

CHROM. 5310

SCHNELLE FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE AN KIESELGEL*

D. RANDAU UND W. SCHNELL

E. Merck, Darmstadt (B.R.D.)

(Eingegangen am 18. Februar 1971)

SUMMARY

Fast liquid chromatography on silica gel

The applicability of silica gel with a pore diameter of 60 Å in fast liquid chromatography was investigated. After examination of different column packing methods, the influence of the particle diameter, the velocity of the mobile phase, and the percentage of the stationary phase, we came to the conclusion that it is advisable to pack the columns by bumping, to use particles greater than 30 μ and to choose a velocity of about 1 cm sec⁻¹. The percentage of the stationary phase must be suited to the actual separation problem.

EINLEITUNG

Kieselgel mit einem Porendurchmesser um 60 Å hat sich sowohl in der Dünnschicht- als auch in der herkömmlichen Säulenchromatographie hervorragend bewährt¹. Es ist daher nur folgerichtig, die bewährten Eigenschaften des Kieselgels auch auf die schnelle Flüssigkeitschromatographie zu übertragen. Ziel der schnellen Flüssigkeitschromatographie ist eine schnelle Auftrennung eines Substanzgemisches mit gleichzeitiger quantitativer Aussage über die Zusammensetzung. Begrenzt wird die schnelle Flüssigkeitschromatographie durch die Leistungsfähigkeit des Geräts in Form seines Pumpensystems, seiner Pulsationdämpfung, der Totvolumina im Injektions- und Detektorteil sowie der Empfindlichkeit der Detektoren.

Herzstück dieser modernen chromatographischen Methode ist aber die Auswahl der für das jeweilige Trennproblem geeigneten stationären und mobilen Phase. An dem Träger Kieselgel haben wir den Einfluss des Säulenfüllens, der Korngrösse, der Analysengeschwindigkeit und dem Grad der Belegung untersucht.

APPARATIVES

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des Universal-Flüssigkeits-Chromatographen UFC 1000** durchgeführt, wobei als Detektor der auf 254 nm eingestellte UV-Detektor LDC 1205** diente. Die Probenaufgabe erfolgte mit Hilfe der Hochdruck-Hamilton-Spritze HP 305 über ein mit Teflondichtungen versehenes Schleusensystem bei laufendem Gerät. Fliessmittel war mit Fractonitril III (1,2,3-Tris(2-cyanäthoxy)-

* Vorgetragen auf der Pittsburgh Conference, Cleveland, Ohio, U.S.A., März 1971.

** Hupe & Busch, Karlsruhe, B.R.D.

propan) gesättigtes *n*-Heptan. Vor dem Einsetzen der Säulen in das Gerät liess man das Fließmittel unter Vakuum in die Säule eindringen, um das Auftreten von Luftblasen im Sorbens zu verhindern. Die verwendeten Stahlsäulen hatten eine Länge von 50 cm und einen inneren Durchmesser von 2 mm. Vor dem erstmaligen Gebrauch wurden sie nacheinander mit halbkonzentrierter Salzsäure, Wasser und Aceton gereinigt. Alle Trennungen fanden bei einer Raumtemperatur von 20–21° statt.

Bei den Belegungen wurde das Kieselgel in eine Lösung von Fractonitril III in Methylenchlorid gegeben. Das Methylenchlorid wurde zuerst unter Drehen im warmen Luftstrom und dann im Vakuum bei 60° abgedampft.

Toluol, Anisol und Acetophenon lagen in einer 0.02 % Lösung vor, von der jeweils 2 µl injiziert wurden. Von den Phthalsäureestern wurden 5 µl einer an jeder Komponente 0.002 % Lösung injiziert. Die Bestimmung des Inertvolumens t_0 erfolgte mit *n*-Pentan und differentialrefraktometrischer Detektion mit dem LDC 1103. Die durch den Injektionsblock und den UV-Detektor verursachte Peakverbreiterung² betrug bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1.92 cm/sec 58 µl und wurde wegen seiner geringen Grösse bei allen Auswertungen vernachlässigt.

DAS SÄULENFÜLLEN

Von grosser Bedeutung für die Trennleistung einer chromatographischen Säule ist die Art der Säulenpackung. Es gibt verschiedene Methoden^{3–7}, eine Säule zu füllen, wobei allen Methoden eigen zu sein scheint, dass man nur mit "Gefühl" dieses Problem meistern kann. Wie aus den späteren Ausführungen über den Zusammenhang zwischen Teilchengrösse und Bodenhöhe hervorgeht, ist das optimale Füllen von Säulen besonders bei Teilchendurchmessern unter 30 µ problematisch.

