Die Säulenchromatographie und ihre Anwendung auf die fettlöslichen Vitamine*

Von O. Isler
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG. Basel

1. Einleitung

Der Entdecker der Chromatographie, der russische Botaniker M. Tswett, erläuterte die Methode in seinen ersten Arbeiten folgendermaßen[1]:

«Wird eine gemischte Lösung durch eine Säule eines Adsorbators filtriert, so werden die Farbstoffe adsorptionsweise niedergeschlagen, verjagen sich aber gegenseitig und ordnen sich der Adsorptionsreihe gemäß in der Richtung des Stromes. Stoffe, welche mit dem angewandten Adsorptionsmittel keine undissoziierbaren Adsorptionsverbindungen eingehen, wandern mehr oder weniger schnell durch die Säule ab. Nachträgliche Filtrierung des reinen Lösungsmittels wird begreiflicherweise die Trennung der Stoffe noch vollständiger machen.»

«Wir sehen somit, daß die Gesetze der mechanischen Affinität sich zu den vollkommensten physikalischen Trennungen der in gewissen Flüssigkeiten löslichen Stoffe anwenden lassen.»

Das *Prinzip* der Röhrenchromatographie wird in Abb. 1 dargestellt. Tab. I zeigt die *historische Entwicklung* der Chromatographie und Tab. II die wichtigsten *Übersichtsarbeiten*.

Wir werden zuerst einige wesentliche Punkte der chromatographischen Adsorptionsmethode in der Reihenfolge Methodik und Apparatives, Lösungs- und Adsorptionsmittel behandeln und dabei ausführlich auf das Arbeiten mit Aluminiumoxyd im sogenannten Durchlaufchromatogramm eingehen. Darauf wird die Anwendung der Röhrenchromatographie auf die wichtigsten fettlöslichen Vitamine dargestellt anhand ausgewählter Beispiele und wichtiger historisch-methodischer Einzelheiten. Zum Schluß werden einige allgemeine Gesichtspunkte besonders hervorgehoben.

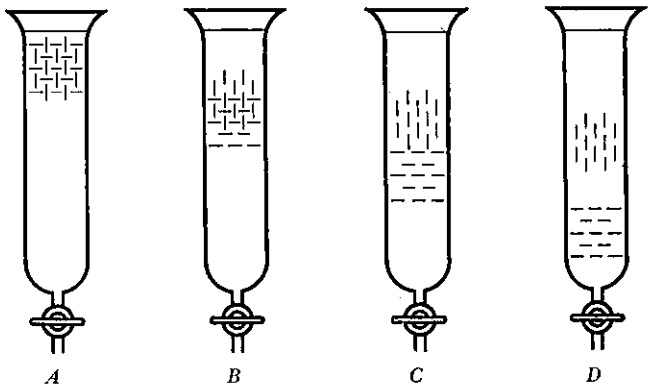


Abb. 1. Entwickeln des Chromatogrammes (*A–D*) durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit der beiden Farbstoffe (| | | bzw. — — —) beim Durchlauf eines Lösungsmittels durch die Säule

* Herrn Dr. O. Straub danke ich für die Durchsicht der Druckbogen.

[1] Ber. bot. Ges. *24*, 316, 384 (1906).

Tab. I. Historische Entwicklung der Chromatographie

1906	M. Tswett, Entdeckung für Pflanzenfarbstoffe. Frühere Anwendung in der Ölchemie, vgl. Nature *166*, 1000 (1950)
1931	Allgemeine Einführung in die organische Chemie durch R. Kuhn, A. Winterstein, E. Lederer und H. Brockmann (Carotine); P. Karrer, R. Morf und K. Schöpp (Vitamin A)
1934	Chromatographie im Ultraviolettlicht: P. Karrer und K. Schöpp, A. Winterstein und K. Schön
1935/37	Durchlaufchromatogramm bzw. flüssiges Chromatogramm von A. Windaus et al. zur Isolierung von Vitamin D_2 und D_3. Ausbau der Technik des Durchlaufchromatogramms für farblose Verbindungen durch die Schulen von T. Reichstein und L. Ruzicka

Tab. II. Wichtige Übersichtsarbeiten und Monographien

1. A. Winterstein und G. Stein, Z. physiol. Chem. *220*, 247, 263 (1933)
2. A. Winterstein in *Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse*, Bd. IV, S. 1403–37, Julius Springer-Verlag, Wien 1933
3. L. Zechmeister und L. v. Cholnoky, M. Chem. *68*, 68–80 (1936)
4. Dieselben: *Die chromatographische Adsorptionsmethode*, Grundlagen, Methodik, Anwendungen, Springer-Verlag, Wien 1937; *Principles and Practice of Chromatography*, Chapman & Hall, London, J. Wiley & Sons, New York 1943 und 1949
5. H. Brockmann in *Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie*, S. 547–70, Verlag Chemie, Berlin 1943
6. G. Hesse, *Adsorptionsmethoden im chemischen Laboratorium*, Monographie, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin 1943
7. Harold H. Strain, *Chromatographic Adsorption Analysis* (Revised Reprint), Monographie, Interscience Publishers, Inc., New York 1945 und 1947
8. Ann. Acad. Sci. (New York) *49*, Art. 2, S. 141–326 (1948)
9. E. Lederer, *Progrès Récents de la Chromatographie, Actualités Scientifiques et Industrielles*, S. 1079, Paris 1949
10. Disc. Faraday Soc. Nr. 7, Gurney & Jackson, London 1949

2. Methoden und Apparatives

Im *ursprünglichen Verfahren* wird das Chromatogramm in der Säule entwickelt; die gebildeten Zonen werden mechanisch getrennt (z. B. Zerschneiden der Säule) und jede Zone für sich eluiert. Diese Ausführungsform wurde für farbige Verbindungen entwickelt. Man verwendet zweckmäßig kurze Säulen.

