

## Die Gegenstromverteilung – der Schlüssel zum Verständnis der Chromatographie C2CL



Wir schreiben das Jahr 1942. Bakterielle Infektionen machen auf dem Feld auch relativ kleine Wunden zur Lebensgefahr: Die Soldaten sterben oftmals an Wundbrand und Blutvergiftungen. Lebensrettende Antibiotika sind noch nicht kommerziell erhältlich. Bereits 1874 hatte der österreichische Chirurg THEODOR BILLROTH den das Wachstum von Bakterien hemmenden Effekt des Pilzes *Penicillium* erkannt und publiziert. Die Entdeckung wurde jedoch nicht sonderlich beachtet und geriet in Vergessenheit.

So erging es 1928 auch der Entdeckung von ALEXANDER FLEMING (1881–1955, Nobelpreis Medizin 1945). Er bemerkte, dass der unscheinbare Schimmelpilz *Penicillium notatum*, der als Verunreinigung versehentlich auf eine Petrischale gelangt war, die umliegenden Bakterien abgetötet hatte. Durch dieses zufällige Missgeschick erkannte er, dass der Pilz offensichtlich Stoffe absondert, die hochgradig bakterientötend wirken.

Erst mit Kriegsbeginn erinnerte man sich an die Zufallsentdeckung. Die verantwortlichen Stoffe, die **Penicilline**, waren die einzige verlässliche und neue Waffe gegen Bakterieninfektionen. Penicilline war die ersten **Antibiotika**. Wegen der Schwierigkeit sie in größeren Mengen aus dem Schimmelpilz zu gewinnen, waren sie extrem kostbar. So wurden sie sogar aus dem Urin der behandelten Soldaten zurückgewonnen, um sie erneut einzusetzen!

Die Entdeckungen und Anwendungen der Penicilline waren kriegswichtig. Nur den Alliierten standen sie in größeren Mengen zur Verfügung. Auf der Seite der Achsenmächte versucht man den Wundbrand mit **Sulfonamiden**, allen voran mit dem in Deutschland entdeckten *Prontosil* zu behandeln. Sie sind den Penicillinen jedoch deutlich unterlegen, denn die Bakterien entwickeln schnell Resistenzen und sind in den Wunden wenig wirksam. Soldaten der Wehrmacht starben deshalb häufiger an den bakteriellen Infektionen oder es mussten ihnen Gliedmaßen amputiert werden. In der zynischen Logik des Krieges ist letzteres für den Feind wesentlich effektiver, weil die Versorgung von Invaliden zusätzlich Ressourcen bindet.

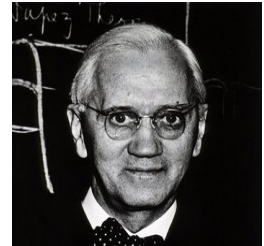
Die Kenntnis über die Wirkung und vor allem der effizienten Isolation von Penicillinen war einer von mehreren kriegsentscheidenden Faktoren. Die Isolierung von Penicillinen aus dem flüssigen Nährmedium, in dem Schimmelpilze wachsen, von den anderen unwirksamen oder giftigen Bestandteilen, ist sehr aufwendig. Die Gewinnung weniger Milligramm ist nur mit vielen hunderten hintereinander geschalteten Flüssigflüssig-Extraktionen möglich und nutzt die kleinen Unterschiede in den NERNST'schen Verteilungskoeffizienten  $K$ .

Ein Pionier auf diesem Gebiet der **Naturstoffisolierungen** war LYMAN C. CRAIG (1906 - 1974), der die hierzu benutzten Laborapparate entwarf und die Verteilungsvorgänge mathematisch beschrieb, die sogenannte **Gegenstromverteilung** (*countercurrent distribution*) auch **multiplikative Verteilung** oder **CRAIG-Verteilung** genannt. Die von ihm maßgeblich entwickelte Trennmethode wurde nicht nur bei der Penicillin-Gewinnung angewandt, sondern in weiterentwickelter Form, bis zum heutigen Tag auch zur Gewinnung/Isolation vieler weiterer Naturstoffe, Antibiotika, von Insulin und Taxol (ein Chemotherapeutikum).

Zu diesem Arbeitsblatt gibt zur Nachbesprechung ein Lernvideo:



<https://youtu.be/BJsD5J353JM>

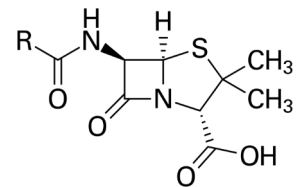


Sir ALEXANDER FLEMING

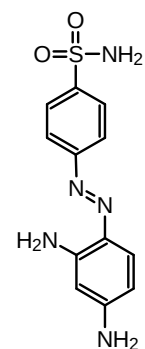


sehenswerte Kurzdoku über Penicillin im Krieg (9 min):

<https://youtu.be/w9Q3k5Plsq>



allg. Strukturformel der Penicilline



Prontosil, das wichtigste Sulfonamid ist ein roter Feststoff



LYMAN C. CRAIG

Ein einfaches Experiment mit Zahlen beschreibt das Trennverfahren

Lernvideo mit Nachbesprechung dieses Zahlenexperiments: <https://youtu.be/BJsD5J353jM>

