

Papierchromatographie und Papierelektrophorese

Von Dr. A. GRÜNE

C. Schleicher & Schüll, Dassel

Schluß

XX. Anwendungsgebiete der Papierchromatographie

1. Aminosäuren, Peptide, Proteine

Allgemeines

Die Trennung der Aminosäuren eines Wollhydrolysates und ihre Identifizierung war die erste papierchromatographische Arbeit in ihrer heutigen Form¹. Es ist daher nicht verwunderlich, daß gerade auf dem Gebiet der Aminosäuren die größte Zahl der Publikationen erschienen ist.

Allgemein gesehen, werden die α -Aminosäuren meistens in Form von Hydrolysaten irgendwelcher natürlicher Eiweißstoffe vorliegen, also zu Beginn der Arbeit nicht in reiner Form, sondern begleitet von durch den Hydrolysevorgang entstehenden Salzen, eventuell auch sonstigen Begleitstoffen.

Hydrolysiermethoden für Proteine

a) *Hydrolyse mit Hilfe von Salzsäure*². Eine Probe des zu analysierenden Proteins in der Größenordnung von 1,6 mg N wird unter Rückfluß in 10 ml 6-n HCl 20 Stunden lang gekocht, die überschüssige Salzsäure im Vakuum bei 35°C oder gegebenenfalls auch auf dem Wasserbad abgedampft. Der trockene Rückstand wird 24 Stunden über Natronkalk oder noch längere Zeit im Vakuum aufbewahrt. Dann nimmt man die Substanz in warmem Wasser auf, filtriert, dampft wieder zur Trockne und löst schließlich in genau 1 ml 10% Isopropanol. Dieser Alkohol hat sehr geringe Veresterungstendenz, und es besteht wenig Gefahr, daß die Aminosäuren durch Esterbildung gebunden werden.

b) *Salzsäure/Ameisensäure*³. Gemisch 1:1 von 6-n HCl und 90% HCOOH (v/v).

c) *Schwefelsäure*⁴. 10 mg Protein werden mit 10 ml 8-n Schwefelsäure 20 bis 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Heiße gesättigte Bariumhydroxydlösung wird zum Hydrolysat gefügt, bis zum pH 11 oder höher. Anschließend wird durch Vakuumdestillation das vorhandene Ammoniak entfernt, worauf das Barium durch einen geringeren Überschuß von 1-n Schwefelsäure gefällt wird. Das ausgefallene Bariumsulfat zentrifugiert man ab und wäscht es sorgfältig mit heißem Wasser. Die mit dem Filtrat vereinigten Waschwässer dampft man zur Trockne und nimmt den trockenen Rückstand mit 10% Isopropanol auf.

d) *Trifluoressigsäure*. Wurde ausprobiert an Casein, Lactalbumin, Weizengluten⁵. – Kochen unter Rückfluß 48 Stunden lang mit 80% Trifluoressigsäure. Danach den Überschuß der organischen Substanz mit Äther extrahieren. Die wäßrige Schicht zur Trockne dampfen, mit 1% wäßrigem Isopropanol aufnehmen.

e) *Bariumhydroxyd*⁶. Vor allem zur Schonung des Tryptophans, das bei saurer Hydrolyse zerstört wird. – Eine Proteinprobe mit 1,6 mg N wird 18 bis 20 Stunden im Ölbad bei 125°C mit 10 ml 14prozentiger Bariumhydroxydlösung gekocht. Man

fällt darauf das Ba mit einem geringen Überschuß von 1-n Schwefelsäure, zentrifugiert und wäscht das Bariumsulfat sorgfältig mit heißem Wasser, das einen Tropfen Essigsäure enthält. Das Filtrat wird im Vakuum abgedampft und der Rückstand im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium völlig getrocknet. Für sehr geringe Proteinmengen werden 5 bis 20 mg Protein (0,75 bis 3 mg N) in einem 7 mm weiten Glasrohr mit 1 ml reiner 20prozentiger HCl unter Stickstoffatmosphäre in einem zugeschmolzenen Rohr hydrolysiert. Bei S-haltigen Proteinen benutzt man besser ein Gemisch gleicher Teile 20prozentiger HCl und 90prozentiger HCOOH.

Aminosäuren und Peptide aus Geweben gewinnt man, indem man die Proteine durch Fällung mit Trichloressigsäure, Wolframsäure, Eisenhydroxyd, Zinksulfat, Bariumhydroxyd usw. entfernt.

Nach DENT⁷ kann man Gewebeschnitte auch mit Alkohol extrahieren, in dem sich wohl die Aminosäuren, nicht aber die Proteine lösen.

AWAPARA⁸ extrahiert Gewebehomogenisate mit Alkohol und gibt dazu die dreifache Menge Chloroform, wodurch Proteine und Lipide gelöst werden. Man trennt ab, in der wäßrigen Schicht befinden sich die Aminosäuren.

Größere Mengen von Begleitsubstanzen stören die Trennung von α -Aminosäuren, müssen daher entfernt werden. Störungen ergeben sich besonders bei niedrigen R_F -Werten mit Phenol als Fließmittel. Man wird daher auf vorstehende Art gewonnene Aminosäurengemische zweckmäßigerweise entsalzen.

Methoden der Entsalzung

a) *Ionenaustauschreaktionen*⁹. Kationen kann man in der Säule mit Duolite C3 oder Amberlite IR-120 entfernen. Man wäscht mit Wasser, bis die Anionen und nicht ionischen Stoffe entfernt sind. Die Aminosäuren und (schwächeren) Kationen werden mit *n*- oder 2-*n*-Ammoniak extrahiert, der Überschuß des Ammoniaks im Vakuum entfernt, der Rest in Wasser aufgenommen und über Anionenaustauscher IRA-410 gegeben. Infolge der Ampholytnatur der Aminosäuren werden diese vom Anionenaustauscher absorbiert; die Kationen gehen ebenfalls hindurch. Arginin und Lysin, die relativ stark basisch sind, gehen teilweise durch, also verloren.

Man zieht aus dem Harz die Aminosäuren durch *n*-HCl aus.

Nach verschiedenen Autoren sind andere Harze besser geeignet: Nalcit SAR¹⁰ soll besonders geringe Aminosäureverluste ergeben (96% werden wieder gewonnen). Auch hier gehen jedoch Arginin und Lysin verloren. Man bereitet zunächst die Hydroxylform des Harzes durch abwechselnde Behandlung mit *n*-HCl und *n*-NaOH, dann mit 1-n NaOH (carbonatfrei) in 70% Äthanol, dann mit 70% Äthanol, bis die Säule neutralisiert ist.

Darauf gibt man durch die neutralisierte Säule die Lösung der Aminosäuren in 70% Äthanol. Man eluiert mit HCl und gibt das Eluat dann über die Bicarbonatform des Austauschers. Letzteren erhält man durch Behandeln der Chloridform mit gesättigtem Natriumbicarbonat und mehrtägiges Trocknen an der Luft.

b) *Elektrolytische Entsalzung.* Nach STEIN und MOORE¹¹ ergibt diese Methode ziemlich starke Verluste, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Glutaminsäure und Alanin erleiden durchschnittlich 5% Verlust, Thyrosin, Methionin, Prolin, Histidin 10 bis 30%, Arginin wird zu über 50% in Ornithin umgewandelt, wobei Kühlung diese Zersetzungerscheinungen etwas hemmt. Außerdem sollen Hydrierungen vorkommen:



Umwandlungen von Indoxylsulfat in Indigo und Jodabspaltungen beim Dijodtyrosin.

Benutzte Substanzmengen

Für die Papierchromatographie der Aminosäuren lassen sich allgemein gültige Regeln nicht aufstellen, da wie bei jeder anderen Trennung die Länge des Wanderungsweges und die sonstigen Bedingungen variieren. Man wird die angewendeten Mengen so wählen, daß die untere Nachweisbarkeitsgrenze überschritten ist, die ja vor allem von der Reaktionsschärfe des Sprühreagens abhängt. BLOCK, DURRUM und ZWEIG¹² bringen eine Tabelle der Nachweisbarkeitsgrenze nach verschiedenen Autoren. Da die Tropfengröße in relativ geringen Grenzen festliegt, wird man die Konzentration der Lösung oder bei verdünnten Lösungen die Zahl der einzelnen Auftragungen mit zwischengeschalteter Trocknung variieren. Nach vorigen Autoren und für quantitative Trennungen dürfen 2,5 Mikroliter Auftrag bei einer Konzentration von 1 bis 10 Millimol meist genügen. Bei größeren Bogen und langem Wanderungsweg wird man bis zu 5 Mikroliter auftragen (siehe Tab. 17).

Fließmittel

Einige klassische Fließmittelgemische werden für die Trennung von α -Aminosäuren bevorzugt:

A. Phenol. Meist mit Wasser im Gewichtsverhältnis 80:20, als gesättigte Lösung von Wasser in Phenol. Die früher in der Literatur oft vorgeschlagenen Reinigungsmethoden der Destillation über Aluminiumspäne und Natriumbicarbonat sind heute weitgehend nicht mehr notwendig, da die von den chemischen Fabriken gelieferten Produkte meistens rein genug sind.

Phenol zeigt am stärksten von allen Fließmitteln die Erscheinung der braunen bis rosa Fließmittelfronten. Man kann sie vermeiden durch Zugabe von 0,1 g NaCN zum «Sättigungsphenol» (am Boden der Kammer) oder von 0,1 g Cupron oder einem anderen Komplexon zum «Entwicklungsphenol».

Bei dem hier nicht notwendigen Zusatz von Ammoniak zum Entwicklungsphenol (gutes Trennmittel z. B. für Zucker) wird die gefärbte Front besonders stark. Sie entsteht durch die Bildung von Oxydationsprodukten unter dem katalytischen Einfluß von immer im Papier

vorhandenen Eisen- und Kupferionen. Sie stört nur dann, wenn Flecken mit einem R_F -Wert von über 0,9 in sie hineinreichen.

Tab. 17. Mindestmengen, die durch Papierchromatographie identifizierbar sind

Arbeitsbedingungen: zweidimensionales Chromatogramm, Phenol-Collidin oder Lutidin, Identifizierung durch Ninhydrin

Stoff	DENT (1948) γ	PRATT (1948) γ	AUCLAIR γ
α -Alanin	2	0,2	0,06
β -Alanin	5	0,2	0,22
Allothreonin	6		
α -Amino- <i>n</i> -Buttersäure	4	0,2	0,12
α -Aminoisobuttersäure	4		
γ -Aminobuttersäure	5		
ϵ -Aminohexansäure	5	0,5	
α -Amino- ϵ -oxycaprinsäure	10		
α -Aminooctansäure	6		
δ -Aminopentansäure	5		
α -Aminophenylelessigsäure	8		
Arginin	15	4	4
Asparagin	5	1	0,8
Asparaginsäure	5	1	0,8
Carnosin	15		
Citrullin	5	0,5	
Cystathion	8		
Cysteinsäure	1	8	0,2
Cystein	0		
Dijodtyrosin	40		
β , β -Dimethylcystein	0		
Djenkolsäure	5		
Äthanolamin	5		
Äthanolaminphosphat	10		
Glutaminsäure	3	0,1	
Glutamin	5	2	0,4
Tryptophan	20	3	2
Tyrosin	15	3	1
Valin	3	0,2	0,15
Glutathion	10	10	
Glycin	1	0,1	0,05
Histidin	20	25	7,5
Homocysteinsäure	10		
Oxylysin	15		
Oxyprolin	15	1	1,0
Lanthionin	6		
Leucin	10	0,5	0,25
Isoleucin	10	0,5	0,25
Lysin	15	3	1,5
Methionin	10	1	
Methioninsulfon	10	5	
Methioninsulfoxyd	5	1	0,5
α -Methyl- α -amino- <i>n</i> -buttersäure	10		
Methylhistidin	20		
Norleucin	30		
Norvalin	5	0,5	
Ornithin	10	3	
Phenylalanin	10	5	1,25
Prolin	8	1	1,5
Serin	2	0,3	0,08
Serinphosphat	10		
Taurin	3	1	0,2
Threonin	10	2	0,2
Thyroxin	60		

Phenol wird auch gepuffert benutzt:

100 g Phenol mit 20 ml Wasser, das enthält:

- 6,3 % Natriumcitrat
- 3,7 % KH_2PO_4
- 0,5 % Ascorbinsäure

Man benutzt die untere Schicht als Fließmittel.

B. Butanol/Eisessig/Wasser. Zwei Volumverhältnisse sind am meisten gebräuchlich:

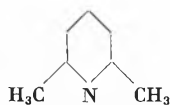
1. 40 ml *n*-Butanol
- 10 ml $\text{CH}_3 \cdot \text{COOH}$
- 50 ml H_2O

Man schüttelt gut durch, möglichst bei einer Temperatur unterhalb der Temperatur des Chromatographierraumes, läßt absitzen und benutzt die obere organische Schicht. Das Fließmittel neigt zur Entmischung und beginnt nach etwa 24 Stunden zu verestern, wodurch sich die R_F -Werte ändern (Versuche siehe vorn). Der Versuch muß ergeben, ob man besser sofort zu arbeiten beginnt oder den Eintritt des Estergleichgewichtes abwartet. Statt *n*-Butanol wird oft Isobutanol empfohlen, das langsamer verestert. Auch kann man das *n*-Butanol teilweise bereits durch Butylacetat ersetzen.

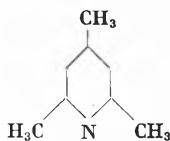
2. *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 80 : 20 : 20 (v/v). Dieses Gemisch hat den Vorteil, daß man keine Phasen abtrennen muß wie bei dem klassischen, zuerst von PARTRIDGE zur Zuckertrennung empfohlenen Gemisch 4 : 1 : 5. Man kann es also sofort benutzen.

C. Organische Basen im Gemisch mit Wasser. Eventuell mit anderen Zusätzen, wie Alkohol, Puffer usw.

2,6-Lutidin



2,4,6-Collidin



Eine große Anzahl von Fließmitteln braucht hier nicht mehr erwähnt zu werden, die alle mehr oder weniger brauchbar sind.

Papiere

Die Dichtigkeit des Papiers bzw. der Mahlgrad seiner Faser richtet sich immer nach den Ausmaßen der benutzten Apparatur, der Viskosität und Trennschärfe des Fließmittelgemisches, der Lage der R_F -Werte zueinander und der angewendeten Technik, bzw. alle diese Faktoren werden aufeinander abgestimmt.

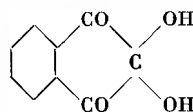
Identifizierung

Die Identifizierung geschieht durch Sprühen mit der Lösung des Reagens oder auch durch Baden in der Reagenslösung. Letztere Methode verlangt, daß die Flecken im Fließmittel des Reagens nicht löslich sind, doch wird sie oft vorgezogen, da die Sprühung das

Reagens oft nicht völlig gleichmäßig, sondern in Tropfenform verteilt.

Meist benutzte Reagenzien:

a) Ninhydrin = Triketohydrindenhydrat:



Anwendung auf verschiedene Arten

α) 5 g Ninhydrin + 0,5 g SnCl_2 werden in einer Mischung aus 500 ml Äthylenglykolmonomethyläther, 250 ml *n*-NaOH und 250 ml 2-*n* Essigsäure gelöst. Mehrere Wochen haltbar.

β) Stammlösung: 2 g Ninhydrin, in 50 ml Wasser unter Erwärmen gelöst. Dazu 80 mg Zinnchlorür in 50 ml Wasser. 24 Stunden im Dunkeln stehen lassen, filtrieren.

Gebrauchslösung: 25 ml dieser Stammlösung mit 50 ml Wasser verdünnen, dazu 450 ml Isopropanol.

γ) 0,2 % Ninhydrin in 95prozentigem Alkohol.

δ) 0,1 % Ninhydrin in wassergesättigtem *n*-Butanol, mit einigen Tropfen Eisessig.

Man sprüht oder badet das Chromatogramm und trocknet dann eine Stunde bei 110°C oder 24 Stunden bei Raumtemperatur. Letztere Methode läßt die Flecken zwar langsam, aber nach und nach sowie farblich etwas modifiziert herauskommen. An der Zeit des Erscheinens sowie der Färbung, zusammen mit der Lage im Chromatogramm, kann man bereits eine Anzahl von Identifizierungen vornehmen.

Tab. 18. Ninhydrinfärbungen der Aminosäuren nach DENT

Purpur	Alanin, α-Amino- <i>n</i> -Buttersäure, α-Amino-Isobuttersäure, α-Amino-ε-Capronsäure, α-Aminocaprylsäure, α-Aminophenyllessigsäure, Arginin, Cystathionin, Glutaminsäure, Glutamin, Glutathion, Lanthionin, Leucin, Iso-leucin, Methionin, Norleucin, Nor-valin, Ornithin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tryptophan, Valin
Blaustichig-purpur	Asparaginsäure
Grünstichig-purpur	Dijodtyrosin, Histamin, Histidin, Methylhistidin, Monojodtyrosin, Phenylalanin, Tyrosin
Dunkelpurpur . .	Oxylysin, Lysin
Orangebraun . . .	Asparagin
Olivbraun	Tyroxin
Zitronengelb . . .	Prolin
Bräunlichgelb . .	Oxyprolin
Blaustichiggelb . .	Carnosin

JEPSON und SMITH¹³ empfehlen das sogenannte *Mehrfach-tauchverfahren* statt des Sprühens. Nach ihnen soll man oft gute Identifizierungen der Aminosäuren erzielen, wenn man nacheinander in Ninhydrin oder Isatin, EHRLICH'S Reagens, SAKAGUCHI-Reagens und Diazoreagens taucht.

ε) Die Ninhydrinreaktion verblaßt nach einiger Zeit; man kann sie durch Komplexbildung mit Metallsalzen stabilisieren.

WIELAND und KAWERAU¹⁴ sprühen mit den alkoholischen Lösungen von Zn-, Cd-, Co- oder Cu-Salzen nach.

Tab. 20. Farbreaktionen der Aminosäuren mit Naphthochinon-4-sulfonsaurem Na

Farben der Aminosäuren:

grünblau	Leucin, Glutamin, Glycin
hellgrün	Isoleucin, Phenylalanin
blaugrün	Valin, Methionin
grau	Tyrosin
braun	Tryptophan, β -Aminobuttersäure, α -Aminobuttersäure, γ -Aminobuttersäure, β -Alanin
orange	Prolin, Oxyprolin
grün	Alanin, Glutaminsäure, Threonin, Serin
hellblau	Asparaginsäure, Arginin, Lysin, Ornithin
violett	Histidin
dunkelblau	Cystin, Cystein

Farben der Peptide:

blaugrün	Alanylglycin
gelbgrün	Glycylglycin, Glycyltryptophan, Glycylleucin
grün	Triglycin
hellgrün	Leucyldiglycin
braun	Glutathion

e) SAKAGUCHI-Reagens für Arginin und Tyrosin²¹

Arginin: 1. 0,01prozentige Lösung von α -Naphthol in einer 5prozentigen Lösung von Harnstoff in Äthanol. Vor Gebrauch löst man 5% KOH in der α -Naphthollösung. – 2. 0,7 ml Brom in 100 ml 5prozentiger NaOH lösen.

Arginin und seine Peptide sowie Guanidyllderivate erscheinen rot auf weißem Grund.

f) α -Nitroso- β -Naphthol für Tyrosin²²

Sprühen mit einer Lösung von 0,1% α -Nitroso- β -Naphthol. Mit Warmluft trocknen. Mit 10prozentiger wäßriger Salpetersäure sprühen. 3 min auf 100°C erhitzen.

Tyrosin erscheint rot auf blaßgelbem Grund (spezifisch).

g) PAULYS Reagens²³

Spricht auf Phenole, Amine und alle sonstigen Substanzen an, die kupplungsfähige Ringsysteme besitzen.

50 g Sulfanilsäure werden in 250 ml 10prozentigem KOH gelöst, abgekühlt und nach dem Abkühlen mit 200 ml 10prozentiger Natriumnitritlösung versetzt. Dann läßt man aus einem Scheidetrichter in eisgekühlte Salzsäure (80 ml konz. HCl und 40 ml Wasser) eintropfen. – Das ausgefallene Diazoniumsalz absaugen, mit Eiswasser waschen, mit Alkohol und Äther trocken waschen. An der Luft trocknen. Vor dem Besprühen 0,1 g Diazoniumsalz in 20 ml 10prozentiger Soda-lösung lösen.

h) EHRLICH'S Reagens²⁴

1 oder 2 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml 20prozentiger Salzsäure lösen, sprühen, bei 60°C entwickeln (siehe Tab. 21).

Allgemeine Erfahrungen bei der Trennung von α -Aminosäuren

Das eindimensionale Verfahren bringt bei komplizierteren Aminosäuregemischen nur selten eine völlige Auf-

trennung zustande, sondern zumeist nur eine Vortrennung. Oft wird nur eine einzige Aminosäure scharf abgetrennt, die Flecken der übrigen gehen ineinander über. Man kann die Methode trennschärfer gestalten durch die Benutzung verschieden gepufferter Papierstreifen mit verschiedenen Lösungsmitteln. Auch kann man das Durchlaufchromatogramm anwenden, wobei natürlich, wie immer, die Gefahr besteht, daß einzelne schnell wandernde Komponenten abfließen und nicht mit erfaßt werden.

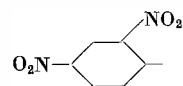
In vielen Fällen wird man zum zweidimensionalen Chromatogramm greifen, um klare Trennungen zu erzielen. Als Routineverfahren zur vollständigen Analyse komplizierter Gemische, z. B. Proteinhydrolysate, empfiehlt DENT²⁶ folgende Reihenfolge von Operationen:

1. Eindimensionale Methode mit Phenol (grober Test, Bestimmung der notwendigen Menge an Lösung).
2. Eindimensionale Methode mit Collidin, Prüfung mit PAULYS Reagens auf Histidin.
3. Zweidimensionale Methode mit einer Richtung Phenol, zweite Richtung Collidin, wobei nahezu alle Aminosäuren erfaßt werden.
4. Wie 3, jedoch nach Behandlung des Substanzgemisches mit H_2O_2 (Oxydation von Cystin zu Methionin).
5. Wie 3, jedoch nach 24stündiger Hydrolyse mit 6-N HCl. Dabei werden die Peptide erfaßt.
6. Leitchromatogramme mit reinen Test-Aminosäuren zur Markierung der Lage.

DENT²⁶ gab bereits ziemlich früh eine «Landkarte» eines zweidimensionalen Chromatogramms mit über 60 Aminosäuren, anhand deren man sich über die Lage unbekannter Flecken orientieren kann.

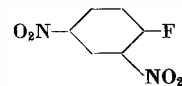
DNP-Aminosäuren

Hier und da benutzt man substituierte Aminosäuren zur Trennung, vor allem die DNP-Aminosäuren, d. h. die in der Aminogruppe durch den Rest



substituierten.

Diese Reaktion dient vor allem dem Zweck der Endgruppenbestimmung sowohl in Proteinen wie auch in Peptiden. Der Umsatz erfolgt mit Dinitrofluorbenzol:



10 mg der Probe, die in wenigen ml einer 10prozentigen Natriumbicarbonatlösung gelöst ist, werden mit dem doppelten Volumen einer 10prozentigen 2,4-Dinitrofluorbenzollösung in Äthanol gemischt und 3 Stunden geschüttelt. Darauf dampft man den Überschuß an Äthanol im Vakuum ab. Das überschüssige Reagens wird mit Äther extrahiert. Dann wird angesäuert.

Nach totaler Hydrolyse trägt die Endaminogruppe den DNP-Rest. Die Papierchromatographie von DNP-Aminosäuren verlangt gepufferte Papiere. Man kann sie

Tab. 21. Einige spezifische Farbreaktionen auf α -Aminosäuren

Aminosäure oder -Derivate	Spezifische Reaktion	Farbe	Bemerkungen
Arginin und monosubstituierte Guanidinderivate	SAKAGUCHI-Reaktion: α -Naphthol-Hypobromit, Harnstoff in alkalischem Medium nach ACHER modifiziert, siehe vorn	Arginin: rot, alle anderen: violettrot, «fleur de pêcher»	
Citrullin	<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyd in HCl (<i>n</i>)	gelb	
Kreatin	JAFFESches Reagens, alkalische Natriumpikratlösung	orange	Man wandelt zuerst das Kreatin um durch Salzsäurebehandlung auf dem Papier
Kreatinin und Derivate	Reagens von LANGLEY und EVANS: Na-Salz der 3,5-Dinitrobenzoesäure	granatrot	
Cystein	Nitroprussidnatrium in alkalischem Medium	orange	Cystin wird zuerst in Cystein übergeführt durch Behandlung mit Cyankali
Cystin (Reaktion der SH-Gruppe)	Tetrazoliumsalz	rot	
Geschwefelte Aminosäuren: Cystein, Cystin, Methionin	Oxydation mit Wasserstoff-superoxyd oder Bromwasser (Cystin gibt Cysteinsäure, Methionin gibt Methioninsulfon) Kaliumchloroplatinat FEIGLS Reagens: «Azoture de Na-Jode»	weiße Flecken auf rosa Grund weiße Flecken auf hellbraunem Grund	Cysteinsäure und Methioninsulfon werden nach der Chromatographie durch Ninhydrin identifiziert Cystein erscheint in 1 min, Cystin in 15 min, Methionin in 1 Stunde
Ergothionein	FOLIN-MARENZI-Reagens: Phosphor-18-Wolframsäure-Harnsäure im alkalischen Medium PAULYS Reagens: Diazotierte Sulfanilsäure		
Glykokoll	<i>o</i> -Phtaldialdehyd	purpurviolett im UV-Licht	Gleiche Reaktion mit Tryptophan
Histidin	PAULYS Reagens: Diazotierte Sulfanilsäure	rot	Phenol darf auch in Spuren nicht mehr vorhanden sein. Dieselbe Farbe bei Tyrosin Tyrosin: bräunliche Färbung Tyrosin: nur schwache Reaktion
	<i>p</i> -Bromanilin	rot	
	diazotiertes <i>p</i> -Anisidin	rot	
Oxyaminosäuren: Serin, Threonin, Oxylysin	Oxydation durch Natriumperjodat und NESSLERS Reagens	braun	
N-Methylaminosäuren	Chlorhydrat des <i>p</i> -Nitrobenzoyls und Pyridin		
Prolin, Oxyprolin	Isatin	blau auf gelbem Grund	Oxyprolin: Reaktion schwach
Tryptophan	EHRLICHS Reagens: salzsaurer <i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyd	bläßgelb oder violett je nach Lösungsmittel	
Tyrosin	PAULYS Reagens <i>p</i> -Bromanilin α -Nitroso- β -Naphthol	rotviolett bräunlich rötlich auf grünem Grund	siehe Histidin siehe Histidin spezifisch für Tyrosin

jedoch auch an hydrophobierten Papieren unter Anwendung des Verfahrens mit umgekehrten Phasen trennen, da sie ziemlich stark lipophil sind. Im normalen Papierchromatogramm wandern sie sehr schnell.

FELIX und KREKELS²⁷ tränkten Filtrierpapier mit Phtalatlösung vom pH 6,0 und trennten damit DNP-Aminosäuren unter Benutzung folgenden Fließmittelgemisches:

50% sek. Butanol
30% Methylacetat
16% 0,5-n HCl
4% Isopropylchlorid

Anwendungen der Papierchromatographie in der Aminosäureanalyse: Konstitutionsermittlung von Faserproteinen:

Beispiel Seide siehe POLSON und Mitarbeiter²⁸. Es wurden in der Seide folgende Aminosäuren gefunden: Arginin, Glycin, Serin, Alanin, Prolin, Calin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Methionin, Histidin, Threonin.

Beispiel Wolle siehe ZAHN²⁹.

γ -Aminobuttersäure in Hefe-Extrakten³⁰ und im Gehirn.

Aminosäurestoffwechsel bei Tieren im gesunden und kranken Zustand³¹.

N-Stoffwechsel von Bakterien³².

Aminosäure-Stoffwechsel des Harns³³.

Aminosäurezusammensetzung des Schlangengiftes Crotoxin³⁴.

Papierchromatographie der Peptide

Allgemeines. Peptide lassen sich direkt, ähnlich wie Aminosäuren, trennen oder als Hydrolysate. Bereits 1951 gaben HEYNS und Mitarbeiter³⁵ eine Trennung von Acylderivaten einheitlicher Peptide aus Gelatinehydrolysaten. Besser noch als die substituierten Peptide lassen sich unsubstituierte trennen, vor allem im Phenol-Wasser-Chromatogramm sowie auch im Pyridin-Isoamylalkohol-Chromatogramm. Englische Wissenschaftler in Leeds³⁶ konnten eine Anzahl niedriger molekularer Peptide aus unvollständig hydrolysierten Proteinen und höhermolekularen Peptiden isolieren und identifizieren.

Z. B. konnten aus Gramicidin S vier Di- und zwei Tripeptide isoliert werden. Es handelte sich um ein Cyclopeptid, in dem wahrscheinlich die Aminosäurefolge: 1-Valyl-1-Ornithyl-1-Leucyl-*d*-Phenylalanyl-1-Propylzweimal vorkommt.

Die partielle Hydrolyse geschah durch Stehenlassen einer 1,2prozentigen Lösung von Gramicidin in Eisessig/10-n HCl = 1:1 bei 37°C. Anschließend wurden die Spaltstücke im zweidimensionalen Chromatogramm analysiert. Die Peptide neigten dabei etwas zur Schwanzbildung, ließen sich aber trotzdem klar trennen.

Eine Anzahl saurer Di- und einiger Tripeptide konnten MARTIN³⁷ u. a. als Wollhydrolysate trennen. Sie erhielten folgende Dipeptide:

Asparagyl-Alanin	Alanyl	-Glutaminsäure
» -Valin	Leucyl	- »
» -Leucin	Seryl	- »
» -Glutaminsäure	Tyrosyl	- »
Glutamyl-Glycin	Cysteinyl	- »
» -Alanin	Cysteinyl	-Alanin
» -Glutaminsäure	Glycyl	-Cysteinsäure
Alanyl -Asparaginsäure	Alanyl	- »
Valyl - »	Threonyl	- »
Leucyl - »	Cysteinyl	-Valin
Glutamyl - »	»	-Leucin
Seryl - »	Leucyl	-Cysteinsäure
Glycyl -Glutaminsäure	Phenylalanyl-	- »

SANGER³⁸ klärte 1951 die Struktur des Insulins auf. Durch Oxydation von Insulin mit Perameisensäure wurde das Molekül unter Sprengung bestimmter SS-Brücken zwischen Cystinresten gespalten. Aus dem Reaktionsprodukt ließen sich zwei Fraktionen isolieren, A und B, von denen die A-Fraktion einen Glycylrest, die B-Fraktion einen Phenylalanylrest aufwies.

