

CHROM. 5245

## CHROMATOGRAPHISCHE ANWENDUNG DES POLYÄTHYLENGLYKOL-DIMETHACRYLAT-GELS MERCKOGEL® PGM 2000 UNTER NORMAL- UND HOCHDRUCK

D. RANDAU, H. BAYER UND W. SCHNELL

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

(Eingegangen am 7. Januar 1971)

## SUMMARY

*Chromatographic applications of the polyethylene glycol dimethacrylate gel Merckogel® PGM 2000 under normal and high pressure*

Merckogel® PGM 2000 is a gel derived from polyethylene glycol dimethacrylates, which is suitable for gel permeation chromatography in aqueous and non-aqueous systems. Because of its high mechanical stability it can be used also for high-speed liquid chromatography under increased pressure. In this work chromatographic separations of polyethylene glycols, beers, and proteins are described, which have been carried out under different conditions.

## EINLEITUNG

Weit verbreitet sind hydrophile Gele für die Gelchromatographie, die durch Vernetzung von Dextranen\* oder Acrylamid\*\* hergestellt werden. Da diese Gele in gequollenem Zustand von weicher Konsistenz sind und sich daher leicht komprimieren lassen, ist man gezwungen, die säulenchromatographischen Trennungen unter einem niedrigen hydrostatischen Druck durchzuführen. Somit ist bei kleiner Durchflussgeschwindigkeit eine lange Analysendauer nötig. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die Dextran-Gele von Mikroorganismen zersetzt werden können.

Von HEITZ und Mitarbeitern<sup>1,2</sup> wurden Gele mit hoher mechanischer Stabilität entwickelt, die nach dem Prinzip einer heterogen-vernetzenden Polymerisation hergestellt werden. Dabei wird ein in Wasser durch Rühren dispergiertes Gemisch von Polyäthylenglykol- und Äthylenglykol-dimethacrylat in Gegenwart eines Initiators und einer Inertkomponente copolymerisiert. Das in Perlforn anfallende Polyäthylenglykoldimethacrylat-Gel quillt sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln. Die chromatographischen Eigenschaften eines derartigen Gels mit dem Ausschlussmolekulargewicht 2500, das unter der Bezeichnung Merckogel® PGM 2000 demnächst im Handel ist\*\*\*, sollen im folgenden beschrieben werden.

\* Sephadex der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden.

\*\* Biogel der Firma Bio-Rad-Laboratories, 8 München 13, B.R.D.

\*\*\* E. Merck, Darmstadt; Patente im In- und Ausland angemeldet.

## EXPERIMENTELLES

Für säulenchromatographische Trennungen an Merckogel® PGM 2000 unter Normaldruck, d.h. unter dem hydrostatischen Druck des sich oberhalb der Säule befindlichen Fliessmittelreservoirs, wurden Glassäulen von 1 m Länge und 1.4 cm I.D. benutzt. Lediglich die Abtrennung der Glucose-Oxydase wurde in einer Glassäule mit 2.5 cm Durchmesser durchgeführt. Beim Füllen der Säulen sedimentierte das über Nacht im Fliessmittel ausgequollene Gel im Laufe von ca. 3 h unter Vibrieren und gleichzeitigem Drehen der Säule<sup>3</sup>. Trennungen mit nur etwas geringerer Auflösung wurden erhalten, wenn die Säule durch einfaches Sedimentieren gefüllt wurde. Die Substanzgemische wurden mit einer Pipette vorsichtig aufgetragen. Die Detektion erfolgte entweder differentialrefraktometrisch mit dem LDC 1103\* oder spektralphotometrisch bei 280 nm mit dem LDC 1205\*. Die Durchlaufgeschwindigkeiten, in den meisten Fällen ca. 8 ml/h, sind aus den Figuren ersichtlich.

