

CHROM. 15,360

Note

Selektive präparative gelchromatographische Trennung niedermolekularer Verbindungen an Sephadex LH-20

H. HENKE

Enka AG, Research Institute, Obernburg (B.R.D.)

(Eingegangen am 6. September 1982)

Unter Gel-Chromatographie versteht man im allgemeinen Trennung nach Molekülgrösse (Gelfiltration und Gelpermeation), wie man es auch mit dem hydroxypropylierten Dextrangel Sephadex LH-20 durchführen kann. Ausführliche Informationen theoretischer und praktischer Art können Monographien sowie Übersichtsartikeln^{1–5} entnommen werden. Dass neben dem Molekularsiebeffekt des Dextrangel auch andere Trenneigenschaften aufweisen kann, zeigen analytische^{4–12} und präparative Trennungen¹³. Wir verwenden nur Methanol als mobile Phase, d.h. es bedarf keiner Optimierung bezüglich der Zusammensetzung wie es in der Adsorption —oder Verteilungschromatographie erforderlich ist. Von präparativen säulenflüssigkeitschromatographischen Trennungen wird in erster Linie bei möglichst hoher Probenkapazität (Probenmenge/Trennung) eine ausreichende Trennung erwartet. Der benötigte Zeitaufwand pro Trennung ist ohne Bedeutung, wenn man bedenkt, dass mittels Fraktionensammler eine Automatisierung, d.h. Trennung über Nacht möglich ist, wie wir es seit Jahren praktizieren.

Über analytische, mikro- und semipräparative gelchromatographische Trennungen niedermolekularer aromatischer und heterocyclischer sowie aliphatischer Verbindungen an Sephadex LH-20 wurde bereits berichtet^{6–9,14–17}. Für spezielle Trennungen wurde das Gel auch modifiziert^{11,12}.

Hier werden in erster Linie praktische Erfahrungen mit einer echten und einfachen doch sehr leistungsstarken präparativen Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mitgeteilt sowie auf die Vielseitigkeit der Methode hingewiesen. Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche präparative Trennung ist eine ausreichende Löslichkeit der Probe in Methanol. Ob und wie gut Trennungen mit anderen mobilen Phasen durchführbar sind, wird z.Z. geprüft, wobei mit Aceton z.T. andere Elutionsreihenfolgen und bessere Trennungen als mit Methanol beobachtet werden können. Präparative Trennungen werden aus folgenden Gründen durchgeführt:

(1) Anwendung im organisch präparativen Labor, um teure, zeitraubende sowie oft umständliche Trennoperationen wie Destillation, Extraktion, Umfällungen etc. einfach und effektiv zu ersetzen. (a) Isolierung einer oder mehrerer Substanzen aus einer noch nicht optimierten Reaktion zur Produktevaluation oder um (b) weitere Umsetzungen mit der so in grösserer Menge isolierten Verbindung (en) durchführen zu können.

(2) Isolierung von grösseren Mengen eines oder mehrerer analytischen(r) Standards.