Aus der Fraktion B ließen sich eine Anzahl Di-, Tri- und höhere Peptide papierchromatographisch ermitteln. Im Verfolg dieser Arbeiten, die in mehreren Versuchsreihen über zwischengeschaltete Fraktionierungen an Austausch- und Aktivkohlesäulen verliefen, ergab sich schließlich für die Fraktion B folgende wahrscheinliche Aminosäurefolge:

Konstitutionsermittlung des Insulins

Aminosäurefolge der «Fraktion B» nach SANGER: Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. Cy. Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu.

Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. Cy. Gly. Glu. Arg. Gly. Phe.
Phe. Tyr. Thr. Pro. Lys. Ala.

Aminosäuregehalt des Insulins (L. F. FIESER und MARY FIESER, *Lehrbuch der organischen Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim 1955, S. 473):

30 g Leucin
12 g Cystein und Cystin
1 g Phenylalanin
10 g Prolin
4 g Serin
3 g Threonin
12 g Tyrosin
21 g Glutaminsäure
3 g Arginin
2 g Lysin
4 g Histidin

Summe: 102 g, da die Aminosäuren z. T. hydratisiert sind.

Wie MARTIN³⁹ und späterhin auch PARDEE⁴⁰ zeigten, können die mutmaßlichen R_F -Werte von Peptiden aus denjenigen der sie aufbauenden Aminosäuren errechnet werden, was wiederum als Anhalt für den Aminosäureaufbau eines Peptids dienen kann.

Zur Strukturanalyse von getrennten einheitlichen Peptiden sind eine Anzahl von Methoden vorgeschlagen worden:

1. Endgruppenbestimmung durch Desaminierung. Vor allem für kleinere Peptide. Man macht zwei zweidimensionale Chro-

matogramme, von denen die Eluate des ersten vollständig hydrolysiert und die Aminosäurezusammensetzung bestimmt wird. Die Eluate des zweiten werden mit NOCl desaminiert (HNO_2), wodurch wie üblich endständiges NH_2 durch OH -ersetzt wird. Da die entstandene Oxyssäure nicht mit Ninhydrin reagiert, war die verschwundene die endständige.

2. *Endgruppenbestimmung als DNP-Derivate*. Auch kann man die Endgruppen mit Dinitrofluorbenzol kondensieren und die entstandenen DNP-Derivate wie üblich chromatographieren.

Papier

Wie üblich, nichts Besonderes. Meist werden Whatman 1, Schleicher & Schüll Nr. 2043 b und a empfohlen.

Fließmittel für die Papierchromatographie der Peptide

Vorwiegend Phenol, mit 0,3 % Ammoniak, *m*-Kresol desgleichen, Collidin desgleichen, oft mit Leuchtgas gesättigt.

Bei zweidimensionalem Arbeiten ist die zweite Richtung oft *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5.

Identifizierung

Fast immer Ninhydrin in wassergesättigtem *n*-Butanol.

Papierchromatographie der Proteine

Allgemeines: Diese Methode wird bislang nicht oft routinemäßig durchgeführt, aus folgenden Gründen:

1. Proteine haben sehr nahe beieinanderliegende R_F -Werte, sind also relativ schlecht differenzierbar und schwer beweglich.
2. Die Papierelektrophorese hat gerade hier so gute Erfolge erzielt, daß in vielen Fällen die chromatographische Trennung uninteressant ist. Die Ausnutzung der Beweglichkeit von Proteinen im elektrischen Feld ist günstiger.
3. Jedes Protein verlangt neue chromatographische Methoden.

Es liegen bislang einige Erfahrungen vor auf folgenden Gebieten:

Enzyme,
Hämoglobine,
Serumproteine.

Angewandte Mengen: Durchweg je 20 Mikrogramm für ein Protein.

Papier: wie üblich, chromatographische Papiere, ohne Vorbehandlung, hier und da auch nach vorheriger Pufferung.

Fließmittelsysteme: Organische Fließmittelsysteme aus Alkohol und Wasser, oft auch Aceton/Wasser, meistens gepuffert. Auch Pufferlösungen allein.

Identifizierung: Fast allgemein anwendbar ist die Reaktion nach REINDEL und HOPPE, d. h. der Nachweis mit Chlor und Benzidin. Für Enzyme kommt durchweg der Plattentest in Anwendung, d. h. die Prüfung des Chromatogramms mit Hilfe geeigneter Substrate, auf die das betreffende Enzym anspricht.

Literatur siehe S. 221

Methode: Z. B. Das Chromatogramm wurde auf einem Filterpapierstreifen $1,4 \times 12$ cm gelaufen. Nach entsprechender Zeit nimmt man den Papierstreifen aus der Apparatur, markiert die Fließmittelfront, trocknet bei Raumtemperatur und legt das Chromatogramm dann auf eine dünne Agarschicht, die das Substrat enthält. Nach 2 bis 8 Stunden hat das Enzym das Substrat hydrolysiert, man feuchtet dann die Agarschicht mit einem geeigneten Reagens an, das mit den Hydrolysenprodukten Farbe erzeugt.

Anwendungsbeispiele

A. Amylasen⁴¹

Fließmittelsysteme: Aceton/Wasser = 1 : 1, 3 : 1 oder 7 : 3, 0,33 mol NaCl, 30–35 prozentige Ammoniumsulfatlösung vom pH 6,4, 3 mol NaCl.

Entwicklungstemperatur: 0–5 °C.

Nachweis: 2% lösliche Stärke in gepuffertem 2prozentigem Agar. Man beläßt bei 65 °C für 2 Stunden, gibt dann LUGOLsche Lösung hinzu und stellt fest, wo die Stärke durch Hydrolyse zerstört wurde.

*B. Cellulasen*⁴²: Man tränkt das chromatographische Papier mit Zein (Maisprotein ohne Lysin und Tryptophan), in 75 % Äthanol, mit HCl auf pH 4 eingestellt, und trocknet an der Luft.

Fließmittel: 0,3 mol NaCl in 0,05 mol Natriumcitratpuffer vom pH 5,4 oder Aceton/Wasser = 1 : 1.

Nachweis: 0,5prozentige Lösung von Carboxymethylcellulose. Es bilden sich reduzierende Substanzen, die nachweisbar sind.

C. Peroxydase⁴³:

Fließmittel: Aceton/Wasser = 6 : 4, 8 : 2, gepuffert mit 0,01 mol Citrat-Phosphat bei pH 5,8 oder 6.

Nachweis: Gesättigte wäßrige Guajakollösung, die 5 Vol.% eines 30prozentigen Wasserstoffsperoxyds enthält.

D. Proteinasen⁴⁴:

Fließmittel: 30–35 % Ammoniumsulfat, auf pH 6,4 gepuffert.

Nachweis: 1. Caseinlösung: 2% in 2% Agar. Man entwickelt 1 bis 16 Stunden bei 45 °C und sprüht dann mit verdünnter alkoholischer Gentianaviolettlösung, darauf mit LUGOLscher Lösung. – 2. Durch Hydrolyse der Gelatine eines Filmstreifens. Ein unbelichteter Filmstreifen von den Ausmaßen des Chromatogramms wird mit *m*/15 Phosphatpuffer nach SÖRENSEN vom pH 6,8 besprüht und so aufgequollen. Das Chromatogramm wird aufgelegt und auch mit Puffer gut befeuchtet. Eine Stunde lang in einer feuchten Kammer bei 30 °C belassen. Die Gelatine verflüssigt sich dort, wo die Proteinase auf dem Chromatogramm sitzen. Beim Durchleuchten des Filmstreifens läßt sich der Ort der Proteinase lokalisieren.

E. Phosphatase⁴⁵:

Fließmittel: Wie bei den anderen Enzymen.

Identifizierung: 2prozentige Agarplatte, die 3% Pufferlösung und 0,1% Natriumphenolphthaleinphosphat enthält. An den hydrolysierten Stellen zeigen sich rote Flecken.

Anwendung in der Praxis: Herstellung von Enzymextrakten aus Pflanzen durch Zerkleinerung und Extraktion der Pflanzenteile durch geeignete Pufferlösungen, um Säuerung zu vermeiden. Arbeiten bei niedrigen Temperaturen ist notwendig. Die Einengung der Extrakte erfolgt zweckmäßigerweise durch Gefriertrocknung.

F. Hämoglobin⁴⁶:

Fließmittel: Natriumacetat-Veronalpuffer vom pH 4,3, auch bei zweidimensionaler Arbeit: 1. Dimension: Molare Zuckerlösung; 2. Dimension: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 20 : 3 : 75.

Pyridin, beim Rundfilterchromatogramm. Das Pyridin wird tropfenweise auf das Zentrum aufgetropft.

G. Serumproteine⁴⁷: Das Serum wird mit Wasser 1 : 9 verdünnt.

Fließmittel: Wassergesättigtes *n*-Butanol/wassergesättigtes Natriumdodekansulfonat/*n*-Butanol = 20:10:0,8, auf den pH-Wert 6,5 bis 6,8 eingestellt. Oder: Wassergesättigtes *n*-Butanol/wassergesättigtes Natriumdodekansulfonat/*n*-Propanol = 4:2:1, auf pH 6,8 bis 7,0 eingestellt, also bei Anwesenheit kapillaraktiver Stoffe. Ringchromatogramm: Die Trennung erfolgt in 15 min (ZIMMERMANN, 1953).

Literatur

- ¹ R. CONSDEN, A. H. GORDON und A. I. P. MARTIN, *Biochem. J.* 38 (1944) 224.
- ² R. J. BLOCK, *Arch. Biochim. Biophys.* 31 (1951) 266.
- ³ R. J. BLOCK, *Arch. Biochim. Biophys.* 31 (1951) 266.
- ⁴ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 82, New York 1955.
- ⁵ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 82, New York 1955.
- ⁶ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 83, New York 1955.
- ⁷ C. E. DENT, W. STEPKA und F. C. STEWARD, *Nature* 160 (1947) 683.
- ⁸ I. AWAPARA, *Arch. Biochem.* 19 (1948) 172.
- ⁹ R. R. REDFIELD, *Biochim. Biophys. Acta* 10 (1953) 344.
- ¹⁰ K. A. PIEZ, E. P. TOOPER und L. S. FOSDICK, *J. Biol. Chem.* 194 (1952) 669.
- ¹¹ W. H. STEIN und S. MOORE, *J. Biol. Chem.* 190 (1951) 105.
- ¹² R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 76, New York 1955.
- ¹³ J. B. JEPSON und I. SMITH, *Nature* 172 (1933) 1100.
- ¹⁴ TH. WIELAND und E. KAWERAU, *Nature* 168 (1951) 77.
- ¹⁵ J. BARROILLIER, *Naturwiss.* 42 (1955) 416.
- ¹⁶ *Physiologische Chemie*, herausgegeben von B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ, Bd. I, S. 517, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1951.
- ¹⁷ F. REINDEL und W. HOPPE, *Naturwiss.* 40 (1953) 221.
- ¹⁸ J. SMITH, *Nature* 171 (1953) 43.
- ¹⁹ D. MÜTING, *Naturwiss.* 39 (1952) 303.
- ²⁰ K. V. GIRI und A. NAGABUSHANAN, *Naturwiss.* 39 (1952) 548.
- ²¹ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 91, New York 1955.
- ²² R. ACHER und C. CROCKER, *Biochim. Biophys. Acta* 9 (1952) 704.
- ²³ F. G. FISCHER und H. DÖRFEL, *Z. physiol. Chem.* 297 (1954) 278.
- ²⁴ C. E. DALGLIESH, *J. Chem. Soc.* 1952, 3940; *Biochem. J.* 52 (1952) 3.
- ²⁵ M. JUTISZ, *Bull. Soc. Chim. France* 1952, 821.
- ²⁶ C. E. DENT, *Biochem. J.* 43 (1948) 168.
- ²⁷ K. FELIX und A. KREKELS, *Z. physiol. Chem.* 290 (1952) 78.
- ²⁸ A. POLSON, V. G. MOSLEY und W. C. WYKOFF, *Science* 105 (1947) 603.
- ²⁹ H. ZAHN, *Melliand Textilber.* 31 (1950) 481.
- ³⁰ J. AWAPARA, A. J. LANDUA, R. FUERST und B. SEALE, *J. Biol. Chem.* 187 (1950) 35.
- ³¹ C. E. DENT, *Biochem. Soc. Symposia* 3 (1950) 39.
- ³² C. GUTINELLI, G. EHRENSVÄRD, L. REIO u. a., *Acta Chem. Scand.* 5 (1951) 353.
- ³³ H. R. CRUMPLER, E. C. DENT, H. HARRIS und R. G. WESTALL, *Nature* 167 (1951) 307. E. WORK, *Biochim. Biophys. Acta* 3 (1949) 400.
- ³⁴ C. E. DENT, *Biochem. Soc. Symposia* 3 (1950) 39.
- ³⁵ K. H. SLOTTA und J. PRIMOSICH, *Nature* 168 (1951) 696.
- ³⁶ K. HEYNS, G. ANDERS und E. BECKER, *Z. physiol. Chem.* 287 (1951) 120.
- ³⁷ R. CONSDEN, A. H. GORDON und A. I. P. MARTIN, *Biochem. J.* 41 (1947) 590.
- ³⁸ A. I. P. MARTIN, *Fibrous Proteins*, Bradford, Society of Dyers and Colorists 1946.

³⁸ F. SANGER, *Biochem. J.* 45 (1949) 563. F. SANGER und H. TUPPY, *Biochem. J.* 49 (1951) 463, 481.

³⁹ A. I. P. MARTIN, *Biochem. Soc. Symposia* 3 (1949) 4.

⁴⁰ A. B. PARDEE, *J. Biol. Chem.* 190 (1951) 757.

⁴¹ J. J. M. JONES und S. E. MICHAEL, *Nature* 165 (1950) 685. W. W. REID, *Nature* 166 (1950) 569.

⁴² R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 124, New York 1955.

⁴³ J. M. GILLESPIE, M. A. JERMYN und E. F. WOODS, *Nature* 169 (1952) 487.

⁴⁴ P. SIMONART und K. Y. SHOW, *Enzymologia* 14 (1951) 356; *Chem. Abstr.* 47 (1953) 3358.

⁴⁵ K. V. GIRI, A. L. N. PRASAD, S. G. DEVI und J. S. RAM, *Biochem. J.* 51 (1952) 123.

⁴⁶ J. KRUH, J. C. DREYFUS und G. SCHAPIRA, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34 (1952) 773. M. A. ANDERSCH, *Federation Proc.* 12 (1953) 168. G. SANSONE und F. CUSMANO, *Chem. Abstr.* 46 (1952) 6176.

⁴⁷ G. ZIMMERMANN und K. H. KLUDAS, *Chem. Techn. (Berlin)* 5 (1953) 203.

2. Antibiotika (Hemmstoffe)*Allgemeines*

Die Trennung der Antibiotika bietet insofern Neues, als sie einen Spezialnachweis gestatten durch Kombination mit biologischen Testen, vor allem mit Plattenkulturen der Bakterien, auf die das betreffende Erzeugnis anspricht (Weiteres siehe unter Identifizierung). Die verwendeten Fließmittel sind überwiegend die gleichen, wie man sie auch sonst zur Papierchromatographie benutzt, nur gibt man hier und da Stoffe zu, welche mit dem betreffenden Antibiotikum reagieren und daher oft die Trennung erleichtern, z. B. *p*-Toluolsulfosäure oder *m*-Kresotinsäure, sogenannte Lösungsvermittler bei der Trennung von Streptomycin und verwandten Stoffen¹.

Die Technik benutzt Streifenchromatogramme oder Rundfilterchromatogramme, aus denen Streifen zur Identifizierung auf Platten herausgeschnitten werden. Das Rundfilterchromatogramm ist im allgemeinen vorzuziehen, da es schärfere Trennungen ergibt.

Es wurden bereits u. a. folgende Antibiotika mit Erfolg papierchromatographisch bearbeitet: Streptomycine, Chloromycetin und seine Zersetzungsprodukte, Aureomycin, Terramycin, Actinomycin, Tetracycline.

Angewendete Mengen

Die zu Trennungszwecken benutzten Stoffmengen richten sich naturgemäß, wie immer, nach der Schärfe und Art der Nachweismethode. Die Mengen müssen so beschaffen sein, daß die Einzelkomponenten noch gut nachweisbar sind. Beim mikrobiologischen Test sind 1 bis 2 Penicillineinheiten (1 I.E. = 0,6 γ krist. Penicillin G), 3 bis 12 Einheiten an Streptomycin und verwandten Stoffen notwendig. Farbreaktionen erfordern 5 bis 20 γ je Flecken².

Man stellt Stammlösungen der Leitchromatogramme mit 100 Einheiten pro ml in 1 prozentigem Phosphatpuffer vom pH 6,9 her³, von denen man 2 bis 5 Mikroliter aufträgt. Damit zu vergleichende Rohpenicillinlösungen sollen ähnliche Konzentrationen haben, bei Streptomycinen soll diese bei 300 bis 12000 Einheiten pro ml liegen.

Literatur siehe S. 223

Tab. 22. Fließmittel zur Trennung von Antibiotika

Fließmittelgemisch	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Äther, wassergesättigt	X								
Amylacetat, wassergesättigt	X								
Äthylacetat, wassergesättigt		X							
<i>n</i> -Butanol (wassergesättigt)/Piperidin/ <i>p</i> -Toluolsulfosäure = 98 : 2 : 2 (v/v/g)			X						
<i>n</i> -Butanol (wassergesättigt)/ <i>p</i> -Toluolsulfosäure 98 : 2 (v/g) <i>n</i> -Butanol/Wasser/Methanol/ <i>p</i> -Toluolsulfosäure = 40 : 20 : 10 : 1 (v/v/v/g)			X	X					
<i>n</i> -Butanol/Wasser/Methanol/Methylorange = 40 : 20 : 10 : 1,5 <i>n</i> -Butanol/Eisessig/Wasser = 495 : 10 : 495 (organische Phase)			X						
<i>n</i> -Butanol/Wasser/Methanol/Methylorange = 40 : 20 : 10 : 1,5 <i>n</i> -Butanol/Eisessig/Wasser = 495 : 10 : 495 (organische Phase)			X						
<i>n</i> -Butanol/Wasser/Methanol/Methylorange = 40 : 20 : 10 : 1,5 <i>n</i> -Butanol/Eisessig/Wasser = 495 : 10 : 495 (organische Phase)		X							
<i>n</i> -Butanol, wassergesättigt/Eisessig = 975 : 25						X			
<i>n</i> -Butanol/Phenol/Pyridin = 95,5 : 2,5 : 2						X			
Methanol/Aceton/Wasser = 19 : 6 : 75								X	
<i>n</i> -Dibutyläther/Äthylacetat/2prozentige Naphtalin- β -sulfo- säure = 3 : 1 : 4									X
<i>n</i> -Dibutyläther/10 % wäßriges Na-naphtalin-1,6-disulfonat (organische Phase)									X
<i>n</i> -Butanol, wassergesättigt					X		X		
Ammoniumchlorid, 3 % wäßrig			X						

1 = Penicilline 4 = Neomycin 7 = Circulin
2 = Tetracycline 5 = Polymyxin 8 = Erythromycine
3 = Streptomycine 6 = Chloromycetin 9 = Actinomycine

Klare Hemmhöfe im mikrobiologischen Test erzielt man noch bei 0,2 bis 0,5 Einheiten pro Flecken.

Papier

Wie üblich, oft durch Vorbehandlung mit Puffern auf einen bestimmten pH-Wert gebracht; vor allem Phosphatpuffer werden empfohlen von durchweg saurem pH zwischen 2,5 und 7 je nach Art der zu trennenden Substanzen⁴. Vor allem bei der Trennung der Penicilline ist gute Feuchtung der Papiere vor dem eigentlichen Chromatographieren unerlässlich. Man kann dabei die Atmosphäre innerhalb der chromatographischen Apparatur durch Einsetzen geeigneter Salzlösungen auf einen bestimmten Feuchtgehalt einstellen. Die Papiere sollen 15 Stunden mit Wasserdampf gesättigt werden.

Auch Vortränkung des Papiers mit Formamid oder Propylenglykol wird empfohlen.

Früher arbeitete man bei Temperaturen von 4 bis 5 °C⁵. Die Trennung läßt sich jedoch auch bei Normaltemperaturen durchführen⁶.

Fließmittel

Wie bereits erwähnt, gibt man oft Zusätze zu, welche die Löslichkeit der einzelnen Antibiotika beeinflussen und ihre Trennung erleichtern.

Geeignete Fließmittel für die Trennung der Antibiotika siehe Tab. 22.

Identifizierung

1. Durch Plattenteste, d. h. Bildung von Hemmzonen auf Kulturen geeigneter Bakterien.
2. Durch Farbreaktionen und Fluoreszenznachweis.

Literatur siehe S. 223

Auf R_F -Werte legt man vor allem bei den Penicillinen wenig Wert, man nimmt statt dessen sogenannte Positionskonstanten, d. h. Bezugswerte zur Lage bekannter und wohldefinierter Penicilline. Besonders wichtig ist natürlich die Herstellung der Platten⁸.

Geeignete Nährböden:

1. *Streptomyces*-Antibiotika:

Pepton	6 g
Beef-Extrakt	1,5 g
Hefe-Extrakt	3,0 g
Agar	15,0 g

Destilliertes Wasser 1000 ml. pH nach Sterilisation 7,9 $\pm$ 0,1.

2. *Penicillin*:

Glucose	1,0 g
Fleischextrakt	1,5 g
Bakto-Pepton	6,0 g
Hefe-Extrakt	3,0 g
Agar	15,0 g

Destilliertes Wasser 1000 ml. pH-Wert vor der Sterilisation auf 6,5 bis 6,6 einstellen.

3. Allgemein brauchbarer Plattentest:

Oxo, Lab, Lemco (Fleischextrakt)	3,0 g
Pepton Ciba B	5,0 g
Kochsalz	2,5 g
Agar	15,0 g

Brunnenwasser 1000 ml. pH-Wert vor der Sterilisation auf 7,2 einstellen.

Benutzte Testorganismen:

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia Coli</i>
<i>Bacillus megathericus</i>	<i>Candida vulgaris</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	und andere.

Anwendung des Plattentestes: Nach Beendigung der chromatographischen Trennung legt man die Papierstreifen auf die Testplatten und gibt wechselnde Zeiten in den Kühlraum, worauf man das Chromatogramm entfernt. Anschließend wird 12 bis 17 Stunden bei 30 bis 37°C entwickelt. Man legt die Platten auf hochempfindliche Filme und stellt somit eine Kontaktphotographie her.

Farbreaktionen:

Für Streptomycine

Sakaguchi-Reaktion⁹. Sprühen des Chromatogramms mit einer 0,25 prozentigen Lösung von α -Naphthol in 0,5 prozentiger NaOH. Nach 2 Minuten wird das Papier mit einer äthanolischen Lösung von Natriumhypochlorit (1 : 1) besprüht. Streptomycin zeigt sich als leuchtend roter Fleck. Bis zu 10 Mikrogramm herab nachweisbar.

Elson-Morgan-Test¹⁰. Lösung A: 5 ml einer 50prozentigen alkoholischen KOH-Lösung, gemischt mit 100 ml einer 1prozentigen Acetylacetonlösung in *n*-Butanol, Mischung erst kurz vor Gebrauch herstellen. – Lösung B: 0,5 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 15 ml Äthanol lösen und 7 ml konz. HCl zufügen. Dazu 90 ml *n*-Butanol. – Chromatogramm mit Lösung A sprühen, 5 min auf 100°C erhitzen. Nach dem Abkühlen mit Lösung B sprühen. Wieder Erhitzen auf 100°C für 2–3 min. Blaßrote Flecken.

Diacetylreagens¹⁰. Gleiche Volumina einer 0,1prozentigen wäßrigen Diacetylösung, 20prozentiger wäßriger KOH- und 2,5prozentiger alkoholischer α -Naphthollösung mischen (kurz vor Gebrauch). Sprühen, bei Raumtemperatur belassen. Blaßrote Flecken bei mindestens 5 Mikrogramm Streptomycin.

Für Chloromycetin, Chloramphenicol und Abbauprodukte

Nitrotest¹¹. Lösung A: 3 ml einer 15prozentigen SnCl_2 -Lösung mit 15 ml konz. HCl mischen und mit 180 ml dest. Wasser verdünnen. – Lösung B: 1 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd lösen in einer Mischung aus 30 ml Äthanol, 3 ml konz. HCl und 180 ml *n*-Butanol.

Sprühen mit der frisch bereiteten Lösung A, an der Luft trocknen. Sprühen mit B, an der Luft trocknen. Nach 5 min hellgelbe Flecken bei Anwesenheit von mindestens 5 Mikrogramm.

Für Neomycine, Circulin, Polymyxine

Ninhydrin¹². Stammlösung: 2 g Ninhydrin in 50 ml Wasser unter Erwärmen lösen. Dazu 80 mg $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 50 ml Wasser. 24 Stunden im Dunkeln stehen lassen. Filtrieren, im Kühlschrank aufbewahren. – Farbreagens: 25 ml Stammlösung, zu 50 ml mit Wasser verdünnen und 450 ml Isopropanol hinzufügen.

Für Tetracycline

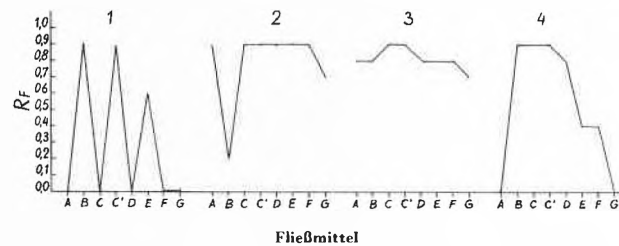
Salzsaurer *p*-Dimethylaminobenzaldehyd. 2prozentig in 1,2-*n*-HCl sprühen, 5 bis 8 Stunden bei Raumtemperatur belassen. – Aureomycin (Chlorotetracyclin) und Achromycin (Tetracyclin) schmutzig gelb, Terramycin (Hydrotetracyclin) blaugrün. Nachweise bis zu 5 Mikrogramm.

Fluoreszenznachweise: Tetracycline fluoreszieren direkt im UV-Licht. Streptomycin nach Behandlung mit einer Lösung von 0,5 g Naphtoresorcin in 225 ml Äthanol und 25 ml konz. *o*-Phosphorsäure. Sprühen, 1 bis 2 min bei 100°C erhitzen, bis der Untergrund schwach rötlich ist. Untere Erfassungsgrenze 5 Mikrogramm¹³.

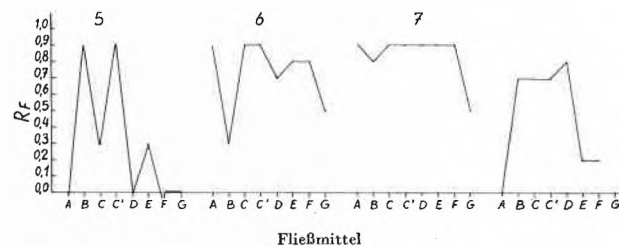
Sammelchromatogramme

Zur Erfassung der Antibiotika sind sogenannte *Sammelchromatogramme* besonders nützlich. Mit Hilfe folgender Fließmittel stellt man eine Anzahl von Chromato-

grammen der zu prüfenden Substanz her, die sich durch kurze Laufzeit auszeichnen:



1 Streptomycin, 2 Actinomycin, 3 Xanthomycin, 4 Grisein, 5 Streptothricin, 6 Aureothricin, 7 Chloromycetin, 8 Orientmycin



A wassergesättigtes *n*-Butanol; B 3% NH_4Cl ; C wassergesättigtes Phenol (80%); C' desgl. in NH_3 -Atmosphäre; D 50% wäßriges Aceton; E 40 ml *n*-Butanol, 10 ml CH_3OH , 20 ml H_2O , 1,5 g Methylorange; F 40 ml *n*-Butanol, 10 ml CH_3OH , 20 ml H_2O ; G 80 ml Benzol, 20 ml CH_3OH

Abb. 1. Sammelchromatogramme

Streifen 15×1 cm, Reagensglasmethode etwa wie nach DUNN. Entwicklung $\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden, je nach Viskosität des Fließmittels. Mikrobiologische Auswertung.

Anwendungsgebiete: Außer der wissenschaftlichen Forschung dient die Methode der Papierchromatographie vor allem der Betriebskontrolle in der Penicillinfabrik usw. Sie ist heute auf diesem Gebiet bereits die Methode geworden.

Literatur

- ¹ Medizin und Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1956. E. SCHMIDT-KASTNER, *Naturwiss.* 43 (1956) 131.
- ² H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 181, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955.
- ³ R. G. KLUENER, *J. Bacteriol.* 57 (1949) 101.
- ⁴ M. L. KARNOVSKY und M. J. JOHNSON, *Anal. Chem.* 21 (1949) 1125, ref. in *Angew. Chem.* 62 (1950) 128.
- ⁵ R. R. GOODALL und A. L. LEVI, *Nature* 158 (1946) 675.
- ⁶ G. A. GLISTER und A. GRAINGER, *Analyst* 75 (1950) 310. W. A. WINSTEN und A. H. SPARK, *Science* 106 (1947) 192.
- ⁷ H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 183, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955.
- ⁸ H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 186, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955.
- ⁹ R. E. HORNE und A. L. POLLARD, *J. Bacteriol.* 55 (1948) 231.
- ¹⁰ M. C. FOSTER und G. C. ASHTON, *Nature* 172 (1953) 958.
- ¹¹ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 291, New York 1955.
- ¹² H. BROCKMANN, G. BOHNSACK und H. GRÜNE, *Naturwiss.* 40 (1953) 223.
- ¹³ M. C. FOSTER und G. C. ASHTON, *Nature* 172 (1953) 958.

3. Vitamine (Wirkstoffe)

Allgemeines

Die Papierchromatographie der Vitamine verlangt weitgehend vorbehandelte Papiere, sei es, daß die Vitamine wasserunlöslich sind, also nach den Methoden der «reversed phase chromatography» gearbeitet werden muß, oder daß Adsorptionschromatographie eher zum Ziele führt als reine Verteilungsmethoden, oder daß eine besondere Reinheit in bezug auf Metallionen gefordert werden muß.

Wäßrige Pflanzenextrakte brauchen meist nicht weiter gereinigt zu werden; man kann sie sofort auftragen und in ihnen die wasserlöslichen Vitamine ermitteln, was oft auch im mikrobiologischen Test geschieht¹.

Fließmittel

Diese richten sich danach, ob man im umgekehrten Verfahren arbeitet, also mehr oder weniger polare Lösungsmittel benötigt, oder auf normalen nicht vorbehandelten Papieren. Sie werden noch bei den einzelnen Stoffgruppen besprochen. Als allgemeine Regel kann man anführen, daß man solche Lösungsmittel vermeiden soll, welche beim häufig benutzten mikrobiologischen Test toxisch wirken, also vor allem Phenole und Kresole.