Zu Beginn soll ein wässriges Gemisch mit den Stoffen X und Y vorliegen. Beide Stoffe sollen voneinander getrennt werden. Die Verteilungskoeffizienten sollen betragen:

$$K(X) = \frac{\text{obere Phase}}{\text{untere Phase}} = \frac{4}{1} = 4 \quad \text{und}$$

$$K(Y) = \frac{\text{obere Phase}}{\text{untere Phase}} = \frac{1}{1} = 1$$

Beginn der Trennung (1. Trennschritt)

In einen Scheidetrichter wird ein Lösungsmittel als untere Phase eingefüllt. Anschließend überschichtet man das Gemisch mit einer wässrigen Lösung die 1000 X und 1000 Y enthält, und die obere Phase bildet.

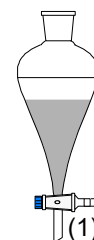
| Gefäßnr.:  |   | (1)  | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) |
|------------|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oberphase  | X | 1000 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
|            | Y | 1000 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Unterphase | X | 0    | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
|            | Y | 0    | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |



Nun wird zur Extraktion (1) geschüttelt. Alle X und Y verteilen sich gemäß der Verteilungskoeffizienten (siehe oben).

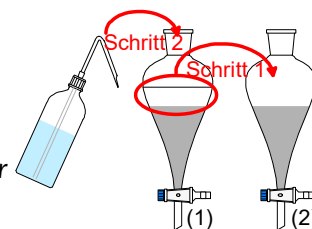
1.1 Vervollständigen Sie den Gehalt/Anzahl an X und Y in (1):

| Gefäßnr.:  |   | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) |
|------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oberphase  | X | 800 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
|            | Y |     | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Unterphase | X |     | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
|            | Y | 500 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |



2. Trennschritt

Nun wird die obere Phase aus dem Gefäß 1 in das vorbereitete Gefäß 2 transferiert, das schon das reine Lösungsmittel als untere Phase enthält. In das Gefäß 1 wird als Flüssigkeitsersatz nun der reine Träger (reines Wasser) als Oberphase hineingegeben.



2.1 Vervollständigen Sie den Gehalt/Anzahl in (1) und (2) unmittelbar nach Transfer der oberen Phase und Auffüllen von (1), aber vor dem Schütteln:

| Gefäßnr.:  |   | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) |
|------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oberphase  | X |     | 800 | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
|            | Y | 0   |     | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Unterphase | X | 200 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
|            | Y | 500 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |

Anm: Die tats. genutzte Gefäßform erlaubte den direkten Transfer durch Umdrehen der Gefäße (ohne Pipettieren):

animiertes GIF:

[sonstiges/trenngefaess\\_gegenstromverteilung.gif](#)

Nun wird beide Gefäße (1) und (2) geschüttelt. Zählen Sie alle X und alle Y in den beiden Gefäßen jeweils zusammen und verteilen Sie diese in dem jeweiligen Gefäß gemäß der K-Werte. *Vervollständigen Sie die Tabelle:*

| Gefäßnr.:  |   | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) |
|------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oberphase  | X |     |     | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
|            | Y |     |     | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Unterphase | X | 40  |     | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
|            | Y |     | 250 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |


**3. Trennschritt**

Nun werden beide obere Phasen aus (1) und (2) in das jeweils rechts daneben liegende Gefäß transferiert: Die Oberphase aus (1) in (2), die von (2) in das vorbereitete Gefäß (3). (3) enthält schon das reine Lösungsmittel als untere Phase. In (1) wird als Flüssigkeitsersatz wieder der reine Träger (H<sub>2</sub>O) als Oberphase hineingegeben.

**3.1 Vervollständigen Sie die Tabelle nach Transfer beider oberer Phasen/Auffüllen von (1) und vor dem Schütteln:**

| Gefäßnr.:  |   | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) |
|------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oberphase  | X | 0   |     |     | -   | -   | -   | -   | -   |
|            | Y |     |     |     | -   | -   | -   | -   | -   |
| Unterphase | X | 40  | 160 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
|            | Y |     |     | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |

Sehenswertes Video  
[https://youtu.be/pJ\\_U359IMD4](https://youtu.be/pJ_U359IMD4)  
 in indischem Englisch



Nun werden (1), (2) und (3) geschüttelt. **3.2 Vervollständigen Sie den Gehalt aufgrund der Verteilungskoeffizienten:**

| Gefäßnr.:  |   | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) |
|------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oberphase  | X |     |     |     | -   | -   | -   | -   | -   |
|            | Y |     |     | 125 | -   | -   | -   | -   | -   |
| Unterphase | X |     |     | 128 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
|            | Y |     |     |     | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |

**4. Trennschritt (ZAHLENWERTE INCL. 1 NACHKOMMASTELLE!). Vervollständigen Sie!**

Nach Volumentransfer und Auffüllen von (1):

