen.

² Neuere Literatur findet sich in: *Biochemical Society Symposia*, no. 3: *Partition Chromatography*, University Press, Cambridge 1950.

³ Neuere Literatur findet sich in: *Discussions of the Faraday Society*, no. 7 (1949): *Chromatographic Analysis*.

auch für die Adsorption auf. Wenn nun die flüssige Phase gemäß Abb. 1 über die Adsorbentien in der Gefäßreihe bewegt wird, treten ganz analoge Erscheinungen auf wie bei der Scheidetrichterreihe. Eine nicht adsorbierte Substanz läuft so rasch wie die flüssige Phase durch die Reihe, eine sehr stark adsorbierte bewegt sich nicht und eine mäßig adsorbierte hat eine mittlere Geschwindigkeit. Die Form der Adsorptionsisotherme bedingt die Konzentrationsverteilung im Substanzband des Chromatogramms analog wie bei der Scheidetrichterreihe.

Wie bei der Verteilungschromatographie sind auch hier die Einheiten räumlich sehr klein bei beachtlicher Säulenlänge, womit die Trennschärfe außerordentlich hoch wird, und wie dort wird auch hier die flüssige Phase ununterbrochen langsam strömen gelassen, wobei an jeder Stelle längs der Säule das Adsorptionsgleichgewicht eingestellt sein soll.

Als Adsorbentien sind eine Unmenge anorganischer und organischer Stoffe im Gebrauch. Vieles spricht dafür, daß die Adsorption nicht mit gleicher Intensität an der gesamten Oberfläche der Teilchen erfolgt, daß vielmehr besondere aktive Stellen vorhanden sind. Bei manchen Adsorbentien werden aktivierende Vorbehandlungen wie Erhitzen usw. vorgenommen. Die Aktivität ist, wie man leicht verstehen kann, von vielen Einzelheiten bei der Präparation und Handhabung abhängig, und es ist bei manchen Stoffen schwer, die genau gleiche Adsorptionsfähigkeit zu reproduzieren. Für vergleichende Untersuchungen legt man sich daher gern eine größere Reserve eines individuellen Stoffes an.

Über die Adsorptionsintensität, also die Kraftwirkungen zwischen Oberfläche der Teilchen und den gelösten Molekülen, ist einiges bekannt. Solange man Adsorbentien ohne ionogene Gruppen betrachtet, kommt es hauptsächlich auf die Stärke der VAN DER WAALSschen Kräfte der gelösten Moleküle an. Dies ist aus folgender Tabelle⁴ zu ersehen:

R-COOH	↓ Abnahme der Adsorption Zunahme der Wanderung ↓
R-CONH ₂	
R-OH	
R-NH ₂	
R-COOCH ₃	
R-N(CH ₃) ₂	
R-NO ₂	
R-OCH ₃	
R-H	

R ist der Azobenzolrest $C_6H_5N=NC_6H_4-$. Die für die vergleichenden Chromatographieversuche verwendeten Azofarbstoffe unterscheiden sich nur in einer Atomgruppe. Ihre Adsorptionsfähigkeit nimmt von oben nach unten in der Reihe ab. Die Wanderungsgeschwindigkeit in einer Chromatographiesäule ist bei RH größer als bei ROCH₃ und hier größer als bei RNO₂ usw.

⁴ H. BROCKMANN, *Chromatographie and the Relation between Constitution and Adsorption Affinity*, Discussions of the Faraday Society 7, 58 (1949).

Die Adsorption ist natürlich auch vom Lösungsmittel abhängig, indem dieses mit dem gelösten Stoff um die Besetzung der aktiven Stellen konkurriert. Das stark adsorbierte R-COOH der obigen Tabelle wird mit Eisessig als Lösungsmittel sehr rasch durch eine Säule gespült, mit Alkohol langsamer und mit einem Kohlenwasserstoff nur sehr langsam.

Sobald das Adsorbens ionogene Gruppen besitzt, gilt die in obiger Tabelle wiedergegebene Reihe nicht mehr. Ein Adsorbens mit sauren Gruppen wird die organischen Basen besonders stark festhalten, ein Adsorbens mit basischen Gruppen die Säuren.

Von der Leistungsfähigkeit der Chromatographiesäulen gibt die Aminosäureanalyse nach STEIN und MOORE⁵ ein gutes Bild.

Etwa 2 mg eines Eiweißhydrolysates werden mit einer Alkohol-Wasser-Mischung durch eine Stärkesäule von 0,9 cm Durchmesser und 30 cm Länge getrieben. Das Eluat wird während etwa fünf Tagen in etwa 250 Portionen zu 0,5 cm³ aufgefangen und in jeder Fraktion die Aminosäuremenge quantitativ bestimmt. Es tritt eine fast vollständige Zerlegung gemäß Abb. 5 ein; die einzelnen Aminosäuren lassen sich mit einer Genauigkeit von etwa 3% bestimmen.