Trennungen unter erhöhtem Druck wurden in dem Universal-Flüssigkeits-Chromatographen UFC 1000\* durchgeführt. In einer Druckapparatur wurde eine durch einen Magnetrührer in Wasser aufgewirbelte Aufschlammung des Gels (nach Nass-siebung 100–125  $\mu$ ) in eine Stahlsäule (50 cm  $\times$  4 mm) bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 80–110 ml/h überführt<sup>4</sup>. Der Druck stieg bei dieser Füllmethode im Laufe einer Stunde auf 40–50 atm. Für die anschliessenden Trennungen wurden zwei derartig gefüllte Säulen über ein Kappilarrohr miteinander verbunden. Die Injektion der Substanzproben (2.5  $\mu$ l bei den Äthylenoxiden, 5  $\mu$ l bei den Bieren) erfolgte mit Hilfe einer Hochdruck-Hamilton-Spritze über ein Schleusensystem bei laufendem Gerät. Die Detektoren waren die gleichen wie bei den Trennungen unter Normaldruck.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

*Physikalische Eigenschaften*

Das trockene Merckogel® PGM 2000 stellt ein farbloses Perlpolymerisat dar, das auf Grund seiner Polyätherstruktur in Lösungsmitteln unterschiedlichster Polarität zu quellen vermag. In Tabelle I, sind die spezifischen Gelbettvolumina  $V_G$  zusammen mit den Dielektrizitätskonstanten für einige typische Fliessmittel angegeben.

Merckogel® PGM 2000 ist in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln beständig, wird von verdünnten Säuren oder Laugen nicht verseift und ist resistent gegenüber Mikroorganismen.

Ein entscheidender Vorteil des Merckogel® PGM 2000 besteht darin, dass es auch hohen Drucken standhält und damit als Träger für die schnelle Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie geeignet ist. Nach Ausquellen des Gels in Wasser und nasser Aussiebung der Kornfraktion 100–125  $\mu$  wurde in einer Säule 1 m  $\times$  4 mm die Abhängigkeit zwischen Druck und Durchflussrate bestimmt. Aus Tabelle II ist ersichtlich, dass ab 40 atm die Durchflussgeschwindigkeit nicht mehr ansteigt. Das Gel wird also von diesem Druck ab komprimiert und eine optimale Probenaufnahme ist nicht mehr möglich. Wir haben daher unsere Untersuchungen bevorzugt bei 10 atm durchgeführt.

---

\* Firma Hupe & Busch, Grötzingen (Karlsruhe), B.R.D.

TABELLE I

 SPEZIFISCHE GELBETTVOLUMINA  $V_G$  VON MERCKOGEL® PGM 2000 IN VERSCHIEDENEN FLIESSMITTELN

Fließmittel	Dielektrizitätskonstante	Gelbettvolumen, $V_G$ (ml/g)
Benzol	2.28	9.5
Toluol	2.38	7.5
Chloroform	4.81	6
Tetrahydrofuran	7.58	6.8
Methanol	33.62	4.3
Dimethylformamid	36.7	4.3
Wasser	80.37	4.5

TABELLE II

 ABHÄNGIGKEIT ZWISCHEN DRUCK UND DURCHFLUSSGESCHWINDIGKEIT BEI MERCKOGEL® PGM 2000 (100–125  $\mu$ )

 Säule, 100 cm  $\times$  4 mm; Fließmittel, Wasser.

	Druck (atm)						
	5	10	20	30	40	80	155
Durchflusssgeschwindigkeit (ml/h)	15.0	34.0	72.8	96.0	108.0	108.0	108.0
(ml/h/cm <sup>2</sup> )	119	270	580	713	858	858	858

### Trennungen von Polyäthylenglykolen

Polyäthylenglykole können an Merckogel® PGM 2000 sowohl mit Tetrahydrofuran als auch mit Wasser als Fließmittel getrennt werden. Nach Fig. 1 ist die Beziehung zwischen  $\log M$  und  $V_E$  für Wasser linear, während sie für Tetrahydrofuran einen nicht linearen Verlauf annimmt. In beiden Fließmitteln liegt das Ausschlussmolekulargewicht bei etwa 2500.