Wir haben mit Kieselgel, das mit 40 % (g/g) Fractonitril III belegt war und einen Teilchendurchmesser von 40–63 µ hatte, verschiedene Methoden des Säulenfüllens an 50 cm lange Stahlsäulen mit einem Innendurchmesser von 2 mm geprüft.

(A) Säulenfüllen unter Vibrieren

Die unten mit einem porösen Teflonscheibchen verschlossene Säule wird an ihrem oberen Ende über eine Klammer an einer Stativstange befestigt, die auf einem Vibrationstisch (Firma AEG, Typ VT 160/250) festgeschweisst ist. Mit Hilfe eines aufgesetzten Plastiktrichters lässt man nun unter Vibrieren (Stufe 5) kontinuierlich und im Laufe von 10 min das Kieselgel in die Säule rieseln.

(B) Säulenfüllen durch Sedimentieren

In einem druckstabilen Stahlgefäss, in dessen Boden ein 3 cm hoher Stutzen eingelassen war, wurde das Kieselgel mit einem Magnetrührer in Heptan aufgewirbelt. Die Säule war mit dem Stutzen verschraubt. Während des Füllvorgangs floss durch die Apparatur aus einem Reservoir ein konstanter Fließmittelstrom von 120 ml/h unter einem von 5 auf 15 atm ansteigenden Druck. Nach 5 h war die Säule gefüllt.

(C) Säulenfüllen durch Stopfen

Als Hilfsmittel bei dieser Methode diente ein Stahldraht von 1.5 mm Durchmesser an dessen einem Ende eine Teflonkappe von 1.9 mm Durchmesser aufgeschraubt war. Ca. 1/20 der Säulenfüllung wurde nun in die Säule gegeben, es wurde

seitlich an die Säule geschlagen, damit alle Teilchen auf den Boden der Säule fielen. Nun wurde der oben beschriebene Stampfer in die Säule eingeführt und das Kieselgel wurde mit langsam steigenden Druck gepresst. Dieser Vorgang wurde mit den restlichen Portionen wiederholt.

(D) Säulenfüllen durch Aufstossen

Bei dieser Methode wird die Säulenfüllung in *ca.* 15 aufeinanderfolgenden Portionen in die Säule gegeben. Nach jeder Zugabe wird die Säule in senkrechter Stellung bis zu zehnmal kräftig auf eine harte Unterlage aufgestossen.