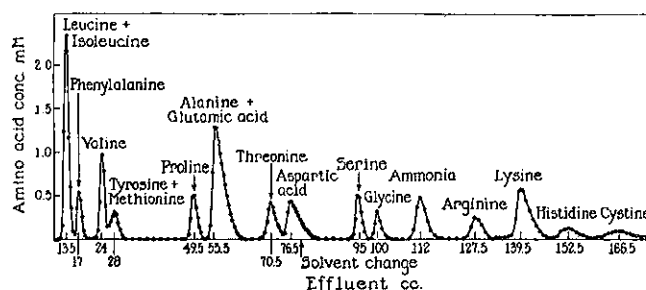


Abb. 5. Aminosäureanalyse des Rinderserumalbumins nach STEIN und MOORE

4. Ionenaustauschchromatographie

Es ist nochmals die Scheidetrichterreihe der Abb. 1, welche das Verständnis auch dieser Methode vermittelt. Die unbewegliche Phase sei jetzt ein fein disperser fester Stoff mit vielen stark ionisierten Gruppen in seiner Oberfläche, beispielsweise ein aromatisches Kunstharz mit Sulfonsäuregruppen. Zwischen den beiden Ionenarten besteht ein wichtiger Unterschied. Die Kationen können abdissoziieren in die flüssige Phase, in diesem Fall Wasser, die Anionen sind Bestandteile des festen Stoffes und damit fixiert. Trennt man die wässrige Phase vom Festkörper ab, so ist diese wegen der Elektroneutralität frei von H-Ionen. Die Kationen werden vom anionischen festen Stoff zurückgehalten. Gibt man aber in den ersten Trichter der Abb. 1 eine kleine Menge eines Elektro-

⁵ W. H. STEIN und ST. MOORE, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Bd. 14, New York 1950.

lyten, beispielsweise Natriumchlorid, und trennt nunmehr die wässrige Phase vom Festkörper ab, so findet man darin die ganze Menge der Cl-Ionen des zugefügten NaCl, aber als Kationen teils Wasserstoff-, teils Natriumionen, deren Summe gleich derjenigen der Chlorionen ist. Der Festkörper hält einen Teil der zugefügten Natriumionen fest und hat eine hierzu äquivalente Menge Wasserstoffionen freigegeben. Bringt man die wässrige Phase aus Trichter 1 mit dem organischen Festkörper von Trichter 2 in Kontakt, so erfolgt der zweite Austausch von Natrium- gegen Wasserstoffionen. Bei der systematischen Verschiebung der wässrigen Phase durch die Trichterreihe der Abb. 1 ist der Austausch bald vollständig. Auf der rechten Seite der Reihe tritt Salzsäure in äquivalenter Menge zum links eingeführten Natriumchlorid aus.

Die Ionenaustauschsäulen haben bereits vielerlei Anwendungen gefunden. Bei der Wasserentsalzung setzt man in einer ersten Säule aus den Salzen die entsprechenden Säuren frei und bindet diese in einer zweiten Säule salzartig an einen basischen Festkörper. Beide Säulen lassen sich nach voller Beladung mit den entsprechenden Ionenarten wieder regenerieren. Eine wichtige Anwendung im analytischen Laboratorium ist die

quantitative Abscheidung der basischen und sauren Aminosäuren aus Eiweißhydrolysaten⁶.

Es wurde bisher auf die einfachen theoretischen Grundlagen aller Chromatographieverfahren hingewiesen. Die genaue Behandlung der einzelnen Phänomene ist, wie man leicht einsehen kann, eher kompliziert. Einmal handelt es sich bei den Säulenfüllstoffen meist um hochdisperse Festkörper. Ihre Charakterisierung hat in den letzten Jahren durch Verwendung der Röntgenographie und des Elektronenmikroskopes große Fortschritte gemacht, muß aber sicher noch viel verfeinert werden, ehe ein volles Verständnis der Adsorptionsvorgänge erwartet werden kann. Andererseits ist die Frage der Verteilung eines Stoffes zwischen zwei flüssigen Phasen oder der Adsorption eines Stoffes aus Lösung noch weit von einer exakten theoretischen Behandlung entfernt. Es ist demnach verständlich, daß beim Chromatographieren noch viel Empirie im Spiel ist. Trotzdem haben die chromatographischen Methoden dank ihrer Einfachheit, Trennschärfe und Vielseitigkeit der Anwendung rasch eine überragende Bedeutung erlangt.

⁶ Näheres über Theorie und Anwendungen findet sich im Buch von R. KUNIN und R. J. MYERS, *Ion Exchange Resins*, John Wiley & Sons, New York, und Chapman & Hall, London, dessen Literaturregister auf 615 Originalarbeiten verweist.