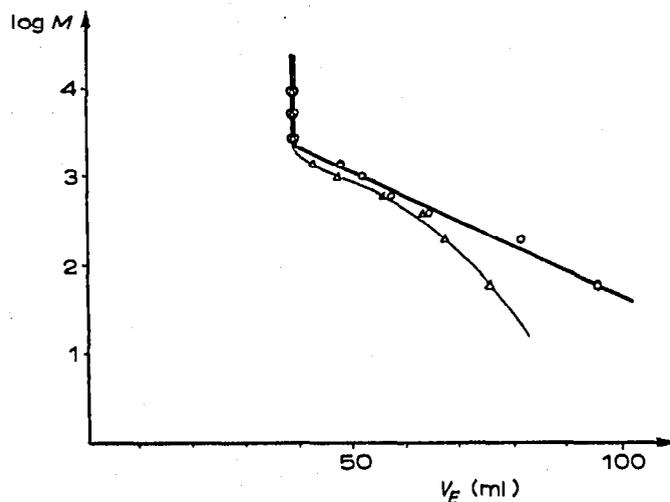


Fig. 1. Die Beziehung zwischen  $\log M$  und  $V_E$  bei Polyäthylenglykolen in Wasser (O) bzw. Tetrahydrofuran ( $\Delta$ ). Säulen, 100  $\times$  1.4 cm.

Ein Gemisch aus Äthylenglykolen mit den deklarierten Molekulargewichten 10000 (I), 600 (II), 200 (III) und 62 (IV) wurde an Merckogel® PGM 2000 mit Wasser als Fließmittel unter verschiedenen apparativen Bedingungen aufgetrennt. In einer herkömmlichen Säule (1 m × 1.4 cm) unter Normaldruck und bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 8 ml/h trennten sich die vier Substanzen im Laufe von 12½ h gut auf (Fig. 2a). In einer 1 m langen Stahlsäule mit 4 mm Innendurchmesser liess sich das Gemisch bei 10 atm Druck (34 ml/h) innerhalb von 20 min trennen (Fig. 2b) und bei 15 atm (50 ml/h) noch hinreichend gut in 13 min (Fig. 2c). Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass man mit zunehmender Analysengeschwindigkeit eine geringere Auflösung in Kauf nehmen muss.

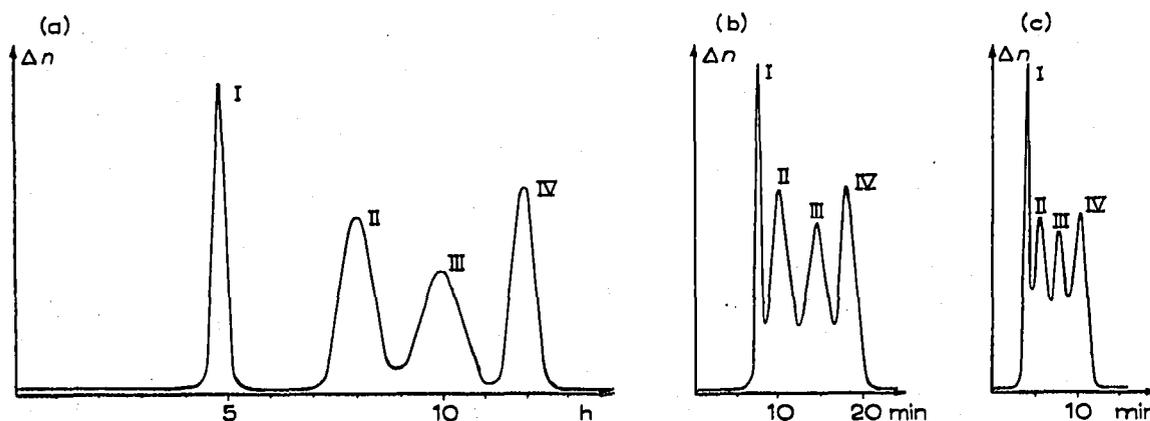


Fig. 2. Trennung von Äthylenglykolen an Merckogel® PGM 2000. Fließmittel, Wasser. (a) Säule 100 × 1.4 cm; Normaldruck. (b) Säule 100 cm × 4 mm; 10 atm Druck. (c) Säule 100 cm × 4 mm; 15 atm Druck.