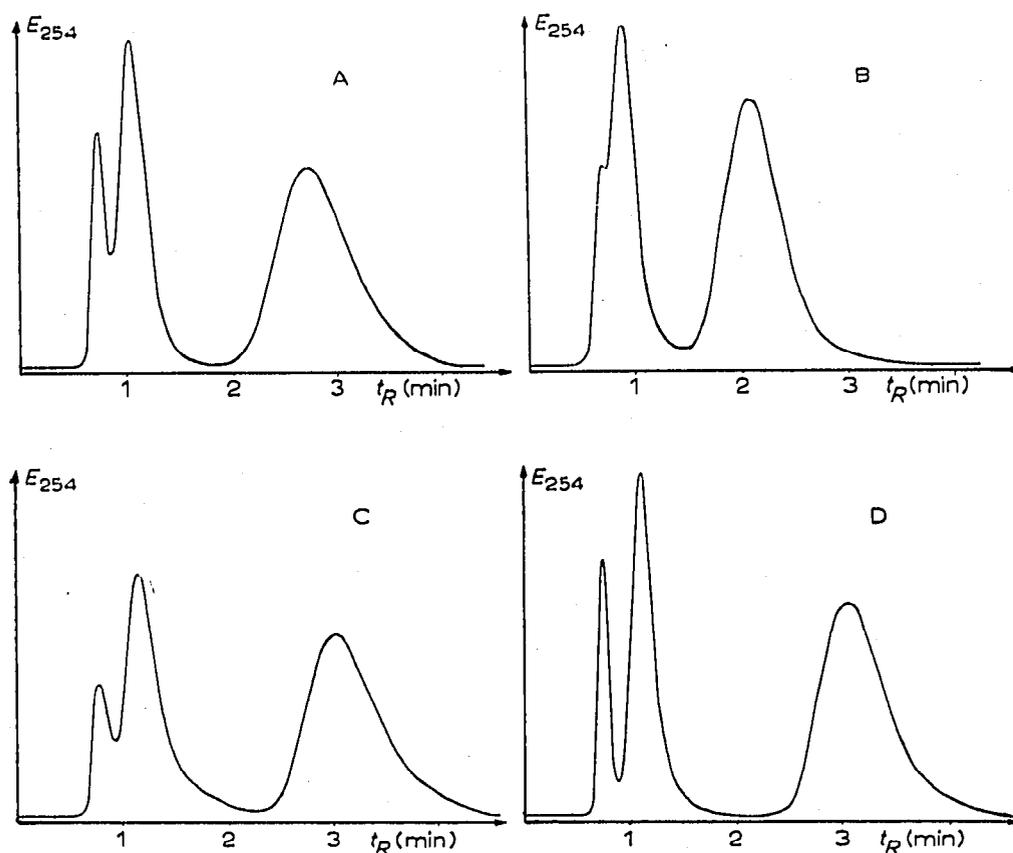


Fig. 1. Trennleistung der nach den Methoden A (Vibrieren), B (Sedimentieren), C (Stopfen) und D (Aufstossen) gefüllten Säulen. $L = 50$ cm, Kieselgel 60 Å ($40\text{--}63 \mu$) belegt mit 40% (g/g) Fractonitril III, erster Peak Toluol, dann Anisol und Acetophenon.

Die Qualität der nach den verschiedenen Methoden gefüllten Säulen wurde an einem Substanzgemisch bestehend aus Toluol, Anisol und Acetophenon geprüft. Aus Fig. 1 ist ersichtlich, dass die nach Methode D gefüllte Säule die höchste Trennleistung aufweist. In Tabelle I sind die dazugehörigen physikalischen Eigenschaften einander gegenübergestellt. Die durch Sedimentieren erhaltene Säule hat die geringste Packungsdichte, die durch Stopfen bzw. Aufstossen entstandenen Säulen haben beide eine Packungsdichte von 0.71 g cm^{-3} ; die grössere Permeabilität der gestopften Säule deutet auf eine unregelmässige Packung hin.

TABELLE I

EIGENSCHAFTEN DER NACH VERSCHIEDENEN METHODEN GEFÜLLTEN SÄULEN
Kieselgel 60 Å (40–63 μ) belegt mit 40 % (g/g) Fractonitril III, $L = 50$ cm.

Füllmethode	u (cm sec ⁻¹)	ρ (g cm ⁻³)	K (cm ²)	H (Acetophenon) (cm)
A (Vibrieren)	0.68	0.68	$5.9 \cdot 10^{-8}$	0.85–1.27
B (Sedimentieren)	0.68	0.55	$8.5 \cdot 10^{-8}$	1.46–1.94
C (Stopfen)	0.68	0.71	$4.2 \cdot 10^{-8}$	0.96–1.08
D (Aufstossen)	0.68	0.71	$3.6 \cdot 10^{-8}$	0.80–0.84

TABELLE II

VERSUCHSPARAMETER BEI DER UNTERSUCHUNG VERSCHIEDENER TEILCHENGRÖSSEN
 $L = 50$ cm, Kieselgel 60 Å belegt mit 40 % (g/g) Fractonitril III.

Korngrößen- bereich des Kieselgels, d_p (μ)	Spezifi- zierung (%)	u (cm sec ⁻¹)	Anisol		Acetophenon		ρ (g cm ⁻³)	ΔP (atm)
			k'	H (cm)	k'	H (cm)		
5–10	87	0.31	1.0	0.40	4.4	0.14	0.77	166
10–20	83	0.29	1.0	0.34	4.5	0.13	0.73	71
20–30	81	0.32	1.1	0.38	4.6	0.12	0.75	22
30–40	77	0.31	1.0	0.37	4.4	0.14	0.73	10
40–63	72	0.30	1.0	0.78	4.4	0.31	0.71	7

DER EINFLUSS DER TEILCHENGRÖSSE

Durch Vergleich der verschiedenen Füllmethoden ergab sich, dass nach Methode D (Aufstossen) Säulen mit bester Packung hergestellt werden können. Diese Methode wurde nun bei verschiedenen Teilchengrößen, die durch Windsichten oder Sieben erhalten worden waren, angewandt. Die Mittelwerte der Versuchsparameter sind in Tabelle II und die graphische Wiedergabe der Beziehungen zwischen Teilchengröße und Bodenhöhe in Fig. 2 wiedergegeben.

