

## Anleitung zur Säulenchromatographie

### Allgemeine Bemerkungen:

- Spannen Sie die Säule senkrecht ein!

*Obacht: Die tragende Stativklemme ist hier ausnahmsweise die obere, mit der Sie die Säule direkt am Schliff so fest spannen, dass sie auch unter Last nicht nach unten wegrutschen kann. Mit der unteren Stativklemme halten Sie die Säule in der Senkrechten.*

- Verwenden Sie einen 500-ml-Tropftrichter oder sonst einen möglichst großen Tropftrichter **mit Druckausgleich!** Je größer der Tropftrichter, um so weniger häufig müssen Sie sich um das Nachfüllen des Lösemittels kümmern.

*Fixieren Sie den Tropftrichter besser nicht mit einer Stativklemme: Das Fixieren wäre sehr unhandlich, weil Sie den Tropftrichter im Laufe der Chromatographie mehrmals abnehmen müssen. Außerdem müssen die meisten von Ihnen sich sehr weit nach oben recken, um dort oben eine Stativklemme einzubauen. Wenn Sie das aber anstrengt, gibt es schnell Verspannungen der Apparatur, weil die Klemme nicht richtig sitzt. Mit einer übermäßigen Anzahl von Stativklemmen verbessern Sie nicht die Stabilität sondern erhöhen ganz im Gegenteil die Bruchgefahr! Wenn Sie drucklos chromatographieren, ruht der Tropftrichter von allein sicher im Schliff. Wenn Sie mit Druck chromatographieren, wird besser die Schliffverbindung gesichert (Siehe unten).*

- Die fertige Apparatur ist ziemlich hoch. Stecken Sie die Teile zunächst trocken zusammen und probieren Sie aus, ob Sie Probleme hätten, Lösemittel durch den Tropftrichter einzufüllen. Falls ja, so stehen Ihnen in Raum 36.01 zwei Abzüge mit niedrigerer Arbeitsplatte zur Verfügung.<sup>2</sup>
- Im Praktikum werden ausschließlich Säulen mit „Fritten“ verwendet. Es handelt sich dabei um eine poröse Glasscheibe am unteren Säulenende, auf der das Füllmaterial ruht. **Stopfen Sie deshalb keine Watte oder ähnliches in die Säule, auch wenn Sie dies lesen oder gesagt bekommen.** Watte ist ein primitiver Ersatz für Säulen ohne Fritten. Im Praktikum gibt es einige Säulen, deren Fritten etwas zu grob sind, so dass bei der Chromatographie etwas Kieselgel mit durchrutschen kann. Grob- und feinporige Fritten kann man schon mit bloßem Auge unterscheiden<sup>3</sup>. Wenn Sie eine Säule mit grober Fritte erwischt haben, schneiden Sie ein Filterpapierstückchen so zurecht, dass es genau auf die Fritte passt<sup>4</sup>. Dann rutscht auch nichts mehr durch.

Zum Einschlämmen des Füllmaterials (= Adsorbens) gibt es zwei Methoden:

<sup>1</sup> Wenn der Tropftrichter keinen Druckausgleich hat, können Sie nicht mittendrin das Lösemittel wechseln, weil Sie den Tropftrichter immer nur dann abnehmen können, wenn er vollkommen leer gelaufen ist.

<sup>2</sup> Es geht darum, ob es Ihnen möglich ist, **sicher** Lösemittel nachzufüllen. Es macht nichts, wenn das ein wenig unbequem ist. Bedenken Sie, dass Sie meistens am unteren Säulenende hantieren müssen. Es wäre also nicht sinnvoll, wenn Sie zwar sehr bequem das Lösemittel nachfüllen können, aber ansonsten ständig auf den Knien vor der Säule herumrutschen.

<sup>3</sup> Wenn Sie Glück haben, ist auf der Säule die Porengröße der Fritte auch markiert. Es gibt Abstufungen von „0“ bis „4“. Je größer die Zahl, umso feinporiger die Fritte.

<sup>4</sup> Tipp: Die größtmögliche Münze ermitteln, die noch in die Säule passt. In der Regel ist das die 2-€Münze. Münze auf Filterpapier legen und mit Bleistift (Tinte finden Sie nachher in Ihrem Produkt) umfahren.

