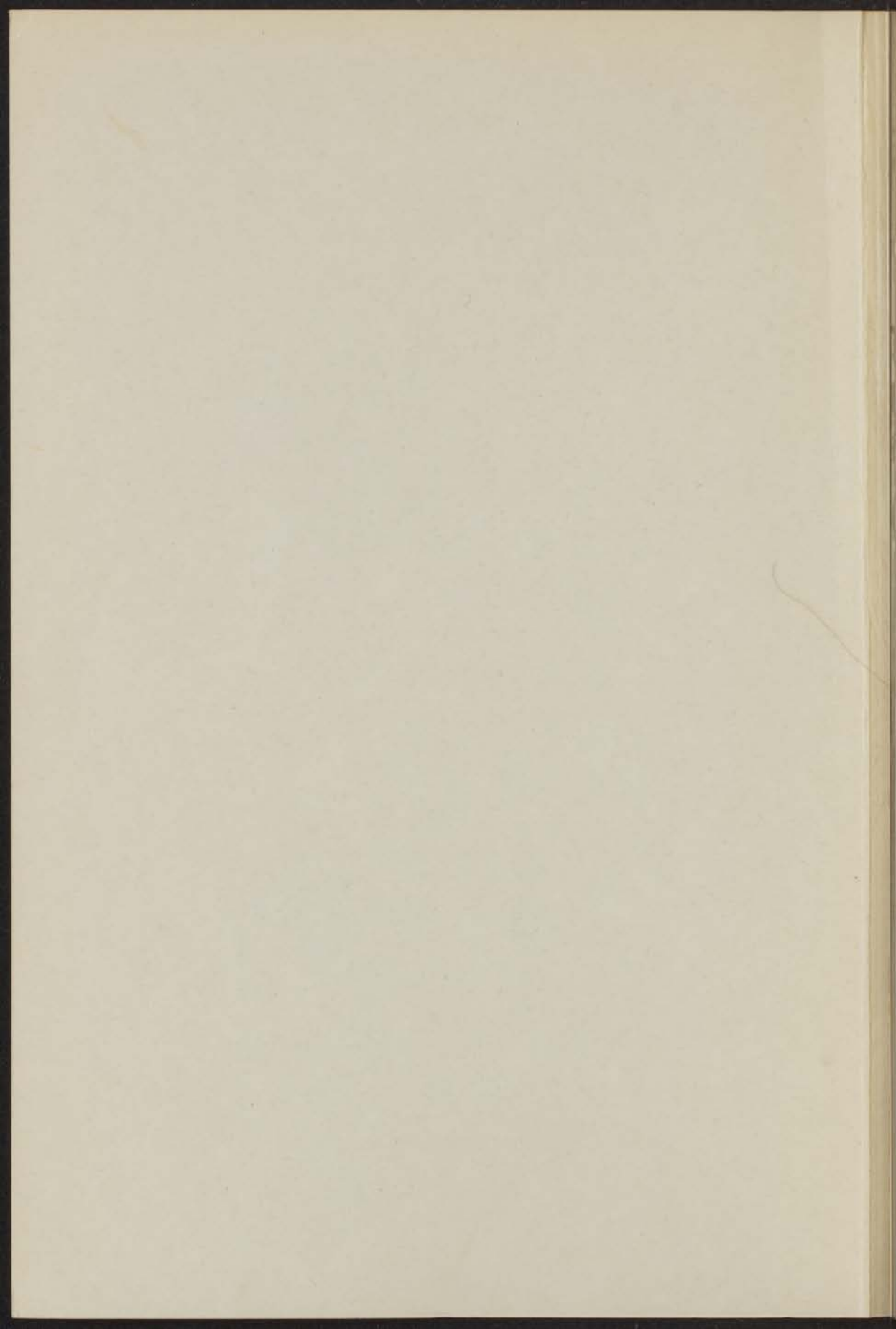


ONDERZOEKINGEN OVER HET
MECHANISME VAN DE
PAPIERCHROMATOGRAPHIE

J. B. SCHUTE



ONDERZOEKINGEN OVER HET
MECHANISME VAN DE
PAPIERCHROMATOGRAPHIE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJSUNIVERSITEIT TE LEIDEN,
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
Dr J. J. L. DUYVENDAK, HOOGLERAAR IN DE
FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE,
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT
DER WIS- EN NATUURKUNDE, TE VERDEDIGEN
OP WOENSDAG 17 JUNI 1953 DES NAMIDDAGS
TE 4 UUR

DOOR

JOHAN BERNARD SCHUTE

GEBOREN TE BREDA IN 1916

UITGEVERIJ POMPE · LEIDEN

ONDIJNEN EN HET
NUTSSTELSEL VAN DE
TARIEFCHROMATOGRAPHIE

PROEFSCHEFT

PROMOTOR:

PROF. DR E. H. VOGELZANG

Aan de nagedachtenis van mijn ouders.

Aan mijn vrouw.

Teneinde te voldoen aan de wens van de faculteit, volgt hieronder een kort verslag van de academische studie van de schrijver van dit proefschrift.

Johan Bernard Schute studeerde pharmacie en chemie aan de rijksuniversiteit te Utrecht. Hij legde de volgende examens af:
candidaatsexamen wis- en natuurkunde letter L (1941)
doctoraalexamen pharmacie (1947)
doctoraalexamen chemie (1949)
apothekersexamen (1949).

De doctorale studie werd volbracht onder leiding van de hoogleraren Dr J.A.C. van Pinxteren, Dr J.F. Reith en Dr O.F. Uffellie (pharmacie) en Dr J.M. Bijvoet, Dr F. Kögl en Dr J.Th.G. Overbeek (chemie).

Vanaf 1945 was hij werkzaam als assistent van Prof. Dr O.F. Uffellie op het pharmaceutisch laboratorium te Utrecht, waar hij onderwerpen bewerkte over de toepassing van nitro-hydrazino-benzoëzuren in de analyse van carbonyl-verbindingen en over de omzetting van atropine in apoatropine in extracten van plantaardige grondstoffen.

In 1949 werd hij conservator van het pharmaceutisch laboratorium van de rijksuniversiteit te Leiden, waar hem door de hoogleraar-directeur, Dr E.H. Vogelenzang, de gelegenheid werd gegeven, een belangrijk deel van zijn werktijd aan researchwerk te besteden. Hieruit ontstond een uitgebreid onderzoek naar de grondslagen, waarop de papierchromatographie berust. Enige resultaten van dit werk werden reeds vastgelegd in een vijftal kleine publicaties:

„Theorie der Papierchromatographie”, Pharm. Weekblad 86,33 (1951)

„Papierchromatographie van Alkaloiden”, Pharm. Weekblad 86,201 (1951)

„Problemen bij de papier-chromatografie van alkaloiden”,

Chem. Weekblad 49,301 (1953)

„The mechanism of paper chromatography”,

Mededel. Vlaams. Chem. Ver. 15,1 (1953)

„Ion Exchange in Paper Chromatography”, Nature 171,839 (1953).

Met erkentelijkheid moge hier worden vermeld, dat dit onderzoek ten dele mogelijk werd gemaakt door financiële steun van de organisatie Z.W.O.

HOOFDSTUK I

PROBLEEMSTELLING

§ 1. Inleiding.

De papierchromatographie heeft zich in korten tijd ontwikkeld tot een algemeen toegepaste analyse-methode, waarmee het mogelijk is ingewikkelde mengsels van chemische stoffen op zeer eenvoudige wijze in de componenten te scheiden. Het aantal stof-typen, waarop deze methode kan worden toegepast, lijkt onbeperkt. Talloze publicaties zijn inmiddels hierover verschenen. Het is overbodig in deze inleiding nader hierop in te gaan; overzichtsartikelen over de papierchromatographie zijn in grote getale gepubliceerd en reeds verschenen enige monografieën over dit onderwerp (Cramer, 1952; Balston en Talbot, 1952; Block, Le Strange en Zweig, 1952).

In tegenstelling tot de mate, waarin de papierchromatographie wordt toegepast, is onze kennis van de grondslagen waarop zij berust, nog vrij beperkt. Het mechanisme van deze methode van analyse is een punt van uitgebreide discussie. In de meeste publicaties, waarin de papierchromatographie op een of andere wijze ter sprake komt, worden veronderstellingen over dit mechanisme gelanceerd, of worden bepaalde problemen ten aanzien hiervan naar voren gebracht.

Het doel van deze studie is een bijdrage te leveren tot een betere kennis van het mechanisme van de papierchromatographie. Slechts een beperkt aantal van de vele problemen, die op dit gebied bestaan, zullen worden behandeld. Ter inleiding in deze problemen zal een overzicht worden gegeven van enige publicaties, die voor dit doel representatief geacht kunnen worden (§ 3). Vooraf zal, in verband met de gebruikte terminologie, een korte beschrijving worden gegeven van een vaak toegepaste uitvoering van de papierchromatographie.

§ 2. Begripsbepaling en definities.

De uitvoering van de papierchromatographie kan in principe als volgt worden beschreven:

Men brengt op een rechthoekige strook filtreerpapier enige μl van

een oplossing van de te onderzoeken stof. Nadat het oplosmiddel is verdampd, bevindt de stof zich in het papier in een cirkelvormig gebied, de *basisvlek*. De plaats waar de basisvlek wordt opgezet (de *basis*), is meestal enige cm verwijderd van een zijde van het papier (de *onderzijde*). Worden meerdere basisvlekken opgezet, dan liggen deze als regel op een rechte lijn, de *basislijn*, die evenwijdig loopt aan de onderzijde van het papier. Men dompelt nu de onderzijde van het papier over een afstand van enige mm in een vloeistof (*solvens of mobiele fase*), zodat deze vloeistof capillair wordt opgezogen en zich met een rechthoekige *front* door het papier verplaatst. De plaats, waar dit front haar beweging begint, wordt *bron* genoemd.

Wanneer het vloeistoffront de basisvlek passeert, wordt de stof *geëluëerd*: zij verplaatst zich (*loopt*) over het papier als een *vlek*, die meestal bij het front achterblijft. De relatieve verplaatsing van het centrum van deze vlek, betrokken op de afstand, die het front vanaf de basis heeft afgelegd wordt R_F^* genoemd (zie *fig 1*). Nadat het front een bepaalde afstand heeft afgelegd, wordt het contact met het solvensreservoir verbroken. Hierna wordt de overmaat solvens door verdampen uit het papier verwijderd en worden de vlekken zo nodig zichtbaar gemaakt met behulp van een geschikt reagens.

Het *chromatogram*, dat op deze wijze ontstaat, heeft vaak de volgende eigenschappen: de vorm van de vlek is min of meer rond, de vlek is groter naarmate de concentratie van de stof groter is (d.w.z. naarmate meer stof op de basis is opgezet) en de R_F is onafhankelijk van de concentratie van de stof en van de aanwezigheid van andere stoffen (zie *fig. 1*) Een dergelijk chromatogram zal een *normaal* chromatogram worden genoemd.

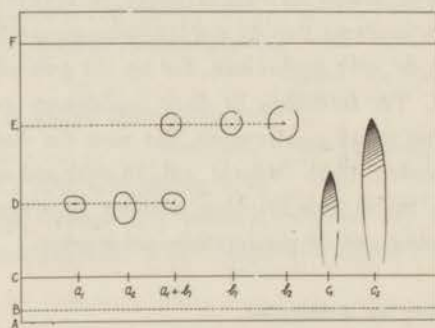


Fig. 1. Papierchromatogrammen. A onderzijde, B bron, C basislijn, F front bij einde elutie. Gechromatographeerd zijn de stoffen a, b en c in de concentraties 1 en 2. a en b geven een normaal chromatogram, c een abnormaal $R_F = DC/FC$ voor a en EC/FC voor b.

De elutie moet bij voorkeur geschieden in een gesloten vat (*chromatographische kamer*), om verdamping van het solvens uit het papier tijdens het elutieproces te voorkomen. De atmosfeer in het vat moet dus voor de elutie begint, met de dampen van het solvens zijn verzadigd. Soms wordt het papier, alvorens geëluëerd wordt, geruimen tijd aan de dampen van het solvens blootgesteld. Dit zal accommoderen van het papier worden genoemd.

In sommige gevallen wijkt de vorm van de vlek na elutie belangrijk van de normale vorm af. Er ontstaan dan langgerekte vlekken, die vaak aan de voorzijde (de zijde, die naar het front is toegekeerd) scherp zijn begrensd, maar aan de achterzijde vaag verlopen. Een R_F kan in dit geval niet aangegeven worden. Onder de verplaatsing van deze stoffen zal worden verstaan de afstand, die door de voorzijde van de vlek is afgelegd. In vele gevallen is de verplaatsing van abnormale vlekken afhankelijk van de concentratie van de stof en van de aanwezigheid van andere stoffen (fig 1). Een chromatogram met abnormale vlekken zal een *abnormaal* chromatogram worden genoemd.

§ 3. Opvattingen over het mechanisme van de papierchromatographie.

De papierchromatographie is ontwikkeld uit de *verdelingschromatographie*, die door Martin en Synge (1941) werd ingevoerd.

Volgens deze auteurs berust de verdelingschromatographie op een verdeling van een opgeloste stof tussen twee onderling niet mengbare vloeistoffen, waarvan de ene door een poreuze *drager* wordt vastgehouden, terwijl de andere door de poriën hiervan stroomt. Een opgeloste stof beweegt zich in dit systeem met een snelheid, afhankelijk van de wijze waarop zij zich tussen beide vloeistoffen verdeelt. Deze verdeling wordt uitgedrukt door de *verdelingscoëfficiënt*, de verhouding van de evenwicht-concentraties van de stof in de niet bewegende resp. bewegende vloeistof. Stoffen, waarvan de verdelingscoëfficiënten voldoende verschillen, kunnen op deze wijze gescheiden worden.

De verdelingschromatographie werd door Martin en Synge oorspronkelijk toegepast op de scheiding van acetylaminozuren. De niet bewegende vloeistof of *stationnaire phase* bestond hierbij uit water gebonden aan silicagel, de bewegende vloeistof of *mobiele phase* was chloroform met 1% butanol. Het vochtige silicagel werd in de vorm van een zuil in een glazen buis gestapeld. Boven op de zuil werd de oplossing van de acetylaminozuren gebracht, waarna met de mobiele phase werd geëluëerd. Deze uitvoering was dus gelijk aan

die van de reeds lang bekende adsorptiechromatographie, waarbij een homogene vaste stof (adsorbens) als stationnaire phase fungeert.

Martin en Synge ontwikkelden een theorie, de *verdelingstheorie*, die het verband aangeeft tussen de mate van verplaatsing van de stof en de verdelingscoëfficiënt, voor het geval dat de laatste onafhankelijk is van de concentratie van de stof. Door de verdelingscoëfficiënt, die op deze wijze uit de verplaatsing van de stof kan worden berekend, te vergelijken met de direct bepaalde verdelingscoëfficiënt (voor het systeem water-chloroform), kon de geldigheid van de verdelingstheorie worden geverifieerd.

De scheiding van aminozuren door verdelingschromatographie had succes, toen cellulose als drager werd gebruikt. Dit leidde tot de invoering van de papierchromatographie door Consden, Gordon en Martin (1944). De verplaatsing van de stof wordt hierbij uitgedrukt door de R_F (§ 2).

De verdelingstheorie toegepast op de papierchromatographie voorspelt, dat de R_F onafhankelijk van de concentratie van de stof is en dat normale vlekken ontstaan (zie hoofdstuk II). Het verdelingschromatogram is dus een normaal chromatogram. De R_F hangt samen met de verdelingscoëfficiënt (α) volgens

$$R_F = 1/(1 + \alpha A_S/A_L) \dots \dots \dots I)$$

waarin A_S/A_L de verhouding is van de oppervlakten van de doorsneden van de stationnaire phase (S) en de mobiele phase (L) op eenzelfde afstand van de bron.

Bij de papierchromatographie van aminozuren ontstonden normale chromatogrammen, hetgeen in overeenstemming is met de verdelingstheorie. Het mechanisme werd daarom door Consden, Gordon en Martin opgevat als een verdeling van de stof tussen het water, dat aan het papier is gebonden en de vloeistof, die door het papier stroomt. De geldigheid van formule I) kon worden vastgesteld door de uit deze formule berekende α te vergelijken met de direct bepaalde verdelingscoëfficiënt. Daarom werd geconcludeerd, dat de cellulose als een inerte drager voor water fungeert, en dat adsorptie geen rol speelt bij de papierchromatographie.

Deze veronderstelling leidde automatisch tot de mening, dat het solvens, dat bij de papierchromatographie wordt gebruikt, niet mengbaar mag zijn met water. De gebruikte solventia werden daarom met water verzadigd en de chromatographische kamer met de dampen van water en solvens.

Consdén, Gordon en Martin constateerden echter, dat ook solventia gebruikt kunnen worden, die geheel mengbaar zijn met water, mits het watergehalte van deze vloeistoffen niet te groot is. Zij verklaarden dit door een *uitzoutingseffect*. Later werd door Martin (1950) nader verklaard, wat hiermede bedoeld werd: Waterhoudende cellulose is te vergelijken met een oplossing van een suiker in water. Een solvens zoals propanol, dat in alle verhoudingen mengbaar is met water, vormt met een geconcentreerde glucose-oplossing twee fasen, waarvan de glucose-phase relatief het meeste water bevat. Zo ook zal propanol bij contact met waterhoudende cellulose twee fasen vormen, waarvan de propanol-phase als de mobiele phase van de verdelingschromatographie kan fungeren.

Het gebruik van solventia die geheel mengbaar zijn met water, werd door Consdén, Gordon en Martin overigens niet aanbevolen, omdat met deze vloeistoffen langgerekte vlekken ontstonden. Zij veronderstelden, dat dit werd veroorzaakt doordat de opgeloste stof de samenstelling van beide vloeistofphasen verandert.

Enige jaren na de invoering van de papierchromatographie ontstond een uitgebreide discussie over de juistheid van het verdelingsprincipe:

Door Moore en Stein (1948) werd aangetoond, dat met de verdelings-theorie in verschillende gevallen een α wordt berekend die niet overeenkomt met de experimenteel bepaalde. Dit is het geval bij elutie van tryptophaan, phenylalanine en tyrosine met butanol, zowel met zetmeel als met papier als drager. Vooral tryptophaan blijkt langzamer te lopen dan met de verdelingscoëfficiënt overeenkomt. Bovendien bleek, dat scheiding kon worden verkregen tussen tryptophaan, phenylalanine en leucine door chromatographie op zetmeel met water als solvens. Het tryptophaan loopt hier het langzaamst. Geconcludeerd werd, dat zetmeel en papier geen zuiver inerte dragers zijn, maar eigenschappen bezitten, zowel voor verdeling als voor adsorptie.

Door Meinhard (1949) wordt opgemerkt, dat het verdelingsprincipe bij chromatographie geldig is in een meer algemene zin dan een verdeling tussen een solvens en een stationnaire water-phase. Een vloeistof, die in contact is met een adsorbens en dit bevochtigt, vormt een „retentie-laag”, die aan het adsorbens gehecht blijft, wanneer de vloeistof stroomt. Deze laag kan honderd en meer moleculen dik zijn en kan als stationnaire phase fungeren. Bovendien wordt de structuur van deze stationnaire vloeistof door de aanwezigheid van het adsorbens gemodificeerd, waardoor de gelijkenis met het systeem van twee

verschillende vloeistoffen wordt voltooid.

Volgens Hanes en Isherwood (1949) maakt het geen essentiële verschil of de gebruikte solventia met water mengbaar zijn of niet. Voor de scheiding van phosphorzure esters kunnen beide categorieën vloeistoffen met succes worden toegepast. Volgens deze onderzoekers is het al te simplistisch de stationnaire phase als een vloeistof-phase te beschouwen. Het is een water-cellulose-complex. Zonder twijfel verschilt het water in dit complex in verschillende opzichten van „normaal“ water. Bovendien hangt het watergehalte van het complex af van de vloeistof, die met de cellulose in contact is en wel van de affiniteit van deze vloeistof tot water en niet van het feit of de vloeistof mengbaar is met water of niet. De kern van het probleem is, hoe het water-cellulose-complex de moleculen van de opgeloste stof kan binden in concurrentie met het solvens. Dit zal kunnen geschieden, doordat het molecule van de opgeloste stof wordt gebonden aan de watermoleculen van het complex, maar ook aan de cellulosemoleculen. De vraag of dit verdeling of adsorptie genoemd moet worden, hangt af van de wijze, waarop men deze termen definiëert.

Door Bentley en Whitehead (1949, 1950), werd aangetoond, dat bij elutie van aminozuren met solventia, die geheel mengbaar zijn met water, normale chromatogrammen kunnen ontstaan ook wanneer het watergehalte van het solvens groot is. Volgens hen werden de lang-gerekte vlekken, die door Consden, Gordon en Martin (1944), werden waargenomen, veroorzaakt, doordat de atmosfeer in het apparaat niet was verzadigd met de damp van het solvens. Zij sluiten zich aan bij de zienswijze van Hanes en Isherwood (1949), ter verklaring van het mechanisme van de papierchromatographie.

Door Decker en Riffart (1950) werd eveneens aangetoond, dat solventia, die onbeperkt mengbaar zijn met water, zeer geschikt kunnen zijn voor het chromatographieren van aminozuren. Zij gebruikten ook water als solvens en vonden hierbij voor de meeste aminozuren R_F -waarden van ongeveer 0,90, voor tyrosine en tryptofaan echter 0,80 resp. 0,70. Waarschijnlijk ontstonden bij elutie met water normale chromatogrammen, hetgeen echter niet expliciet werd vermeld. Decker en Riffart concludeerden uit hun proeven, dat de papierchromatographie berust op adsorptie volgens Langmuir.

Daar het normale chromatogram wijst op een lineaire isotherm, nemen zij aan, dat de stof door de diffusie van de vlekken in zo kleine concentratie aanwezig is, dat de Langmuir-isotherm lineair is.

Burma en Banerjee (1950) elueerden aminozuren en suikers met water. Zij stelden vast, dat de R_F in dit geval onafhankelijk was van de concentratie van de stof. De R_F van de meeste aminozuren en die van de suikers bleek ongeveer gelijk (0,85) te zijn. Voor tryptofaan werd een R_F van 0,57 gevonden. Daar er bij elutie met water geen sprake zou kunnen zijn van verdeling, concludeerden deze auteurs dat de aminozuren aan de cellulose worden geadsorbeerd.

Martin (1950) wijst er op, dat het water in de stationnaire phase bij papierchromatographie is geconcentreerd in de amorphe gebieden van de cellulose en dus te vergelijken is met een sterke oplossing van een polysaccharide in water en niet met gewoon water. Associatie van een molecule van een opgeloste stof met deze „opgeloste” cellulose-ketens, kan geen adsorptie worden genoemd, evenmin als het verschijnsel, dat de oplosbaarheid van een stof in het water van de amorphe gebieden verschilt van de oplosbaarheid in gewoon water. Een onderzoek naar de relatieve oplosbaarheid in water en koolhydraatoplossing van stoffen, die bij zetmeel- en papierchromatographie „geadsorbeerd” zouden worden (tryptofaan bv.) zou dit gezichtspunt nader kunnen verifiëren.

Abnormale chromatogrammen.

Bij papierchromatographie van zuren en basen met neutrale solventia ontstaan meestal abnormale chromatogrammen. De vlekken zijn vaak langgerekt en spits aan de voorkant en leggen dan een grotere afstand af, naarmate meer stof wordt geëluëerd. (fig. 1).

Dergelijke verschijnselen werden het eerst beschreven door Lugg en Overell (1947) bij chromatographie van verschillende carbonzuren met neutrale solventia. Door het solvens aan te zuren met azijnzuur, verdwijnen de abnormale verschijnselen. Daar het azijnzuur de ionisatie terugdringt, werd geconcludeerd, dat deze verschijnselen worden veroorzaakt door de ionisatie van het carbonzuur.

In een latere publicatie (Lugg en Overell, 1948) verklaarden deze onderzoekers, dat zij adsorptie van de carbonzuren aan het papier konden vaststellen door p_H -metingen van de oplossingen van het zuur met en zonder aanwezigheid van filtreerpapier. Zij veronderstelden, dat deze adsorptie zelfs zou toenemen, wanneer de ionisatie van het carbonzuur wordt teruggedrongen, maar dat het azijnzuur, dat aan het solvens wordt toegevoegd, zelf sterker geadsorbeerd wordt en het carbonzuur uit de geadsorbeerde toestand verdringt.

Rydel en Macheboeuf (1949) toonden aan, dat het optreden van abnormale vlekken samenhangt met de ionisatie van de stof in het solvens: Wanneer pyrogallol wordt geëluëerd met butanol, ontstaan normale vlekken; elutie met het basische solvens collidine, waarin het phenol ioniseert, geeft echter vlekken, voorzien van een lange „staart”. De auteurs concludeerden, dat de ionen sterk aan het papier worden geadsorbeerd.

Munier en Macheboeuf (1949) constateerden abnormale verschijnselen bij elutie van alkaloiden met neutrale solventia. Door ammonia aan het solvens toe te voegen, waardoor de ionisatie van het alkaloid wordt teruggedrongen, ontstonden normale chromatogrammen. Geconcludeerd werd, dat het papier de ionen adsorbeert. In een volgende publicatie (Munier en Macheboeuf, 1950) trachtten zij een verband te leggen tussen het optreden van abnormale vlekken en de ionisatie-constante van het alkaloid: Normale vlekken ontstonden wanneer de ionisatie-constante zeer groot of zeer klein was. Alle andere alkaloiden, zowel in de vorm van de base als van het zout, gaven bij elutie met een neutraal solvens, langgerekte vlekken. Zij verklaarden dit nu, door aan te nemen, dat de vrije base en het ion met verschillende snelheid worden gechromatographeerd, maar onderling in evenwicht staan.

Jermstad en Jensen (1950) wijzen op een andere mogelijkheid om de abnormale vlekken te verklaren, die bij elutie van carbonzuren met neutrale solventia ontstaan: De verdelingscoëfficiënt zal voor een ioniserende stof in het algemeen afhangen van de concentratie van de stof. Bij geringe concentratie neemt de ionisatiegraad toe en wel het sterkst in de water-phase. De verdelingscoëfficiënt zal daarom groter zijn, naarmate de concentratie kleiner is. Het gevolg is, dat gebieden van kleine concentratie zich langzamer verplaatsen dan gebieden van grote concentratie. Ook het feit, dat tegelijkertijd in beide fasen moleculen en ionen in verschillende verhouding voorkomen, veroorzaakt eenzelfde effect, omdat het ion veel beter in water zal oplossen dan in een organisch solvens.

§ 4. Discussie.

Uit het voorafgaande blijkt, dat de begrippen verdeling en adsorptie aanleiding kunnen geven tot misverstand. Het is daarom noodzakelijk eerst nader te bepalen wat onder deze begrippen moet worden verstaan.

Verdeling zullen we hier definiëren als een reversibele distributie

van een opgeloste stof tussen twee vloeistoffen. Voor verdeling geldt de wet van Nernst: Stellen we de vloeistoffen voor door S en L, dan is volgens deze wet de concentratie van de opgeloste stof in S (C_S) bij evenwichtinstelling een lineaire functie van de concentratie in L (C_L). Dit kan worden voorgesteld door:

$$C_S = \alpha C_L \dots \dots \dots \text{II)}$$

Hierin is α een constante (de verdelingscoëfficiënt). Het verband tussen C_S en C_L kan dus worden weergegeven door een rechte lijn (lineaire distributie-isotherm).

De wet van Nernst kan theoretisch worden afgeleid en geldt slechts voor ideaal verdunde oplossingen en gelijke molecuul-soort in beide vloeistoffen. Afwijkingen van de wet zijn dus te verwachten bij grote concentratie van de stof en bij ionisatie- of associatie-evenwichten in de vloeistoffen.

Onder *adsorptie* wordt verstaan een binding van een gas of opgeloste stof aan het oppervlak van een vast adsorbens. De hoeveelheid gas, die bij evenwicht per oppervlakte-eenheid wordt geadsorbeerd (m), hangt volgens Langmuir samen met de concentratie van de stof (C) in de omgeving, volgens:

$$m = k_1 C / (1 + k_2 C) \dots \dots \dots \text{III)}$$

Hierin zijn k_1 en k_2 constanten; het verband tussen m en C is dus niet lineair (Langmuir-isotherm). Slechts bij kleine concentraties is de isotherm bij benadering een rechte lijn, daar $k_2 C$ dan t.o.v. de eenheid verwaarloosd kan worden. Formule III) werd door Langmuir theoretisch afgeleid, waarbij bepaalde vereenvoudigende veronderstellingen werden gemaakt.

Ook bij de adsorptie van een stof uit de verdunde oplossing kan de Langmuir-isotherm gelden over een redelijk concentratiegebied (Cassidy, 1951, pag. 70). Vaak geldt echter een andere adsorptie-isotherm, nl. de Freundlich-isotherm, waarbij het verband tussen de geadsorbeerde hoeveelheid en de concentratie wordt gegeven door:

$$m = a C^n \dots \dots \dots \text{IV)}$$

Hierin zijn a en n constanten; de exponent n is kleiner dan de eenheid. De Freundlich-isotherm is niet lineair, ook niet voor het gebied van zeer kleine concentraties. Zij geldt voor allerlei adsorbentia en talrijke oplossingen, soms nog in uiterste verdunning (Freundlich, 1930, pag. 244 e.v.).

Ook de Freundlich-isotherm kan theoretisch worden geïnterpreteerd nl. als een superpositie van Langmuir-isothermen, indien men aanneemt, dat het oppervlak uit energetisch verschillende centra bestaat (Cremer, 1950).

Uit het bovenstaande volgt, dat bij verdeling theoretisch een constante verdelingscoëfficiënt is te verwachten. Daar volgens de verdelingstheorie een constante verdelingscoëfficiënt een normaal chromatogram ten gevolge heeft, is er dus een logische samenhang tussen verdelingschromatographie en het optreden van normale chromatogrammen.

Bij adsorptie wordt echter de distributie van de stof tussen het adsorbens en de oplossing bepaald door een adsorptie-isotherm, die in principe niet lineair is. Dit komt overeen met een „verdelingscoëfficiënt”, die van de concentratie afhankelijk is. Indien de Freundlich-isotherm geldig is, wordt bij kleine concentratie relatief meer geadsorbeerd dan bij grote concentratie. Bij papierchromatographie, die op een Freundlich adsorptie berust, zullen dus de gebieden van de vlek, waar de concentratie gering is, langzamer bewegen dan die, waar de concentratie groot is. Het gevolg is, dat de verplaatsing van de stof afhankelijk is van de hoeveelheid, die op de basis is gezet, maar ook, dat de vorm van de vlek sterk gerekt wordt. Dit is te zien in *fig. 2*, waar de stof zich oorspronkelijk bevindt in gebied A. De concentratie in dit gebied is het grootst in het centrum en neemt naar de rand af, tengevolge van de diffusie. Het centrum zal zich dus sneller bewegen dan de randen en er ontstaat een vlek B, waarvan de voorzijde spits en goed begrensd is, de achterzijde daarentegen vaag verloopt.

Er bestaat dus eveneens een logische samenhang tussen adsorptiechromatographie en het optreden van abnormale chromatogrammen. Het is daarom begrijpelijk, dat men abnormale chromatogrammen door adsorptie meent te moeten verklaren

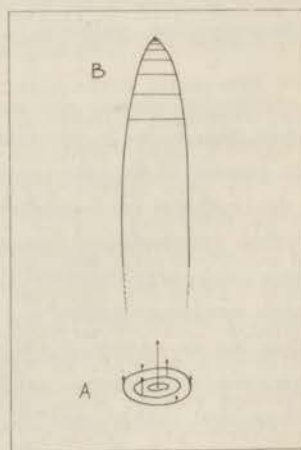


Fig. 2. Vorming van een abnormale vlek B uit het extractiegebied A. De lengte der pijlen is een maat voor snelheid van de verschillende delen van A.

(Lugg en Overell, 1948; Munier en Macheboeuf, 1949). Noodzakelijk is deze verklaring echter niet, omdat de verdelingscoëfficiënt voor stoffen, die in oplossing gedeeltelijk ioniseren, van de concentratie afhankelijk is. Ook in dit geval zullen abnormale chromatogrammen kunnen ontstaan en zij kunnen dus ook worden verklaard door verdelingschromatographie (Jermstad en Jensen, 1950).

Ook de veronderstelling dat het ion en het ongeïoniseerde molecule afzonderlijk zouden worden gechromatographeerd, (Munier en Macheboeuf, 1950) is een hypothese, die geen gebruik maakt van adsorptie, maar geheel strookt met het begrip verdelingschromatographie.

Aan de andere kant is het mogelijk, dat een normaal chromatogram ook door adsorptie tot stand komt, omdat de adsorptie-isotherm voor kleine concentraties lineair kan zijn.

Een dergelijke verklaring voor een normaal chromatogram moet echter met de nodige reserve worden beschouwd en kan zeker niet als algemeen worden geaccepteerd, omdat voor vele stoffen, ook voor kleine concentraties, de adsorptie-isotherm niet lineair is. De reden, waarom verschillende onderzoekers adsorptie bij de papierchromatographie veronderstellen, is dan ook vaak een eenzijdige opvatting van het begrip verdelingschromatographie.

Men kan onder verdelingschromatographie eentegenstroom-extractieproces verstaan, waarbij de stof tussen twee onderling niet mengbare vloeistoffen wordt verdeeld en waarbij de drager volkomen inert is, m.a.w. op geen enkele wijze de stationnaire vloeistof modificeert, of de eigenschappen van de opgeloste stof verandert. Deze betekenis werd oorspronkelijk aan het begrip verdelingschromatographie gehecht en wij zullen dit systeem aanduiden met de oorspronkelijke naam „vloeistof-vloeistof-chromatographie” („liquid-liquid-chromatography”, zie Gordon, Martin en Syngé, 1943).

Afgezien van de vraag, of vloeistof-vloeistof-chromatographie in de bovenbeschreven betekenis mogelijk is, is het logisch, het begrip verdelingschromatographie uit te breiden op de wijze, zoals door Meinhard (1949) is gesuggereerd en er dus ook onder te verstaan een systeem waarbij de stationnaire en de mobiele vloeistof identiek zijn en waarbij de stationnaire phase ontstaat, doordat een deel van de mobiele phase door de drager wordt vastgehouden. In dit geval zou papierchromatographie met water als solvens, op verdelingschromatographie kunnen berusten. De verdeling heeft dan plaats tussen mobiel en stationnair water en de verdelingscoëfficiënt zal gelijk zijn aan de

eenheid en dus voor alle stoffen gelijk. Scheiding is met dit systeem niet mogelijk.

Een verdere uitbreiding kan aan het begrip verdelingschromatographie worden gegeven, door aan te nemen, dat de stationnaire vloeistof door de aanwezigheid van de drager wordt gemodificeerd, zodat de oplosbaarheid van een stof in deze vloeistof anders is, dan in de mobiele vloeistof. Door dit effect zal de verdelingscoëfficiënt voor twee stoffen kunnen verschillen, zodat met een dergelijk systeem scheiding kan worden verkregen. We kunnen hierbij zeker van verdelingschromatographie spreken, als de verdeling geschiedt tussen de twee vloeistof-fasen zonder dat een directe binding van de stof aan de drager optreedt.

Het beeld van een verdelingssysteem, bestaande uit een vloeistof, die stationnair wordt gehouden en gemodificeerd wordt door de drager, vertoont overeenkomst met het water-cellulose-complex van Hanes en Isherwood (1949). Een binding van de opgeloste stof in dit water-cellulose-complex zal echter niet beperkt behoeven te zijn tot associatie met de watermoleculen, maar ook direct aan de cellulose kunnen plaats vinden. De vraag of dit laatste adsorptie genoemd moet worden, wordt door Hanes en Isherwood buiten beschouwing gelaten. Volgens Martin (1950) heeft het echter geen zin om dit adsorptie te noemen, omdat het gehele water-cellulose-complex als vloeistof is te beschouwen, nl. als een oplossing van cellulose in water.

In al deze gevallen is verdelingschromatographie beschouwd als een proces, waarbij de stof wordt verdeeld tussen twee vloeistoffen. Het begrip *stationnaire vloeistof* is hierbij echter rekbaar. Het kan zowel een normale vloeistof betekenen als een vloeistof-phase, waarin de drager „opgelost” is. Daar men normaliter onder stationnaire vloeistof verstaat, de vloeistof, die aan de drager is gebonden en niet het gehele complex van drager en vloeistof, lijkt het juister om verdelingschromatographie te definiëren als chromatographie, waarbij de stationnaire phase als een *volumen-phase* te beschouwen is, in tegenstelling tot adsorptiechromatographie, waar de stationnaire phase een *oppervlak* is.

Onder een stationnaire volumen-phase zal dan worden verstaan, een stationnaire vloeistof (normaal of gemodificeerd door de drager) of een complex van stationnaire vloeistof en de hierin gedispergeerde drager, indien de dispersiteitsgraad van de drager zo hoog is, dat we

van een oplossing kunnen spreken.