Aus Tabelle II ist ersichtlich, dass bei nahezu gleichbleibender Geschwindigkeit der mobilen Phase und bei Konstanz der k' -Werte sich die Bodenhöhe entgegen den Erwartungen unterhalb 40 μ praktisch nicht verändert. Der Druckabfall ΔP allerdings wird mit Abnahme der Teilchengröße immer grösser. Da die Pumpe nur bis 200 atm eingesetzt werden kann, ist es bei der Geschwindigkeit $u = 0.31$ cm sec⁻¹ und einer Teilchengröße von 5–10 μ schon unmöglich, die Trennkolonne auf 1 m zu verlängern. Der Druckabfall von 10 atm beim Korngrößenbereich 30–40 μ erlaubt dagegen eine mehrfache Verlängerung der Kolonne ohne Verschlechterung der Bodenhöhe und damit eine bessere Trennung bei geringerer Beanspruchung des Geräts. Es ist also nach den hier beschriebenen Fällen nur ratsam, die schnelle Flüssigkeitschromatographie an Kieselgel über 30 μ zu betreiben.

Die schlechte Trennleistung bei Teilchengrößen unter 30 μ ist wohl nicht auf die

Teilchengröße selbst, sondern auf die Geometrie der Packung zurückzuführen. Es ist natürlich denkbar, dass durch Benutzung kugelförmiger Teilchen oder besonders ausgefeilter Säulenfüllmethoden sich die Bodenhöhe bei kleinen Teilchengrößen verbessern lässt. Ein anderer Weg zur Verbesserung der Trennleistung wird beschritten, wenn man chromatographisch inerte Glaskugeln mit Kieselgel beschichtet⁸.

DER EINFLUSS DER GESCHWINDIGKEIT

Wie eingangs gesagt, soll die schnelle Flüssigkeitschromatographie auch möglichst schnell ablaufen. Die Kinetik der sich in der Trennkolonne einstellenden Gleichgewichtszustände ist abhängig von der linearen Geschwindigkeit der beweglichen Phase u . Aus Fig. 3 geht hervor, dass die Bodenhöhe H mit steigender Geschwindigkeit grösser wird und sich damit die Trennung verschlechtert. Bei Geschwindigkeiten bis etwa 1 cm sec^{-1} ist der Anstieg der Bodenhöhe vergleichsweise steiler als bei höheren Geschwindigkeiten. Man hat sich also von Fall zu Fall zu entscheiden, ob man eine langsame Trennung mit hoher Auflösung oder eine schnelle Trennung mit geringerer Auflösung haben will. Ist die Auftrennung bei 1 cm sec^{-1} noch ausreichend — das entspricht einer Durchflussrate von 65 ml h^{-1} — so kann ohne grossen Verlust an Trennschärfe auch bei höherer Geschwindigkeit gearbeitet werden.

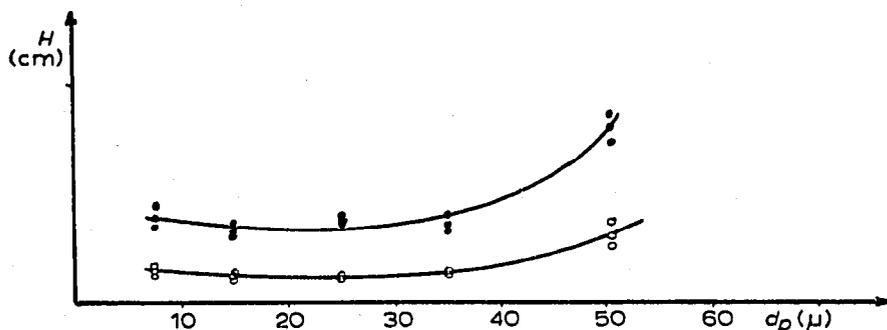


Fig. 2. Die Beziehung zwischen Teilchengröße und Bodenhöhe. Kieselgel 60 Å belegt mit 40% (g/g) Fractonitril III, $u = 0.31 \text{ cm sec}^{-1}$, Anisol (\bullet , $k' = 1.0$) und Acetophenon (\circ , $k' = 4.5$).

