

CHROM. 6701

Note

Säulenchromatographische Trennung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe

Trennung an organischen Gelen in protischen Lösungsmitteln

H.-J. KLIMISCH und D. REESE

*Forschungsinstitut der Zigarettenindustrie e.V.**, Gazellenkamp 38, D 2 Hamburg 54 (B.R.D.)

(Eingegangen am 26. Februar 1973)

Die Adsorptionschromatographie an organischen Trägermaterialien hat aufgrund der Trennkraft und Selektivität der Systeme zunehmend Beachtung gefunden. Durch Arbeiten von Wilk¹, Oelert² und Streuli³ ist besonders das lipophile Gel Sephadex LH-20 auf sein Trennverhalten gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) in Alkoholen und Acetonitril untersucht worden. In diesen Lösungsmitteln zeigte sich eine beachtliche Trennung der PAH infolge energetischer Wechselwirkungen der π -Bindung mit dem Gelträger. Es erschien daher sinnvoll, weitere Geltypen in anderen Lösungsmitteln auf ihr Trennverhalten gegenüber PAH zu prüfen, um optimale Trennbedingungen zu diskutieren.

MATERIAL UND METHODEN

Als Gele wurden eingesetzt (siehe Tabelle I): Sephadex LH-20 (Deutsche Pharmacia GmbH), sowie gesiebte Fraktionen von: Bio Beads SX-8 (Bio-Rad Laboratories); Styragel 50–80 Å (Waters Messtechnik GmbH); Merckogel OR-PVA 500 (Merck AG); Sephadex G-10 und ein hydroxypropyliertes Sephadex G-10 (Deutsche Pharmacia GmbH).

Die verwendeten destillierten Lösungsmittel wurden über Aluminiumoxid-Säulen (W 200, Woelm) gereinigt. Die Gele wurden durch Sedimentationspackung in die Säulen (Chromatonix, Serva-Technik) gefüllt und mehrere Stunden bei einem Gegendruck, der um 10–20% über dem späteren Arbeitsdruck lag, mit dem Lösungsmittel gewaschen.

1–10 μ l der Eichsubstanzen wurden (Tabelle II) als gesättigte Lösungen im jeweiligen Laufmittel in die Säule injiziert, und diese mit Hilfe von Pumpen entwickelt (Vario-Perpex (LKB), Orlita 3-fach Dosier-Membranpumpe Typ M-3-S-4). Als Detektor diente ein Spektralphotometer PMQ II (Firma Zeiss) mit einer 8- μ l Durchflussküvette.

* Direktor: Prof. Dr. W. Dontenwill.

TABELLE I

TRENNVERHALTEN DER UNTERSUCHTEN SÄULEN

No.	Gele	Partikel- durchmes- ser $d_p = \mu\text{m}$	Säulen- dimen- sionen (cm)	Lösungsmittel	Elutions- geschwin- digkeit (cm/sec)	Druck ΔP	Elutions- volumen V_e (ml) von Anthracen
1	Sephadex LH-20	25-100	1.27 × 100	Isopropanol	0.02	2	167.0
2	Sephadex LH-20	25-100	1.27 × 100	Isopropanol	0.03	4	167.5
3	Sephadex LH-20	25-100	1.27 × 33	Methanol	0.01	—	35.8
4	Sephadex LH-20	25-100	0.6 × 58	Acetonitril	0.05	1.4	16.3
5	Sephadex LH-20	25-100	0.6 × 58	Methyläthylketon	0.04	—	11.1
6	Sephadex LH-20	25-100	0.6 × 58	Aceton	0.04	—	12.4
7	Sephadex G-10	71- 80	0.6 × 58	Methanol	0.03	—	17.2
8	Hydroxypropyl- Sephadex G-10	71- 90	0.3 × 150	Isopropanol	0.02	5	18.0
9	Merckogel OR-500	36- 63	1.27 × 33	Methanol	0.01	1.1	65.8
10	Merckogel OR-500	36- 63	0.6 × 58	Isopropanol	0.04	4.5	49.5
11	Merckogel OR-500	36- 63	0.6 × 58	Acetonitril	0.04	3	16.5
12	Merckogel OR-500	36- 63	0.6 × 58	Aceton	0.05	—	12.7
13	Styragel 50-80 Å	36- 63	2.5 × 45	Methyläthylketon	0.01	—	110.0
14	Bio-Beads SX-8	36- 63	0.6 × 58	Aceton	0.04	—	14.0
15	Bio-Beads SX-8	36- 63	0.6 × 58	Methanol	0.04	0.5	6.4
16	Bio-Beads SX-8	36- 63	0.6 × 58	Isopropanol	0.04	2.6	7.5
17	Bio-Beads SX-8	36- 63	2.5 × 45	Methyläthylketon	0.01	—	95.0

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Einfluss von Gelstruktur und Lösungsmittel

Zum Vergleich der Trenneffektivitäten der verschiedenen Systeme sind die relativen Elutionsvolumina der PAH, bezogen auf Anthracen, in Tabelle II aufgeführt. Gegenüber den in der Literatur veröffentlichten Werten¹⁻³ der Sephadex LH-20 Säulen in Isopropanol, Acetonitril und Methanol liessen sich die Trennungen verbessern. Wir führen diesen Befund auf eine verbesserte Packungsmethode zurück.