Het is duidelijk, dat het onderscheid tussen verdelingschromatographie, die op deze wijze is gedefiniëerd en adsorptiechromatographie in vele gevallen niet scherp te trekken is. De drager is immers nooit volledig in de stationnaire vloeistof gedispergeerd, omdat zij dan geheel zou zijn opgelost, en geen „drager” meer zou zijn. Erblijven dus gebieden (bij cellulose de kristallijne gebieden), die als een oppervlak zijn te beschouwen. Indien de opgeloste stof aan de drager in de stationnaire volumen-phase wordt gebonden, zal dit naar alle waarschijnlijkheid ook geschieden aan de delen van de drager, die niet gedispergeerd zijn. Dit laatste moet echter adsorptie genoemd worden.

De vraag, of men in een bepaald geval moet spreken van adsorptie of verdeling, is op zich zelf van weinig betekenis. Wel is het belangrijk, de waargenomen verschijnselen beter te kunnen begrijpen. Het is hiervoor van belang, dat we het mechanisme van de papierchromatographie kunnen herleiden tot een eenvoudig model, zoals een verdeling tussen volumen-fasen. Wanneer we weten, hoe de stationnaire phase in dit geval is opgebouwd, zullen we de verdelingscoëfficiënt van een stof kunnen vergelijken met de oplosbaarheid van de stof in de mobiele phase en in een mengsel, analoog aan de stationnaire volumen-phase.

Zo kan de voorstelling van een verdeling tussen volumen-fasen de proeven van Burma en Banerjee (1950) en Decker en Riffart (1950) veel begrijpelijker maken, dan door het begrip adsorptie mogelijk is. Nemen we aan, dat papierchromatographie met water als solvent berust op een verdeling van de stof tussen „normaal” stationnair water en stromend water, dan zal voor alle stoffen de verdelingscoëfficiënt gelijk zijn aan de eenheid. Alle stoffen hebben dan een gelijke R_F , zoals experimenteel het geval blijkt te zijn voor de meeste aminozuren en suikers. Het is lastig in te zien, waarom al deze stoffen in gelijke mate geadsorbeerd zouden worden en waarom de adsorptieisothermen lineair zouden zijn. Uit de genoemde experimenten blijkt tevens, dat tyrosine en vooral tryptophaan een belangrijk lagere R_F hebben dan de andere aminozuren. Volgens de voorstelling van verdelingschromatographie betekent dit, dat deze stoffen beter in de stationnaire volumen-phase oplossen dan in water. Hiermee is in overeenstemming het feit, dat tryptophaan en tyrosine ook bij papierchromatographie met butanol een grotere verdelingscoëfficiënt hebben, dan met hun verdeling tussen water en butanol overeenkomt (Moore en Stein, 1948).

Het probleem van het mechanisme van de papierchromatographie komt dus in de eerste plaats neer op de vraag, of en onder welke omstandigheden een stationnaire volumen-phase aanwezig is en hoe deze phase is samengesteld. Voor de oplossing van dit probleem is het nodig na te gaan, hoe de vloeistoffen, die bij de papierchromatographie als solventia worden gebruikt, op het papier kunnen inwerken (hoofdstuk III en IV). Vervolgens zal moeten worden onderzocht, of bij aanwezigheid van zulk een stationnaire phase het chromatogram kan worden verklaard door een verdeling van de stof tussen de stationnaire en de mobiele phase (hoofdstuk V). Het is hiervoor nodig, de verdelingstheorie van Martin en Syngge toe te passen, omdat hierdoor het verband wordt gegeven tussen de plaats van de stof op het chromatogram (R_F) en de verdelingscoëfficiënt.

Daar de verdelingstheorie een belangrijke plaats inneemt bij dit onderzoek, zal deze theorie eerst nader worden besproken, te meer daar door Craig (1950) de juistheid van deze theorie, op grond van experimenteel onderzoek met zijn „countercurrent distribution”, in twijfel wordt getrokken en omdat bij de toepassing van de theorie op de papierchromatographie enige bijzondere problemen naar voren komen. Getracht zal worden aan te tonen, dat de verdelingstheorie een bevredigend uitgangspunt is voor het onderzoek van het mechanisme van de papierchromatographie (hoofdstuk II).

Als laatste probleem zal worden onderzocht, op welke wijze een binding van de opgeloste stof aan de cellulose van het papier, aanleiding kan geven tot complicaties bij de papierchromatographie (hoofdstuk V en VI).

HOOFDSTUK II

DE VERDELINGSTHEORIE VAN MARTIN EN SYNGE

§ 1. Mathematische afleiding.

Martin en Synge (1941) hebben mathematisch afgeleid hoe de opgeloste stof over de chromatographische zuil is gedistribueerd als een functie van de verplaatsing van de mobiele fase. Zij namen hierbij aan, dat de verdeling van de stof tussen mobiele fase (L) en stationaire fase (S) geschiedt volgens een lineaire isotherm en dat het verdelingsevenwicht zich niet direct instelt. Hiervoor pasten zij het begrip *theoretische plaat* (bekend uit de theorie van de gefractioneerde destillatie) toe op de chromatographische zuil, die zij verdeeld dachten in schijven van een hoogte, equivalent aan één theoretische plaat.

Deze hoogte of *H.E.T.P.* („height equivalent to one theoretical plate”), werd zodanig gedefiniëerd, dat de concentratie van de stof in het deel van L, dat de schijf (*de plaat*) verlaat, in evenwicht is met de gemiddelde concentratie van de stof in S over de gehele plaat genomen. Volgens de auteurs kan de H.E.T.P. als een constante worden beschouwd, indien het concentratie-verval op de plaat gering is.

Hier zal de afleiding van Martin en Synge, op enige niet essentiële punten gemodificeerd, kort worden weergegeven. De verplaatsing van L zal worden gemeten aan de afstand H afgelegd door een doorsnede („front”) van L in de zuil. De theorie wordt hierdoor direct van toepassing op de papierchromatographie. In verband hiermee zijn ook enige grootheden door andere symbolen aangeduid dan door Martin en Synge zijn gebruikt. Het zal in het midden worden gelaten, of zich vóór het front vloeistof bevindt of niet. Als oorsprong $H=0$ zal worden genomen de grens tussen 1e en 2e plaat.

Beschouwen we nu het geval, dat zich bij $H=0$ op de 1e plaat (de *basisplaat*) een totale hoeveelheid stof m bevindt en dat L zich verplaatst telkens over infinitesimale afstanden dH . De fractie van de stof, die

bij een verplaatsing van L over dH , van de plaat wordt afgevoerd, is volgens Martin en Synge gelijk aan

$$dH/h(1 + \alpha A_S/A_L) = dH/c$$

h is de hoogte van de plaat,

A_S en A_L zijn de oppervlakten van dwarsdoorsneden van S resp. L, $\alpha = C_S/C_L$ is de verdelingscoëfficiënt, de verhouding van de concentraties in S en L bij evenwicht.

De fracties van m , die zich op verschillende platen bevinden na verplaatsing van L over opvolgende afstanden dH , kunnen nu worden weergegeven door de volgende tabel:

verplaatsing van L, ndH	Serie nummer van de platen (k).				
	$k = 1$	$k = 2$	$k = 3$	$k = 4$	$k = 5$
$n = 0$	1	0	0	0	0
1	$1 - dH/c$	dH/c	0	0	0
2	$(1 - dH/c)^2$	$2(1 - dH/c)dH/c$	$(dH/c)^2$	0	0
3	$(1 - dH/c)^3$	$3(1 - dH/c)^2 dH/c$	$3(1 - dH/c)(dH/c)^2$	$(dH/c)^3$	0
4	$(1 - dH/c)^4$	$4(1 - dH/c)^3 dH/c$	$6(1 - dH/c)^2 (dH/c)^2$	$4(1 - dH/c)(dH/c)^3$	$(dH/c)^4$

Uit de tabel is te zien, dat de fractie m_{k+1}/m , die zich bevindt op plaat $k+1$, na verplaatsing van L over ndH wordt gegeven door de $k+1$ ste term van het binomium $[(1 - dH/c) + dH/c]^n$, zodat:

$$m_{k+1} = \frac{m \cdot n! \cdot (1 - dH/c)^{n-k} (dH/c)^k}{k! \cdot (n-k)!} \dots \dots \dots \text{I)}$$

Wanneer n groot is, kan dit worden omgezet in

$$m_{k+1} = \frac{m}{k!} \cdot (ndH/c)^k \cdot e^{-ndH/c} \dots \dots \dots \text{IIa)}$$

of, daar ndH de verplaatsing H voorstelt:

$$m_{k+1} = \frac{m}{k!} (H/c)^k \cdot e^{-H/c} \dots \dots \dots \text{IIb)}$$

Wanneer k groot is, kan de Stirling-benadering voor de faculteiten worden toegepast ($k! = \sqrt{2\pi k} \cdot (k/e)^k$) of:

$$m_{k+1} = \frac{m}{\sqrt{2\pi k}} (H/ck)^k \cdot e^{k-H/c} \dots \dots \dots \text{III)}$$

De functies II) en III) geven m_{k+1} als een continue functie van H . Zij stellen echter ook de hoeveelheid stof voor, die zich bij constante H op iedere plaat bevindt als functie van k en kunnen dus als (discontinue) *distributiefuncties* worden aangeduid. Voor $H/c = k$ is de hoeveelheid m_{k+1} maximaal. Wanneer k groot is, bevindt zich in dit geval tevens meer stof op plaat $k+1$ dan op de andere platen, zodat het maximum van de distributiefunctie eveneens wordt bepaald door $k=H/c$. Wanneer L p platen heeft doorlopen, is voor $k=H/c=ph/c$ de hoeveelheid op plaat $k+1$ maximaal. Nu is $(k+1)/p = h/c + 1/p$ en dit is, wanneer p groot is, bij benadering gelijk aan h/c . De verhouding $(k+1)/p$ geeft de verplaatsing van het maximum t.o.v. de verplaatsing van L en wordt R_F genoemd. Substitutie van $c = h(1+\alpha A_S/A_L)$ geeft dus voor deze verhouding het verband:

$$R_F = 1/(1+\alpha A_S/A_L) \dots \dots \dots \text{IV)}$$

§ 2. Bezwaren.

Tegen deze afleiding zijn enige bezwaren aan te voeren:

1) Martin en Synge nemen aan, dat wanneer L zich verplaatst over de afstand dH , de fractie $dH/(1+\alpha A_S/A_L)$ van de totale hoeveelheid stof op de plaat, van deze wordt afgevoerd. Dit is bij de door hen gegeven H.E.T.P.-definitie slechts bij benadering het geval.

Wanneer C_S en C_L de gemiddelde concentraties voorstellen in S en L over plaat k genomen, dan wordt het deel van m_k , dat zich in S bevindt (x), gegeven door $x = 1/(1 + C_L A_L / C_S A_S)$.

Nu is er geen evenwicht tussen C_L en C_S , maar volgens de definitie tussen C_S en de concentratie C_U in het deel van L , dat van de plaat uitgaat.

Daar $C_U = dm_k/A_L dH = C_S/\alpha = x m_k/\alpha A_S h$, wordt de fractie van m_k , die de plaat verlaat bij verplaatsing over dH , gegeven door:

$$dm_k/m_k = x A_L dH/\alpha A_S h.$$

Substitueren wij hierin de uitdrukking voor x en vervolgens weer $C_S = \alpha C_U$, dan volgt:

$$dm_k/m_k = dH/h(\alpha A_S/A_L + C_L/C_U).$$

De hoeveelheid stof, die de plaat verlaat, is dus nog afhankelijk van het concentratieverval C_L/C_U . Bij kleine h zal C_L/C_U niet veel verschillen van de eenheid; maar het is moeilijk te overzien, hoe een kleine afwijking hiervan de berekening zal beïnvloeden.

2) De definitie van H.E.T.P., die door Martin en Syngé wordt gebruikt, heeft de merkwaardige consequentie, dat een deel van de stof onbepaald veel sneller door de zuil loopt, dan de mobiele phase. Bij verplaatsing van L over ndH , bevindt zich immers reeds stof op plaat $n+1$, zodat deze stof zich heeft verplaatst over de afstand nh . De verplaatsing van L (ndH) is onbepaald klein, terwijl de verplaatsing van de stof (nh) dit niet is. De stof loopt dus onbepaald veel sneller dan de mobiele phase. Dit is fysisch niet zinvol.

Beide bezwaren 1) en 2) vervallen, indien de verplaatsing dH gelijk aan h wordt genomen. Indien h een bepaalde afstand is, betekent dit dat de verplaatsing sprongsgewijze geschiedt (discontinu is). Daar de verplaatsing van L in werkelijkheid continu is, is de afleiding van Martin en Syngé dus slechts reëel voor $h=0$, m.a.w. wanneer wordt aangenomen, dat het evenwicht zich onmiddellijk instelt. Neemt men echter aan, dat h van nul verschilt, dan komt de afleiding er in feite op neer, dat men een *continu proces zonder evenwicht* vervangt door een *discontinu proces met evenwicht* en aanneemt, dat beide processen hetzelfde resultaat geven.

Het discontinu proces is natuurlijk niet reëel, omdat de verplaatsing van L in werkelijkheid continu is. Het proces is echter in zoverre fysisch zinvol, dat het mechanisch kan worden nagebootst. Dit is door Craig (1944) uitgevoerd, die deze techniek de naam *counter current distribution* heeft gegeven.

§ 3. Consequenties van de theorie.

Om de theorie te kunnen toepassen, is het nodig, dat de factor $c = h(1 + \alpha A_S/A_L)$ een constante is. Dit betekent, dat h , α en A_S/A_L tijdens het proces niet mogen veranderen. Naar aanleiding hiervan is het volgende op te merken:

- (a) Voorwaarde voor constante h (H.E.T.P.) is, dat het concentratieverval op de plaat slechts gering is. Dit zal des te beter benaderd zijn, naarmate de H.E.T.P. kleiner is. De H.E.T.P. neemt toe met de stromingssnelheid van L en hangt af van de mate van contact tussen S en L (korrelgrootte van de drager) en van de diffusiesnelheid van de stof in S en L. De snelheid van L zal dus niet groot mogen zijn.
- (b). Constante α betekent, dat de distributie van de stof tussen S en L door een lineaire isotherm kan worden voorgesteld. De theorie is dus eveneens geldig voor adsorptie van de stof aan S volgens een lineaire isotherm. In dit geval heeft α de betekenis van de verhouding

tussen de (per oppervlakte-eenheid) geadsorbeerde hoeveelheid stof en C_L , terwijl A_S/A_L moet worden vervangen door de verhouding tussen het oppervlak van S en het bijbehorende volumen van L. Indien S een volumen-phase is en α dus de verdelingscoëfficiënt voorstelt, moet α onafhankelijk zijn van de concentratie van de stof en van de aanwezigheid van andere stoffen.

Wanneer h klein is t.o.v. H , hetgeen impliceert, dat k groot is (afgezien van een klein gebied bij de basis), is formule III) geldig. De distributie-functie kan dan worden voorgesteld door een curve, die praktisch samenvalt met de curve der normale verdeling (Gauss-curve). De functie is dan vrijwel symmetrisch. De „breedte” van de curve (die we kunnen definiëren als de afstand tussen de platen, waarop de hoeveelheid stof een bepaald gering percentage is van de maximum hoeveelheid), neemt toe, naarmate het aantal gepasseerde platen groter is. De breedte neemt hierbij minder dan evenredig met dit aantal toe. De plaats van het maximum is echter onafhankelijk van h . Vergelijken we dus twee zuilen, waarop eenzelfde stof over dezelfde afstand H wordt gechromatographeerd, terwijl h voor beide zuilen verschilt, dan geeft de zuil met de kleinste h de smalste curve, terwijl de plaats van het maximum voor beide gevallen dezelfde is. (fig. 3) Weliswaar wordt bij kleinere h een groter aantal platen doorlopen, doch een bepaalde afstand op de zuil komt nu ook met een evenredig groter aantal platen overeen. Het „rekken” van de curve is echter geringer dan evenredig met dit aantal. Wordt h onbepaald klein, dan wordt de curve onbepaald smal.

Tot nu toe is beschouwd het geval dat alleen de eerste plaat was bezet met de stof. In de praktijk wordt de stof echter over een aantal platen verdeeld, die gezamenlijk de *basisschijf* vormen. Bevindt zich voor het proces begint mobiele fase op alle platen van de basisschijf, dan geeft de stof van iedere plaat een distributiecurve volgens III), waarvan de maxima op een plaatafstand liggen. Superpositie van de afzonderlijke curven geeft de *somcurve*, welke de distributie in een chroma-

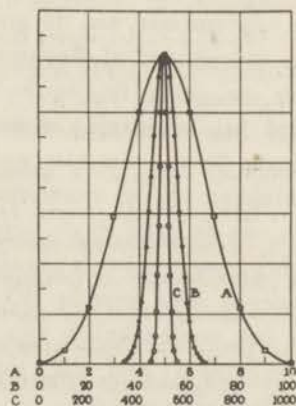


Fig. 3. Het smaller worden van de distributiecurve bij verkleining van de H.E.T.P. De curven A, B en C komen overeen met een H.E.T.P., die telkens een factor 10 kleiner is (Craig, 1950).

tographische band weergeeft (fig.4). Ook de breedte hiervan wordt met toenemende H voortdurend groter. Het effect van het afnemen van h bij constante H is ook hier een smaller worden van de band, zodat deze voor $h=0$ tot de oorspronkelijke breedte van de basisschijf nadert.

De theorie van Martin en Synge voert dus voor direct instellen van het evenwicht tot het zelfde resultaat als op andere wijze werd afgeleid door Wilson (1940) en Weiss (1943).

Het verschil tussen direct evenwicht en evenwichtsbenadering is dus, dat in het eerste geval de band door elutie niet verandert, maar in het laatste geval voortdurend rekt en wel des te sterker naarmate de evenwichtsbenadering slechter is. Bij dit rekken neemt de concentratie aan de grenzen voortdurend af. Wanneer h niet te groot is, blijft de band bij benadering symmetrisch. De R_F , die hier wordt betrokken op de zwaartepunten van de band en de basisschijf, wordt in beide gevallen (gegeven door formule IV) en is dus onafhankelijk van de hoeveelheid stof die wordt gechromatographeerd.

Door bepaling van het rekken van de band met toenemende H kan h worden berekend. We dienen echter te bedenken, dat de gemeten H.E.T.P. ook een factor zal bevatten, die wordt veroorzaakt door de stroming van de mobiele fase.

Ook wanneer geen diffusie of verdeling zou optreden, geven volgens Oplatka en Gryllus (1952) de wervelingen in de stroming reeds aanleiding tot een vervorming van de band van eenzelfde aard als de

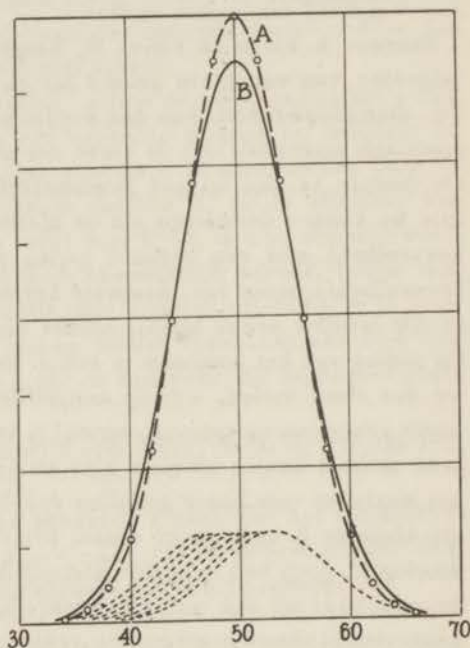


Fig.4. Somcurve (B) gevormd uit de distributiecuren van een stof, die over zeven basisplaten is verdeeld. De maxima der afzonderlijke curven liggen op een plaatafstand van elkaar. Curve A is de distributiecure, voor het geval slechts één basisplaat met de stof zou zijn bezet (Craig, 1950).

verdelingstheorie voorspelt (zie ook *Klinkenberg*, 1949). Het rekken van een chromatographische band door elutie is dus nog geen noodzakelijke aanwijzing voor het ontbreken van een verdelingsevenwicht.

§ 4. Onderzoek van de theorie door middel van „counter current distribution.”

Door *Craig* (1950) zijn experimenten verricht met de „counter current distribution“ (C.C.D.) om het mechanisme van de verdelingschromatographie (V.C.) nader te onderzoeken. Hij merkt o.a. het volgende op:

- 1) „Onvolmaakte overbrenging van plaat naar plaat bij C.C.D. is relatief onbelangrijk. Een herhaaldelijk maar willekeurig optredende fout van 15-20% in de overbrenging, maakt de distributiecurve iets te breed.” Dit komt dus overeen met het effect van ongelijkmatige stroming bij V.C.
- 2) „Afwijking van een constante α maakt de curve asymmetrisch. Een afwijking overeenkomende met een *Freundlich* adsorptie-isotherm geeft bij C.C.D. een „scherp front” en „slepde staart”. Dit is dus ook bij V.C. te verwachten (zie hoofdstuk I). Alle opgeloste stof wijkt min of meer af van de wet van *Nernst*, maar C.C.D. kan 10 tot 100 maal grotere concentraties verdragen dan V.C., alvorens belangrijke afwijkingen optreden.” Ook dit laatste is geheel in overeenstemming met de theorie van *Martin* en *Synge*. Immers zal, zoals *Craig* zelf al opmerkt, een kleine afwijking zich veel duidelijker demonstreren bij een groot aantal overbrengingen. Bij V.C. is dit aantal zeer groot (H.E.T.P. van orde van grootte van 0,001 cm).
- 3) „Bij C.C.D. is voor het verkrijgen van de normale distributiecurve volmaakt evenwicht nodig vóór iedere overbrenging. Bij V.C. is er echter geen evenwicht. Het gedrag bij niet-evenwicht kan nauwkeurig bestudeerd worden met C.C.D. en vergeleken met de theoretische curve, die bij evenwicht ontstaat. C.C.D.-experimenten zonder volledig evenwicht gaven curven, die in sommige gevallen symmetrisch waren, maar iets breder dan de theoretische en die het theoretisch maximum hadden, in andere gevallen echter asymmetrisch waren, soms te breed, maar soms ook te smal, terwijl het maximum iets anders lag dan bij de evenwichtcurve.”

Het is niet duidelijk wat deze niet-evenwicht-experimenten voor betekenis hebben. De V.C.-theorie veronderstelt immers volledig evenwicht in iedere plaat en is dus geheel analoog aan de C.C.D.-met-

evenwicht. Een vergelijking van het continu niet-evenwichtsproces (V.C.) met het discontinu niet-evenwichtsproces heeft slechts zin, indien bij het laatste een zeer groot aantal overbrengingen wordt gebruikt, zodat het discontinu proces een benadering wordt van het continu proces. Het zal dan nodig zijn de verdeling bij steeds toenemend aantal overbrengingen na te gaan, omdat het onbekend is of een bepaalde asymmetrie en een afwijking van het maximum, bij een groter aantal overbrengingen sterker of zwakker wordt. Dat dit laatste niet eenvoudig te voorspellen is, volgt al uit het vrij wispelturig gedrag van de curven bij deze proeven, die soms breder maar soms ook smaller zijn dan bij normale C.C.D.

Craig meent op grond van zijn proeven, dat juist de afwijkingen van constante α en het ontbreken van evenwicht wel eens de belangrijkste factoren zouden kunnen zijn, die de scheiding bij V.C. teweeg brengen. Dit laatste moet echter onwaarschijnlijk geacht worden. De scheiding berust op verschil in R_F en wordt beïnvloed door de bandbreedte. Volgens de V.C.-theorie zal grotere h grotere bandbreedte geven en dus ongunstig zijn voor de scheiding. Dat bij C.C.D.-zonder evenwicht, bij een betrekkelijk klein aantal overbrengingen de curve soms smaller is dan de theoretische curve bij evenwicht, is op de V.C.-theorie niet toepasbaar. Bovendien is het waarschijnlijk, dat deze breedte door de aanwezigheid van een tweede stof zal worden beïnvloed, daar zonder evenwichtinstelling de „verdelingscoëfficiënten” vrij sterk van de concentratie zullen afhangen (diffusie).

Het is dus nog de vraag of een te smalle curve bij de bewuste C.C.D.-experimenten ook zo smal zou zijn bij aanwezigheid van andere stoffen. Alleen in dit laatste geval zou de scheiding gunstig worden beïnvloed door ontbreken van evenwicht.

Door Craig wordt nog gewezen op het feit, dat de H.E.T.P. voor verschillende stoffen op dezelfde zuil belangrijk kan verschillen. Waarschijnlijk ziet hij hierin een analogie met de te brede of te smalle curven bij C.C.D.-zonder evenwicht. Het verschijnsel kan echter geheel in overeenstemming zijn met de V.C.-theorie, daar de H.E.T.P. ook door de diffusiesnelheid wordt bepaald. Deze hangt af van de aard van de opgeloste stof.

De R_F wordt voor een gegeven systeem bepaald door α . Afwijking van de wet van Nernst bij grote concentratie of bij aanwezigheid van een tweede stof, kan natuurlijk de scheiding gunstig beïnvloeden. Als regel wordt echter niet onder deze omstandigheden gewerkt.

De experimenten van Craig dwingen zeker niet tot twijfel aan de principiële juistheid van formule IV).

§ 5. Experimentele verificatie van de theorie.

Uit de praktijk zijn fraaie voorbeelden bekend van het optreden van vrijwel symmetrische distributiecuren bij V.C., zoals bv. blijkt uit het werk van Moore en Stein (1948). De techniek van *elutie-analyse* geeft hier direct een afspiegeling van de stofdistributie in de zuil.

Voor een resultaat als door Moore en Stein verkregen, is een geringe stromingssnelheid voorwaarde en dit is in overeenstemming met de theorie van Martin en Synge, die immers kleine H.E.T.P. eist. Wordt de stromingssnelheid te groot, dan zijn formule II), III) en IV) niet meer van toepassing. Belangrijke afwijkingen van de symmetrie en afhankelijkheid van de R_F van de stromingssnelheid (Lester Smith, 1952) kunnen hierdoor waarschijnlijk verklaard worden.

De juistheid van formule IV) is in een aantal gevallen aan het experiment getoetst door α uit IV) te berekenen en tevens rechtstreeks te bepalen.

De principiële moeilijkheid hierbij is, dat beide α 's niet overeen behoeven te komen (zie hoofdstuk I). Bovendien is A_S/A_L vaak niet nauwkeurig te bepalen, speciaal niet bij zetmeel en cellulose, waar een deel van het stationnaire water chemisch gebonden is en dus niet zal bijdragen tot A_S . Het is daarom beter de verhouding van de α 's van verschillende stoffen voor de verificatie te gebruiken, omdat voor deze verhouding immers A_S/A_L niet bekend hoeft te zijn.

Martin en Synge (1941) vonden uitstekende overeenstemming tussen theorie en experiment bij acetylproline en acetylphenylalanine voor S = water aan silicagel en L = chloroform met 1% butanol. Deze stoffen lijken echter minder geschikt, daar het vrij sterke zuren zijn (de ionisatie-constante is van de orde van grootte van 10^{-4}). Zoals door Martin en Synge (1949,a) zelf werd aangetoond, neemt de α van acetylaminozuren dan ook belangrijk toe met afnemende concentratie. Dit is niet het geval bij aminozuren. Uit chromatographie op zetmeelkolommen verkreeg Synge (1944) voor leucine, alanine en valine α 's, die goed met de direct bepaalde overeenkwamen en vonden Moore en Stein (1948) α 's voor leucine, isoleucine en valine, waarvan de verhouding goed overeenkwam met die van de rechtstreeks gemeten verdelingscoëfficiënten.

§ 6. Toepassing op papierchromatographie.

De beschouwingen van de verdelings-theorie gaan uit van het moment dat de stof opgelost in L op de basisschijf aanwezig is. Dit is bij papierchromatographie pas het geval, wanneer L de basisvlek is gepasseerd en de stof hieruit heeft geëxtraheerd. Het gebied waar de stof zich na deze extractie bevindt, het *extractiegebied*, fungeert dan als de basisschijf, waarvan de theorie uitgaat.

Het extractiegebied heeft vaak een vorm zoals afgebeeld in fig. 5. De breedte van het gebied is in eerste instantie gelijk aan de doorsnede van de basisvlek; de lengte hangt af van de oplosbaarheid van de stof in L. Tijdens de elutie wordt het gebied in de richting van de stroming gerekt, terwijl het zich zowel in de lengte- als in de breedte-richting uitbreidt, ten gevolge van de diffusie van de stof. Door de diffusie wordt het gebied dus min of meer afgerond, zodat normale vlekken ontstaan. Afwijkingen van de normale vorm van de vlek zijn echter te verwachten indien het extractiegebied zeer lang is. Wanneer de diffusie gering is, zullen geen afgeronde vlekken ontstaan, maar blijft de oorspronkelijke vorm van het extractiegebied min of meer behouden.

Daar volgens de verdelingstheorie de R_F onafhankelijk is van de concentratie van de stof, volgt uit deze theorie, dat een normaal chromatogram zal ontstaan, indien geen complicaties bij de extractie van de stof optreden. Het ontstaan van normale chromatogrammen kan dus als een bevestiging van de juistheid van de verdelingstheorie worden beschouwd. In het onderstaande zullen we zien, dat experimentele verificatie van de theorie ook mogelijk was door de α 's, die uit de R_F -waarden van verschillende stoffen werden berekend, te vergelijken met de direct gemeten verdelingscoëfficiënten. Vooraf zullen we echter enige moeilijkheden bespreken, die bij de toepassing van de verdelingstheorie op de papierchromatographie naar voren komen. Deze moeilijkheden worden veroorzaakt door de *capillaire structuur van het papier*.

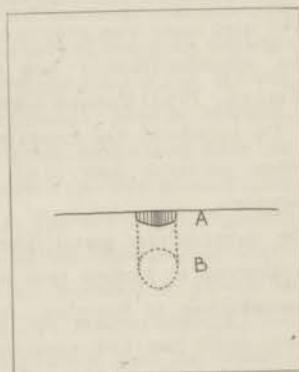


Fig. 5. Vorming van het extractiegebied A uit de basisvlek B bij het passeren van het vloeistoffront.

De capillaire stroming van een vloeistof door papier is uitvoerig bestudeerd door Tollenaar en Blokhuis (1950). De vloeistofverplaatsing als functie van de tijd t , in een capillair met straal r wordt gegeven door

$$H = \sqrt{\gamma r t / 2\eta} \dots \dots \dots V)$$

waarin γ de oppervlaktespanning en η de viscositeit van de vloeistof is. H wordt gemeten vanaf het vloeistofoppervlak (bron) buiten de capillair.

Formule V) geldt voor zuiver capillaire opzuiging zonder uitwendige druk. Om ze op papier toe te passen, werd verondersteld dat dit kan worden beschreven als een serie evenwijdige capillairen met verschillende stralen, variërend van klein tot groot en tevens dat het systeem open is, m.a.w. dat alle capillairen met elkaar in contact zijn. Is het uiteinde van deze capillairen-

bundel in een vloeistof gedompeld, dan wordt de vloeistof ingezogen en wel het snelst in de capillairen met de grootste straal. Wanneer nu een normale verdeling van de grootte van de stralen wordt aangenomen, kan de fractie van het papiervolumen die met de vloeistof is gevuld, voor ieder punt van het papier worden berekend. Het resultaat hiervan is voorgesteld door fig. 6 (curve I).

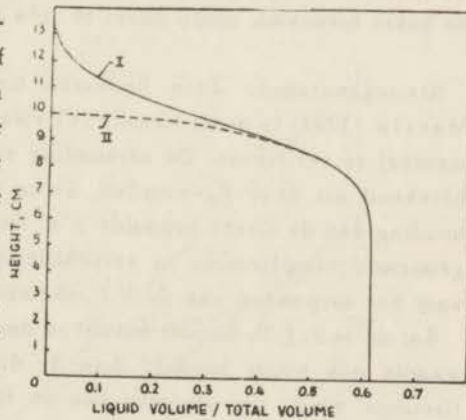


Fig. 6. Vloeistofverdeling in papier. I berekend, II waargenomen. (Tollenaar en Blokhuis, 1950).

Experimenteel werd echter curve II) gevonden. Dit kan worden verklaard door het contact dat overal tussen de capillairen bestaat. Immers de capillaire druk in een cylinder met straal r wordt gegeven door $2\gamma/r$ en is dus groter naarmate de capillairen nauwer zijn. De vloeistof in de wijde capillairen krijgt geen kans om volgens de berekening te stijgen, omdat ze in de nauwere capillairen, die op deze hoogte nog niet gevuld zijn, wordt weggezogen. De stijging volgens V) begint dus pas wanneer de drenking van het papier bijna volledig is. In dit geval heeft het leegzuigen nog maar weinig effect, daar het door de nog niet gevulde zeer nauwe capillairen moet geschie-

den, die echter een grote stromingsweerstand hebben. Aan de stijging volgens V) gaat dus vooraf het verschijnsel van het leegzuigen en dit geschiedt in een kleine strook direct achter het vloeistoffront. De snelheid waarmee deze strook en dus het front zich verplaatst, wordt daarom bepaald door de capillairen, waarvoor het leegzuigen geen effect meer heeft (buigpunt in curve I). Daar deze capillairen een discrete straal (r_m) hebben, zal de stijghoogte van het front een lineaire functie zijn van \sqrt{t} , hetgeen in overeenstemming is met het experiment.

Uit het bovenstaande volgen twee bedenkingen tegen het toepassen van de V.C.-theorie op de papierchromatographie:

- 1) De snelheid van L in het papier is niet constant, maar neemt voortdurend af, daar ze omgekeerd evenredig is met H. Daar de H.E.T.P. van de snelheid afhangt, kunnen we verwachten, dat deze grootheid bij de papierchromatographie niet constant is.
- 2) De verhouding A_S/A_L is niet constant, omdat A_L van het front naar de basis toeneemt, zoals direct te zien is in fig.6.

Niettegenstaande deze bezwaren waren Consden, Gordon en Martin (1944) in staat formule IV) voor een aantal aminozuren experimenteel te verifiëren. De verhouding van de α 's van zes aminozuren berekend uit deze R_F -waarden, kwam vrij goed overeen met de verhouding van de direct bepaalde α 's. Het is dus waarschijnlijk, dat de genoemde complicaties in verschillende gevallen geen bezwaar zijn voor het toepassen van de V.C.-theorie op de papierchromatographie.

Wat de H.E.T.P. betreft zal dit te danken zijn aan het feit, dat deze waarde ook wordt bepaald door de diffusiesnelheid van de stoffen. Hierdoor wordt het afnemen van de H.E.T.P. met kleiner wordende snelheid gecompenseerd. Het is dus mogelijk, dat bij de papierchromatographie de H.E.T.P. voornamelijk door diffusie wordt bepaald en dit wordt ook door Glueckauf, Barker en Kitt (1949) gesuggereerd.

Wat de verandering van A_L betreft, is het volgende op te merken: De curve II in fig.6 geeft A_L (als fractie van de dwarsdoorsnede van het papier) weer als functie van de afstand H door het front afgelegd. Direct achter het front is A_L zeer gering. In de frontzone neemt A_L echter sterk toe, maar vanaf een bepaalde afstand tot aan de basis verandert A_L niet belangrijk meer en op deze afstand is A_L dus reeds als maximaal te beschouwen.

De waarde van A_L wordt bepaald door het aantal en de doorsnede van de capillairen, die op een bepaalde plaats met vloeistof zijn gevuld.

Beschouwen we het papier als een serie evenwijdige capillairen van allerlei diameter, dan stijgt de vloeistof in de capillairen van straal r_1 ($r_1 < r_m$) in een bepaalde tijd over een afstand H_1 , gegeven door $H_1 = \sqrt{\gamma r_1 t / 2\eta}$. De afstand, die in deze tijd door het vloeistoffront wordt afgelegd, wordt bepaald door $H(\text{front}) = \sqrt{\gamma r_m t / 2\eta}$ zodat

$H_1/H(\text{front}) = r_1/r_m = \text{constant}$; m.a.w. het niveau van de vloeistof in de capillairen met straal r_1 heeft een constante „ R_F ”. Daar H_1 overeenkomt met een bepaalde waarde van A_L , gevormd door de bijdragen van de vloeistof in alle capillairen met $r > r_1$, verplaatst zich een niveau van constante A_L volgens een constante R_F .