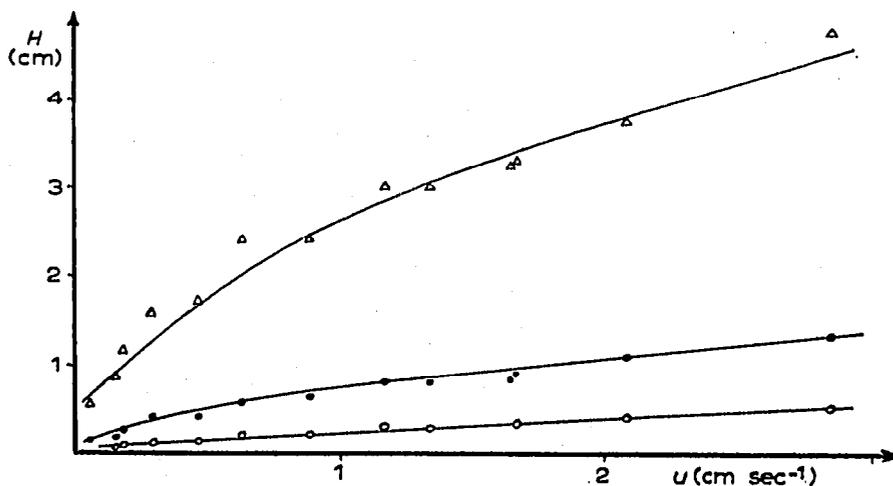


Fig. 3. Die Beziehung zwischen Bodenhöhe H und der linearen Durchflussgeschwindigkeit u . Kieselgel 60 Å (30–40 μ) belegt mit 40% (g/g) Fractonitril III, Toluol (Δ , $k' = 0.32$), Anisol (\bullet , $k' = 1.0$) und Acetophenon (\circ , $k' = 4.5$).

DER EINFLUSS DER BELEGUNG

Chromatographische Trennungen an Kieselgel kommen in den meisten Fällen durch das gleichzeitige Auftreten von Adsorptions- und Verteilungsvorgängen zustande. Belegungen des Kieselgels, sei es nun mit Wasser oder anderen Flüssigkeiten, können die Verteilungskoeffizienten entscheidend ändern. Besondere Fähigkeiten in Hinblick auf Belastbarkeit und Trennfähigkeit weisen die sogenannten schwerbeladenen Säulen in der Flüssigkeitschromatographie auf⁹. Mit zunehmender Belegung wird aus dem Adsorptionsgleichgewicht immer mehr ein Verteilungsgleichgewicht, mit dem gewöhnlich eine Vergrößerung der Bodenhöhe einhergeht. An Kieselgel 60 Å (40–63 μ) haben wir die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten k' bzw. der Bodenhöhe H von dem Grad der Belegung näher untersucht.