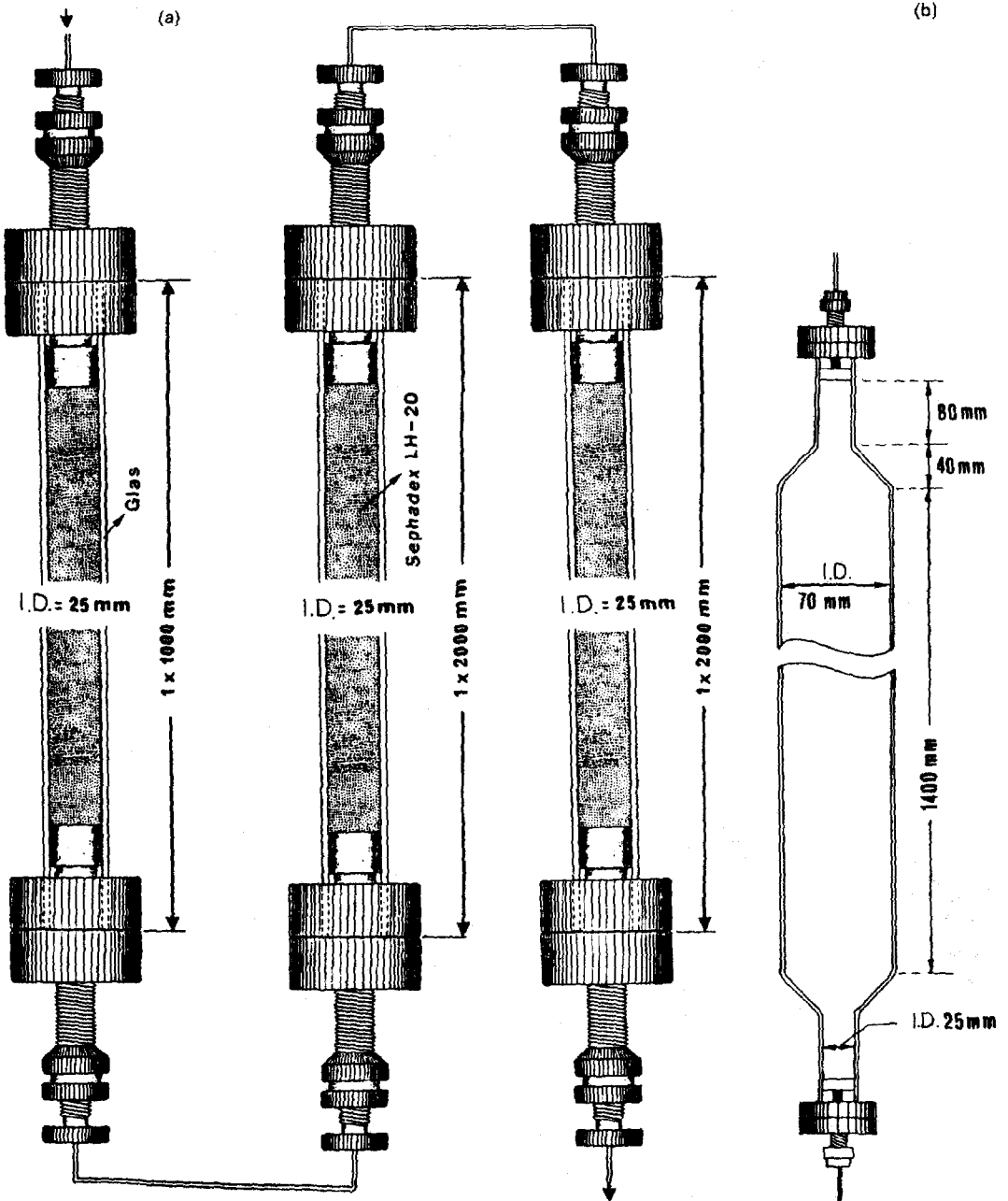


Fig. 1. (a) "Kleine" präparative Glassäulen; (b) "grosse" präparative Glassäule.

(3) Isolierung von Reaktionsnebenprodukten zwecks Identifizierung mit chemischen und physikalischen Methoden.

(4) Quantitative Bestimmung (gravimetrisch) einer oder mehrerer Komponenten eines Reaktionsgemisches bevor sie einzeln identifiziert werden. Die bekannten

Substanzen eines Reaktionsgemisches können damit ohne Eichung quantitativ erfasst werden.

(5) Isolierung von Substanzen aus industriell gefertigten Produkten, aber auch ganz allgemein zur Abtrennung von Naturstoffen, Arzneimitteln, Wirkstoffen etc.

Aus patentrechtlichen Gründen sind hier in vielen Fällen stellvertretend für z.T. noch unbekanntes Verbindungen Testsubstanzen getrennt worden, die im Molekülaufbau gleiche oder sehr ähnliche Unterschiede aufweisen. In manchen Fällen wurden aus den gleichen Gründen signifikante Verbindungen weggelassen. Die Leistungsfähigkeit der Methode ist auch so unübersehbar.

GERÄTE UND TRENNBEDINGUNGEN

Die präparativen Trennungen werden in mehreren unterschiedlich zusammengesetzten Apparaturen durchgeführt. Hier ein Beispiel:

Pumpe: Gilson Modell 302.

Säulen: (a) "kleinere" $25 \times 1000 + 2 \cdot 25 \times 2000$ mm, Gelmeng: 695 g (Fig. 1a); (b) "grössere" 2-4 Stück wie in Fig. 1b, Gelmeng: 2120-4240 g.