Papiere

Sie sollen ebenfalls bei den einzelnen Stoffgruppen besprochen werden.

Einzelne Gruppen:

Vitamin A und aktive Carotinoide

1 Mikrogramm pro Fleck an Substanz ist notwendig, um die Substanzen noch nachweisen zu können. Es wird auf Aluminiumoxydpapier² gearbeitet, das folgendermaßen hergestellt wird:

Ein ziemlich festes Papier wird durch eine Lösung von 65 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ pro Liter gezogen. Den Überfluß läßt man abtropfen, dann wird das Papier in 2-n Ammoniak eingelegt, in dem es eine Zeitlang – am besten über Nacht – liegen bleiben soll, um Ausfällung des Aluminiumoxydhydrats auch in den inneren Papierschichten zu erzielen. Mindestens 5 Stunden in Wasser waschen und trocknen. Auch kann man ein mit 10-prozentiger Silikone in Methylenchlorid getränktes bzw. ein in gleicher Art mit Silikone-Hahnenfett behandeltes und bei 50°C getrocknetes Papier benutzen³.

Als Fließmittel dienen Gemische von Acetonitril und Wasser³ sowie für Aluminiumoxydpapier wassergesättigter hochsiedender Petroläther (80 bis 100°C). Die Identifizierung erfolgt mit CARR-PRICE-Reagens, d. h. einer gesättigten Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform, das unbedingt alkoholfrei sein muß. Andernfalls muß das Chloroform erst mit Wasser gewaschen und wieder scharf getrocknet werden. Zu den Eluatien kann man CARR-PRICE-Reagens zufügen und photoelektrisch kolorimetrieren bei 620 m μ .

Literatur siehe S. 226

Vitamin-B-Komplex

Thiamin, Riboflavin, Nicotinamid und Pyridoxinhydrochlorid, also wasserlösliche, auch synthetisch hergestellte Vitamine, wurden von BROWN und MARSH⁴ in einer roten Kammer, um Zersetzungen am Licht zu vermeiden, mit Butanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 40 : 5 : 55 getrennt, wovon die organische obere Phase nach dem Absetzen benutzt wurde.

Für Thiamin vor allem empfiehlt sich die Anwendung von Papieren, die vorher mit Lösungen von geeigneten Komplexonen gewaschen wurden, um Störungen durch Zersetzung infolge Anwesenheit von Metallspuren zu vermeiden. 0,2-prozentige Lösungen genügen.

MARTEN und GASSMANN⁵ arbeiteten zur Vermeidung der Oxydation in Stickstoff-, Kohlendioxid- oder Schwefelwasserstoff-Atmosphäre. Sie benutzten das Rundfilterverfahren mit Papier 2045b und einem Gemisch von *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5 als Fließmittel zur Reinheitsprüfung von synthetischem Thiamin auf Synthesezwischenprodukte.

Als Fließmittel werden empfohlen⁶:

für Thiamin und Triphosphothiamin:

n-Butanol/Eisessig/Wasser in verschiedenen Verhältnissen
Äthylacetat/Pyridin/Wasser = 5 : 3 : 2
Isobutanol/Pyridin/Wasser = 3 : 2 : 5
n-Propanol/0,1-n HCl = 2 : 1

Riboflavin:

n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5
n-Propanol/Pyridin/Wasser = 1 : 3 : 1
tert. Butanol/Pyridin/Wasser = 50 : 15 : 35

Nicotinsäure:

n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5
n-Butanol/Aceton/Wasser = 45 : 5 : 50
n-Butanol/Methanol/Benzol/Wasser = 2 : 1 : 1 : 1
n-Butanol, mit 1,5-n NH_3 gesättigt
Isobutanol/Wasser = 1 : 1 und andere

Pantothersäure:

Wassergesättigtes *n*-Butanol

Pyridoxine:

n-Amylalkohol/Aceton/Wasser = 2 : 1 : 2
Isoamylalkohol/Pyridin/Wasser = 2 : 1 : 2

Folsäure und Derivate:

Äthanol/*n*-Butanol/Ammoniak/Wasser = 50 : 15 : 10 : 25
Isopropanol/Ammoniak/Wasser = 7 : 1 : 2
2,4,6-Collidin, mit Wasser gesättigt
Isoamylalkohol mit 5% KH_2PO_4 oder Na_2HPO_4

Cobalamine:

n-Butanol, wassergesättigt
Isopropanol/Wasser = 70 : 30

Identifizierung

Sie erfolgt sehr oft durch mikrobiologischen Test. – Durchführung: Man benutzt zweckmäßigerweise eindimensionale Chromatogramme. Eine Agarplatte geeigneten Durchmessers wird mit der für das spezielle Vitamin geeigneten Bakterienart besät und die Streifen, auch streifenförmige Ausschnitte aus Kreischromato-

Tab. 23. Testorganismen für Vitamine

Testorganismus	B ₁ Aneurin Thiamin	B ₂ Lactoflavin Riboflavin	B ₆ Adernin Pyridoxin	B ₁₂	B _c Folsäure	H Biotin Bios IIb	Pantothen- säure Bios IIa	Inositol Bios I	p-Amino- benzoe- säure	Nicotin- säureamid
<i>Lactobacillus Helv.</i>		X	(X)		(X)	(X)	(X)		(X)	
<i>Lactobacillus arab.</i> 17/5						X	X			X
<i>Lactobacillus fermenti</i> 36	X								(X)	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 535										X
<i>Streptococcus faecalis</i> (lactis ROGERS)			(X)		X	(X)				
<i>Neurospora sitophila</i> (Mutante 299)			X					X		
<i>Neurospora crassa</i> (Mutante 37401)										
<i>Neurospora crassa</i> (Mutante 1633)									X	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> F. B.	(X)					(X)				
<i>Saccharomyces carlsbergiensis</i> 4228			(X)				(X)			
<i>Escherichia Coli</i> , Stamm 273/384									(X)	
<i>Escherichia Coli</i> , Stamm 303/138										(X)
<i>Lactobacillus Leichmannii lactis</i> LLD				X						

X = sehr geeignet (X) = geeignet, weniger benutzt

grammen, für etwa 5 min aufgelegt¹. Dann läßt man über Nacht bei Optimaltemperatur, also zwischen 27 und 37°C, je nach Bakterienart, entwickeln. Dort, wo die Vitamine sich befinden, findet Bakterienwachstum statt. Durch Kontaktphotographie kann man auch Dokumente anfertigen. Sprüht man die Flecken mit verdünnter Glucose-Triphenyltetrazoliumchloridlösung, so werden die Stellen, wo die Bakterien Lebenstätigkeit entfalten, durch Formazanbildung rot gefärbt⁷. Testorganismen für Vitamine siehe Tab. 23.

Farbreaktionen zum Nachweis der B-Vitamine

Thiamin, Triphosphothiamin

- Alkalische Ferricyanidlösung (Betrachtung im UV-Licht)⁹
- Essigsäureester des p-Aminophenols¹⁰
- Dipikrylamin in ammoniakalischer Lösung¹¹
- Kaliumwismutjodid (auch für Alkaloide)¹²

Riboflavin

- UV-Licht bei Gegenwart von Alkali¹³

Nicotinsäure und Derivate

- Bromcyandampf¹⁴

Pantothenensäure¹⁵

- 0,5 % Natrium-β-Naphtochinon-4-sulfosäure (pH 9,2 bis 9,4) in Natriumtetraaboratlösung (FOLINS Reagens)

Pyridoxine¹⁶

- 2,6-Dichlorchinonchlorimid 0,1% in Benzol
- NH₃-Dämpfe

Folsäure und Derivate¹⁷

- 10 % TiCl₄ in konz. HCl, mit 15 % Natriumcitrat

Cobalamine

- Identifizierung erfolgt praktisch immer durch mikrobiologischen Test

Vitamin C (Ascorbinsäure und verwandte Substanzen)

Allgemeines

Ascorbinsäure ist sehr oxydationsempfindlich; die Fließmittel müssen daher dieser Eigenschaft Rechnung tragen. STROHECKER, HEIMANN und MATT¹⁸ fanden fünf

Fließmittelsysteme heraus, die sich zur quantitativen Bestimmung der Ascorbinsäure eigneten, also möglichst wenig Oxydationsverluste zeigten. Sie seien unter «Fließmittel» erwähnt.

Papier

Nach den vorhin erwähnten Autoren vor allem 2043 b M, das eine günstige Wanderungsgeschwindigkeit und gute Trennmöglichkeiten aufweist.

Angewandte Mengen

Am günstigsten bis 60 Mikroliter einer 1 prozentigen Lösung. Im Grenzfall 20 Mikroliter einer 0,1 prozentigen Lösung. Bei natürlichen Extrakten (Obstsafteextrakten) muß oft eine sehr verdünnte Lösung durch zwischengeschaltete Trocknungen auf dem Papier konzentriert werden.

Fließmittel

Nach STROHECKER und Mitarbeitern¹⁸:

1. n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5 + 2 % an Methylphosphorsäure + eine Spur KCN
2. n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5 + 2 % Oxalsäure + eine Spur KCN
3. n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5 + 2 % Oxalsäure + eine Spur KCN + eine Spur KSCN
4. n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5 + 2 % Oxalsäure + eine Spur KCN + eine Spur Cystein
5. n-Butanol/Wasser = 4 : 6 + 2 % Oxalsäure + eine Spur KCN

Identifizierung

2,6-Dichlorphenolindophenol, 0,8 g in 1 Liter¹⁹ Wasser + 1 Liter Methanol

Ammoniakalische Silbernitratlösung: 10 ml n/5 AgNO₃ in 10 ml 10 % NaOH, dazu Ammoniak tropfenweise bis zur Lösung des Silberniederschlags¹⁹.

Vitamin E (Tocopherole)

Allgemeines

Trennungen erfolgen nach den Verfahren der umgekehrten Phasen, also mit hydrophobierten Papieren und

polaren Fließmittelgemischen und unter Berücksichtigung der leichten Oxydierbarkeit der Vitamin-E-Komponenten. Um Vitamin-E-Komponenten aus Pflanzenölen zu gewinnen, werden diese bei Gegenwart von Pyrogallol verseift, um Oxydationen zu vermeiden. Sterole entfernt man durch Kristallisation aus Methanol bei 15 °C, Carotine durch Behandlung mit Zinnchlorür und Floridin.

Papier

Tränkung mit Lösungen von 2,5% Vaseline in Äther und trocknen, oder mit 3% flüssigem Paraffin in Petroläther (Kp. 40–60 °C), oder mit Silikoneöl bzw. Silikonehahnfett in Methylenchlorid und andere³.

Fließmittel

Äthanol/Wasser 75prozentig

Aceton/Wasser = 8:2

Acetonitril/Wasser in verschiedenen Verdünnungsverhältnissen

Identifizierung

1. 2,2'-Dipyridyl in Äthanol (0,25%)²⁰, anschließend 0,1% FeCl₃ in Äthanol. Nicht haltbare, rote Flecken.
2. 1,7 g AgNO₃ in 50 ml Wasser, 33 ml Methanol und 17 ml Ammoniak ($d = 0,880$). Haltbare dunkelbraune Flecken²⁰.
3. o-Dianisidin, diazotiert, mit 2% Natriumcarbonat²⁰: γ - und δ -Isomere purpur bzw. rot. α - und β -Isomere keine Reaktion.

Literatur

- ¹ C. MARTEN, *Naturwiss.* 41 (1954) 576.
- ² O. P. DATTA, B. G. OVERELL und H. STUCK-DUNNE, *Nature* 164 (1949) 673.
- ³ J. A. BROWN, *Anal. Chem.* 25 (1953) 774.
- ⁴ J. A. BROWN und M. M. MARSH, *Anal. Chem.* 24 (1952) 1952.
- ⁵ G. MARTEN und B. GASSMANN, *Vitamine u. Hormone* 6 (1954) 318.
- ⁶ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, New York 1955.
- ⁷ H. B. WOODRUFF und J. C. FOSTER, *J. Biol. Chem.* 183 (1950) 569.
- ⁸ Nach H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 171, gekürzt, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955.
- ⁹ M. BERAN und V. SICHÖ, *Chem. Listy* 45 (1951) 154. A. ROSSI-FANELLI, N. SILIPRANDI und P. FASELLA, *Science* 116 (1952) 711. H. KRAUT und L. WILDEMANN, *Biochem. Z.* 321 (1951) 368.
- ¹⁰ K. MIGAKI und H. MOMIYAMA, *Chem. Abstr.* 46 (1952) 11296, 9147.
- ¹¹ G. MALYOTH und H. W. STEIN, *Biochem. Z.* 323 (1952) 265.
- ¹² W. BARTLEY, *Biochem. J.* 56 (1954) 379.
- ¹³ A. HEYNDRIK, *J. Amer. Chem. Pharm. Assoc.* 42 (1953) 680.
- ¹⁴ E. KODICEK und K. K. REDDI, *Nature* 168 (1951) 475.
- ¹⁵ E. G. FRAME, J. A. RUSSELL und A. E. WILHELMI, *J. Biol. Chem.* 149 (1943) 255. R. CROCAERT, *Arch. int. Physiol.* 56 (1948) 189.
- ¹⁶ J. Q. SNIDER und S. H. WENDER, *Arch. Biochem. Biophysics* 46 (1953) 465.
- ¹⁷ J. KOMENDA, *Chem. Abstr.* 48 (1953) 3850.
- ¹⁸ W. HEIMANN, R. STROHECKER und F. MATT, *Z. Lebensmitt.-Unters. Forsch.* 97 (1953) 263.
- ¹⁹ L. A. MAPSON und S. M. PARTRIDGE, *Nature* 164 (1949) 479.
- ²⁰ F. BROWN, *Biochem. J.* 51 (1952) 237.

4. Alkaloide

Allgemeines

Nur selten werden die Alkaloide, die zur chromatographischen Untersuchung gelangen, in der Praxis als

Reinsubstanzen vorliegen, sie werden durchweg aus pflanzlichem Material oder aus Körperteilen (Vergiftungsfälle, Süchtigkeit) zu isolieren sein. Im ersten Falle benutzt man meist die leichte Löslichkeit der Alkaloidbasen in organischen Fließmitteln, im letzteren die Löslichkeit der Alkaloidsalze in Wasser. Meist also wird man das Alkaloid aus den zerkleinerten Pflanzenteilen bei Gegenwart von Alkali mit Chloroform oder Äther extrahieren, daraus die Base mit Hilfe von HCl in wäßrige Lösung bringen und dadurch von Chlorophyll und lipophilen Stoffen trennen. Man macht wieder alkalisch und schüttelt das Alkali mit Chloroform aus.

Hier und da läßt sich das zerkleinerte und getrocknete Pflanzenmaterial sofort zur Trennung bringen, indem man das Verfahren nach TÖPPEL¹ einerseits und ERBRING und PATT² andererseits benutzt, das Pflanzenpulver in eine kleine Säule mit Cellulosepulver zusammen gemischt verbringt und diese Säule mit Rundfiltern kombiniert.

JATZKEWITZ³ bringt eine Isolierung und papierchromatographische Trennung basischer Suchtmittel im Harn, die naturgemäß auf Trennung nach Alkaloidgruppen weniger Rücksicht nimmt. Die Isolierung aus Harn ist allgemein anwendbar, und der Arbeit kommt immerhin das große Verdienst zu, bereits früh eine allgemein interessante Anwendung gegeben zu haben.

Isolierung der Suchtmittel aus Harn: 10 ml Harn werden mit verdünnter Sodalösung auf pH 9 bis 10 gebracht. Die freien Alkaloidbasen werden dann in 10 ml Isoamylacetat extrahiert, darauf wird zentrifugiert. Weiterhin fügt man einige Tropfen 15prozentiger Ameisensäure zu, zentrifugiert wieder und erhält so die Alkaloide als wasserlösliche Formiate, die chromatographiert werden, wozu JATZKEWITZ das Papier 2043b benutzte.

Die Papierchromatographie der freien Alkaloidbasen leidet unter ihrer starken Löslichkeit in fast allen organischen Fließmitteln, die R_F -Werte liegen meist bei 1. Die Papierchromatographie der Salze im neutralen Medium führt ebenfalls oft nicht zu guten Erfolgen. Es bilden sich langgezogene Flecken mit starker Schwanzbildung oder verwaschene Streifen. Im neutralen Medium lassen sich nur Alkaloide mit extrem geringer Dissoziationskonstante zwischen 10^{-10} und 10^{-15} trennen, z. B. Colchicin, Piperin, Xanthin, Theobromin, Coffein sowie Alkaloide vom Typ quaternärer Ammoniumverbindungen, etwa Cholin, Neurin, beide mit sehr hoher Dielektrizitätskonstante, über 10^{-3} . Das dürfte sich durch die Tatsache erklären, daß bei beiden Gruppen praktisch nur eine Form vorliegt, nämlich bei den sehr wenig dissoziierten die undissoziierte Form, bei den stark dissoziierten das Ion. Alle übrigen zeigen starke Schwanzbildung.

MUNIER und MACHEBŒUF^{4,5} und später auch BRÄUNIGER unterscheiden vier Basentypen bei den Alkaloiden und studieren zugleich die Auswirkung der Dissoziationskonstante auf das chromatographische Verhalten:

Literatur siehe S. 229

Tab. 24

Natur der Base	Dissoziationskonstante	Vertreter
a) Starke Basen . . .	über 10^{-3}	Cholin, Acetylcholin
b) Mittelstarke Basen .	10^{-3} bis 10^{-7}	Phenanthrengruppe, Opiumalkaloide, Solanaceenalkaloide
c) Schwache Basen . .	10^{-7} bis 10^{-10}	Isochinolingruppe der Opiumalkaloide, Chinaalkaloide
d) Sehr schwache Basen	über 10^{-10}	Colchicin, Piperzin, Xanthinderivate

Die Gruppen a und d lassen sich – wie bereits erwähnt – auch neutral chromatographieren, alle anderen sauer.

In bezug auf die Säurekonzentration des Fließmittels gelten weiterhin zwei Regeln:

1. Je mehr sich die Dissoziationskonstante der Säure von der des Alkaloids unterscheidet, um so höher muß die Säurekonzentration im Fließmittel sein, um scharfe Trennungen zu erzielen.
2. Mit steigender Säurekonzentration des Fließmittels steigen die R_F -Werte, daher finden sich bei sehr hohen Säuregehalten auch hohe R_F -Werte.

Fließmittel

Bei der Trennung der Alkaloide kommt es sehr oft auf die strikte Regulierung des Wassergehaltes im Fließmittel an, um definierte Säurekonzentrationen zu erzielen, weshalb man oft so vorgeht, daß man dem organischen Lösungsmittel die Säure zusetzt, und dann mit Wasser sättigt.

Tab. 25. Häufig benutzte Fließmittel für Alkaloide

1. 100 ml n-Butanol, 4 ml Eisessig, Wasser bis zur Sättigung
2. 100 ml n-Butanol, 10 ml Eisessig, Wasser bis zur Sättigung
3. n-Butanol/Ameisensäure/Wasser = 12:1:7 (v/v/v)
4. Tert. Amylalkohol/0,2-m Acetatpuffer (pH 5,6) = 1:1 (v/v)
5. Sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser = 75:15:10 (v/v/v)
6. n-Butanol/HCl/Wasser = 10:2: Sättigung
7. Chloroform/n-Butanol, mit HCl gesättigt = 1:1
8. n-Butanol/Wasser/Essigsäure = 100:20:10 (v/v/v)
9. n-Butanol/Wasser/Eisessig = 50:45:15 (v/v/v)
10. Isobutanol/konz. HCl/Wasser = 50:7,5:13,5 (v/v/v)
11. n-Butanol/konz. HCl/Wasser = 100:20: Sättigung

Hier und da werden Alkaloide auch durch Gemische mit schwächeren organischen Basen getrennt.

Papier

Es werden die üblichen chromatographischen Papiere, wie 2043a und b, Whatman 1, Whatman 4 u. a., verwendet, doch meist nach vorheriger Tränkung mit Puffern. Oft auch wird das Papier mit einer Salzlösung ge-

tränkt, die mit der betreffenden Säure des Fließmittels einen Puffer ergibt: z. B.



Als Puffer werden auch oft Phosphatpuffer mit sauren Kalium-, Natrium- oder Calciumsalzen benutzt.

Die Tränkung mit dem Puffer oder den Salzlösungen geschieht so, daß man das Papier in einer großen flachen Schale, möglichst ohne zu knicken, badet, den Überschuß mit Filterpapier durch leichtes Pressen entfernt und bei nicht zu hoher Temperatur, etwa 80 bis 100°C, trocknet.

Identifizierung

Hier und da durch Fluoreszenz unter der UV-Lampe. Von etwa 44 Alkaloiden fluoreszieren nach MUNIER und MACHEBŒUF⁴ 14, abgesehen von den Mutterkornalkaloiden, die ebenfalls fluoreszieren⁵. Die sonstigen Identifizierungsmethoden durch farbgebende Reagenzien sind nicht sehr zahlreich.

a) DRACENDORFFS Reagens

Lösung A: 850 mg Wismutsubnitrat in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser.

Lösung B: 8 g Jodkali in 20 ml Wasser.

A und B zusammen ergeben die Stammlösung, die in brauner Flasche unbegrenzt haltbar ist. Vor dem Sprühen mischt man 1 ml Stammlösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser. Alkaloide und organische Basen, die nicht direkt mit DRACENDORFFS Reagens reagieren, wie z. B. Ephedrin, Benzedrin, Theobromin, Pyridoxin, können auf dem Papier methyliert werden: Man sprüht mit 10prozentiger wäßriger Kaliumcarbonatlösung, trocknet, taucht in Dimethylsulfat, preßt ab und erhitzt 10 min auf 90°C. Dann sprüht man mit 1:5 mit 70prozentiger Essigsäure verdünntem DRACENDORFFS Reagens. Die Reaktion ist nicht typisch, sie ist auch bei Sulfonamiden positiv. Die Farbe der Flecken ist intensiv orange auf blaßgelbem Grund, nicht lange haltbar.

b) Jod-Jodkalium-Lösung. 0,5% Jod und 1% Jodkali in Wasser, durchziehen, eine halbe Stunde liegen lassen. Beispiele: Hyoscin rotbraun, Atropin graublau.

c) Diazotierte Sulfanilsäure. PAULYS Reagens. Für alle kuppungsfähigen Alkaloide. 4,5 g Sulfanilsäure werden in 45 ml konz. HCl unter Erwärmen gelöst, dann auf 500 ml verdünnt. 10 ml der erkalteten Lösung werden im Eisschrank abgekühlt, 10 ml einer eiskalten 4,5prozentigen Natriumnitritlösung hinzugefügt. Kurz vor dem Besprühen das gleiche Volumen einer 10prozentigen Natriumcarbonatlösung hinzufügen.

d) Bromcyan – Anilin – Benzidin. Man bedampft 10 min mit Bromcyan und sprüht anschließend mit einer Lösung von 2% Anilin und 0,25% Benzidin in 50prozentigem Alkohol.

Weiteres sei anhand der einzelnen Alkaloidgruppen und besonders umfassender einzelner Arbeiten beschrieben.

Solanaceenalkaloide

Einige Arbeiten seien zitiert:

SCHUTE⁶ benutzte zur Trennung von Solanaceenalkaloiden Wasser mit 5% Ammoniak als Fließmittel und identifizierte die einzelnen Komponenten durch Joddampf. Er erhielt folgende Färbungen:

Atropin	violettblau
Apoatropin	rotbraun
Belladonnin	braungelb
Scopolamin	hellbraun oder lilafarben

A. ROMEIKE⁷ benutzte als Fließmittel ein Gemisch von *n*-Butanol und Eisessig, dem tropfenweise bis zur Sättigung Wasser zugegeben wurde. Das Verhältnis von *n*-Butanol zu Essigsäure war 100 : 10.

MUNIER und MACHEBŒUF⁴ trennten Solanaceenalkaloide auf einem mit *m*/2 KCl vorgetränkten Papier und wandten als Fließmittel folgendes an: *n*-Butanol/HCl/Wasser = 100 : 2 : Sättigung.

SCHILL und AGREN sowie JENTZSCH^{8,9} benutzten als Fließmittel Chloroform/*n*-Butanol, mit HCl gesättigt = 1 : 1. Sie arbeiteten in einer salzsäuregesättigten Atmosphäre.

Tabakalkaloide

WERLE und KOCH¹⁰ trennten Tabakalkaloide mit Hilfe folgender Fließmittel:

- n*-Butanol, mit Wasser gesättigt
- n*-Butanol mit 10 % Eisessig und 20 % Wasser

Die Lösungen der Alkaloide lagen 1 prozentig vor, die Lösungen waren auf pH = 7 eingestellt. Es wurde von einigen Autoren bei niedrigen Temperaturen, im Eisschrank, gearbeitet. – Identifizierung: 10 bis 20 min im Bromcyandampf, dann mit 2prozentiger Lösung von Anilin in *m*/15 Phosphat gesprüht.

MUNIER und MACHEBŒUF⁴ trennten Nicotin, Pyrrolidin, Pyridin in *n*-Butanol/HCl/Wasser = 100 : 20 : Sättigung. Die Alkaloide lagen als Salze vor, die Wegstrecke des Fließmittels betrug 20 cm.

E. WEGNER¹¹ benutzte zur Trennung der Tabakalkaloide *n*-Butanol/Wasser/Eisessig = 100 : 20 : 10 und zur Identifizierung Bromcyan-Anilin in Phosphatpuffer.

Coca-Alkaloide

KLEMENTSCHITZ und MATHES¹² trennten Ecgonin von Benzoyllecgonin, Tropicocain und Cocain, wobei sie als Fließmittel Äthylglykol/Wasser-Mischungen benutzten. Als besonders wichtig erkannten sie die gute Sättigung der Kammer mit den Fließmitteldämpfen. Zur Trennung aller vier Komponenten erwies sich folgendes Fließmittel als günstig: Methyläthylketon/Wasser/Pyridin/Äthylglykol/Ligroin 95 bis 100°C = 30 : 5 : 0,5 : 1,5 : 3,5. – Zur Identifizierung benutzten sie DRAGENDORFFS Reagens und eine Lösung von 0,1 g Bromkresolpurpur in 250 ml Äthanol, der 3,7 ml *n*/20 NaOH enthält.

Lokalanästhetika

VITTE und BOUSSEMER¹³ trennten Novocain, Butelline, Cocain und Orthoform im aufsteigenden Verfahren mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 50 : 15 : 45 als Fließmittel.

JAMINET¹⁴ benutzte zur Trennung und chromatographischen Identifizierung ein Gemisch von Isbutanol/HCl konz./Wasser = 50 : 7,5 : 13,5.

Opiumalkaloide

MUNIER und MACHEBŒUF¹⁵ u. a. trennten Morphin, Thebain und Codein mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 100 : 10 : 50 als Fließmittel sowie *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 100 : 30 : Sättigung. Als Papier wurde ein mit *m*/1 KH₂PO₄ getränktes benutzt.

Chinaalkaloide

SÜSSMANN, KIRCH und WEBSTER¹⁶ arbeiteten aufsteigend und benutzten als Fließmittel Cyclohexanol, mit 2- bis 4-*n* HCl gesättigt, oder Cyclohexanol, mit Wasser gesättigt. Die Identifizierung geschah mit Hilfe der Fluoreszenz im UV-Licht oder verdünnter Kaliumplatinjodidlösung.

Strychnosalkaloide

MUNIER und MACHEBŒUF¹⁷ zeigten die Trennung Strychnin-Brucin unter Benutzung zweier Fließmittel:

1. *n*-Butanol/HCl/Wasser = 100 : 20 : Sättigung
 2. *n*-Propanol oder Isopropanol/Wasser = 3 : 1
- Das benutzte Papier war mit *m*/1 bis *m*/5 KH₂PO₄-Lösung getränkt.

GRIFFON und ROMANO¹⁸ trennten Strychnin und Brucin im zweidimensionalen Verfahren.

1. Dimension: Aceton/Diäthylamin/Wasser = 150 : 10 : 40
2. Dimension: *n*-Butanol + HCl = 200 + 30/Kaliumferrocyanid in 10prozentigem Glycerin/Essigester = 50 : 5 : 5

Das Kaliumferrocyanid hatte dabei die Aufgabe, das Strychnin im salzsauren Milieu unlöslich zu machen und so am Wandern zu hindern, um eine Trennung von Brucin zu erzielen. Im basischen Milieu (auch Diäthylamin) wandert es.

Mutterkornalkaloide

Bei dieser Alkaloidgruppe ist die Trennung insofern komplizierter, als wasserlösliche und wasserunlösliche Mutterkornalkaloide getrennt behandelt werden müssen. Es existiert bereits eine Anzahl einschlägiger Arbeiten.

Nach FOSTER, McDONALD und JONES¹⁹ kann man die wasserlöslichen Alkaloide Ergometrin und Ergometrinin mit Hilfe des bekannten Fließmittelgemisches *n*-Butanol/Eisessig/Wasser von den wasserunlöslichen trennen. Ergometrin zeigt dabei einen *R_F*-Wert von 0,59, Ergometrinin 0,68. Die wasserunlöslichen wandern mit der Lösungsmittelfront. Getrennte Mengen 5 bis 15 γ, die Alkaloide lagen als Tartrate, Lactate oder Maleate vor. Identifizierung durch Fluoreszenz unter der UV-Lampe.

BRINDLE, CARLESS und WOODHEAD²⁰ trennten wasserunlösliche Alkaloide auf mit Zitronensäure, Weinsäure-Phosphat oder Äpfelsäure-Phosphat vom pH unter 6 imprägnierten Papieren. Als Fließmittel benutzten sie alkoholfreien, wassergesättigten Narkoseäther.

PÖHM und FUCHS²¹ konnten sogar die physiologisch hochwirksamen linksdrehenden Basen von den weniger wirksamen rechtsdrehenden Isomeren trennen durch Benutzung von formamidgetränktem Papier. Das Formamid enthielt 4 % Benzoesäure.

TAYLOR und SCHWARTING²² nebst Mitarbeitern. Beide Autorengruppen benutzen ähnliche Fließmittel, Kohlenwasserstoffe und gechlorte Kohlenwasserstoffe, z. B. Gemische von CCl₄ / CHCl₃ / C₆H₆ = 7 : 2 : 1.

Auch auf Silikonpapier und acetyliertem Papier wurden bereits Erfolge erzielt.

STOLL und RÜEGGER²³ imprägnierten das Papier mit einem Gemisch aus 10 Teilen Phtalsäuredimethylester und 90 Teilen Isopropyläther und benutzten als Fließmittel Formamid/Wasser-Gemische, die mit Ameisensäure auf verschiedene pH-Stufen eingestellt waren. Fast alle Autoren empfehlen sehr gute vorherige Sättigung der Bogen – meistens über Nacht – in der Dampfphase des Lösungsmittels.