Nach Auswertung der Trennungen ergab sich, dass die lineare Beziehung zwischen  $\log M$  und  $V_E$  bei allen Durchlaufgeschwindigkeiten gewahrt blieb. Dieses stimmt mit an Polystyrol-Gelen gewonnenen Ergebnissen überein<sup>5</sup>.

#### Charakterisierung verschiedener Biere

In der Lebensmittelchemie besteht das Bedürfnis nach einer einfachen und schnellen Charakterisierung von Nahrungsmitteln. Es war zu erwarten, dass sich die Bestandteile des Bieres wenigstens teilweise an Merckogel® PGM 2000 mit Wasser als Fließmittel würden auftrennen lassen. In Fig. 3 sind die chromatographischen Auftrennungen von Export-, Malz- und Diätbier einander gegenübergestellt. Die linken drei Chromatogramme sind das Ergebnis von Trennungen in der Normalsäule (100 × 1.4 cm) wobei jeweils 0.5 ml entgastes Bier aufgegeben wurden. Die in der Mitte und rechts abgebildeten Diagramme entstanden bei der Chromatographie unter einem Druck von 10 atm in einer Säule von 1 m × 4 mm. Injiziert wurden jeweils 5  $\mu$ l Bier, die Detektion erfolgte sowohl differentialrefraktometrisch als auch absorptionsphotometrisch bei 280 nm. Der Vergleich der Fig. 3a–3b, 3d–3e und 3g–3h zeigt wieder, dass mit steigender Analysengeschwindigkeit eine Abnahme der Trennschärfe einhergeht. Aus den Fig. 3c, 3f und 3i geht hervor, dass die absorptionsphotometrische Analyse wesentlich differenziertere Aussagen gibt als die differentialrefraktometrische. Der zuerst auftretende Peak, der die von dem Gel ausgeschlossenen Substanzen enthält, erlaubt eine quantitative Aussage über den Gehalt an hochmolekularen Substanzen in