Dit is grafisch voorgesteld in *fig. 7*. De abscis geeft de afstand aan, die door het front is afgelegd en de ordinaat de afstand, die een be-

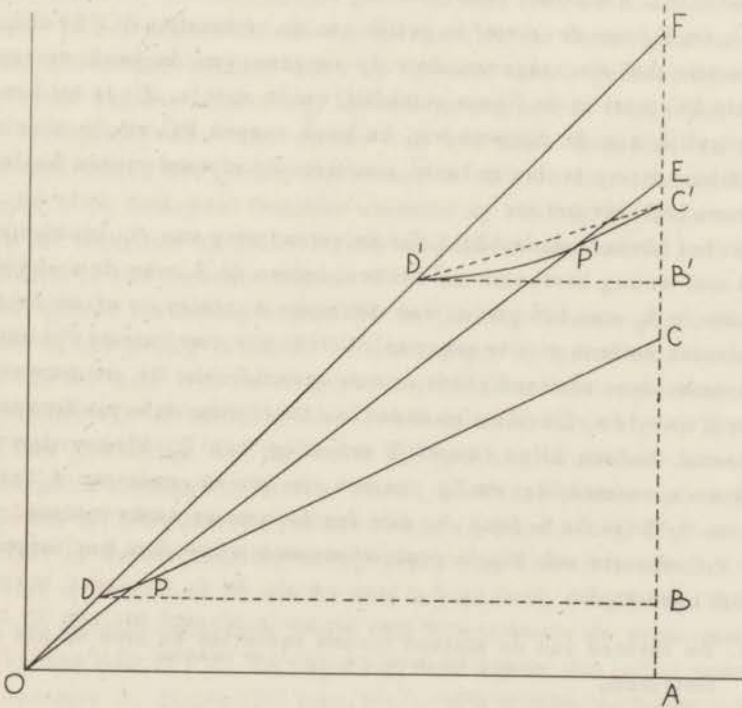


Fig. 7. Graphische voorstelling van de verplaatsing van een stof over het papier, (zie tekst).

paald punt op het papier, van de bron verwijderd is. De verplaatsing van het front wordt dus weergegeven door een rechte (OF), die door de oorsprong gaat en een hoek van 45° met de abscis maakt. De verplaatsing van een niveau van constante A_L wordt weergegeven door een rechte, die een hoek kleiner dan 45° met de abscis maakt. In fig. 7 is een dergelijke niveau-lijn OE getekend met $R_F = AE/AF$. Deze lijn komt overeen met de waarde van A_L in fig. 6, die ongeveer gelijk is aan de maximale waarde (R_F ongeveer 0,75). In het gebied onder de rechte OE verandert A_L dus niet belangrijk meer.

Wordt nu een stof op de afstand AB boven de bron op het papier gezet en heeft deze stof bij elutie met het solvens een R_F , die beduidend kleiner is dan de R_F van de niveaulijn OE, dan bevindt de stof zich tijdens de elutie zich vrijwel geheel in het gebied van maximale A_L . In dit gebied kan de verdelings-theorie worden toegepast. De verplaatsing van de stof wordt weergegeven door de lijn DC. In het gebied gelegen tussen de rechten OF en OE is deze lijn naar boven toe gekromd (DP). Vanaf het punt waar zij OE snijdt, is de lijn een rechte (PC). De R_F van deze stof is gelijk aan de verhouding $BC/BF = BC/BD$ en wordt dus weergegeven door de tangens van de hoek tussen de rechte DC (niet in de figuur getekend) en de abscis. Zij is bij benadering gelijk aan de tangens van de hoek tussen PC en de abscis en deze benadering is des te beter, naarmate de afstand tussen basisvlek en bron (AB) kleiner is.

Uit het bovenstaande blijkt, dat de verandering van A_L bij elutie van een stof weinig betekenis zal hebben, indien de R_F van de stof kleiner is dan de R_F van het niveau van maximale A_L (mits de afstand tussen basisvlek en bron niet te groot is). Verificatie van formule IV) zal dan ook onder deze omstandigheden moetengeschieden. De aminozuren, die door Conden, Gordon en Martin (1944) voor deze verificatie zijn gebruikt, hadden allen (mogelijk toevallig) een R_F kleiner dan 0,60. Als we aannemen, dat de R_F van het niveau van constante A_L gelijk is aan 0,75 (zoals in fig. 6), is dus aan deze voorwaarde voldaan, zodat de V.C.-theorie ook bij de papierchromatographie door het experiment wordt bevestigd.

§ 7. De invloed van de afstand tussen basisvlek en bron op het chromatogram.

Wanneer de afstand tussen basisvlek en bron groot wordt, moet de stof, zoals in fig. 7 is te zien, een belangrijke afstand afleggen in het

gebied, waar A_L beduidend variëert. Ook in dit geval blijken normale vlekken te ontstaan, waarvan de R_F onafhankelijk is van de concentratie. Het is dus waarschijnlijk, dat ook wanneer A_L tijdens het proces verandert, betekenis aan formule IV) moet worden gehecht. De verhouding A_S/A_L uit deze formule zal dan een gemiddelde waarde voorstellen.

Bij de berekening van formule I) is de factor c constant verondersteld. Zoals reeds is opgemerkt, is het moeilijk te overzien hoe deze berekening zal worden beïnvloed door een kleine afwijking van c van de constante waarde. Wel is in te zien, dat een concentratie-afhankelijkheid van c het chromatographisch beeld op een andere wijze zal beïnvloeden dan een variatie van c door een verandering van A_S/A_L .

In het eerste geval zullen de punten van het extractiegebied, die verschillende concentratie hebben, met verschillende snelheid over het papier lopen. Het gevolg is, dat de vlek gerekt wordt in de richting van de stroming (hoofdstuk I). Daar in het extractiegebied, ook wanneer dit zeer klein is, de concentratie sterk variëert (van de maximum concentratie in het midden tot nul aan de randen), zal de invloed van de concentratie-afhankelijkheid van c op de vorm van de geëluëerde vlek groot zijn. Wanneer echter A_S/A_L tijdens het proces verandert, zal deze verandering voor alle punten van het extractiegebied vrijwel gelijk zijn, indien het gebied niet te lang is en zich niet direct achter het front blijft bewegen. Ondanks verandering van A_S/A_L kunnen we dus in het algemeen normale vlekken verwachten met een R_F , die onafhankelijk is van de concentratie.

In het gebied tussen de rechten OF en OE (fig. 7) neemt A_L belangrijk toe en het gevolg is dat de verhouding A_S/A_L geleidelijk kleiner wordt van OF naar OE. De relatieve snelheid van een opgeloste stof ten opzichte van de snelheid van het front, neemt dus volgens IV) in dit gebied geleidelijk toe. Dit wordt in fig. 7 uitgedrukt door het toenemen van de richtingscoëfficiënt van de kromme, die de verplaatsing van de stof bij het passeren van het bewuste gebied weergeeft.

In fig. 7 is de verplaatsing weergegeven van een stof, waarvan de basisvlek op de afstand AB van de bron is geplaatst, door de lijn DPC. Wordt de afstand basis-bron groter (AB'), dan wordt de verplaatsing weergegeven door $D'P'C'$. De delen van deze lijnen, die in het gebied van constante A_L liggen (PC resp. $P'C'$), zijn rechten en lopen evenwijdig aan elkaar. De R_F wordt in beide gevallen weergegeven door de tangens van de hoek tussen de rechten DC resp. $D'C'$ en de abscis

(zie § 6). Uit de figuur is te zien, dat de R_p kleiner is naarmate de afstand basis-bron groter is.

Door Consden, Gordon en Martin (1944) is deze invloed van de afstand basis-bron reeds geconstateerd en geïnterpreteerd als een gevolg van het veranderen van A_L . Door anderen (Burma, 1951; Kowkabany en Cassidy, 1952) wordt echter de verandering van de samenstelling van de mobiele fase tijdens de elutie (zie hoofdstuk IV, § 4), verantwoordelijk gesteld voor dit verschijnsel. Om de hier gegeven theorie experimenteel te verifiëren, zal men dus moeten zorgen, dat de mobiele fase tijdens de elutie niet van samenstelling verandert en bovendien dat ook A_s constant is (zie hoofdstuk V, § 3).

HOOFDSTUK III

FILTREERPAPIER EN CELLULOSE.*)

§ 1. Chemische samenstelling van filtreerpapier.

Voor de bereiding van filtreerpapier worden drie soorten natieve cellulose-vezels gebruikt.

1) „Katoen”. Hieronder wordt verstaan textielafval (lompen), voornamelijk bestaande uit katoen of linnen. De lompen worden gereinigd met soda of verdunde loog, gemalen en gebleekt.

2) „Cellulose” of houtpulp. Dit wordt bereid uit hout, waaruit het lignine wordt verwijderd, bv. met bisulfiet („sulfietpulp”) of loog en sulfide-sulfaat („sulfaatpulp”), waarna het product wordt gebleekt.

3) „Linters”. Dit zijn katoenharen, die ongeschikt zijn voor het spinproces. Ze worden gereinigd en gebleekt.

Het cellulose-molecule is opgebouwd uit glucose-moleculen die β -glycosidisch zijn verbonden tot lange lineaire macromoleculen. De lengte van de ketenmoleculen wordt aangegeven door de polymerisatiegraad (P) d.i. het aantal glucoseresten, waaruit het molecule is opgebouwd.

— Het blijkt dat de gemiddelde polymerisatiegraad (DP) van een cellulose-preparaat door het reinigen en bleken aanzienlijk kan dalen. De ketens worden hierbij dus gedeeltelijk afgebroken. Dit kan geschieden door oxydatie en hydrolyse.

Door oxydatie kunnen carbonyl- en carboxylgroepen worden ingevoerd, hetgeen vaak gepaard gaat met een doorbraak van de keten. De door oxydatie veranderde cellulose wordt *oxycellulose* genoemd. De oxydatie kan in alkalisch milieu reeds met luchtzuurstof geschieden. De aantasting tijdens het bleken, hangt sterk af van het gebruikte bleekmiddel en van factoren als zuurgraad en katalysatoren (sporen Cu).

*) Bij de bewerking van dit hoofdstuk is voor een belangrijk deel gebruik gemaakt van P.H. Hermans „Physics and Chemistry of Cellulose Fibres” Amsterdam 1949. Slechts in speciale gevallen zal hiernaar verwezen worden.

Door hydrolyse wordt de glycoside-binding verbroken en er ontstaan producten die onder de naam *hydrocellulose* worden samengevat en een reducerend vermogen voor Cu^{++} hebben.

Naast cellulose-moleculen al of niet aangetast door oxydatie en hydrolyse, kunnen in cellulose-vezels verontreinigingen voorkomen zoals xylanen, mannanen, galactanen, polyuron-zuren, pectine en hars. De koolhydraten hiervan worden wel *hout-polyosen* genoemd daar ze voornamelijk in hout voorkomen.

Het is gebruikelijk onderscheid te maken tussen α -, β - en γ -cellulose, waarbij de laatste twee ook gezamenlijk *hemicellulose* genoemd worden. Dit berust op een soort fractioneringsproces naar polymerisatiegraad, waarbij als reagens natronloog van 17,5% wordt gebruikt. Hierin lost de α -fractie niet op en de hemicellulose-fractie wel. Met zuur slaat de β -cellulose uit de oplossing neer, terwijl de γ -cellulose in oplossing blijft. De hemicellulose wordt verondersteld te bestaan uit cellulose van geringe polymerisatiegraad ($\text{DP} < 150$) en uit een deel van de bovengenoemde organische verontreinigingen.

Normaal filtreerpapier bevat bovendien steeds anorganische bestanddelen die gedeeltelijk afkomstig zijn uit de cellulose-vezels, gedeeltelijk ook uit het water dat voor de papierfabricage wordt gebruikt.

Volgens Feigl (1947) bevat filtreerpapier bijna steeds kleine hoeveelheden zetmeel. Dit zal echter alleen van toepassing zijn op papier gemaakt van lompen, daar linters- en houtpulp-papier de jodiumreactie op zetmeel niet geven.

Van chemisch standpunt beschouwd kunnen we dus zeggen, dat filtreerpapier bestaat uit cellulose, waarvan de DP en het gehalte aan oxycellulose, hydrocellulose, hemicellulose en andere verontreinigingen belangrijk kan variëren, al naar gelang de voorgeschiedenis van het papier is geweest. In het algemeen kan gezegd worden, dat de afbraak en het gehalte aan verontreinigingen bij linters-papier geringer is dan bij houtpulp-papier, en dat dit laatste in het bijzonder meer hemicellulose bevat. Bij lompen-papier is het aantal factoren dat invloed kan hebben op de samenstelling zeer variabel, daar deze grondstof zowel door de textielfabrikant als door de „voddenman” geleverd wordt.

§ 2. Rangschikking van de cellulose-moleculen.

Cellulose geeft een röntgen-interferentiediagram, hetgeen wijst op

een kristallijne bouw. Het kristalrooster blijkt voor natieve cellulose van zeer verschillende herkomst gelijk te zijn: al deze cellulosen vertonen het zgn. Cellulose-I-rooster. De ketens zijn hierin evenwijdig gerangschikt, terwijl door ruimtelijke analyse is in te zien, dat waterstofbruggen mogelijk zijn tussen de moleculen onderling. Dit verklaart de grote rooster-energie van het kristal, waardoor cellulose in water onoplosbaar is, terwijl toch het molecule, dat veel hydroxylgroepen bevat, een zeer grote affiniteit tot water heeft. Bij inwerken van water blijft het rooster intact, daar de cohaesie-energie der evenwijdig geordende moleculen groter is dan de wisselwerkings-energie van de cellulose met het water.

Men spreekt bij cellulose meestal niet van kristallen maar van *kristallieten* of *micellen*. De benaming micel heeft zich gehandhaafd ofschoon de oorspronkelijke betekenis (discrete deeltjes van supermoleculaire afmetingen, als zodanig dispergeerbaar tot een colloïdale oplossing) hier niet meer aan mag worden gehecht.

Behalve kristallijne gebieden, zijn er in de cellulose-vezels plaatsen, waar de cellulose-moleculen minder regelmatig geordend zijn, ofschoon de ketens hier wel min of meer evenwijdig kunnen zijn. In deze zogenaamde *amorphe* of *parakristallijne* gebieden zal het aantal waterstofbruggen tussen de ketens geringer zijn dan in het rooster, zodat de cohaesie-energie door de inwerking van water kan worden overwonnen. Het water kan in de amorphe gebieden binnendringen, waarbij de vezel zwelt en men dus ook kan spreken van *zwellbare* of *voor water toegankelijke* gebieden.

Het is waarschijnlijk, dat er allerlei overgangstoestanden kunnen bestaan tussen kristallijn en amorph. Er kunnen met name plaatsen zijn die niet voldoende geordend zijn om van een rooster te kunnen spreken, maar toch nog zo goed, dat water er niet kan binnendringen. Daar dit aanleiding geeft tot een dubbele betekenis van het begrip *amorphe cellulose*, zullen we hier het woord *amorph* alleen gebruiken in de betekenis *gemakkelijk toegankelijk voor water*. De gebieden van niet volmaakte rooster-orde, die dus niet kristallijn zijn te noemen, maar toch niet gemakkelijk toegankelijk zijn voor water door hun betrekkelijk goede geordendheid, worden *mesomorph* genoemd.

Cellulose-vezels kunnen langs mechanische weg worden gesplitst in microscopische *fibrillen*. Deze kunnen met behulp van bv. ultrasone trillingen nog verder worden gesplitst in *micro-* of *elementaire*

fibrillen die met het electronen-microscop zichtbaar gemaakt kunnen worden. Volgens Frey-Wyssling (1951) heeft natieve cellulose microfibrillen van 200–300 Å doorsnede, die ongeveer 2000 evenwijdige cellulose ketens (in roostervorm gedacht) bevatten. Daar de doorsnede van de micellen op grond van röntgenanalyse op ongeveer 60 Å is vastgesteld, zal een microfibril dus 15–25 micellen bevatten. Tussen deze micellen bevinden zich *intermicellaire* spleten, terwijl er grotere holten zijn tussen de microfibrillen onderling. Het beeld, dat Frey-Wyssling zich vormt van de dwarsdoorsnede van de vezel is weergegeven in *fig. 8*.

Volgens Rånby (1952) echter, is de doorsnede van de elementaire fibrillen, zoals deze met het electronen-microscop kan worden bepaald, van dezelfde orde van grootte als de doorsnede van de micellen (70–120 Å, voor de verschillende soorten natieve cellulose).

Over de wijze waarop de kristallijne en amorphe gebieden samenhangen, lopen de meningen uiteen. Volgens Hermans (1949, pag. 33), is er alle reden om aan te nemen dat de kristallijne gebieden geen individuele struc-

tuur-eenheden van de vezel zijn. Zij zouden moeten worden beschouwd als die plaatsen in een groter systeem van ongeveer evenwijdig gerangschikte cellulose-ketens, waar de rangschikking regelmatig is. Dit betekent, dat de micellen onderling door primaire-valentie-ketens zijn verbonden, bv. op de wijze als afgebeeld in *fig. 9*. Eenzelfde molecule kan behoren zowel tot een kristallijn als tot een amorph gebied.

De laatste tijd komt echter ook (weer) de opvatting naar voren dat de amorphe cellulose slechts via secundaire valentie-krachten met de micellen samenhangt.

Algar, Giertz en Gustafsson (1951) zijn van mening, dat de amorphe cellulose identiek is met de hemicellulose en zich als een soort kitstof tussen de micellen bevindt. Volgens Rånby (1952) zijn

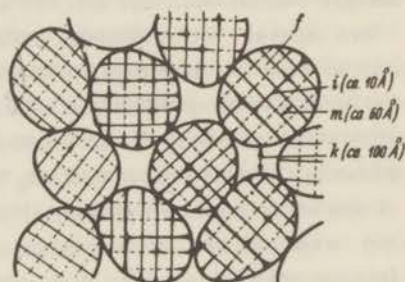


Fig. 8. Doorsnede van de microfibrillen (*f*). De micellen (*m*) zijn gescheiden door intermicellaire spleten (*i*). *k* = interfibrillaire capillair. (Frey-Wyssling, 1951).

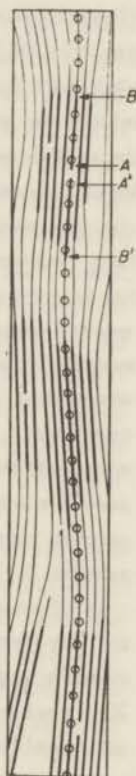
de micellen identiek met de elementaire fibrillen (*micelstrengen*) en als individuele structureenheden te beschouwen.

Het is niet opportuun hier een standpunt t.o.v. dit vraagstuk in te nemen. Het zij voldoende vast te stellen dat de cellulose-vezel bestaat uit (a) kristallijne en mesomorphe gebieden die voor water niet toegankelijk zijn, (b) amorphe gebieden waarin het water kan penetreren en (c) holten. De grondstoffen waaruit het papier bestaat, kunnen dus, behalve in chemisch opzicht, nog belangrijke verschillen vertonen in de onderlinge verhouding van kristallijne, mesomorphe en amorphe gebieden.

Er bestaan verschillende methoden om het „gehalte aan kristallijne gebieden” van de cellulose te bepalen. Deze methoden zijn deels van fysische deels van chemische aard. De resultaten van de verschillende methoden lopen vaak zeer uiteen en de interpretatie ervan is nog een punt van discussie (zie hierover bv. Centola, 1950 en Nickerson, 1951).

Het is waarschijnlijk dat de meeste soorten houtpulp een geringer gehalte aan kristallijne gebieden hebben dan katoen, terwijl vast staat dat dit gehalte voor viscosezijde veel geringer is dan voor katoen en houtpulp (Hermans 1951, Algar, Giertz en Gustafsson 1951, Nickerson, 1951).

Fig. 9. Micellaire structuur van cellulose volgens Kratky en Mark (1937). De evenwijdig gerangschikte delen van de moleculen vormen de „micellen” of kristallijne gebieden (zoals het gebied gelegen tussen B en B').



§ 3. De sorptie van waterdamp door cellulose.

Wanneer droge cellulose aan vochtige lucht wordt blootgesteld, neemt zij een hoeveelheid water op, afhankelijk van de relatieve dampdruk (r.d.) van het water in de lucht. Dit opnemen van damp uit de omgeving zal hier worden aangeduid met de term *sorptie*. Het percentage water van cellulose in evenwicht met een atmosfeer van variërende r.d., wordt voorgesteld door isothermen van de vorm als afgebeeld in *fig. 10*. De punten die de watergehalten weergeven, uitgaande van geheel droge cellulose die steeds toenemende hoeveelheden water opneemt, vormen de *absorptie-isotherm*. Gaat men daarentegen uit van cellulose met

maximum watergehalte en verlaagt men steeds de r.d., dan vindt men de punten van de *desorptie-isotherm*. Het verschijnsel, dat beide isothermen niet samenvallen, wordt *hysterese* genoemd.

De in fig. 10 afgebeelde isotherm heeft de vorm van een multilaag-adsorptie-isotherm (isotherm type II volgens de Brunauer-classificatie; Cassidy, 1951 pag. 49). De isotherm zou dus verklaard kunnen worden door adsorptie van het water aan de cellulose. Het eerste stuk komt dan overeen met adsorptie van een monomoleculaire laag watermoleculen, terwijl bij hogere r.d. meerdere lagen worden geadsorbeerd. Daar de molecuul-lagen hier worden aangelegd aan de wanden van capillairen, zullen deze bij voortgezette adsorptie van steeds nieuwe lagen, tenslotte geheel met water worden gevuld.

In dit stadium is de adsorptie te vergelijken met de *capillair-condensatie* die door Zsigmondy (1911) werd aangenomen om de sorptie van water aan silicagel te verklaren. De dampdruk van een vloeistof in een capillair is nl. lager dan die van de „normale” vloeistof, als de meniscus in de capillair, naar de vloeistof toe, gebogen is. De vloeistof condenseert dan in de capillair bij lagere dampdruk dan normaal (r.d. < 100%). De dampdrukverlaging is des te groter, naarmate de kromtestralen van de meniscus kleiner zijn. Zijn er dus in het adsorbens capillairen van allerlei diameter, dan zal de damp het eerst in de kleine capillairen condensereren, terwijl bij toenemende dampdruk ook grotere capillairen worden gevuld. De isotherm die de capillair-condensatie in een dergelijk poriënsysteem weergeeft, heeft de vorm van het rechter deel van de curve in fig. 10.

Op grond van het bovenstaande wordt de sorptie-isotherm van water-

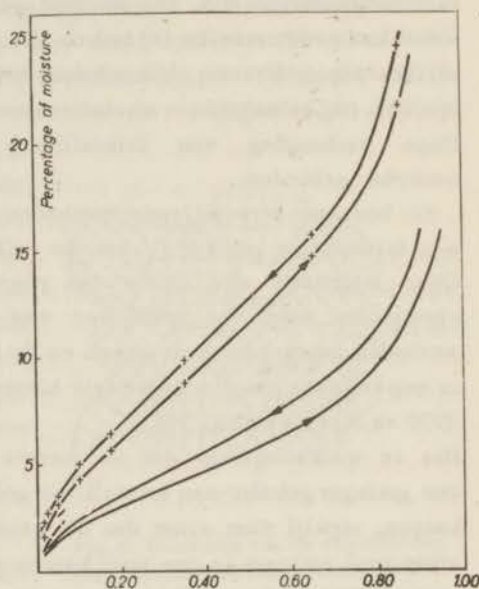


Fig. 10. Adsorptie- en desorptie-isothermen van water en katoen (—) en kunstzijde (---). Hermans 1949, pag. 182.

damp aan cellulose wel geïnterpreteerd als een adsorptie van het water gevolgd door capillair-condensatie. De uitdrukking *adsorptie* is hier echter minder op haar plaats, omdat het water in staat is het „oppervlak” van de cellulose te veranderen doordat het in de amorphe gebieden kan penetreren. Een juistere beschrijving van het sorptie-mechanisme is als volgt (Hermans, 1949, pag. 180 e.v.):

De eerste hoeveelheid water wordt aan droge cellulose gebonden onder belangrijke warmteontwikkeling. Dit gaat gepaard met een entropie-vermindering van het systeem, hetgeen wijst op een geörienteerde toestand van het water. Dit water vormt zeer waarschijnlijk echte hydraten. Hydraten van cellulose zijn nl. bekend in kristallijne cellulose, waar zij röntgen-analytisch kunnen worden onderzocht. Het is te verwachten dat het water ook aan het oppervlak van de micellen en in de amorphe gebieden, waarin het penetreert, hydraten zal vormen.

Bij hogere r.d. penetreert meer water in de amorphe gebieden, waardoor de cellulose zwelt. Het warmte-effect hiervan is gering en dit proces is te vergelijken met oplossen van de amorphe cellulose in het water. De gehele sorptie-isotherm kan op deze wijze quantitatief worden geïnterpreteerd. Het eerste stuk (van r.d. 0 tot ongeveer 60%) komt dan overeen met hydraat-vorming, het tweede stuk (r.d. > 60%) met oplossen van de gehydrateerde cellulose in het water.

Ook de term *capillair-condensatie* voor dit laatste proces is volgens Hermans (1949, pag. 192) niet gelukkig gekozen omdat de „capillairen”, waarin het geabsorbeerde water zich bevindt, pas ontstaan door de zwellende die met dit proces samengaat. Het lijkt ons echter moeilijk in te zien waarom geen „echte” capillair-condensatie zou optreden (dus in capillairen die reeds vooraf aanwezig zijn) indien de cellulose maar voldoende lang met de (verzadigde) damp in contact is.

De *hysterese* bij de sorptie van waterdamp door cellulose kan als volgt worden verklaard (Hermans, 1949, pag. 191): Wanneer het water in de amorphe cellulose penetreert, worden waterstofbruggen tussen de cellulose-moleculen verbroken. Bij desorptie keert de oorspronkelijke toestand niet geheel terug en het aantal vrije hydroxyl-groepen is nu bij dezelfde r.d. groter dan voorheen. De hoeveelheid geabsorbeerd water zal dus ook groter zijn.

Ook capillair-condensatie, in tegenstelling tot onbeperkte multilaag-adsorptie kan hysterese vertonen, zoals experimenteel werd aangetoond door Carman en Raal (1951). Er zijn verschillende theorieën opgesteld om deze hysterese te verklaren (zie Brown en Foster, 1950).

§ 4. Sorptie van de dampen van organische vloeistoffen.

Door Brimley (1924) werd de absorptie van enige organische vloeistofdampen door katoen onderzocht. Twee monsters gedroogde Egyptische katoen werden bij kamertemperatuur in de verzadigde damp van de vloeistoffen gehouden en na verschillende tijden gewogen. Het gehalte geabsorbeerde damp van de katoen bij verzadiging met de damp was als volgt:

	A. ongebleekte katoen.	B. gebleekte katoen.
water	18 - 20 gew %	19 - 21 gew %
aethanol	3 - 3½ "	8½ - 9 "
aether	7 - 7½ "	7 - 7½ "
aceton	2 - 2½ "	6½ - 7 "
benzeen	1½ - 2 "	1 - 2 "
ijsazijn	18 - 20 "	17 - 19 "

De absorptie van ijsazijn is dus bijna even groot als die van water. Tevens valt het op dat in enige gevallen het monster B veel meer absorbeert dan het monster A.

Tabel I

Sorptie van dampen aan gezuiverde katoen (A) en viscose-zijde (B) bij r.d. = 90%. in mol. per 10 kg. Temperatuur 30° C.

	A	B
water	55,95	160,02
methanol	23,57	41,68
aethanol	10,25	-
propanol-1	1,42	2,00
butanol-1	0,00	0,00
aceton	3,65	2,24
azijnzuur	17,91	0,57
benzeen	0,00	0,00
chloroform	0,92	0,46

Een nauwkeurig en uitgebreid onderzoek werd verricht door Kanamaru en Chao (1938). Zij bepaalden punten van de absorptie-isotherm bij 30° C uitgaande van in vacuo (10^{-4} mm Hg) gedroogde katoen en kunstzijde. Het vacuum werd vervangen door damp van bepaalde druk

en de maximale gewichtstoename van de cellulose aan de uitrekking van een kwartsspiraal gemeten. In *tabel I* zijn enkele waarden opgenomen.

De absorptie van water, methanol en propanol is bij kunstzijde belangrijk hoger dan bij katoen. Daar de kunstzijde een veel groter „gehalte aan amorphe gebieden” heeft dan katoen, wijst dit op penetratie van deze dampen in de amorphe gebieden van de cellulose. Uit de tabel volgt, dat het vermogen om in de amorphe cellulose te penetreren, afneemt van water tot butanol. Bij methanol is dit vermogen nog groot, bij propanol echter al gering. Merkwaardig is het gedrag van azijnzuur, dat door katoen sterk, maar door kunstzijde nauwelijks wordt geabsorbeerd.

Het onderzoek van Kanamaru en Chao werd herhaald door Lauer (1944) die de gegevens grotendeels kon bevestigen. Door Lauer werden absorptie-isothermen bepaald voor katoen en kunstzijde zoals weergegeven in *fig. 11*.

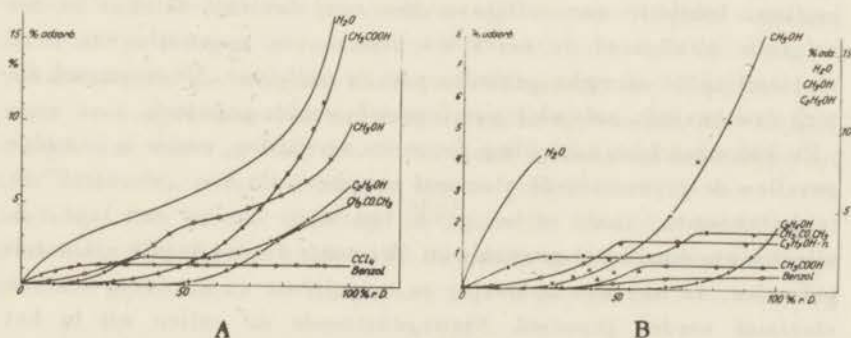


Fig. 11. Absorptie-isothermen van enige vloeistoffen aan droge katoen (A) en droge viscosezijde (B). (Lauer, 1944).

In tegenstelling tot de Japanse onderzoekers kon hij sorptie vaststellen van benzeen en butanol. Ook toluen en paraffinen werden opgenomen. Hier valt eveneens het eigenaardige gedrag van azijnzuur op.

Lauer meent dat een isotherm met toenemende richtings-coëfficiënt als van azijnzuur bij katoen, wijst op zwellings en dat een isotherm met afnemende richtingscoëfficiënt adsorptie aanduidt. De sorptie van methanol zou dan beginnen met zwellings, daarna in adsorptie overgaan en tenslotte weer eindigen met zwellings. Alleen uit de vorm van de isotherm mag hiertoe echter niet worden besloten, daar deze isotherm ook op multilaag-adsorptie kan wijzen (isotherm-type III van de Bru-

nauer classificatie). Het feit dat azijnzuur nauwelijks door kunstzijde wordt geadsorbeerd, maakt het twijfelachtig dat azijnzuur in de amorphe cellulose kan penetreren. Wel is het duidelijk dat water en methanol hiertoe in staat zijn.

§ 5. Inwerking van vloeistoffen op cellulose.

Imbibitie.

De wijze waarop vloeistoffen op de cellulose van filtreerpapier in kunnen werken, is van groot belang voor het begrijpen van het mechanisme van de papierchromatographie (zie hoofdstuk V). In het bijzonder is het hierbij van belang te weten of en in welke mate verschillende vloeistoffen in de amorphe gebieden van de cellulose kunnen penetreren. Daar het penetreren in deze gebieden in het vervolg vaak ter sprake zal komen, zullen wij kortheidshalve hiervoor de term *imbibieren* gebruiken. Imbibitie van cellulose door een vloeistof zal dus in het volgende uitsluitend de betekenis hebben van penetratie van deze vloeistof in de amorphe gebieden van de cellulose. De vloeistof die zich daar bevindt, zal *imbibitie-vloeistof* worden genoemd.

Dit kan misschien aanleiding geven tot verwarring, omdat in sommige gevallen de gepenetreerde vloeistof niet meer als een „vloeistof” is te beschouwen, zoals in het geval van water dat bij een lage r.d. alleen als hydraatwater aanwezig is. Het water dat bij hogere r.d. wordt gebonden, is met een oplossing te vergelijken en kan dus wel een vloeistof worden genoemd. Niettegenstaande dit zullen wij in het algemeen van *imbibitie-vloeistof* blijven spreken en slechts in speciale gevallen onderscheid maken tussen *kristalwater* en *imbibitiewater in engere zin*.

Over het vermogen van organische vloeistoffen om cellulose te imbibieren is nog het volgende bekend:

Hermans (1949, pag. 299 e.v.) merkt op, dat men op grond van gemeten sorptiewarmten zou verwachten, dat alleen de lagere alcoholen tot propanol en misschien de lagere vetzuren in de vezel dringen. Het gedrag van mechanische eigenschappen van cellulose-vezels in verschillende vloeistoffen zou er op wijzen dat methanol en aethanol, mierenzuur en azijnzuur in de amorphe gebieden kunnen penetreren, de hogere alcoholen en zuren echter niet.

Het is echter moeilijk om de proeven waaruit dergelijke conclusies worden getrokken goed te beoordelen omdat allerlei complicaties kunnen

optreden. Ook optische eigenschappen zouden er op wijzen dat alcoholen, maar ook aldehyden en stikstofbasen de cellulose kunnen imbiberen (Hermans, 1949, pag. 226).

Davis, Barry, Peterson en King (1943) vonden dat waterrijke primaire aminen tot en met heptylamine cellulose sterk doen zwellen en dat de lagere aminen zelfs de afmetingen van de kristalcel kunnen veranderen. Door Segal, Nelson en Conrad (1951) werd aangetoond, dat door behandelen van katoen met lagere waterrijke primaire aminen (tot en met propylamine) het gehalte aan kristallijne gebieden wordt verminderd. Daar de lagere aminen dus blijkbaar in het rooster kunnen dringen, is het zeker te verwachten, dat zij ook in de amorphe gebieden penetreren.

Inclusie.

Door Staudinger en Dohle (1943) werd aangetoond, dat cellulose verschillende vloeistoffen kan *includeren*, die niet ontsnappen wanneer de cellulose 2 dagen in vacuum bij 100° wordt gedroogd. Hiervoor is het nodig eerst de cellulose met water te doen zwellen. Wordt nu het water verdrongen door een met water mengbare vloeistof, en dan gedroogd, dan kan een deel van de vloeistof hardnekkig achterblijven. Ook koolwaterstoffen e.d. kunnen worden geïncludeerd als men eerst het water door alcohol verdringt en daarna de alcohol door de koolwaterstof. Bij katoen werden de volgende gehalten geïncludeerde vloeistof gevonden:

Water	0,0 gew. %
Methanol	0,8 "
Aethanol	1,6 "
Propanol	3,1 "
Aceton	2,0 "
Pyridine	2,7 "
Hexaan	4,9 "

Het inclusie-verschijnsel werd door de auteurs als volgt verklaard: Wanneer cellulose imbibitiewater bevat en in contact is met een organische vloeistof die met water mengbaar is, zal deze vloeistof in de geïmbibeerde cellulose overgaan. Wanneer nu het water hieruit verdwijnt, zullen de celluloseketens weer plaatselijk door waterstofbruggen kunnen worden verbonden, waardoor moleculen van de organische

vloeistof kunnen worden ingesloten. De kans op insluiting zal des te geringer zijn naarmate het ingesloten molecule zelf in staat is de waterstofbruggen te verbreken.

Uit de inclusie-gehalten volgt dus dat de alcoholen des te minder in staat zijn de waterstofbruggen tussen de cellulose-moleculen te verbreken, naarmate zij hoger staan in de homologe reeks. Hieruit kan worden geconcludeerd dat ook het imbiberend vermogen van de alcohol in deze volgorde afneemt. Het hoge inclusie-gehalte voor hexaan wijst er op dat deze vloeistof geen imbiberend vermogen voor cellulose heeft, hetgeen ook niet anders te verwachten is, daar hexaan niet in staat is waterstofbruggen met andere moleculen te vormen. Tevens blijkt uit het onderzoek van Staudinger en Dohle dat vloeistoffen, die cellulose zelf niet kunnen imbiberen, in de amorphe cellulose kunnen penetreren, indien de amorphe gebieden door een imbiberende vloeistof toegankelijk zijn gemaakt.

Door Mease (1933) was reeds ontdekt dat aethanol door droge cellulose ingesloten kan worden. Werd gedroogde katoen in absolute alcohol bij 70° C gedrenkt en daarna weer gedroogd, dan bleek 1,8% alcohol geïnccludeerd te zijn. Na uitwassen met water en drogen, keerde het oorspronkelijke gewicht weer terug waarna het proces herhaald kon worden. Daar hier van droge cellulose gebruik werd gemaakt, volgt uit dit experiment dat aethanol in staat moet zijn cellulose te imbiberen en tevens dat deze imbibitie een niet geheel reversibel proces is (vergelijk hysteresis).