Als Identifizierung dient dort, wo die Fluoreszenz zu schwach ist, das sogenannte VAN-URK-Reagens: 0,2 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in einem Gemisch aus 55 ml Wasser + 65 ml konz. Schwefelsäure + 2 Tropfen 5prozentige FeCl₃ · 6H₂O. – Die Identifizierung erfolgte wegen der sehr starken Säure des Reagens durch Auflegen der Chromatogramme auf eine mit Reagens bestrichene Platte.

Curare-Alkaloide

SCHMID und KARRER²⁴ trennten die Curare-Alkaloide im zweidimensionalen Verfahren.

1. Dimension: Essigester/Wasser/Pyridin = 20 : 20 : 9
2. Dimension: Methyläthylketon/Wasser/Cellosolve = 30 : 7 : 1,5

Tropaalkaloide

MUNIER und MACHEBEUF²⁵ trennten Atropin, Scopolamin und Homatropin auf einem mit $n/2$ KCl getränktem Papier.

Fließmittel: 100 Vol. *n*-Butanol, 2 Vol. konz. HCl, Wasserzusatz bis zur Sättigung.

Ausgezeichnete Trennung, wurde selbst ausprobiert. Eignet sich auch für andere Alkaloidgruppen. Die Flecken waren vor allem sehr rundlich, zeigten keinerlei Schwanzbildung.

ROMEIKE⁷ zeigte die Trennung von Atropin, Scopolamin, Tropin und Scopolin im Rundfilterverfahren unter Erprobung einer Anzahl von Schleicher- & Schüll-Papieren. – Die Identifizierung geschah durch DRAGENDORFFS Reagens.

Hydrastis-Alkaloide

ERBRING und WULF²⁶ trennten die Inhaltsstoffe von *Hydrastis canadensis* im aufsteigenden Verfahren auf Papier Schleicher & Schüll 2043b mit wassergesättigtem Collidin als Fließmittel oder 94prozentigem Äthanol.

Die Identifizierung geschah durch Beobachtung der Fluoreszenz bei 3660 Å:

Berberin	fluoresziert stark gelb,
Canadin	» gelblich,
Hydrastinin	» intensiv blau.

Anwendungsgebiete der Alkaloidtrennungen: Analyse von Arzneimitteldrogen, forensische Chemie (Vergiftungsfälle), Suchtmittelnachweis bei der Entwöhnung Süchtiger, Reinheitsprüfungen und Identifizierungen bei Arzneimittelkombinationen von Alkaloidnatur usw.

Literatur

- ¹ O. TÖPPEL, *Angew. Chem.* 66 (1954) 555.
- ² H. ERBRING und P. PATT, *Naturwiss.* 41 (1954) 216.
- ³ H. JATZKEWITZ, *Z. physiol. Chem.* 292 (1953) 94.
- ⁴ R. MUNIER und M. MACHEBEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 31 (1949) 1144, 1198, 32 (1950) 192, 904, 33 (1951) 846, 857. R. MUNIER, M. MACHEBEUF und N. CHERRIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33 (1951) 1919. R. MUNIER und M. MACHEBEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34 (1952) 209. R. MUNIER, *Bull. Soc. Chim. France* 1952, 852; *Bull. Soc. Chim. Biol.* 35 (1953) 1225.
- ⁵ H. BRÄUNIGER, *Pharmazie* 9 (1954) 643, 719, 834.
- ⁶ J. B. SCHUTE, *Pharm. Weekbl.* 86 (1951) 201.
- ⁷ A. ROMEIKE, *Pharmazie* 7 (1952) 496, 8 (1953) 729.
- ⁸ G. SCHILL und A. AGREN, *Svensk Farm. Tidskr.* 55 (1951) 781, 797, 825.
- ⁹ K. JENTZSCH, *Scientia Pharm.* 20 (1952) 216.
- ¹⁰ E. WERLE und J. KOCH, *Naturwiss.* 38 (1951) 333.
- ¹¹ R. WEGNER, *Naturwiss.* 40 (1953) 580.
- ¹² W. KLEMENTSCHITZ und P. MATHES, *Scientia Pharm.* 20 (1952) 65.
- ¹³ G. VITTE und E. BOUSSEMAR, *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux* 88 (1950) 181, 89 (1951) 83.
- ¹⁴ F. JAMINET, *J. Pharm. Belgique* 6 (1951) 81.
- ¹⁵ R. MUNIER und M. MACHEBEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 31 (1949) 1154.
- ¹⁶ D. SÜSSMANN, E. KIRCH und G. WEBSTER, *J. Amer. Pharm. Assoc.* 40 (1951) 368.
- ¹⁷ R. MUNIER und M. MACHEBEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 32 (1950) 210.
- ¹⁸ H. GRIFFON und C. ROMANO, *Ann. Pharm. Franç.* 10 (1952) 497.
- ¹⁹ M. C. FOSTER, H. McDONALD und T. S. O. JONES, *J. Pharmacy Pharmacol.* 1 (1949) 802.
- ²⁰ H. BRINDLE, J. E. CARLESS und H. B. WOODHEAD, *Nature* 168 (1951) 203.
- ²¹ M. PÖHM und L. FUCHS, *Naturwiss.* 41 (1954) 63.
- ²² V. TAYLOR und A. SCHWARTING, *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 41 (1952) 354.
- ²³ A. STOLL und A. RÜEGGER, *Helv. Chim. Acta* 37 (1954) 1725.
- ²⁴ H. SCHMID und P. KARRER, *Helv. Chim. Acta* 33 (1950) 512.
- ²⁵ R. MUNIER, *Bull. Soc. Chim. France* 1952, 852.
- ²⁶ H. ERBRING und W. WULF, *Koll.-Z.* 125 (1952) 99.

5. Zucker

Allgemeines

Hier ist vor allem die Trennung der niedrigsten Zucker selbst oder in Form der Hydrolysate aus Oligo- und Polysacchariden wichtig. Auch als Extraktivstoffe und Hydrolysate aus Pflanzenteilen können sie zur Trennung gelangen. Die Extraktion von Pflanzenteilen geschieht nach vorheriger Zerkleinerung im Elektromischer, nachdem man die Enzyme inaktiviert und Pflanzensäuren neutralisiert hat. Die Zucker extrahiert man mit Wasser oder wäßrigem Alkohol. Störend wirken können Proteine, höhere Kohlehydrate, Salze. Letztere entfernt man nach den bei α -Aminosäuren üblichen Verfahren. Aus Gemischen von Zuckern und Salzen kann man auch häufig die Zucker mit Pyridin extrahieren¹, in dem die Salze nicht löslich sind.

Hydrolyse von Polysacchariden siehe weiter hinten.

Zur Chromatographie sollen die Zucker zweckmäßigerweise als etwa 1prozentige Lösungen in bezug auf jede Komponente vorliegen. Bei der Trennung von Mono- und Disacchariden arbeitet man meist eindimensional, seltener zweidimensional. Rundfilterchromatogramme und vor allem die Methode der geformten Streifen nach MATTHIAS können mit Erfolg angewendet werden. Nach letzterem Verfahren mit seiner relativ geringen Steighöhe ist es allerdings hier und da notwendig, das Chromatogramm vom gleichen Fließmittel mehrmals überwandern zu lassen. Die Trennung gerade der einfachsten Monosaccharide der gleichen Kohlenstoffzahl, etwa der Hexosen, ist oft nicht ganz einfach, da in vielen Lösungsmittelsystemen ihre R_F -Werte nahe zusammenliegen. Man kann oft besser zum Ziele kommen, wenn man das Durchlaufchromatogramm-Verfahren anwendet.

Zwei Formen dieses Verfahrens sind vor allem üblich: Auszacken der der Startlinie gegenüberliegenden Kante und Anwendung des absteigenden Verfahrens, wobei das Fließmittel abtropft, oder Annähen eines Wattestreifens an der gleichen Kante, der den Überschuss des Fließmittels aufnimmt. Hier kann man natürlich keinen R_F -Wert bestimmen, sondern bezieht den Wanderungsweg auf eine geeignete Bezugssubstanz, meist Glucose; diesen nennt man dann R_C -Wert.

Mit steigender Polymerisation werden die R_F -Werte meist schnell kleiner; Oligosaccharide müssen daher oft, Polysaccharide immer vor der Chromatographie hydrolysiert werden. Vor der Hydrolyse muß oft das Polysaccharid von niedrigeren Polymerisaten getrennt werden, was auf Grund der verschiedenen Löslichkeit möglich ist:

Kaltes Wasser löst Zucker und Fructosane (Inulin).

Heißes Wasser löst Stärke, Glykogen, Lichenin, z. T. Schleime und Pektine.

Mit steigendem Alkali gewinnt man Pentosane und Hemicellulosen.

Auch Wasser kann bereits Pentosane herauslösen.

Literatur siehe S. 231

Die Hydrolyse kann erfolgen:

A. Durch Säurehydrolyse im geschlossenen Rohr mit HCl oder Schwefelsäure².

Auch mit Oxalsäure oder Essigsäure unter milden Bedingungen (Schonung der Furanoseringe)³.

Cellulose benötigt sehr konzentrierte Säuren wie 41prozentige HCl, 66prozentige Schwefelsäure oder verdünnte Säure bei sehr hohen Temperaturen.

B. Durch enzymatische Hydrolyse mit Hilfe typischer Carbohydrasen⁴.

Angewandte Substanzmengen

Man empfiehlt meistens die Anwendung von 1prozentigen Lösungen in bezug auf jede Komponente, von denen man 2 bis 5 Mikroliter aufträgt.

Papier

Außer den üblichen chromatographischen Papieren, deren Dichtigkeit mit den anderen Versuchsbedingungen, wie Größe der Apparatur, Fließmitteln, Arbeitszeit, abgestimmt werden sollte und die bereits hinreichend beschrieben wurden, gelang JAYME und KNOLLE⁵ die Trennung von Zuckern auch auf Glasfaserpapier, wobei als Vorteil der Methode eine sehr kurze Wanderungszeit anzusehen ist. Nach dem Verfahren von JAYME und KNOLLE zeigt das Glasfaserpapier nicht die starken Adsorptions- und Diffusionserscheinungen des Baumwollfaserpapiers.

Da die Glasfaser relativ stark alkalisch ist, erwies es sich als zweckmäßig, das Papier vor der eigentlichen chromatographischen Trennung mit einem Phosphatpuffer vom pH 5,0 aus einer Mischung von 0,1-m Lösung von Phosphorsäure und Dinatriumhydrogenphosphat zu tränken. Auch wurde das Papier mit Chromschwefelsäure vorgereinigt, um gewisse organische und anorganische Verunreinigungen zu vermeiden. Als Fließmittel wurde zumeist Butanol/Wasser/Aceton 40 : 50 : 10 benutzt, und es wurden eine Anzahl niederer Zucker in etwa 2 Stunden, gegenüber einem normalen Papierchromatogramm in 8 Stunden, getrennt.

Die Methode versagte auf einem amerikanischen Glasfaserpapier gleicher Faserherkunft, wahrscheinlich aus dem Grunde, weil das deutsche Papier wesentlich kurzfasriger ist und mehr einem wirklichen Papier gleicht, das amerikanische dagegen mehr einer Art von Schichtenfilter, mit eingelagerten langen Fasern.

Hier und da versagt die Methode noch, aus bislang nicht erklärbaren Ursachen. Es steht zu erwarten, daß die in der letzten Zeit erfolgte teilweise Verlegung der Fabrikation auf die Papiermaschine eine größere Gleichmäßigkeit als die bisherige Handschöpfung mit sich bringt.

Fließmittelsysteme

Phenol/Wasser, meist 80 : 20 (g/v), also als gesättigte Lösung von Wasser in Phenol. Hier und da auch als Gemisch Phenol/1% Ammoniak = 80 : 20. Letzteres Gemisch dient vor allem zur Trennung bei Gegenwart von Aminosuktern und sauren Begleitsubstanzen. Hierbei findet jedoch sehr leicht die Bildung einer breiten braunen Schmutzfront statt, weswegen

man etwas KCN zum Sättigungsphenol oder etwas Komplexon zum Entwicklungsphenol zugibt.

Organische Basen, zusammen mit Wasser und anderen organischen Fließmitteln:

<i>n</i> -Butanol/Pyridin/Wasser	=	3 : 2 : 1,5
Äthylacetat/Pyridin/Wasser	=	2 : 1 : 2
		5 : 2 : 5
		5 : 3 : 2

Collidin, wassergesättigt

n-Butanol/Ammoniak in verschiedenen Mischungsverhältnissen

Zur Trennung von Saccharose und Raffinose im rohen Rübenzucker: *n*-Butanol/Pyridin/Wasser/Benzol = 5 : 3 : 3 : 1

n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5 und 8 : 2 : 2

Weitere Lösungsmittelgemische zur Trennung einfacher und komplizierter Zucker siehe Tab. 26 und 27.

Tab. 26. Fließmittel für einfache Zucker

Fließmittel	Zu trennendes Gemisch	Autor Jahr
1. Äthylacetat/Pyridin/Wasser = 2 : 1 : 2	Xylose, Arabinose, Mannose, Glucose,	JERMYN (1949)
2. Äthylacetat/Eisessig/Wasser = 3 : 1 : 3	Galaktose	
3. Untere Schicht von Benzylalkohol/Eisessig/Wasser = 3 : 1 : 3	Ketoheptosen	BEVENUE (1951)
4. <i>n</i> -Butanol/Pyridin/Wasser = 45 : 25 : 40	Lactose, Galaktose, Glucose	BORKOWSKY (1952)
5. <i>n</i> -Butanol/Äthanol/Wasser/Ammoniak = 40 : 10 : 49 : 1	Glucose aus Harn	BAYLY (1951)
6. <i>n</i> -Butanol/Äthanol/Wasser = 10 : 1 : 2	Melibiose, Fructose, Glucose	WILLIAMS (1951)

Tab. 27. Fließmittel für Oligo- und Polysaccharide

Fließmittel	Kohlehydratklasse	Autor, Jahr
<i>n</i> -Butanol/Äthanol/Wasser = 10 : 1 : 2	Oligosaccharide	WHITE (1953)
<i>n</i> -Butanol/Äthanol/Wasser = 4 : 1 : 5	Oligosaccharide	LINDBERG (1953)
Äthylacetat/Pyridin/Wasser = 8 : 2 : 1	Oligosaccharide	WHITE (1953)
<i>n</i> -Butanol/Pyridin/Wasser = 6 : 4 : 3	Oligosaccharide	FRENCH (1950, 1953) DIMLER (1952)
Fuselöl (121–139 °C)/Pyridin/Wasser = 1 : 1 : 1	Oligosaccharide	DIMLER (1952)
25 % Propanol in <i>m</i> /15 Phosphatpuffer (pH = 6,4)	Mucopolysaccharide	KERBY (1953)
75 % Isopropanol/Eisessig = 9 : 1	Amylose	BIRD (1954)
<i>n</i> -Butanol/Pyridin/Wasser/Benzol = 50 : 30 : 30 : 4,5	Raffinose	BROWN (1952)

Das erstere Butanol/Wasser-Gemisch ist das aus den Arbeiten von PARTRIDGE bekannte⁶ Gemisch, das zu-

erst für die Trennung einfacher Zucker benutzt wurde und eine Abtrennung der organischen von der wäßrigen Phase verlangt. Das zweite ist völlig mischbar und daher sofort gebrauchsfertig. Für beide gilt, daß sie bei geringem Temperaturabfall leicht entmischbar sind. Daß die in der Literatur so oft erwähnte starke Veresterung nach unseren Erfahrungen erst nach etwa 24 Stunden merkbare Veränderungen hervorrufen kann, wurde bereits weiter vorn erwähnt.

Die pyridinhaltigen und basischen Fließmittel haben die Eigenschaft, die R_F -Werte relativ günstig auf dem Chromatogramm zu verteilen, d. h. in Richtung der Fließmittelfront zu verschieben, so daß man u. U. durch Variation von *n*-Butanol und basischen Zusätzen in Verbindung mit Wasser günstige Trennergebnisse erzielen kann. Im allgemeinen gilt naturgemäß die Regel, daß, je mehr Wasser im Fließmittelgemisch vorhanden ist, die Zucker um so weiter transportiert werden, infolge ihrer großen Verwandtschaft zum Wasser (OH-Gruppen).

Nachweisreaktionen: Am empfehlenswertesten sind – mit weitem Abstand – die Reaktionen mit Anilinhydrogenphthalat und diejenige mit Silbernitrat, wobei nach eigener Erfahrung diejenige mit acetonischem Silber vorzuziehen ist, da sich die Zucker praktisch nicht in Aceton lösen. Daher werden sie natürlich beim Sprühen auch nicht ausgeschwemmt.

Reaktionen:

Silbernitrat, in ammoniakalisch-alkalischer Lösung. Sofort nach dem Sprühen muß das Chromatogramm im Trockenschrank erhitzt oder über stark dampfendes Wasser gehalten werden, bis die Flecken scharf heraustreten. – Es ist notwendig, das Chromatogramm zu fixieren, um es aufbewahren zu können, ohne daß das Filtrierpapier in unerwünschter Weise nachdunkelt. Das geschieht zweckmäßigerweise mit einer schwach mit Essigsäure angesäuerten Natriumthiosulfatlösung, wobei die Essigsäure das Alkali abstumpft, das sonst das Papier in seiner Naßfestigkeit stark beeinträchtigt. Anschließend muß gut mit Wasser nachgewaschen werden. Auch Thioharnstoff eignet sich zur Fixierung. – Silbernitrat kann auch sodaalkalisch gesprüht werden. Die weitaus beste Reaktion ist diejenige mit Anilinhydrogenphthalat, nämlich 0,93 g Anilin und 1,66 g Phtalsäure in 100 ml wassergesättigtem Butanol. Die Wassersättigung ist notwendig, da sich andernfalls die Phtalsäure schlecht löst. Es muß anschließend an das Sprühen 15 min auf 105°C erhitzt werden.

An weiteren Reaktionen werden empfohlen⁷:

Benzidinacetat, *m*-Phenylendiamin, Triphenyltetrazoliumchlorid, hierbei ist die Einhaltung der 40°C warmen, wasserdampfgesättigten Atmosphäre schwierig.

3,4-Dinitrobenzoesäure, *p*-Aminodimethylanilin, **Naphtoresorcin**, das sich auch für nicht reduzierende Zucker eignet, z. B. Ketohehexosen und Uronsäuren.

Anthronreagens⁸ gibt gute scharf differenzierte Farben. 300 mg Antron in 10 ml Eisessig unter Erwärmen lösen, dazu 20 ml Alkohol, 3 ml Phosphorsäure ($d = 1,6$) und 1 ml Wasser. Die Lösung ist im Eisschrank stabil. Man sprüht die Chromatogramme und beläßt sie 5 bis 6 min bei 108°C.

Mono- und Oligosaccharide sind gelb,
Ketopentose purpur,
D-Glucoheptulose orangegelb,

D-Mannoheptulose orangegelb,
Ketoxylose purpur.

o-Aminophenol wurde als neues Reagens in die Zuckerchemie eingeführt durch HIRASE, ARAKI und NAKANISHI^{9a}.

Konzentration:

Tab. 28. 0,15 g *o*-Aminophenol in 20 ml Alkohol und 10 ml 50prozentiger Phosphorsäure

Zucker	Farbe	Erfassungsgrenze
Pentose	blau	1 Mikrogramm
Methylpentose . . .	kirschrot	5 Mikrogramm
Aldohexose	braun	5 Mikrogramm
Ketohexose	zitronengelb	1 Mikrogramm
Lactose	braun	5 Mikrogramm
Saccharose	gelb	1 Mikrogramm
Uronsäure	blau	1 Mikrogramm

Praktische Anwendungsgebiete der Papierchromatographie der Zucker: Qualitative Analyse der Zucker in Lebensmitteln, die nach den üblichen analytischen Methoden möglich ist. Desgleichen in Hydrolysaten aus Cellulose, Hemicellulosen und sonstigen hochmolekularen Polysacchariden². Eine Reihe wichtiger Erkenntnisse auf dem Gebiet der natürlichen Kohlehydrate konnte durch papierchromatographische Verfahren gesammelt werden. Die Strukturanalyse pflanzlicher Reserve- und Gerüstsubstanzen wurde ermöglicht⁹. Enzymatische und sonstige Stoffwechselvorgänge konnten kontrolliert werden¹⁰.

Am interessantesten waren wohl die Erfahrungen auf dem Gebiet der Photosynthese mit radioaktiven Indikatoren¹¹.

Weitere interessante Gebiete waren: Erforschungen auf dem Gebiet des natürlichen Cellulose- und Hemicelluloseaufbaus, Arbeiten auf dem Gebiet der natürlichen Honige, z. B. von TÄUFEL und Mitarbeitern¹².

Literatur

- 1 C. Schleicher & Schüll, *Arbeitsmethodik*, Auflage 1955, S. 20.
- 2 G. W. HOFMAN, P. A. REBERS, D. R. SPIESTERSBACH und F. SMITH, *Nature* 175 (1955) 990.
- 3 W. G. C. FORSYTH und D. M. WEBLEY, *Biochem. J.* 44 (1949) 455.
- 4 J. S. D. BACON und I. EDELMAN, *Biochem. J.* 48 (1951) 114. T. KENNETH, K. T. WILLIAMS und A. BEVENUE, *Science* 113 (1951) 582.
- 5 G. JAYME und H. KNOLLE, *Angew. Chem.* 1956, 243.
- 6 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.* 42 (1948) 238.
- 7 C. Schleicher & Schüll, *Arbeitsmethodik*, Auflage 1955, S. 75–7.
- 8 R. JOHANSON, *Nature* 172 (1953) 956.
- 9a S. HIRASE, CH. ARAKI und L. NAKANISHI, *Bull. Chem. Soc. Japan* 26 (1953) 183.
- 9 J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.* 1949, 4. E. L. HIRST, L. HOUGH und J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.* 1949, 3145. J. S. D. BACON und I. EDELMAN, *Biochem. J.* 48 (1951) 114. R. DEDONDER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34 (1952) 144, 157, 171.
- 10 M. A. JERMYN und R. G. TOMKINS, *Biochem. J.* 47 (1950) 437.
- 11 W. STEPKA, A. A. BENSON und M. CALVIN, *Science* 108 (1948) 304. M. CALVIN und A. A. BENSON, *Science* 109 (1949) 140. J. GLOVER, M. D. KAMEN und H. VAN GENDEREN, *Arch. Biochem. Biophysics* 36 (1952) 384. A. A. BENSON, J. A. BASSHAM und M. CALVIN, *J. Amer. Chem. Soc.* 72 (1950) 1710. H. P. BINGER, J. T. SULLIVAN und C. O. JENSEN, *J. Agr. Food. Chem.* 2 (1954) 696. G. C. WHITING, *Nature* 168 (1951) 833.
- 12 K. TÄUFEL und M. MÜLLER, *Z. Lebensmittel-Unters. Forsch.* 100 (1955) 351. K. TÄUFEL, *Z. Lebensmittel-Unters. Forsch.* 94 (1952) 1.

6. Aliphatische Säuren und verwandte Gebiete

Allgemeines

Die Papierchromatographie der aliphatischen Säuren verläuft völlig verschieden, je höher man innerhalb der homologen Reihen fortschreitet. Diese Erfahrung beruht vor allem auf der Tatsache, daß die Löslichkeit in Wasser mit steigendem C-Gehalt abnimmt.

Zur Papierchromatographie der hohen Fettsäuren, die wasserunlöslich sind, geht man weitgehend auf Verfahren der Papierchromatographie mit umgekehrten Phasen über.

Niedere Fettsäuren und mittlere werden oft als Extrakte aus Pflanzenmaterial interessieren, sie müssen daher daraus gewonnen und gereinigt werden. Die hohen Fettsäuren sind vor allem als Fett-, Wachs- und Seifenbestandteile interessant.

Die Gewinnung von Fettsäuren aus natürlichem Pflanzenmaterial geschieht durch Extraktion mit Wasser oder wäßrigem Alkohol, in der Kälte oder auch bei erhöhter Temperatur.

Flüchtige Säuren gewinnt man durch Extraktion mit 2-*n* Soda, hohe Fettsäuren aus Pflanzenmaterial durch Extraktion mit Kohlenwasserstoffen. Aus Fetten, Wachsen und Seifen durch die üblichen Verfahren des Verseifens und Ansäuerns.

Die Pflanzenextrakte müssen von anorganischen Salzen, Zuckern und anderen Störsubstanzen befreit werden, was nach BRYANT und OVERELL¹ am besten mit Hilfe eines stark basischen Ionenaustauschers, etwa des Amberlite-IRA 400, geht, aus dem man die Pflanzensäuren wieder mit Ammoniumcarbonat eluiert. Der Ionenaustauscher muß vorher nacheinander mit 1-*n* Natriumcarbonat, Wasser und 1-*n* HCl aktiviert werden.

Bei organischen Säuren ist der Verteilungskoeffizient wegen der Neigung der Säuren zur Dimerisierung und Dissoziation von der Konzentration der zu trennenden Stoffe abhängig. Es gibt drei Möglichkeiten, die dadurch bedingten Streifen- oder Schwanzbildungen zu vermeiden:

1. Zugabe einer flüchtigen Säure mit hoher Dielektrizitätskonstante zum Fließmittel, meist Ameisensäure oder Essigsäure².
2. Salzbildung mit einer flüchtigen, leicht austreibbaren Base als Kation³.
3. Bildung von Derivaten der Säure, meist Hydroxamaten⁴.

Da die Dimerisierung durch Brückenbildung des Carboxylwasserstoffions erfolgt, ist sie naturgemäß beim Salz nicht möglich. Zugleich wird nach den beiden letzten Verfahren die Flüchtigkeit verringert.

Der Zusatz der unter 1 genannten Säure, meist Ameisensäure oder Essigsäure, erhöht zugleich durch stärkere Wasserbindung an das organische Lösungsmittel die R_F -Werte².

Literatur siehe S. 239–40

Die Einteilung des großen Gebietes der Fettsäuren sei folgendermaßen vorgenommen:

- I. Flüchtige aliphatische Säuren C₁ bis C₉
- II. Nichtflüchtige aliphatische wasserlösliche Säuren
- III. α -Ketosäuren
- IV. Höhere Fettsäuren
- V. Phosphatide
- VI. Steroide und herzwirksame Glykoside
- VII. Gallensäuren

a) Flüchtige aliphatische Säuren C₁ bis C₉

Allgemeines

Sie werden infolge ihrer Flüchtigkeit immer als Salze getrennt. Als Kation dienen: Na, NH₄, Diäthylamin, Äthylendiamin, Hydrazin. Auch in Form der Kaliumhydroxamate wird die Trennung durchgeführt. Das Ziel bei allen diesen Arbeitsvorgängen ist, die Flüchtigkeit weitgehend zu vermeiden. Bei der Anwendung von Na als Kation findet man hier und da eine Säure nicht mehr vor, z. B. die Essigsäure beim Auftragen der Säure in Form von Natriumacetat.

Man bringt daher zwar oft die Säuren in Form ihrer Natriumsalze auf das Papier, entwickelt jedoch mit ammoniakhaltigen Fließmitteln, so daß in Wirklichkeit die Ammoniumsalze laufen. Das Na-Ion bleibt oft am Startpunkt sitzen.

Angewandte Mengen

0,5 bis 3 Mikrogramm der Salze in 2 bis 10 Mikroliter Flüssigkeit.

Papier

Es eignen sich alle reinen Linterspapiere. In bezug auf ihre technischen Daten, wie Dicke, Dichtigkeit usw., gelten auch hier die bereits früher angegebenen Regeln. Oft wird empfohlen, das Papier vor der eigentlichen chromatographischen Arbeit mit 1 prozentiger Oxalsäure, dann mit Wasser zu waschen und zu trocknen. Durch diese Behandlung vermeidet man die sogenannten «Geisterflecken», welche sich bilden, wenn mit einem Säure-Base-Indikator gesprüht wird, dessen pH unter dem Punkt des Farbumschlages liegt⁵.

Bei alkalischen Indikatoren empfiehlt man, das Papier vorher nacheinander mit 2-*n* Essigsäure, destilliertem Wasser und 10-*n* NH₃ zu waschen, die Trennungen werden dann besser, Schwänze und Geisterflecken werden vermieden. Auch läßt sich die Identifizierung leichter durchführen, da das Papier von löslichen sauren und reduzierenden Bestandteilen befreit wird.

«Scheckigwerden» des Chromatogramms nach dem Sprühen kann man vermeiden, wenn man das Papier mit der alkoholischen Phase eines Gemisches gleicher Teile *n*-Butanol und 1,5-*n* Ammoniak vorwäscht.

ISHERWOOD hat die Vorwäsche in einem Spezialapparat vorgenommen, der einen geteilten Plastiktrog enthielt und zu gleicher Zeit 60 Bogen aufnehmen konnte⁶.

Tab. 29. Fließmittel und R_F -Werte bei flüchtigen Fettsäuren
(modifiziert nach LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*). Papier: Whatman 1

Fließmittel	100 ml Äthanol 95 prozentig + 1 ml konz. NH_3	n -Butanol mit 1,5- n NH_3 gesättigt	n -Butanol/1,5- n NH_3 = 1 : 1 (v/v)	n -Propanol/konz. NH_3 ($d = 0,88$) = 9 : 1 (v/v)
Methode	aufsteigend	aufsteigend	absteigend	absteigend
Säure:				
Ameisensäure	0,31	0,10	0,09	—
Essigsäure	0,33	0,11	0,10	0,13
Propionsäure	0,44	0,19	0,19	0,25
Buttersäure	0,54	0,29	0,33	0,33
Valeriansäure	0,60	0,41	0,45	—
Capronsäure	0,68	0,53	0,61	—
Önanthensäure	0,72	0,62	—	0,52
Caprylsäure	0,76	0,65	0,74	—
Pelargonsäure	—	0,67	—	0,58

Identifizierung

Sie erfolgt praktisch immer durch pH-Indikatoren.

Bromphenolblau: 50 mg in 100 ml Wasser, dazu 200 mg Zitronensäure, Ammonium- und Äthylaminsalze erscheinen blau auf gelbem Grund.

Bromkresolpurpur: 40 mg in 100 ml einer 1 : 5-Verdünnung von Formalin in Methanol, pH etwa 5, mit 0,1- n NaOH eingestellt. Gesprühtes Chromatogramm 2 bis 3 min in Atmosphäre, gesättigt mit 3% wäßrigem Ammoniak, belassen. Die Säuren finden sich als gelbe Flecken auf purpurnem Grund.

Thymolblau: 100 mg in 100 ml Wasser, pH auf 10 mit $n/10$ NaOH einstellen. — NH_4 -Salze gelb auf blauem Grund. Sprühen in CO_2 -Atmosphäre.

Bromkresolgrün: 1 g in 100 ml absolutem Alkohol. Äthylamin- und Ammoniumsalze bilden blaue Flecken auf gelbem Grund.