### Säule füllen: Die „quick-and-dirty“ Methode:

- Verrühren Sie in einem Becherglas oder in einer Kristallisierschale das Adsorbens mit etwas Lösemittel zu einer Aufschlämmung, die Sie über einen Trichter möglichst schnell in die Säule gießen.
- Klopfen Sie die Säule mit einem Korkring gut ab, um die Packungsdichte zu verbessern

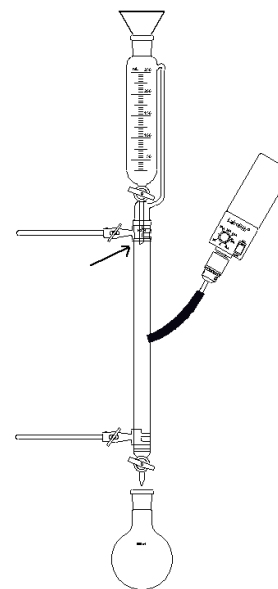
#### Vorteil:

- Es geht ziemlich schnell

#### Nachteile:

- Es ist ein ziemliches Gepansche, bei dem Sie ziemlich viel in die Nase bekommen. Je gefährlicher das Lösemittel, umso fahrlässiger wird diese Methode. Chloroform ist z.B. krebserzeugend.
- Die Säulenfüllung ist nicht ganz gleichmäßig. Manchmal sind auch kleine Luftbläschen mit eingeschlossen.

### Säule füllen: Die „bessere“ Methode:



Das folgende mag Sie beim Lesen etwas abschrecken, weil es kompliziert klingt, was es in Wirklichkeit aber gar nicht ist.

- Spannen Sie die Säule wie oben beschrieben ein! Setzen Sie einen Tropftrichter auf und stellen Sie einen Rundkolben oder Erlenmeyerkolben unter. Auf den Tropftrichter kommt noch ein Einfülltrichter. Das ganze sollte jetzt so aussehen, wie auf der nebenstehenden Abbildung. (Wozu der Rührmotor gut ist, erfahren Sie gleich.) Vergewissern Sie sich, dass der Tropftrichter dicht auf der Säule sitzt. Dies ist dann der Fall, wenn die Schliffverbindungen absolut sauber sind, es also beim Drehen des Tropftrichters keine Schabe- oder Kratzgeräusche gibt.
- Öffnen Sie den Hahn des Tropftrichters und schließen Sie den Hahn an der Säule. Füllen Sie die Säule durch den Tropftrichter hindurch mit Lösemittel voll, bis das Lösemittel etwa in der Mitte des Tropftrichters steht. (Die Schliffverbindung sollte dicht sein!)<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> Bei dieser Methode haben Sie überdies den Vorteil, dass Sie gleich jetzt schon am Anfang schnell mal kontrollieren können, ob der Auslaufhahn der Säule dicht schließt. Ist das Kieselgel nämlich schon drin und vielleicht auch schon die Substanz, können sie nichts mehr aufhalten, was vielleicht wünschenswert wird, wenn der Arbeitstag nicht gereicht hat und Sie also anderntags die Chromatographie fortsetzen wollen und die also über Nacht nicht trocken laufen soll. Schließt da was nicht dicht, klären Sie das jetzt gleich und zuerst mit Ihrem Assistenten, bevor Sie weiter machen!

Geben Sie das Adsorbens **trocken** in den Tropftrichter. Sie können abwarten, bis es im Tropftrichter einsinkt und von selbst eine Aufschlammung gibt oder mit einem Glasstab oder Spatel von oben nachstochern. Sobald das Adsorbens auf den Boden des Tropftrichters gesunken ist, lassen Sie das Lösungsmittel durch zunächst vorsichtiges Öffnen des Säulenhahns langsam ab. Das Lösemittel sollte dabei nicht unter das Ende des Auslaufrohres des Tropftrichters (Siehe Pfeil in der Abbildung) sinken.

Sie können jetzt beobachten, dass sich die aus dem Tropftrichter austretende Aufschlammung separiert: Zum einen in die zuvor eingeschlossenen Luftbläschen, die jetzt nach oben durch das Druckausgleichsrohr des Tropftrichters entweichen und zum anderen in das jetzt wie einzelne Schneeflocken herabrieselnde Adsorbens.

- Wenn sich die ersten paar Zentimeter Adsorbens auf der Fritte der Säule abgesetzt haben, ist die Strömgeschwindigkeit von selbst so weit herabgesetzt, dass sie diese nicht mehr mit dem Säulenhahn kontrollieren müssen. Öffnen Sie den Hahn ganz!
- Beobachten Sie den Tropftrichter! Ergänzen Sie das, was jeweils knapp wird, also entweder das Lösemittel oder das Füllmaterial.

Sie müssen auch hier die Säule abklopfen, damit Sie eine möglichst dichte Packung erhalten. Dieses Abklopfen kann man auch automatisieren. Installieren sie einen Rührmotor schräg neben die Säule, so wie dies die Abbildung zeigt.