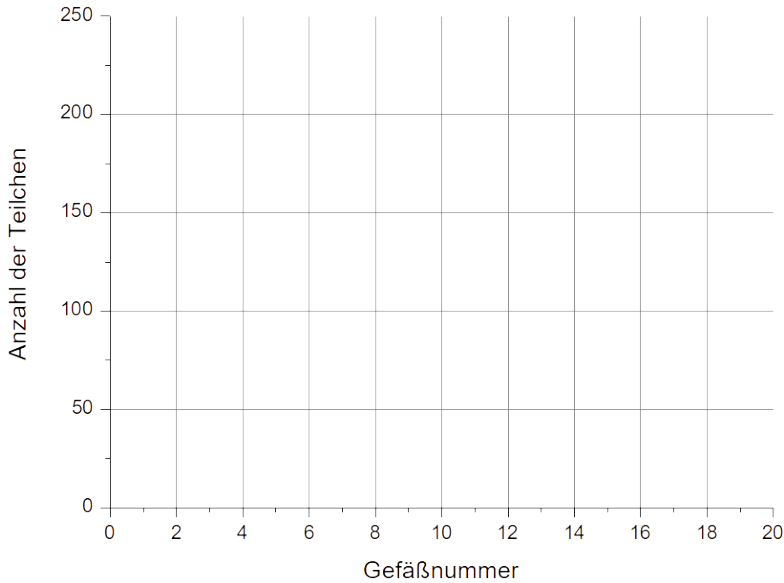
Nach Schütteln:

| Gefäß:     | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oberphase  | X   |     |     |     |     | -   | -   | -   |
|            | Y   |     |     |     |     | -   | -   | -   |
| Unterphase | X   |     |     |     | 0   | 0   | 0   | 0   |
|            | Y   |     |     |     | 0   | 0   | 0   | 0   |

| Gefäß:     | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oberphase  | X   |     |     |     |     |     |     |     |
|            | Y   |     |     |     |     |     |     |     |
| Unterphase | X   |     |     |     |     | 0   | 0   | 0   |
|            | Y   |     |     |     |     | 0   | 0   | 0   |



7.2 Zeichnen Sie das Säulendiagramm zur Verteilung von X und Y in den Gefäßen mit  $K(X) = 4$  und  $K(Y) = 1$  schematisch und vervollständigen Sie rechts daneben den Lückentext zu den Schlussfolgerungen!



Die unterschiedliche Verteilung von X und Y in den beiden Phasen, führt dazu, das sich die beiden Stoffe zunehmend voneinander trennen. Nach 20 Schritten ist das Aufenthaltsmaximum von Stoff X im Gefäß-Nr. ...., das von Stoff Y in Gefäß Nr. .... . Die Verteilungszahlen der Stoffe auf die Gefäße beschreiben Glockenkurven (Fachsprache: ..).

Mit dem Weitertransport der Stoffe ist eine zunehmende Verbr..... der Peaks zu beobachten.

**Analogie der Gegenstromverteilung und Chromatographie**

Klicken Sie **unbedingt** auf den Link und starten Sie das Javascript-Applet oder scannen Sie den QR-Code mit einem Javascript-fähigen Handy. Spielen Sie mit den Werten für K!

<http://www.laborberufe.de/sonstiges/Javascript.htm>



1. Füllen Sie die Tabelle mit den passenden Begriffen

| Trennung mittels CRAIG-Verteilung                           | Analogie zu chromatogr. Verfahren |
|---|-----------------------------------|
|   | mobile Phase                      |
| Untere Flüssigkeiten (Phasen) in den einzelnen Trenngefäßen |                                   |
| einzelne Trenngefäße  | Trennstufe (Trennboden, Boden)    |

Erinnern Sie sich noch, an die Theorie zur Rektifikation? Analog der dortigen **Zahl der Trennböden** bei der Rektifikation, gibt es auch in chromatographischen Systemen eine **Zahl an Trennstufen (Böden)**. Bei einer Trennstufe (= „Boden“) handelt es sich um den Teil einer Säule, indem es zwischen der mobilen Phase und der stationären Phase zu einer GG-Einstellung kommt. Es handelt sich auch hier im einen eher abstrakten Begriff, weil er nicht direkt als Boden mit dem Auge gesehen werden kann. Jeder Trennboden entspricht in der CRAIG-Verteilung einem Trenngefäß. Auf jedem Boden kommt es zu einer GG-Einstellung. Je höher die Trennbodenzahl, desto höher die Leistungsfähigkeit der stationären Phase. Mit kleiner werdender Partikelgröße der stationären Phase, nimmt die Anzahl der Trennstufen zu. Die effektive Zahl hängt auch von anderen Faktoren, z.B. der Temperatur, ab.

Genutzte Quellen

[https://en.wikipedia.org/wiki/Countercurrent\\_distribution](https://en.wikipedia.org/wiki/Countercurrent_distribution)

<https://digitalcommons.rockefeller.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1044&context=harvey-lectures>

(Vorlesungstext/Seminarbeitrag von Craig, als Volltext abrufbar)