Im *Durchlaufchromatogramm* oder der fraktionierten Elution werden alle Zonen fortlaufend aus der Säule ausgewaschen und der Durchlauf portionenweise eingedampft. Bei diesem Verfahren, das wir bevorzugen, sind lange Säulen vorteilhaft.

Sehr oft kombiniert man die beiden Ausführungsformen und isoliert das aufgetrennte Substanzgemisch teils aus der Säule und teils aus dem Durchlauf.

Abb. 2 zeigt eine besonders saubere Vorbereitung für ein Durchlaufchromatogramm, und Tab. III resümiert allgemein die *Darstellung von Chromatographiesäulen.*

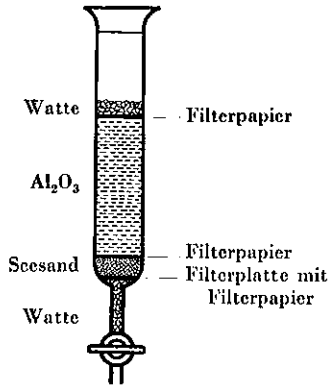


Abb. 2. Säule für Durchlaufchromatogramm (Schule Reichstein)

Tab. III. Apparatives

a) Größe unserer Säulen:
Für Vorversuche und Standardisierung
Ø 15 mm, Länge 10 cm
Für ein mittleres Chromatogramm
Ø 30 mm, Länge 60 cm
Für ein großes Chromatogramm
Ø 70 mm, Länge 1 m

b) Abschluß *unten* durch Wattebausch (Filterplatte, Seesand, Glaswolle), *oben* durch Filterpapier (Wattebausch)

c) Einfüllen durch Einstampfen (trocken)
durch Einrieseln in Lösungsmittel
durch Einschlämmen in die Säule

Wir bevorzugen das Füllen der Säulen durch Einschlämmen des Adsorptionsmittels. Beim Arbeiten mit sauerstoffempfindlichen Substanzen evakuieren wir das

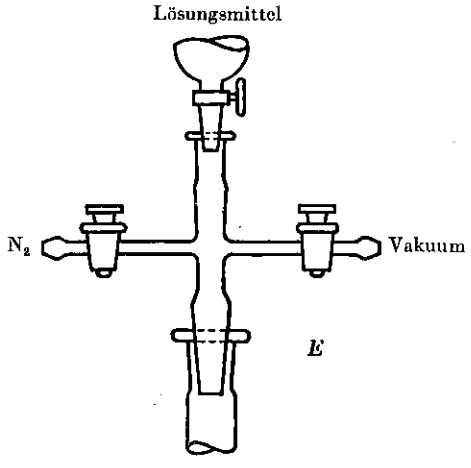


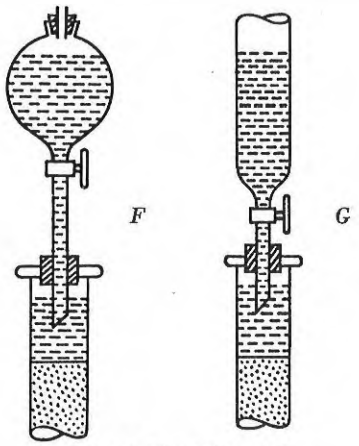
Abb. 3. Aufsatz zur Begasung des Adsorptionsmittels

Adsorptionsmittel vorerst in einem Schliffkolben unter Anwendung von Aufsatz *E*, begasen mit Stickstoff, evakuieren und geben dann das Lösungsmittel zum Einschlämmen in die Säule zu.

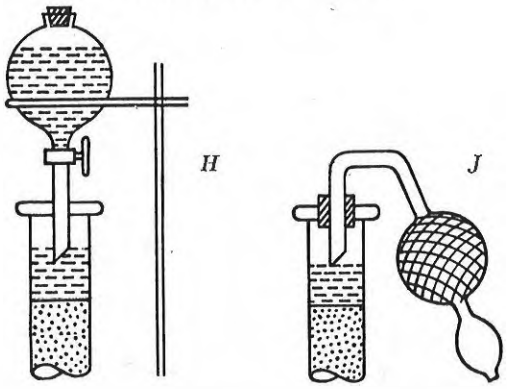
Einige Beispiele für den *Lösungsmittelnachschub* sind in Abb. 4 dargestellt. Die regelmäßigste Ausbildung der Zone eines Chromatogramms erfolgt bei gleichmäßigem Druck durch eine kleine Flüssigkeitssäule (*F–H*). Aus Zeitmangel muß man oft den Durchfluß des Lösungsmittels beschleunigen; dies gelingt durch Druck mittels eines Gummiballons (*J*), eines Aquariummotors (Marke Cyclon) oder einer Bombe mit Reduzierventil.