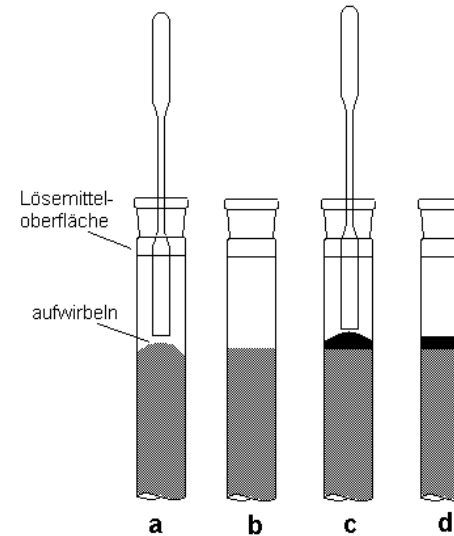
- Montieren Sie ein ca. 20 cm langes, möglichst gebogenes Stück Vakuumschlauch auf die Antriebswelle des Rührmotors.
- Schalten Sie den Motor ein und experimentieren Sie mit Drehzahl und Abstand zur Säule, bis der Vakuumschlauch möglichst oft und kräftig gegen die Säule schlägt. Wenn Ihnen das ein bisschen Angst macht, dann versuchen Sie diese zu bezwingen: Der Schlauch tut der Säule nichts!
- Nehmen Sie die in der Versuchsvorschrift angegebene Menge an Füllmaterial nur als Näherungswert. Füllen Sie die Säule so weit, dass das Füllmaterial bis etwa 5 cm an den oberen Säulenschliff heranreicht. Richten sie es so ein, dass genau dann auch das Füllmaterial im Tropftrichter aufgebraucht ist, da dieses sonst verworfen werden muss. (Das Füllmaterial ist ziemlich teuer!)
- Schließen Sie den Hahn am Tropftrichter und nehmen Sie ihn ab, wenn das Lösemittel unter die Schliffverbindung abgesunken ist<sup>6</sup>. Schließen Sie in diesem Augenblick auch den Hahn der Säule.

Vorteil dieser Methode:

- Eine maximal dichte und von oben bis unten völlig gleichmäßig gepackte Säulenfüllung
- Eine dankbare Nase.

<sup>6</sup> Installieren Sie eine weitere Stativklemme im Abzug, in die Sie den Tropftrichter einspannen können. Vergessen Sie nicht, ein Gefäß (z.B. Kolben) unterzustellen, weil Schliffhähne auch einmal unbeabsichtigt tropfen können.

Die folgenden Schritte sind für beide Methoden wieder gemeinsam



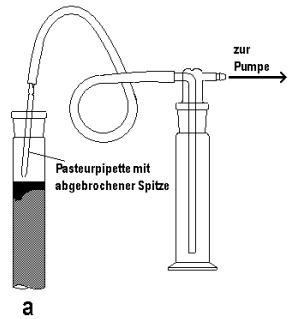
- Als nächstes müssen Sie eine vollkommen ebene Oberfläche des Füllmaterials produzieren. Nehmen Sie dazu die flache Seite eines nicht zu kleinen Spatels und wirbeln Sie die Oberfläche des Füllmaterials etwas auf (a). Lassen Sie danach wieder absetzen. Vorsichtiges Klopfen an der Säule macht die Oberfläche - wenn Sie es richtig gemacht haben - bretteben (b). Ist es nicht gelungen, dann muss noch einmal aufgewirbelt werden.
- Überschichten Sie die Oberfläche des Füllmaterials jetzt mit einer etwa 5 mm dicken Schicht Seesand<sup>7</sup>. Sie können das wieder über den Tropftrichter machen oder aber den Seesand vorsichtig trocken in die offene Säule rieseln lassen. Nehmen Sie dazu am besten mehrmals etwas Sand zwischen Daumen und Zeigefinger und geben das in die Säule - ganz genau so wie sie ein Gericht mit „einer Prise Salz“ abschmecken.
- Auch der Seesand muss eine ebene Oberfläche erhalten. Sie erreichen das wieder durch vorsichtiges Aufwirbeln mit dem Spatel (c). Aber Vorsicht: Sie dürfen nur den Seesand aufwirbeln, keinesfalls das Füllmaterial!! Das fertige Ergebnis sollte aussehen, wie (d).

Sie können die so präparierte Säule ohne weiteres - z.B. über Nacht - stehen lassen (*Natürlich mit einem Stopfen verschlossen!*) - jedenfalls wenn Sie schon am Anfang darauf geachtet haben, dass der Säulenhahn sich dicht verschließen lässt.

<sup>7</sup> Sie brauchen diese Seesandschicht, damit Sie später das Füllmaterial mit Ihrer Lösung überschichten können. Wenn Sie das Auftragen auf die Säule schon so richtig gut beherrschen, kommen Sie auch mit einem Stückchen Filterpapier aus, aber vermutlich ist es besser, wenn Sie jetzt doch erst mal lieber den Seesand nehmen.

### Fehlerbeseitigung

Das Folgende ist nur wichtig, wenn der Säulenkopf zum Schluss nicht so aussieht, wie er soll, sondern so, wie bei (a) in der folgenden Skizze. Dann haben Sie nämlich die Präparation der Säule vermasselt! Wenn Sie nichts vermasselt haben, fahren Sie fort mit dem „Auftragen der Substanz“.