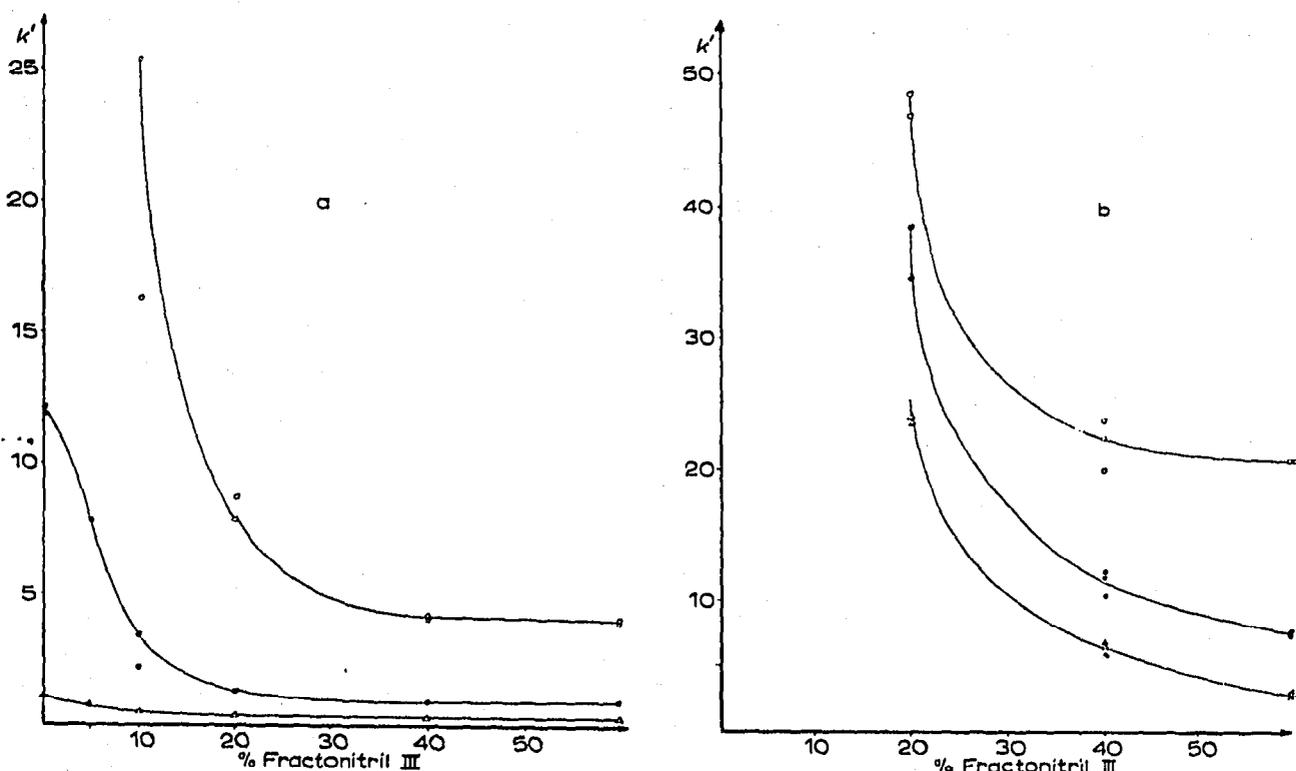


Fig. 4. Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten k' vom Belegungsgrad. Kieselgel 60 Å (40–63 μ), $u = 1.3 \text{ cm sec}^{-1}$. (a) Toluol (Δ), Anisol (\bullet) und Acetophenon (\circ); (b) Phthalsäurebutylester (Δ), Phthalsäureäthylester (\bullet) und Phthalsäuremethylester (\circ).

Substanzen mit hoher Polarität werden an den polaren Silanolgruppen des Kieselgels stärker festgehalten als weniger polare. In Fig. 4a wird dies anhand der Substanzen Toluol ($\epsilon = 2.38$), Anisol ($\epsilon = 4.41$) und Acetophenon ($\epsilon = 17.9$) deutlich. Besonders bei Acetophenon und Anisol macht sich der "Durchgriff" der Silanolgruppen bei Belegungen unter 20 % in einem sprunghaften Anstieg der k' -Werte stark bemerkbar. Analoge Verhältnisse gelten nach Fig. 4b für Phthalsäurebutylester ($\epsilon = 6.1$), Phthalsäureäthylester ($\epsilon = 7.6$) und Phthalsäuremethylester ($\epsilon = 8.5$).

Weiterhin wurde der Einfluss des Belegungsgrades auf die Bodenhöhe untersucht. Für die schon genannten Substanzen wächst nach Fig. 5a und 5b mit dem Be-