Tab. IV. Chromatographie farbloser Verbindungen

a) Beobachtung im Ultraviolettlicht. Viele Substanzen werden dadurch sichtbar; überdies verblaßt die Eigenfarbe des Adsorptionsmittels oft beim Haften farbloser Verbindungen.
b) Markierung der Zonen durch Zugabe von ähnlich adsorbierenden Farbstoffen.
c) Test des Durchlaufs (bzw. der Säule) mit Farbreaktion ($KMnO_4$, Tetranitromethan usw.) und Indikatorpapier.
d) Kontrolle des Durchlaufs mittels UV-Absorptionsmessung.
e) Empirische Trennung des Chromatogramms und Vergleich der eingedampften Eluate.



Druck durch Flüssigkeitssäule



Flüssigkeitsreservoir ohne Druck Druck mit Gummiballon

Abb. 4. Lösungsmittelnachschub

In Tab. IV sind die Methoden zur *Chromatographie farbloser Verbindungen* aufgezählt.

3. Allgemeine Angaben über Lösungs- und Adsorptionsmittel

Die üblichen Lösungsmittel sind in Tab. V in der Reihenfolge ihres Eluierungsvermögens aufgeführt. In Zukunft dürften die chlorierten Kohlenwasserstoffe häufiger angewandt werden, da sie gutes Lösungsvermögen besitzen und nicht brennbar sind.

Tab. V. Übliche Lösungsmittel

Die Adsorption ist am größten aus dem ersten, die Elution am stärksten durch das letzte Lösungsmittel der nachfolgenden Reihe

Petroläther, Sdp. 50–60° › Sdp. 60–80° › Sdp. 80–100°
Tetrachlorkohlenstoff
Benzol
Methylenchlorid, Chloroform, Äther
Essigester, Aceton
n-Propylalkohol › Äthanol › Methanol
Wasser
Pyridin oder Eisessig

Gebräuchlich sind auch Gemische mit steigendem Eluierungsvermögen wie Petroläther, Petroläther + 2%, + 4%, + 6%, + 8% Äther oder Benzol, Benzol + 25%, + 50%, + 75% Chloroform. Wir arbeiten oft mit der Reihe: Petroläther – Benzol – gewöhnlicher Äther – Methylalkohol – Methylalkohol/Eisessig. Die Schule REICHSTEIN bevorzugt die Reihe Petroläther – Benzol – Chloroform – Methanol.

Die Haftfestigkeit der chemischen Verbindungen wird bedingt durch ihre funktionellen Gruppen. Diese ordnen sich nach abfallender Haftfestigkeit in folgende Reihe:
COOH › OH, NH_2, SH › CHO, CO › COOR › Br, Cl › -CH=CH-

Die üblichen Adsorptionsmittel sind in Tab. VI ungefähr in der Reihenfolge ihrer Adsorptionsfähigkeit aufgeführt. Dabei ist zu beachten, daß die Aktivität der einzelnen Mittel bei verschiedenem Wassergehalt in weiten Grenzen schwankt. Zwei besondere Adsorbentien, Kohle und Silikagel, möchten wir überhaupt nicht einreihen.

Tab. VI. Übliche Adsorptionsmittel

Ungefähr in der Reihenfolge zunehmender Adsorptionsfähigkeit

Stärke, Zucker, Inulin
Magnesiumcitrat, Talk
Calciumphosphat, Calciumsulfat
Natrium-, Kalium-, Calcium-, Magnesium-, Zinkcarbonat
Calciumhydroxyd, Calciumoxyd
Magnesiumoxyd
Aktiviertes Aluminiumoxyd

Die Schule von Prof. KARRER arbeitet mit einer großen Zahl verschiedener Adsorptionsmittel und wählt für jede Aufgabe das geeignetste Mittel aus. Wir chromatogra-

phieren beinahe ausschließlich mit Aluminiumoxyd; nicht weil es ein ideales Mittel ist, sondern weil seine Tücken am besten bekannt sind. Einige genauere Angaben über dieses gebräuchlichste Adsorptionsmittel können auch als Wegleitung für die Behandlung und die Standardisierung anderer Adsorbentien dienen.

4. Das Arbeiten mit Aluminiumoxyd

Eine wissenschaftliche Beurteilung der Aluminiumoxydsorten gibt R. J. Taylor[2]. Die Umwälzung des Aluminiumoxyds, das z. B. von den Firmen Merck, Darmstadt, AIAG, Chippis, oder Wander, Bern, bezogen werden kann, wird in Tab. VII resümiert.

Tab. VII. Vorbehandlung und Regenerierung von Al_2O_3

a) Evtl. Vorbehandlung zur Neutralisation:
In Essigester zwei Tage stehen lassen (bzw. mit Essigester und einer Spur Eisessig kochen), abfiltrieren, mit Wasser und Methanol waschen und trocknen.

b) Aktivierung: Erhitzen auf 300–500° in irgendeinem Ofen oder einer Pfanne (vorteilhaft ist eine Rösttrommel). Zur Erzielung eines weniger aktiven Al_2O_3 kann man in Glasgefäßen im Vakuum ½ Stunde auf 195 bis 200° erhitzen (Prof. Reichstein).

c) Partielle Desaktivierung:
Durch Liegenlassen an feuchter Luft bei periodischer Kontrolle der Aktivität oder
durch Zugabe einer bestimmten Wassermenge (½ %, 1 %) und Schütteln in Kolben oder Flaschen, bis das Al_2O_3 homogen ist (5–15 Minuten).

d) Regenerierung des Al_2O_3 nach der Chromatographie: Waschen mit Alkohol (Behandeln mit Essigester, Filtration), trocknen, erhitzen usw.