Vergleicht man die Werte verschiedener Gele im gleichen Lösungsmittel, so erkennt man den deutlichen Einfluss der chemischen Struktur des Trägers.

Am Beispiel des Lösungsmittels Isopropanol kann gezeigt werden, dass von den hier aufgeführten Gelen das Polyvinylacetat-Gel OR-PVA ein stärkeres Bindungsvermögen zu den PAH als das Gel-Sephadex LH-20 aufweist. Bemerkenswert ist dabei, dass sich die Reihenfolge der Elutionswerte der beiden isomeren Benzpyrene umkehrt. Demnach könnten neben der Ausbildung von Bindungen auch sterische Merkmale des Gels bzw. des PAH das Trennverhalten beeinflussen.

Ein Unterschied in der Porengrösse der Gele Sephadex LH-20 und hydroxypropyliertes Sephadex G-10 lässt den Effekt erkennen, dass mit abnehmender Porengrösse die Adsorption am Träger zunimmt. Damit verbessert sich eine Auftrennung z.B. der isomeren Benzpyrene.

Gele, die aus einer Polystyrolmatrix bestehen, wie z.B. Bio-Beads SX-8, zeigen dagegen in Isopropanol keinen Trenneffekt auf der Basis der Adsorption. Es deutet sich im Gegenteil eine gelchromatographische Trennung an.

TABELLE II

RELATIVE ELUTIONSVOLUMINA EINIGER PAH, BEZOGEN AUF ANTHRACEN

LH-20 = Sephadex LH-20; SX-8 = Bio-Beads SX-8; OR-500 = Merckogel OR-500; G-10 = Sephadex G-10; LH-10 = hydroxypropyliertes Sephadex G-10; Styr. = Styragel 50-80 Å.

Substanz	Lösungsmittel																
	Methanol			Isopropanol			Aceton			Methyläthylketon			Acetonitril				
	LH-20	G-10	SX-8	OR-500	LH-20	SX-8	OR-500	LH-10	LH-20	SX-8	OR-500	LH-20	SX-8	Styr.	LH-20	OR-500	
Benzol	0.78	0.58	1.04	0.40	0.62	1.01	0.34	0.43	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Naphthalin	—	0.73	1.02	0.60	0.76	1.00	0.55	0.50	—	—	—	—	—	—	—	0.83	0.83
Anthracen	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Phenanthren	1.12	1.05	1.00	1.02	1.02	1.00	1.04	1.04	1.00	0.96	1.00	1.02	0.98	—	—	1.00	1.01
Naphthacen	—	—	—	1.80	—	—	—	—	1.05	1.21	1.08	1.08	1.04	1.05	1.08	1.27	1.28
Pyren	1.28	1.34	1.06	1.44	1.18	0.98	1.34	1.28	1.09	1.16	1.10	1.05	1.06	1.07	1.22	1.22	1.24
3,4-Benzopyren	1.78	2.29	0.98	2.86	1.77	0.98	2.68	2.22	1.20	1.46	1.22	1.11	1.19	1.17	1.65	1.65	1.65
1,2-Benzopyren	1.89	2.50	0.98	2.81	1.82	0.98	2.42	2.41	1.20	1.45	1.24	1.11	1.20	—	1.69	1.62	1.62
Perylen	—	—	1.02	—	1.95	0.99	—	2.50	1.25	1.57	1.25	1.15	1.25	1.24	1.73	1.73	1.73
1,12-Benzperylene	—	—	1.01	—	2.14	0.97	—	3.11	1.31	—	1.40	1.17	1.33	1.36	2.10	2.12	2.12
Coronen	—	—	0.96	—	2.44	0.96	—	4.00	1.44	1.89	1.54	1.20	1.41	1.52	2.92	2.73	2.73

In dem Lösungsmittel Methanol kann man etwa den gleichen Trend erkennen. In Relation zu Isopropanol liegen die Elutionsvolumina der PAH höher, was auf eine verstärkte Adsorption in diesem Lösungsmittel hindeutet. Diese Eigenschaft führt zu einer verbesserten Auftrennung niedrig kondensierter PAH. Das System Sephadex LH-20-Methanol lässt eine Trennmöglichkeit der isomeren Verbindungen Phenanthren und Anthracen erkennen.