**Tragen Sie niemals aus Verzweiflung eine Substanz auf eine vermasselte Säule auf!**

Sie werden sonst eine unzureichende Trennung bekommen, weil die Fraktionen sich ineinander verzahnen!

So schlimm, wie das jetzt aussieht, ist es auch gar nicht, denn man kann das vermurkste wie folgt retten:

Sie brauchen jetzt:

- Eine Pasteurpipette und eine Ampullenfeile. Mit der Ampullenfeile ritzen Sie die Pasteurpipette an der Stelle, wo sich deren Durchmesser aufweitet und brechen die auslaufende Spitze ab. Die Öffnung der Pasteurpipette sollte noch einigermaßen eng sein, das Glas sich aber gleich hinter der Öffnung verbreitern.<sup>8</sup>
- Eine Gaswaschflasche mit Stativklemme
- Eine Membranpumpe
- PVC-Schlauch

Fixieren Sie die Gaswaschflasche in der Nähe des Säulenkopfs mit der Stativklemme. Verbinden Sie mit dem PVC-Schlauch die gekürzte Pasteurpipette mit der Gaswaschflasche.<sup>9</sup>

**Beachten Sie die Polung der Gaswaschflasche!** Wenn Sie sie falsch herum anschließen, ruinieren Sie die Pumpe, die sie am zweiten Stutzen der Gaswaschflasche anschließen!

Lassen Sie das Laufmittel bis in die Gegend des Säulenkopfes absinken. Betrachten Sie den Säulenkopf: Das Problem ist dem eines kariösen Zahns ähnlich - und also müssen Sie jetzt genau das selbe tun, wie ein Zahnarzt: Der Seesand wird nach Anschalten der Pumpe mit der gekürzten Pipette vorsichtig - na gut: Nicht weggebohrt, sondern abgesaugt. Immerhin wird Sie das schlürfende Geräusch stark an Ihren letzten Zahnarztbesuch erinnern. Wenn alles abgesaugt ist, sollte sich Ihnen ein Bild wie unter (b) bieten. Das ist schon mal ganz gut, allerdings ist der Säulenkopf gerade gefährlich trocken und immer noch schief. Pipettieren Sie also wieder etwas Lösemittel nach und glätten die Oberfläche wie schon beschrieben. Dann können Sie auch schon wieder versuchen, die Seesandschicht dieses Mal richtig aufzutragen und Sie haben durch das Malheur vielleicht nur eine halbe Stunde Zeit verloren.

<sup>8</sup> Anleitung zum Schneiden von Glas:

[http://www.bcp.fu-berlin.de/chemie/chemie/studium/ocpraktikum/ressourcen/laborpraxis/laborpraxis\\_webinfos/glasrohre\\_zuschneiden/index.html](http://www.bcp.fu-berlin.de/chemie/chemie/studium/ocpraktikum/ressourcen/laborpraxis/laborpraxis_webinfos/glasrohre_zuschneiden/index.html)

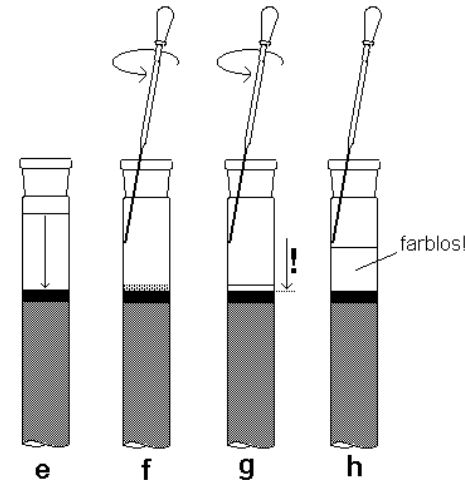
<sup>9</sup> Hilfe, wenn Sie Probleme mit unterschiedlichen Anschlussdurchmessern haben, finden Sie auf:

[http://www.bcp.fu-berlin.de/chemie/chemie/studium/ocpraktikum/ressourcen/laborpraxis/laborpraxis\\_webinfos/schlauchverbindungen/index.html](http://www.bcp.fu-berlin.de/chemie/chemie/studium/ocpraktikum/ressourcen/laborpraxis/laborpraxis_webinfos/schlauchverbindungen/index.html)

### Auftragen der Substanz

- **Das Auftragen der Substanz ist der kritischste Augenblick der Chromatographie! Fehler sind nicht korrigierbar!**
- **Die Säule darf bis zum Ende der Chromatographie niemals trocken laufen!**

Sorgen Sie dafür, dass Sie den Säulenkopf bequem erreichen können. Arbeiten Sie ruhig und ohne Hast. Fragen Sie einen Assistenten, wenn Sie unsicher sind! Halten Sie 2 Pasteurpipetten griffbereit, deren Hütchen fest und dicht auf den Pipetten sitzen - also nicht abrutschen und nicht zum Auslaufen der Pipette führen.