Mobile Phase: Methanol; (a) 2 ml/min bei den "kleineren" Säulen; (b) 15 ml/min bei den "grösseren" Säulen.

Detektor: Waters Modelle 403.

Fraktionensammler: Multirac 2111 von LKB.

Die in Methanol gelöste Probe (Probenvolumen: 20-60 ml bei den "kleineren" und 100-300 ml bei den "grösseren" Säulen) wird mittels Spritze aufgetragen oder man lässt die Lösung einsickern.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Trennung nach Molekülgrössen

Die Trennung nieder- und hochmolekularer Verbindungen (Gelfiltration und Gelpermeation) nach Molekülgrösse ist wohl die bekannteste gelchromatographische Trennmethode. Nicht die Trennung nach Molekülgrösse sondern die Mengen, die man mit Hilfe dieser einfachen und leistungsstarken Methode trennen und isolieren kann, ist von grosser praktischer Bedeutung. In Fig. 2 ist die Trennung von unterschiedlich äthoxiliertem Bisphenol A dargestellt und Fig. 3 zeigt wie gut die drei Ester des Trimethylolpropan getrennt werden können. In beiden Fällen könnte man die Probenmenge noch wesentlich erhöhen oder bei höheren Durchfluss schneller trennen, eine Tatsache, die bei vielen anderen Trennungen auch zutrifft.

Vergleicht man aber die beiden Trennbeispiele miteinander, so kann man leicht feststellen, dass es auch zu Adsorptionseffekten kommt. Aromaten werden stärker retardiert als aliphatische Verbindungen. Dass auch Verbindungen mit kleineren Unterschieden (homologe Reihe) getrennt werden können, wurde am Beispiel der Diurethane (Methyl-/Methyl-, Methyl-/Äthyl-, Äthyl-/Äthyl- etc.) des *p*-Phenylendiisocyanats festgestellt. Unter gleichen Bedingungen wurden Pentaerythrit-tetraester (Test- und Standardsubstanzen) vom überschüssigen vierwertigen Alkohol abgetrennt. Das wären nur wenige von sehr vielen präparativen Trennbeispielen dieser Art, die täglich durchgeführt werden.

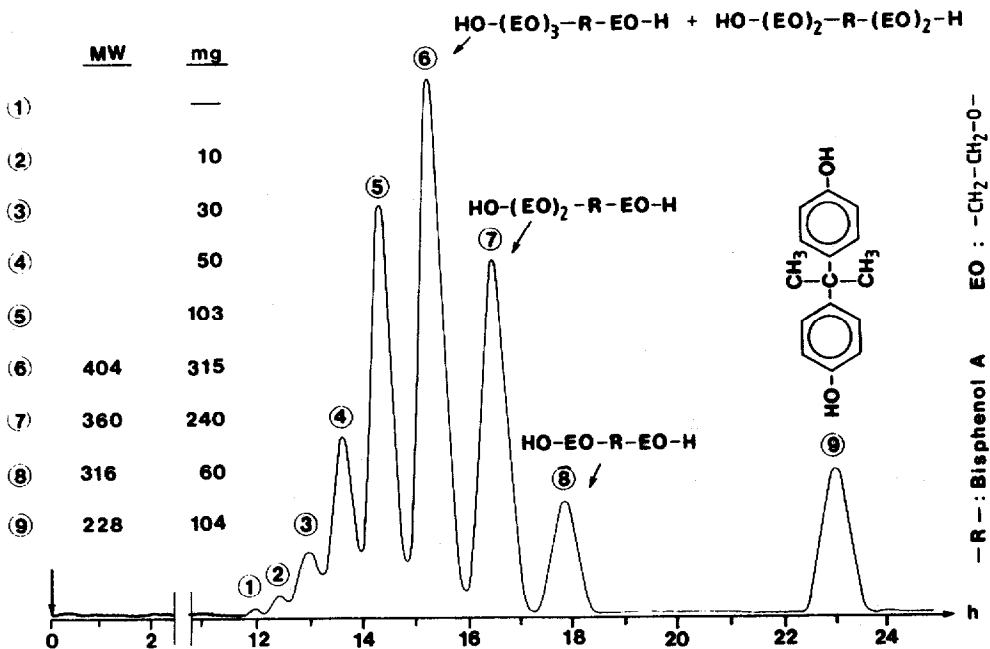


Fig. 2. Trennung von äthox. (900 mg) und freiem Bisphenol A (104 mg). Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min. MW = Molekulargewicht.