In Acetonitril erhält man niedrigere Elutionsvolumina der PAH, die Zonenbreiten der Peaks sind etwas kleiner. Die Trennung wird jedoch nicht verbessert. Im Vergleich Polyvinylacetat-Gel-Sephadex LH-20 ist wiederum eine Umkehr bei der Elution der Benzpyrene zu beobachten. Die beiden geprüften Ketone, Aceton und Methyläthylketon, bewirken dagegen schon eine merklich geringere Trennleistung bei den polaren Geltypen. Da Isopropanol ($\epsilon = 18.3$) und Methyläthylketon ($\epsilon = 18.5$) annähernd gleiche Dielektrizitätskonstanten haben, zeigt es sich, dass der Polaritätsgrad des Lösungsmittels keinen trennungsbestimmenden Einfluss hat.

Im Gegensatz zu den polaren Geltypen tritt nun ein deutlicher Trenneffekt bei den Polystyrol-Gelen Bio-Beads SX-8 und Styragel auf. Damit ist das Auftreten einer Adsorption erstmals auch bei diesen Gelstrukturen erwiesen. Polare Gruppen wie bei den Polyvinylacetat- bzw. Sephadex-Gelen sind demnach nicht eine ausschliessliche Bedingung für adsorptionschromatographische Trennvorgänge.

Vergleicht man die relativen Elutionsvolumina der Polystyrol-Gele in Ketonen mit denen der Polyvinylacetat- bzw. Sephadex-Gele in Alkohol, so wird man den polaren Geltypen aufgrund der höheren Trennleistung den Vorzug geben.

Einfluss der Elutionsgeschwindigkeit

Wurden gleiche Mengen Testsubstanz bei gleicher Temperatur auf die Säule gegeben und die Elutionsgeschwindigkeit v variiert, so konnten wir Befunde von Oelert² bestätigen, der einen linearen Zusammenhang zwischen Elutionsvolumenmaxima ($V_{e\max.}$) und v beschreibt.

Darüber hinaus scheint uns folgende Beobachtung für die Beurteilung des Trennverfahrens wichtig. Aus den in Tabelle III angegebenen Bereichswerten der Peak-Zonenbreiten der PAH lässt sich ablesen, dass bei erhöhter Geschwindigkeit v mit einer Verbreiterung der Elutionspeaks gerechnet werden muss. Die Trenneffektivität des Systems nimmt erheblich ab und die Nachweisgrenze sinkt. Dieser Befund widerspricht kürzlich geäußerten Erwartungen⁴, die Analysendauer in diesen Trennsystemen durch Verwendung höherer Drücke und damit grösserer Elutionsgeschwindigkeiten in Flüssigkeitschromatographen sinnvoll zu verkürzen.

TABELLE III

ZONENBREITE DES 3,4-BENZPYRENS BEI VERSCHIEDENEN ELUTIONSGESCHWINDIGKEITEN v (SÄULEN 1 UND 2 AUS TABELLE I)

Substanz	Zonenbreite(ml)	
	$v = 70 \text{ ml/h}$	$v = 110 \text{ ml/h}$
3,4-Benzpyren	52	110

Der Grund für die Vergrößerung des Elutionsvolumenbereichs bei zunehmender Geschwindigkeit dürfte in den langen Diffusionswegen liegen, die für die hochporösen Gele charakteristisch sind.

Für die Adsorptionschromatographie der PAH ergeben sich aus diesen Untersuchungsergebnissen folgende Bedingungen: Als Trennmaterialien sind hydroxypropylierte Sephadextypen genauso wie Polyvinylacetat-Gele zu empfehlen. Kleine Porengrösse und enger Korngrössenbereich bewirken eine höhere Trennkraft. Als Lösungsmittel eignen sich Alkohole, wobei die Auswahl von der Ringgrösse der zu trennenden PAH abhängt. Die Elutionsgeschwindigkeit darf nicht zu hoch gewählt werden. Als Richtwert bewährten sich Geschwindigkeiten, wie sie durch die Verwendung von Niveaugefässen erreicht werden.

Unter diesen Bedingungen stellt die Adsorptionschromatographie der PAH an organischen Gelen ein Trennsystem dar, dessen Reproduzierbarkeit und Trenneffektivität beachtlich sind.

DANK

Wir danken der Firma Pharmacia für die Herstellung des hydroxypropylierten Sephadex G-10.

LITERATUR

- 1 M. Wilk, J. Rochlitz und H. Bende, *J. Chromatogr.*, 24 (1966) 414.
- 2 H. H. Oelert, *Z. Anal. Chem.*, 244 (1969) 91.
- 3 C. A. Streuli, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 225.
- 4 R. Gladen, *Chromatographia*, 4 (1972) 236.