- Öffnen Sie den Hahn der Säule und lassen Sie das Lösemittel so weit ab, bis es gerade eben in die Seesandschicht eingesunken ist (e).<sup>10</sup>
- Genau in diesem Augenblick überschichten Sie ganz vorsichtig mit einer Pasteurpipette mit der Lösung mit den zu trennenden Komponenten (f). Lassen Sie die Lösung an der Säulenwand entlang rinnen und führen Sie die Pipette dabei im Kreis herum, so dass die Lösung auf der gesamten Innenfläche der Säule auf den Seesand rinnt. Wenn Tropfen auf die Seesandfläche platschen, verschlechtern Sie Ihr Trennergebnis! Es sieht dann so aus wie unter (k) auf der nächsten Seite. Tragen Sie zügig die gesamte Lösung auf!

- Ist die gesamte Lösung aufgetragen, so spülen Sie den verwendeten Kolben mit 1-2 ml frischem Lösemittel und tragen auch diese Waschlösung auf die Säule auf. Waschen Sie damit auch die Innenwände der Säule sauber. Sie können diesen Spülvorgang falls nötig wiederholen. Sie sollten dabei aber nur so wenig Lösemittelvolumen wie notwendig verwenden.

**Es kommt jetzt darauf an, dass der aufgetragenen Lösung möglichst schnell wieder das reine Lösemittel folgt - ohne dass sich Lösemittel und Lösung am Säulenkopf miteinander mischen.**

- Wenn die Lösung gerade eben in die Seesandschicht eingesunken ist, überschichten Sie mit genau einer Pasteurpipette<sup>11</sup> voll reinen Lösemittels (g). Warten Sie jetzt ab, bis das Lösemittel gerade eben wieder eingesunken ist! Erst dann kommt der nächste Auftrag mit der Pasteurpipette. Diesen Vorgang müssen Sie diverse Male wiederholen!

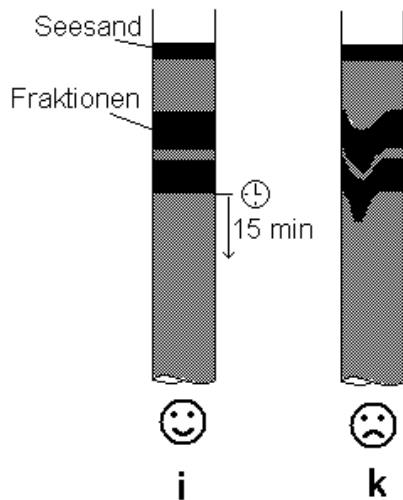
<sup>10</sup> Das Auftragen ist hier in der Weise beschrieben, dass der Hahn der Säule ständig geöffnet bleibt. Bei zügigem Arbeiten ist das ohne weiteres möglich. Kommen Sie jedoch unter Stress und droht Ihnen die Säule trocken zu laufen, dann schließen Sie den Hahn augenblicklich! Vergessen Sie aber nicht, ihn wieder zu öffnen, wenn es weitergehen soll!

<sup>11</sup> Verwenden Sie jetzt die zweite Pasteurpipette!

**Farbige Verbindungen:**

Wenn Sie der Meinung sind, dass die Lösung nunmehr vollständig in die Säulenfüllung eingesunken ist, so überschichten Sie in rascherer Folge mit einigen Pipetten voll Lösemittel. Die überstehende Lösung muss farblos sein (**h**)! Ist sie es nicht, lassen Sie wieder einsinken und fahren Sie fort mit dem pipettenweisen Auftragen!

- Überschichten Sie nun in rascher Folge mit der Pasteurpipette mit reinem Lösemittel. Je größer der Abstand der Lösemitteloberfläche vom Seesand, umso sorgloser können Sie auftragen. Ist die Oberfläche ca. 2 - 3 cm oberhalb der Seesandoberfläche, so setzen Sie den Tropftrichter wieder auf und öffnen zunächst ganz vorsichtig und dann, wenn die Säule voll gelaufen ist, wieder vollständig den Hahn des Tropftrichters. Füllen Sie den Tropftrichter mit Lösemittel auf! Nutzen Sie den hydrostatischen Druck des bis in den Tropftrichter hinein stehenden Lösungsmittels aus, um die Chromatographie zu beschleunigen!

**Auftrennung****Farblose Verbindungen**

Sie haben leider keine Möglichkeit, festzustellen, ob die Lösung vollständig eingesunken ist. Sie tun deshalb gut daran, das pipettenweise Auftragen und Einsinken lassen zur Sicherheit deutlich öfter zu machen, als Sie dies für eine farbige Verbindung für notwendig halten würden.