Uit het bovenstaande volgt dat droge cellulose geïmbibeerd kan worden door water, methanol, aethanol en (misschien) propanol. Het imbiberend vermogen is groot bij water, belangrijk bij methanol, gering bij aethanol en onbeduidend bij propanol. Het vermogen van andere vloeistoffen tot imbibitie van droge cellulose is onzeker. Het gedrag van azijnzuur is eigenaardig omdat het door katoen sterk, door kunstzijde nauwelijks wordt geabsorbeerd. Misschien heeft aceton een zwak imbiberend vermogen (vergelijk de absorptie hiervan met die van propanol in fig. 11).

Uit de gegevens van § 5 volgt, dat de lagere termen van de reeks der primaire aminen, alcoholen en vetzuren, cellulose kunnen imbiberen. Wellicht geldt dit ook voor andere stikstofbasen en voor aldehyden. Over de mate waarin deze vloeistoffen de cellulose imbiberen, is uit deze gegevens weinig af te leiden. Bovendien is het niet duidelijk

of de gegevens alleen gelden voor waterhoudende (*luchtdroge*) of ook voor droge cellulose. De aanwezigheid van water in het papier (of in de vloeistof), zal het imbibierend vermogen van de vloeistof immers aanzienlijk kunnen vergroten, omdat water de amorphe cellulose beter toegankelijk maakt voor de vloeistof. Voor een juiste beoordeling van dit vermogen zal met de aanwezigheid van water dus rekening moeten worden gehouden.

Hierbij valt nog op te merken dat verschillende organische vloeistoffen, zoals methanol en aethanol, sterk water-onttrekkend zijn. Het is dus te verwachten, dat zij bij contact met luchtdroog papier water hieraan zullen onttrekken. De invloed van water op de imbibitie wordt daardoor gecompliceerd.

Naar aanleiding van het bovenstaande werden enige experimenten uitgevoerd, die in het volgende hoofdstuk zullen worden beschreven.

HOOFDSTUK IV

EIGEN ONDERZOEK OVER DE INWERKING VAN ORGANISCHE VLOEISTOFFEN OP FILTREERPAPIER

§ 1. Inleiding.

In het vorige hoofdstuk is opgemerkt, dat het imbiberend vermogen van een vloeistof voor waterhoudend papier belangrijk groter zal zijn dan voor uitgedroogd papier. Het leek gewenst dit nader te onderzoeken. Bovendien werd het van belang geacht meer gegevens te verzamelen over het imbiberend vermogen van enige stikstofbasen, vetzuren en andere vloeistoffen, door dit vermogen te vergelijken met dat van methanol. Voor dit onderzoek werd een chromatographische methode gebruikt, uitgaande van de volgende overweging:

Wanneer een vluchtige vloeistof, die cellulose imbibeert en waarin een stof is opgelost, op het papier wordt gebracht, bevindt de opgeloste stof zich, na het verdampen van het oplosmiddel, (gedeeltelijk) in de amorphe gebieden van de cellulose. Wordt nu het papier gechromatographeerd met een niet imbiberend solvens, zoals hexaan, dan zal het gedeelte van de stof, dat zich in de amorphe cellulose bevindt, niet door het solvens kunnen worden geëxtraheerd. Dit gedeelte blijft als *restvlek* achter, en de intensiteit van deze restvlek is een maat voor het imbiberend vermogen van de vloeistof, waarin de stof was opgelost.

Weliswaar is de tijd, waarin de vloeistof op de cellulose inwerkt, in dit geval slechts kort; door vergelijking met het gedrag van methanol, kan het imbiberend vermogen van de vloeistof echter voldoende beoordeeld worden. Bovendien zijn gegevens over de imbitie juist bij een korte inwerkingstijd eveneens van belang voor de kennis van de papierchromatographie.

De gebruikte stof moet aan de volgende voorwaarden voldoen: zij moet voldoende oplossen in het solvens, mag uit deze oplossing niet aan het papier worden geadsorbeerd en moet goed aantoonbaar zijn. Een zeer geschikte stof hiervoor bleek fluorenon te zijn. De fluorescentie in ultra-violet licht (UV) en de vluchtigheid van deze stof

bieden nl. nog een extra mogelijkheid tot bevestiging van de theorie die in hoofdstuk III is uiteengezet.

Een tweede probleem dat naar voren is gekomen is de vraag, in hoeverre door inwerking van organische vloeistoffen op luchtdroog papier water aan dit laatste wordt onttrokken. Ook dit werd nader onderzocht en wel met de eerste vier alcoholen van de reeks methanol-butanol, omdat het imbiberend vermogen hiervan voldoende bekend is. De hiervoor gebruikte alcoholen bevatten slechts sporen water; alleen bij propanol werden monsters met groter watergehalte gebruikt om de invloed van het water te onderzoeken. Het onderzoek geschiedde door het luchtdroge papier met de alcohol geheel te doordrenken. Na een lange inwerkingstijd waarin het evenwicht, naar verondersteld werd, zich had ingesteld, werd het watergehalte van de alcohol bepaald. Uit de watergehalten van de alcohol vóór en na de proef en uit het watergehalte van het papier, konden conclusies worden getrokken (§ 3).

§ 2. Restvlek-proeven met fluorenon.

Hierbij werd gebruik gemaakt van 9-fluorenon (omgekristalliseerd uit methanol; smeltpunt $83,5^{\circ}$); als solvens werd hexaan gebruikt. Fluorenon lost niet op in water en wordt uit hexaan-oplossing niet geadsorbeerd aan droge of waterhoudende cellulose. Bovendien vertoont fluorenon het verschijnsel van solvatochromie en is de fluorescentie sterk afhankelijk van de bindingstoestand van deze stof. De laatste eigenschap bleek ook waardevol voor deze proeven, hetgeen we eerst nader zullen toelichten.

Tabel II

Oplosmiddel	Kleur	Rangnummer intensiteit	Fluorescentie
Hexaan	zwak geelgroen	1	zwak groen
Aether	id.	2	vrij sterk groen
Dibutylaether	id.	2	id.
Diaethylamine	(zwak)geelgroen	3	zeer zwak
Aceton	id.	4	(zeer)sterk groen
Pyridine	geelgroen	5	zeer sterk groen
Chloroform	id.	6	sterk geelgroen
Methanol	groengeel	7	sterk bruingeel
Aethanol	id.	7	id.
Propanol-1	id.	7	id.
IJsazijn	id.	8	zwak bruingeel
Mierenzuur	sterk geel	9	zeer zwak bruingeel

De kleur in daglicht en de fluorescentie in UV van oplossingen van fluorenon (25 mg per ml) in verschillende vloeistoffen zijn weergegeven in tabel II. De rangschikking is in volgorde van toenemende kleursintensiteit bij visuele waarneming.

De kleur van de oplossing wordt blijkbaar geler naarmate het oplosmiddel een sterkere proton-donor is. Ook de fluorescentie hangt hiermee samen, zoals in een analoog geval van solvatochromie door Suhrmann en Perkampus (1951) kon worden aangetoond.

Wordt een fluorenon-oplossing in methanol (12 mg/ml) op luchtdroog papier gebracht, dan vertoont de vlek, nadat de methanol is opgedroogd, een *bruine* kleur in UV, ongeveer zoals die van de oplossing. Wordt een oplossing in chloroform, hexaan of andere koolwaterstoffen op papier gezet, dan vertonen de vlekken in UV meestal een sterk *groene* fluorescentie.

Het ontstaan van deze vlekken kan het fraaist worden waargenomen wanneer men een langzaam verdampend oplosmiddel gebruikt.

Een oplossing in dekaline is op het papier in UV te zien als een donker-groene vlek. Wanneer de dekaline is verdampd, krijgt de vlek een lichtere tint maar blijft zwak *groen*. Na enige tijd ziet men dan plotseling dat een of meer punten van de vlek fel *groen* oplichten, hetgeen zich langzaam als kristallisatie van een amorph residu, over de gehele vlek uitbreidt. In sommige gevallen ziet men echter ook punten die fel *geel* oplichten en zich snel over de vlek uitbreiden. Het resultaat kan zijn dat de vlek geheel sterk *geel* fluoresceert, maar ook gedeeltelijk *groen* en *geel*.

Het verschijnsel bleek op allotropie te berusten. Wordt fluorenon op een voorwerp glas in wat chloroform opgelost, dan ontstaat na het verdampen hiervan een amorphe rest, die spoedig kristalliseert. Onder de microscoop kan men waarnemen, dat deze kristallen metastabiël zijn en spoedig omgezet worden in een andere modificatie. In UV kan men bij deze proef zien, dat de amorphe rest zwak *groen* fluoresceert, de metastabiële kristallen feller *groen* en de stabiele sterk *geel*. In het papier kunnen beide modificaties blijkbaar naast elkaar blijven bestaan.

Het fluorenon heeft dus de eigenschap dat het *bruin* fluoresceert, wanneer het in de amorphe gebieden van de cellulose is doorgedrongen. Zeer waarschijnlijk berust dit op waterstofbrugbinding tussen het fluorenon en de hydroxylgroepen van het papier. Dat het verschijnsel niet uitsluitend wordt veroorzaakt door eventueel geïnccludeerd oplosmiddel blijkt uit het feit, dat wanneer men de *bruin* fluorescerende vlek in methanoldamp brengt, de vlek *groen* oplicht om vervolgens weer *bruin* te worden.

De methanol verdringt de stof dus eerst uit de binding met de hydroxylgroepen, om haar daarna op te lossen. In overeenstemming hiermee ziet men ook bij inwerking van waterdamp of water een kleursverandering van bruin naar groen, die hier echter blijvend is omdat de stof niet in water oplost.

Oplossingen van fluorenon in verschillende vloeistoffen werden nu op uitgedroogd papier (Whatman no 1) gebracht. Hiertoe werd een papieren cylinder in een grote exsiccator van ± 10 liter inhoud 6×24 uur boven CaO uitgedroogd. Daarna werden de oplossingen met een lange pipet door een nauwe buis in de zijwand van de exsiccator op het papier gezet, alle op dezelfde hoogte op onderlinge afstand van 1,5 cm. De experimentele details van deze techniek voor het opbrengen der vlekken zijn beschreven in hoofdstuk V § 2. Tijdens het opzetten van de stof werd sterk zwavelzuur in de exsiccator gedruppeld in een schaal onder de cylinder, zodat geen vochtige lucht binnen kon komen. Dit geschiedde door middel van een kraantrechter waarvan de buis in een zijtubus van de exsiccator was bevestigd.

De hoeveelheid vloeistof en de concentratie werden zo gekozen, dat vlekken van ongeveer 8 mm doorsnede ontstonden die $30 \mu\text{g}$ fluorenon bevatten. Bij de zeer vluchtige oplosmiddelen, zoals aether, was $3 \mu\text{l}$ nodig, bij weinig vluchtige, zoals dekaline, was $1 \mu\text{l}$ voldoende. Steeds werd na het opzetten van een vlek geruimen tijd gewacht voor een volgende werd opgebracht. Na het opbrengen van de laatste vlek werd de zijbuis afgesloten met een chloorcalciumbuisje. Na 3 uur werd via de kraantrechter op het zwavelzuur hexaan toegelaten, waarna hiermee werd geëluëerd over een afstand van 3 cm vanaf de basislijn. Het chromatogram werd in UV waargenomen.

Met uitzondering van de vlekken uit mierenzuur en methanol opgezet, was van een restvlek niets te zien. In al deze gevallen (tabel III) bevond zich het fluorenon in een scherp begrensd extractiegebied direct achter het solvensfront. Het fluorenon uit mierenzuur opgezet, bevond zich echter nog geheel op de basis en dat uit methanol voor een belangrijk deel (klein extractiegebied achter het front). Beide restvlekken fluoresceerden bruin, de extractiegebieden groen.

Uit deze proef volgt, dat methanol een vrij sterk imbiberend vermogen heeft voor droge cellulose, daar het in de korte tijd dat het met de cellulose in contact is reeds belangrijk hierin penetreert. Mierenzuur is nog sterker imbiberend (het verdampst ongeveer in dezelfde tijd als

methanol en kan dus hiermee vergeleken worden) maar we moeten hier het voorbehoud maken dat het misschien een zout vormt met fluorenon, dat niet in hexaan oplost, in welk geval geen conclusies over imbibitie zijn te trekken. Bij de andere vloeistoffen kan geen imbibitie worden vastgesteld.

Merkwaardig is het gedrag van azijnzuur, dat bij het hier beschreven experiment geen imbibitie vertoont (ofschoon het veel langzamer verdampst dan methanol) terwijl de absorptie aan katoen (hoofdstuk III) belangrijk groter is dan die van methanol bij hoge r.d.. Dit bijzondere gedrag kwam reeds tot uiting in de geringe absorptie aan kunstzijde en het reeds geuite vermoeden, dat de grote absorptie van azijnzuur aan katoen niet op imbibitie berust, wordt hierdoor dus bevestigd.

Het beschreven experiment werd herhaald met luchtdroog papier (dit bevat voornamelijk hydraatwater). Het resultaat hiervan is te zien in tabel III.

TABEL III

oplosmiddel	intensiteit restvlek	
	A uitgedroogd papier	B luchtdroog papier
hexaan	niet waarneembaar	niet waarneembaar
dekaline	„	„
chloroform	„	„
tetrachlooraethaan	„	„
aether	„	„
dibutylaether	„	„
aceton	„	uiterst zwak
propanol-1	„	zeer zwak
diaethylamine	„	vrij zwak
aethanol	„	vrij zwak
methanol	vrij sterk	(vrij) sterk
pyridine	niet waarneembaar	sterk
ijsazijn	„	sterk
mierenzuur	zeer sterk	zeer sterk

Bij B was in alle gevallen een extractiegebied te zien. Dit was natuurlijk des te kleiner naarmate meer stof in de restvlek was

achtergebleven, maar nog duidelijk waarneembaar in het geval van mierenzuur. De intensiteit van de restvlekken is in alle gevallen bij B groter dan bij A en de extractiegebieden zijn, indien de restvlek aanwezig is, bij B iets kleiner dan bij A, uitgezonderd bij mierenzuur. Het uitblijven van een extractiegebied bij mierenzuur in geval A is dan ook enigszins verdacht en wijst in de richting van zoutvorming. Bij aanwezigheid van water zal dit zout worden gehydrolyseerd. Het gedrag van mierenzuur in geval B wijst dus wel op imbibitie van waterhoudende cellulose door dit zuur.

Uit het bovenstaande volgt, dat de imbibitie van het waterhoudende papier groter is dan die van het droge. Bijzonder opvallend is dit zelfs bij de imbibitie door pyridine en ijsazijn. De veronderstelling, dat water de toegankelijkheid van de amorphe cellulose bevordert, wordt hierdoor dus bevestigd. Zelfs hydraatwater blijkt een belangrijke invloed te hebben.

Het imbibierend vermogen voor *luchtdroog* papier is groot bij *mierenzuur*, *azijnzuur*, *pyridine* en *methanol* en waarschijnlijk ook bij *diethylamine* (dit laatste is zeer vluchtig en verdampt veel sneller uit het papier dan methanol). Het is nog belangrijk bij *aethanol* maar gering bij *propanol* en *aceton*. Bij de andere vloeistoffen van tabel III kan geen imbibitie worden vastgesteld.

Het fluorenon heeft nog een andere eigenschap die kan dienen als indicator voor imbibitie of inclusie van of in cellulose, nl. de vluchtigheid. Een vlek van fluorenon, uit hexaanoplossing op papier gezet, is na enige dagen geheel verdampt. Een bruin fluorescerende restvlek neemt echter in maanden niet merkbaar in intensiteit af. Dit wijst dus op een geïncludeerde toestand van het fluorenon.

Uit de hier beschreven proeven volgt tevens, dat het fluorenon uit hexaanoplossing niet aan het papier wordt geadsorbeerd, noch wanneer dit uitgedroogd, noch wanneer dit waterhoudend is. Ook bij grotere elutieafstanden (20 cm) blijkt geen adsorptie op te treden. Het extractiegebied is scherp begrensd en loopt direct achter het front.

§ 3. Inwerking van alcoholen op luchtdroog papier.

Stroken Whatman papier no 1 van 57x5 cm werden bij kamertemperatuur boven een verzadigde NaBr-oplossing (r.d. = 60%) geaccommodeerd vervolgens overgebracht in een goed sluitend flesje en daarnagewogen (D gram). Vervolgens werd een bekende hoeveelheid alcohol (A gram) van bekend watergehalte (B%) aan het papier toegevoegd. Na ongeveer 14 dagen staan in het gesloten flesje, waarbij herhaaldelijk werd

TABEL IV

proef no	alcohol				gewicht van het papier					in het papier geïnccludeerde alcohol.		
	soort	hoeveelheid toegevoegd aan het papier	watergehalte		geaccommo- deerd bij r.d.60%	uitgedroogd bij 105° C na inwerken v.d. alcohol	E nat gemaakt en weer uitgedroogd bij 105° C					
			voor de proef	na de proef				gram	gram	mg	gew%	mg
	gram	gew. %	gew. %	gram	gram	gram	mg	gew%	mg	gew.%	mmol/100g	
A	B	C	D	E	F	G		H				
1	Methanol	9,475	0,27	2,28	2,6690	2,4906	2,4770	192,0	7,77	13,6	0,55	17
2	Methanol	19,834	0,27	1,22	2,7457	2,5634	2,5535	192,2	7,53	9,9	0,39	12
3	Aethanol	9,704	0,62	2,40	2,6607	2,5098	2,4700	190,7	7,71	39,8	1,61	35
4	Aethanol	19,990	0,62	1,43	2,5095	2,3636	2,3315	178,0	7,65	32,1	1,38	30
5	Propanol-1	9,454	0,39	1,78	2,5300	2,4037	2,3510	179,0	7,62	52,7	2,24	37
6	Propanol-1	19,480	0,39	1,16	2,7554	2,6140	2,5570	198,4	7,77	57,0	2,24	37
7	Propanol-1	3,818	4,8	6,5	2,4758	2,3373	2,3037	172,1	7,48	33,6	1,46	24
8	Propanol-1	6,934	4,8	5,8	2,4685	2,3302	2,2970	171,5	7,48	33,2	1,45	24
9	Propanol-1	5,556	11,5	11,3	2,4383	2,2902	2,2664	171,9	7,58	23,8	1,05	17
10	Propanol-1	6,778	11,5	11,0	2,3833	2,2342	2,2153	168,0	7,82	18,9	0,97	16
11	Butanol-1	8,308	0,31	1,56	2,3977	2,2642	2,2305	167,2	7,50	33,7	1,51	20

geschud, werd van de vloeistof een gedeelte afgeschonken. Hierin werd het watergehalte (C%) bepaald. Het papier werd vervolgens gedroogd bij 105°C tot constant gewicht (E gram). Daarna werd het met water nat gemaakt en weer gedroogd bij 105°C tot constant gewicht (F gram). De resultaten zijn samengevat in tabel IV.

Het verschil tussen D en F geeft de hoeveelheid water aan, die het papier bevatte (G), terwijl het verschil tussen E en F de hoeveelheid alcohol aangeeft, die in het papier werd geïncorporeerd (H). Dat deze inclusie inderdaad plaats vond, was duidelijk te constateren in het geval van propanol en butanol. Het papier was in droge toestand (weging E) vrijwel reukloos. Wanneer het aan lucht van normale vochtigheid werd blootgesteld, nam het onder warmteontwikkeling water op, terwijl de geur hierbij niet of nauwelijks veranderde. Werd het papier vervolgens nat gemaakt, dan ontwikkelde zich een sterke geur van de alcohol.

De waterbepaling van de alcoholen geschiedde door titratie met het reagens van Fischer. De omslag werd visueel bepaald. De opgegeven gehalten zijn gemiddelden van meerdere bepalingen en nauwkeurig tot op 1 à 2% relatief.

Beschouwen we nu het papier, dat in contact is met het mengsel van alcohol en water, als een systeem, bestaande uit een binnen-phase (imbibitie-vloeistof of imbibitie-phase) en een buiten-phase (de vloeistof die zich buiten de amorphe cellulose bevindt):

Met de gegevens uit tabel IV kan de hoeveelheid water van de imbibitie-phase berekend worden als functie van de hoeveelheid alcohol die zich in deze phase bevindt. Wanneer A g alcohol van watergehalte B% is toegevoegd aan papier dat G g water bevat, is de totale hoeveelheid water van het systeem $G + 0,01BA$.

Stel nu, dat x g alcohol in de imbibitie-phase overgaat en dat y g water hierin bij evenwicht aanwezig is. De hoeveelheid water in de buiten-phase is gelijk aan $G + 0,01BA - y$. Daar de totale hoeveelheid vloeistof in de buiten-phase gelijk is aan $A + G - x - y$, is het watergehalte van deze phase: $(G + 0,01BA - y)/(A + G - x - y) = 0,01C$. Lossen we hieruit y op, dan volgt:

$$y = \frac{Cx}{100 - C} - \frac{A(C - B)}{100 - C} + G = Px + Q. \quad . . 1)$$

Hierin zijn A, G, x en y uitgedrukt in grammen en B en C in gew. %. De waarden van $P = C/(100 - C)$, en van $Q = G - A(C - B)/(100 - C)$, zijn

voor de 11 experimenten weergegeven in tabel V.

Q stelt de hoeveelheid water voor in de imbibitie-phase van het papier, wanneer we aannemen dat geen alcohol hierin is overgegaan ($x=0$). Bij de berekening van Q kunnen belangrijke fouten worden gemaakt door de onnauwkeurigheid in de watergehalten B en C. Wanneer men rekening houdt met een maximale relatieve fout van 1 à 2% in deze gehalten, kunnen de uiterste waarden van Q worden geschat. Deze waarden zijn in de tabel opgenomen.

TABEL V

proef no.	alcohol	P. 10^3 mg	grenswaarden van y		water oorspronkelijk in het papier (G) mg	watergehalte buiten phase (C) gew. %
			Q. 10^3 mg	y (1). 10^3 mg		
1	methanol	23,3	-7	1 24	192,0	2,28
2	methanol	12,4	-5	7 19	192,2	1,22
3	aethanol	24,6	9	19 44	190,7	2,40
4	aethanol	14,5	8	20 35	178,0	1,43
5	propanol	18,1	41	49 67	179,0	1,78
6	propanol	11,7	40	52 64	198,4	1,16
7	propanol	70	96	110 180	172,1	6,5
8	propanol	62	84	112 174	171,5	5,8
9	propanol	127	159	211 338	171,9	11,3
10	propanol	124	176	236 360	168,0	11,0
11	butanol	15,8	59	65 81	167,2	1,56

De grootte x hangt af van het imbiberend vermogen van de alcohol en neemt dus af naarmate deze hoger staat in de homologe reeks en toe naarmate het watergehalte van de alcohol groter is. De juiste grootte van x is onbekend, maar wel kunnen de grenzen binnen welke x ligt, worden aangegeven. Volgens Hermans (1949, pag. 192) bevat katoen bij maximale imbibitie met water 35 tot 40% H_2O . Daar het imbiberend vermogen van alcohol kleiner is dan dat van water, kan x dus ook niet groter zijn dan 40% van het papiergewicht (lg). De waarde van x ligt dus tussen 0 en 1.

Conclusies.

Uit de boven omschreven experimenten kunnen nu de volgende conclusies worden getrokken:

1. Wanneer luchtdroog papier in contact is met watervrije alcoholen wordt een belangrijke hoeveelheid water aan het papier onttrokken en wel minder naarmate de alcohol hoger staat in de homologe reeks. Bij contact met waterhoudende alcoholen wordt eveneens water aan het papier onttrokken, indien het watergehalte van de alcohol niet te hoog is. Neemt dit gehalte toe, dan staat het papier steeds minder water af; bij een bepaald watergehalte wordt geen water meer onttrokken en hierboven neemt het papier water uit de alcohol op.

Toelichting: In tabel V is de bovenste grens ($x=1$) voor de hoeveelheid water in de imbibitiephase als $y(1)$ opgenomen. Deze waarden zijn volgens formule I) uitgerekend, waarbij de grootste waarden van Q zijn gebruikt. Vergelijkt men $y(1)$ met de waarden van G uit tabel IV, dan is direct te zien, dat de alcoholen met laag watergehalte water aan het papier onttrekken.

Vergelijken we nu de proeven 5 tot en met 10 waarbij de buiten-phase bestaat uit propanol van variërend watergehalte: De hoeveelheid water die het papier bevat, ligt in tussen de waarden van $y(1)$ (bovenste grens) en van Q (onderste grens). Het blijkt, dat de hoeveelheid water in het papier stijgt naarmate het watergehalte in de buiten-phase groter is. Bij proef 8 wordt zeer waarschijnlijk nog water aan het papier onttrokken, bij proef 10 wordt echter water door het papier opgenomen.

Vergelijken we de waarden van $y(x)$ voor de proeven 1 tot en met 6 en 11, waarbij de alcohol in de buiten-phase variëert van methanol tot butanol, terwijl het watergehalte hiervan ongeveer gelijk blijft, dan zien we dat de grenzen, waarbinnen y ligt, zodanig verschuiven dat y in de genoemde volgorde groter wordt. Het papier behoudt dus meer water naarmate de alcohol hoger staat in de homologe reeks.

2. Het watergehalte van de imbibitie-vloeistof is in alle gevallen groter dan dat van de buiten-vloeistof. De verhouding van de watergehalten in binnen- en buiten-phase neemt toe naarmate de alcohol in de buiten-phase hoger staat in de homologe reeks en neemt af naarmate het watergehalte van de buiten-phase groter is.

Toelichting: Het watergehalte van de imbibitie-vloeistof wordt uitgedrukt door $y/(x+y)$ en de genoemde verhouding door $y/(x+y)0,01C = f(x)$.

Substitueren we hierin $y = Px + Q$ en $0,01C = P/(P + 1)$ dan volgt

$$f(x) = \frac{P(P + 1)x + (P + 1)Q}{P(P + 1)x + PQ} \dots \dots \dots \text{II)}$$

Deze functie stelt een orthogonale hyperbool voor met asymptoten $f(x) = 1$ en $x = -Q/P(+ 1)$. In het interval $0 \leq x \leq 1$ is $f(x)$ steeds groter dan de eenheid, mits P en Q positief zijn.

Nu zijn P en Q in alle gevallen positief met uitzondering van de proeven 1 en 2 waar de kleinste waarden van Q negatief zijn. Deze negatieve waarden zijn echter zeer onwaarschijnlijk. De hoeveelheid water die het papier bevatte (G) is nl. bepaald door drogen tot constant gewicht bij 105°C . Onder deze omstandigheden blijft een kleine hoeveelheid water, van de orde van $\frac{1}{2}\%$ in het papier achter. G is dus in werkelijkheid ongeveer 10 mg groter en Q dus eveneens^{*)}. In dit geval is de waarde van Q ook voor de proeven 1 en 2 positief. We mogen dus concluderen, dat $f(x)$ in het beschouwde interval steeds groter is dan de eenheid, m.a.w. het watergehalte is binnen groter dan buiten.

Beschouwen we nu de verschillende alcoholen van de homologe reeks met gelijk watergehalte. Deze alcoholen onttrekken in de volgorde methanol-butanol steeds minder water aan het papier (conclusie 1) en penetreren zelf minder in de cellulose. Het watergehalte van de imbibitie-vloeistof en dus ook $f(x)$ is dus groter naarmate de alcohol in de buiten-vloeistof hoger staat in de homologe reeks.

Om aan te tonen dat $f(x)$ afneemt met het watergehalte van de buiten-phase, zijn de uiterste grenzen van $f(x)$ voor de proeven 5 t/m 10 met propanol van variërend watergehalte volgens formule II) uitgerekend en in tabel VI opgenomen.

Tabel VI

f(x)	grenswaarden van f(x)			watergehalte buiten-phase (C) gew. %
	x = 0	x = 1	x = 1 (voor Q + 10mg)	
$f_6(x)$	86,5	4,25-5,18	5,03-5,95	1,16
$f_5(x)$	56,2	3,15-3,54	3,64-4,04	1,78
$f_8(x)$	17,3	2,18-2,54	2,31-2,66	5,8
$f_7(x)$	15,5	2,18-2,34	2,28-2,44	6,5
$f_{10}(x)$	9,1	2,10-2,40	2,14-2,44	11,0
$f_9(x)$	8,9	1,98-2,23	2,02-2,29	11,3

Wegens de onzekerheid in de waarde van Q zijn voor de bovenste grens $f(1)$, twee waarden opgenomen nl. die voor de kleinste Q van de

*) Men ziet gemakkelijk in, dat dit de conclusie ad 1) niet beïnvloedt.

tabel en die voor de grootste Q . De functies, overeenkomend met de proeven 5 t/m 10 zijn genoteerd als $f_5(x)$ t/m $f_{10}(x)$. De volgorde in de tabel is die van toenemend watergehalte (C) van de buiten-phase. We zien, dat in deze volgorde zowel $f(0)$ als $f(1)$ afnemen.

Nu heeft $f(x)$ de volgende eigenschap: Wanneer voor 2 functies b.v. $f_5(x)$ en $f_6(x)$ geldt dat $f_5(0) < f_6(0)$ en dat $f_5(1) < f_6(1)$, dan geldt voor het gehele interval $0 \leq x \leq 1$ dat $f_5(x) < f_6(x)$. We mogen dus concluderen dat $f(x)$ voor het beschouwde interval afneemt in de volgorde van tabel VI.

Opmerkingen.

- a. De bovengenoemde conclusie blijft geldig wanneer alle waarden van Q 10 mg groter zijn. Dit blijkt uit tabel VI, waarin ook de waarden van $f(1)$ voor deze Q 's zijn opgenomen.
 - b. Het afnemen van $f(1)$ in de volgorde van tabel VI geldt slechts met zekerheid voor $f_6(1) > f_5(1) > f_8(1)$. Voor de andere waarden van $f(1)$ is dit slechts een waarschijnlijkheid. De getrokken conclusie wordt echter nog ondersteund door het feit dat x groter wordt naarmate het watergehalte van de buiten-phase groter wordt.
3. Uit tabel IV blijkt dat de vier alcoholen in de cellulose geïncludeerd worden, indien het papier na de inwerking gedroogd wordt. Het papier bevatte oorspronkelijk vrijwel uitsluitend hydraatwater (watergehalte 7,5%). Het is voor het tot stand komen van de inclusie dus niet nodig, dat de cellulose eerst volledig door water wordt geïmbibeerd en dat daarna het water door de alcohol wordt verdrongen, zoals dit door Staudinger en Döhle (1943) werd gedaan. Gaat men echter volgens de methode van deze auteurs te werk, dan is het inclusie-gehalte van propanol (zie hoofdstuk III, §5) belangrijk hoger dandat vantabel IV. Het is waarschijnlijk dat dit wordt veroorzaakt doordat de propanol bij de inwerking op luchtdroog papier slechts weinig in de cellulose penetreert. Dit wordt bevestigd door het feit dat het inclusie-gehalte van butanol (tabel IV) kleiner is dan van propanol, ofschoon butanol gemakkelijker wordt geïncludeerd. De penetratie van butanol in het luchtdroge papier is dus zeer gering.
- § 4. Verandering van de samenstelling van de mobiele phase tijdens de elutie.

Uit het bovenstaande volgt, dat de samenstelling van een mengsel van alcohol en water door contact met papier over het algemeen zal

veranderen. Elueert men luchtdroog papier met alcoholen die slechts weinig water bevatten, dan neemt de alcohol water uit het papier op. Het watergehalte van de alcohol stijgt hierdoor en het zal dichtbij het vloeistoffront groter zijn dan verder hier vandaan.

Neemt het watergehalte van de alcohol toe, dan wordt een punt bereikt, waar de samenstelling van de vloeistof niet meer verandert. Bij dit watergehalte neemt het papier water en alcohol op, in dezelfde verhouding als die van de elutievloeistof. Uit de proeven 5 t/m 10 van tabel IV is te zien, dat voor waterige propanol de evenwichtsconcentratie ligt bij ongeveer 10% water. Is het watergehalte van de elutievloeistof groter dan deze evenwichtsconcentratie, dan is het te verwachten, dat relatief meer water dan alcohol in de cellulose zal penetreren, zodat het watergehalte van de alcohol afneemt door het contact met het papier. Dit werd nog experimenteel geverifieerd door aan 2,5 g luchtdroog papier 6,3 g propanol toe te voegen van een watergehalte van 48,6%. Na enige dagen werd een deel van de propanol afgescheiden. Het watergehalte hierin bleek 45,2% te zijn. Het was dus belangrijk gedaald, overeenkomstig de verwachting.

Ook van vele andere vloeistoffen of vloeistofmengsels is het in het algemeen te verwachten, dat zij bij contact met luchtdroog papier van samenstelling veranderen, hetzij door dat zij water uit het papier opnemen, hetzij doordat de componenten van het mengsel in de cellulose penetreren in een verhouding die afwijkt van de samenstelling van het mengsel.

Is het evenwicht bereikt, dan is er een binnen- en buiten-phase van bepaalde samenstelling. Deze samenstelling zal, in het algemene geval, voor de binnen-phase anders zijn dan voor de buiten-phase.

Wordt het papier vooraf in de damp van het solvens geaccommodeerd, dan zal de evenwichts-instelling reeds gedeeltelijk plaats vinden voor de elutie begint. Bij geaccommodeerd papier zal dus de verandering van de samenstelling van het solvens geringer zijn dan wanneer het papier niet is geaccommodeerd.

Dat de samenstelling van het solvens tijdens de elutie verandert, is reeds door verschillende onderzoekers verondersteld of aangetoond. Het verschijnsel wordt echter niet altijd juist geïnterpreteerd: Zo meent Burma (1951) dat het solvens voortdurend water aan het papier afgeeft, zodat het bij voortgezette elutie tenslotte al het water verliest.

De verandering van de samenstelling van de mobiele phase tijdens

de elutie kan aanleiding geven tot ontmengings-verschijnselen. Wordt b.v. luchtdroog papier geëluëerd met een mengsel bestaande uit 20 vol.% methanol en 80% tetrachloorkoolstof, dan is na enige tijd een „tweede front” te zien dat zich achter het normale front beweegt. Blijkbaar wordt door de methanol zoveel water aan het papier onttrokken, dat het mengsel van tetra en methanol dit niet meer op kan nemen.

De ontmenging kan ook tot stand komen zonder dat het water uit het papier in het solvens overgaat. Gebruikt men b.v. een solvens bestaande uit methyl-n-propylketon, bedield met 5-25 vol.% geconcentreerd zoutzuur, dan ontstaat volgens Burstall, Davies, Linstead en Wells (1949) bij elutie een tweede front. In dit geval bevat het solvens zoveel water, dat het uitgesloten geacht kan worden dat het papier water afstaat. Waarschijnlijk neemt het papier in dit geval uit het solvens relatief meer HCL op dan water. Daar de hoeveelheid water, die het keton kan opnemen, sterk afhangt van de hoeveelheid HCL die aanwezig is, kan dit verlies van HCL aanleiding geven tot ontmenging. Dergelijke gevallen van ontmenging zijn ook beschreven door Lederer (1948) en door Munier en Macheboeuf (1950).

Een consequentie van het hier beschreven verschijnsel is, dat de R_F van een stof bij elutie met een solvens, waarvan het watergehalte tijdens het proces verandert, in het algemeen afhankelijk zal zijn van de afstand basis - bron (zie hoofdstuk II, §7). De R_F van vele stoffen is immers afhankelijk van het watergehalte van het solvens (hoofdstuk V).

HOOFDSTUK V

PAPIERCHROMATOGRAPHIE ALS VERDELINGSCHROMATOGRAPHIE

§ 1. Inleiding.

In hoofdstuk I is uiteengezet, dat verdelingschromatographie niet beperkt hoeft te zijn tot „vloeistof-vloeistof” chromatographie, maar meer algemeen kan worden opgevat als een proces, waarbij een opgeloste stof wordt verdeeld tussen een stationnaire en een mobiele volumen-phase. Met de gegevens van hoofdstuk III en IV is het nu mogelijk, dit nader te specificeren voor het geval dat papier als drager fungeert. Een vloeistof kan aan het papier worden gebonden, doordat zij de cellulose van het papier imbibeert. Door het contact van de vloeistof met het papier ontstaat een volumen-phase (imbibitie-phase) waarvan de samenstelling afhangt van de aard van de buiten-vloeistof. Stroomt deze buiten-vloeistof door de capillairen van het papier, dan is het aannemelijk te verwachten, dat de imbibitie-vloeistof stationnair blijft. Het is immers niet waarschijnlijk, dat in de amorphe gebieden vloeistofstroming kan plaats vinden.

Een verdelingssysteem kan dus reeds worden verwacht, wanneer een solvens wordt gebruikt, dat de cellulose imbibeert. Een moeilijkheid hierbij is nog de vraag, wat er gebeurt wanneer de imbibitie-phase niet in evenwicht is met de mobiele phase. Evenwicht zal immers eerder uitzondering dan regel zijn en het is zeker niet aanwezig, wanneer het papier niet vooraf in de damp van het solvens wordt geaccommodeerd. De stationnaire phase zal dan tijdens het proces moeten worden opgebouwd. Doordat de imbibitie betrekkelijk langzaam verloopt (vergelijk oplossen), kan het geruimen tijd duren, voordat ze haar maximale waarde heeft bereikt. Het gevolg is, dat A_s/A_L groter wordt, naarmate de vloeistof langer op het papier heeft ingewerkt en dat deze grootte toeneemt van het front naar de basis. Bij de meeste solventia zal bovendien, zoals we in het vorige hoofdstuk hebben gezien, de samenstelling van het solvens veranderen

tijdens de elutie, wanneer het papier niet voldoende is geaccommodeerd. Het gevolg hiervan is, dat ook α bij een bepaalde stof afhangt van de plaats, waar deze stof zich op het papier bevindt.