Die Aktivität eines Aluminiumoxydmusters kann nach verschiedenen Methoden bestimmt werden: Am gebräuchlichsten ist die Standardisierung nach H. Brockmann und H. Schodder mit einem Probechromatogramm mit Azofarbstoffen, die in Tab. VIII näher erläutert wird. M. Kofler[3] mißt das Adsorptionsvermögen eines einzelnen Farbstoffes. Diese Methode ist ausbaufähig. Genauer, aber viel umständlicher ist die Messung der Benetzungswärme nach P. B. Müller[4].

Tab. VIII. Standardisierung nach Brockmann[5]

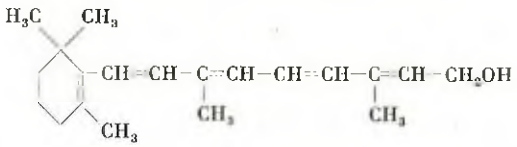
Farbstoffreihe mit zunehmender Haftfestigkeit:
1. Azobenzol, 2. p-Methoxyazobenzol, 3. Sudangelb, 4. Sudanrot, 5. p-Aminoazobenzol, 6. p-Oxy-azobenzol

Definition der Aktivität von Aluminiumoxyd:
Trennung von 1 und 2 = Aktivität I, von 2 und 3 = Aktivität II, von 3 und 4 = Aktivität III, von 4 und 5 = Aktivität IV, von 5 und 6 = Aktivität V

[2] J. Chem. Ind. *68*, 23 (1949).
[3] Helv. Chim. Acta *28*, 711 (1945).
[4] Helv. Chim. Acta *26*, 1945 (1943), *27*, 404 (1944).
[5] Ber. dtsch. chem. Ges. *74*, 73 (1941).

Das von uns verwendete Aluminiumoxyd «Chippis» besitzt nach dem Glühen meist die Aktivität III; mit ½% Wasser desaktiviert, die Aktivität IV; mit 1–1½% Wasser desaktiviert, die Aktivität V.

5. Vitamin A oder Axerophthol



a) Erkennung: Blaufärbung mit Antimontrichlorid in Chloroformlösung, Blaufärbung mit Tonsil bzw. sauren Erden. Im Ultraviolettlicht gelbgrüne Fluoreszenz. UV-Absorption $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ 325 mμ = 1750 (in Cyclohexan).

b) Wanderungsgeschwindigkeit: Die Ester wandern schneller als der Vitamin-A-Alkohol, die Zersetzungsprodukte (Anhydrovitamin A und Isoanhydrovitamin A) schneller als die Ester. Die Carotine trennen sich leicht vom Alkohol und schwer von den Estern.

c) Zersetzlichkeit: Empfindlich gegen Luft und Säuren. Alkohol und Ester zersetzen sich an sauren Säulen; die Ester werden an alkalischen Säulen verseift. Die Eluate zeigen im UV-Spektrum oft Absorptionsbanden, die ursprünglich nicht vorhanden waren. Der Not gehorchend, haben wir die Vorbegasung und das Neutralisieren des Aluminiumoxyds eingeführt.

d) Chromatographie eines gemischten Vitamin-A-Konzentrates aus Fischleberölen (Gehalt ca. $1 \cdot 10^6$ I.E./g).

Ein präparatives Durchlaufchromatogramm von 20 g Konzentrat an 2 kg Aluminiumoxyd (Aktivität IV), das mit der Lösungsmittelreihe Petroläther-Benzol-Äther-Methanol gewonnen wurde, wird mit Abb. 5 und Tab. IX resümiert:

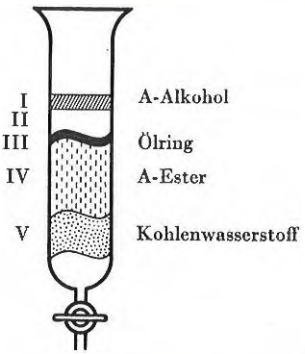


Abb. 5. Zonenfolge im Vitamin-A-Chromatogramm

Das präparative Chromatogramm lieferte somit 6,3 g einer Vitamin-A-Esterfraktion mit 63% und 4,0 g einer Vitamin-A-Alkoholfraktion mit 23%, zusammen mit 86% der ursprünglich gemessenen Aktivität.

Das gleiche Konzentrat wurde nach den chromatographischen Analysenverfahren von P. B. Müller und von N. T. Gridgeman bestimmt. Die Trennung nach

Tab. IX. Auswertung des Durchlaufchromatogramms

Zone Abb. 5	Lösungsmittel	Durchlauf Liter	Rückstand g	n_D^{20}	Gehalt in I.E./g	Gehalt von ursprünglicher Aktivität	Hauptbestandteil
V	Petroläther	ca. 1	2,0	1,525	$0{,}24 \cdot 10^6$	2 %	Kohlenwasserstoff
IV	Petroläther	ca. 3	6,3	1,592	$2{,}15 \cdot 10^6$	63 %	Vitamin-A-Ester
II/III	Benzol	ca. 2	7,0	1,479	$0{,}24 \cdot 10^6$	8 %	Nebenprodukte
I	Äther	ca. 4	4,0	1,560	$1{,}25 \cdot 10^6$	23 %	Vitamin-A-Alkohol
	Methanol	ca. 2	1,6	1,534	$0{,}13 \cdot 10^6$	1 %	Nebenprodukte
	Total	12	19,9	–	–	97 %	–