**Farbige Verbindungen:**

- Wenn Sie alles richtig gemacht haben, so sehen Sie alsbald eine Auftrennung der Fraktionen (**i**). Markieren Sie die vorderste Front der ersten Fraktion mit einem Filzstift und notieren Sie die Uhrzeit - am besten direkt auf der Säule. Wiederholen Sie den Vorgang z.B. 15 Minuten später. Rechnen Sie dann aus, wann die erste Fraktion aus der Säule auslaufen wird. Sie wissen dann also, ob Sie noch mal einige Zeit weggehen können oder lieber dableiben sollten. Ist das Auftragen schlecht gelungen, so sehen die Fraktionen ungefähr so aus wie unter (**k**). Sie „verzahnen“ sich ineinander - die Auftrennung ist schlechter.
- **Fraktionieren Sie „auf Sicht“, d.h. fangen Sie die Fraktionen so auf, wie Sie sie aus der Säule auslaufen sehen. Je nach Erfordernis können Sie dabei auch Zwischenfraktionen auffangen.**

**Farblose Verbindungen**

Sie haben keinerlei Möglichkeiten zu sehen, was in der Säule „passiert“. Entweder testen Sie laufend das auslaufende Eluat dünnstichtchromatografisch auf enthaltene Komponenten oder fangen - besser - das Eluat zunächst einmal in Reagenzgläsern auf, die Sie in gleichbleibenden Zeitabständen wechseln. Das Praktikum verfügt dazu über sog. **Fraktionssammler**, die diesen Wechsel automatisieren. Sie können dann hinterher in aller Ruhe dünnstichtchromatografisch untersuchen, in welchen Reagenzgläsern sich das Gewünschte befindet und entsprechend vereinigen. Beachten Sie, dass die Lösungen sehr verdünnt sind und Sie also wahrscheinlich mehrmals auf die DC-Karte auftupfen müssen.

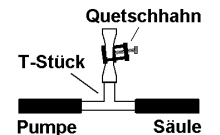
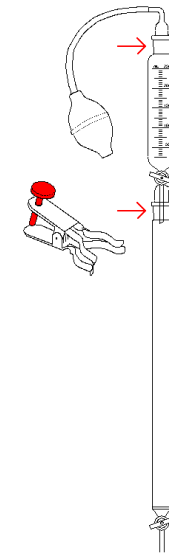
- Lassen Sie nach jedem Auftupfen ablüften!
- Versuchen Sie das Auftragen möglichst reproduzierbar zu machen, damit Sie auch die Konzentration der Stoffe in den einzelnen Fraktionen abschätzen können. (Also z.B. immer genau 10 Mal auftupfen.)

**Was ist, wenn die Säule zu langsam läuft?**

Je feinkörniger das Kieselgel, desto besser die Trennleistung, desto größer aber auch der Druck, der notwendig ist, um das Lösemittel durch die Säule laufen zu lassen. Gerade bei sehr leistungsfähigem Kieselgel kann es also sein, dass Ihre Säule nicht richtig läuft. Bei der „Flashchromatographie“ wird das Lösemittel mit mäßigem Überdruck in die Säule gepresst um die Strömgeschwindigkeit zu erhöhen. Es handelt sich sozusagen um die „light“-Version der HPLC. Man braucht also eine Pumpe, die einen bekannten und konstanten Druck erzeugen kann, der für die Apparatur nicht zu hoch ist.

Am einfachsten lässt sich das mit einer Aquarienpumpe realisieren. Eine Aquarienpumpe entwickelt einen Druck von ca. 200 mbar, was ausreichend hoch ist, um einen deutlichen Effekt zu bewirken, andererseits aber auch nicht zu hoch, um gefährliche Zustände zu erzeugen.

Ist die Laufgeschwindigkeit mit Aquariumpumpendruck zu stark, installiert man in den Zuleitungsschlauch ein T-Stück und lässt durch den nun vorhandenen Seitenauslass den überschüssigen Druck ab. Geregelt wird mit einem Quetschhahn nach Hoffmann oder - wenn vorhanden - noch schöner mit einem Nadelventil. Aquariumpumpen können - derzeit leider in noch begrenzter Anzahl - bei den Assistenten ausgeliehen werden.

**Wenn Sie Druck auf die Säule geben, müssen alle Schliffverbindungen mit Gabelklemmen gesichert werden!! (Siehe Pfeile in der Abbildung links)**

Auf dieser Abbildung sehen Sie außerdem, dass wer keine Aquariumpumpe hat, gern hilfsweise eine Handpumpe verwendet. Mit so einer Handpumpe zu arbeiten ist eigentlich Pfusch. Sie haben dann nämlich die ganze Zeit damit zu tun, irgendwie so auf dem Ball herumzudrücken, dass der Druck irgendwie richtig und irgendwie gleichmäßig erhöht ist<sup>12</sup>. Das gelingt Ihnen natürlich nur höchst unvollkommen, weshalb von einer gleichmäßigen Chromatographie keine Rede mehr sein kann. Modernes Kieselgel ist allerdings so leistungsfähig, dass es oft trotzdem noch eine akzeptable Trennung gibt und also können sie überall auch in den Forschungslaboratorien Mitarbeiter in dieser Weise arbeiten sehen.