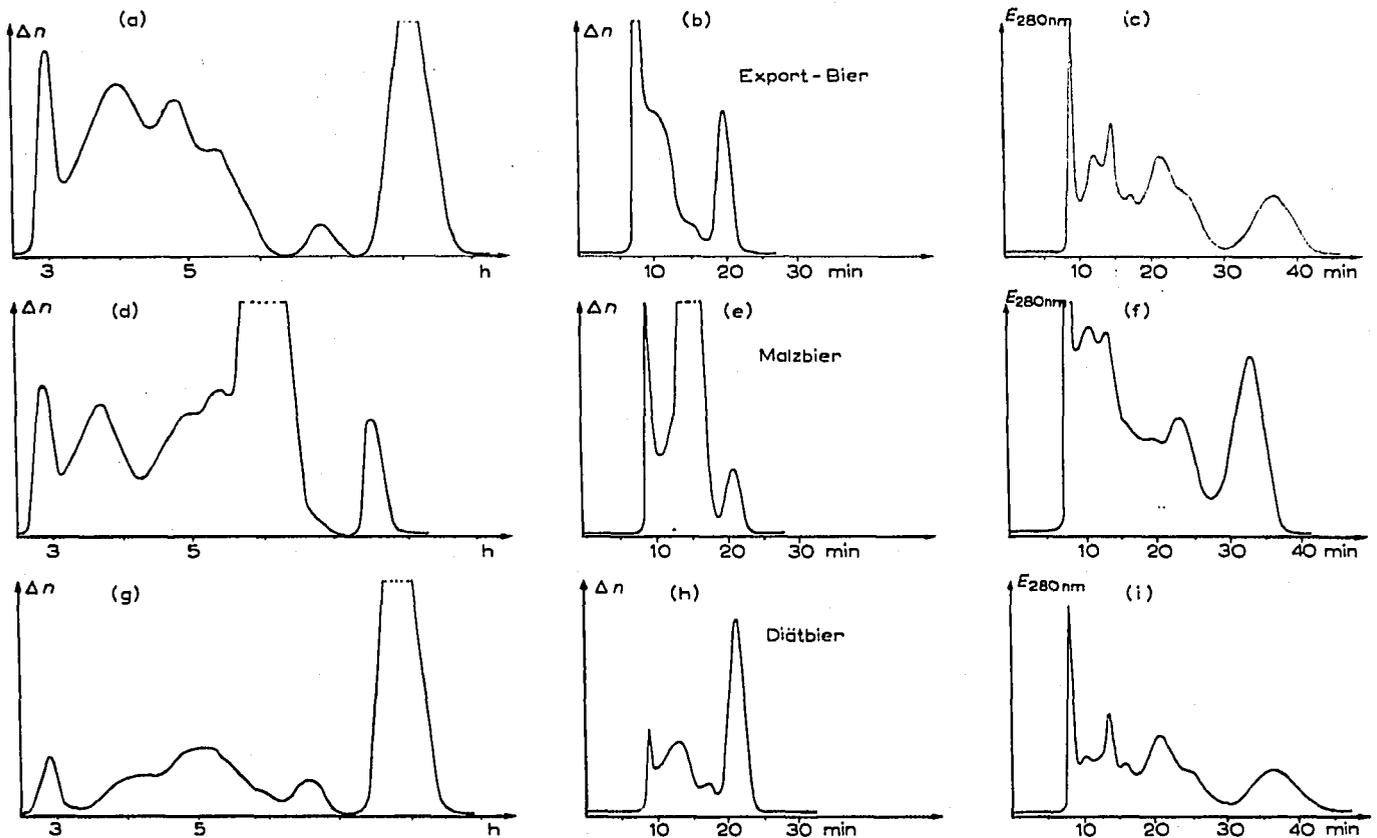


Fig. 3. Chromatographische Auftrennung verschiedener Biere an Merckogel® PGM 2000 (Erläuterung im Text).

der entsprechenden Probe. Wenn auch keine der getrennten Substanzen isoliert und aufgeklärt wurde, so ist als Ergebnis doch festzuhalten, dass an Merckogel® PGM 2000 mit Hilfe der schnellen Flüssigkeitschromatographie auf einfache Weise ein charakteristischer "fingerprint" von Bieren erhalten werden kann.

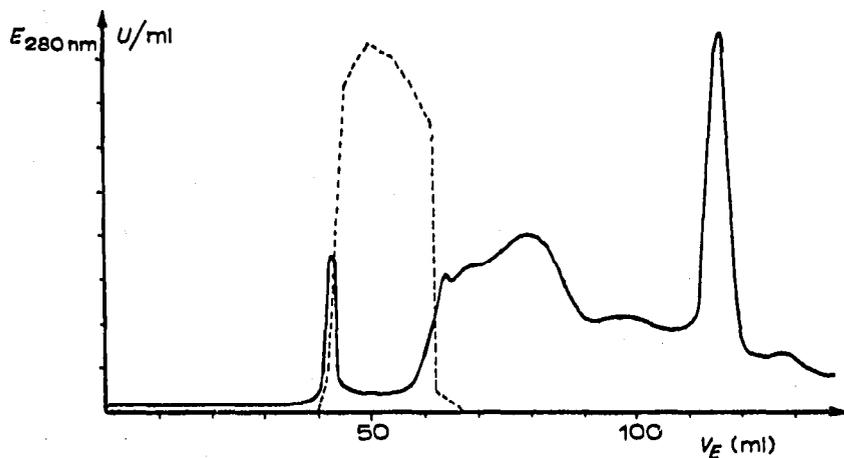


Fig. 4. Abtrennung von Glucose-Oxidase (GOD) aus einem Kulturfiltrat. Säule, 72.5 × 2.5 cm. (---) U/ml; (—) E<sub>280 nm</sub>.