Wanneer de verandering van A_S/A_L en van α per lengte-eenheid van het papier slechts gering is, zal een normaal chromatogram ontstaan. De reden hiervoor is reeds in hoofdstuk II, §7 uiteengezet. De invloed van de twee effecten op de R_F kan dan worden afgeleid uit formule IV) van Hoofdstuk II: De R_F neemt af wanneer A_S/A_L en α toenemen.

In dit hoofdstuk zullen enige experimenten worden beschreven, die werden uitgevoerd met het doel de juistheid van de boven beschreven opvatting te toetsen. In de eerste plaats werd hierbij gebruik gemaakt van water als solvens. In dit geval zullen immers de minste complicaties optreden, daar de samenstelling van het solvens tijdens de elutie niet kan veranderen. De proeven werden uitgevoerd met suikers. Hierbij zijn nl. geen complicaties door ionisatie te vrezen. De invloed van het accommoderen van het papier werd nagegaan, terwijl achter het front (dus op plaatsen van het papier, waar het vloeistoffront reeds gepasseerd was) enige vlekken werden opgezet, om de toeneming van A_S/A_L met groter wordende afstand van het front te onderzoeken.

Vervolgens werden alcoholen en enige andere organische solventia gebruikt. Hiermee werden glucose, fluorenon en azobenzeen geëluëerd.

In alle gevallen werd gewerkt bij kamertemperatuur. Deze was niet constant, doch varieerde van 17°- 22° C.

§ 2. Experimentele techniek.

De experimenten werden uitgevoerd met luchtdroog Whatman papier no 1. Van een vel papier (23 x 28 cm) werd een cylinder gemaakt van 28 cm hoogte, die aan een glazen geraamte werd bevestigd (fig 12). Op 3 cm van de onderzijde werd de basislijn aangebracht. Loodrecht op deze basislijn werd met potlood een schaalverdeling in cm aangebracht, zodat de afstand, die het front van de basis af heeft afgelegd, op ieder moment kon worden afgelezen.

Een ruime glazen cylinder, afgesloten door een vlakke glazen plaat, diende als chromatographische kamer. In de glazen plaat bevond zich een gat, waarin het geraamte waaraan het papier was bevestigd, door middel van een doorboorde kurk was vastgezet. De boring van deze kurk was zodanig gekozen, dat de naar buiten stekende staaf van het geraamte voldoende werd vastgeklemd, maar nog gemakkelijk op en neer kon worden geschoven en om haar as kon worden gedraaid.

De elutie-vloeistof bevond zich onder in de cylinder.

Op deze wijze is het mogelijk het papier eerst te accommoderen en vervolgens te eluëren, zonder dat de glazen cylinder wordt geopend. Men trekt het geraamte zover op, dat de onderkant van het papier het solvens niet raakt. Door het geraamte naar beneden te schuiven, kan men de elutie laten beginnen. Als regel werd het papier $\frac{1}{2}$ cm in de elutie-vloeistof gedompeld.

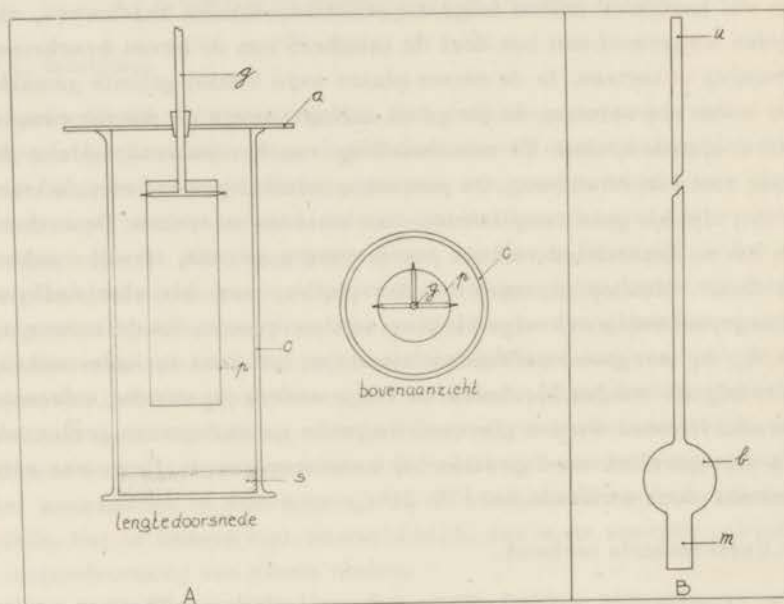


Fig. 12. A. Experimentele techniek. De glazen cylinder (c) is afgesloten door de glazen plaat (a). De papieren cylinder (p) hangt aan het geraamte (g). Door g naar beneden te schuiven, komt het papier in contact met het solvens (s). B. capillaire pipet voor het opzetten van basisvlekken op geaccommodeerd papier. Het gecalibreerde uiteinde (u) waarin de oplossing zich bevindt, wordt door een opening in de wand van het vat naar binnen gebracht en op het papier gehouden. Door nu m met de duim af te sluiten en b met de vingers te verwarmen, wordt de oplossing op het papier gedrukt.

Indien het papier werd geaccommodeerd, werd in alle gevallen de wand van de glazen cylinder bekleed met filtreerpapier („wandpapier”), dat met het solvens in contact was en hiermee dus geheel was door-drenkt. De accommodatie wordt door dit wandpapier zeer versneld.

Wanneer niet werd geaccommodeerd, werd geen wandpapier gebruikt. Wel werd er voor gezorgd, dat de atmosfeer van de glazen cylinder met de damp van het solvens was verzadigd, voordat het papier in de cylinder werd gebracht.

Wanneer papier, waarop vlekken van fluorenon of azobenzeen zijn gezet, langdurig wordt geaccommodeerd in de damp van alcoholen en andere organische vloeistoffen, diffunderen de vlekken zo sterk, dat zij onbruikbaar groot worden. Bij de betreffende experimenten was het daarom noodzakelijk deze vlekken pas na de accommodatie op het papier te zetten, zonder het papier uit het vat te nemen. Dit werd op de volgende wijze uitgevoerd.

In de glazen cylinder werd een gat geboord, waarin een buisje van ongeveer 2 mm doorsnede en 2 cm lengte door middel van een doorboorde kurk werd bevestigd. Ter plaatse van dit zijbuisje werd in het vat geen wandpapier aangebracht. Door het zijbuisje kan een capillaire pipet (fig. 12) naar binnen worden gebracht. Doordat de papieren cylinder, door middel van de naar buiten stekende staaf van het geraamte, zowel op en neer bewogen als om haar as kan worden gedraaid, kan zo op elke gewenste plaats van het papier een druppel oplossing worden gezet. Tijdens het accommoderen was het zijbuisje afgesloten. Het werd slechts geopend om de stof op het papier te brengen, waarbij de accommodatie niet noemenswaard wordt verstoord. Dezelfde methode werd gebruikt om vlekken achter het front op te zetten (§ 3) en bij experimenten met uitgedroogd papier (hoofdstuk IV, § 2 en hoofdstuk VI, § 2).

§ 3. Elutie met water.

Met water werden gechromatographeerd *glucose*, *fructose*, *lactose* en *xylose*. Van iedere suiker werden twee vlekken van 20 μ g en 50 μ g uit waterige oplossing opgezet en bovendien 5 cm boven de basislijn nog 50 μ g glucose. Nadat het water was verdampt, werd één vel papier (A) 40 uur in waterdamp geaccommodeerd en daarna geëluëerd. Een ander, op gelijke wijze behandeld vel (B) werd direct met water geëluëerd. Bij bepaalde fronthoogten werden op 3 cm boven de basis nog vlekken van $\frac{1}{2}$ μ l glucoseoplossing van 10% achter het front opgezet.

Na een elutie-tijd van ongeveer 70 minuten (elutie-afstand = 18,5 cm) werden de suikers zichtbaar gemaakt volgens Trevelyan, Procter en Harrison (1950), door het papier, na opdrogen van het solvens, te dompelen in een oplossing van AgNO_3 in aceton en daarna te

besproeien met alcoholische loog. De chromatogrammen zijn afgebeeld in fig. 13.

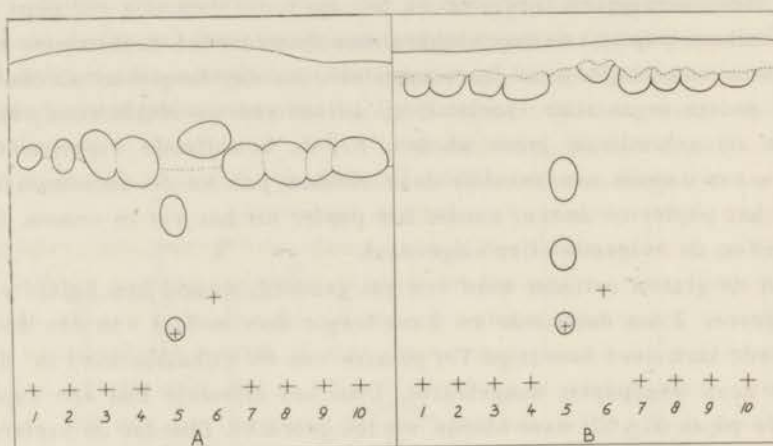


Fig. 13. Chromatogrammen van suikers geëluëerd met water. A na 40 uur accommodatie, B zonder accommodatie. + plaats van de basisvlekken, — solvensfront, - - - - - grens van de zône der „papierstoffen”. Opgezet zijn glucose (no 5 t/m 8), lactose (no 1 en 2), fructose (no 3 en 4) en xylose (no 9 en 10). De vlekken op no 5 zijn achter het front opgezet.

De R_F van de verschillende suikers, die op dezelfde basislijn zijn opgezet, is ongeveer gelijk. De R_F -waarden zijn weergegeven in tabel VII

Tabel VII

	A		B	
	R_F met accommodatie	A_S/A_L	R_F zonder accommodatie	A_S/A_L
vlekken opgezet op basislijn	0,66-0,67	0,50	(0,90)	
vlek opgezet op 5 cm boven basis	0,63	0,59	(0,90)	
1e vlek achter het front opgezet	0,66	0,51	0,90	0,11
2e " " " " "			0,87	0,15

Bij beide chromatogrammen is er tussen het front en de vlekken, die op de basislijn zijn opgezet, een zône die met het $AgNO_3$ lichtbruir kleurt en wel bij B sterker dan bij A. Achter deze zône blijft het

papier wit. Blijkbaar worden uit het papier stoffen geëxtraheerd, die met dezelfde R_F als de suikers verplaatst worden en ook met het $AgNO_3$ reagens kleuren.

Het chromatogram A heeft goed gevormde vlekken met een R_F , die onafhankelijk is van de concentratie. Ook de vlek, die achter het front is opgezet, heeft deze R_F , terwijl uit de figuur te zien is, dat deze vlek tijdens de elutie aanmerkelijk gerekt wordt in de richting van de stroming (vergelijk deze vlek met de vlek, die opgezet is onmiddellijk voor het einde van de elutie). De vlek, die boven de basislijn werd opgezet, heeft echter een belangrijk kleinere R_F .

Het chromatogram heeft dus de karakteristiek van een verdelingschromatogram en kan geheel door de verdelingstheorie worden verklaard. Het kleiner worden van de R_F bij vergroten van de afstand basis-bron is in overeenstemming met de theorie der capillaire stroming, weergegeven in hoofdstuk II §7 en kan hier niet worden verklaard door een verandering van de samenstelling van het solvens tijdens de elutie.

Het chromatogram B heeft hartvormige vlekken, waarvan de voorkant onduidelijk is afgetekend en diffuus overgaat in de zône van de papierstoffen. De R_F van deze vlekken is niet nauwkeurig te meten en is daarom in de tabel tussen haakjes geplaatst. Wel is het duidelijk, dat de R_F onafhankelijk van de concentratie is. De abnormale vorm van deze vlekken wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de snelle toeneming van A_S in de frontzône. Direct achter het front, waar A_S zeer gering is, blijft de stof nauwelijks bij het front achter.

Achter deze frontzône neemt A_S slechts langzaam toe, zoals te zien is aan de vlekken die achter het front zijn geplaatst. Deze vlekken hebben een normale vorm. De R_F is echter kleiner wanneer de vlek later wordt opgezet en de toeneming van A_S met de imbibitie-tijd is dus duidelijk te constateren. Vooral na een lange imbibitie-tijd, dus bij het geaccommodeerde chromatogram (A), is A_S belangrijk groter geworden en de R_F overeenkomstig kleiner. De R_F van de vlek, die hier achter het front is opgezet, is gelijk aan die van de vlekken van de basis. Dit is ook niet anders te verwachten, daar bij dit langdurig geaccommodeerde chromatogram A_S tijdens de elutie niet belangrijk meer zal toenemen.

Beide chromatogrammen zijn dus geheel te verklaren door aan te nemen, dat de suikers worden verdeeld tussen stationnair en mobiel water. In dit geval zal α voor alle suikers gelijk zijn aan de eenheid

(hoofdstuk I) en kunnen de waarden van A_S/A_L

(hoofdstuk I) en kunnen de waarden van A_S/A_L uit de R_F worden berekend. Deze waarden zijn in tabel VII opgenomen.

Het leek interessant te trachten de berekende waarden van A_S/A_L experimenteel te verifiëren. Hiertoe werd uitgegaan van de volgende overweging: De verhouding A_S/A_L is gelijk aan de verhouding van de volumina, die het stationnaire en het mobiele water in een bepaalde hoeveelheid papier innemen. Deze volumina worden voorgesteld door V_S resp. V_L . Van V_S kunnen we een indruk krijgen uit de gewichtstoename van luchtdroog papier bij absorptie van waterdamp. Het luchtdroge papier bevatte immers bijna alleen hydraatwater en dit kan verondersteld worden geen bijdrage te leveren tot V_S . Het imbibitie-water heeft vrijwel hetzelfde soortelijk gewicht als gewoon water (Hermans, 1949 pag. 208), zodat het gewicht hiervan tevens het volumen aangeeft. V_L kunnen we berekenen, wanneer het capillair volumen van het luchtdroge papier bekend is.

Het capillair volumen van het papier werd gemeten door weging van een hoeveelheid opgezogen petroleum. Stroken Whatman papier no 1 van 5 x 30 cm (watergehalte 7,2%) werden met potlood verdeeld in 6 opvolgende genummerde secties van 5 x 5 cm. Het papier werd gewogen en daarna opstijgend met petroleum geëluëerd. De onderste sectie (no 6) was hierbij $\frac{1}{2}$ cm in de vloeistof gedompeld. Nadat het front van de petroleum ongeveer 1 cm in de bovenste sectie (no 1) was doorgedrongen, werden de vier middelste secties (no 2 t/m 5) snel uitgeknipt en gewogen. Het verlies tijdens het uitknippen door verdamping van petroleum bedroeg volgens een controleproef minder dan 3 mg. Uit de wegingen en uit het gewicht van het papier kon het gewicht van de opgezogen petroleum in iedere sectie worden berekend. In tabel VIII zijn de hoeveelheden petroleum als % van het papiergewicht van de sectie, voor vier verschillende stroken (A t/m D) opgegeven.

Het volumen, dat door de vloeistof wordt ingenomen, is dicht achter het front (sectie 2) veel geringer dan op grotere afstand, in overeenstemming met de theorie van de capillaire opzuiging in papier, die in hoofdstuk II, §6 is uiteengezet. Vanaf sectie 3 neemt het volumen minder toe, maar toch nog belangrijk. Het toekennen van een bepaalde waarde voor de berekening van A_S/A_L kan dan ook slechts een schatting zijn. We zullen 65% van het papiergewicht aannemen met een onnauwkeurigheid van 10% relatief. Het soortelijk gewicht van de petroleum was 0,80, zodat het capillair volumen, in watergewicht uitgedrukt, 81% van het gewicht van het luchtdroge papier is.

Tabel VIII

gewicht opgezogen petroleum in % van het
gewicht van het luchtdroge papier.

sectie	A	B	C	D
2	32,6	36,0	38,8	36,6
3	58,0	60,7	58,3	57,5
4	64,5	68,7	67,1	64,0
5	72,0	72,5	73,6	70,7

De absorptie van waterdamp door het papier werd bepaald met behulp van een veerbalans. De gevoeligheid van deze balans was ± 5 mg. Een papieren cylinder, wegende 3,762 g (watergehalte 7,2%), werd opgehangen in een glazen cylinder, die voorzien was van wandpapier en waarin zich water bevond. Het vat werd afgesloten met een glazen plaat, waarin een glazen buisje van enige mm doorsnede en enige cm lengte was bevestigd. Een katoenen draad, waaraan het papier hing, werd door dit buisje geleid en aan de veerbalans opgehangen. De gewichtsvermeerdering van het papier als functie van de tijd is weergegeven in *fig. 14*.

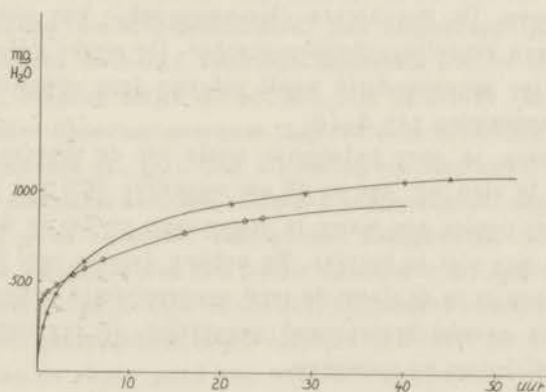


Fig. 14. Sorptie van water (x) en methanol (o) door 3,762 g luchtdroog Whatman papier (no 1), als functie van de tijd van accommodatie. Het watergehalte van het papier was bij het begin 7,2%.

Bij het chromatogram A was het papier 40 uur in waterdamp geaccommodeerd. In deze tijd blijken 3,762 g papier 1,05 g water op te nemen of 28% van het gewicht van het luchtdroge papier. Nemen we aan, dat dit water bij de chromatographie stationnair blijft, dan wordt dus $V_S = 28\%$ van het papiergewicht. Het totale capillair volumen was 81% met als grenzen 73% en 89%. Wanneer V_S hiervan wordt afgetrokken, verkrijgen we V_L . We vinden hiervoor dus als grenzen 45% en 61%, zodat de overeenkomende waarden van $A_S/A_L = V_S/V_L$ worden: $28/45 = 0,62$ en $28/61 = 0,44$.

Bij het chromatogram B verbleef het papier in totaal 70 min. in contact met het water. In deze tijd neemt 3,762 g papier 350 mg water uit de dampphase op. V_S is dus maximaal 9,3% van het papiergewicht. Nemen we voor het capillair volumen de grenswaarden 73 en 89%, dan wordt A_S/A_L $9,3/63,7 = 0,15$ resp. $9,3/79,7 = 0,12$. Deze waarde van A_S/A_L is echter pas bereikt na 70 minuten. De gemiddelde waarde voor dit chromatogram is kleiner. Daar uit de R_F 0,11–0,15 gemeten werd, vinden we dus een waarde, die waarschijnlijk te laag is. De opbouw van V_S werd bij dit chromatogram echter voornamelijk tot gebracht door contact van het papier met de *vloeistof* en het ligt voor de hand, dat V_S onder deze omstandigheid sneller wordt gevormd dan door absorptie van de *damp*.

We kunnen dus de overeenkomst tussen theorie en experiment bevredigend noemen. De beschreven chromatographie kan goed worden verklaard als een verdelingschromatographie. De sterke daling van de R_F bij langdurige accommodatie wordt volgens deze opvatting veroorzaakt door de toeneming van A_S/A_L .

Deze toeneming is zeer belangrijk zoals uit de directe bepaling blijkt. Uit fig. 14 zien we, dat na 48 uur ongeveer 38% van het drooggewicht van het papier aan water is opgenomen en dat in dit stadium de eindwaarde nog niet is bereikt. We hebben daarom voor het behandelen van het papier in de damp de term *accommoderen* gekozen, omdat dit woord geen evenwichtstoestand suggereert, in tegenstelling tot termen als *equilibreren* en *satureren*.

§ 4. Elutie met alcoholen.

Wanneer alcoholen worden gebruikt als solventia voor de papierchromatographie, zal een verdelingssysteem ontstaan, indien de betreffende alcohol de cellulose voldoende imbibeert. Zoals we in het voorafgaande hebben gezien, hangt de mate, waarin de alcoholen de

cellulose imbiberen, af van het *watergehalte*, de *aard* en de *tijd van nwerking* van de alcohol. De invloed van deze factoren werd daarom bij deze chromatographische experimenten nader onderzocht.

Als stoffen werden gebruikt *glucose*, *fluorenon* en *azobenzeen*. De glucose werd uit waterige oplossing op het papier gezet, steeds vóór dit werd geaccommodeerd. Van het fluorenon en het azobenzeen werden per vlek 3 μ l van een oplossing in chloroform gebruikt. Indien het papier vooraf werd geaccommodeerd, werden de beide laatste stoffen pas na de accommodatie op het papier gezet. Als gevolg hiervan kwam bij deze experimenten een weinig chloroform (3 μ l per vlek) in het vat; de invloed hiervan op het chromatogram werd verwaarloosbaar geacht.

De keuze van de stoffen werd bepaald door de volgende overweging: Bij de chromatographie zullen de stoffen verdeeld worden tussen de imbitie-phase en de mobiele phase. Glucose is veel beter oplosbaar in water dan in de alcoholen, fluorenon en azobenzeen lossen daarentegen in water niet op, maar zijn oplosbaar in de alcoholen. De imbitie-phase die bij elutie met alcoholen ontstaat, heeft een groter watergehalte dan de mobiele phase (hoofdstuk IV, § 3). We mogen dus in eerste instantie verwachten, dat de verdeling van glucose tussen beide fasen ten gunste van de imbitie-phase zal zijn ($\alpha > 1$) en die van de beide andere stoffen ten gunste van de mobiele phase ($\alpha < 1$). Fluorenon werd bovendien uitgekozen, omdat het uit methanol niet aan cellulose wordt geadsorbeerd. Het omgekeerde kan nl. worden geconstateerd: methanol verdringt fluorenon uit de binding met de cellulose, hetgeen blijkt uit het feit, dat de bruine fluorescentie van het gebonden fluorenon overgaat in groen door inwerking van methanol-damp (hoofdstuk IV, § 2). Ook uit de andere alcoholen wordt fluorenon zeer waarschijnlijk niet aan cellulose geadsorbeerd, omdat uit hexaan-oplossing geen adsorptie kan worden vastgesteld. Als regel neemt immers de adsorptie aan een polair adsorbens af, naarmate het oplosmiddel meer polair is (Cassidy, 1951). Behalve fluorenon werd ook nog azobenzeen gechromatographeerd, omdat deze stof sterk gekleurd is en dus tijdens de elutie goed kan worden waargenomen. Ook azobenzeen blijkt uit hexaan niet aan cellulose te worden geadsorbeerd.

Alle stoffen werden in verschillende concentraties gechromatographeerd, om de invloed van de concentratie op de R_F te kunnen constateren. Bij alle chromatogrammen was de afstand door het front afgelegd, ongeveer 20 cm gemeten van de basislijn af. De glucose werd op het papier zichtbaar gemaakt op de wijze zoals in § 3 is beschreven.

Fluorenon en azobenzeen zijn zelf gekleurd, maar worden beter zichtbaar door het chromatogram in de damp van jodium te brengen. Het azobenzeen wordt hierdoor blijvend grijs-blauw. Het fluorenon kan ook in ultra-violet licht worden opgespoord.

1. Elutie met methanol; variatie van de accommodatie-tijd.

Met absolute methanol werden drie chromatogrammen gemaakt, resp. zonder accommodatie, na 16 uur en na 120 uur accommodatie. De R_F -waarden van de onderzochte stoffen zijn opgenomen in tabel IX. De chromatogrammen zijn afgebeeld in fig. 15.

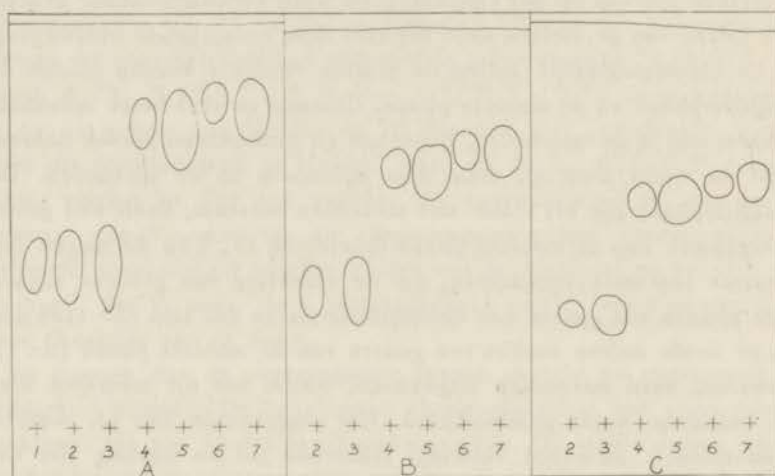


Fig. 15. Chromatogrammen van glucose (no 1, 2 en 3), fluorenon (no 4 en 5) en azobenzeen (no 6 en 7) geëluëerd met methanol. A zonder accommodatie, B na 16 uur en C na 120 uur accommodatie. — solvensfront, + basisvlekken.

Tabel IX

chromatogram accommodatie- tijd in uren	glucose			fluorenon			azobenzeen		
	R_F	α_{AS}/α_L		R_F	α_{AS}/α_L	R_F	α_{AS}/α_L	α_{AS}/α_L	
		3 μ g	10 μ g 20 μ g						30 μ g
A 0	0,397	(0,397)	1,52	0,760	(0,743)	0,32	0,812	(0,772)	0,2
B 16		0,342	1,95	0,667	0,667	0,50	0,722	0,722	0,3
C 120		0,273	2,63	0,558	0,558	0,79	0,596	0,596	0,6

Naar aanleiding hiervan is het volgende op te merken:

a. Bij azobenzeen is het verloop van de extractie uit de basisvlek goed te volgen. Het extractiegebied is bij chromatogram no I zeer veel langer voor de vlek van 150 μ g dan voor die van 30 μ g. Het gevolg hiervan is, dat ook de geëluëerde vlek veel langer is bij de grote hoeveelheid azobenzeen dan bij de kleine. De zwaartepunten van deze vlekken vallen daarom niet samen en de R_F , die aan deze zwaartepunten wordt afgemeten, verschilt aanmerkelijk voor beide vlekken. De voorkant loopt voor beide vlekken echter even snel en de verplaatsingssnelheid is dus in werkelijkheid onafhankelijk van de concentratie. Ook de vlekken van grote concentratie bij fluorenon en glucose zijn, door de langzame extractie, te lang om hieraan de R_F op juiste wijze te kunnen bepalen. De R_F -waarden van de langgerekte vlekken zijn in de tabel tussen haakjes geplaatst.

Door vergelijking van de vlekken van de chromatogrammen A, B en C is te zien, dat de extractie vlotter verloopt, wanneer het papier geaccommodeerd wordt.

b. Afgezien van enige gerekte vlekken tengevolge van een langzame extractie, zijn de chromatogrammen normaal. Het chromatogram wijst op verdelingschromatographie en kan niet door adsorptie worden verklaard.

c. De belangrijke daling van de R_F door accommodatie van het papier, moet worden toegeschreven aan het groter worden van A_S/A_L . Uit de R_F -waarden kunnen de waarden van $\alpha A_S/A_L$ met behulp van formule IV) (hoofdstuk II) worden berekend. Deze waarden zijn in tabel IX opgenomen. De verhouding hiervan voor de drie stoffen van eenzelfde chromatogram is voor de volgorde glucose : fluorenon : azobenzeen als volgt:

chromatogram A	1,52	:	0,32	:	0,23	=	6,6	:	1,4	:	1
B	1,95	:	0,50	:	0,39	=	5,0	:	1,3	:	1
C	2,63	:	0,79	:	0,68	=	3,9	:	1,2	:	1

Deze verhouding is ongeveer dezelfde als die van de verdelingscoëfficiënten. Weliswaar is A_S/A_L niet op ieder punt van het papier gelijk, maar de variatie is, afgezien van de frontzône, niet groot. Ze is zeker te verwaarlozen voor plaatsen die dicht bij elkaar liggen, zoals de plaatsen, waar het fluorenon en het azobenzeen zich bevinden. We mogen dus concluderen, dat de verdelingscoëfficiënten toenemen

in de volgorde α (azobenzeen) < α (fluorenon) < α (glucose).

In verband met de oplosbaarheden van de stoffen in water en alcoholen, hebben we reeds verondersteld, dat de α van glucose groter, de α van fluorenon echter kleiner is dan de eenheid. In dit geval zou bij chromatogram B de waarde van A_S/A_L groter moeten zijn dan 0,50.

Om te onderzoeken of dit mogelijk is, werd de absorptie gemeten van methanol-damp door luchtdroog papier, met de methode, die in § 3 is beschreven. In fig. 14 is de absorptie als functie van de tijd weergegeven, betrokken op 3,76 g papier (watergehalte 7,2%). In 20 uur nam

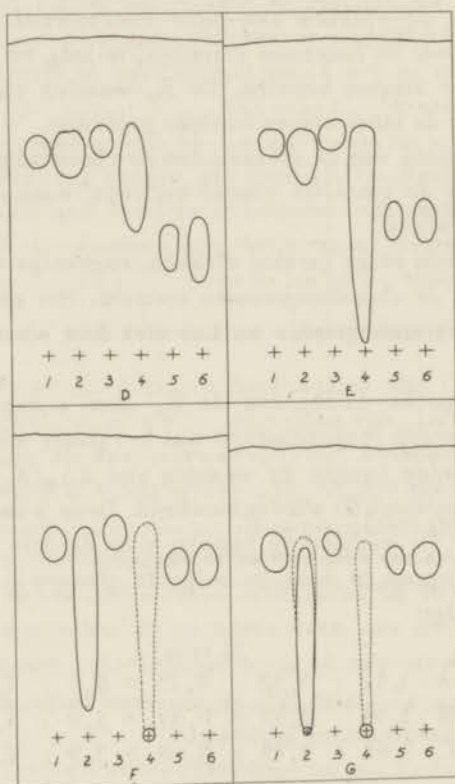


Fig. 16. Chromatogrammen van glucose (no 5 en 6), fluorenon (no 1 en 2) en azobenzeen (no 3 en 4), geelueerd met methanol van variërend watergehalte. Watergehalte in vol.% D 0%, E 12%, F 35% en G 45% — solvensfront, + basisvlekken.

het gewicht met 800 mg toe. Daar in hoofdstuk IV, §3 is gebleken, dat door inwerking van methanol op luchtdroog papier bijna al het water (d.i. 250mg) uit het papier wordt verdreven, moet dit gewicht nog bij de 800 mg worden opgeteld. Door het papier wordt dus geabsorbeerd 1.05 g methanol of 32% van het gewicht van het luchtdroge papier. Aannemende dat V_S wordt bepaald door het volumen van deze geabsorbeerde methanol, vinden we $V_S = 40\%$ (uitgedrukt in watergewicht; het soortelijk gewicht van methanol is op 0,80 gesteld). Uit de voorwaarde $A_S/A_L > 0,50$ volgt nu $V_S/V_L > 0,50$ of $V_L < V_S/0,50$. Substitutie van $V_S = 40\%$ geeft $V_L < 80\%$.

Vergelijken we dit met de waarde die in §3 voor het capillair volumen van het papier is gemeten, dan zien we dat hieraan zeker voldaan is. Het is dus waarschijnlijk, dat de veronderstelling α (fluorenon, azobenzeen) < 1 juist is.

Een tweede conclusie, die uit de boven weergegeven verhouding van de verdelingscoëfficiënten kan worden getrokken, is dat de α 's door de accommodatie veranderen en meer aan elkaar gelijk worden naarmate het papier langer wordt geaccommodeerd. We komen hier aan het einde van deze paragraaf op terug.

2. Flutie met methanol; variatie van het watergehalte.

Met methanol van verschillend watergehalte werden vier chromatogrammen gemaakt, met papier dat 20 uur in de damp van het solvens was geaccommodeerd. De R_F -waarden van de onderzochte stoffen en de waarden van $\alpha A_S/A_L$ zijn weergegeven in tabel X. De chromatogrammen zijn afgebeeld in fig. 16.

Bij deze tabel is het volgende op te merken:

a. Naarmate de methanol meer water bevat, neemt de oplosbaarheid van fluorenon en van azobenzeen in dit solvens sterk af. Hierdoor wordt de extractie van de grote hoeveelheden van deze stoffen zeer bemoeilijkt (zie hoofdstuk VI) en ontstaan lange strepen. De R_F is in dit geval tussen haakjes geplaatst.

b. De verhouding van de verdelingscoëfficiënten α (glucose : fluorenon : azobenzeen) is voor de verschillende chromatogrammen:

$$D \quad 1,94 : 0,55 : 0,48 = 4,0 : 1,2 : 1$$

$$E \quad 1,38 : 0,48 : 0,44 = 3,1 : 1,1 : 1$$

$$D \quad 0,76 : 0,54 : 0,48 = 1,6 : 1,1 : 1$$

$$G \quad 0,67 : 0,56 : 0,50 = 1,3 : 1,1 : 1$$

Tabel X

water- chroma- togram	water- gehalte methanol vol %	glucose		fluorenon			azobenzeen			
		R_F		R_F			R_F			
		5 μ g	20 μ g	$\alpha A_S/A_L$	30 μ g	300 μ g	$\alpha A_S/A_L$	30 μ g	300 μ g	$\alpha A_S/A_L$
D	spoor	0,340	0,340	1,94	0,647	0,647	0,55	0,677	(0,677)	0,48
E	12	0,420	0,420	1,38	0,675	(0,675)	0,48	0,694	(0,694)	0,44
F	35	0,569	0,569	0,76	0,650	(0,650)	0,54	0,675	(0,675)	0,48
G	45	0,600	0,600	0,67	0,643	-	0,56	0,667	-	0,50

We zien, dat de α 's tot elkaar naderen naarmate het watergehalte van de methanol stijgt. Dit komt overeen met het feit, dat de samenstelling van de imbititie-vloeistof meer gelijk wordt aan die van de buiten-vloeistof, naarmate het watergehalte in de alcohol groter is.

3. Elutie met verschillende alcoholen.

Met de alcoholen methanol/m amylalcohol werden chromatogrammen gemaakt, waarbij het papier langdurig in de damp van het solvens werd geaccomodeerd. De alcoholen bevatten slechts sporen water. De R_F -waarden van de onderzochte stoffen zijn weergegeven in tabel VI. De chromatogrammen zijn afgebeeld in fig. 17 (het chromatogram C in fig. 15).

We kunnen het volgende opmerken:

a. De verplaatsing van glucose wordt geringer naarmate de alcohol hoger staat in de homologe reeks. Bij aethanol ontstaan langgerekte vlekken, die zich van de basis af uitstrekken. De vlekken worden in de genoemde volgorde korter en de voorkant wordt steeds onduidelijker. Bij de hogere alcoholen is goed waar te nemen, dat de verplaatsing van de glucose groter wordt naarmate meer stof op de basis is gezet. Mogelijk wordt glucose uit dit milieu aan de cellulose geadsorbeerd (zie echter ook opmerking b.). Een R_F van glucose is daarom voor de hogere alcoholen niet meer opgenomen.

b. De vlekken van fluorenon en azobenzeen vertonen, indien de hogere alcoholen als solventia zijn gebruikt, een bijzondere vorm (zie fig. 17). De vlekken bestaan uit een „kop”, waarin de grootste hoeveelheid van de stof is geconcentreerd, gevolgd door een steeds vager wordende „staart”. De verplaatsing van de kop is onafhankelijk van de hoeveelheid stof die op de basis is gezet. De R_F -waarden van tabel XI zijn in de betreffende gevallen gemeten aan het centrum van deze koppen.