Weiterer Nachteil der Handpumpe ist der kaum kalkulierbare Überdruck und die damit verbundene Gefahr, gefährliche Drücke zu erzeugen. Die Sicherung der Schliffverbindungen ist in diesem Fall besonders wichtig. Richtig würde man das machen, indem man Geräte mit Schraubverbindungen verwendet, die unter der Druckbelastung nicht aufgehen können. Nicht ganz so richtig, aber noch akzeptabel machen Sie es, wenn Sie die in der nebenstehenden Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichneten Schliffverbindungen mit einer soliden Gabelklemme sichern. Kann die Gabelklemme nicht mit einer Schraube wie in der Abbildung gesichert werden, ist es noch ein wenig weniger sicher.

<sup>12</sup> Laborbedarfsunternehmen freuen sich natürlich, wenn auch Chemiker diese Handpumpen kaufen - aber eigentlich gehören die in eine Arztpraxis, wo sie bei Darmspiegelungen dazu verwendet werden, um Luft in den Darm zu pumpen, damit der Arzt die Darminnenwand besser beurteilen kann.

Wenn Sie die Gabelklemme ganz vergessen, springt Ihnen der Tropftrichter von der Säule. Wenn Sie Glück haben, hopst er nur mal kurz hoch und geht nicht kaputt. Sie selbst werden allerdings weniger Glück haben, denn aus der aufgetrennten Schliffverbindung wird das Lösemittel genau in Ihr Gesicht katapultiert<sup>13</sup> und wenn es mit voller Wucht Stirn und Schutzbrille trifft, dauert es eine halbe Sekunde, bis Ihnen das Zeug von der Stirn an der Schutzbrille vorbei in die Augen gelaufen ist!

Ganz primitiv - und aber auch wenig wirkungsvoll - können Sie den Druck auch mit einem gewöhnlichen aufgeblasenen Luftballon erhöhen. Stülpen Sie dazu den Luftballon über ein ca. 2 cm langes Stück Vakuumschlauch und blasen Sie den Ballon auf, z.B. indem Sie das Vakuumschlauchstück kurz an den Ausblasstutzen einer Membranpumpe halten. Verbinden Sie den aufgeblasenen Luftballon über ein Gasableitungsrohr mit dem Tropftrichter der Apparatur! So ein Luftballon erzeugt allerdings nur einen Druck von 20 mbar, weshalb die Wirksamkeit nur sehr begrenzt ist.

### Laufmittel wechseln

Um das Laufmittel zu wechseln, drehen Sie zunächst den Hahn am Tropftrichter zu. Das Laufmittel sinkt dann schnell unter die Schliffverbindung ab. Ab diesem Moment können Sie den Tropftrichter abnehmen und ein anderes Laufmittel einfüllen.

- Steigern Sie die Polarität des Laufmittels nicht zu stark, wenn sich noch mehrere Fraktionen in der Säule befinden. Dann kann nämlich die oberste Fraktion anfangen „loszurasen“, weil sie als erste in Kontakt mit dem polaren Laufmittel kommt, wohingegen die weiter unten befindlichen Fraktionen zunächst weiterhin „auf der Stelle treten“. Dabei können vorher bereits getrennten Fraktionen sich im ungünstigsten Fall sogar wieder vereinigen.

**Wenn Sie die Polarität des Laufmittels zu hoch gewählt haben, ist die Säule vermurkst! Sie bekommen das nicht repariert, indem sie hektisch schnell wieder ganz unpolares Laufmittel verwenden. Deshalb noch einmal: Erhöhen Sie die Polarität nur in kleinen Schritten.**

### Alternative: Aluminiumoxid

Statt Kieselgel kann man auch Aluminiumoxid als Säulenfüllmaterial verwenden. Aluminiumoxid hat den Vorteil, vielfältig an das Trennproblem anpassbar zu sein. So ist es möglich, die Substanz „basisch“, „neutral“ und „sauer“ reagierend herzustellen. Das wichtigste sind jedoch die nach Brockmann definierten unterschiedlichen Aktivitätsstufen, die durch den Wassergehalt eingestellt werden. Je geringer der Wassergehalt, umso höher ist die Aktivität.

Aktivitätsstufe	Wassergehalt (%)
I	0
II	3
III	6
IV	10
V	15

Inzwischen ist es gelungen, aus der Aktivitätsstufe I ein weiteres Prozent Wasser herauszukitzeln. Man hat diese Aktivitätsstufe deshalb „super I“ genannt. Hohe Aktivitätsstufen eignen sich zur **Lösemitteltrocknung**. Bei präparativen Trennungen von Produktgemischen werden hingegen eher niedrigere Aktivitätsstufen verwendet.