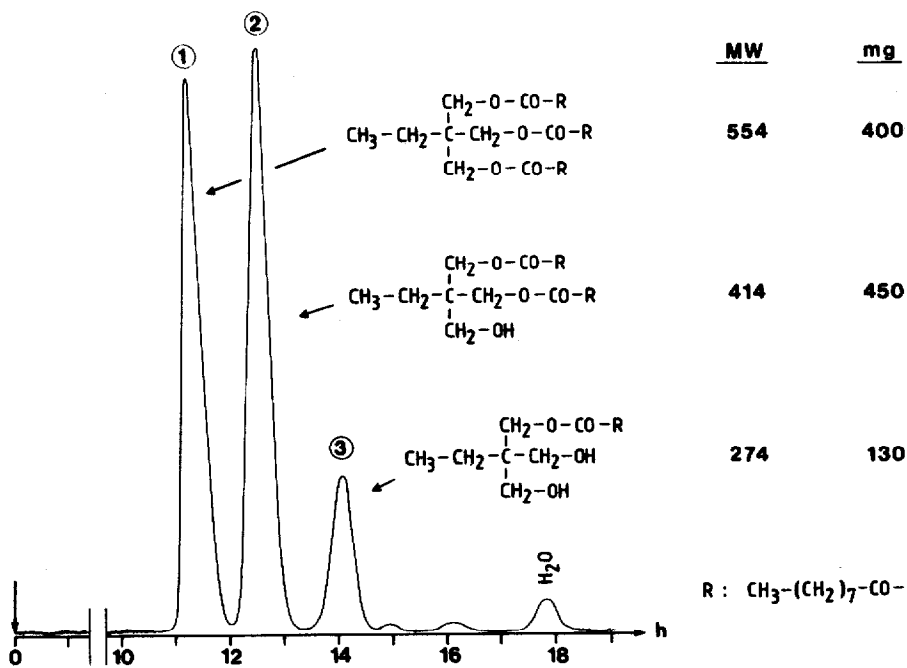


Fig. 3. Trennung von TMP-Estern (Tri-, Di- und Mono-). Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min.

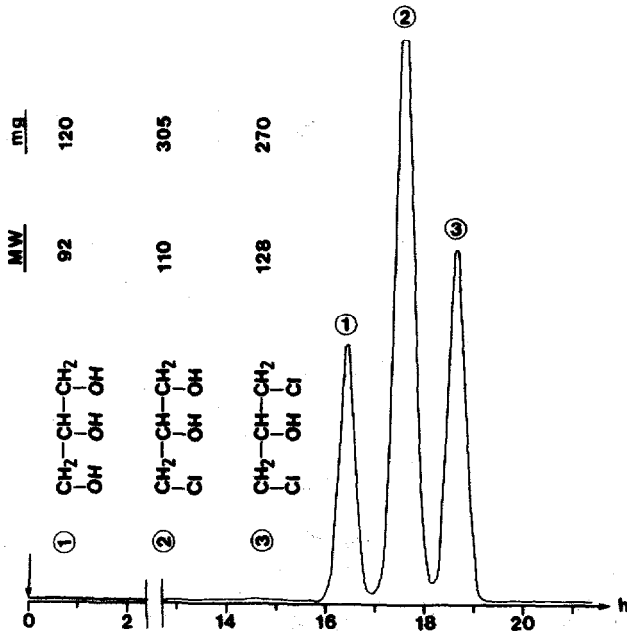


Fig. 4. Trennung von Glycerin, Monochlorhydrin und 1,3-Dichlor-2-propanol. Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min.