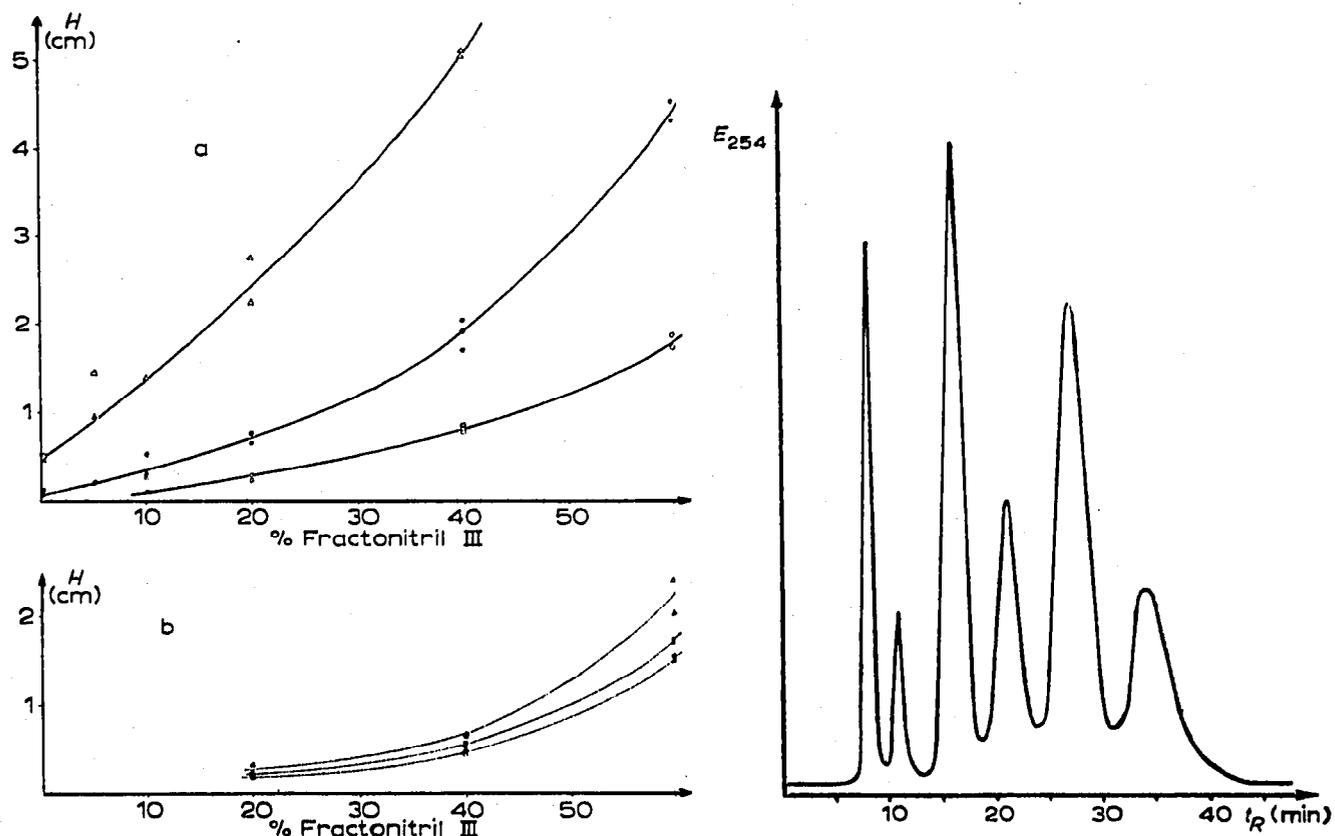


Fig. 5. Der Einfluss des Belegungsgrades auf die Bodenlänge. Kieselgel 60 Å (40–63 μ), $u = 1.3$ cm sec^{-1} . (a) Toluol (Δ), Anisol (\bullet) und Acetophenon (\circ) (b) Phthalsäurebutylester (Δ), Phthalsäureäthylester (\bullet) und Phthalsäuremethylester (\circ).

Fig. 6. Auftrennung von kondensierten Aromaten. Kieselgel 60 Å (40–63 μ) belegt mit 40% (g/g) Fractonitril III, $L = 150$ cm, $u = 0.45$ cm sec^{-1} . Peaks in der Reihenfolge Benzol, Naphthalin, Anthracen, Fluoranthren, 1,2-Benzanthracen und 4,5-Benzpyren.

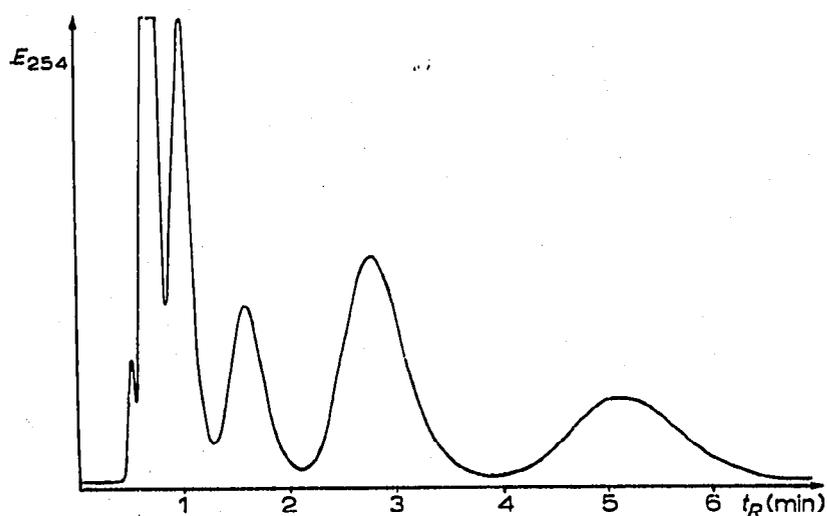


Fig. 7. Auftrennung von *m*-Oligophenylenen. Kieselgel 60 Å (30–40 μ) belegt mit 40% (g/g) Fractonitril III, $L = 50$ cm, $u = 0.83$ cm sec^{-1} , $t_0 = 5.65$ sec. Peaks in der Reihenfolge Benzol ($k' = 0.38$), Biphenyl ($k' = 0.89$), *m*-Terphenyl ($k' = 1.67$), *m*-Quarterphenyl ($k' = 3.24$), *m*-Quinquephenyl ($k' = 6.37$) und *m*-Hexaphenyl ($k' = 12.52$).

legungsgrad auch die Bodenhöhe und zwar besonders stark bei Belegungen über 40 %.