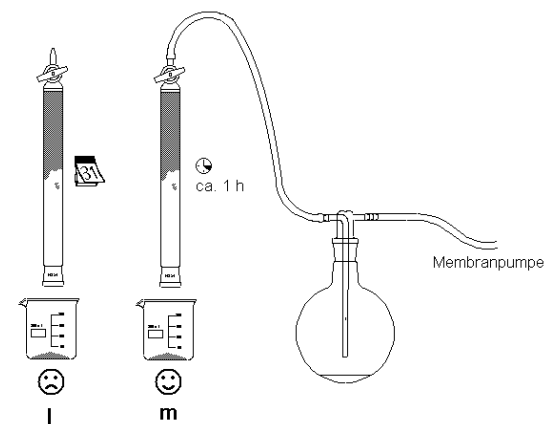
Wenn Ihnen die benötigte Aktivitätsstufe nicht zur Verfügung steht, können Sie aus einer höheren Aktivitätsstufe eine niedrigere herstellen, indem Sie die gemäß der Tabelle fehlende Menge Wasser

<sup>13</sup> Vertrauen Sie nicht darauf, dass Sie Glück haben könnten und gerade nicht an der Apparatur stehen. Sie stehen, wie ja schon beschrieben, ständig neben der Apparatur und drücken auf dem Gummiball herum. Und das Unglück passiert genau in dem Augenblick, wenn Sie ein kleines bisschen zu stark auf den Gummiball gedrückt haben.

ergänzen. Geben Sie dazu das Aluminiumoxid in einen Rundkolben, der so groß ist, dass er anschließend etwa zur Hälfte mit dem Aluminiumoxid gefüllt ist. Fügen Sie die erforderliche Menge Wasser hinzu und verschließen Sie mit einem Stopfen. Schütteln Sie die Mischung anschließend kräftig und ausgiebig durch. **VORSICHT:** Die Reaktion ist stark exotherm! Ziehen Sie bei größeren Ansätzen Lederhandschuhe an, damit Sie sich nicht die Finger verbrennen! Zusätzlich müssen Sie mit einem kräftigen Dampfdruck rechnen! Beginnen Sie also vorsichtig mit dem Schütteln, wobei Sie immer wieder belüften. Die Mischung muss nach dem Schütteln klümpchenfrei sein. Lassen Sie vor der Verwendung 24 Stunden stehen und schütteln Sie dann noch einmal zum Abschluss kräftig durch.

### Wie kriegt man die Säule hinterher wieder sauber?

Wenn die Chromatographie beendet ist, lassen Sie zunächst die Säule leer laufen. So lange das Füllmaterial in der Säule noch feucht ist, werden Sie es aber nicht herausbekommen. Sie haben 2 Möglichkeiten.



1. Säule kopfüber festspannen, etwas drunter stellen und warten (I). ... und warten... Sie werden ganz lange warten müssen, nämlich Tage bis Wochen. Und sie werden die Säule irgendwann vergessen haben. Die Säule wird alle anderen stören, weil Abzugfläche unnötig vollgestellt ist.
2. Saugen Sie mit einer Membranpumpe das Lösemittel ab und danach weiter Luft durch die Säule (m). Tipp: Der Gaswaschflaschenaufsatz ist ein Normschliff, der auch auf normale Kolben passt. Das ist hier die bessere Wahl, weil evakuiert wird und weil die zu erwartende Lösemittelmenge für eine Waschflasche u.U. zu viel ist. Aus ökologischen Gründen sollte die Pumpe druckseitig einen Kühler oder wenigstens einen Kondensatabscheider haben.

Sie werden beim Durchsaugen der Luft alsbald merken, dass eine Kältezone vom Säulenkopf bis zum Auslauf durch die Säule wandert. Das ist die Verdunstungskälte durch das an dieser Stelle gerade verdampfende Lösemittel. Ist die Säule wieder warm geworden, so ist also alles Lösemittel verdampft und der Inhalt wieder trocken und deshalb rieselfähig. Wenn der Inhalt trotzdem noch in der Säule „klebt“, liegt das daran, dass er durch die Pumpe angesaugt wird. Schalten Sie die Pumpe ab und klopfen Sie notfalls etwas an der Säule: Sie werden sehen, dass der Inhalt spontan herausfällt! Das Trockensaugen dauert in der Regel nicht länger als eine Stunde. Natürlich müssen Sie das nicht unbedingt noch am gleichen Tag erledigen. Aber die anderen Praktikanten wollen auch noch chromatographieren und warten deshalb auf Ihre Säule und außerdem nimmt ungenutzter Krempel unnötig Platz im Abzug weg.

Wenn das Säulenfüllmaterial nicht so gaaaaaaaanz vollständig aus der Säule herauskommt und im Gegenteil etliche Krümel gemeinerweise ganz unten an der Säuleninnenwand kleben bleiben, wo sie weder mit Finger Spatel oder Bürste hinlangen können, wenden Sie sich an die Assistenten, die Ihnen extra für diesen Zweck gern eine XXL-Mega-Spülbürste für Mega-Säulen ausleihen.