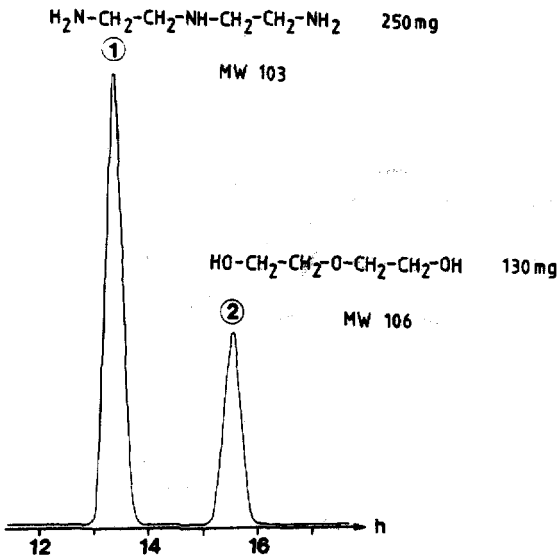


Fig. 5. Trennung von Diäthylentriamin und Diäthylenglykol. Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min.

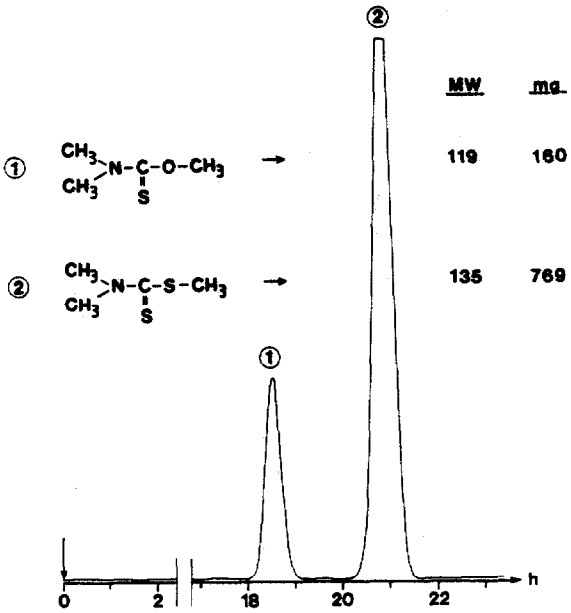


Fig. 6. Trennung von O-Methylthiocarbamat (1) und Methylthiocarbamat (2). Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min.

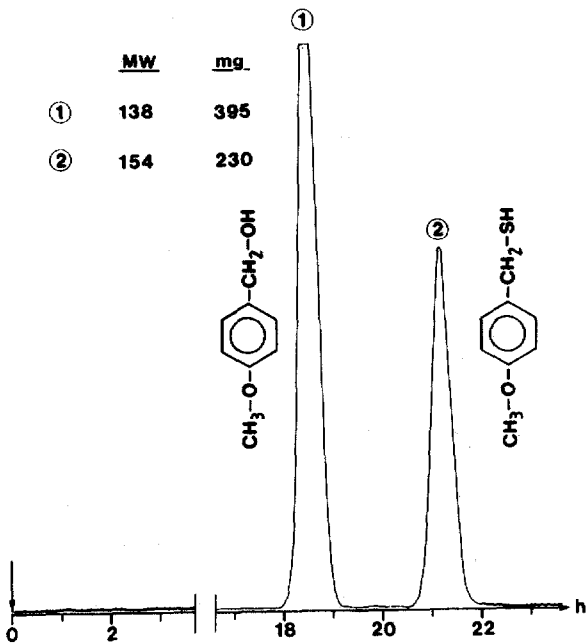


Fig. 7. Trennung von 4-Methoxybenzylalkohol (Anisalkohol) und 4-Methoxybenzylmercaptan. Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min.