Bromthymolblau: 0,04% wäßrige Lösung, vom pH 7,5, das mit NaOH eingestellt wird. — Die gelben Flecken sind die Anionen, die zugehörigen Kationen erscheinen tiefblau.

Trennung als Hydroxamate

Herstellung der Hydroxamate: Methylester der Säuren werden mit dem zweifachen Überschuß einer Mischung von 2 Vol. n -KOH und 1 Vol. n -Hydroxylamin · HCl in Methanol einige Minuten gekocht, vorher wird das KCl abfiltriert⁷.

Fließmittel für Hydroxamate⁴:

n -Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5
Wassergesättigtes Phenol
Wassergesättigtes n -Butanol
Amylalkohol/Ameisensäure/Wasser = 75 : 25 : 75
Benzol/Ameisensäure/Wasser = 75 : 75 : 75

Identifizierung der Hydroxamate: Trocknen und Sprühen mit 10% FeCl_3 in Alkohol. Purpurne Flecken auf gelbem Grund.

b) Nichtflüchtige wasserlösliche Säuren

Allgemeines

Nichtflüchtige wasserlösliche Säuren lassen sich naturgemäß als freie Säuren trennen. Doch macht man manchmal mehrere Chromatogramme nebeneinander, eins mit freien Säuren, eins mit den Salzen, da die Auftrennung einer größeren Anzahl Säuren schwierig ist und oft mehrere Chromatogramme und mehrere Fließmittel verlangt. Auch arbeitet man oft zweidimensional.

Wanderung im alkalischen Fließmittel wird oft durch die Zahl der Carboxylgruppe kontrolliert: Monocarbonsäuren wandern schneller als Dicarbonsäuren, Dicarbonsäuren schneller als Tricarbonsäuren.

Papier: Wie unter a).

Fließmittel:

Tab. 30. R_F -Werte nichtflüchtiger aliphatischer Säuren⁸

Säure	1	2	3
Oxalsäure			0,03
Malonsäure	0,48	0,63	0,52
Bernsteinsäure	0,66	0,74	0,64
Glutarsäure	0,86	0,84	
Adipinsäure	0,18	0,89	
Äpfelsäure	0,42	0,45	0,32
Weinsäure	0,19	0,22	0,13
Tricarballoylsäure	0,52		
Zitronensäure	0,26	0,37	0,24
Glykolsäure	0,59		
Milchsäure	0,72	0,67	0,58

1 = Phenol/Wasser = 3 : 1 (g/v) + 1% HCOOH (90%)

2 = n -Butanol/ HCOOH /Wasser = 4 : 1 : 5

3 = n -Propanol/Eucalyptol/ HCOOH (98%) = 5 : 5 : 2

Auch hier benutzt man den Zusatz einer Säure von hoher Dielektrizitätskonstante, «swamp»-acid⁹, um die R_F -Werte günstig voneinander zu differenzieren. Man muß jedoch natürlich die Chromatogramme nach dem Trennvorgang längere Zeit bei etwas erhöhter Temperatur trocknen; auch Bedampfen des Chromatogramms mit Wasserdampf und gleichzeitige Bestrahlung der Rückseite mit einem Infrarotstrahler ist anwendbar.

Identifizierung

Zur Identifizierung benutzt man die üblichen pH-Indikatoren und auch ammoniakalisches Silbernitrat.

Auch die Aussparung der Flecken, an denen organische Säuren sitzen, bei der Reaktion von Glucose mit ammoniakalisches Silbernitratlösung kann man benutzen:

Man sprüht das getrocknete Chromatogramm mit einer 1prozentigen Glucoselösung, dann mit einer Lösung gleicher Volumina 0,1-*n* Silbernitrat und 1-*n* Ammoniak, erhitzt dann auf 105°C während 5 min. Es zeigen sich weiße Flecken auf braunem Grund.

Ebenfalls mit Silbernitrat identifiziert haben SMITH und SPRIESTERSBACH¹⁰ Uronsäuren, Zitronensäure, Weinsäure und Äpfelsäure, die auf mit Ammoniumalginat getränktem und mit HCl gefälltem Papier, also auf einem solchen mit vermehrter Carboxylgruppenzahl, getrennt wurden.

c) α -Ketosauren

Allgemeines

Die Trennung erfolgt entweder in Form der freien Säuren oder oft vorteilhafter in Form der 2,4-Dinitrophenylhydrazone, da letztere stabiler und gefärbt oder zumindest unter der UV-Lampe sichtbar sind.

Herstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone: Zu 0,5 ml einer 0,01-m. Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin gibt man 0,1 ml einer wäßrigen Lösung der α -Ketosaure (Konzentration nicht höher als 0,025 m.). 30 min bei 25°C stehen lassen. Die klare Lösung kann benutzt werden. Nach CAVALLINI¹¹ werden die Hydrazone aus der Reaktionsflüssigkeit durch Extraktion mit Chloroform abgetrennt, die 20% Äthanol enthält, und durch Lösen in Sodalösung und Wiederextrahieren mit Chloroform gereinigt. Nach VIRTANEN¹² müssen aus Pflanzenextrakten freie Fettsäuren und sonstige Verunreinigungen vorher entfernt werden, was durch Adsorption der Hydrazone an gemischten Bentonit- und Celite-Säulen und Wiederauswäsche durch Natriumcarbonatlösung geschieht.

Brenztrauben- und Oxalessigsäure ergeben *cis-trans*-Isomere an der C-N-Bindung der Hydrazone. Je nach Versuchsbedingungen kann man also zwei Flecken der Hydrazone auf dem Chromatogramm erwarten.

In organischen Lösungsmitteln kann eine Decarboxylierung erfolgen, weshalb man die Hydrazone oft in Lösung eines Phosphatpuffers vom pH 7,2 aufsetzt.

Papier

Wie üblich, häufig wird empfohlen, das Papier mit wäßrig alkalischen Puffern vorzuwaschen.

Fließmittel

Die Trennung der freien Ketosauren erfolgt durchweg in sauren oder neutralen Fließmitteln.

Z. B. Mischungen von

Toluol/Eisessig/Wasser = 100 : 5 : 60

Isobutanol/Propionsäure = 95 : 5

usw.

Die 2,4-Dinitrophenylhydrazone werden häufig bei Gegenwart von Ammoniak getrennt:

n-Butanol/Äthanol/0,5-*n* Ammoniak = 70 : 10 : 20

n-Butanol, mit 3% Ammoniak gesättigt,

auch:

n-Butanol/*n*-NaHCO₃ = 1 : 2

usw.

Literatur siehe S. 239–40

Identifizierung

Nachweis freier Ketosauren erfolgt nach WIELAND¹³ mit *o*-Phenylendiamin (0,05% in 10prozentiger wäßriger Trichlor-essigsäure, erhitzen auf 100°C während 2 min). – Gelbgrüne Flecken, die im UV-Licht fluoreszieren. Daneben Semicarbazid und NESSLERS Reagens. Im ersteren Falle sind die Flecken Fluoreszenzlöcher auf fluoreszierendem Untergrund, in letzterem stellt man zunächst die Ammoniumsalze der Säuren her, deren Ammoniumion man dann mit NESSLERS Reagens nachweist. – Die 2,4-Dinitrophenylhydrazone zeigen Eigenfarbe, die durch Sprühen mit alkoholischer Kalilauge noch verstärkt wird.

Anwendung

Blutfiltrat, Harn, Pflanzenextrakte.

d) Hohe Fettsäuren und Fette

Allgemeines

Anschließend an dieses Gebiet sollen auch die Stoffe behandelt werden, die in bezug auf ihr chromatographisches Verhalten eine gewisse Verwandtschaft zu hohen Fettsäuren zeigen, insofern, als sie eine nur minimale bzw. nicht vorhandene Löslichkeit in Wasser aufweisen, und weiterhin, da sie z. T. Fettcharakter zeigen oder den Fetten nahestehen. Sie sind alle praktisch nur in organischen Lösungsmitteln löslich.

Für diese Art von Trennungen mußten daher neue Verfahren gefunden werden. Man arbeitet fast immer nach den Verfahren der Chromatographie mit umgekehrten Phasen.

Zwei Methoden haben vor allem Bedeutung erlangt, sowohl bei der Trennung von Fettsäuren als auch der Ester, bzw. die Publikationen aus zwei Arbeitskreisen haben das Gebiet vorzüglich erschlossen:

1. die Arbeiten von KAUFMANN und Mitarbeitern¹⁴,
2. die Arbeiten von MICHEEL und Mitarbeitern¹⁵.

Auch das angelsächsische Schrifttum zitiert meist diese Arbeiten, da nur wenig andere Publikationen vorhanden sind. Die älteren KAUFMANNschen Arbeiten besitzen großen Wert als orientierende Vorversuche. Die im Jahre 1954 von KAUFMANN und NITSCH publizierte chromatographische Trennung hoher Fettsäuren dagegen eröffnete zusätzlich neue Perspektiven.

1. KAUFMANN und NITSCH arbeiten unter folgenden Bedingungen:

Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2043b wird in Cerosin, ein Kohlenwasserstoffgemisch vom Sdp. 190–220°C, getaucht, dann zwischen Filtrierpapier und Glasplatten unter einem konstanten Druck abgepreßt. Schließlich einige Minuten unter zwischengeschaltetem Umlegen horizontal an der Luft getrocknet.

Auftragung und Substanzmenge: einige Mikroliter der 2prozentigen Toluollösungen der Fettsäuren werden aufgetropft und getrocknet.

Fließmittel: 90% Eisessig, mit Cerosin gesättigt.

Methode: aufsteigend.

Identifizierung

pH-Indikatoren werden nicht oft benutzt, da nicht alle Fettsäuren damit erkannt werden können. Das ist z. B. der Fall

bei Palmitinsäure und Stearinsäure, die nur schwer erkennbar sind. Durch aufeinanderfolgende Behandlung mit Phenylhydrazin, Rhodamin B und wäßriger Silbernitratlösung kann man nach KAUFMANN folgende Farbtönungen erhalten:

Linolsäure	rötlichbraun
Ölsäure	intensiv rot
Elaidinsäure	intensiv rot
Erucasäure	dunkel leuchtendrot
Stearinsäure	schwach rötlichbraun
Pelargonsäure	} schwach rötlichbraun
Önanthsäure	
Capronsäure	
Buttersäure	
Valeriansäure	} schwarze Flecken

Im übrigen arbeitet man mit dem Kupferreagens: Man stellt zunächst die Kupferseifen der Fettsäuren her, indem man sie trocknet und etwa $\frac{1}{4}$ Stunden in wäßrige Kupferacetatlösung einlegt, das überschüssige Kupferacetat muß durch gutes Waschen entfernt werden.

Durch Einlegen in wäßrige Kaliumferrocyanidlösung bildet sich an den Stellen der Kupferseifen braunes Kupferferrocyanid, das gegen den gelben Untergrund gut absticht.

RÖTH¹⁶ benutzt eine ähnliche Form zur schnellen papierchromatographischen Trennung und Identifizierung von mehr als vier Einzelkomponenten in der Seifenanalyse.

Papier

Schleicher & Schüll 2043b, das auf besondere Weise vorbereitet wird. Knapp über der Startlinie bringt man unmittelbar vor dem Steigenlassen eine Barriere in Form eines 2 cm breiten Dekalinstreifens an.

Fließmittel

Gemische von Eisessig, Methanol und Wasser.

Identifizierung

Verdünnte Lösung von Malachitgrün.

2. MICHEEL und Mitarbeiter brachten ebenfalls im Jahre 1954 eine Trennung von hohen Fettsäuren in Form ihrer Hydroxamate.

Herstellung der Hydroxamate aus Fett: Man kocht 100 mg des wasserfreien Fettes 2–3 min mit 1 ml 1-m. Hydroxylaminchlorhydratlösung und 2 ml KOH, filtriert vom KCl ab und neutralisiert mit einer Essigsäure, die durch Verdünnen von Eisessig mit Tetrahydrofuran auf das fünffache Volumen hergestellt wurde.

Papier

Whatman 1 mit 20–25 % Acetyl. – Heute sind entsprechende, jedoch auf anderer Basis hergestellte, acetylierte Papiere aus Schleicher & Schüll 2043b und 2045b mit 20 bis 25 % Acetyl im Handel sowie auch ein über 90 % acetyliertes Papier 2043a.

Tab. 31. R_F -Werte von Fettsäuren als Hydroxamate¹⁷

Papier: etwa 25 % Acetyl

Fließmittel: Essigsäureäthylester/Tetrahydrofuran/Wasser = 0,6 : 3,5 : 4,7 (v/v/v)

Substanz	R_F	Substanz	R_F
Valeriansäure . .	0,84	Undecylsäure . .	0,40
Capronsäure . .	0,72	Laurinsäure . .	0,38
Önanthsäure . .	0,64	Myristinsäure . .	0,34
Caprylsäure . .	0,57	Palmitinsäure . .	0,30
Pelargonsäure . .	0,51	Stearinsäure . .	0,24
Caprinsäure . .	0,46	Ölsäure	0,30
		Erucasäure . . .	0,22

Fließmittel

Essigsäureäthylester/Tetrahydrofuran/Wasser = 0,6 : 3,5 : 4,7 (v/v/v).

Identifizierung

2 % FeCl₃ in Äthanol/Butanol = 1 : 4 gelöst. Rote bis rotbraune Flecken.

e) Phosphatide

Allgemeines

Hier sind vor allem die Arbeiten von HUENNECKENS¹⁸, KAUFMANN und BUDWIG¹⁹ sowie HACK²⁰ wegleitend.

Papier

Sowohl unbehandeltes als auch hydrophobiertes Papier wurde benutzt, die Trennungen erfolgten also z. T. als «reversed phase»-Verfahren.

Fließmittel

HUENNECKENS¹⁸ gibt eine Anzahl an, zugleich mit den bei verschiedenen Substanzen erzielten R_F -Werten:

Tab. 32

Substanz	1	2	3	4
Ungesättigtes Lecithin (Dipalmitolein)	0,81	0,89	0,78	0,86
Gesättigtes Lecithin . . .	0,87	0,89	0,78	0,86
Ungesättigtes Lysolecithin .	0,70	0,87	0,80	0,80
Gesättigtes Lysolecithin . .	0,67	0,89	0,61	0,85
α -Monopalmitin	0,93	0,92	0,91	0,90
α,β -Dipalmitolein	0,93	0,88	0,91	0,92
Ölsäure	0,95	0,92	0,94	0,94
Glycerylphosphorylcholin .	0,00	0,70	0,25	0,76
β -Glycerophosphat	0,00	0,46	0,03	0,07
Phosphorylcholin	0,00	0,45	0,00	0,08
Cholin	0,11	0,72	0,30	0,40

1 = *n*-Butanol, wassergesättigt

2 = Äthanol/Wasser = 8 : 1

3 = *n*-Propanol/Wasser = 8 : 1

4 = *n*-Propanol/Eisessig/Wasser = 8 : 1 : 1

Andere empfohlene Fließmittel sind:

Für die Trennung von Hydrolysenprodukten des Lecithins: Phenol/Wasser und *n*-Butanol/Morpholin/Wasser.

Für die Trennung von Lecithinen und Kephallinen: Chloroform/Äthanol/Wasser = 160 : 40 : 5.

Zur Trennung der Lipide des menschlichen Serums: 1. Eisessig, Petroläther, Chloroform und Eisessig, Wasser, Methanol. – 2. Petroläther, Chloroform und wäßriges Methanol.

Die beiden vorstehenden Fließmittelkombinationen sollen so angewandt werden, daß sie im Versuch zugleich absteigend und aufsteigend laufen, so daß sie sich direkt über den Flecken treffen. Die eine stellt also zugleich für die zweite die stationäre Phase.

KAUFMANN und BUDWIG benutzten Papier 2043b und das zweidimensionale Verfahren zur Trennung von Blutlipiden. Das Papier wurde vorher mit Essigsäuredämpfen sauer eingestellt.

Fließmittel: 1. Dimension: Gemische aus Methanol und Aceton. 2. Dimension: Äthanol + Äther.

Tab. 33. Identifizierung der Lipide

Substanz	Identifikation durch
Phospholipide . . .	0,005 % Rhodamin G, Betrachten im UV-Licht
Cholinlipide . . .	0,05-m. REINECKES Salz: $[\text{Cr}(\text{CNS})_4(\text{NH}_3)_2]^- (\text{NH}_4)^+$ Tauchen während 2 Stunden, rosa Flecken Jodjodkali, 0,0001-m. in wäßriger Lösung 0,1-m. Kaliumbichromat 0,005-m. Phosphormolybdänsäure 0,01-m. Bebricher Scharlach
Aminolipide . . .	Ninhydrin wie bei Aminosäuren
Acetallipide . . .	Wäßrige 0,005-m.-Lösung von Mercurchlorid
Phosphorsäureester	wie bei Phosphaten üblich, Molybdänblaureaktion
Glucolipide	Oxydation mit wäßriger Perjodsäure und Behandlung mit Fuchsin-Bisulfidlösung
Neutralfette . . .	Nilblau oder Sudanschwarz (0,1 g in 100 ml 50 prozentigem Äthanol)
Lipoproteide . . .	Ölrot O, gesättigte Lösung in 60 prozentigem Methanol

f) Steroide und herzwirksame Glykoside

Allgemeines

Die sehr geringe Wasserlöslichkeit der Steroide macht auch hier fast immer die Anwendung des Verfahrens der umgekehrten Phasen notwendig, wenn auch die ersten Arbeiten meist andere Wege gingen, nämlich entweder durch Trennung in Form der Hydrazone mit Hilfe des GIRARD-Reagens oder durch Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxydpapier.

Papier

Die Literatur gibt meistens Whatman 1 oder 2043b von Schleicher & Schüll an und empfiehlt die verschiedensten Formen der Vorbehandlung:

Imprägnierung mit Silikonen.

Imprägnierung mit Quilon.

Tränkung mit verschiedenen hochsiedenden Lösungsmitteln.

Letztere wirken dann auf dem Papier als stationäre Phase, d. h. sie übernehmen die Rolle des Wassers im normalen Chromatogramm, wobei die Frage zunächst noch offen bleibt, ob auch hier die Möglichkeit zur Bildung eines Cellulose-Lösungsmittel-Komplexes gegeben ist.

Die Auswahl des Imprägnierungsmittels richtet sich nach der Natur der zu trennenden Steroide, wobei im großen und ganzen folgende Regeln aufgestellt werden können²¹:

Literatur siehe S. 239–40

Natur des Steroids	Imprägnierungsmittel
1. Stark polare Steroide Ketosteroide, <i>Digitalis</i> -Glucoside Phenolische Steroide	Propylenglykol Äthylenglykol, Glycerin, Caprylalkohol
2. Schwach polare Steroide oder Acetate	Äthylenglykolmonophenyläther
3. Dazwischenliegende	Propylenglykol

Weiterhin werden zur Imprägnierung empfohlen:

Triglyceride
Chlor- oder Bromnaphthalin
Höhere Alkohole und Formamid
Phenylcellosolve
Heptanol
1,3-Butandiol

Es wird häufig absteigend im Durchlaufchromatogramm gearbeitet. Man läßt dann meistens die wenig polaren Steroide ablaufen und untersucht sie gesondert. Auf dem Originalchromatogramm trennt man die stärker polaren Steroide.

Es muß besonders gut auf den richtigen Gehalt an stationärer Phase geachtet werden. Die Steroide befinden sich von ihrer Isolierung her oft in methanolischer Lösung.

Fließmittel

Diese sollen alle mit der stationären Phase gesättigt sein und werden weitgehend auf diese abgestimmt. Siehe Tab. 34a und b.

Bei der Trennung der Steroide ist die Gewinnung der Lösungen der zu chromatographierenden Substanzgemische von besonderer Wichtigkeit.

Nur drei Beispiele aus dem reichlichen Schrifttum seien zitiert:

1. *Extraktion von Corticosteroiden aus dem Blut*²⁴: Plasma aus Citratblut, mit der gleichen Wassermenge verdünnt, wird mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Dieser Extrakt wird mit 0,2-n Sodalösung und mit Wasser gewaschen und im Vakuum zur Trockne verdampft. – Die Lösung des Rückstandes in einem Gemisch aus Petroläther/Äthylacetat = 1:1 wird über Silikagel gereinigt, im Vakuum zur Trockne gedampft, in Äthylchlorid aufgenommen und zur Chromatographie benutzt.

2. *Extraktion von Östrogenen aus menschlicher Placenta*²⁵: Methanolextrakt aus Placenta, das Methanol wird im Vakuum abgedampft, der Rückstand mit Äther extrahiert. Waschung mit 9 % NaHCO₃, Abdampfen im Vakuum, Aufnehmen des Rückstandes in Benzol. Die benzolische Lösung wird mit Wasser ausgeschüttelt, Östriol löst sich, Östron und Östradiol bleiben zurück. – Der wäßrige Auszug wird mit Äther extrahiert, zum Ätherextrakt wird auf 18 Teile Äther 1 Vol. Tetrachlorkohlenstoff zugefügt. Dann Extraktion mit n-NaOH. Der NaOH-Auszug wird mit Schwefelsäure auf pH 9 gebracht, dann mit Äther extrahiert. Nach Abdampfen liegt der Östriolanteil vor. – Der benzolische Anteil wird zur Gewinnung des Östrons und Östradiols mit n-NaOH behandelt und dann weiterhin wie das Östriol. Der endgültige Rückstand wird in Äthanol aufgenommen.

Tab. 34a. Fließmittel (bewegliche Phase) zur Trennung von Steroiden (herzwirksamen Glucosiden)

Sämtliche Fließmittel müssen mit der stationären Phase gesättigt werden

Stationäre Phase	Fließmittel	Autoren und Gebiete
Formamid	Benzol Benzol/Chloroform = 9 : 1 und 5 : 5	SCHINDLER (1951) HASSALL (1951) ZAFFARONI (1950, 1951) HOFMANN (1951) Herzwirksame Glucoside, Aglykone, Neben- nierenrindensteroid
	o-Dichlorbenzol, Methylenchlorid, Cyclohexen, Dekalin	AXELROD (1953) Östrogene
Formamid/Wasser = 4 : 1	n-Butanol/Toluol = 1 : 1 n-Butanol, wassergesättigt	REICHSTEIN u. a. (1954) Herzwirksame Glykoside und Aglykone
	Benzol/Chloroform = 7 : 5	REICHSTEIN u. a. (1954–1955) <i>Strophantus</i> -Glucoside
	Benzol/Chloroform = 9 : 1 und 7 : 5 Butanol/Pyridin/Wasser = 6 : 4 : 3	SIGG, TAMM, REICHSTEIN (1955) Glucoside aus <i>Thanginia venenifera</i>
Propylenglykol	Toluol Toluol/Methanol = 1 : 1	ZAFFARONI (1951), SCHWARTZ (1953) Corticosteroide
	Ligroin, Heptan	BRADY (1951), Testosteron
	Ligroin/Propylenglykol in wechselnden Verhältnissen	SAVARD (1953) Monooxy-monoketosteroide, Monooxy- diketo-steroid, Triketosteroide aus Harn und Gewebe
	Benzol/Cyclohexan = 1 : 1	KOCHAKIAN (1952), C ₁₉ -Steroide
	Benzol/Chloroform = 1 : 1	REICHSTEIN, URSCHALER, TAMM (1954–1955) Krötengifte aus <i>Parotis</i> -Drüsen und Haut der Europäischen Erdkröte
Propylenglykol/Wasser	Benzol/Chloroform = 1 : 1, mit stationärer Phase gesättigt	REICHSTEIN, URSCHALER, TAMM (1955) Krötengifte aus <i>Parotis</i> -Drüsen und Haut der Europäischen Erdkröte
Äthylenglykolmonophenyl- äther	Heptan	NEHER (1952) wenig polare Steroide, gesättigt oder unge- sättigt mit verestertem OH- oder -COOH
	Heptan-Phenylcellosolve	RUBIN (1953) sehr schwach polare 17-Ketosteroide
Heptanol	Wasser/Heptanol = 10 : 1 (organische Phase)	SCHMIDT (1953), Corticosteroide
Butandiol	Methylcyclohexan	AXELROD (1953) Allopregnan-3,20-dion und Pregnan-3,20-dion Progesteron, Androstan-3,17-dion, 5-Iso- androsten-3,17-dion
Natrium-p-Toluolsulfonat	Toluol	BOSKOTT (1952) neutrale Ketosteroide, Östrogene
	Chloroform/Benzol/n-Ammoniak = 1 : 9 : 1	natürliche Östrogene

Tab. 34b

Für Aluminiumoxyd-imprägnierte Papiere werden empfohlen

Fließmittel	Autor, Jahr, Arbeit
Benzol	BUSH (1950) Östrogenhormone, Acetate von Desoxycorticosteron 11-Dehydrocorticosteron, 17-Oxycorticosteron Corticosteron
Tetralin	BUSH (1950) Östron, Testosteron, Androsteron
Aceton	BUSH (1952) 21-Acetate der Corticosterongruppe
Hexan, Äther Hexan/Äther = 19 : 1 und 15 : 5	SHULL (1952) neutrale Steroide

Für Silikone- und Quilon-behandeltes Papier wurden benutzt:

Fließmittel	Autor, Jahr, Arbeit
Wasser/Äthanol/Chloroform = 6 : 10 : 10	KRITCHEVSKY (1951) 3,17-Androstandion, δ^4 -3,17-Androstandion, Androsteron, Isoandrosteron, Dehydroisoandrosteron, Testosteron
Äthanol/Wasser = 8 : 2	KRITCHEVSKY (1952) Cholesterin und Cholestenon

Auch die Verwendung unbehandelter Papiere hat zu Erfolgen geführt

Fließmittel	Autor, Jahr, Arbeit
Petroläther/Toluol/Äthanol/Wasser = 20 : 10 : 1 : 9	Trennung 17- α -Östradiol von 17- β -Östradiol
Petroläther/Methanol/Wasser = 10 : 8 : 2 Toluol/Petroläther/Methanol/Wasser = 5 : 5 : 7 : 3	BUSH (1952, 1953) Nebennierenrindenhormone
Toluol/Methanol/Wasser = 10 : 5 : 5 Benzol/Methanol/Wasser = 10 : 5 : 5 Toluol/Äthylacetat/Methanol/Wasser = 9 : 1 : 5 : 5	BUSH (1952) Herzglykone
Phenol/Methanol/Wasser = 13,5 : 30 : 56,5 Phenol/Methanol/Wasser = 14 : 30 : 56	McMAHON (1950) 7-Dehydrocholesterin von Cholesterin und Ergosterin
<i>n</i> -Butanol, Amylalkohol, Isoamylalkohol, alle wasser- gesättigt	HABERMANN (1953) Trennungen in der <i>Digitalis</i> -Gruppe
Chloroform/Methanol/Wasser = 10 : 2 : 5	OKADA (1952) Herzwirksame Glykoside von Aglykonen in der <i>Digitalis</i> - Gruppe
Äthylacetat/Wasser Äthylacetat/wäßriges Natriumbenzoat <i>n</i> -Butanol/Wasser, Äthylloxalat/Wasser, Äthylmethylketon/Wasser, Chloroform/Wasser <i>n</i> -Butanol/Toluol = 1 : 1	HASSALL (1952) 7 verschiedene herzwirksame Glykoside SCHINDLER (1955) Herzwirksame Glykoside
<i>n</i> -Butanol/Toluol = 9 : 1 und 1 : 1	URSCHELER und TAMM (1955) Herzwirksame Glykoside

Tab. 35. Farbreagenzien zur Entdeckung von Östrogenen im Papierchromatogramm

Reagens	Erfassungsgrenze in Mikrogramm		α -Östradiol	β -Östradiol	Östron	Östriol	17-Äthynil- östradiol	Diäthyl- stilböstrol
15% Rauchd. Schwefelsäure	5	Farbe Fluoreszenz	orange gelb gelbgrün	orange gelb grün	orangebraun grüngelb	rötlichbraun rötlichgrün	rotbraun gelborange	ocker rotbraun
Benzoylchlorid Zinnchlorid	10	Farbe Fluoreszenz	orangebraun grüngelb	orangerot gelb	orangebraun gelb	rötlichviolett dunkelrot	hellrot orange	graustichig braun rosa
Phenolsulfonat Phosphorsäure	10	Farbe Fluoreszenz	hellgrün blaugrün	grüngelb grün	orangebraun violettrosa	gelblichrot hellrot	hellrot gelborange	orange —
Salpetrige Säure Quecksilberchlorid	15	Farbe Fluoreszenz	gelbbraun purpurbraun	gelbbraun zinnoberrot	gelbbraun purpurbraun	gelbbraun purpurbraun	gelbbraun purpurbraun	gelbbraun purpurbraun
Antimonpentachlorid	15	Farbe	braun	purpurblau	ocker	gelbbraun	braun	karminrot
Eisenchlorid	20	Farbe	purpur	weinrot	purpur	purpur	purpur	purpur
Bromwasser	5	Farbe	—	—	—	—	—	karminrot

3. *Extraktion von Herzglykonen aus Strophantus-Samen*²⁸: Die vermahlene Saat wird 2 Stunden mit Athanol extrahiert, der eingengte und mit Wasser verdünnte Extrakt mit Petroläther extrahiert. Die wäßrige Lösung wird mit 0,1-n Schwefelsäure verdünnt und 30 min unter Rückfluß gekocht. Dann wird mit Chloroform extrahiert und dieser Extrakt bei 1 g Ausgangsmaterial auf 5 ml zum Zwecke der Chromatographie eingedampft.

Identifizierung der Östrogene siehe Tab. 35.

Anwendungen

Im Verlauf der letzten fünf Jahre wurde im Schrifttum vieler Länder eine große Anzahl von Arbeiten auf diesem Gebiet publiziert. Eine Anzahl von ihnen sind in Tabellen 34 a und b vermerkt. Vor allem von REICHSTEIN, TAMM, SCHINDLER und dem gesamten Basler Mitarbeiterkreis kam eine große Anzahl sehr wertvoller Arbeiten zur Publikation. Beispiele: Herzglykoside und Aglykone aus *Strophantus*-Arten, *Cheirantus*-Arten und vielen anderen. Nebennierenrindenhaltstoffe, herzwirksame Glykoside aus Hautsekreten und *Parotis*-Drüsen der Erdkröte. — Außerdem gibt es einschlägige wichtige Arbeiten von TH. WIELAND und einem nordischen Arbeitskreis. Sie alle zu erwähnen, würde zu weit führen.

g) Gallensäuren

Allgemeines

Gallensäuren wurden bereits 1952 von KRITCHEVSKY³⁰ anionisch getrennt, mit Hilfe alkalischer Fließmittel. Andere Autoren trennten sie in Form neutraler Moleküle oder als GIRARD-T-Hydrazone.

Fließmittel

Isopropyläther/Heptan = 7 : 3, mit 70prozentiger Essigsäure gesättigt (letztere ist auch stationäre Phase im Papier).