P. B. MÜLLER[6] mit Hilfe von verschieden aktivierten Aluminiumoxydschichten ergab pro 1 g Konzentrat einen Estergehalt von $0{,}65 \cdot 10^6$ I.E. und einen Alkoholgehalt von $0{,}30 \cdot 10^6$; total $0{,}95 \cdot 10^6$ I.E. Vitamin A/g (Abb. 6). Die Verseifung des Konzentrates nach N. T. GRIDGEMAN[7] unter nachfolgendem Durchlaufchromatogramm des Vitamin-A-Alkohols ergab einen Gehalt von $1{,}02 \cdot 10^6$ I.E. Vitamin A/g Konzentrat. Beide Analysenmethoden gaben somit etwas höhere Werte als das präparative Chromatogramm.

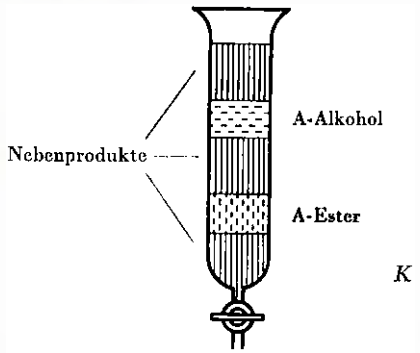
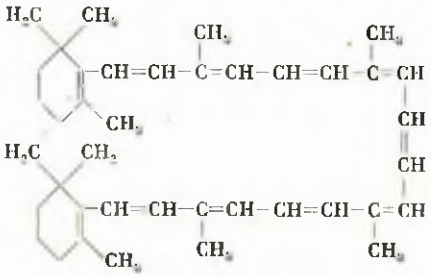


Abb. 6. Analyse nach P. B. MÜLLER
(Aluminiumoxyd mit fünf verschiedenen Aktivitäten)

e) Reindarstellung und technische Anwendung: Die erste Reindarstellung des Vitamin A aus Fischölen gelang Prof. KARRER 1931 durch mehrfache Chromatographie an Aluminiumoxyd[8]. Dies war das Paradestück zur Veranschaulichung der Leistungsfähigkeit der neuen Reinigungsoperation. In gleicher Weise gelang uns 1947 die erste Reindarstellung von synthetischem Vitamin A[9]. In der Technik hielt sich die Chromatographie sehr lange neben der gebräuchlicheren Molekulardestillation zur Konzentrierung von Fischölen. Bei der Ausarbeitung der Vitamin-A-Synthese wurde die Chromatographie überflüssig. Die synthetischen Reinpräparate werden heute durch Kristallisation gewonnen.

[6] Helv. Chim. Acta *27*, 443 (1944), *30*, 1172 (1947).
[7] Analyst *73*, 662 (1948).
[8] P. KARRER, R. MORF und K. SCHÖPP, Helv. Chim. Acta *14*, 1036, 1431 (1931).
[9] O. ISLER, W. HUBER, A. RONCO und M. KOFLER, Helv. Chim. Acta *30*, 1911 (1947).

6. β-Carotin oder Provitamin A



a) Erkennung: Gelbrote Farbzone; Blaufärbung mit Antimontrichlorid in Chloroform; Absorptionsmessung $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ 465 mμ = 2440 (Cyclohexan).

b) Wanderungsgeschwindigkeit: Etwas langsamer als α-Carotin, etwas schneller als γ-Carotin und Lycopin, viel schneller als die Chlorophylle, Xanthophylle und Vitamin-A-Alkohol.

c) Zersetzlichkeit: Empfindlich gegen Luft. Dazu Möglichkeit teilweiser Isomerisierung beim Chromatographieren an Aluminiumoxyd.

d) Reindarstellung: Carotinpaste wird technisch aus Palmöl und Karotten hergestellt. Aus diesen Pasten kann man im Laboratorium durch doppeltes Durchlaufchromatogramm (Abb. 7) und nachfolgende Kristallisation wie folgt reines β-Carotin gewinnen:

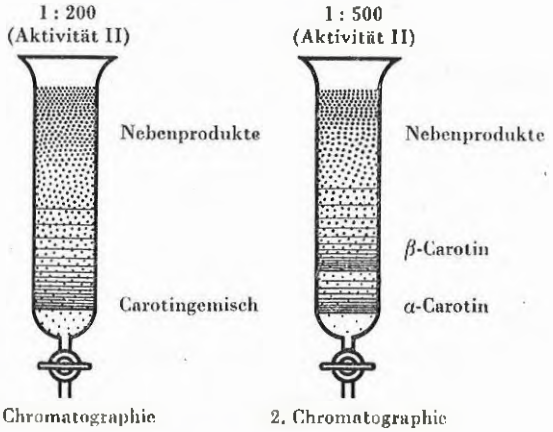


Abb. 7. Reinigung von β-Carotin

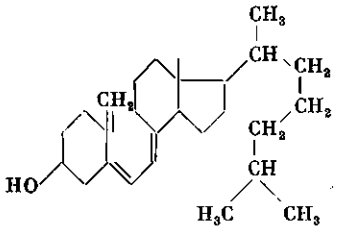
1 g Carotinpaste, die etwa 12% β-Carotin enthält, wird vorerst an 200 g Aluminiumoxyd (Aktivität II) chromatographiert. Die meisten Nebenprodukte haften an der Säule. Der gefärbte Durchlauf, etwa 600 cm³ Benzol–Petroläther-Gemisch (1 : 1), liefert beim Einengen ca. 0,1 g kristallisiertes Carotin.