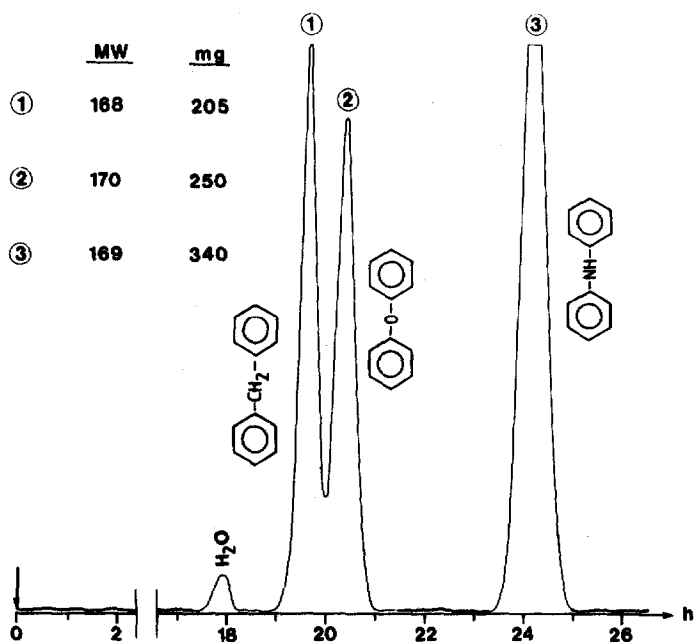


Fig. 8. Trennung von Diphenylmethan, Diphenyläther und Diphenylamin. Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min.

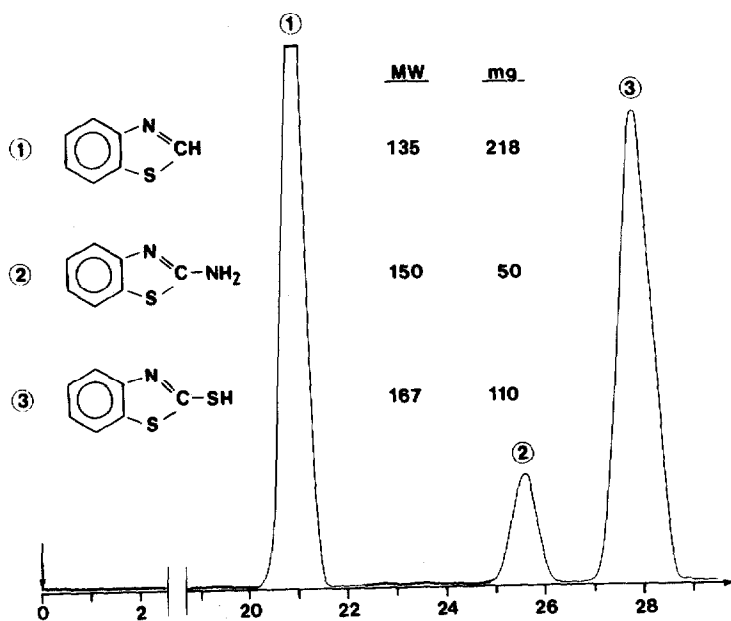
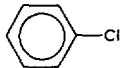
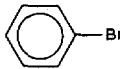
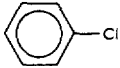
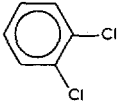
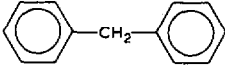
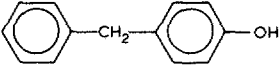
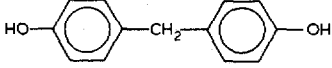
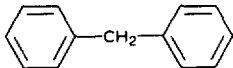
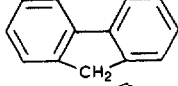
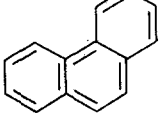


Fig. 9. Trennung von Benzthiazol und dessen Derivate. Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min.

TABELLE I

ADSORPTIONSCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG NACH STEIGENDEM MOLEKULARGEWICHT

 $R(\text{Resolution}) > 1$ bedeutet, dass die probenmenge noch erhöht werden kann.

Verbindung	Peak No.	Molekulargewicht	mg	R
	1	112	440	0.6
	2	157	300	
	1	112	270	0.8
	2	146	415	
	1	168	415	1.7
	2	184	280	
	3	200	305	1.9
$\text{CH}_3\text{—CO—CH}_3$	1	58	200	1.3
$\text{CH}_3\text{—CO—NH}_2$	2	59	115	
$\text{H}_2\text{N—CO—NH}_2$	3	60	253	2.5
$\text{H}_2\text{N—CO—NH}_2$	1	60	200	4.5
$\text{H}_2\text{N—CS—NH}_2$	2	76	260	
$(\text{CH}_3)_2\text{—N—CS—N—}(\text{CH}_3)_2$	1	132	160	3.5
$(\text{CH}_3)_2\text{—N—CS—S—CS—N—}(\text{CH}_3)_2$	2	208	170	
$(\text{CH}_3)_2\text{—N—CS—S—S—CS—N—}(\text{CH}_3)_2$	3	240	110	1.9
	1	168	530	3.2
	2	166	190	
	3	178	130	1.9