Toluol/Eisessig/Wasser = 5 : 5 : 1

n-Butanol/n-Propanol/Wasser = 6 : 2 : 1

Identifizierung

Phosphorsäure (85 %)/Wasser/Äthanol = 85 : 25 : 25 daneben:

Phosphormolybdänsäure
Rhodamin B
m-Dinitrobenzoesäure
Jod

Literatur

- 1 F. BRYANT und B. T. OVERELL, *Biochim. Biophys. Acta* 10 (1953) 471.
- 2 J. W. H. LUGG und B. T. OVERELL, *Nature* 160 (1947) 86. J. B. STARK, A. E. GOODBAN und H. S. OWENS, *Anal. Chem.* 23 (1951) 413. F. BRYANT und B. T. OVERELL, *Nature* 168 (1951) 167. I. OPIENSKA-BLAUTH u. a., *Nature* 168 (1951) 511. R. I. CHEFTEL, R. MUNIER und M. MACHEBŒUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33 (1951) 840. A. R. JONES, E. J. DOWLING und W. J. STRABA, *Anal. Chem.* 25 (1953) 394. J. W. AIRAN, G. V. JOSHI, I. BARNABAS und R. W. P. MASTER, *Anal. Chem.* 25 (1953) 659.
- 3 A. G. LONG, J. R. QUAYLE und R. I. STEDMAN, *J. Chem. Soc.* 1951, 2197. A. R. JONES, E. J. DOWLING und W. J. STRABA, *Anal. Chem.* 25 (1953) 394. F. BROWN und L. P. HALL, *Nature* 166 (1950) 66. R. E. HISCOX und N. J. BERRIDGE, *Nature* 166 (1950) 522. R. I. CHEFTEL, R. MUNIER und M. MACHEBŒUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34 (1952) 380. R. L. REID und M. LEDERER, *Biochem. J.* 50 (1951) 60.
- 4 A. R. THOMPSON, *Austral. J. Sci. Res.*, B 4 (1951) 180.
- 5 E. P. KENNEDY und A. H. BARKER, *Anal. Chem.* 23 (1951) 1033.
- 6 F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.* 55 (1953) 824.
- 7 K. FINK und R. M. FINK, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70 (1949) 654.
- 8 Auswahl nach H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 91, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955.
- 9 R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 166, New York 1955.
- 10 F. SMITH und D. SPRIESTERSBACH, *Nature* 174 (1954) 466.

nannte R_L -Werte, wobei sie die vordere Front des Fleckens als Meßpunkt benutzen statt des Massenschwerpunktes. Sie finden unter diesen Umständen gewisse Regeln der Lage heraus:

Mono-Oxybenzole . . .	R_L = über 0,9
Dioxybenzole . . .	R_L = 0,8 bis 0,9
Trioxybenzole . . .	R_L = 0,6

Man kann aus einem unbekannten Gemisch, also z. B. Teerfraktionen, erst Gruppentrennungen durchführen und diese weiter auftrennen.

Tab. 39. Trennung einfacher Phenole

Fließmittel: Benzol/Cyclohexan = 1 : 12
 Papier: 2043b Gl. mit 4prozentiger Sodalösung besprüht
 Methode: aufsteigend, geformte Streifen
 Sprühreagens: Diazosulfanilsäure

Substanz	R_F -Wert	Farbe
Phenol	0,12	gelb
o-Kresol	0,49	rot
m-Kresol	0,27	ocker
p-Kresol	0,30	violett
2,3-Dimethylphenol	0,68	braun
2,4-Dimethylphenol	0,69	rosa
2,5-Dimethylphenol	0,69	rot
3,4-Dimethylphenol	0,47	violett
3,5-Dimethylphenol	0,51	braun

Tab. 40. Trennung einfacher Phenole

Fließmittel: Benzol/Cyclohexan 1 : 10
 Papier: 2043b Gl. mit 4prozentiger Sodalösung besprüht
 Methode: aufsteigend, geformte Streifen
 Sprühreagens: Diazosulfanilsäure

Substanz	R_F -Wert	Farbe
Brenzkatechin	0,01	gelb
Resorcin	0,00	rot
4-Oxyhydrinden	0,69	violett
5-Oxyhydrinden	0,57	ocker
3-Methyl-5-Äthylphenol	0,70	ocker
Isopseudocumenol	0,85	violett
4-tert. Butylphenol	0,68	ocker
α -Naphthol	0,30	violett
β -Naphthol	0,21	rot

Identifizierung

1. PAULYS Reagens: Wie bereits beschrieben.

2. Diazotiertes p-Nitranilin: 25 ml einer 0,3prozentigen Lösung von p-Nitranilin in 80% HCl mit 1,5 ml einer 5prozentigen Natriumnitritlösung mischen. Sprühen, mit 20prozentigem Natriumcarbonat nachsprühen.

3. pH-Indikatoren: 5 Teile einer 0,1prozentigen Methylrotlösung mit 10 Teilen 0,667-mol. Phosphatpuffer mischen, auf $pH = 7$ bringen. Statt dessen können weiter pH-Indikatoren benutzt werden.

4. Ammoniakalische Silberlösung, 0,1 mol.

5. 0,1% $FeCl_3$: Nach eigener Erfahrung für Oxy Säuren am besten pH-Indikatoren, jedoch bei ammoniakhaltigen Fließmitteln erst nach Kurzerhitzung auf 150°C, um etwa vorhandenes Ammoniak zu vertreiben.

Für Phenole Diazosulfanilsäure.

Einige Anwendungen aus der Literatur

Studium des Nitrophenolstoffwechsels im Harn, ROBINSON (1951)³.

Polyphenole in Teeblättern, ROBERTS (1951)⁴.

Stoffwechsel der Oxybenzoesäuren im Harn, BRAY (1950)⁵.

Studium der Phenolfractionen des Steinkohlenteers⁶.

Identifizierung von Konservierungsmitteln in Lebensmitteln u. a.⁷

Phenolstoffwechsel im Harn, BOSCOTT⁸.

Literatur

¹ H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 221, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955.

² E. TERRES, F. GEBERT u. a., *Brennstoff-Chem.* 1955, 67, 78, 228, 272, 275, 289, 359.

³ D. ROBINSON, J. N. SMITH und R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* 50 (1951) 221.

⁴ E. A. H. ROBERTS und D. J. WOOD, *Biochem. J.* 49 (1951) 414.

⁵ H. G. BRAY, W. V. THORPE und K. WHITE, *Biochem. J.* 46 (1950) 271.

⁶ E. TERRES, F. GEBERT u. a. *Brennstoff-Chem.* 1955, 67, 78, 228, 272, 275, 289, 359.

⁷ R. JARCZYNSKI und F. KIERMEIER, *Z. Lebensmittel-Unters. Forsch.* 100 (1955) 195.

⁸ R. J. BOSCOTT, *Abstr. 2. Intern. Congr. Biochem. Paris 1952*, S. 349.

9. Phosphat in anorganischer und organischer Bindung

Allgemeines. Es sind mehrere Gebiete, auf denen ein Phosphatnachweis interessiert:

Anorganisch: Trennung der einfachen und Polyphosphate.

Organisch: Zuckerphosphate und Adenosinphosphate. Nukleinsäuren.

Anorganisches Phosphat

Hier sind vor allem zwei Forschergruppen tätig, nämlich diejenige von EBEL in Straßburg¹ sowie THILO und Mitarbeiter in Berlin².

Angewandte Mengen: Nach THILO benutzt man durchweg Lösungen, die einem Mikrogramm pro Mikroliter entsprechen.

Das wären für $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ 7,2 mg des Salzes in 1 ml Wasser. Bei den höheren, schwieriger zu dosierenden Phosphaten, vor allem dem durch wechselnden Wassergehalt durchweg flüssigen Tetraphosphat, sorgt man zumindest, daß die Phosphormenge nicht zu hoch wird, etwa 5 Mikrogramm.

Je nach Zahl der zu erwartenden Komponenten ist meist 10 bis 20 mg Phosphor pro ml Wasser die richtige Konzentration, wovon 1 Mikroliter aufgetragen wird.

Papier: Bei der Trennung der Phosphate hat es sich vor allem als zweckmäßig erwiesen, Papiere zu benutzen, die so mineralstoffarm sind, daß ihr Kalk- und Magnesiumgehalt nicht mehr stören kann, da sonst Bindung des Phosphats an diese Mineralstoffe stattfindet und diese daher nicht wandern können.

EBEL benutzte zunächst Whatman-Papiere, die er mit einer alkoholischen Lösung von 8-Oxychinolin vorwusch. THILO empfiehlt die Benutzung der käuflichen, mit Säure gewaschenen Papiere:

Literatur siehe S. 246

Schleicher & Schüll Nr. 2040 a ausgewaschen

Nr. 2043 a »

Nr. 2043 b »

bei denen eine Vorwäsche nicht mehr notwendig ist. THILO benutzte das aufsteigende Verfahren und empfiehlt die Anwendung geformter Streifen, mit denen man schärfere Trennungen erzielt.

Fließmittel: In sinnvollen Versuchsreihen hat EBEL die besten Fließmittelkombinationen herausgefunden, die auch von THILO angewandt werden:

Tab. 41

A. Saure Fließmittel	
1.	75 ml Isopropanol, 25 ml Wasser 5 g Trichloressigsäure 0,3 ml Ammoniak (20prozentig)
2.	70 ml Isopropanol, 10 ml Wasser 20 ml 20prozentige Essigsäure 0,3 ml Ammoniak (25prozentig)
B. Ammoniakalische Fließmittel	
3.	40 ml Isopropanol, 20 ml Isobutanol 39 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25prozentig)
4.	20 ml 20prozentige Essigsäure 0,3 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25prozentig)

Dabei ist das saure Fließmittel 1 besonders geeignet, die niedermolekularen Poly- und Metaphosphate zu trennen, für höher kondensierte Oligophosphate empfiehlt THILO das saure Fließmittel 2. THILO rät zur Herstellung von jeweils zwei Chromatogrammen der gleichen Substanz, wobei das erste mit saurem, das zweite mit ammoniakalischem Fließmittel läuft. Mit dem letzteren erhält man vor allem die Metaphosphate mit ringförmigem Anion klar.

Identifizierung: Diese erfolgt praktisch immer durch die Molybdänblaureaktion nach HANES und ISHERWOOD³, mit folgendem Sprühreagens:

1 g Ammoniummolybdat
85 ml Wasser
10 ml *n*-HCl
5 ml 60prozentige Überchlorsäure

Man sprüht nach kurzem Erhitzen und entwickelt das Molybdänblau durch kurze Bestrahlung mit UV-Licht.

Ringförmige Metaphosphate benötigen dabei eine längere Bestrahlung als andere. Monophosphat zeigt sich sofort gelb, die anderen brauchen eine bestimmte Zeit. Statt der UV-Bestrahlung kann auch eine Begasung mit Schwefelwasserstoff angewendet werden.

THILO bringt sowohl die R_F -Werte der Phosphate als auch ihre Positionskonstanten, P_K -Werte genannt, welche als Bezugssubstanz das charakteristische Monophosphat benutzen, also in gewissem Sinne dem R_G -Wert bei den Zuckern nahestehen.

Anwendung

Beispiel: Aufklärung der Hydrolyse des Phosphor-trichlorids, -bromids und -jodids. Es konnte festgestellt werden, daß bei der Hydrolyse von PCl_3 unter milden Bedingungen sich bis zu 75% Pyrophosphit bildet. Im alkalischen Medium konnte ein bislang unbekanntes Iso-subphosphat und noch eine Reihe weiterer Verbindungen mit P-O-P-Bindungen und P-P-Bindungen isoliert werden⁴.

Praktisches Interesse findet das Gebiet der Papierchromatographie der anorganischen Phosphate vor allem in der Waschmittelindustrie und in der Lebensmittel-

Tab. 42. Anorganische Phosphate, R_F -Werte und Positionskonstanten (P_K -Werte)

Phosphat	Fließmittel 1			Fließmittel 2		
	R_F gef.	P_K gef.	P_K ber.	R_F gef.	P_K gef.	P_K ber.
Monophosphat $(\text{PO}_4)^{3-}$	0,69	100	100	0,73	100	100
Diphosphat $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$	0,44	63,8	63,1	0,53	72,6	73,1
Triphosphat $(\text{P}_3\text{O}_{10})^{5-}$	0,29	42,0	39,8	0,39	53,4	53,4
Tetraphosphat $(\text{P}_4\text{O}_{13})^{6-}$	0,17	24,6	25,1	0,29	39,7	39,1
Pentaphosphat $(\text{P}_5\text{O}_{16})^{7-}$	0,11	15,9	15,9	0,22	30,1	28,6
Hexaphosphat $(\text{P}_6\text{O}_{19})^{8-}$	0,07	10,1	10,0	0,16	21,9	20,9
Heptaphosphat $(\text{P}_7\text{O}_{22})^{9-}$	0,04	5,8	6,3	0,11	15,1	15,2
Oktaphosphat $(\text{P}_8\text{O}_{25})^{10-}$	—	—	4,0	0,08	11,0	11,1

Tab. 43. Anorganische Phosphate, R_F -Werte und Positionskonstanten (P_K -Werte)

Phosphat	Fließmittel 3			Fließmittel 4		
	R_F gef.	P_K gef.	P_K ber.	R_F gef.	P_K gef.	P_K ber.
Trimetaphosphat $(\text{P}_3\text{O}_9)^{3-}$	0,53	160		0,64	156	
Tetrametaphosphat $(\text{P}_4\text{O}_{12})^{4-}$	0,40	121		0,50	122	
Monophosphat $(\text{PO}_4)^{3-}$	0,33	100		0,41	100	
Diphosphat $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$	0,24	73		0,31	76	
Triphosphat $(\text{P}_3\text{O}_{10})^{5-}$	0,24	73		0,31	76	
Tetraphosphat $(\text{P}_4\text{O}_{13})^{6-}$	(0,20)	(61)		(0,26)	(63)	

kontrolle zum Nachweis zugesetzter Polyphosphate zu Fleischwaren⁵. Letzterer ist im Augenblick noch etwas problematisch durch die Tatsache, daß Polyphosphate unter dem Einfluß des schwach sauren pHs und der Feuchtigkeit in Wurstwaren leicht hydrolysieren und dann nur noch als Orthophosphat nachweisbar sind, das sich ohnehin im Fleisch findet.

Nukleinsäuren

Als Nukleinsäuren bezeichnet man bekanntlich Polynukleotide, d. h. Makromoleküle, die sich aus einer großen Zahl chemisch verknüpfter Nukleotide zusammensetzen.

Als Nukleotide, welche Kettenglieder der Nukleinsäuren bilden können, waren mit Sicherheit feststellbar⁶:

Purin-Nukleotide:

Adenylsäure (Adenin – Pentose – Phosphorsäure)

Guanylsäure (Guanin – Desotose – Phosphorsäure)

Pyrimidin-Nukleotide:

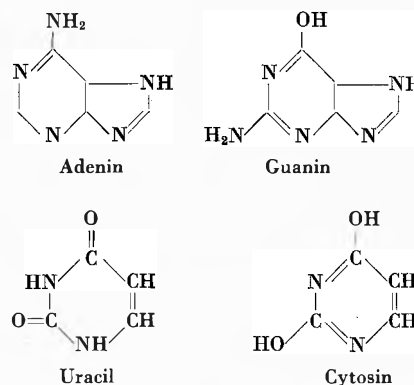
Uridylsäure (Uracil – Pentose – Phosphorsäure)

Cytodylsäure (Cytosin – Pentose – Phosphorsäure)

5-Methylcytidylsäure (Methylcytosin – Pentose – Phosphorsäure)

Als vorwiegend auftretende Pentosen hat man D-Ribose und die D-2-Desoxyribose feststellen können,

beide in der Furanoseform. Nach SIGNER und BÜTLER⁶ haben Ribosenukleinsäuren (RNS) und Desoxyribosenukleinsäuren (DNS) den schematischen Aufbau, der auf dieser Seite unten dargestellt ist.

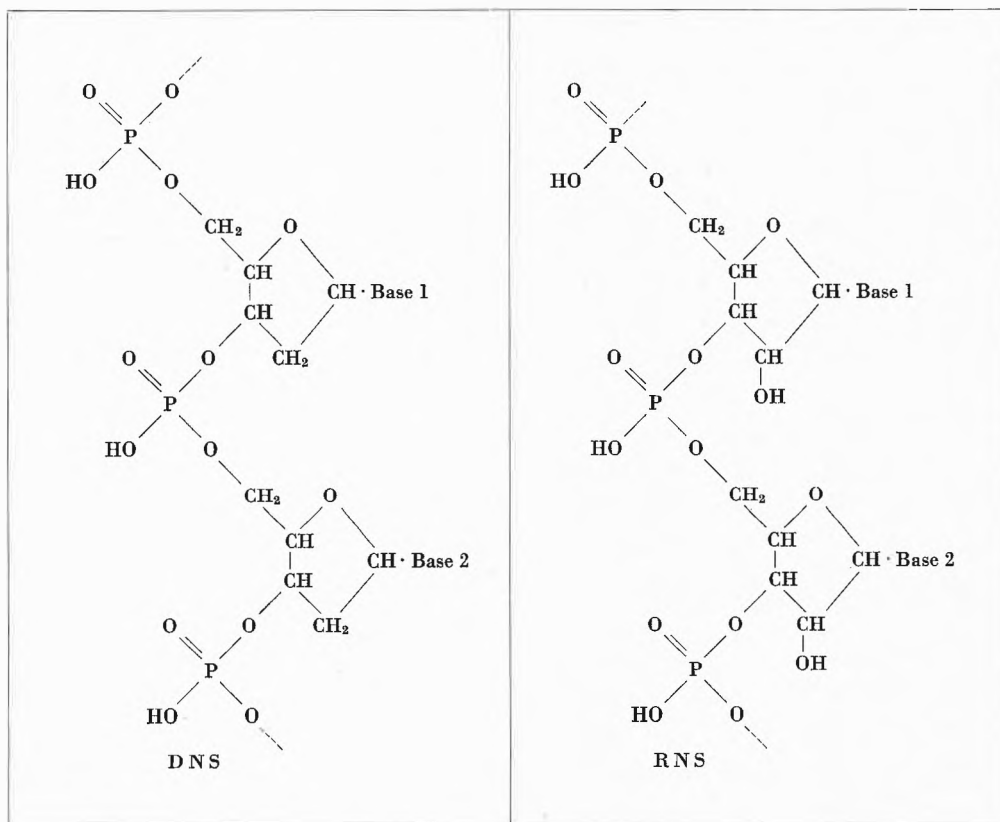


Als Nukleosid bezeichnet man die Kombination Base + Zucker, also die phosphorfreie Verbindung.

Die Papierchromatographie der Nukleinsäuren, z. B. mit dem Ziel der Bausteinanalyse einer Nukleinsäure, wird also immer auf Grund der Trennung und Identifizierung der Komponenten nach vorheriger saurer oder alkalischer Hydrolyse erfolgen.

Die Extraktion der Nukleinsäuren aus pflanzlichem Material geschieht vor allem nach drei Methoden:

Aufbau der Ribosenukleinsäuren (RNS) und der Desoxyribosenukleinsäuren (DNS)



1. Extraktion der Gewebe mit 10prozentiger Trichlor-essigsäure,
2. Extraktion mit 0,1prozentiger, 0,2prozentiger oder *n*-Überchlorsäure,
3. Extraktion mit Salzlösungen, z. B. mit 0,14-m. NaCl bei Gegenwart von 0,01-mol. Natriumcitrat.

Die Hydrolyse der isolierten Nukleinsäuren kann mit verschiedenen Agenzien in Richtung auf verschiedene Endziele erfolgen⁷:

1. *Hydrolyse zur Freisetzung von Purinen und Pyrimidinen*, z. B. mit Salzsäure verschiedener Konzentration. Angegeben werden:
 - 1,5prozentige methanolische Salzsäure 20 Stunden bei 37°C.
 - 1-n Salzsäure 1 Stunde bei 100°C.
 - 2prozentige Schwefelsäure 3 Stunden bei 100°C.
 - 6-n Salzsäure 2 Stunden bei 120°C.
2. *Hydrolyse auf Nukleotide*
 - 1-n NaOH 18 Stunden bei 100°C.
3. *Hydrolyse auf Nukleoside*
 - 1-n Salzsäure 1 Stunde bei 100°C.

Die Nukleoside entstehen neben den Purinen.

Papierchromatographisch interessant wird also sein:

1. die Chromatographie von Nukleotiden
2. die Chromatographie von Nukleosiden
3. die Chromatographie von Purinen und Pyrimidinen
4. die Chromatographie von Pentosen
5. der chromatographische Nachweis der Phosphorsäure

Nukleotide⁸

Fließmittel: Eine Tabelle über Fließmittel und die dabei erzielten R_F -Werte bringt LINSKENS⁷ (siehe Tab. 44).

Identifizierung

1. Nachweis des Phosphorsäurerestes

Nach HANES und ISHERWOOD⁹: 5 ml 60prozentige Überchlorsäure (g/g), 10 ml *n*-HCl, 25 ml 4prozentiges Ammoniummolybdat (g/v), mit Wasser zu 100 ml aufgefüllt. Man trock-

net das Chromatogramm, sprüht, trocknet wiederum mit Hilfe des Föhns, darauf 7 min auf 85°C. Man läßt das Papier sich wieder auf Luftfeuchtigkeit einstellen und begast dann mit Schwefelwasserstoff.

2. Identifizierung auf Grund des anhängenden Zuckers

Mit Anilinphtalat, wie bei Zuckern üblich. – Zu diesem Zwecke muß jedoch zunächst eine Hydrolyse auf dem Papier stattfinden, mit Hilfe von Peptonlösung vom pH = 3 oder durch 20prozentige Trichloressigsäure bei 0°C.

3. Identifizierung auf Grund der vorhandenen Purin- und Pyrimidinbasen

Alle Purine und Pyrimidine lassen sich am sichersten anhand ihrer UV-Absorption bei etwa 260 m μ identifizieren. Man bedient sich dabei fast immer des Photoprintverfahrens. Man legt das Chromatogramm auf Photopapier und befestigt beide auf einer konvexen Holzplatte. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberlampe geeigneter Wellenlänge. Durch Vorschalten eines kombinierten Chlorgas-Nickel-Kobalt-Filters filtert man die Wellenlängen 253,7 und 265 m μ heraus.

Filter A: Wäßrige Lösung von Nickelsulfat und Kobaltsulfat (350 g NiSO₄ · 7 H₂O und 100 g CoSO₄ · 7 H₂O auf 1000 ml Wasser). Filterdicke 3 cm.

Filter B: Chlorgas über CaCl₂, Filterdicke 3,5 cm.

Die benutzten Küvetten bestehen aus Quarzglas.

Einige chemische farbgebende Reagenzien eignen sich auch zur Identifizierung der Purine:

1. Modifiziertes DRAGENDORFFS Reagens

2,4 g Bi(NO₃)₃ · 5 H₂O, in 50 ml dest. Wasser gelöst
7,2 g KJ

Man gibt das Jodkali zur Lösung des Wismutsalzes, wobei sich der zunächst entstehende schwarze Niederschlag zu einer klaren roten Lösung löst.

2. Eosin-Quecksilber

Man sprüht das Chromatogramm mit einer 0,2prozentigen Eosin-Sublimat-Lösung:

20 mg Eosin und 3,25 g HgCl₂ in 10 ml 96prozentigem Alkohol.

BLOCK, DURRUM und ZWEIG¹⁰ geben eine Tabelle von Fließmitteln zur Trennung von Purinen, Pyrimidinen und verwandten Stoffen (siehe Tab. 45).

Tab. 44

Fließmittel	R_F -Werte von			
	Adenylsäure	Guanylsäure	Cytidylsäure	Uridylsäure
Phenol/Isopropanol/Ameisensäure/Wasser = 80 : 10 : 10 : 100	0,64 bis 0,65	0,44 bis 0,45	0,50 bis 0,54	0,33 bis 0,34
Phenol/tert. Butanol/Ameisensäure/Wasser = 84 : 6 : 10 : 100	0,70	0,46	0,57	0,35
Phenol/Ameisensäure/Wasser = 90 : 10 : 100	0,70 bis 0,75	0,52 bis 0,54	0,60 bis 0,63	0,41 bis 0,44
Isopropanol/Glycinmonochlorhydrin/ <i>n</i> -HCl = 60 : 30 : 10	0,43	0,36	0,43	0,62
Isopropanol/ <i>n</i> -HCl = 80 : 20	0,62	0,55	0,66	0,82
Tert. Butanol/HCl/Wasser = 70 : 13,2 : 16,8	0,50	0,46	0,56	0,80
Tert. Butanol/Ammoniumsulfat = 80 : 20	0,47	0,41	0,81	0,92
Isopropanol/Ammoniumsulfat, wäßrig gesättigt/Wasser = 2 : 79 : 19	0,16	0,40	0,73	0,73
<i>n</i> -Butanol/Dioxan/Wasser = 4 : 1 : 1 (NH ₃ -Atmosphäre)	—	—	0,09	0,17
<i>n</i> -Butanol/Diäthylenglykol/1,5- <i>n</i> HCl = 4 : 1 : 5	—	—	0,35	0,03
<i>n</i> -Propanol/Ammoniak/Wasser = 6 : 3 : 1	0,30	—	—	—
Isobuttersäure/0,5- <i>n</i> wäßriges Ammoniumisobutyrat = 10 : 6	0,30	—	—	—
Isopropanol/2- <i>n</i> HCl = 65 : 35	—	—	0,61	0,79
5prozentiges Dinatriumphosphat/Isoamylalkohol	0,64 0,74	0,79	0,86	0,86

Tab. 45

Fließmittel	Zu trennendes Gemisch	Autor
Isopropanol/2-n HCl = 65 : 35	Cytidin von Guanin und Adenin	MARKHAM (1951)
7,45-mol. tert. Butanol/0,8-n HCl geschüttelt	Uridin und Cytidylsäure	MARKHAM (1951)
Gesättigte Ammoniumsulfatlösung/Wasser/Isopropanol = 79:10:2	Guanin, Adenin, Cytidin	MARKHAM (1951)
n-Butanol, wassergesättigt	Adenylthiomethylpentose	WEYGAND (1952)
n-Butanol/Wasser/Äthylenglykol/Eisessig = 5:1:5:2	AMP, ADP, ATP	TURBA (1951)
Amylalkohol, wassergesättigt	Thiouracil, Methylthiouracil, Propylthiouracil	LEDERER (1952)
n-Propanol/Ammoniak/Wasser = 60:30:10	Inosin und Adenosinphosphate	WEBSTER (1953)
0,5% Laurylamin in Amylalkohol	Inosinsäure, Adenosindi- und -triphosphate, Adenosin	SNELLMAN (1951)
95prozentiges Äthanol/Amylalkohol/Wasser = 7:5:3	ATP, ADP, AMP	PALADINI (1952)
n-Butanol/Diäthylenglykol/Wasser = 4:1:1 (NH ₃ -Atmosphäre)	Hypoxanthin, Adenin	KREAM (1952)
n-Butanol/Diäthylenglykol/0,1-n HCl = 4:1:1	Xanthin, Guanin	KREAM (1952)
Pyridin/Wasser = 2:1	DPN, DPNH, TPN, TPNH	BURTON (1954)

Nukleoside

LINSKENS bringt eine Zusammenstellung von Fließmitteln und den zugehörigen R_F -Werten, die in Tab. 46 wiedergegeben sei.

Weitere Fließmittel und die zugehörigen R_F -Werte von Purin- und Pyrimidinbasen siehe *Arbeitsmethodik* von C. Schleicher & Schüll, S. 71–3.

Anwendungsgebiete der Papierchromatographie der Nukleinsäuren:

Konstitutionsaufklärung des Baues der Nukleinsäuren in Hefe und Pankreas¹².

Arbeiten auf den Gebieten der Hefe-Ribonukleinsäuren sowie der Muskeladenylsäuren¹³.

Zuckerphosphatstoffwechsel in Leber und Knochenmark¹⁴.

Weitere Anwendungsgebiete siehe die Literaturzusammenstellungen über Papierchromatographie von C. Schleicher & Schüll, Nr. I–V.

Literatur

¹ H. GRUNZE und E. THILO, *Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate*, 2. Aufl., Akademie-Verlag, Berlin 1955. H. GRUNZE, Papierchromatographische Untersuchungen von Natriumpolyphosphatgläsern, in *Silikattechnik* 7 (1956) 134. E. THILO, H. GRUNZE,

J. HÄMMERLING und G. WERZ, Über Isolierung und Identifizierung der Polyphosphate aus *Acetabularia mediterranea*, in *Z. Naturforsch.* 11 B (1956) 266. E. THILO, *Angew. Chem.* 67 (1955) 141. E. THILO, *Forsch. u. Fortsch.* 26 (1950) 284. *Angew. Chem.* 63 (1951) 508. *Chem. Techn.* 4 (1952) 345. Weitere siehe im Index der genannten Publikationen.

² J. P. EBEL und Y. VOLMAR, *C. R. Soc. Biol.* 233 (1951) 415. J. P. EBEL, *C. R. Soc. Biol.* 234 (1952) 621. J. P. EBEL, *Bull. Soc. Chim. France* 10 (1953) 991. Y. VOLMAR, J. P. EBEL und F. B. YACOB, *C. R. Soc. Biol.* 235 (1952) 372. J. P. EBEL, *Bull. Soc. Chim. France* 10 (1953) 998, 1089. J. P. EBEL, *Microchim. Acta* 1954, 679.

³ C. S. HANES, F. A. ISHERWOOD, *Nature* 164 (1949) 1107.

⁴ H. ROUX, E. THILO, H. GRUNZE und M. VISCONTINI, Über die Konstitution von 2 Polyphosphorylierungsmitteln: Hydratisiertes Phosphoroxchlorid und thermisch entwässerte Phosphorsäure, in *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 15.

⁵ R. GRAU, R. HAMM und A. BAUMANN, *Angew. Chem.* 65 (1953) 242.

⁶ *Biochemisches Taschenbuch*, herausgegeben von H. M. RAUEN, S. 433 ff., Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1956.

⁷ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIF, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 214–6, New York 1955.

⁸ H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 146, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955.

⁹ C. S. HANES und F. A. ISHERWOOD, *Nature* 164 (1949) 1107.

¹⁰ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIF, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 207, New York 1955.

¹¹ H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 146, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955.

¹² E. CHARGAEFF, *J. Biol. Chem.* 176 (1948) 715.

¹³ E. VISHER, B. MAGASANIK und E. CHARGAEFF, *Federation Proc.* 8 (1949) 263. G. LANGE, *Biochem. Z.* 326 (1954) 172. F. TURBA und H. SCHUSTER, *Biochem. Z.* 325 (1954) 537. [261.]