Tabel XI

chroma- togram	solvens	accommo- datie-tijd in uren	R _F glucose		R _F fluorenon		R _F azobenzeen	
			10 µg	20 µg	30 µg	300 µg	30 µg	150 µg
C	methanol	120	0,27	0,27	0,56	0,56	0,60	0,60
H	aethanol	120	(0,10)	(0,10)	0,63	0,63	0,65	0,65
K	propanol-1	170	—	—	0,64	0,64	0,67	0,67
L	butanol-1	170	—	—	0,70	0,70	0,72	0,72
M	amylalcohol	170	—	—	0,78	0,78	0,80	0,80
N	aceton	120	—	—	0,71	0,71	0,74	0,74
P	pyridine	120	0,57	0,57	0,65	0,65	0,66	0,66
Q	diaethylamine	120			0,58	0,58	0,64	0,64

De lengte van de staart is bij fluorenon steeds groter dan bij azobenzeen. De staart is bovendien langer, naarmate de hoeveelheid stof van de vlek groter is. De staartvorming treedt niet op bij elutie met methanol, begint zwak bij aethanol, is sterk bij propanol en neemt dan weer af, zodat bij elutie met amylalcohol weer normale vlekken van azobenzeen ontstaan.

Dit bijzondere verschijnsel kan niet bevredigend door adsorptie worden verklaard, daar fluorenon en azobenzeen uit de oplossing in de hogere alcoholen zeer waarschijnlijk niet aan cellulose worden geadsorbeerd. De bijzondere vorm van de vlekken wijst er op, dat bij de verdeling van de stof tussen stationnaire phase (S) en mobiele phase (L) *hysterese* optreedt. We kunnen dit als volgt nader toelichten.

Methanol imbibieert cellulose sterk en bij elutie met deze vloeistof ontstaat dus een „goed ontwikkelde” imbibitie-phase. In dit geval ontstaan normale fluorenon- en azobenzeen-vlekken, zodat de verdeling van deze stoffen tussen S en L geheel reversibel geschiedt: de concentratie in S is een eenzinnige functie van de concentratie in L. Bij elutie met propanol ontstaat echter een vrij slecht ontwikkelde imbibitie-phase. Een in de propanol opgeloste stof zal ook in deze phase overgaan, maar hierdoor zal de mate van de imbibitie van de cellulose gemakkelijk groter kunnen worden, afhankelijk van de aard van de stof (veronderstel bv. dat aethanol met dit systeem zou worden gechromatographeerd). Wanneer nu de opgeloste stof de imbibitie-phase gedeeltelijk weer verlaat, kunnen we ons voorstellen, dat *hysterese* optreedt, evenals dit het geval is bij absorptie en desorptie van van waterdamp bij niet te hoge dampdrukken (dus ook bij cellulose met „slecht ontwikkelde” imbibitie-phase). Dit betekent, dat de con-

concentratie van de stof in S, die met een bepaalde concentratie in L in evenwicht is, groter is naarmate dit evenwicht tot stand komt bij het verlaten van S („desorptie”), dan wanneer het tot stand komt bij overgang naar S („absorptie”).

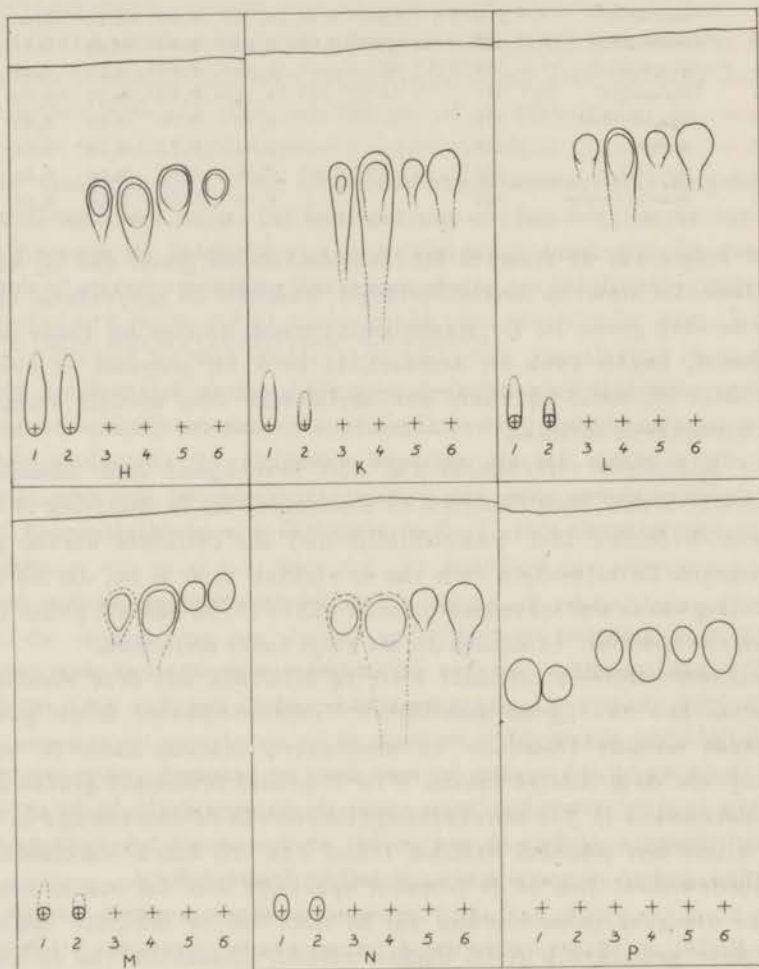


Fig.17. Chromatogrammen van glucose (no 1 en 2), fluorenon (no 3 en 4) en azobenzeen (no 5 en 6) geelueerd met verschillende vloeistoffen, na langdurige accommodatie van het papier. H aethanol, K propanol-1, L butanol-1, M amyl-alcohol, N aceton, P pyridine. — solvensfront, + basisvlekken.

Deze hysterese zou hier mogelijk verklaard kunnen worden door *inclusie* van de stof, veroorzaakt door het sluiten van waterstofbruggen. Een dergelijk gedrag is immers bekend bij het penetreren van aethanol in droge cellulose (hoofdstuk III, § 5). Het gevolg van de inclusie is, dat de stof bij haar beweging over het papier kleine hoeveelheden stof achter laat, die de staart van de vlek vormen. Later wordt de geïnccludeerde stof blijkbaar weer geëluëerd en de inclusie is hier dus slechts tijdelijk. Ook dit is begrijpelijk, omdat de cellulose immers voortdurend geïmbibeerd blijft, zij het dan ook, dat deze imbibitie slechts zwak is. Er blijft dus steeds de mogelijkheid, dat de stof uit de geïnccludeerde toestand wordt „verlost”.

Deze verklaring maakt het feit begrijpelijk, dat het „staarten” van de vlekken bij propanol maximaal is. Het verschijnsel zal immers pas duidelijk optreden bij een slecht ontwikkelde imbibitie-phase. Is deze phase echter zéér slecht ontwikkeld, zoals in het geval van butanol of (vooral) amyalcohol, dan is de mogelijkheid voor de stof om in de amorphe cellulose te penetreren zo gering, dat de hoeveelheid stof die geïnccludeerd wordt, onbeduidend is. De staarten zijn in dit geval dan ook zo vaag, dat zij nog maar nauwelijks waarneembaar zijn. Dat de voorwaarden voor staartvorming bij elutie met propanol optimaal zijn, is te zien aan de inclusie-gehalten voor de alcoholen bij de experimenten van hoofdstuk IV, § 3. Ook hier is er een maximum voor propanol, omdat de hogere alcoholen de cellulose slechts zeer weinig imbibieren.

De veronderstelling, dat het verschijnsel van staartvorming wordt veroorzaakt door een matig ontwikkelde imbibitie-phase werd op de volgende wijze bevestigd.

(1). Wordt het papier geëluëerd met absolute propanol zonder accommodatie, dan is de imbibitie-phase zeer slecht ontwikkeld. In dit geval lopen fluorenon en azobenzeen vrijwel even snel als het front en is bij fluorenon slechts een zeer onduidelijke staart te zien.

(2). Wordt het papier geëluëerd met waterhoudende propanol (na 16 uur accommodatie), dan zien we dat de staart van het fluorenon verdwijnt naarmate het watergehalte van de propanol groter wordt. Bij een watergehalte van 10 vol% geeft een vlek van 300 μ g nog een kleine staart; bij een watergehalte van 20 vol% ontstaat een normale vlek. In het laatste geval is de imbibitie-phase blijkbaar voldoende ontwikkeld om hysterese bij de verdeling te voorkomen.

(3). Elutie met watervrije pyridine en diaethylamine na 120 uur

accommodatie geeft normale fluorenon- en azobenzeen-vlekken. Elutie met aceton geeft echter een lange staart bij fluorenon. Uit de experimenten van hoofdstuk IV, § 2 volgt, dat pyridine en diaethylamine een goed ontwikkelde-, aceton daarentegen een matig ontwikkelde imbibitie-phase vormen. De R_F -waarden van deze chromatogrammen zijn opgenomen in tabel XI.

c. Uit tabel XI blijkt, dat de R_F -waarden van fluorenon en azobenzeen groter worden naarmate de alcohol, waarmee wordt geëluëerd, hoger staat in de homologe reeks. In deze volgorde wordt het verschil tussen de samenstelling van imbibitie-vloeistof en mobiele phase groter; volgens hoofdstuk IV, § 3 neemt het watergehalte van de imbibitie-vloeistof toe. De verdeling van fluorenon en azobenzeen zal gunstiger worden vóór de mobiele-phase (α wordt kleiner) en de R_F wordt dus groter.

Een andere reden voor het groter worden van de R_F is het feit, dat A_S in de genoemde volgorde kleiner wordt.

Uit het onder 3b van deze paragraaf behandelde blijkt, dat de imbibitie-phase, die door inwerking van amylicalcohol op het papier wordt gevormd, zeer slecht ontwikkeld is. De R_F van azobenzeen is in dit geval 0,80, hetgeen overeenkomt met $\alpha A_S/A_L = 0,25$. Daar α kleiner is dan de eenheid (de verdeling is gunstiger voor de mobiele phase), moet A_S/A_L groter zijn dan 0,25, dus veel groter dan deze waarde is, wanneer het papier zonder accommodatie met water wordt geëluëerd (zie § 3 van dit hoofdstuk). In het laatste geval is de imbibitie-phase echter goed ontwikkeld. Hieruit volgt, dat A_S bij chromatogram M niet uitsluitend door de grootte van de imbibitie-phase wordt bepaald, omdat anders A_S/A_L veel kleiner dan 0,25 zou moeten zijn.

Het lijkt ons daarom waarschijnlijk, dat de stationnaire phase ook wordt gevormd door capillair-condensatie van het solvens in de nauwe capillairen van het papier. Dat deze condensatie optreedt, wordt bevestigd door de volgende waarnemingen:

1. De snelheid waarmee het front van het solvens zich door het papier verplaatst, wordt belangrijk groter indien het papier vooraf in de dampen van het solvens wordt geaccomodeerd. De snelheid van het front wordt immers afgeremd doordat de vloeistof uit de wijde- in de nauwe capillairen wordt gezogen, (hoofdstuk II, § 6). Indien de nauwe capillairen door condensatie reeds met vloeistof zijn gevuld, zal dus de snelheid van het front toenemen.

2. Indien het papier langdurig geaccommodeerd is, is meestal de aftekening van het solvens-front tegen het papier onduidelijk. Deze aftekening berust namelijk op het verschil in lichtbreking tussen het droge en het natte papier. Bij capillair-condensatie bevindt zich ook vóór het front vloeistof (in de nauwe capillairen) en de aftekening wordt dus slechter.

De veronderstelling, dat het capillair-condensaat als (deel van de) stationnaire phase fungeert, betekent, dat de vloeistof die in de nauwe capillairen van het papier is gecondenseerd, niet meer beweegt, wanneer het solvens door de nog lege capillairen wordt opgezogen. Om dit aannemelijk te maken, zijn verschillende veronderstellingen noodzakelijk, waarvan wij de waarschijnlijkheid zonder nader onderzoek niet kunnen beoordelen. Wij zien daarom van een nadere bespreking van dit probleem af.

De veronderstelling, dat het capillair-condensaat, dat door accommodatie van het papier wordt gevormd, ook als stationnaire phase bij de papierchromatographie kan fungeren, geeft eveneens een verklaring voor het onder 1.c. van deze paragraaf geconstateerde feit, dat de α 's van verschillende stoffen tot elkaar naderen, indien het papier langdurig wordt geaccommodeerd. Door het accommoderen ontstaat eerst een imbibitie-phase. De samenstelling hiervan verschilt van die van de mobiele phase. Wordt de accommodatie voortgezet, dan wordt de imbibitie-phase groter en gaat (geleidelijk) over in een capillair-condensaat. De samenstelling van het condensaat zal niet (of slechts weinig) verschillen van die van de mobiele phase. Daar de stationnaire phase in dit geval wordt gevormd door imbibitie-phase en capillair-condensaat tezamen, wordt de samenstelling van de stationnaire phase door accommodatie meer gelijk aan die van de mobiele phase. De verdelingscoëfficiënten naderen hierdoor tot de eenheid. Een praktisch belangrijke consequentie hiervan is, dat de scheiding door langdurige accommodatie ongunstig zal worden beïnvloed.

Na langdurige accommodatie is het solvens-front vaak onregelmatig. Dit bleek te worden veroorzaakt door verandering van de temperatuur in de chromatographische kamer. Wanneer bv. de achterzijde van het vat warmer wordt dan de voorzijde, stijgt het front aan deze kant langzamer. Door de temperatuursverhoging verdampt blijkbaar een deel van capillair-condensaat. Hierdoor stijgt het front langzamer en wordt de R_F groter. Het gevolg is, dat de R_F van dezelfde stof op twee plaatsen van hetzelfde papier aanmerkelijk kan verschillen.

§ 5. Conclusies.

Door de bovenbeschreven experimenten kan bewezen worden geacht, dat papier-verdelingschromatographie optreedt, wanneer een solvens wordt gebruikt, dat de cellulose imbibeert. De verdeling van de stof vindt dan plaats tussen de stationnaire imbibitie-phase en de stromende vloeistof. Het is voor de mogelijkheid van een verdelingssysteem dus niet noodzakelijk, dat de imbibitie-phase wordt gevormd door een vloeistof, die (buiten het papier) niet mengbaar is met de mobiele phase. De vloeistoffen in beide fasen mogen zelfs identiek zijn, zoals het geval is, wanneer water als solvens wordt gebruikt. Evenmin is het noodzakelijk, dat de stationnaire phase water bevat, omdat er behalve water, nog andere vloeistoffen zijn (bv. methanol), die cellulose voldoende imbibieren.

Het verdelingsmechanisme fungeert slechts goed, indien de imbibitie-phase goed ontwikkeld is. Is dit niet het geval, dan kunnen abnormale vlekken ontstaan. Als voorlopige verklaring hiervan werd verondersteld, dat deze verschijnselen worden veroorzaakt door inclusie van de stof in de amorfe cellulose.

Het optreden van abnormale vlekken, die door onvoldoende imbibitie van de cellulose ontstaan, kan dus worden verhinderd door aan het solvens een vloeistof toe te voegen met groot imbibierend vermogen voor cellulose (bv. water). Neemt het solvens niet voldoende hiervan op (zoals bv. hexaan, dat bijna geen water opneemt), dan is het noodzakelijk het papier vooraf in de dampen van de imbibierende vloeistof (eventueel verzadigd met het solvens) te accommoderen.

Bij chromatographie van glucose, fluorenon en azobenzeen met methanol, kan de verdeling tussen stationnaire en mobiele phase worden beschouwd als een verdeling tussen twee methanol-fasen van verschillend watergehalte. Bij een dergelijk systeem kan een indruk van de verdelingscoëfficiënt van een stof worden verkregen, door vergelijking van de oplosbaarheden van de stof in beide fasen. Dit demonstreert het belang van de zienswijze, volgens welke het mechanisme van de papierchromatographie als een verdeling tussen twee volumen-fasen opgevat kan worden. Hierdoor kan immers de mogelijkheid om twee stoffen door papierchromatographie te scheiden, beoordeeld worden met behulp van de experimenteel gemakkelijk toegankelijke oplosbaarheden van de stoffen. Een voorbeeld moge dit nader illustreren.

Een in de pharmacie belangrijk probleem is de scheiding van barbitalen. Deze stoffen lossen in water practisch niet op. Wil men ze

papierchromatographisch scheiden, dan moet men dus in eerste instantie een verdelingssysteem trachten te vinden, waarbij de stationnaire phase slechts weinig water bevat. Een tweede vereiste voor het verdelingssysteem is, dat de verdelingscoëfficiënten van de stoffen groter zijn dan de eenheid, omdat anders de stoffen zich alle in de frontzone zullen bevinden, hetgeen de scheidingsmogelijkheid zeer beperkt. Dit betekent, dat de oplosbaarheid van de stoffen in de stationnaire phase groter moet zijn dan die in de mobiele phase.

Op grond van het bovenstaande werd geëxperimenteerd met mengsels van methanol en tetrachloorkoolstof als solvens. Daar methanol sterk polair is en tetrachloorkoolstof niet, mogen we verwachten, dat een mengsel van beide vloeistoffen bij inwerking op papier een imbibitie-phase zal geven met een groter methanol gehalte, dan dat van de mobiele phase (vergelijk hoofdstuk IV, § 3). De barbitalen lossen goed in methanol op en slecht in tetrachloorkoolstof, zodat aan de genoemde voorwaarden voor het verdelingssysteem is voldaan.

Met mengsels van methanol en tetrachloorkoolstof werden enige barbitalen geëluëerd op luchtdroog Whatman papier (no 1) na een half uur accommodatie van het papier. De barbitalen werden zichtbaar gemaakt met kwiksulfaat, zoals aangegeven door Wickström en Salvén (1952). Normale chromatogrammen ontstonden, indien het solvens 10 vol% of meer methanol bevatte. Met meer dan 20% methanol in het solvens was er echter weinig differentiatie in de R_F -waarden. In dit geval verschilt de samenstelling van stationnaire en mobiele phase dus niet veel. Met een solvens bestaande uit 20-10% methanol verschillen de R_F -waarden echter voldoende om scheiding te verkrijgen. tussen rutional (methyl-phenyl-barbituurzuur) en luminal (aethyl-phenyl-barbituurzuur) en tussen veronal (diaethyl-barbituurzuur) en proponal (dipropyl-barbituurzuur).

Het mengsel met 10% methanol bleek reeds te voldoen, zonder dat het papier werd geaccommodeerd. De vlekken zijn echter langer gerekte dan bij gebruik van geaccommodeerd papier. Worden solventia met minder dan 10% methanol gebruikt, dan ontstaan abnormale vlekken. De imbibitie-phase is dan waarschijnlijk niet voldoende ontwikkeld, zodat inclusie optreedt. Het is echter ook mogelijk, dat deze vlekken worden veroorzaakt door adsorptie of door slecht oplosbaarheid van de stoffen in het solvens (zie hoofdstuk VI).

HOOFDSTUK VI

ADSORPTIE EN IONENUITWISSELING

§ 1. Abnormale chromatogrammen.

In hoofdstuk I is uiteengezet, dat adsorptie van de opgeloste stof aan de cellulose van het papier in het algemeen aanleiding zal geven tot een abnormaal chromatogram. Het optreden van een dergelijk chromatogram is echter niet voldoende om tot adsorptie te kunnen besluiten. Afwijkingen van het normale papierchromatogram kunnen immers reeds bij vloeistof-vloeistof-chromatographie voorkomen, nl. wanneer aan de voorwaarde van de verdelingstheorie niet is voldaan.

De verdelingstheorie eist een kleine H.E.T.P. en een constante verdelingscoëfficiënt. Bovendien is voor het ontstaan van normale vlekken nodig, dat de waarde van A_S/A_L slechts weinig varieert in het gebied, waar de stof zich bevindt en dat het extractiegebied niet te lang is (hoofdstuk II).

Indien aan deze eisen niet is voldaan, zullen abnormale chromatogrammen ontstaan. Als oorzaken hiervan kunnen dus worden genoemd: te grote snelheid van de mobiele fase (grote H.E.T.P.), concentratieafhankelijkheid van de verdelingscoëfficiënt, variatie van de waarde van A_S/A_L en langgerekt extractiegebied.

De variatie van A_S/A_L zal alleen in de frontzône van betekenis zijn, terwijl de snelheid van de mobiele fase wordt bepaald door de keuze van de papiersoort en van het solvens.

Concentratieafhankelijkheid van de verdelingscoëfficiënt kan worden veroorzaakt door ionisatie of associatie van de stof, of door een te grote concentratie (hoofdstuk I). Het effect van grote concentratie wordt bij papierchromatographie echter gecompenseerd door de diffusie van de stof. De verdelingscoëfficiënt kan bovendien van de concentratie afhangen, doordat de samenstelling van stationnaire en mobiele fase door aanwezigheid van een opgeloste stof wordt beïnvloed. Dit is bij vloeistof-vloeistof-chromatographie mogelijk, omdat de onderlinge mengbaarheid van twee vloeistoffen door de aanwezigheid van een derde stof belangrijk kan veranderen. Op deze wijze verklaren

Jermyn en Isherwood (1949) het ontstaan van langgerekte vlekken bij papierchromatographie van suikers met solventia bestaande uit water-methanol-chloroform, water-methanol-aethylacetaat e.a.

Een lang extractiegebied zal slechts ontstaan, wanneer de stof niet voldoende in het solvens oplost. De vlek, die dan bij elutie ontstaat, is langgerekt en wel des te langer naarmate meer stof in de basisvlek aanwezig was. De verplaatsing van de stof is in eerste instantie onafhankelijk van de concentratie (zie fig. 16 E, hoofdstuk V). Wanneer de stof echter moeilijk in het solvens oplost en in grote hoeveelheid in de basisvlek aanwezig is, wordt de extractie aanmerkelijk gestoord, doordat de capillairen voor het solvens zijn geblokkeerd. In dit geval is in het voorste deel van het extractiegebied slechts zeer weinig opgeloste stof aanwezig. Naarmate meer stof wordt geëxtraheerd, neemt de blokkade van de capillairen af, zodat de concentratie van de stof, in de meer naar achter gelegende delen van het extractiegebied, toeneemt. Door dit effect kan de concentratie van de stof in het voorste deel van de geëluëerde vlek zo gering zijn, dat de stof niet meer aangetoond kan worden. De verplaatsing van de stof wordt hierdoor voor een grote concentratie (schijnbaar) geringer dan voor een kleine concentratie, waarbij het blokkade effect slechts onbeduidend is (zie de vlekken van fluorenon en azobenzeen in fig. 16 G, hoofdstuk V).

Behalve door bovengenoemde oorzaken kunnen abnormale vlekken ontstaan door de wisselwerking van de opgeloste stof met de cellulose (en begeleidende stoffen) van het papier. In hoofdstuk V is reeds inclusie genoemd als een mogelijke oorzaak van het optreden van bijzondere vlekken. In dit verband kan ook nog verwezen worden naar de in hoofdstuk IV beschreven restvlekken, die eveneens door inclusie kunnen ontstaan. Reeds vaak is adsorptie ter sprake gekomen als een oorzaak van abnormale chromatogrammen, terwijl in § 3 van dit hoofdstuk zal worden aangetoond, dat bij elutie van ioniserende stoffen ook ionenuitwisseling de oorzaak van dit verschijnsel kan zijn.

Bovenstaand overzicht zou nog kunnen worden aangevuld (we denken hierbij aan chemische reacties van de stof tijdens het proces). Het is echter niet de bedoeling een systematische behandeling van deze materie te geven. Slechts adsorptie en ionenuitwisseling zullen nader worden onderzocht.

§ 2. Adsorptie.

Uit het bovenstaande volgt, dat de eenvoudigste methode om het

optreden van adsorptie bij papierchromatographie te onderzoeken, zal bestaan uit een elutie-proces, waarbij verdeling uitgesloten is. Wanneer in dit geval blijkt dat de stof bij het front achterblijft, is adsorptie aangetoond, indien tenminste de concentratie van de stof niet zo ongunstig wordt gekozen, dat het achterblijven van de stof ook door storingen bij de extractie kan worden verklaard.

Op grond van deze overweging werd het volgende experiment uitgevoerd: Een papieren cylinder van Whatman no 1 (14 x 23 cm) werd 72 uur boven CaO uitgedroogd. Vervolgens werden vlekken van 20 μ g *atropine* (in chloroform-oplossing) opgezet met behulp van de in hoofdstuk V beschreven techniek. Daarna werd geëluëerd met hexaan, over \pm 8 cm en werd het alkaloïde met jodiumdamp zichtbaar gemaakt. Het chromatogram is afgebeeld in *fig. 18 A*.

De basisvlekken werden op steeds grotere afstand van de bron opgezet, zodat het verloop van het proces aan het chromatogram goed te zien is. Er ontstaat eerst een extractiegebied (a). De achterzijde hiervan beweegt zich met dezelfde snelheid als het front. Uit het extractiegebied wordt voortdurend *atropine* afgegeven aan het papier, totdat het gehele gebied „geconsumeerd” is.

In dit stadium is een langgerekte vlek ontstaan, die zich tot aan de basis uitstrekt. Het *atropine* is dus aan het papier gebonden en wordt door hexaan uit deze binding niet meer geëluëerd, m.a.w. de binding geschiedt *irreversibel*.

De binding van het *atropine* berust zeer waarschijnlijk op *adsorptie* aan het oppervlak van de uitgedroogde cellulose. Zij kan niet op *ionenuitwisseling* berusten, daar het *atropine* in het hexaan niet ioniseert. Er is echter nog een andere mogelijkheid, nl. *inclusie*. In dit geval zou de oplossing van *atropine* in hexaan de droge cellulose zwak moeten imbiberen. Het is echter niet waarschijnlijk, dat dit door zulke grote moleculen als die van *atropine* zal kunnen geschieden.

Het boven beschreven experiment werd herhaald met papier, dat 24 uur boven een verzadigde NaBr-oplossing in water (r.d. = 60%) was geaccommodeerd. Het chromatogram is afgebeeld in *fig. 18 B*. Ook hier blijkt het *atropine* *irreversibel* aan het papier te worden gebonden. Dit is eveneens te constateren aan het feit, dat de lengte van de vlekken niet meer toeneemt bij verdere elutie, nadat het extractiegebied volledig is geconsumeerd.

Bij deze proef treedt tevens een restvlek op. De oorzaak hiervan werd niet nader onderzocht. Daar het *atropine* in chloroform was

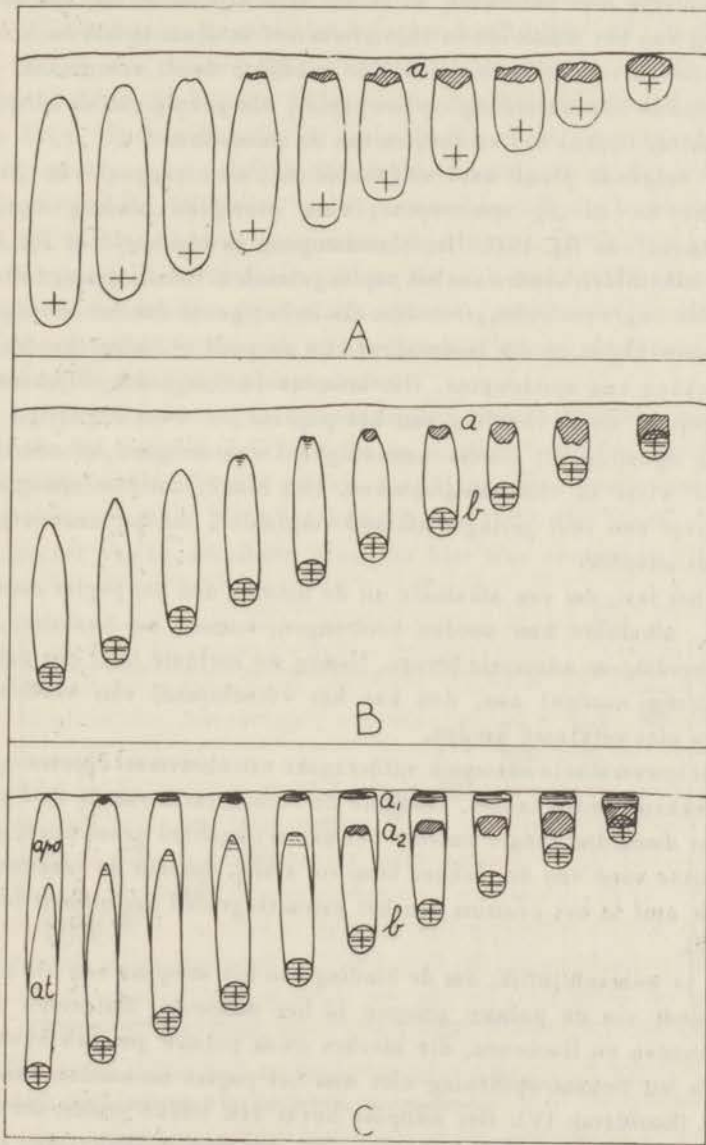


Fig. 18. A en B chromatogrammen van 20 μg atropine, geëluëerd met hexaan. A uitgedroogd papier, B papier geaccommodeerd bij r.d. = 60%. a = extractiegebied, b = restvlek. C mengsel van 20 μg atropine (at) en 12 μg apoatropine (apo) op papier geaccommodeerd bij r.d. = 60% en geëluëerd met hexaan. a_1 en a_2 zijn de extractiegebieden van apoatropine resp. atropine. b = restvlek.

opgelost bij het opzetten van de vlekken en daar chloroform zelf de de cellulose niet imbibeert, wijst het verschijnsel er op, dat de oplossing van het alkaloïde in chloroform *wel* in staat is het luchtdroge papier zwak te imbiberen, of dat de imbibitie wordt veroorzaakt door condensatie van waterdamp op het papier, als gevolg van de temperatuursdaling tijdens het verdampen van de chloroform.

Een volgende proef werd uitgevoerd met een mengsel van 20 μg atropine en 12 μg apoatropine, maar overigens analoog aan het experiment van fig. 18B. Het chromatogram is afgebeeld in fig. 18C. Beide alkaloïden worden aan het papier gebonden. Het atropine geeft vlekken, die ongeveer even groot zijn als in het geval dat het apoatropine niet aanwezig is en die intensiever zijn en goed te onderscheiden van de vlekken van apoatropine. Het atropine *verdringt* dus blijkbaar het apoatropine uit de binding aan het papier. Dit werd bevestigd door 12 μg apoatropine, zonder aanwezigheid van atropine, op overigens gelijke wijze te chromatographeren. Het bleek, dat het apoatropine zich over een veel geringer afstand verplaatst, dan bij aanwezigheid van het atropine.

Uit het feit, dat een alkaloïde uit de binding aan het papier door een ander alkaloïde kan worden verdrongen, kunnen we besluiten, dat deze binding op adsorptie berust. Namen we inclusie (d.i. een passief ingesloten worden) aan, dan kan het verschijnsel van verdringing immers niet verklaard worden.

Deze irreversibele adsorptie veroorzaakt een abnormaal chromatogram. De vlekken worden langer, naarmate de concentratie van de stof groter is; het duurt dan langer voordat het extractiegebied geconsumeerd is. De spitse vorm van de vlekken komt tot stand, doordat de concentratie van de stof in het centrum van het extractiegebied het grootst is (zie fig. 18).

Het is waarschijnlijk, dat de binding van het atropine aan het papier geschiedt via de polaire groepen in het molecuul. Moleculen zoals azobenzeen en fluorenon, die slechts zwak polaire groepen bevatten, bleken uit hexaan-oplossing niet aan het papier te worden geadsorbeerd (hoofdstuk IV). Het atropine bevat een sterke proton-acceptorgroep in de amine-stikstof en bovendien een proton-donor-groep in het alcoholische hydroxyl. Deze groepen kunnen waterstofbruggen vormen bv. met de hydroxylgroepen van de cellulose. Vooral de proton-donor-groep blijkt een rol te spelen, daar het apoatropine, dat deze groep mist, door het atropine uit de geadsorbeerde toestand wordt verdrongen.

Het is dus te verwachten, dat het alkaloid door sterk polaire solventia, zoals water, eveneens uit de geadsorbeerde toestand zal worden verdrongen. Waterhoudend papier kan echter de alkaloiden sterk adsorberen, zoals blijkt uit de chromatogrammen van fig. 18 B en C. De adsorptie is hier zelfs sterker dan bij uitgedroogd papier, zoals blijkt uit het feit dat de intensiteit van de atropine-vlekken van fig. 18 B groter is dan van de vlekken van fig. 18 A. Het water in het papier van fig. 18 B en C is echter voornamelijk als hydraat-water gebonden (het papier was geaccommodeerd bij r.d. 60%). Een eventuele verdringing door dit water zal aan de vorm van het chromatogram niet geconstateerd kunnen worden, omdat de gehydrateerde cellulose zelf als een vast adsorbens is te beschouwen, m.a.w. de adsorptie kan ook aan het hydraatwater plaats vinden.

Verdringing zal dus pas geconstateerd kunnen worden, wanneer imbibitie-water aanwezig is. Om dit na te gaan, werd het experiment van fig. 18 B herhaald met papier, dat 24 uur was geaccommodeerd boven een verzadigde NaCl oplossing (r.d. = 75%). Het bleek, dat het verschijnsel van irreversibele adsorptie hier was verdwenen (fig. 19).

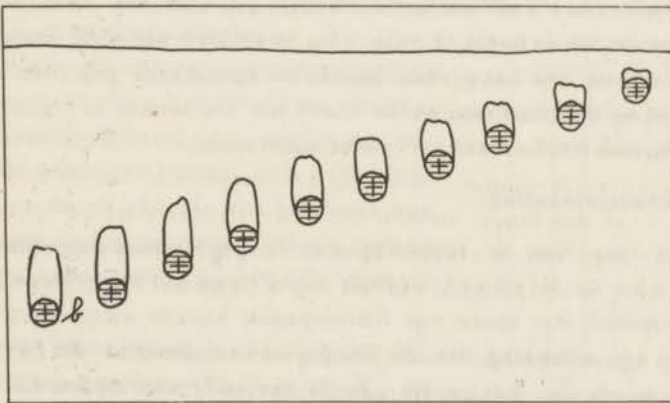


Fig. 19. Chromatogrammen van 20 μg atropine, geelueerd met hexaan op papier geaccommodeerd bij r.d. = 75%. b = restvlek.

Aan het chromatogram is te zien, dat de verplaatsing van het atropine regelmatig toeneemt met de afstand, die het front heeft afgelegd. In dit geval zal dus de verdeling van het atropine tussen imbibitie-water en hexaan een rol gaan spelen.

De overgang van adsorptie naar verdeling bij toenemend watergehalte van het papier, is beter te constateren bij stoffen, die in water niet ioniseren. Er zijn dan immers geen complicaties te verwachten, veroorzaakt doordat de verdelingscoëfficiënt van de concentratie afhangt, of door ionenuitwisseling (zie § 3). Deze factoren veroorzaken ook bij verdelingschromatographie abnormale chromatogrammen evenals adsorptie dit doet en hierdoor is het onderscheid tussen adsorptie en verdeling in dergelijke gevallen weinig spectaculair.

Geschikte stoffen bleken *pyramidon* en *antipyrine* te zijn. Dit zijn zeer zwakke basen, die in water nauwelijks ioniseren. Ze kunnen evenals atropine met jodiumdamp zichtbaar gemaakt worden. Bij elutie met hexaan op papier, dat bij r.d. = 60% werd geaccommodeerd, worden beide stoffen geadsorbeerd. Er ontstaan zeer gerekte vlekken en de verplaatsing is sterk afhankelijk van de concentratie. Het antipyrine blijkt het pyramidon uit de geadsorbeerde toestand te verdringen. Wordt het papier echter 4 uur in waterdamp geaccommodeerd en dan met hexaan geëluëerd, dan is de verplaatsing onafhankelijk van de concentratie. De R_f van pyramidon is 0,29, die van antipyrine 0,01 – 0,02, zowel voor de zuivere stoffen als voor mengsels van beide. De vlekken van pyramidon hebben echter nog een zeer zwakke staart, die bijna tot aan de basis te volgen is. Misschien wordt dit veroorzaakt door adsorptie van het pyramidon aan de kristallijne gebieden van de cellulose op die plaatsen, welke direct met het hexaan in contact zijn. Dit vraagstuk werd echter niet nader onderzocht.

§ 3. Ionenuitwisseling.

Reeds lang voor de invoering van de papierchromatographie was door Rona en Michaelis (1920; cf. Freundlich, 1930, pag. 309) geconstateerd, dat ionen van filtreerpapier kunnen uitwisselen tegen ionen in een oplossing, die met het papier in contact is. *Methyleenblauw* wordt door het papier „geadsorbeerd”, waarbij het Cl^- in de oplossing blijft en geneutraliseerd wordt door Ca^{++} uit het papier. De „adsorptie” is hoger bij papier met hoog asgehalte, dan bij asvrij papier. Het zouden dus de asbestanddelen zijn, met name *Ca-silicaat*, die in uitwisselende „adsorptie” met de kleurstoffen in wisselwerking treden.

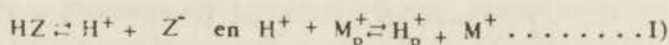
Niet alleen de silicaten van het papier, maar voornamelijk de *carboxylgroepen*, die door oxydatie van de cellulose bij de fabricage van het papier en haar grondstoffen ontstaan (zie hoofdstuk III), zijn de

oorzaak van het vermogen tot ionenuitwisseling (Hermans 1949, pag. 82 e.v.).