200 mg dieses Gemisches von α- und β-Carotin werden in der zweiten Säule an der 500fachen Menge Aluminiumoxyd (Aktivität II) adsorbiert und durch Entwickeln mit Petroläther und Benzol getrennt. Das Petroläthereluat (600 cm³) enthält vorwiegend gelbes α-Carotin. Das rotgelbe Benzoleluat (400 cm³) liefert nach dem Einengen und Umkristallisieren 150 mg kristallisiertes β-Carotin.

Zur Prüfung auf Einheitlichkeit bereitet man in analoger Weise ein kleines Probechromatogramm und beurteilt die Gleichmäßigkeit der entstehenden Farbzone.

e) Besondere Anwendungen: Die erste Auftrennung von α- und β-Carotin durch R. KUHN und E. LEDERER[10] war der wichtigste Markstein in der Geschichte der Chromatographie. Die Reindarstellung des synthetischen β-Carotins erfolgte 1950 fast gleichzeitig von P. KARRER und C. H. EUGSTER[11] mittels Calciumhydroxyd und Zinkcarbonat und von H. INHOFFEN et al.[12] mittels Aluminiumoxyd. Für die sehr zahlreichen Beiträge zur Chromatographie ähnlicher Verbindungen muß auf das schöne Buch «Die Carotinoide» von P. KARRER und E. JUCKER (Verlag Birkhäuser, Basel 1948, speziell S. 30–6) und den Aufsatz von L. ZECHMEISTER, «Stereochemistry and Chromatography»[13] verwiesen werden.

7. Vitamin D_3



a) Erkennung: Gelbfärbung mit Antimontrichlorid in Chloroform, die in Gegenwart von Carotin oder Vitamin A verdeckt wird. UV-Absorption $E^{1\%}_{1\,cm}$ 625 mμ = 490 (in Äthylalkohol).

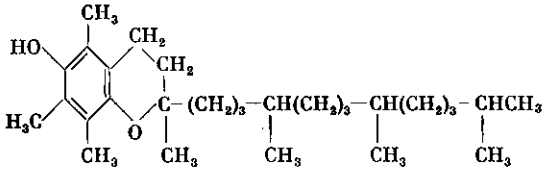
b) Wanderungsgeschwindigkeit: Etwas langsamer als Vitamin A; viel langsamer als β-Carotin und Vitamin-A-Ester.

c) Zersetzlichkeit: Weniger empfindlich als Vitamin A.

d) Reindarstellung und technische Anwendung: Die erste Reindarstellung erfolgte 1936 in Göttingen mit Hilfe der Chromatographie an Aluminiumoxyd, und zwar gleichzeitig durch Isolierung aus Fischölen und durch Synthese aus Cholesterin[14]. Bei der Isolierung aus Thunfischöl gebrauchte H. BROCKMANN neue Behelfe, um die Lage der an sich farblosen Verbindung im Chromatogramm zu erkennen. Er markierte zuerst die Vitamin-D_3-Zone durch Zugabe eines ähnlich adsorbierenden Farbstoffes. Die angereicherten Präparate wurden darauf in das gefärbte 3,5-Dinitrobenzoat verwandelt, das bei weiterem Chromatographieren eine einheitliche, gelbe Zone ergab, dessen Eluat kristallisierte.

Bei der Ausarbeitung der Synthese des Vitamin D_3 fiel die Chromatographie als Reinigungsoperation weg. Erhalten blieb sie bei der analytischen Bestimmung des Vitamin D_3 neben Vitamin A und β-Carotin[15].

8. Vitamin E oder α-Tocopherol



a) Erkennung: Sehr schwache Zone im Ultraviolettlicht. Reduktionswirkung der eingedampften Eluate (z. B. mit alkoholischem Silbernitrat), UV-Absorption $E^{1\%}_{1\,cm}$ 292 mμ = 73 (Isopropylalkohol).

b) Wanderungsgeschwindigkeit: α-Tocopherol wandert schneller als β-Tocopherol, dieses schneller als γ- und δ-Tocopherol. Die Tocopherolester wandern viel schneller als die freien Tocopherole.

c) Zersetzlichkeit: Die freien Tocopherole sind luft- und alkaliempfindlich, aber beständig in saurem Milieu. Reine Verbindungen werden im Chromatogramm weniger zersetzt als Rohkonzentrate. Für die quantitative Trennung von α-, β- und γ-Tocopherol empfiehlt M. KOFLER[16] eine Vorbehandlung der Aluminiumoxydsäulen mit Zinn-(II)-chlorid.

d) Trennung von freiem und verestertem Tocopherol im Durchlaufchromatogramm.