¹⁴ I. E. SEEGMILLER und B. L. HORECKER, *J. Biol. Chem.* 194 (1952)

Tab. 46. R_F -Werte von Nukleosiden

Fließmittel	Adenosin	Adenin-desoxy-ribosid	Guanosin	Guanin-desoxy-ribosid	Cytidin	Cytosin-desoxy-ribosid	Uridin	Thymin-desoxy-ribosid
n-Butanol/Wasser = 86:14	0,20		0,15		0,12		0,17	
desgleichen, NH ₃ -Atmosphäre	0,22		0,03		0,11		0,08	
n-Butanol/Ameisensäure/Wasser = 77:10:13	0,12		0,17		0,18		0,25	
n-Butanol/Äthanol/Wasser = 50:15:35	0,50		0,40		0,42		0,49	
Amylalkohol, wassergesättigt	0,11		0,02		0,02		0,05	
desgleichen, NH ₃ -Atmosphäre	0,09		0,00		0,03		0,03	
Amylalkohol, wassergesättigt/Ameisensäure = 90:10	0,04		0,04		0,03		0,07	
Ammoniumisobutytrat = 10:6	0,79							
n-Butanol, wassergesättigt		0,32		0,18		0,21		0,45
n-Butanol, wassergesättigt	0,33	0,33	0,10	0,21	0,16			0,51
n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:5	0,41		0,22					
s-Collidin, wassergesättigt	0,68			0,66	0,50		0,81	

10. Farbstoffe

Allgemeines: In diesem Gebiet soll in kurzen Zügen alles das zusammengefaßt werden – natürlich oder künstlich –, was überhaupt Farbstoffnatur besitzt und bisher papierchromatographisch bearbeitet wurde.

Es sollen also sowohl natürliche pflanzliche Pigmente wie auch die synthetischen Farbstoffe der verschiedensten Anwendungsklassen erfaßt werden.

Bei der Betrachtung des Schrifttums über die synthetischen Farbstoffe fällt sehr stark auf, daß die Papierchromatographie der Farbstoffe die stoffgegebene Systematik der Farbstoffe grobenteils vermissen läßt, es finden sich bislang nicht allzu viele systematische Behandlungen bzw. Trennungen der einzelnen Gruppen. Auf dem Gebiet der künstlichen Farbstoffe interessieren einzelne Anwendungsgebiete, besonders:

Textilfarbstoffe

Lebensmittelfarbstoffe

Tinten in Substanz oder als Schriftzeichen zum Nachweis von Schriftfälschungen u. a.

Daneben wurden auch pH-Indikatoren, Lederfarben usw. bearbeitet. Gemeinsam ist fast allen synthetischen Farbstoffen, daß man zu ihrer Identifizierung nur relativ selten Sprühreagenzien benötigt, abgesehen von gewissen Tüpfelungen mit Säuren, Basen oder Salzen, um ihre Identität sicherzustellen. Infolge der farbigen Natur der Flecken kann man ihren Lauf auf dem Chromatogramm beobachten, weshalb man Anfängern auf dem Gebiet der Papierchromatographie immer empfehlen sollte, erste Versuche mit geeigneten Farbstoffgemischen durchzuführen.

Vorläufer der Farbenchromatographie finden sich weitgehend bereits im Schrifttum über die Kapillaranalyse, z. B. bei SCHOENBEIN, GOPPELSROEDER, LIESEGANG¹.

In diesem Zusammenhang sei ein Demonstrationsversuch zur kapillaranalytischen Trennung von Farbstoffen erwähnt, anhand dessen drei geeignete Farbstoffe in 15 min trennbar sind²:

Ein 20 cm langer Streifen Filtrierpapier wird in eine Lösung der drei Farbstoffe:

Anthralangelb G
Anthralanrot G und
Anthralanblau G

eingehängt. Nach 10 bis 15 min zeigen sich drei Farbzonen.

Interessant ist auch hier das bereits von LIESEGANG beschriebene Verfahren, saure und basische Farbstoffe durch ihr kapillares Verhalten gegenüber der negativ geladenen Papierfaser zu trennen³:

Aus einer wäßrigen Lösung von Kristallviolett steigt nur die farblose wäßrige Lösung hoch, da der Farbstoff, dessen Kation farbig ist, an der Eintauchstelle ausgeflockt wird.

Aus einer entsprechenden Lösung von Säureviolett steigt in einem eingetauchten Papierstreifen hingegen die violette Farbstofflösung hoch, da das farbige Anion durch die negativ geladene Papierfaser nicht beeinflusst wird.

Literatur siehe S. 252–3

Es seien nun auf dem Gebiet der künstlichen Farbstoffe zunächst die Textilfarben besprochen.

Textilfarbstoffe

Eine der ersten und umfassendsten Arbeiten auf diesem Gebiet war diejenige von H. ZAHN:

Tab. 47

R_F -Werte und Fließmittel bei synthetischen Farbstoffen⁴

Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2043b, Streifen 30 × 15 cm

Methode: aufsteigend

Säurefarbstoffe				
Farbstoffe	Farbe bzw. Farbkomponenten	80 % Äthanol R_F	Iso-butanol R_F	Iso-buttersäure R_F
Kitonlichtgelb 3 GRL 3 Komponenten	gelb	0,51	0,00	0,00
	gelb	0,75	0,12	0,13
	gelb	0,86	0,57	0,49
Anthralanorange GG		0,46	0,02	0,00
Orange II		0,85	0,45	0,41
Kitonlichtrot BGLE		0,73	0,19	0,18
Echttrot AV	violett	0,33	0,00	0,00
	rot	0,75	0,48	0,41
Kristallponceau 6 R		0,65	0,14	0,10
Alizarinsaphirblau C	blau	0,0 bis 0,34	0,00	0,00
	blau	0,58	0,10	
Sulfocyanin 5R extra		0,75	0,41	0,07
Beizenfarbstoffe				
Chromechtgelb O		0,72	0,41	0,34
Chromechtrot		0,57	0,25	0,24
Chromechtblau 2 RB		0,38 bis 0,84	0,49	0,33
Säurealizarin-schwarz R	violett	0 bis 0,64	0,39	0,36
	braun	0,72	–	–
	blau	0,94	0,57	0,49
	stahlblau		0,00	0,00
Chromkomplexfarbstoffe				
Neolangelb BE		0,54 bis 0,86	0,08	0,02
Neolanrosa BE		0,00		
Neolanrot BRE		0,55	0,05	0,05
Neolangrün BF		0,00	0,27	0,16
		0,53		
Neolanblau 2 RB		0,00	0,25	0,00
		0,53		0,08

Von DITTMAR⁵ werden als allgemein anwendbare Fließmittel für Farbstoffe, auch auf dem Gebiet der Lebensmittelfarben und der Tintenfarben, die sich begreiflicherweise teilweise überdecken, die in Tab. 48 folgenden Fließmittelsysteme, einzeln oder in Kombination, als Standardsatz angegeben.

Auffallend ist dabei, daß auch reine Salzlösungen oft gute Trennungen von Farbstoffen ergeben; hier ist der Trenneffekt sicherlich auf eine Form der Aussalzchromatographie zurückzuführen.

Eine intensive Studie über die Möglichkeiten zur Trennung von Farbstoffen und die dazu benutzten Fließmittel gibt auch TILDEN⁶.

Tab. 48. Fließmittel zur papierchromatographischen Trennung von Farbstoffen

1. Einprozentige Kochsalzlösung
2. 2 g tert. Natriumcitrat in 100 ml 5 prozentigem Ammoniak
3. Phenol/Wasser = 4 : 1 (g/v)
4. Essigester/Eisessig/Wasser = 8 : 2 : 2
5. Propionsäure/n-Butanol/Wasser = 66 : 140 : 74
6. n-Butanol/Eisessig/Wasser = 10 : 2 : 4
7. n-Butanol/Ameisensäure/Wasser = 100 : 24 : 36
8. Essigester/Pyridin/Wasser = 70 : 25 : 20
9. Methyläthylketon/Wasser = 10 : 1
10. Tetrahydrofuran/Wasser = 3 : 1
11. Tetramethylsulfon/Wasser = 3 : 1
12. tert. Butanol/Methyläthylketon/Wasser = 8 : 5 : 5

Die Autorin empfiehlt dabei unter anderem folgende Fließmittelsysteme zum Zwecke einer Übersichtsanalyse und Aufteilung in Gruppen:

Für Azofarben: 150 g Phenol
48 g Wasser
2 g Eisessig

Für Triphenylmethanfarbstoffe:
95 % Methanol
3 % Ameisensäure

Außerdem noch folgende Fließmittel:

Phenol/Eisessig/Wasser = 150 : 2 : 48 (g/v/v)
Phenol/Wasser = 80 : 20 (g/v)
n-Butanol/Ammoniak/Wasser/70 prozentiges Äthanol =
200 : 2 : 88 : 40

Sie stellte im Verlauf ihrer Arbeiten fest, daß die R_F -Werte der Farbstoffe stark von ihrer sauren oder basischen Natur beeinflußt werden.

Angewandte Mengen: Je nach Farbtintensität und Ausgiebigkeit 0,25- bis 2 prozentige Lösungen, von denen man 5 bis 15 Mikroliter auftröpfelt. Lösungen bei Textilfarbstoffen sind meistens wäßrig, hier und da auch in organischen Lösungsmitteln.

Papier: In der einschlägigen Literatur werden hauptsächlich Schleicher & Schüll 2043b und Whatman 1 empfohlen. SHIBATA, TAKITO und TANAKA⁷ bringen bereits 1950 eine Analyse natürlicher und künstlicher Anthrachinonpigmente, mit Petroläther als Fließmittel, der mit 97 prozentigem Methanol gesättigt ist (siehe Tab. 49).

Tab. 49

Substanz	Konstitution	R_F -Wert	Farbe
Chinizarin	1,4-Dioxyanthrachinon	0,89	purpur
2-Methylchinizarin	1,4-Dioxy-2-Methyl-a.	0,92	purpur
Emodin	4,5,7-Trioxo-2-Methyl-a.	0,52	rosa
Rhein	4,5-Dioxy-2-Carboxyl-a.	0,00	orange
Alizarin	1,2-Dioxyanthrachinon	0,04	violett
Endocrocin	4,5,7-Trioxo-2-Methyl-3-Carboxyl-anthrachinon	0,00	rosa
Purpurin	1,3,4-Trioxanthrachinon	0,03	purpur
Tetraoxyanthrachinon	1,3,5,7-Tetraoxyanthrachinon	0,02	orange
Anthragallol	1,2,3-Trioxanthrachinon	0,00	grau
Rufigallulsäure	1,2,3,5,6,7-Hexaoxy-a.	0,00	grau-violett

Die Färbungen wurden durch Behandeln mit 0,5 prozentigem Magnesiumacetat in Methanol erzeugt, durch 5 min langes Erhitzen

Literatur siehe S. 252-3

Die Farbbildung mit Magnesiumacetat kann natürlich nur dann eintreten, wenn die Bildung eines inneren Komplexsalzes möglich ist, d. h. wenn 1 OH in α -Stellung zur CO-Gruppe steht.

Die Stellung der OH-Gruppen im Ringsystem bringt dabei natürlich gewisse Regelmäßigkeiten in bezug auf die Farbe mit sich. Die R_F -Werte zeigen gewisse Gesetzmäßigkeiten in bezug auf Stellung und Zahl der OH-Gruppen.

Im tschechischen Schrifttum findet sich eine Arbeit über technische Sulfonsäuren des α - und β -Naphthols, also Farbstoffzwischenprodukte⁸. Als Papier werden Schleicher & Schüll Nr. 2043b und Whatman 1 empfohlen und als Fließmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser benutzt sowie auch n-Butanol/Pyridin/Wasser. Die Identifizierung erfolgte naturgemäß durch Bildung der Azofarbstoffe auf dem Papier durch Kuppeln mit diazotiertem p-Nitranilin.

In der *Nature* des Jahres 1949 findet sich in ähnlicher Weise eine Trennung und Identifizierung von R- und G-Säure⁹.

DITTMAR¹⁰ bringt zwei Beispiele der papierchromatographischen Analyse bzw. Reinheitsprüfung technischer Farbstoffzwischenprodukte:

1. Die Prüfung einer Acetyl-H-Säure auf restliche H-Säure durch vorheriges Kuppeln mit diazotiertem Anilin und chromatographische Prüfung im Rundfilterchromatogramm unter Mitlaufenlassen von Farbstoffen aus reinen Säuren. Fließmittel ist eine 3 Tage alte Kochsalzlösung; es findet also hier eine Aussalzchromatographie statt.
2. Die Prüfung von Sulfurierungsprodukten des β -Naphthols. Nachweis von SCHAEFFER-Säure, R-Säure und Naphtholtrisulfosäure durch Kuppeln mit diazotierter Anilin-3-sulfosäure. – Als Papier wurde in beiden Fällen 2043b benutzt.

In diesem Zusammenhang ist vielleicht auch eine etwas abwegig liegende Arbeit interessant, nämlich die Trennung der cis-trans-Azobenzole mit 40 prozentiger Essigsäure durch FRANKEL und WOLOVSKY¹¹. Die cis-Form wandert, die trans-Form ($R_F = 0$) bleibt am Startpunkt liegen.

pH-Indikatoren

LEDERER¹² und TAIRA¹³ machen Angaben über das chromatographische Verhalten von pH-Indikatoren:

Tab. 50

Indikator	Iso-propanol	n-Butanol	Amyl-alkohol	3% NaCl wäßrig
Kongorot		0,00	0,00	–
Indigokarmin		0,00	0,00	0,32
Chlorphenolrot		0,17	0,01	–
Phenolrot		0,18	0,01	0,73
Kresolrot		0,41	0,12	–
Bromkresolpurpur	0,68	0,43	0,10	0,58
Bromkresolgrün	0,84	0,47	0,24	–
Bromphenolblau	–	0,55	0,19	0,57
Methylorange	0,77	0,55	0,26	–
Methylrot	0,73	0,59	0,33	0,41
Neutralrot	–	0,66	0,53	–
Bromthymolblau	0,93	0,79	0,63	0,37
Methylviolet	0,95	0,88	0,86	0,01
Thymolblau	1,00	0,90	0,75	0,37
Phenolphthalein	1,00	0,92	0,89	0,10
Thymolphthalein	1,00	0,92	0,92	–

Lederfarbstoffe

Hier sind im deutschen Schrifttum vor allem zwei Arbeitsmethoden bzw. Publikationen interessant geworden:

1. die chromatographische und elektrophoretische Prüfung von Farbstoffgemischen durch GRASSMANN und Hübner¹⁴.
2. die Vorschrift der Kommission für Lederfärberei im Verein für Gerbereichemie und Technik e. V.¹⁵

Zu 1. Die Verfasser prüfen eine Anzahl von Lederfarbstoffen:

- a) ein sulfoniertes Kupfer-Phtalocyanin
- b) Wollechtsblau FGLL Hö 3
- c) Amidonaphtolbraun 3G Hö 4
- d) Säurelederbraun Hö 5
- e) Farbstoff L5, ein Gemisch aus 14 Azofarbstoffen
- f) eine Serie von Farbstoffen des gleichen Typs: Echtschwarz E, Naphtolrot SE, Ponceau 6R

Dazu eine Reihe basischer Farbstoffe nach verschiedenen bekannten Methoden:

Anfärbung von Filtrierpapier
Ausblasemethode
Kapillaranalyse
Papierchromatographie mit organischen Lösungsmitteln
Adsorptionsanalyse mit Wasser
Rundfilterchromatographie mit Wasser allein
Rundfilterchromatographie mit organischen Lösungsmitteln
Papierelektrophorese
Freie Elektrophorese

Es wurden qualitative und z. T. auch quantitative Trennungen durchgeführt und die Frage von Adsorptionseffekten an die Papierfaser diskutiert.

Zu 2. Sogenannte Pilzmethode:

Ausführung:

Lösung der Farbstoffe: Anionische, 5 g zu 1 Liter gelöst.
Kationische, 5 g mit 1 ml Essigsäure kochen, zu 1 Liter auffüllen.

Papier: Nr. 604 von Schleicher & Schüll.

Ausführung: Man schneidet ein Rechteck von 20 × 15 cm, an dessen einer Längsseite sich in der Mitte eine Zunge von 3 cm Breite und 6 cm Länge befindet.

Man taucht die Zunge in ein Becherglas mit der Farbstofflösung und läßt bis zu etwa 2/3 der Höhe aufsaugen. Das Filtrierpapier soll vorher 12 Stunden klimatisiert werden. Ein Farbstoff gilt als einheitlich, der höchstens 5% eines anderen enthält.

Lebensmittelfarbstoffe

Einen großen Raum auf dem Gebiet der Farbstoffuntersuchungen nehmen im Verlauf der letzten Jahre die Nachweise der künstlichen Färbung von Lebensmitteln ein. Den Anstoß dafür gab die Erkenntnis, daß gewisse Farben bei langem Gebrauch krebsartige Erscheinungen hervorrufen können sowie auch gewisse Formen von Allergie. Das in der Presse heftig befahdete Buttergelb, *p*-Dimethylaminoazobenzol, ist allerdings seit langen Jahren verboten, bzw. wird nicht mehr angewendet, doch besteht nach der einmal gewonnenen Erkenntnis immer die Gefahr, daß nicht genügend auf ihre sichere Unschädlichkeit erprobte Farbstoffe die gleichen Wirkungen hervorrufen können oder zumindest deshalb in den Verbraucherkreisen Beunruhigung hervorrufen können.

Deshalb ist es wohl begreiflich, daß die gesetzgebenden Stellen im Verlauf der letzten Jahre ganz allgemein Arbeitskreise ins Leben gerufen haben, mit der Aufgabe:

1. seit langen Jahren als unschädlich bekannte Farbstoffe herauszusuchen und zu erproben,
2. einfache Analysenmethoden herauszufinden, mittels deren die zugelassenen Färbungen als solche erkannt werden und die verbotenen identifiziert werden können.

Als geeignete Methode wurde bald ganz allgemein die Papierchromatographie erkannt, so daß zahlreiche Publikationen auf diesem Gebiet erschienen. Aus der Vielzahl seien einige herausgeholt (siehe Tab. 51).

Im deutschen Bundesgebiet hat sich eine Kommission zum Studium des Lebensmittelfarbenproblems innerhalb der deutschen Forschungsgemeinschaft gebildet, die aus den in den Farbstofftabellen von SCHULTZ erschienenen Farbstoffen geeignet erscheinende sowie einige unbedenkliche Naturfarben herausuchte und in Listen aufstellte. Die Liste A umfaßt die nach dem heutigen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis unbedenklichen Farbstoffe, die Liste B diejenigen, die bis auf weiteres noch benutzt, vor ihrer endgültigen Zulassung jedoch noch überprüft werden müssen, die Liste der Naturfarben das Carotin und Carotinoide, Chlorophyll, die natürliche Cochenille und das Lactoflavin.

Tab. 51

Land	Autor	Titel	Literaturstelle
Belgien	W. LHOEST	Synthetische Farbstoffe im Gebrauch der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie	<i>J. Pharm. Belg.</i> 1953, Nummern 3-8
Deutsche Bundesrepublik Italien	THALER und SOMMER BARILE, STEIN und PASCUCI	Studien zur Farbstoffanalytik IV Chromatographische Untersuchung synthetischer Lebensmittelfarben	<i>Z. Lebensmittel-Unters. Forsch.</i> 97 (1952) 345 <i>Ind. Ital. Conserve</i> 27 (1952) 152
Schweiz	DE MEURON	Identifikation von Farbstoffen in Lebensmitteln durch Papierchromatographie	<i>Mitt. Lebensm. Hyg.</i> 44 (1953) 185
Spanien	CHARRO ARRIAS	Papierchromatographie synthetischer Lebensmittelfarben	<i>Anales bromatol.</i> 5 (1953) 359

THALER und SOMMER¹⁶ studierten noch eine Anzahl von Faktoren, die für eine scharfe Identifizierung und vor allem die Lage der R_F -Werte von Bedeutung sind:

Alter der Farblösungen
Alter des Fließmittels
Einfluß der Salzkonzentration
Chemische Natur des Salzes
Wirkung des Salzzusatzes gegenüber destilliertem Wasser
pH-Wert (Alkalieffekt)
und andere mehr

Unter Beachtung dieser Momente lassen sich oft Trennungen erzielen, selbst bei Farbstoffen, deren R_F -Werte nahe beieinander liegen.

Als Standardfließmittel wurde schließlich das Gemisch 2% Trinatriumcitrat in 2,5prozentigem Ammoniak gefunden, wobei Alkali- und Aussalzeffekt gleichermaßen wirken und wandfreie Trennungen erzielt werden.

Die Anwendung dieses Fließmittels gestattete darüber hinaus auch die Unterscheidung zwischen natürlicher und künstlicher Färbung. Beispiel:

Farbe grün: Wasserlösliche Chlorophyllpräparate zeigen durchweg keine Wanderung oder einen sehr verwaschenen undefinierten Streifen. – Künstliche Lebensmittelfarbe «grün» wandert in Form ihrer Komponenten blau und gelb.

Farbe braun: Zuckercouleur und synthetisches Braun. Die Zuckercouleur verhält sich ähnlich wie das Chlorophyll, die künstliche Farbe «braun» teilt sich in verschiedene andersfarbige Komponenten auf.

In letzter Zeit beginnen auch die fettlöslichen Farben in zunehmendem Maße interessant zu werden. Drei Fälle sind vor allem beachtenswert:

1. Auffärben der Orangenschalen mit künstlichen Rotfarben.
2. Färbung von Butter- und Margarinefett mit öllöslichen Gelbfarben.
3. Untersuchung von Lippenstiftfarben¹⁷.

JAX und AUST¹⁸ studierten das chromatographische Verhalten einer Reihe fettlöslicher Gelb- und Rotfarben mit Hilfe folgender Fließmittel:

80prozentigem Methanol
80prozentigem Isopropanol
Methanol/Eisessig/Wasser = 4 : 4 : 2
Isobutanol/2-n-Essigsäure/Glycerin = 16 : 3 : 1

MICHEEL und SCHWEPPE¹⁹ trennten wasserunlösliche Cellitonfarben auf Acetypapier. Mit Essigsäurebutylester/Pyridin/Wasser = 1 : 5 : 10 erhielten sie folgende Werte:

Tab. 52

Fließmittel: Essigsäurebutylester/Pyridin/Wasser = 1 : 5 : 10

Farbstoff	R_F -Wert
Cellitonechtorange GR	0,07
Cellitonechtgelb G	0,12
Cellitonechtrötviolett RN	0,21
Cellitonechtröt GG	0,16
Cellitonechtblau FFG	0,21
Cellitonechtblaugrün B	0,28

Nach unseren eigenen Erfahrungen gelingt die Trennung künstlicher fettlöslicher Farben und natürlicher

Chlorophylle und Carotine sowie Anatto ganz ausgezeichnet auf Papier 2043b, das mit einer Lösung von 5% Paraffinöl in niedrig siedendem Petroläther getränkt wurde. Die künstlichen Farben wandern bei Anwendung eines Gemisches aus Alkohol oder Aceton und Wasser, die natürlichen bleiben am Startpunkt sitzen oder wandern nur sehr wenig.

Natürliche Pigmente und Gerbstoffe

Allgemeines: Die natürlichen Pigmente der Pflanze können eingeteilt werden in die strukturgebundenen und die zellsaftlöslichen.

Als strukturgebundene Farbstoffe interessieren vor allem Chlorophyll sowie Carotin und Xanthophyll, also grüne und gelbe Blattpigmente. Die zellsaftlöslichen gehören vor allem zwei Gruppen glucosidischer Natur an, den Anthocyanen und den Anthoxanthinen. Da die Catechu-Gerbstoffe wiederum diesen nahestehen, seien diese hier ebenfalls kurz besprochen.

Da es sich bei allen diesen Gruppen fast immer um Untersuchungen von Pflanzenextrakten handelt, wird die Herstellung dieser Extrakte aus pflanzlichem Material sehr oft die erste Aufgabe sein.

1. **Herstellung von Rohchlorophyll-Lösungen**²⁰: Abtöten des Blattmaterials durch Tauchen in heißen Alkohol, dann Extraktion des Rohchlorophylls mit 96prozentigem Alkohol, Benzin-Methanol (6 : 4) oder 90prozentigem Aceton. Die acetonische Lösung wird ausgeäthert und weiter behandelt.

2. **Zellsaftlösliche Pigmente**²¹: Anthocyane und Anthoxanthine extrahiert man mit Methanol, Äthanol oder Wasser. – Auch kann man chromatographische Gemische wie

1 Vol. konz. HCl und 37 Vol. Methanol oder
n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5

benutzen.

3. **Gerbstoffe**: Nach BLOCK, DURRUM, ZWEIG²² durch Zerkleinerung des Pflanzenmaterials, Auspressen, Zentrifugieren des Saftes, Erhitzen auf 100°C, Wiederabkühlen und eventuelle Konzentrierung im Vakuum. – Auch Extraktion mit 95prozentigem Äthanol wird empfohlen.

Papier: Entweder nach normalen Verfahren mit unbehandelten Papieren, wobei Whatman 1, Schleicher & Schüll Nr. 2043b und Durieux Nr. 147 empfohlen werden, oder bei Blattpigmenten auch nach dem Verfahren der umgekehrten Phasen (Tränkung mit Vaseline in petrolätherischer Lösung).

Bei Blattpigmenten empfiehlt es sich jedoch, auch bei normalem Verfahren die Papiere mit Petroläther vorzuwaschen, um das enthaltene Baumwollwachs zu entfernen. – Auch Glaspapier²³ wurde bereits benutzt.

Fließmittel: Für Chlorophylle fast immer wasserfrei:

Aceton
Benzin
Benzol
Petroläther
Methanol
Chlorbenzol
Toluol
Tetrachlorkohlenstoff

sowie Gemische aus obigen in wechselnden Verhältnissen. Für zellsaftlösliche Pigmente werden empfohlen:

Tab. 53. Das Verhalten von Anthoxanthinen vor der Analysenquarzlampe

Verbindungstyp	Unbehandelt	Mit $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Bemerkungen
Flavone	braune oder dunkle Flecken	gelb	
Flavonol-3-Glykoside . .	braune oder dunkle Flecken	gelb	
Flavonole	gelb	intensiv gelbgrün	
Flavanone	farblos	uncharakteristisch (gelb, grau oder blauweiß)	
Flavanonole	farblos	uncharakteristisch	
Isoflavone	farblos	uncharakteristisch	mit NH_3 braun bis gelb
Benzalcumarone	gelb	unbekannt	mit NH_3 orange
Chalkone	gelb	gelborange bis rot	mit NH_3 rot

n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 5

m-Kresol/Eisessig/Wasser = 50 : 2 : 48

Essigester/Ameisensäure/Wasser = 10 : 2 : 3

Chloroform/Isobutanol/Wasser = 2 : 4 : 4

Isopropylalkohol/Wasser in verschiedenen Verhältnissen

Methanol/Wasser/Chloroform/Ligroin = 1 : 5 : 2 : 7

Benzol/Ligroin/Methanol = 5 : 50 : 1

und andere.

Für Gerbstoffe:

Phenol, wassergesättigt

n-Butanol/Eisessig = 4 : 1, dazu Wasser bis zur Sättigung.

Identifizierung: Für Flavanoide gelten gewisse Gesetzmäßigkeiten im R_F -Wert, z. B.²⁴:

1. Die Zahl der Hydroxylgruppen ist umgekehrt proportional dem R_F -Wert.

2. Methylierung der Hydroxylgruppen erniedrigt den R_F -Wert.

3. Jedes auf dem Papier gefundene Flavanoid ist durch zwei Verhältniszahlen charakterisiert:

$$R_F^1 = R_F(\text{Butanol/Eisessig}) / R_F(\text{m-Kresol/Eisessig})$$

$$R_F^2 = R_F(\text{Butanol/Eisessig}) / R_F(\text{Phenol/Wasser})$$

Zwei Substanzen sind dann identisch, wenn R_F^1 und R_F^2 innerhalb der Versuchsfehler übereinstimmen.

Identifizierung durch Farbreaktionen:

Chlorophylle: Farbreaktionen meistens uninteressant, da die Substanzen durch ihre Eigenfärbung erkennbar sind.

Anthocyane: Meist genügend eigene Färbung. Variation bzw. Verstärkung ist möglich durch Behandlung mit Ammoniakdampf, der meist zur Farbvertiefung führt. – Oft besteht Fluoreszenz unter der UV-Lampe.

Anthoxanthine: Außerdem noch: FeCl_3 in Wasser oder Methanol, also das übliche Phenolreagens; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1prozentig in Methanol gelöst; damit behandelte Anthoxanthine zeigen charakteristische Färbungen im UV-Licht; ähnliche Reaktionen ergeben auch basisches Bleiacetat und Zirkonoxychlorid (siehe Tab. 53).

Azoreaktion: Phenolische Anthoxanthine kuppeln mit Diazosulfanilsäure.

Schwierig und zeitraubend dürfte in allen Gruppen die Gewinnung reiner Testsubstanzen sein.

Farbreaktionen de Catechu-Gerbstoffe: Mit 0,1prozentigem wäßrigem Eisenchlorid oder 0,2prozentigem Ferroammoniumsulfat: Gerbstoffe mit Brenzcatechinrest werden grün, solche mit Pyrogallolrest graublau, Catechin und Epicatechin werden dunkelblau.

Tinten und Schreibstoffe im Dienste der Kriminalistik

Allgemeines: Die schwierigste Aufgabe in dieser Problemstellung wird immer die möglichst quantitative Ablösung eines Schriftzeichens, mit möglichst geringer Ver-

änderung des Schreibmaterials, mit geeigneten Lösungsmitteln sein. Von vornherein wird man annehmen, daß ein Unterschied vorliegt, je nachdem, ob eine Schrift alt ist oder neueren Datums. Je nach Art des Schreibmaterials, vor allem, wenn dokumentenechte Tinten benutzt werden, können diese Unterschiede jedoch hinfällig werden. Es finden sich Angaben in der Literatur, nach denen sich Tinten bei jahrelangem Vorhandensein als Schrift auf Papier gar nicht verändert hatten. Meistens wird es weniger bedeutungsvoll sein, eine ganz klare Trennung der Komponenten zu erzielen als ein möglichst charakteristisches, reproduzierbares Bild, das deutlich von demjenigen der Prüf- und Vergleichstinten abweicht oder sich vollkommen mit ihnen deckt, also keine Unsicherheiten läßt.

Im Falle, daß das Material ausreicht, wird man versuchen, mehrere Chromatogramme mit verschiedenen Fließmitteln durchzuführen, um charakteristische Kennzeichen herauszuholen. Meistens wird man auf eine «Analyse» des Schriftzeichens verzichten und möglichst eben diese charakteristischen Kennzeichen herausarbeiten. Oft wird man auch die UV-Lampe zu Hilfe nehmen.