Mann kommt also zu folgendem Ergebnis: Für unser chromatographisches System und die darauf getrennten polaren Substanzen treten grosse k' -Werte mit kleinen Bodenhöhen bei geringer Belegung und andererseits kleine k' -Werte mit grossen Bodenhöhen bei hoher Belegung auf. Aus diesen beiden Extremen ergab sich für unseren Fall ein Kompromiss mit einer Belegung von 40 %, der noch eine schnelle Trennung bei ausreichender Bodenhöhe erbrachte. Das Prinzip der Veränderung des Belegungsgrades dürfte allgemein bei der Lösung von Trennproblemen helfen.

Zum Schluss seien noch zwei Trennbeispiele angegeben, die an mit 40 % (g/g) Fractonitril belegtem Kieselgel durchgeführt wurden. Auf Fig. 6 ist die Auftrennung von kondensierten Aromaten und auf Fig. 7 die von *m*-Oligophenylenen wiedergegeben. Oligophenylene eignen sich gut zur Charakterisierung der Sorptionsenergie¹⁰. Trägt man $\log t_R'$ gegen die Anzahl der Phenylkerne auf, so ergibt sich eine Gerade, deren Steigung ein Mass für die Sorptionsenergie pro Phenylkern darstellt.

DANK

Herrn Professor I. HALÁSZ, Institut für physikalische Chemie der Universität Frankfurt, danken wir für anregende Diskussionen.

SYMBOLVERZEICHNIS

d_p = Teilchengrösse des Trägermaterials (μ)

H = $L/16 (w/t_R')^2$ = Bodenhöhe (cm)

K = $\eta Lu/\Delta P$ = Permeabilität (cm^2)

k' = t_R'/t_0 = Massenverteilungskoeffizient

L = Länge der Kolonne (cm)

ΔP = Druckabfall an der Kolonne (1 atm = 9.81×10^5 dyn cm^{-2})

t_0 = Durchbruchzeit der Inertbande (sec)

t_R = Retentionszeit (sec)

t_R' = $t_R - t_0$ = Reduzierte Retentionszeit

u = L/t_0 = Lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase (cm sec^{-1})

w = Bandenbreite (sec)

ϵ = Dielektrizitätskonstante bei 20°

η = Viskosität der beweglichen Phase (poise)

ρ = Schüttgewicht (g cm^{-3})

40 % (g/g) bedeutet, dass z.B. 40 g Fractonitril von 100 g Kieselgel aufgenommen wurden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwendbarkeit von Kieselgel mit einem Porendurchmesser von 60 Å wurde für den Gebrauch in der schnellen Flüssigkeitschromatographie untersucht. Dabei wurde der Einfluss des Säulenfüllens, der Teilchengrösse, der Geschwindigkeit der mobilen Phase und des Belegungsgrades auf die Trennung berücksichtigt. Nach den gewonnenen Ergebnissen empfiehlt es sich, die Säulen durch Aufstossen zu füllen, bei Teilchengrössen über 30 μ und bei einer Geschwindigkeit um 1 cm sec^{-1} zu

arbeiten. Die Höhe des Belegungsgrades muss dem jeweiligen Trennproblem angepasst werden.

LITERATUR

- 1 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
- 2 I. HALÁSZ, H. O. GERLACH, A. KRONEISEN UND P. WALKING, *Z. Anal. Chem.*, 234 (1968) 97.
- 3 H. N. M. STEWART, R. AMOS UND S. G. PERRY, *J. Chromatogr.*, 38 (1968) 209.
- 4 J. F. K. HUBER, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 85.
- 5 S. T. SIE UND N. VAN DEN HOED, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 257.
- 6 B. L. KARGER, K. CONROE UND H. ENGELHARDT, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 242.
- 7 L. R. SNYDER, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 352.
- 8 B. L. KARGER, H. ENGELHARDT, K. CONROE UND I. HALÁSZ, *Intern. Symp. Gas Chromatogr., Dublin, 1970*, paper 5.
- 9 I. HALÁSZ, E. ENGELHARDT, J. ASSAUER UND B. L. KARGER, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1460.
- 10 F. GEISS, H. SCHLITT UND S. SANDRONI, *J. Chromatogr.*, 48 (1970) 46.

J. Chromatogr., 57 (1971) 373-381