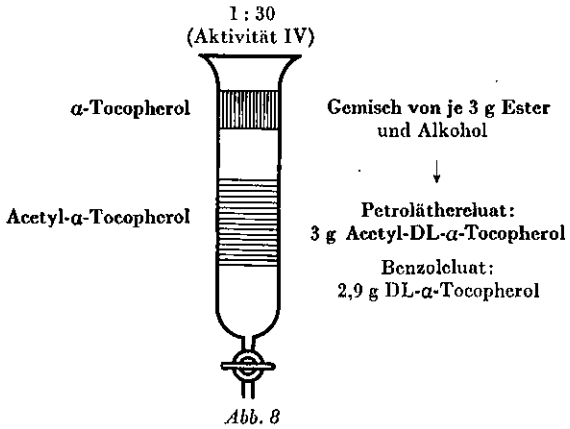


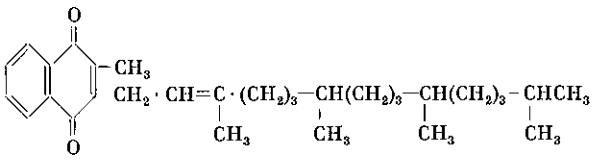
Abb. 8

[10] Ber. dtsch. chem. Ges. *64*, 1349 (1931).
[11] Helv. Chim. Acta *33*, 1172 (1950).
[12] Liebigs Ann. Chem. *569*, 237 (1950), *570*, 54, 69 (1950).
[13] Ann. Acad. Sci. (New York) *49/2*, S. 220–34 (1948).
[14] A. WINDAUS, F. SCHENK und F. v. WERDER sowie H. BROCKMANN, Z. physiol. Chem. *241*, 100, 104 (1936).
[15] P. B. MÜLLER, Mitt. Lebensm. Hyg. *40*, 376 (1949).
[16] Helv. Chim. Acta *30*, 1053 (1947).

Das Gemisch von Ester und Alkohol wird an der 30-fachen Menge Aluminiumoxyd (Aktivität IV) chromatographiert (Abb. 8). Man eluiert den Ester mit der 100-fachen Menge Petroläther und darauf den Alkohol mit der 100fachen Menge Benzol. Die hier angewandten Mengenverhältnisse Substanz zu Aluminiumoxyd zu Eluierungsmittel von 1:30:100:100 werden beim Arbeiten mit unbekannten Verbindungen als Norm empfohlen.

e) Reindarstellung und technische Anwendung: Die erste Isolierung von reinem α-Tocopherol gelang den Amerikanern EVANS, EMERSON und EMERSON[17]. Diesen Forschern war die Chromatographie wenig vertraut, und sie benutzten sie nur zur Reinigung der Allophanate an Calciumcarbonatsäulen. Die direkte Chromatographie des Unverseifbaren von Weizenkeimölen beschrieben zuerst P. KARRER und H. SALOMON[18]. Bei der Synthese des Vitamin E, die wir in Zusammenarbeit mit Prof. KARRER ausführten, gelang die erste Reindarstellung durch Chromatographie an Aluminiumoxydsäulen[19]. Bei der technischen Ausarbeitung der Synthese konnte die chromatographische Reinigung durch eine Hochvakuumdestillation ersetzt werden. Technische Bedeutung besitzt die Chromatographie weiterhin für die Trennung des Gemisches verschiedener Tocopherole, das bei der Molekulardestillation vieler Öle anfällt.

9. Vitamin K_1 oder Phyllochinon



a) Erkennung: Blaufärbung mit Natriummethylat in Äthylalkohol (= DAM-KARRER-Test). UV-Absorption $E^{1\%}_{1\,cm}$ 249 mμ = 417 (in Petroläther), UV-Absorption des Dihydrovitamin-K_1-Diacetates $E^{1\%}_{1\,cm}$ = 1600 (in Petroläther).

b) Zersetzlichkeit: Das Vitamin K_1 ist lichtempfindlich und wird an Aluminiumoxyd teilweise zerstört. Man benutzt deshalb zweckmäßig weniger aktive Adsorptionsmittel zu seiner Chromatographierung. Die Dihydrovitamin-K_1-Diester sind an Aluminiumoxyd völlig beständig.

c) Reindarstellung von Dihydrovitamin-K_1-Diacetat: Acetyliertes Kondensationsprodukt aus Acetylphytol und Methylnaphtohydrochinon, das etwa 40 % Dihydrovitamin-K_1-Diacetat enthält, wird an der 100fachen Menge Aluminiumoxyd adsorbiert, mit Petroläther gewaschen und dann mit Benzol eluiert (Abb. 9). Da unmittelbar vor der Esterzone ein stark fluoreszierendes Nebenprodukt durch die Säule wandert, kann das Dihydrovitamin-K_1-Diacetat in einer kleinen Benzolfraktion abgetrennt werden. Einengen und Umkristallisieren aus Äthylalkohol liefert die reine Verbindung vom Smp. 59°.