Tab. 54

Lösungsmittel zum Ablösen von Schriftzeichen vom Papier²⁶

Für Tinten:

Destilliertes Wasser
Angesäuertes destilliertes Wasser
Ammoniakalisch gemachtes destilliertes Wasser
Aceton/Wasser-Gemische
Natriumfluorid in gesättigter Lösung
Verdünnte Oxalsäurelösung

Für Kugelschreiber: Aceton/Wasser = 2 : 1

Eine Mischung aus:

2,6 Vol. Glycerin
3,0 Vol. Aceton
2,5 Vol. Eisessig
10,0 Vol. dest. Wasser

Für Kopier- und Farbstifte:

Verschiedene organische Lösungsmittel

Man wird beim Ablösen aus verständlichen Gründen so konzentriert wie möglich arbeiten, um klare chromatographische Bilder zu erzielen. Man trägt einen

Tropfen des Lösungsmittels auf, den man mit Hilfe eines Glasstabes, einer Mikropipette oder einer Platinöse überträgt.

Methodik: Es wird die Rundfilterchromatographie empfohlen sowie Chromatographie auf sehr schmalen Streifen aufsteigend in langen Standzylindern sehr schmalen Durchmessers. Letztere Methode hat nach unseren Erfahrungen den Vorzug, daß die Farbflecke darauf die geringste Ausdehnung haben und schärfer werden. Man nimmt am besten Streifen von wenigen mm Breite.

Papier: Die einschlägige Literatur empfiehlt Whatman 1 und Schleicher & Schüll Nr. 2043b. Wir benutzten zu unseren Versuchen das Papier 2043b.

Fließmittel: Die üblichen Gemische, vor allem *n*-Butanol/Eisessig/Wasser, Phenol/Wasser, *n*-Butanol/Ammoniak, verschiedene Alkohole mit Wasser usw. Auch der Citratpuffer nach THALER hat sich in Verbindung mit Methanol nach unseren Versuchen bestens geeignet.

Weitere Fließmittel siehe *Papierchromatographie im Dienste der Kriminalistik* (C. Schleicher & Schüll, Dassel 1956).

Tab. 55. Farbkomponenten von Handelstinten²⁶

Schwarz:

Amidoschwarz B extra	Amidoschwarz ATT konz.
Kohlschwarz ZX5	Naphtolaminschwarz S
Nigrosin WLA	Nigrosin Blauschwarz
Nigrosinbase 51017	Tintenschwarz B85
Tintenschwarz extra	Tintenechtschwarz A extra
Brillantschwarz CBX	

Blau:

Patentblau V hochkonz.	Tintenblau BJTN
Wasserblau I	Wasserblau I alt
Wasserblau IN	Patentblau AE

Violett:

Kristallviolett

Rot:

Lackponceau LGN	Eosin A salzfrei T
Fuchsin A	

Gelb:

Tartrazin O

Grün:

Lichtgrün SF gelblich konz.

Anwendung: Einige Erfahrungen konnten wir bereits sammeln, die wir hier weitergeben: Eisengallustinten ergeben bei Anwendung bestimmter Fließmittel am Startpunkt graue Flecken, die nicht oder nur beschränkt wandern und im letzteren Falle die Farbflecken teilweise überdecken können. Das wurde auch von anderen beobachtet. Die Papierchromatographie von Tinten, Füllhaltertinten, Kopierstiften und Farbstiften ist eine Sache des Ausprobierens günstigster Bedingungen und wird immer ein klares oder zumindest charakteristisches Bild ergeben. Die chromatographische Bearbeitung von Kugelschreiberstiften ist ziemlich schwierig. Diese enthalten fett- oder harzartige Zusätze (Fette, Ölsäuren,

auch Kunstharze) zum Zwecke der Konsistenz und Flüssigkeit beim Schreiben. Alle diese Zusätze stören die chromatographische Charakterisierung und führen zu einer erheblichen Schwanzbildung.

Wir versuchten, nach den Verfahren der umgekehrten Phasen etwas bessere Bilder zu erzielen, doch waren unsere Bemühungen bislang nicht von Erfolg gekrönt.

Zur Abfassung eines kleinen, mit Chromatogrammen geschmückten Heftchens standen uns elf einschlägige Literaturstellen zu Verfügung²⁷. Die Literatur ist also noch nicht allzu zahlreich.

Literatur

- CHR. F. SCHOENBEIN, *Verh. Naturf. Ges. Basel* 4 (1865) 224, 3 (1861) 249. FR. GOPPELSROEDER, *Verh. Naturf. Ges. Basel* 3 (1861) Heft 2; *Poggendorfs Ann. Physik Chem.* 115 (1862); *Z. anal. Chem.* 1862; *Capillaranalyse*, Basel 1901; *Über Capillaranalyse und ihre verschiedenen Anwendungen*, sowie über das Emporsteigen der Farbstoffe in den Pflanzen, Wien 1889; *Anregungen zum Studium der auf Capillaritäts- und Adsorptionserscheinungen beruhenden Capillaranalyse*, Basel 1906. R. E. LIESEGANG, *Scheinoptik bei Kapillarercheinungen*, drei Mitteilungen; *Kapillarercheinungen mit Säurefuchsin*, eine Mitteilung.
- G. SCHAEFFER, *Handbuch der Färberei*, Bd. IV, Konradin-Verlag, Stuttgart 1950.
- R. E. LIESEGANG, *Kolloidchemische Technologie*, Dresden/Leipzig 1927.
- H. ZAHN, *Textilpraxis* 6 (1951) 127.
- G. DITTMAR, in *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, 3. Aufl., Bd. VII, S. 212, Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1956.
- H. TILDEN, *J. Assoc. Agr. Chem.* 35 (1952) 423, 36 (1953) 802, ref. in *Z. anal. Chem.* 138 (1953) 380.
- SH. SHIBATA, M. TAKITO und O. TANAKA, *J. Amer. Chem. Soc.* 72 (1950) 2789.
- J. LATINAK, *Chem. Listy* 48 (1954) 1354.
- R. A. EVANS, W. H. PARR und W. C. EVANS, *Nature* 164 (1949) 674.
- G. DITTMAR, in *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, 3. Aufl., Bd. VII, S. 214–5, Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1956.
- M. FRANKEL und R. WOLOSZY, *Experientia* 10 (1954) 367.
- M. LEDERER, *Science* 112 (1950) 504.
- T. TAIRA, S. YAMATODANI und S. FUJII, *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 25 (1951/52) 121; *Chem. Abstr.* 47 (1953) 6302.
- W. GRASSMANN und L. HÜBNER, *Leder* 5 (1954) 49.
- Arbeitsmethodik C. Schleicher & Schüll, Dassel*, S. 57.
- H. THALER und G. SOMMER, *Z. Lebensmittel-Unters. Forsch.* 97 (1953) 345.
- J. DESHUSSES und P. DESBAUMES, *Mitt. Lebensm. Hyg.* 44 (1953) 500.
- P. JAX und H. AUST, *Milchwiss. Ber.* 1953, 145.
- F. MICHEEL und H. SCHWEPPE, *Microchim. Acta* 1954, 53.
- H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 197. K. PAECH und W. SIMONIS, *Übungen zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1952.
- E. C. BATE-SMITH, *Partition Chrom. Biochem. Soc. Symp.* 3, 68, Cambridge 1951.
- R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIF, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 275, New York 1955.
- H. STRAIN, *J. Physiol. Chem.* 57 (1953) 638.
- E. C. BATE-SMITH, *Nature* 161 (1948) 835.
- H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 207, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955.
- C. Schleicher & Schüll, *Papierchromatographie im Dienste der Kriminalistik*, Dassel 1956.
- E. MARTIN, *Erweiterte Arbeitsmethode zur qualitativen Bestimmung eingetrockneter Tintenschriften auf der Grundlage der Papierchromatographie*, in *Intern. Krim. Pol. Rev.* 91 (1955) 257; *Chromatographische Mikroanalyse eingetrockneter Tinten*, in *Intern. Krim. Pol. Rev.* 81 (1954) 232. CH. BROWN und P. L. KIRCK, *Horizontal Paper Chromatography in the Identification of Ball Pen Inks*, in *J. Crim. Law, Criminol. Pol. Sci.* 45 (1954/55) 334. A. W. SOMERFORD, *Comparison of Writing Inks by Paper Chromatography*,

in *J. Crim. Law, Criminol. Pol. Sci.* 43 (1952) 124. CH. BROWN und P. L. KIRCK, Paper Electrophoresis in the Identification of Writing Inks, in *J. Crim. Law, Criminol. Pol. Sci.*, November 1955. W. SOUDER, Composition, Properties and Behavior of Ball Pens and Inks. Comparison with Horizontal Paper Chromatography, in *J. Crim. Law, Criminol. Pol. Sci.* 45 (1955) 473. B. B. COLDWELL, The Comparison of Inks and Writings by Paper Chromatography, in *The Analyst* 80 (1955) 68. J. W. BRACKETT jr. und L. W. BRADFORD, Comparison of Ink Writing on Documents by Means of Paper Chromatography, in *J. Crim. Law, Criminol. Pol. Sci.* 43 (1952) 530. H. J. STARCK, Zur papierchromatographischen Untersuchung von Schreibstoffen und Tinten, in *Kriminalwiss.* 1954, 85. F. ANGERMAYER, Analytische Untersuchungen von Schreibstoffen unter besonderer Berücksichtigung der Papierchromatographie, in *Kriminalwiss.* 1954, 41. C. G. MACRIS und D. RIGANEZIS, Characterization of Inks by Paper Chromatography for Criminological Purposes, in *Anal. Chim. Acta* 13 (1955) 129.

11. Kationen

Allgemeines: Man trennt die Kationen meist in Form der Chloride oder Nitrate, da diese Salze am wenigsten zur Hydrolyse neigen. Sulfate sind ohnehin oft schwer löslich und bleiben am Startpunkt liegen oder wandern nur sehr wenig, was hier und da auch erwünscht sein kann (Trennung Blei-Thallium¹). Als Fließmittel dienen meistens Gemische mit starken Säuren, sehr oft *n*-Butanol/Salzsäure. Der Säurezusatz wird meist so gewählt, daß die Säure trotz Bindung am Papier ausreicht, und keine säurefreie Zone entsteht, innerhalb deren Hydrolyse und damit Veränderung der R_F -Werte eintreten kann. Hier und da tränkt man auch das Papier mit Lösungen von Komplexonen und trennt somit die Kationen in Form ihrer inneren Komplexsalze. Hat man ein unbekanntes Kationengemisch zu analysieren, so stellt man eine 2prozentige Lösung der Substanz her, indem man zuerst in destilliertem Wasser löst und dann mit steigenden Mengen Salpetersäure versetzt und schließlich mit destilliertem Wasser zum richtigen Volumen auffüllt. Vom Unlöslichen filtriert man ab. Statt der Salpetersäure kann man auch Salzsäure benutzen. Die als Zusatz zum Fließmittel und zur Lösung benutzten Säuren müssen sorgfältig auf Anwesenheit von Kationen vorher geprüft sein. Oft trennt man Kationen in kleinen Kammern auf sehr schmalen Streifen, da gute Sättigung der Atmosphäre besonders wichtig ist.

Die Isolierung aus Rohmaterial, das Kationen enthält, richtet sich nach der Art dieses Rohmaterials. Bei pflanzlichem Material wird man die trockene Veraschung zu den Oxyden bzw. Carbonaten wählen und die Asche in Säure lösen, eventuell auch naß mit konzentrierter Schwefelsäure und/oder Salpetersäure veraschen oder einen Schmelzaufschluß durchführen.

Kationen können sich in ihrer Wanderung gegenseitig stark beeinflussen². Es können Überlappungen und auch Änderungen der R_F -Werte eintreten. Die R_F -Werte sind konzentrationsabhängig, sie nehmen mit steigender Konzentration zu und mit fallender Temperatur ab. Sie nehmen ebenfalls ab mit steigender Weglänge, d. h. Entfernung der Lösungsmittelfront vom Startpunkt. Sie sind anders, wenn das Papier vorher mit Salzlösungen getränkt wurde. Harte Papiere und sehr weiche ergeben niedrigere R_F -Werte als mittlere.

Mehr als auf anderen Gebieten der Papierchromatographie und stärker markiert hat sich auf dem Gebiet der anorganischen Kationen eine Art von Forschergruppen herausgeschält:

In England: BURSTALL, DAVIES u. a.
POLLARD, McOMIE u. a.
In Frankreich: LEDERER und Mitarbeiter
In der Schweiz: ERLIENMEYER und Mitarbeiter
In Deutschland: SOMMER (München), PFEIL (Marburg) u. a.

Angewandte Mengen: Diese richten sich nach den zu analysierenden Substanzen, allgemein jedoch benutzt man Mengen von 20 bis 200 Mikrogramm in bezug auf jedes Kation.

Papier: In bezug auf Dichtigkeit und sonstige technische Eigenschaften gilt die übliche Abstimmung der Versuchsbedingungen, die bereits öfters erwähnt wurde.

Bei sehr empfindlichen Bestimmungen wird es sich empfehlen, die säuregewaschenen Papiere des Handels zu benutzen oder das Papier mit Lösungen von Komplexonen zu waschen und anschließend mit Wasser erschöpfend wieder auszuwaschen.

Fließmittel: Nach BURSTALL, DAVIES, LINSTAD und WELLS³ arbeitet man entsprechend der Methode der geformten Streifen, absteigend, mit *n*-Butanol und 3-*n* HCl gesättigt als Fließmittel bzw. mit salzsaurem Acetylaceton, und trennt die Metalle der Kupfer- und Arsengruppe als Chloride, letztere in Form ihrer niedrigsten Wertigkeiten.

POLLARD, McOMIE und ELBEH⁴ benutzen zum gleichen Zweck als Fließmittel salpetersaures *n*-Butanol, das als Komplexbildner Benzoylaceton enthält bzw. salpetersaures Dioxan, mit Antipyrin als Komplexbildner. Es werden daneben noch andere Mischungen zum gleichen Zweck herangezogen:

Acetylaceton/HCl/Aceton
Aceton/Salzsäure
Methyläthylketon/HCl
Pyridin/Wasser
und andere

PFEIL und Mitarbeiter⁵ trennten die Metalle der Schwefelwasserstoffgruppe unter Verwendung von *n*-Butanol als Fließmittel, das mit 3,4-*n* HCl gesättigt war, im aufsteigenden Verfahren. Angewandte Mengen: Bei Pb unter 10 Mikrogramm, alle übrigen 20 bis 50 Mikrogramm, die Metalle wurden sämtlich in der höchsten Oxydationsstufe aufgetragen.

BURSTALL, DAVIES, LINSTAD und WELLS³ trennten Eisen, Aluminium und Chrom als Chloride. Fließmittel Eisessig mit 25 Vol. % trockenem Methanol und Nickel, Mangan, Kobalt und Zink mit einem Gemisch von Aceton und HCl.

BERG und McINTIRE trennten Kupfer und die Metalle der Schwefelammoniumgruppe in Form von Chelaten, wobei sie als Komplexbildner 2-Thenoyltrifluoraceton benutzten⁶.

Als Fließmittel dienten Methanol, Benzol, Eisessig in wechselnden Verhältnissen. Es wurden Kochsalz- oder Aluminiumoxyd-impregniertes Papier benutzt.

SOMMER⁷ prüfte praktisch alle häufiger vorkommenden Kationen auf ihr chromatographisches Verhalten durch und gab auch Beobachtungen über gewisse Gesetzmäßigkeiten in bezug auf die R_F -Werte, die bereits weiter vorn erwähnt wurden, da sie mehr oder weniger allgemein gültig sind.

Die R_F -Werte einer Anzahl von Kationen mit 80prozentigem Methanol als Fließmittel bei Gegenwart verschiedener Säuren in 1-*n* Konzentration sei im folgenden gezeigt. Eine große Anzahl von R_F -Werten bei Benutzung anderer Fließmittel ist tabellarisch weiterhin angegeben. Aus Zeit- und Raumgründen kann sie hier nicht gebracht werden, es sei auf die Original-Literatur verwiesen.

Tab. 56

Fließmittel: HCl/CH₃OH/H₂O = 10 : 80 : 10

Kation	Alter des Fließmittels		
	0 Tage	5 Tage	15 Tage
Fe ³⁺	0,78	0,78	0,78
Al ³⁺	0,85	0,86	0,86
Co ²⁺	0,71	0,74	0,73
Ni ²⁺	0,67	0,71	0,70
Mn ²⁺	0,71	0,73	0,72
Zn ²⁺	0,94	0,96	0,95
TiO ²⁺	0,75	0,78	0,76
Mg ²⁺	0,71	0,73	0,72
Ca ²⁺	0,47	0,54	0,49
Sr ²⁺	0,24	0,29	0,30
Ba ²⁺	0,09	0,11	0,13
K ⁺	0,10	0,12	0,16

Tab. 57. *R_F*-Werte bei Kationen der Schwefelwasserstoffgruppe⁷Fließmittel: HCl/CH₃OH/H₂O = 10 : 80 : 10
Steighöhe 20,5 cm, Temperatur 20°C

Kation	2040 b	2043 b	2045 b	Kation	2040 b	2043 b	2045 b
Sb ³⁺	0,76	0,82	0,68	Th ⁴⁺	0,75	0,75	0,66
Sn ⁴⁺	0,89	0,90	0,90	UO ₂ ²⁺	0,51	0,51	0,43
Hg ²⁺	0,91	0,92	0,85	Be ²⁺	0,86	0,85	0,84
Bi ³⁺	0,80	0,82	0,76	Ba ²⁺	0,11	0,12	0,07
Cu ²⁺	0,64	0,66	0,60	Sr ²⁺	0,26	0,30	0,19
Pb ²⁺	0,33	0,34	0,29	Ca ²⁺	0,46	0,49	0,37
Cd ²⁺	0,88	0,91	0,88	Mg ²⁺	0,67	0,70	0,65

Tab. 58. *R_F*-Werte von Kationen der Schwefelammoniumgruppe⁷Fließmittel: HCl/CH₃OH/H₂O = 10 : 80 : 10
Steighöhe 20,5 cm, Temperatur 20°C

Kation	2040 b	2043 b	2045 b	Kation	2040 b	2043 b	2045 b
Fe ³⁺	0,69	0,74	0,71	Li ⁺	0,71	0,74	0,68
Al ³⁺	0,79	0,82	0,79	Na ⁺	0,29	0,30	0,20
Co ²⁺	0,66	0,71	0,66	K ⁺	0,11	0,12	0,06
Ni ²⁺	0,63	0,68	0,62	Rb ⁺	0,10	0,11	0,07
Mn ²⁺	0,68	0,71	0,64	Cs ⁺	0,11	0,12	0,07
Zn ²⁺	0,87	0,89	0,86	Au ³⁺	0,87	0,92	0,81
TiO ²⁺	0,75	0,75	0,66	Pt ⁴⁺	0,89	0,90	0,77

Kapillare Methoden analog der alten Kapillaranalyse. Das alte Verfahren der Kapillaranalyse wurde in modifizierter Form gerade bei den Kationen von FLOOD im Jahre 1949 wieder aufgegriffen, allerdings mit Hilfe eines Aluminiumoxyd-getränkten Papierstreifens, also in Form einer Adsorptionschromatographie⁸. – Man läßt die zu untersuchende Lösung in einem Ende des Aluminiumhydroxyd-beladenen Papierstreifens hochsteigen, bis die Höhe von 1 bis 3 cm oder höher erreicht ist. Dann läßt man bis zur Höhe von 10 cm oder höher Wasser nachsteigen und identifiziert die Zonen des getrennten Chromatogramms durch geeignete Reagenzien. Durch Zuhilfenahme passender Komplexbildner kann die Trennung vervollständigt werden.

Interessant ist eine Trennung *stereoisomerer anorganischer Verbindungen* durch STEFANOVIC und JANJIC⁹:

Die Autoren trennten die *cis*- und *trans*-Formen von:

1. Dinitro-bis(äthylendiamin)kobalt-III-nitrat
2. Dinitro-bis(äthylendiamin)kobalt-III-jodid
3. Dichloro-bis(äthylendiamin)kobalt-III-chlorid

Als Fließmittel benutzten sie:

Im Falle 1. 65 ml Aceton, 30 ml Wasser, 5 ml HNO₃
(*d* = 1,42)

Im Falle 2. 85 ml Aceton, 15 ml Wasser, 1 g KJ

Im Falle 3. 70 ml Aceton, 20 ml Wasser, 10 ml HCl (*d* = 1,19)

Trennung der Edelmetalle: In einer älteren Arbeit trennt LEDERER¹⁰ die Edelmetalle *Gold, Platin, Palladium und Silber* vom Kupfer bei Verwendung von HCl-gesättigtem *n*-Butanol als Fließmittel. LEDERER beobachtete hier auch die Erscheinung der «zweiten Front», die sich dadurch bildet, daß die Salzsäure am Papier adsorbiert wird und die obere Schicht salzsäure- und wasserfrei ist. Diese Erscheinung ist durch Verwendung eines genügend wassergesättigten Papiers und eines genügenden HCl-Gehaltes im Fließmittel auszuschließen.

BURSTALL, DAVIES, LINSTAD und WELLS¹¹ trennen die *Platinmetalle* als Chloride oder Natriumchlorosalze bei Verwendung von Methyläthylketon/HCl als Fließmittel und von Gemischen aus salzsaurem Methanol und Äther als Fließmittel.

Trennung der seltenen Erden: in Form der Nitrate durch die vorhin erwähnten Autoren mit salpetersaurem Tetrahydroxylvan als Fließmittel¹¹.

Kationentrennung als Fällungschromatographie: MILONE, CETINI und RICCA¹² trennten Kationen in Form einer Fällungschromatographie auf dem Papier, das mit hydrolysierenden anorganischen Salzen wie Natriumsilikat, Kaliumpyroantimonat, Natriumtetraborat oder Natriumarsenit getränkt wurde. Auch hier wurde ein «Tauchverfahren» nach Art der älteren Kapillaranalyse

Tab. 59

Elemente der Gruppe	Fließmittel	Anfärbung mit
Pb, Cu, Bi, Cd, Hg	<i>n</i> -Butanol, mit 3- <i>n</i> HCl gesättigt	Dithiozon in CHCl ₃ , Rhodizonsäure
As, Sb, Sn	Acetylacetone, wassergesättigt + 0,5 Vol. % HCl (<i>d</i> = 1,18) + 25 Vol. % Aceton	Dithizon in CHCl ₃
Fe, Cd, Cr . .	Eisessig mit 25 Vol. % Methanol, 5- <i>n</i> HCl	Alizarin in Alkohol + NH ₃ , Na ₂ O ₂ und Benzidin/Eisessig
Ni, Mn, Co, Zn	Aceton + 5 Vol. % HCl (<i>d</i> = 1,18) + 8 Vol. % H ₂ O	Alizarin, Rubeanwasserstoff, Salicylaldehyd + NH ₃
Ca, Sr, Ba . .	Pyridin + 20 Vol. % H ₂ O + 1 Gew. % KSCN	Alizarin Na-Rhodizonat
Li, Na, K . . Mg	Methanol	AgNO ₃ + Fluorescein in Alkohol, Violursäure
Platinmetalle	Methyläthylketon + 30 Vol. % HCl (<i>d</i> = 1,18)	SnCl ₂ , SnCl ₄ + KJ, Thioharnstoff in 5- <i>n</i> HCl

angewendet, und Wasser oder Fließmittel nachsteigen gelassen. Das Verfahren wird als einfach und schnell durchführbar empfohlen.

SEILER, SORKIN und ERLÉNMEYER¹³ trennten Erdalkalien und Alkalien neben einer Anzahl von Schwermetallen und führten die Identifizierung mit Hilfe von Violursäure und Thioviolursäure durch.

Identifizierung: BURSTALL, DAVIES, LINSTAD und WELLS¹¹ bringen eine Zusammenstellung der getrennten Kationen mit Fließmitteln und Farbreaktionen:

POLLARD⁴ gab folgende Tabelle von Farbreaktionen der Kationen mit verschiedenen Komplexbildnern:

Tab. 60

Reagens	Kation	Farbe
Rubeanwasserstoff	Ni	graublau
	Cu	olivgrün
	Co	braun
Kaliumchromat	Pb	gelb
	Ag	ziegelrot
Rhodankalium	Bi	gelb
Kaliumferrocyanid	U	rötlichbraun
	Fe	blau
Rhodizonsäure	Ba	hellrot
	Pb	violett
Phosphormolybdänsäure . .	Sb	blau
Hypophosphorigsaures Na . .	As	braun
Zinkuranylacetat UV-Lampe .	Na	blaugrüne Fluoreszenz
KOJl-Säure + 8-Oxychinolin .	Al	grüne Fluoreszenz
UV-Lampe	Sn	gelbe Fluoreszenz

PFEIL und Mitarbeiter identifizieren die getrennten Metalle der Schwefelwasserstoffgruppe durch folgende Reagenzien⁵:

Besprühen mit 0,2prozentiger Jodkalilösung:

Hg	rot oder gelb
Bi	braun oder gelb
Sb	braun
Cu	braun
Pb	schwach gelb

Bei 60°C trocknen, dann, falls As noch nicht sichtbar, Gegend um R_F 0,8 mit konzentrierter Salzsäure sprühen, darauf mit Ammoniak, bis der Arsenfleck verschwunden ist, schließlich Sprühen mit Schwefelammonium:

Hg	schwarz
Cd	gelb
Bi	braun
Pb	schwarz
Cu	braunschwarz
Ag	schwarz

Sn wird mit alkoholischer Quercetinlösung und Ammoniak nachgewiesen.

Weitere Farbreaktionen der Kationen der Schwefelwasserstoff- und Schwefelammoniumgruppe¹⁴:

Literatur siehe S. 256

Tab. 61

Kation	Oxin		Dithizon		Resorcin	
	Tageslicht	UV-Licht	Tageslicht	UV-Licht	Tageslicht	UV-Licht
Hg	gelb	rot	rot	a	gelb	rot
Cu	gelb	rot	grün	a	schwarz	purpur
Bi	gelb	rot	orange	rot	-	-
Cd	gelb	gelb	lohgelb	a	a	a
Ni	gelb	rot	rot	a	hla	rot
Co	gelb	rot	purpur	a	braun	rot
Fe	schwarz	purpur	grün	rot	-	-
Al	gelb	gelb	rot	a	a	a
Zn	gelb	gelb	rot	a	a	a

a = keine oder nur sehr schwache Reaktion

Tab. 62. Farbreaktionen mit Violursäure nach SEILER, SORKIN und ERLÉNMEYER¹³

Kation	Farbe
Lithium	rotviolett
Zink	blaßrosa
Magnesium	gelbrosa
Kupfer	gelb
Calcium	orange
Natrium	rotviolett
Strontium	orange
Kalium	violett
Barium	orange
Eisen	blau

Statt Violursäure ist auch Thioviolursäure anwendbar, wobei unter der UV-Lampe charakteristische Färbungen zu beobachten sind.

Anwendungen der papierchromatographischen Kationenanalyse in der Praxis: Vier im Schrifttum erwähnte Fälle erschienen uns in der Anwendung auf die Praxis besonders interessant:

1. Papierchromatographische Uranbestimmung durch SEILER, SCHUSTER und ERLÉNMEYER¹⁵: Es wurden Uran, Eisen und Kupfer nebeneinander bestimmt, mit einem Fließmittel aus 81 ml Methyläthylketon und 0,5 ml Acetonlacton, das mit 2-n Essigsäure bis zur Grenze der Mischbarkeit versetzt wurde. Das Wesentlichste dabei war, daß jeder Flecken mit Natriumbicarbonatlösung überlagert wurde, wodurch die beiden anderen Metalle am Startpunkt liegen blieben, hingegen das Uran wanderte. – Es wurde durch Kaliumferrocyanid identifiziert. Durch planimetrische Ausmessung und Vergleich mit Flecken bekannter Konzentration ließ sich das Uran auch annähernd quantitativ bestimmen. Durch Schmelzfluß mit Soda-Salpeter wurde das Uran aus den Erzen isoliert.

2. Stahlanalyse eines Ridsdale-Stahles beschreiben POLLARD, MCOMIE und andere¹⁶. Sie geben auch die genaue Zusammensetzung dieses Stahles an:

0,34 % C
0,25 % Si
0,014% P
0,64 % Mn
0,75 % Cr
2,59 % Ni
0,43 % MO

Es wurde mit salzsaurem und salpetersaurem n-Butanol gearbeitet, mit und ohne Zusatz von Benzoylacetone.

3. Analyse von Aluminiumlegierungen mit Fremdgehalten unter 1% geben VENTURELLO und GHE¹⁷: Fließmittel: *n*-Butanol/2-*n* HCl = 1:1. Methode: Ringchromatographie.

4. DILLER und REX bringen einen Nachweis des Thalliums neben anderen toxisch wirkenden Metallen: Sie arbeiten mit Gemischen von Methanol und Schwefelsäure, wodurch das Blei als Sulfat am Startpunkt liegen bleibt. Identifizierung durch Jodkali oder Thionallid.

Literatur

- ¹ H. DILLER und O. REX, *Z. anal. Chem.* 137 (1952) 241.
- ² S. N. TEWARI, *Naturwiss.* 41 (1954) 229.
- ³ F. H. BURSTALL, G. R. DAVIES, R. P. LINSTAD und R. A. WELLS, *J. Chem. Soc.* 1950, 516.
- ⁴ F. H. POLLARD, J. F. W. MCOMIE und I. I. M. ELBEIH, *J. Chem. Soc.* 1951, 466, 470, 471.
- ⁵ E. PFEIL, G. PLOSS und H. SARAN, *Z. anal. Chem.* 146 (1955) 241.
- ⁶ E. W. BERG und R. T. MCINTIRE, *Anal. Chem.* 26 (1954) 813.
- ⁷ G. SOMMER, *Z. anal. Chem.* 147 (1955) 241.
- ⁸ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 312, New York 1955.
- ⁹ M. A. STEFANOVIC und D. JANJIC, *Anal. Chim. Acta* 11 (1954) 550.
- ¹⁰ M. LEDERER, *Nature* 162 (1948) 776.
- ¹¹ F. H. BURSTALL, G. R. DAVIES, R. P. LINSTAD und R. A. WELLS, *J. Chem. Soc.* 1950, 516.
- ¹² M. MILONE, G. CETINI und B. RICCA, *Ann. Chimica* 43 (1953) 652.
- ¹³ H. SEILER, E. SORKIN und H. ERLIENMEYER, *Helv. Chim. Acta* 35 (1952) 120.
- ¹⁴ Schleicher & Schüll, *Arbeitsmethodik*, S. 62, Dassel 1955.
- ¹⁵ H. SEILER, M. SCHUSTER und H. ERLIENMEYER, *Helv. Chim. Acta* 37 (1954) 1252.
- ¹⁶ F. H. POLLARD, J. F. W. MCOMIE u. a., *J. Chem. Soc.* 1953, 1338.
- ¹⁷ G. VENTURELLO und A. M. GHE, *Anal. Chim. Acta* 7 (1952) 268.