Het optreden van ionenuitwisseling bij papierchromatographie werd onderzocht met behulp van *zuren* en *alkaloiden*. Voor de experimenten werd, tenzij anders is aangegeven, Whatman papier no 1 gebruikt. De chromatographie geschiedde zonder accommodatie van het papier en volgens de opstijgende methode.

Zuren.

Als zuur werd voornamelijk *salicylzuur* gebruikt, daar zowel het waterstofion als het anion hiervan eenvoudig op het papier zijn aan te tonen. Wordt het zuur (HZ) met water geëluëerd, dan kunnen de volgende reacties optreden:



Hier stelt M_p^+ het metaalion voor, dat aan het papier gebonden is en H_p^+ het H^+ , dat voor deze ionen in de plaats is gekomen. Het H^+ en het H_p^+ kunnen op het papier worden aangetoond door besproeien met een geneutraliseerde methylrood-oplossing in verdunde alcohol. Het salicylaation (Z^-) kan worden zichtbaar gemaakt met een oplossing van FeCl_3 in verdunde alcohol.

In *fig. 20* zijn chromatogrammen weergegeven van 20 μg en 40 μg salicylzuur, opgezet uit methanol-oplossing en geëluëerd met water. De basisvlek bevond zich 2 cm boven de bron en de stijghoogte van het front was 9 cm vanaf de basis. Het H^+ bleek zich te bevinden in het gebied a, het salicylaat in het gebied b.

Uit het chromatogram blijkt, dat het H^+ van het zuur uitgewisseld is tegen M_p^+ en dat het vrijwel irreversibel aan het papier wordt gebonden. De combinatie van de vrijgekomen kationen en het salicylaation ($\text{M}^+ + \text{Z}^-$), het zout van het zuur dus, wordt afzonderlijk gechromatographeerd en geeft de *zoutvlek* b, die geheel gescheiden kan worden van de *zuurvlek* a.

De lengte van de zuurvlek hangt af van de hoeveelheid M_p^+ en van het aantal aequivalenten zuur, dat is gechromatographeerd. In het geval

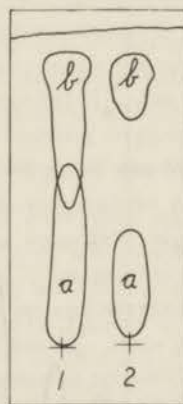


Fig. 20. Chromatogrammen van salicylzuur, geëluëerd met water. 1 = 40 μg , 2 = 20 μg , a = zuurvlek, b = zoutvlek, + = plaats der basisvlekken.

van chromatogram no 2 (fig.20) werden $20 \mu\text{g}$ of $0,145 \mu\text{aeq.}$ salicylzuur gebruikt. De oppervlakte van de zuurvlek die hierbij ontstaat, bleek $2,65 \text{ cm}^2$ te zijn, zodat het gebruikte Whatman papier $0,55 \text{ m aeq/m}^2$ uitwisselbaar ion bevat, indien tenminste de zuurvlek alle H^+ afkomstig uit het salicylzuur bevat en geen M_p^+ , dat nog niet is uitgewisseld.

Dit behoeft echter niet het geval te zijn, zoals uit het chromatogram van fig.21 blijkt. Hier zijn salicylzuur, sulfosalicylzuur en benzoëzuur

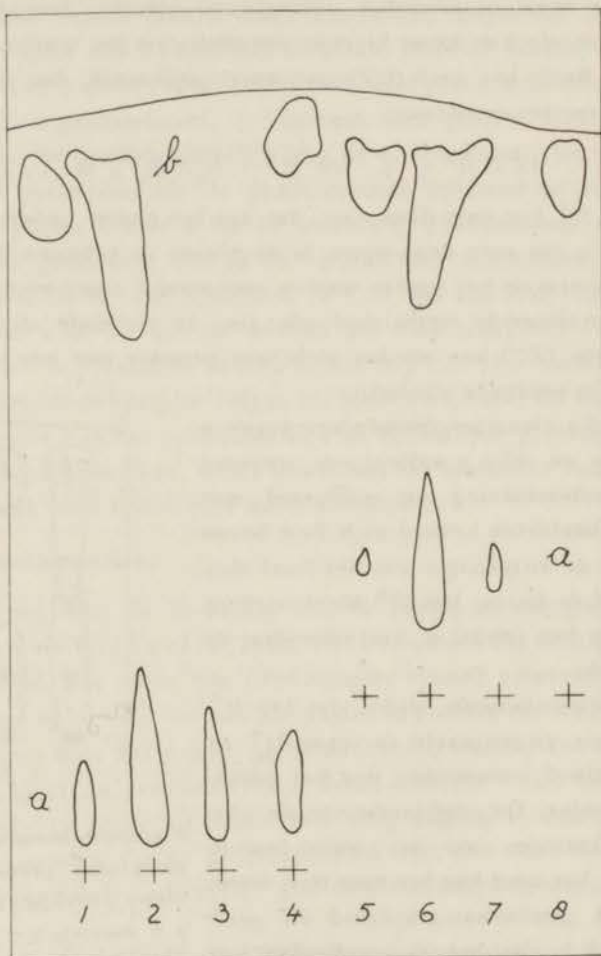


Fig. 21. Chromatogrammen van salicylzuur (no 1 en 5 = $30 \mu\text{g}$, no 2 en 6 = $60 \mu\text{g}$), benzoëzuur (no 3 en 7 = $30 \mu\text{g}$) en sulfosalicylzuur (no 4 en 8 = $30 \mu\text{g}$), gebluëerd met water. + = plaats der basisvlekken.

in de aangegeven hoeveelheden opgezet op 2 cm en 7 cm boven de bron. Bovendien is geëluëerd over een grotere afstand (24 cm vanaf de bron). We zien dat de zuurvlekken kleiner worden en dat de achterzijde van de zuurvlekken verder verwijderd is van de basis, naarmate de elutieafstand en de afstand basis-bron groter zijn.

Ter verklaring hiervan werd verondersteld, dat het water uit het papier kationen vrijmaakt, die de uitwisselingsreactie I) terugdringen. De concentratie van deze ionen zal het grootst zijn dicht achter het front en voortdurend toenemen, naarmate dit een grotere afstand heeft afgelegd. Bevindt de basisvlek zich op grote afstand van de bron, dan zal het water dat passeert, een aanmerkelijke hoeveelheid electrolyt bevatten, dat de uitwisseling verstoort.

De invloed van electrolyt op de uitwisseling werd daarom nader bestudeerd door salicylzuur te elueren met verschillende zoutoplossingen. Elutie met 0,1 molair NaCl, KCl en $MgSO_4$ gaf het zelfde resultaat als elutie met zuiver water. Werde echter geëluëerd met Mg- en Ca-acetaat-oplossing, dan bleek de zuurvlek vrijwel rond te zijn en zich te bevinden kort achter het front, zelfs iets dichterbij dan de zoutvlek.

We mogen hieruit besluiten, dat de betreffende groepen in het papier een grote affiniteit tot H^+ hebben. Wanneer H_p^+ met $MgSO_4$ -oplossing in contact is, kan het in principe tegen Mg^{++} uitwisselen. Er komt dan echter H^+ in de oplossing en hierdoor komt de reactie spoedig tot stilstand. Bevindt zich echter Mg-acetaat tegenover het H_p^+ , dan wordt het vrijkomende H^+ door de grote overmaat acetaat-ion weggenomen en kan de reactie veel verder voortschrijden dan in het geval van $MgSO_4$.

Het kation dat uit het papier door water wordt vrijgemaakt en dat het effect van fig. 21 zou veroorzaken, moet dus vergezeld zijn door anionen van een zwak zuur of eventueel door OH^- . Dit zal het geval zijn, wanneer de elutie van het electrolyt berust op een uitwisseling met het H^+ van het water, een hydrolyse dus van het M_p^+ . Deze hydrolyse van het M_p^+ wordt door Hirsch (1952) aangenomen ter verklaring van verschijnselen, die optreden bij de titratie van oxycellulose. Het verschijnsel kan verklaard worden door een Donnan-evenwicht aan te nemen tussen binnen- en buiten-phase van de cellulose. Door de hydrolyse gaan ionen van het papier in het water, terwijl OH^- als tegenionen fungeren. Ook carbonaat- of bicarbonaat-ionen kunnen tegenionen zijn bij aanwezigheid van koolzuur in het water.

Deze hydrolyse zal afnemen naarmate meer M_p^+ door H_p^+ is vervangen. Wordt het papier dus eerst met water „capillair” gewassen (hieronder

verstaan we elutie van papier met water volgens de afdalende methode, tot het water geruimen tijd van de onderzijde is afgedruppeld, waarna het papier bij kamertemperatuur wordt gedroogd), dan zal het effect van de hydrolyse belangrijk moeten afnemen. Tevens neemt dan ook de hoeveelheid M_p^+ af, daar een gedeelte door H_p^+ wordt vervangen (het papier wordt zuur).

Dit kon worden geverifiëerd door het experiment van fig. 21 te herhalen met capillair gewassen papier. De oppervlakten van de zuurvlekken en de hieruit berekende waarden van M_p^+ zijn in de onderstaande tabel weergegeven.

afstand basis bron cm	zuur	hoeveel- heid μg	aeq. gew.	opp.zuurvlek cm ²	M_p^+ m aeq/m ²
2	salicylzuur	30	138	5,8	0,37
2	salicylzuur	60	138	11,2	0,39
2	sulfosalicylz.	30	127	6,5	0,38
2	benzoëzuur	30	122	6,0	0,39
7	salicylzuur	30		5,4	

Het effect van grote afstand basis-bron is sterk verminderd maar nog niet geheel opgeheven; ook uit het gewassen papier wordt door water nog electrolyt vrijgemaakt. De waarde van M_p^+ is belangrijk kleiner dan die berekend uit het chromatogram van fig. 20. Bovendien blijkt deze waarde voor zuren van uiteenlopende sterkte gelijk te zijn. Het is dus waarschijnlijk dat de oppervlakte van de zuurvlekken een juiste maat is voor de hoeveelheid uitwisselbaar metaalion.

De waarde $M_p^+ = 0,55$ m aeq/m², die uit het chromatogram van fig. 20 is berekend, zal de werkelijke waarde goed benaderen, daar de stijghoogte van het front hier slechts gering was en daar de basisvlek zich dicht bij de bron bevond. Op de beschreven wijze kan dus de hoeveelheid M_p^+ van het papier worden bepaald. Deze waarde hoeft natuurlijk niet overeen te komen met de totale uitwisselingscapaciteit, omdat het papier voor een gedeelte met H^+ bezet kan zijn. Bij het gebruikte Whatman papier was waarschijnlijk geen H_p^+ aanwezig, daar dit papier neutraal reageerde op een met ammonia geneutraliseerde methylroodoplossing. Voor papier, dat gedeeltelijk met H^+ is bezet, kan men de uitwisselingscapaciteit op genoemde wijze bepalen, door vooraf het H_p^+ door M_p^+ te vervangen. Dit laatste kan geschieden door het papier te behandelen met NH_3 .

Het leek interessant na te gaan hoe groot de hoeveelheid M_p^+ is bij andere papiersoorten. Hiertoe werden $40 \mu\text{g}$ salicylzuur uit methanol op verschillende papiersoorten gezet, waarna geëluëerd werd met water over 10 cm. De verkregen chromatogrammen zijn weergegeven in fig. 22.

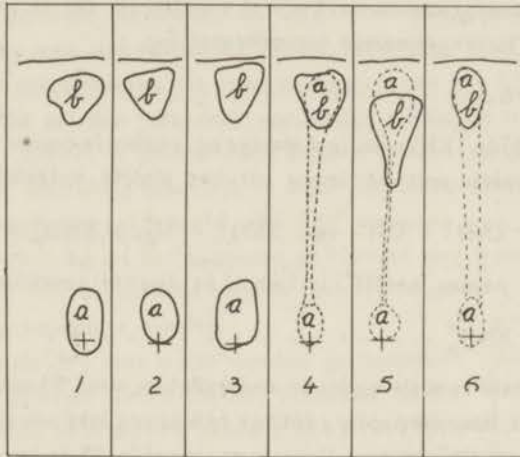


Fig. 22. Chromatogrammen van $40 \mu\text{g}$ salicylzuur, geëluëerd met water, op verschillende papiersoorten. 1 = Schleicher en Schüll 1101 L. 2, 3 en 4 = Machery Nagel (MN) resp. 610, 613 en 613n. 5 en 6 = Schut resp. V 215 en TVN. + = plaats der basisvlekken.

De zuurvlek is in alle gevallen veel kleiner dan bij gebruik van Whatman papier no 1. De hoeveelheid M_p^+ is dus naar verhouding groter. Bovendien valt het op, dat bij de papiersoorten TVN, V 215 en MN 613n*) de zuurvlekken gedeeltelijk „mobiel” zijn; slechts een gedeelte bevindt zich aan de basis. Dit deel is niet scherp begrensd en door een vage corridor verbonden met een zuur gebied, dat zich dicht bij het front bevindt.

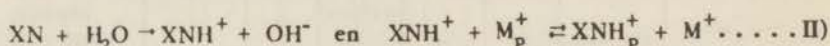
Uit het onderzoek van de as van de gebruikte papiersoorten bleek, dat juist TVN, V 215 en MN 613n veel grotere hoeveelheden *phosphaat* bevatten dan de andere soorten. Als mogelijke verklaring van het „mobiel worden” van de zuurvlek werd daarom gedacht aan een uitwisseling van H^+ met b.v. Ca-phosphaat. Hierbij ontstaat oplosbaar fosphaat (primair fosphaat of phosphorzuur). Bij deze uitwisseling wordt dus het anion mobiel in tegenstelling tot de uitwisseling met M_p^+ gebonden aan carboxylgroepen en silicaat.

Het storende fosphaat zal worden verwijderd door het papier capillair te wassen met N HCl. Bij de betreffende soorten werd dit gedaan,

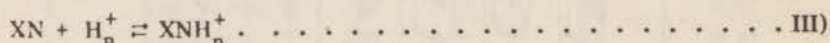
lair te wassen met NHCl . Bij de betreffende soorten werd dit gedaan, waarna het papier werd gedrenkt in Na -acetaat-oplossing, gedroogd en capillair met water gewassen. Het papier is nu dus voor een belangrijk deel met Na^+ bezet. Bij elutie van salicylzuur op dit papier met water bleken goed gevormde kleine zuurvlekjes te ontstaan, analoog aan die van de chromatogrammen no 1 t/m 3 van fig. 22. Dit is in overeenstemming met de bovengenoemde veronderstelling.

Alkaloïden.

Een alkaloïde (XN), dat in waterige oplossing in contact is met papier, kan uitwisselen met de ionen uit het papier volgens de reacties:



Wanneer het papier met H^+ is bezet, is directe zoutvorming mogelijk:



Om de laatste reactie nader te onderzoeken, werd Whatman papier no 1 met H^+ bezet, door dit papier capillair te wassen met zoutzuur en vervolgens met water (H^+ -papier). Vervolgens werden $20 \mu\text{g}$ en $40 \mu\text{g}$ atropine op dit papier geëluëerd met water over een elutieafstand van 10 cm. Het alkaloïde werd zichtbaar gemaakt met jodiumdamp en bleek zich te bevinden in een klein gebied, dat zich bijna vanaf de oorspronkelijke basisvlek uitstrekt (fig. 23). Het blijkt dus vrijwel irreversibel aan het papier te worden gebonden. De oppervlakte van de atropinevlek van $40 \mu\text{g}$ bleek $2,80 \text{ cm}^2$ te zijn, waaruit kan worden berekend dat $0,50 \text{ m.aeq.}$ atropine per m^2 papier wordt gebonden. Het papier bevat dus tenminste $0,50 \text{ m.aeq./m}^2 \text{ H}_p^+$. De juiste waarde zal iets groter zijn, daar tengevolge van hydrolyse niet al het H_p^+ door XNH_p^+ zal zijn vervangen. Dat deze hydrolyse optreedt, is te zien aan het feit, dat de atropinevlek iets t.o.v. de oorspronkelijke basisvlek is verschoven en wel het meest bij de kleine atropineconcentratie. Deze waarde stemt dus overeen met de uit de zuurvlek van salicylzuur berekende waarde.

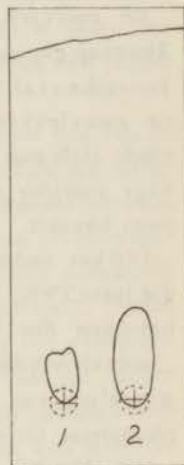


Fig. 23. Atropine (1 = $20 \mu\text{g}$, 2 = $40 \mu\text{g}$) geëluëerd met water op H^+ papier (Whatman no 1). ---- = omtrek van de basisvlekken.

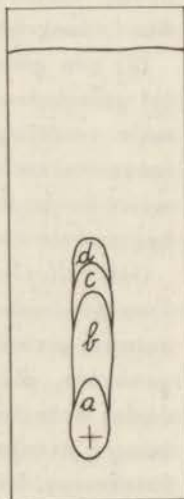
Terwijl het alkaloid in de toestand XNH_p^+ nauwelijks door zuiver water wordt geëluëerd, zal dit wel het geval zijn, wanneer het water electrolyt bevat, daar nu de uitwisselingsreactie volgens II) in tegengestelde zin kan verlopen. Dit werd experimenteel nagegaan door atropine op H^+ -papier te elueren met 0,2 molair KCl oplossing. Er ontstond nu een normaal chromatogram. Blijkbaar wordt door de overmaat K^+ de binding van het alkaloid in de vorm van XNH_p^+ verhinderd. We kunnen dit ook opvatten als een verdringing van het XNH^+ door K^+ .

Het alkaloid zal dus ook door een ander alkaloid uit de binding aan het papier geheel of gedeeltelijk kunnen worden verdrongen, zodat op deze wijze scheiding mogelijk is door ionenuitwisseling. In fig. 24 is een chromatogram afgebeeld van een mengsel van *scopolamine*, *atropine*, *apootropine* en *belladonnine* geëluëerd met water op Whatman H^+ -papier. De vier alkaloiden blijken (geheel of gedeeltelijk) gescheiden te worden.

Wanneer alkaloiden met water worden gechromatografeerd op gewoon filtreerpapier, ontstaan, zoals wij elders reeds beschreven hebben (Schute, 1951) abnormale chromatogrammen. Het chromatographisch beeld kan belangrijk verschillen bij verschillende papiersoorten. In vele gevallen kunnen met water scheidingen verkregen worden.

Het is in verband met het voorafgaande duidelijk, dat deze abnormale chromatogrammen door ionenuitwisseling zullen worden veroorzaakt. Wanneer het gebruikte papier geheel met metaal-ionen is bezet,

Fig. 24. Mengsel van *scopolamine* (d), *atropine* (c), *apootropine* (b) en *belladonnine* (a) geëluëerd met water op H^+ -papier (Whatman no 1), + = basisvlek.



zal de uitwisseling verlopen volgens reactie II). De mate, waarin deze reactie voortschrijdt, hangt af van de affiniteit van XNH^+ en M^+ tot het papier en van de electrolyt-concentratie in het water. Dit probleem zal hier niet nader geanalyseerd worden.

§ 4. Conclusies.

Uit het voorgaande blijkt, dat bij papierchromatographie onder bepaalde omstandigheden adsorptie kan optreden. Deze adsorptie is van polaire aard. De neiging tot adsorptie neemt toe, naarmate het polaire

karakter van de opgeloste stof groter en dat van het solvens kleiner is. Het is waarschijnlijk, dat de meeste stoffen uit waterige oplossing niet aan de cellulose worden geadsorbeerd. Het water is immers sterk polair en zal de stof uit de geadsorbeerde toestand verdringen. Hier komt nog bij, dat water de cellulose imbibeert en dus een belangrijk deel van het oppervlak omzet in een volumen-phase.

Uit de experimenten van hoofdstuk V (§ 3) kan worden geconcludeerd, dat *suikers* uit waterige oplossing niet aan cellulose worden geadsorbeerd. Evenmin is dit het geval voor *atropine*, *antipyrine* en *pyramidon* (§ 2). Dat dit ook voor verschillende andere alkaloiden geldt blijkt uit een publicatie van Munier en Macheboeuf (1950,a). Deze onderzoekers toonden aan, dat *morphine*, *codéïne* en *thebaine* normale vlekken geven bij elutie met propanol, indien de propanol 20 tot 70% water bevat. Wanneer het watergehalte van de propanol groter of kleiner is dan is aangegeven, ontstaan gerekte vlekken.

Bij een gering watergehalte zullen de alkaloiden dus geadsorbeerd (of geïncludeerd) worden; neemt het watergehalte toe, dan treedt normale verdeling op, terwijl bij een groot watergehalte blijkbaar de ionenuitwisseling een rol gaat spelen. In propanol met minder dan 70% water is de ionisatie van de alkaloiden dus zo gering, dat hierdoor het normale chromatogram niet wordt verstoord.

Ook *salicylzuur* en *sulfosalicylzuur* worden uit water niet aan cellulose geadsorbeerd. Uit fig. 21 blijkt, dat de anionen van deze zuren normaal gechromatographeerd worden. Het H^+ wordt *wel* aan het papier gebonden, nl. door uitwisseling. Dit is geen adsorptie te noemen, omdat deze binding geen specifieke oppervlakte-binding is. Zij kan immers evengoed plaatsvinden aan de carboxylgroepen van de celluloseketens, die in het imbibitie-water gedispergeerd zijn. De „adsorptie” van carbonzuren aan filterpapier, die Lugg en Overell (1948) meenden te constateren (zie hoofdstuk I), is dus naar alle waarschijnlijkheid een uitwisseling van het H^+ geweest tegen M_p^+ , waardoor natuurlijk de P_H van de oplossing van het zuur stijgt, maar waarbij het anion van het zuur in de oplossing blijft.

De abnormale chromatogrammen, die bij elutie van carbonzuren en alkaloiden met neutrale solventia ontstaan, zullen dus door ionisatie en niet door adsorptie veroorzaakt worden, indien het watergehalte van de stationnaire phase niet te laag is. Het is duidelijk, dat de ionenuitwisseling een rol zal spelen, wanneer de stoffen in de stationnaire phase ioniseren. Het beeld, dat het chromatogram vertoont, zal

in dit geval afhankelijk zijn van de wijze, waarop men de stoffen zichtbaar maakt.

Volgens Lugg en Overell (1948) ontstaan bij elutie van *appelzuur*, *wijnsteenzuur*, *citroenzuur* e.a. met butanol als solvens (verzadigd met water) lange staartvlekken. Deze vlekken werden zichtbaar gemaakt door besproeien met een indicator en geven dus de plaats aan, waar het H^+ zich bevindt.

Worden echter *glutaminezuur* en *asparaginezuur* met een neutraal solvens geëluëerd, dan kunnen normale vlekken ontstaan. Deze stoffen worden als regel aangetoond met ninhydrine en dit reagens maakt alleen de plaats van het *anion* van het zuur zichtbaar. Indien uitwisseling plaatsvindt, wordt het anion geneutraliseerd door ionen uit het papier en het gevormde zout kan een normale vlek geven (vergelijk salicylzuur en sulfosalicylzuur, fig. 21). Wanneer de abnormale vlekken alleen veroorzaakt zouden worden door concentratie-afhankelijkheid van de verdelingscoëfficiënt, zou het gedrag van de zure aminozuren lastig te verklaren zijn.

Ook met water als solvens geven glutaminezuur en asparaginezuur normale vlekken (aangetoond met ninhydrine), zoals blijkt uit een onderzoek van Burma en Banerjee (1951). De basische aminozuren *arginine* en *lysine* geven echter lange strepen. Dit is begrijpelijk, daar bij de basische aminozuren door ninhydrine het *kation* wordt aangetoond.

Een ander probleem, dat begrijpelijk wordt indien men aanneemt dat de abnormale vlekken van carbonzuren door ionenuitwisseling ontstaan, is het volgende: Het optreden van staartvlekken bij elutie van *wijnsteenzuur* en *citroenzuur* ($p_K = \pm 3,0$), kan reeds voorkomen worden door aan het solvens *azijnzuur* ($p_K = 4,8$) toe te voegen (Lugg en Overell, 1947). Het is niet waarschijnlijk, dat dit alleen op een terugdringen van de ionisatie van de geëluëerde zuren berust, daar deze zuren veel sterker zijn dan het azijnzuur. Het azijnzuur kan echter wel M_p^+ vervangen door H_p^+ . Dit kan overal geschieden waar het azijnzuur met het papier in contact is, m.a.w. reeds op plaatsen van het papier, waar de zuurvlekken nog niet gepasseerd zijn. De geëluëerde zuren zullen dan bij hun weg over het papier geen M_p^+ , maar alleen H_p^+ ontmoeten, zodat uitwisseling voor deze zuren onmogelijk is.

Het verhinderen van adsorptie en ionenuitwisseling.

In het voorafgaande is gebleken, dat waardevolle scheidingen kunnen

worden verkregen door middel van papierchromatographie, die berust op adsorptie of ionenuitwisseling. Het is echter van belang om het optreden van adsorptie en ionenuitwisseling ook te kunnen verhinderen, omdat zij meestal abnormale chromatogrammen veroorzaken.

Een normaal chromatogram heeft immers het belangrijke voordeel, dat de R_F onafhankelijk is van de concentratie van de stof. De R_F is dus een karakteristieke grootte voor de stof en kan als hulpmiddel voor identificatie worden gebruikt.

Adsorptie kan worden voorkomen, door een solvens te gebruiken dat voldoende polair is. Het is een bekend verschijnsel, dat vaak abnormale vlekken ontstaan wanneer het solvens slechts weinig water bevat (Bentley en Whitehead, 1950; Decker en Riffart, 1950). Door voldoende water aan het solvens toe te voegen, ontstaan normale vlekken. De oorzaak van de genoemde abnormale verschijnselen zou dus adsorptie kunnen zijn, hoewel zij onder bepaalde omstandigheden ook door inclusie of slechte oplosbaarheid in het solvens kunnen worden verklaard.

Ionenuitwisseling kan worden voorkomen door de ionisatie van de opgeloste stof terug te dringen. Bij zuren kan dit, door aan het solvens een sterker zuur toe te voegen. Reeds is opgemerkt, dat de werking hiervan ook kan berusten op een vervanging van M_p^+ door H_p^+ . We kunnen dus ionenuitwisseling bij chromatographie van zuren eveneens verhinderen, door gebruik te maken van papier, dat van te voren reeds met H^+ is bezet (H^+ -papier), in welk geval met een neutraal solvens geëluëerd kan worden.

Om dit laatste te onderzoeken werden salicylzuur en sulfosalicylzuur gechromatographeerd met water op H^+ -papier, gemaakt van Whatman no 1. Er ontstond een normaal chromatogram (fig. 25). De R_F verschilt voor beide zuren belangrijk (0,55 resp. 0,70), zodat scheiding op deze wijze mogelijk is. Uit het experiment mogen we concluderen, dat de scheiding berust op een verschil in de verdelingscoëfficiënten van beide zuren, voor de verdeling tussen de imbibitie-phase en water.

In dit geval zou de oplosbaarheid van beide zuren in het imbibitie-water belangrijk groter moeten zijn dan in gewoon water (voor $\alpha = 1$ zou de R_F ongeveer 0,90 moeten zijn, zie hoofdstuk V, § 3). Analogieën hiervan zijn bekend. Zo werd door Bancroft en Butler (1932) aangetoond, dat de oplosbaarheid van barnsteenzuur in mengsels van water en alcoholen groter is dan met de oplosbaarheid van deze stof

in de componenten van het mengsel overeenkomt. De auteurs verklaren dit door aan te nemen, dat de alcohol het water depolymeriseert en dat de stof in het gedepolymeriseerde water beter oplost dan in normaal water. Ofschoon deze verklaring kunstmatig lijkt, is zij als een werkhypothese toch wel geschikt om bovengenoemde scheiding van salicylzuur en sulfosalicylzuur begrijpelijk te maken. Volgens deze hypothese zou de structuur van het imbibitie-water door de aanwezigheid van de alcoholische hydroxylgroepen (en eventueel carboxylgroepen) van de cellulose zodanig worden gewijzigd, dat de oplosbaarheid van de zuren in dit water groter is dan in normaal water.

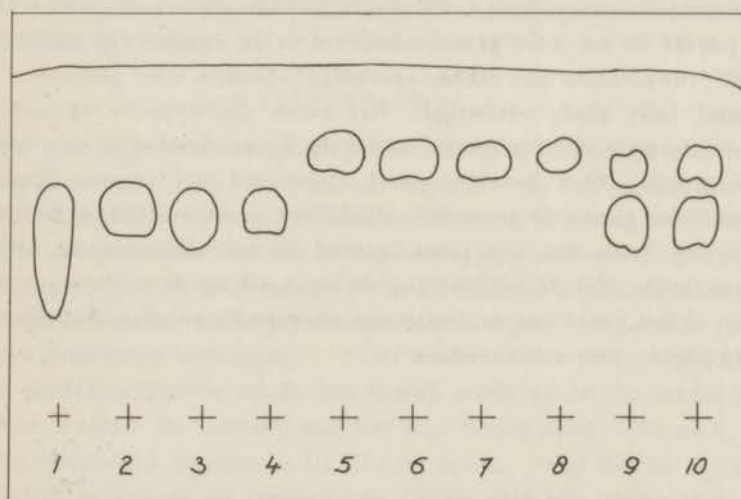


Fig. 25. Elutie met water van salicylzuur (no 1 t/m 4) en sulfosalicylzuur (no 5 t/m 8) in verschillende concentraties op H^+ -papier (Whatman no 1). No 9 en 10 zijn mengsels van beide zuren. + = plaats der basisvlekken.

Deze veronderstelling is echter niet erg bevredigend, zolang we niet inzien, waarom deze gewijzigde structuur de oplosbaarheid van bepaalde verbindingen wel, die van andere verbindingen echter niet verandert. Een nader onderzoek van dit probleem is dus zeer gewenst. Merkwaardig is ook nog het feit, dat de verdelingscoëfficiënt bij het experiment van fig. 25 onafhankelijk van de concentratie blijkt te zijn, ofschoon de zuren in het water gedeeltelijk ioniseren.

Ionenuitwisseling kan bij elutie van alkaloiden worden verhinderd, door de ionisatie van het alkaloid terug te dringen (toevoegen van ammonia bv.) maar ook door de aanwezigheid van een overmaat

willekeurig electrolyt in de stationnaire phase (§ 3). Verschillende alkaloiden, die abnormale vlekken vertonen bij elutie met water, geven een normaal chromatogram wanneer zij met 0,1 NKCl worden gechromatographeerd. Dit effect van electrolyt zal ook aanwezig zijn bij elutie met andere solventia dan water. Door Munier, Macheboeuf en Chevrier (1952) werd aangetoond, dat de abnormale verschijnselen bij chromatographie van alkaloiden met neutrale solventia sterk verminderen, indien het papier wordt geïmpregneerd met KCl.

Volgens onze ervaring kunnen op deze wijze zelfs normale chromatogrammen ontstaan: Chromatogrammen werden gemaakt met Whatman papier no 1, dat gedrenkt was in 0,1 NKCl oplossing en daarna bij kamertemperatuur gedroogd. Alkaloid-vlekken werden opgezet, waarna het papier 20 uur werd geaccommodeerd in de dampen van butanol en water (wederzijds met elkaar verzadigd). Daarna werd geëluëerd met butanol (met water verzadigd). Het bleek dat *atropine* en *cocaïne* hierbij normale vlekken gaven en dat de R_f onafhankelijk was van de concentratie. Werd dezelfde proef uitgevoerd met gewoon Whatman papier, dan gaven de genoemde alkaloiden gerekte vlekken. Ionenuitwisseling heeft dus een grote invloed op het chromatogram, terwijl tevens blijkt, dat de invloed van de ionisatie op de verdelingscoëfficiënt, in het geval van de elutie van *atropine* en *cocaïne* op geïmpregneerd papier, niet waarneembaar is.

SAMENVATTING EN SLOTBESCHOUWING

De papierchromatographie werd door Consden, Gordon en Martin (1944) geïntroduceerd als een vorm van verdelingschromatographie, waarbij de geëluëerde stof wordt verdeeld tussen een stationaire fase (S) bestaande uit water en een mobiele fase (L) bestaande uit een solvens, dat niet mengbaar is met water. De verdelingstheorie van Martin en Syngé (1941) geeft voor een dergelijk systeem het verband tussen de R_F van een stof op het papierchromatogram en de verdelingscoëfficiënt (α) volgens

$$R_F = 1/(1 + \alpha A_S/A_L) \dots \dots \dots 1)$$

Hierin stelt A_S/A_L de verhouding voor van de oppervlakten van dwarsdoorsneden van S resp. L op eenzelfde plaats van het papier. De verdelingstheorie geldt slechts indien α onafhankelijk van de concentratie is. Zij is echter niet uitsluitend van toepassing op een verdelingssysteem, maar geldt ook voor adsorptie van de stof aan S mits de adsorptie-isotherm lineair is. In dit geval worden α en A_S/A_L uit formule 1) door andere constanten vervangen.

De verdelingstheorie en de toepassing ervan op de papierchromatographie werden in verband met het hier beschreven onderzoek, uitvoerig besproken (hoofdstuk II). Uit de theorie volgt dat de R_F onafhankelijk is van de concentratie en dat de vlek van een stof op het chromatogram min of meer rond is (normaal chromatogram).

Consden, Gordon en Martin konden hun opvatting over het mechanisme van de papierchromatographie experimenteel verifiëren door de α 's van een aantal aminozuren uit de R_F -waarden van het chromatogram volgens 1) te berekenen en te vergelijken met de direct bepaalde α 's.

Uit later onderzoek bleek echter, dat voor bepaalde aminozuren de uit 1) berekende α groter is dan de direct bepaalde. Tevens bleek, dat bij elutie met solventia die onbeperkt mengbaar zijn met water en zelfs met zuiver water normale chromatogrammen kunnen ontstaan en scheidingen kunnen worden verkregen. Hieruit werd door verschillende onderzoekers geconcludeerd, dat ook adsorptie bij de papierchromatographie een rol speelt.

Deze conclusie is echter niet noodzakelijk, omdat de genoemde verschijnselen ook kunnen worden verklaard door verdelingschromatographie, indien tenminste aan dit begrip een ruimere dan de oorspronkelijke betekenis wordt toegekend.

Bij het hier beschreven onderzoek werd verdelingschromatographie gedefinieerd als een chromatographisch proces, waarbij de stationnaire phase een volumen-phase is, in tegenstelling tot adsorptiechromatographie, waar de stationnaire phase een oppervlak is. Volgens deze definitie is een directe binding van de opgeloste stof aan de cellulose van het papier niet noodzakelijk als adsorptie op te vatten. Het water, dat aan het papier wordt gebonden, imbibeert de cellulose (penetreert in de amorphe gebieden van de cellulose) en de geïmbibeerde cellulose kan worden beschouwd als een oplossing van de cellulose in het water en dus als een volumen-phase (imbibitie-phase). Een reversibele overgang van de opgeloste stof in de geïmbibeerde cellulose valt geheel onder het begrip verdeling, ook wanneer de stof direct aan de cellulose-ketens wordt gebonden. Uit deze opvatting volgt tevens, dat de oplosbaarheid van een stof in de geïmbibeerde cellulose kan verschillen van de oplosbaarheid in zuiver water. De α uit I) berekend, kan dus afwijken van de verdelingscoëfficiënt die bepaald is voor de verdeling tussen solvens en water, zonder dat adsorptie in het spel behoeft te zijn.

Hier tegenover staat echter, dat een stof die direct aan de celluloseketens in de imbibitie-phase wordt gebonden, hoogstwaarschijnlijk ook zal worden gebonden aan het oppervlak van de cellulose in de kristallijne gebieden. Dit laatste is als adsorptie op te vatten en dit zal als regel tengevolge hebben dat het chromatogram abnormaal wordt.

Een afwijking van de oplosbaarheid van een stof in de imbibitie-phase van die in zuiver water, kan echter ook toegeschreven worden aan een indirecte invloed van de cellulose op het imbibitie-water. Dit is analoog aan het bekende verschijnsel, dat de oplosbaarheid van een stof in mengsels van water en alcoholen groter kan zijn dan met de oplosbaarheden in de zuivere componenten overeenkomt. De oplosbaarheid van een stof in de imbibitie-phase kan dus ook verschillen van die in water, zonder dat een directe binding van de stof aan de cellulose behoeft te worden aangenomen.

Volgens de gegeven definitie is verdelingschromatographie niet beperkt tot een verdelingssysteem bestaande uit water en een hiermee niet mengbare vloeistof. Het is immers geen noodzakelijke voorwaarde

voor het stationnair blijven van de imbibitie-vloeistof (d.i. de vloeistof die door imbibitie aan de cellulose wordt gebonden), dat het solvens niet met water mengbaar is. Reeds met water als solvens zal een verdelingsstelsel gerealiseerd zijn, indien het imbibitie-water stationnair blijft, wanneer water door de capillairen van het papier stroomt. Hetzelfde zal gelden voor een willekeurig solvens dat de cellulose imbibeert.