### Abtrennung von Proteinen

50 ml eines Glucose-Oxidase (GOD) enthaltenden Kulturfiltrats wurden auf eine mit Merckogel® PGM 2000 gefüllte Säule (72.5 × 2.5 cm) gegeben. Als Fliessmittel diente ein mit 1 N Salzsäure eingestellter 0.05 M Trispuffer von pH 6.5 in 1 M Natriumchlorid-Lösung. Neben der UV-Absorption wurde die Enzymaktivität im Eluat bestimmt. Nach Fig. 4 konnte das Enzym von fast allen Begleitstoffen befreit in reiner Form isoliert werden. In einer anderen Untersuchung liess sich mit 1 % Essigsäure als Fliessmittel ein Gemisch aus Ribonuclease (V), Bacitracin (VI) und Tyrosin (VII) auftrennen (Fig. 5). Es ist zu erwarten, dass sich Merckogel® PGM 2000 besonders bei Enzymabtrennungen im grossen Masstab bewähren wird, weil es druckstabil und resistent gegenüber Mikroorganismen ist.

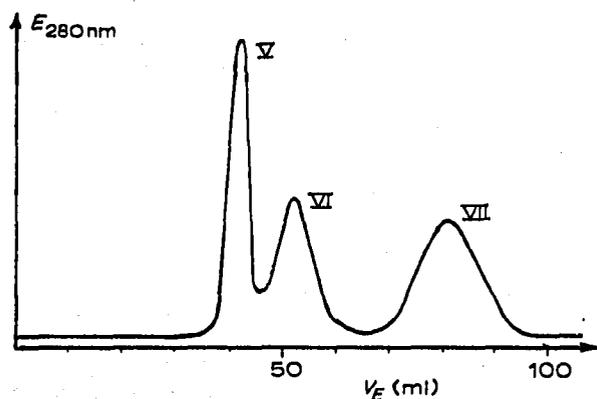


Fig. 5. Auftrennung von Ribonuclease (V), Bacitracin (VI) und Tyrosin (VII). Säule, 100 × 1.4 cm; Fliessmittel, 1 % Essigsäure.

### ZUSAMMENFASSUNG

Merckogel® PGM 2000 ist ein aus Polyäthylenglykoldimethacrylaten hergestelltes Gel, das sich zur Gelchromatographie in wässrigen und nichtwässrigen Systemen eignet. Wegen seiner hohen mechanischen Stabilität lässt es sich auch für die schnelle Flüssigkeitschromatographie unter erhöhtem Druck einsetzen. In dieser Arbeit sind unter verschiedenen Bedingungen durchgeführte chromatographische Trennungen von Polyäthylenglykolen, Bieren und Proteinen beschrieben.

### LITERATUR

- 1 W. HEITZ UND H. WINAU, *Makromol. Chem.*, 131 (1970) 75.
- 2 W. HEITZ, *Angew. Chem.*, 82 (1970) 675.
- 3 W. HEITZ, K. KLATYK, F. KRAFFCZYK, K. PFITZNER UND D. RANDAU, *7th Intern. Seminar Gel Permeation Chromatogr., Monte Carlo, October, 1969*, S. 214.
- 4 W. HEITZ UND J. ČOUPEK, *J. Chromatogr.*, 36 (1968) 290.
- 5 J. N. LITTLE, J. L. WATERS, K. J. BOMBAUGH UND W. J. PAUPLIS, *Chimia, (Aarau), Suppl.* (1970) 128.