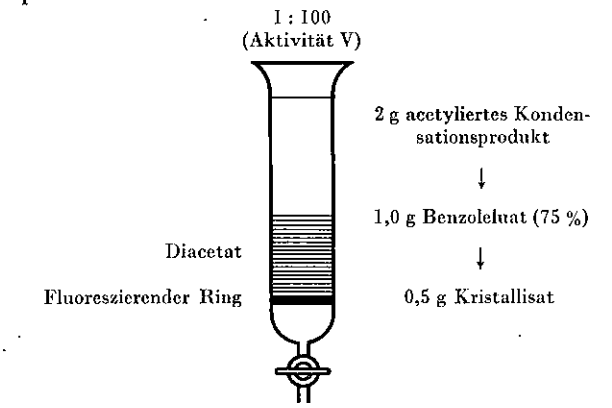


Abb. 9

d) Reindarstellung und technische Anwendung: Die Reindarstellung gelang P. KARRER, H. DAM und Mitarbeitern[20] durch mehrfache Chromatographie an Magnesiumsulfat- und Zinkcarbonatsäulen. E. A. DOISY und Mitarbeiter[21] chromatographierten erst an künstlichen Zeolithen, die sonst zum Weichmachen des Wassers dienen, und anschließend am Kohlepräparat «Darco». Bei der Konzentrierung der ersten Syntheseprodukte aus Methylnaphtohydrochinon und Acetylphytol[22] benutzten wir Magnesiumsulfat und Aluminiumoxyd als Adsorptionsmittel. Bald darauf ersetzte L. F. FIESER die chromatographischen Reinigungsverfahren durch das Zentrifugieren der in Petroläther schwerlöslichen Dihydroverbindung[23].

10. Allgemeine Gesichtspunkte

Bei der Behandlung der fettlöslichen Vitamine konnte gezeigt werden, daß die erste Reindarstellung dieser Wirkstoffe nur unter Anwendung der Chromatographie gelungen ist. Mit der gleichen Methodik, die am Naturstoff ausexerziert war, wurden später die ersten synthetischen Präparate angereichert. Bei der Verfahrensentwicklung der synthetischen Vitamine schied die Chromatographie wieder als Reinigungsoperation aus, da in der Technik die Lösungsmittelextraktion, die Kristallisation und die Destillation gegenüber der Chromatographie bevorzugt werden. Dagegen hielt sich die Chromatographie bei der Gewinnung der Vitamine aus natürlichen Materialien. Ähnliche Verhältnisse können aus dem Schrifttum für viele andere Wirkstoffe abgelesen werden.

Die Chromatographie ist in erster Linie eine Laboratoriumsmethode. Hier ist sie einer der unentbehrlich-

[17] J. Biol. Chem. *113*, 319 (1936).
[18] Helv. Chim. Acta *21*, 514 (1938).
[19] P. KARRER und Mitarbeiter, Helv. Chim. Acta *21*, 520 (1938); P. KARRER und O. ISLER, U.S. Pat. 2411967.
[20] Helv. Chim. Acta *32*, 310, 1464 (1939).
[21] J. Biol. Chem. *130*, 219 (1939).
[22] O. ISLER, U.S. Pat. 2325681.
[23] J. Amer. Chem. Soc. *61*, 2559 (1939).

sten Behelfe. Wer mit Naturstoffen arbeitet, darf die Chromatographie heute nicht mehr umgehen. In vielen Instituten ist es sogar zur Regel geworden, daß jedes Zwischenprodukt vor der Analyse chromatographiert wird. Voraussetzung für das Gelingen der Chromatographie ist, daß die Substanzen unter den angewandten Bedingungen beständig sind. Hierüber geben meistens die Absorptionsspektren der Produkte Auskunft. Die Ultraviolettabsorptionsmessung ist ohnehin eine der aufschlußreichsten Auswertungsmethoden für die anfallenden Eluate.

Die Anwendungsformen der Chromatographie seien noch kurz nach ihrer Wichtigkeit in folgende Reihe geordnet:

1. Auftrennung von Gemischen.
2. Reinigung irgendwelcher Produkte.
3. Prüfung auf Reinheit und Einheitlichkeit (eventuell Identitätsbeweis durch Mischchromatogramm im sogenannten Dreiröhrentest).
4. Erste Anhaltspunkte für die Strukturaufklärung.

Bei der Ausführung der Chromatographie wird man, wenn möglich, im Licht oder im Ultraviolettlicht beobachten oder den Verlauf der Adsorption mittels Farbreaktionen verfolgen. Diese direkte Beobachtung kann mit dem Zielen beim Schießen verglichen werden. Eine besondere Knacknuß ist die Chromatographie farbloser Verbindungen ohne besondere Merkmale, wobei diese Verbindungen leider das Gros der chemischen Produkte ausmachen. Man kann diese Aufgabe mit den indirekten Schießverfahren vergleichen, bei denen man das Ziel nicht beobachten kann. Diese besondere Aufgabe wird am zweckmäßigsten gelöst mit der Arbeitsweise von Prof. REICHSTEIN, die auch uns bei unübersichtlichen Verhältnissen als Wegweiser dient:

«Pro 1 g zu chromatographierender Substanz werden 30 g Aluminiumoxyd eingesetzt und solange mit je 100 cm³ eines Lösungsmittels gewaschen, bis nichts mehr aus der Säule eluiert wird; darauf fährt man fort mit je 100 cm³/g des nächsten Eluierungsmittels und so fort.»

Es wird vermutet, daß TSWETT die Anregung zu seiner grundlegenden Entdeckung vom Basler Chemieprofessor SCHÖNBEIN erhielt. Wiederum ein Schweizer, A. WINTERSTEIN, schrieb die erste zusammenfassende Darstellung. Die Schulen von KARRER, RUZICKA und REICHSTEIN haben die neue Methode entwickelt und allgemein bekannt gemacht. Der große Beitrag, den unsere klassischen Forschungsstätten an die Entwicklung der Röhrenchromatographie geleistet haben, ist eine Verpflichtung für alle schweizerischen Laboratorien, die Chromatographie anzuwenden und weiter auszubauen.