Om te kunnen beoordelen in hoeverre de papierchromatographie als een verdelingschromatographie kan functioneren, is het dus noodzakelijk te weten hoe de verschillende vloeistoffen die als solventia worden gebruikt, op de cellulose inwerken. De eigenschappen van cellulose in het algemeen en de inwerking van vloeistoffen op cellulose in het bijzonder, werden daarom uitvoerig besproken (hoofdstuk III).

Cellulose neemt water op door hydraatvorming en imbibitie. De geïmbibeerde cellulose is te vergelijken met een oplossing van cellulose in water. Martin (1950) vergelijkt de geïmbibeerde cellulose met een oplossing van glucose in water. Het is echter niet te beoordelen hoever deze vergelijking kan worden doorgevoerd, omdat de opvattingen over de aard van de amorphe gebieden van de cellulose uiteenlopen. Bovendien moet rekening worden gehouden met de mogelijkheid, dat de aard van de amorphe cellulose belangrijk kan verschillen voor verschillende cellulose-monsters. De eigenschappen van de imbibitie-phase kunnen dus bij verschillende papiersoorten eveneens uiteenlopen, afhankelijk van de grondstof die voor het papier is gebruikt.

Ook andere vloeistoffen dan water kunnen droge cellulose imbiberen, zoals methanol en aethanol. Het imbiberend vermogen neemt af in de volgorde: water > methanol > aethanol. De imbibitie van droge cellulose door aethanol blijkt, in tegenstelling tot de imbibitie door water, een niet geheel reversibel proces te zijn. Bij uitdrogen van cellulose die door aethanol is geïmbibeerd, blijft een deel van de aethanol hardnekkig achter (inclusie).

Vloeistoffen die droge cellulose niet imbiberen, kunnen wel in de amorphe gebieden penetreren, indien deze door water of een ander imbiberend solvens toegankelijk zijn gemaakt. Vloeistoffen die zich in de amorphe gebieden van de cellulose bevinden, kunnen bij uitdrogen worden geïncludeerd. Een vloeistof wordt des te gemakkelijker geïncludeerd, naarmate haar imbiberend vermogen voor cellulose geringer is.

Nadere gegevens over de inwerking van enige vloeistoffen op cellulose werden door experimenteel onderzoek verkregen (hoofdstuk IV).

Hydraatwater-houdend papier bleek in belangrijke mate geïmbibeerd te worden door mierenzuur, azijnzuur, pyridine, methanol endiaethylamine, minder door aethanol en slechts weinig door propanol-1 en aceton. Geen imbibitie kon worden geconstateerd bij aether, chloroform en koolwaterstoffen. Bij uitgedroogd papier kon alleen imbibitie door methanol vastgesteld worden. Bij inwerking van mengsels van vloeistoffen is de samenstelling van de imbibitie-vloeistof verschillend van de samenstelling van de buiten-vloeistof (de vloeistof buiten de amorphe cellulose), die met de imbibitie-vloeistof in evenwicht is. Uit het onderzoek bleek, dat mengsels van een alcohol met water bij contact met papier een imbibitie-vloeistof vormen met groter watergehalte dan dat van de buiten-vloeistof. De samenstelling van beide vloeistoffen verschilt des te meer, naarmate het watergehalte van de buiten-vloeistof kleiner is en de alcohol hoger staat in de homologe reeks. Bovendien bleek dat alcoholen met een gering watergehalte, water aan luchtdroog papier onttrekken. Is het watergehalte echter groot, dan gaat water uit de alcohol in het papier over. Bij een bepaald watergehalte gaat geen water in of uit het papier. Dit gehalte is afhankelijk van de aard van de alcohol.

Wordt luchtdroog papier met een willekeurig solvens geëluëerd, dan zal als regel de samenstelling van het solvens tijdens de elutie veranderen, doordat water van het papier in het solvens overgaat of doordat de componenten waaruit het solvens is samengesteld, in de cellulose penetreren in een verhouding die afwijkt van de samenstelling. Dit effect kan worden verminderd door het papier vooraf in de dampen van het solvens te accommoderen.

Door middel van een serie chromatographische experimenten kon worden aangetoond, dat de imbibitie-phase die door inwerking van het solvens op het papier ontstaat, als stationnaire phase voor verdelingschromatographie kan fungeren (hoofdstuk V). Het is hierbij niet noodzakelijk dat de imbibitie-phase en het solvens met elkaar in evenwicht zijn.

In het geval van elutie van suikers met water, kon het mechanisme worden herleid tot een verdeling tussen twee waterfasen ($\alpha = 1$); chromatographie van glucose, azobenzeen en fluorenon met methanol-water mengsels, kon worden teruggebracht tot een verdeling van de stof tussen twee methanol-fasen van verschillend watergehalte.

De waargenomen verschijnselen leidden tot de opvatting dat het het probleem van de papierchromatographische scheiding in hoofdzaak kan worden herleid tot de volgende vragen:

- a) Hoe is de samenstelling van de imbibitie-vloeistof bij gebruik van een bepaald solvens.
- b) Hoe wordt de stof verdeeld tussen twee vloeistoffen van bekende samenstelling.

De samenstelling van de imbibitie-vloeistof kan experimenteel worden onderzocht. Om een indruk te verkrijgen, zal men vaak kunnen volstaan met de regel, dat de imbibitie-vloeistof rijker zal zijn aan polaire vloeistof dan het solvens, dat er mee in evenwicht is en dat het verschil in samenstelling van beide vloeistoffen groter is, naarmate het solvens minder polair is. Deze regel, die een generalisatie is van hetgeen bij inwerking van alcoholen op papier werd gevonden, dient echter nader te worden geverifieerd.

Een indruk van de verdelingscoëfficiënt van de stof kan men verkrijgen door vergelijking van de oplosbaarheden van de stof in imbibitie-vloeistof en solvens.

Dat de bovenstaande opvatting een richtlijn kan zijn voor het oplossen van een scheidingsprobleem, werd aan een voorbeeld geïllustreerd (scheiding van enige barbitalen). De keuze van het solvens werd in dit geval bepaald door de oplosbaarheden van de stof en door bovengenoemde regel over de samenstelling van de imbibitie-phase.

Het behoeft geen betoog, dat het belangrijk is dat het chromatographisch gedrag van een stof in direct verband kan worden gebracht met de oplosbaarheden van de stof in verschillende solventia. Oplosbaarheden zijn immers experimenteel gemakkelijk te bepalen. Het kan dus van belang geacht worden nader te onderzoeken in hoeverre de hier naar voren gebrachte voorstelling op de papierchromatographie kan worden toegepast. Een complicatie hierbij is, dat de oplosbaarheid van een stof in de imbibitie-vloeistof door de aanwezigheid van de cellulose kan worden beïnvloed. Hierdoor wordt scheiding mogelijk door verdelingschromatographie met water als solvens (hoofdstuk VI § 4). Ook dit dient nader te worden onderzocht om hierin een beter inzicht te verkrijgen.

Bij het experimentele onderzoek kwamen enkele punten van praktisch belang naar voren (hoofdstuk V):

Door accommodatie van het papier kan de R_f belangrijk dalen, hetgeen wordt veroorzaakt door het toenemen van de verhouding A_S/A_L .

Deze toeneming is in bepaalde gevallen zo groot dat aangenomen werd, dat ook het capillair-condensaat dat bij accommodatie kan ontstaan, als een deel van de stationnaire phase fungeert. Opgemerkt werd dat bij geaccommodeerd papier het front vaak sneller stijgt en minder scherp is afgetekend dan bij direct geëluëerd papier. Ook dit kan door aanwezigheid van capillair-condensaat worden verklaard.

Het verschijnsel kan aanleiding geven tot onregelmatige stroming van het solvens, indien de temperatuur in de chromatographische kamer niet gelijkmatig is. Op plaatsen van het papier, waar het capillair-condensaat door stijging van de temperatuur verdampt, verplaatst het front zich langzamer. Het gevolg is, dat de R_f van een stof op twee plaatsen van hetzelfde papier kan verschillen.

Door langdurige accommodatie van het papier naderen de verdelingscoëfficiënten van verschillende stoffen tot elkaar. De scheiding wordt hierdoor ongunstig beïnvloed. Ook dit verschijnsel kan worden verklaard door aan te nemen, dat een capillair-condensaat van dezelfde samenstelling als het solvens, als deel van de stationnaire phase fungeert. Een korte accommodatietijd veroorzaakt echter vaak meer compacte vlekken en dit is dus gunstig voor de scheiding.

Aangetoond werd dat abnormale vlekken kunnen ontstaan zonder dat adsorptie optreedt, indien de imbibitie-phase niet goed ontwikkeld is. Verondersteld werd, dat dit wordt veroorzaakt door inclusie van de stof in de gebieden van de amorphe cellulose.

Adsorptie van enige stoffen aan cellulose kon worden aangetoond (hoofdstuk VI). In deze gevallen ontstonden abnormale vlekken. Door verdringing van een geadsorbeerde stof door een andere, die sterker wordt geadsorbeerd, kunnen scheidingen worden verkregen. Aangetoond werd dat de adsorptie van een opgeloste stof aan het papier van polaire aard is. Zij kan worden verhinderd door te zorgen, dat het solvens voldoende polair is of door de cellulose te imbiberen door een polaire vloeistof. In vele gevallen zal de aanwezigheid van een bepaalde hoeveelheid water in het solvens voldoende zijn om adsorptie te voorkomen en normale vlekken te verkrijgen.

Bij chromatographie van ioniserende stoffen kunnen abnormale vlekken ontstaan door ionenuitwisseling met de kationen van het papier. Dit werd onderzocht door middel van elutie van zuren en alkaloiden met water (hoofdstuk VI).

Bij zuren wordt het H^+ van het zuur uitgewisseld tegen de metaal-ionen (M_p^+) van het papier. Het H^+ wordt hierbij irreversibel gebonden,

terwijl het vrijgekomen M^+ en het anion van het zuur samen een normale zoutvlek geven. De uitwisseling kan worden verhinderd door de ionisatie van het zuur terug te dringen of door het M_p^+ van het papier door H^+ te vervangen. Dit laatste kan reeds vóór de elutie geschieden door het papier met zoutzuur te behandelen.

Bij elutie van alkaloiden met water, kan het kation van het alkaloid uitwisselen tegen M_p^+ , terwijl het vrije alkaloid direct gebonden kan worden aan het H^+ van het papier. Hierdoor ontstaan abnormale vlekken. De vorm hiervan hangt zeer af van de gebruikte papiersoort. Daar het alkaloid uit de gebonden toestand weer door een kation en dus door een ander alkaloid kan worden uitgewisseld, is scheiding van verschillende alkaloiden mogelijk. De ionenuitwisseling bij elutie van alkaloiden kan, behalve door het terugdringen van de ionisatie, worden verhinderd door een overmaat kation (bv. KCl) aan het solvens of aan de stationnaire phase toe te voegen.

De ionenuitwisseling bij elutie van zuren en de binding van alkaloiden aan het H^+ van het papier, kunnen worden gebruikt om de uitwisselingscapaciteit van het papier te bepalen. Hierbij kunnen verschillende complicaties optreden. Het blijkt, dat de uitwisselingscapaciteit van verschillende papiersoorten aanzienlijk uiteenloopt.

INVESTIGATIONS OF THE MECHANISM OF PAPER CHROMATOGRAPHY

SUMMARY

Paper chromatography was introduced by Consden, Gordon and Martin (1944) as a variant of partition chromatography, in which the solute is distributed between a stationary phase (S) consisting of water and a mobile phase (L) consisting of a solvent immiscible with water. The partition theory of Martin and Synge (1941) connects the R_F of a solute on a paper chromatogram with the partition coefficient (α) by the following equation:

$$R_F = 1/(1 + \alpha A_S/A_L) \dots \dots \dots 1)$$

in which A_S/A_L represents the ratio of the areas of cross sections of S and L on the same place of the paper. The partition theory holds only when α is independent of the concentration. The theory is also applicable to adsorption of the solute on S provided that the adsorption isotherm is linear.

The partition theory and its application to paper chromatography were extensively discussed (chapter II). It follows from the theory that the R_F is independent of the concentration of the solute and that the spots on the chromatogram are nearly round. Such a chromatogram will be called here a normal chromatogram.

Consden et al. were able to verify their conception of the mechanism of paper chromatography by comparing the α values of some amino acids calculated from 1) with the partition coefficients which were determined directly.

It has been shown, however, by others, that in some cases the α calculated from 1) was considerably higher than the partition coefficient.

Moreover, it appeared that normal chromatograms occurred and separations could be performed by using solvents which were fully miscible with water, including water itself as a solvent. Therefore, several investigators (Moore and Stein 1948, Decker and Riffart 1950, Burma and Banerjee 1950) concluded that adsorption plays an important part in paper chromatography. This conclusion, however, is not necessary, since the phenomena in question may also be explained by partition chromatography, if a broader meaning is given to this term.

In the present study partition chromatography is defined as a chromatography in which the stationary phase is a volume phase, in distinction from adsorption chromatography in which the stationary phase is a surface. According to this definition a direct bonding of the solute to the cellulose of the paper should not necessarily be considered as an adsorption. The water which is bound to the paper, may penetrate in the amorphous regions of the cellulose (imbibition) and the water-cellulose complex may be considered as a solution of cellulose in water and therefore as a volume phase (imbibition phase). A reversible transition of the solute in such an imbibition phase is in accordance with the meaning of partition, even in the case that the cellulose chains are directly involved in binding the solute. Another result of this conception is that the solubility of a substance in the imbibition phase may deviate from the solubility in pure water. The α -value calculated from I) may deviate therefore from the partition coefficient which is determined directly without adsorption taking place.

However, a substance which is bound directly to the cellulose chains in the imbibition phase, will also be bound to the surface of the cellulose in the crystalline regions. The latter is to be considered as adsorption and this may result in the occurrence of an abnormal chromatogram.

A deviation of the solubility of a substance in the imbibition phase from the solubility in pure water may also be explained by an indirect influence of the cellulose on the imbibition water. This is analogous to the phenomenon that the solubility of a substance in mixtures consisting of water and alcohols may be higher than the sum of the corresponding solubilities in the pure components. (Bancroft and Butler 1932). The solubility of a substance in the imbibition water may deviate therefore from the solubility in pure water without the necessity of assuming a direct bonding of the solute to the cellulose molecules.

Partition chromatography as defined above will not be confined to a partition system consisting of water and a solvent not miscible with water, because the use of such a solvent is not a condition for the imbibition liquid remaining stationary. A partition system will be realised already when water is used as a solvent, if the imbibition water remains stationary whilst the mobile water flows through the capillaries of the paper. The same view holds good when an arbitrary

solvent is used which is bound to the cellulose by imbibition.

In order to judge the possibilities of a partition system in paper chromatography, it is necessary to know how the solvents which are used as the mobile phase can be bound to the cellulose of the paper. The properties of the cellulose and in particular the action of liquids and vapours upon cellulose were discussed therefore extensively (chapter III).

Cellulose takes up water by hydration and by imbibition. The cellulose water complex may be considered as a solution of cellulose in water. Martin (1950) compares it to a solution of glucose in water. It is difficult, however, to judge how far this comparison holds good, because the opinions about the nature of the amorphous cellulose diverge on essential points (Hermans 1949, Frey-Wyssling 1951, Algar, Giertz and Gustafsson 1951, Rånby 1952). Moreover, we have to consider the possibility that the nature of the amorphous cellulose and consequently the properties of the imbibition phase may differ importantly for different kinds of paper.

Other liquids than water, for instance methanol and ethanol, are able to be bound to dry cellulose by imbibition (Kanamaru and Chao 1938, Lauer 1944). The imbibition decreases in the sequence water > methanol > ethanol. It appears that the imbibition of ethanol is a irreversible process (Mease 1933); when cellulose contains ethanol a part of the latter remains in the cellulose after drying (inclusion). Liquids which are not bound to dry cellulose by imbibition may penetrate into the amorphous components of the fibre, if these components are made accessible to the liquids by water or other imbibing solvents. In drying the cellulose which contains a liquid in the amorphous parts, inclusion of the liquid may occur (Staudinger and Döhle 1943). A liquid is included in the cellulose the more easily when it penetrates the more difficultly into the amorphous regions of dry cellulose.

By our own experiments concerning the action of liquids upon cellulose the following results were obtained (chapter IV).

Air-dry paper (containing water of hydration) appeared to be imbibed strongly by formic acid, acetic acid, pyridine, methanol and diethylamine, less by ethanol and only slightly by propanol-1 and acetone. Imbibition of ethers, chloroform and hydrocarbons could not be established. In the case of fully dried paper only imbibition of methanol could be ascertained.

When mixtures of liquids act upon cellulose, the composition of the

imbibition liquid is, as a rule, different from the composition of the outer liquid (the liquid outside the amorphous regions) which is in equilibrium with the imbibition phase. Mixtures of alcohols and water give an imbibition liquid of higher water content than the outer liquid. The composition of inner- and outer liquid is the more different when the water content of the outer liquid is lower and the molecular weight of the alcohol is higher.

It appeared that alcohols with a low percentage of water are able to withdraw water from air-dry paper. However, when the water content of the alcohol is high the paper takes up water from the alcohol. At a given water concentration, dependent on the nature of the alcohol, no transition of water between the paper and the alcohol takes place.

When an arbitrary solvent is used for chromatography on air-dry paper, it follows that the composition of the solvent is apt to change during the process of elution. This may be caused by a transition of water from the paper into the solvent or by a transition of the components of the solvent into the paper in a ratio different from the composition of the solvent. This change in composition will decrease when the paper is exposed for some time to the vapours of the solvent, before the elution is started („accommodation” of the paper).

It could be shown by several chromatographic experiments that the imbibition phase, which results from the interplay of the solvent and the paper, acts as the stationary phase of partition chromatography (chapter V). Elution of sugars with water as a solvent could be reduced to a partition of the solutes between two water phases ($\alpha = 1$). Elution of glucose, fluorenone and azobenzene with mixtures of methanol and water as solvents could be reduced to a partition between two methanol phases of a different water content.

As a result of the experiments the conclusion was drawn that the problem of a separation by paperchromatography can be reduced to the following questions:

- a) How is the composition of the imbibition liquid when a given solvent is used.
- b) How is the distribution of a solute between two liquids of a given composition.

The composition of the imbibition liquid may be investigated experimentally. For obtaining a qualitative impression, we may generalize the results found for the action of alcohols upon paper in the following way: The imbibition liquid will be more polar than the solvent and the

composition of the imbibition liquid and the solvent will differ more, the less polar the solvent is.

For obtaining an impression of the partition coefficient we may compare the solubilities of the substance in the imbibition phase and the solvent.

It could be shown, that the above called conception may serve as a guidance in separating mixtures of substances by paper chromatography (separation of some barbiturates by mixtures of methanol and carbon tetrachloride).

The possibility of connecting the chromatographic behaviour of a substance to the solubilities of the substance is of importance as solubilities are easily determined. It seems to be important to investigate more closely how far this conception may be applied to paper chromatography. A complication arises, however, from the fact that the solubility of a substance in the imbibition liquid may be influenced by the presence of cellulose. As a result of this, separations may be obtained by partition chromatography with water as a solvent (chapter VI, § 4). Also this should be further examined in order to get a better insight.

In the course of the experimental investigation some points of practical importance emerged:

By accommodation of the paper in the vapour of the solvent the R_F decreases importantly. This is caused by the increase of the ratio A_S/A_L . This increase may assume such proportions as to compel the assumption that a part of the stationary phase is formed by capillary condensation of the solvent in the narrow capillaries of the paper. It was noticed that the rate of flow of the solvent increases and that the sharpness of the front decreases, when the paper is accommodated in the vapour for a long time. This may also be explained by capillary condensation with the aid of the theory of paper structure developed by Tollenaar and Blokhuis (1950).

Capillary condensation may give rise to an irregular solvent front when the temperature in the chromatographic chamber is unequal. At those places of the paper where the condensate evaporates by the increase of temperature, the solvent front travels more slowly. This may cause a difference of the R_F values of the same solutes eluted on different places of the same paper.

Accommodation of the paper for a long time is unfavourable for effecting separations, since the ratio of the partition coefficients

approaches to unity in this case. This may be explained by the assumption that after prolonged accommodation the stationary phase consists (partly) of a capillary condensate of the same composition as the solvent. A short accommodation of the paper, however, favours the occurrence of more compact spots.

It could be shown that abnormal spots may occur in cases in which adsorption and ionization are excluded, when the imbibition phase is developed insufficiently. This has been explained by the assumption that a part of the solute is included in the amorphous cellulose in these cases.

It has been demonstrated that under circumstances adsorption on the paper may occur, causing abnormal spots (chapter VI). Since a substance may be displaced out of the adsorbed state by another one, separations may be obtained by adsorption chromatography on paper. It could be shown that this adsorption is of a polar nature. The adsorption can be prevented by using a sufficiently polar solvent or by imbibition of the cellulose with a sufficiently polar liquid. In many cases the presence of a certain quantity of water in the solvent will prevent the adsorption and will cause normal spots.

In the chromatography of ionizing substances abnormal spots may occur by ion exchange with the kations of the paper. This was investigated by elution of acids and alkaloids with water (chapter VI).

When acids are eluted with water, the H^+ of the acid is exchanged against the metalions (M_p^+) of the paper. The H^+ is irreversibly bound to the paper, giving a streaky acid spot, whilst the combination of M^+ and the anion of the acid is chromatographed further, giving a normal salt spot. The ion exchange may be prevented by preventing the ionization of the acid or by displacing the M_p^+ of the paper by H^+ . The latter can be done by treating the paper with hydrochloric acid.

When alkaloids are eluted with water, the kation of the alkaloid exchanges with M_p^+ and the free alkaloid can be bound directly to the H^+ of the paper. This causes abnormal spots, the shape of which may vary much when different kinds of paper are used. Since the alkaloid which is bound to the paper may be displaced by another one, separation of alkaloids is possible in this way. The ion exchange of alkaloids can be prevented by preventing the ionization or by an excess of an arbitrary electrolyte (e.g. KCl) in the stationary phase. The ion exchange which occurs in elution of acids and the bonding of alkaloids to the H^+ of the paper can be used for determining the carboxyl content of the paper. Several complications may, however, occur.

LITERATUUR

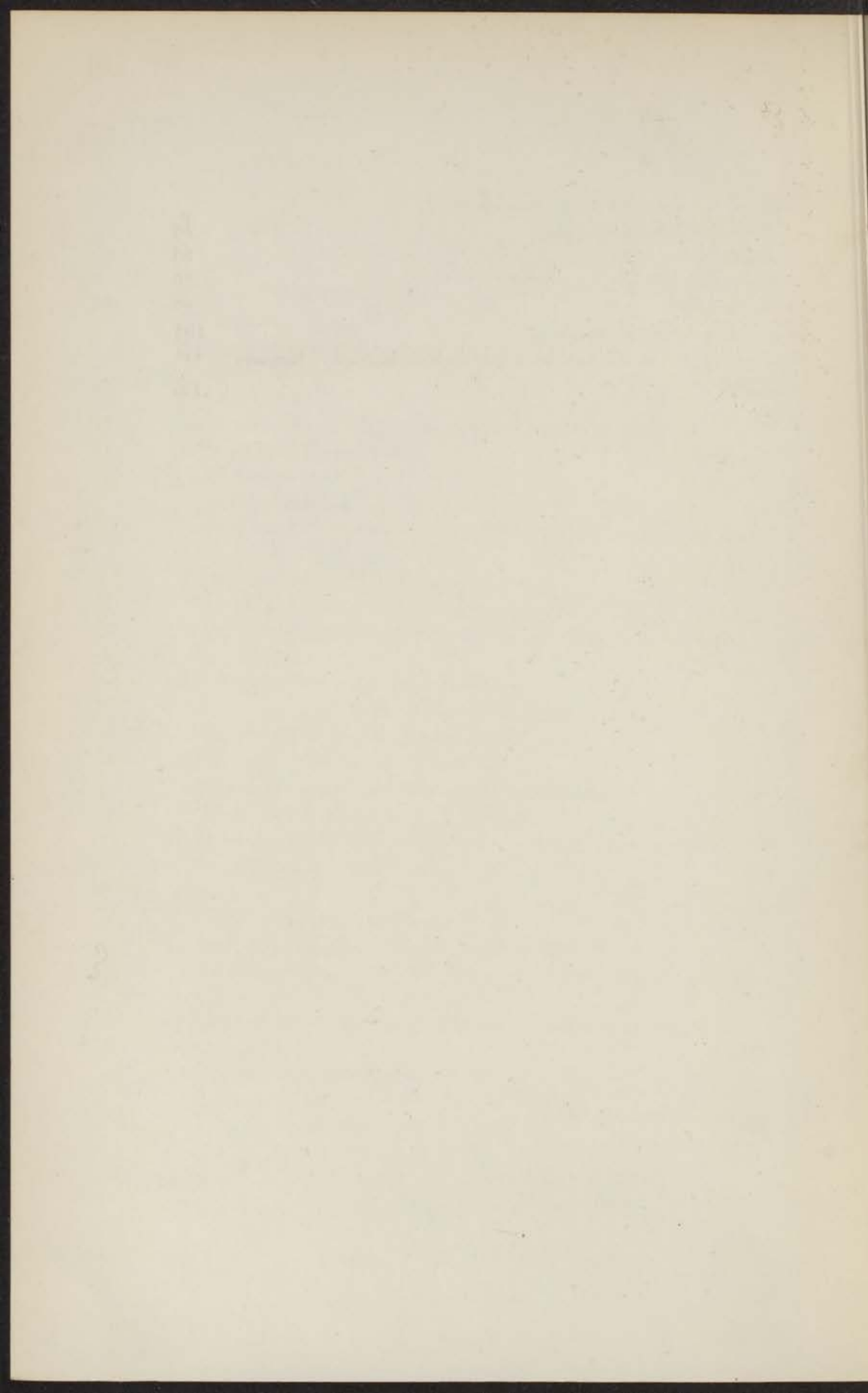
1. Algar W.H., Giertz H.W. en Gustafsson A., *Svensk Papperstidn.* **54**,335 (1951)
2. Balston J.N. en Talbot B.E., „A guide to Filter Paper and Cellulose Powder Chromatography” London (1952)
3. Bancroft W.D. en Butler F.J.C., *J.Phys.Chem.* **36**,2515 (1932)
4. Bentley H.R. en Whitehead J.K., *Nature* **164**,182 (1949)
5. Bentley H.R. en Whitehead J.K., *Biochem.J.* **46**,341 (1950)
6. Block R.J., Le Strange R. en Zweig G., „Paperchromatography” New York (1952)
7. Brimley R.C., *Nature* **114**,432 (1924)
8. Brown M.J. en Foster A.G., *Research* **3**,97 (1950)
9. Burma D.P. en Banerjee B., *Science and Culture* **15**,363 (1950)
10. Burma D.P. en Banerjee B., *J.Indian Chem.Soc.* **28**,135 (1951)
11. Burma D.P., *J.Indian Chem.Soc.* **28**,631 (1951)
12. Burstall F.H., Davies G., Linstead R. en Wells R., *Nature* **163**,64 (1949)
13. Carman P.C. en Raal F.A., *Nature* **167**,112 (1951)
14. Cassidy H.G., „Adsorption and Chromatography” New York (1951)
15. Centola G., *Ind.carta (Milaan)* **4**,135 (1950)
16. Consden R., Gordon A.H. en Martin A.J.P., *Biochem.J.* **38**,224 (1944)
17. Cramer F., „Papierchromatographie” Weinheim (1952)
18. Craig L.C., *J.Biol.Chem.* **155**,519 (1944)
19. Craig L.C., *Anal.Chem.* **22**,1346 (1950)
20. Cremer E., *Z.physik.Chem.* **196**,196 (1950)
21. Davis W.E., Barry A.J., Peterson F.C. en King A.J., *J.Am.Chem. Soc.* **65**,1294 (1943)
22. Decker P. en Riffart W., *Chem.-Ztg.* **74**,261,273 (1950)
23. Feigl F., „Qualitative Analysis by Spot Tests” New York (1947)
24. Freundlich H., „Kapillarchemie” I, Leipzig (1930)
25. Frey-Wyssling A., *Makromol.Chem.* **6**,7 (1951)
26. Glueckauf E., Barker K.H. en Kitt G.P., *Gen.Disc.Faraday Soc.* **7**,199 (1949)
27. Gordon A.H., Martin A.J.P. en Synge R.L.M., *Biochem.J.* **37**,79 (1943)
28. Hanes C.S. en Isherwood F.A., *Nature* **164**,1107 (1949)
29. Hermans P.H., „Physics and Chemistry of Cellulose Fibres” Amsterdam (1949)

30. Hermans P.H., *Makromol.Chem.* **6**,25 (1951)
31. Hirsch P., *Rec.trav.chim.* **71**,525 (1952)
32. Jermstad A. en Jensen K., *Pharm.Acta Helv.* **25**,209 (1950)
33. Jermyn M.A. en Isherwood F.A., *Biochem.J.* **44**,402 (1949)
34. Kanamaru K. en Chao J., *Kolloid-Z.* **84**,85 (1938)
35. Klinkenberg A., *Gen.Disc.Faraday Soc.* **7**,151 (1949)
36. Kowkabany G.N. en Cassidy H.G., *Anal.Chem.* **24**,643 (1952)
37. Kratky O. en Mark H., *Z.physik.Chem.B* **36**,129 (1937)
38. Lauer K., *Kolloid-Z.* **107**,86 (1944)
39. Lederer M., *Nature* **162**,776 (1948)
40. Lester Smith E., *Nature* **169**,60 (1952)
41. Lugg J.W.H. en Overell B.T., *Nature* **160**,87 (1947)
42. Lugg J.W.H. en Overell B.T., *Australian J.Sci.Research A* **1**,98 (1948)
43. Martin A.J.P. en Synge R.L.M., *Biochem.J.* **35**,91 (1941) (a)
44. Martin A.J.P. en Synge R.L.M., *Biochem.J.* **35**,1358 (1941)
45. Martin A.J.P., *Ann.Rev.Biochem.* **19**,517 (1950)
46. Mease R.T., *Ind.Eng.Chem.Anal.Ed.* **5**,317 (1933)
47. Meinhard J.E., *Science* **110**,387 (1949)
48. Moore S., en Stein H., *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **49**,265 (1948)
49. Munier R. en Macheboeuf M., *Bull.soc.chim.biol.* **31**,1144 (1949)
50. Munier R. en Macheboeuf M., *Bull.soc.chim.biol.* **32**,192 (1950)
51. Munier R. en Macheboeuf M., *Bull.soc.chim.biol.* **32**,904 (1950) (a)
52. Munier R., Macheboeuf M. en Chevrier N., *Bull.soc.chim.biol.* **34**,
204, (1952)
53. Nickerson R.F., *Textile Res.J.* **21**,195 (1951)
54. Oplatka G. en Gryllus E., *Acta chim.acad.sci.Hungaricae* **2**,103 (1952)
55. Rånby B.G., *Svensk Papperstidn.* **55**,115 (1952)
56. Rydel S. en Macheboeuf M., *Bull.soc.chim.biol.* **31**,1265 (1949)
57. Schute J.B., *Pharm.Weekblad* **86**,201 (1951)
58. Segal L., Nelson M.L. en Conrad C.M., *J.Phys.& Colloid Chem.* **55**,
325 (1951)
59. Staudinger H. en Döhle W., *J.prakt.Chem.* **161**,219 (1943)
60. Suhrmann R. en Perkampus H.H., *Naturwissenschaften* **38**,382 (1951)
61. Synge R.L.M., *Biochem.J.* **38**,285 (1944)
62. Tollenaar D. en Blokhuis G., *Appl.sci.Res. A* **2**,125 (1950)
63. Trevelyan W.E., Procter D.P. en Harrisaon J.S., *Nature* **166**,444 (1950)
64. Weiss J., *J.Chem.Soc.* **1943**,297
65. Wickström A. en Salvesen B., *J.Pharm.Pharmacology* **4**,98 (1952)
66. Wilson J.N., *J.Amer.Soc.* **62**,1583 (1940)
67. Zsigmondy R., *Z.anorg.Chem.* **71**,356 (1911)

INHOUD

Hoofdstuk I Probleemstelling	
1 Inleiding	5
2 Begripsbepaling en definities	5
3 Opvattingen over het mechanisme van de papierchromatographie	7
4 Discussie	12
Hoofdstuk II De verdelingstheorie van Martin en Synge	
1 Mathematische afleiding	19
2 Bezwaren	21
3 Consequenties van de theorie	22
4 Onderzoek van de theorie door middel van „counter current distribution”	25
5 Experimentele verificatie van de theorie	27
6 Toepassing op papierchromatographie	28
7 De invloed van de afstand tussen basisvlek en bron op het chromatogram	32
Hoofdstuk III Filtreerpapier en cellulose.	
1 Chemische samenstelling van filtreerpapier	35
2 Rangschikking van de cellulose-moleculen	36
3 De sortie van waterdamp door cellulose	39
4 Sortie van de dampen van organische vloeistoffen	42
5 Inwerking van vloeistoffen op cellulose	44
Hoofdstuk IV Eigen onderzoek over de inwerking van organische vloeistoffen op filtreerpapier	
1 Inleiding	48
2 Restvlek-proeven met fluorenon	49
3 Inwerking van alcoholen op luchtdroog papier	53
4 Verandering van de samenstelling van de mobiele fase tijdens de elutie	59
Hoofdstuk V Papierchromatographie als verdelingschromatographie	
1 Inleiding	62
2 Experimentele techniek	63
3 Elutie met water	65
4 Elutie met alcoholen	70
5 Conclusies	82

Hoofdstuk VI Adsorptie en ionenuitwisseling	
1 Abnormale chromatogrammen	84
2 Adsorptie	85
3 Ionenuitwisseling	90
4 Conclusies	97
Samenvatting en slotbeschouwing	103
Investigations of the mechanism of paper chromatography. Summary	110
Literatuur	116



STELLINGEN

I

Uit de oplosbaarheid van een chemische stof in verschillende oplosmiddelen, kunnen in vele gevallen belangrijke gegevens worden afgeleid voor de identificatie van de stof. Men kan hierbij volstaan met zeer geringe hoeveelheden van de stof, door de oplosbaarheid in een druppel van het oplosmiddel met behulp van het microscoop waar te nemen.

II

Men dient ernstig rekening te houden met de mogelijkheid, dat het insuline-molecule opgebouwd is uit slechts twee peptide-ketens, die onderling door twee disulfide-bruggen zijn verbonden.

Fredericq E., *Nature* 171, 570 (1953)

Sanger F., Thompson E.O.P. en Tuppy H., „Symposium sur les hormones protéiques et dérivées des protéines” Paris 1952, pag. 26 e.v.

III

De mening van Najjar, dat het „direct reagerende” bilirubine een metaalcomplex zou zijn van het „indirect reagerende”, is aan bedenkingen onderhevig.

Najjar V.A., *Pediatrics* 10, 2 (1952)

IV

De opvatting van Charabot over de vorming van thujylalcohol bij *Arthemisia absinthium*, is geheel onjuist weergegeven in het handboek van Guenther.

Guenther E., „*The essential Oils*” New York 1952, vol. 5, pag. 496

Charabot E., *Compt. rend.* 130, 923 (1900)

Charabot E., *Bull. soc. chim.* 3e Ser. 23, 474 (1900)

V

Het is nog niet afdoende bewezen, dat carvon in de vruchten van *Carum Carvi* ten koste van limoneen ontstaat.

Sandermann W., J.prakt.Chem. 2e Ser. 151, 160 (1938)

VI

Het gebruik van 5-nitro-2-hydrazino-benzoëzuur voor de analyse van carbonylverbindingen, verdient aanbeveling.

VII

Ten onrechte beweert Hesse, dat bij adsorptiechromatographie van p-xyleen en aethylbenzeen scheiding van deze stoffen zou zijn te verwachten op grond van hun verschil in dipoolmoment.

Hesse G., Z.Electrochem. 55, 60 (1951)

VIII

De bewering van Schneider, dat het verschil in fysische en chemische eigenschappen tussen natieve en geregenereerde cellulose slechts berust op het feit, dat bij de eerste de celwand nog intact is, is onjuist.

Schneider E., Deutsch. Ap. Ztg. 91, 292 (1951)

IX

De mathematische behandeling van de verdelingschromatographie, zoals deze wordt gegeven door Martin en Synge en James en Martin, voert tot een fysische ongerijmdheid, indien men aanneemt dat het evenwicht voor de verdeling van de stof tussen stationaire en mobiele fase zich niet onmiddellijk instelt.

Martin A.J.P. en Synge L.M., Biochem. J. 35, 1358 (1941)

James A.T. en Martin A.J.P., Analyst 77, 915 (1952)

Dit proefschrift, hoofdstuk II