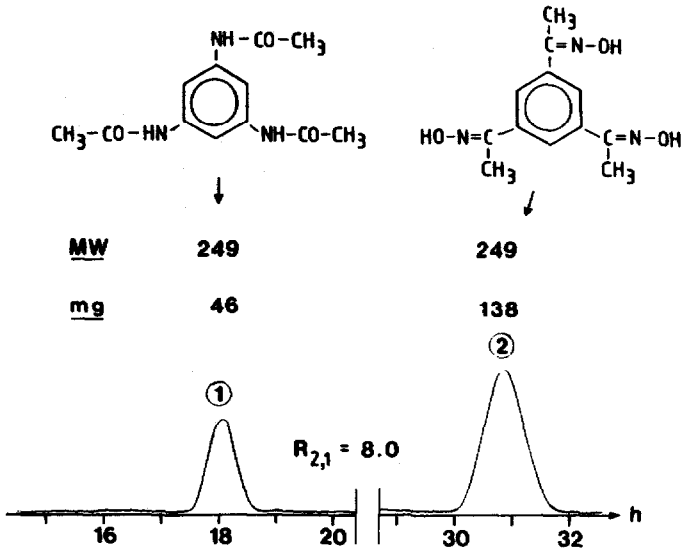


Fig. 10. Trennung strukturisomerer Verbindungen: Triacetamido-benzol (1) und dessen Trioxim (2). Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min.

		<u>MW</u>	<u>mg</u>
①	<chem>c1ccc(CO)cc1</chem>	108	150
②	<chem>c1ccc(OC)cc1</chem>	108	110
③	<chem>Oc1ccc(C)cc1</chem>	108	105

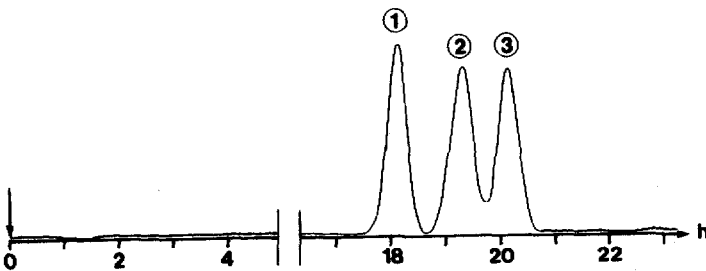
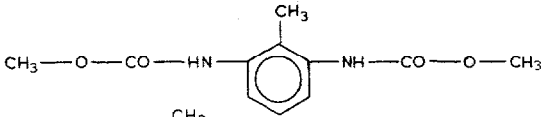
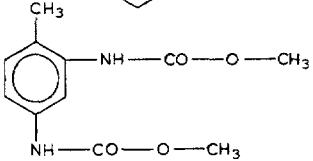
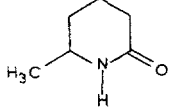
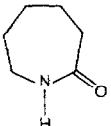
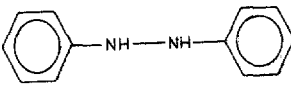
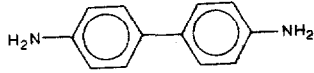
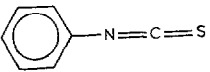
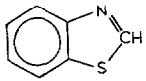
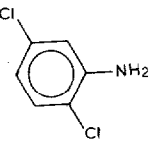
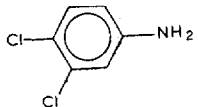


Fig. 11. Trennung strukturisomerer Verbindungen: Benzylalkohol (1), Anisol (2) und *p*-Kresol (3). Säulen wie in Fig. 1a, 2 ml Methanol/min.

TABELLE II
TRENUNG STRUKTURISOMER VERBINDUNGEN

Verbindung	Peak No.	Molekulargewicht	mg	R
	1	238	210	1.2
	2	238	470	
	1	113	150	0.5
	2	113	250	
	1	184	240	2.0
	2	184	160	
	1	135	386	2.7
	2	135	117	
	1	161	190	0.7
	2	161	215	

mit Aceton

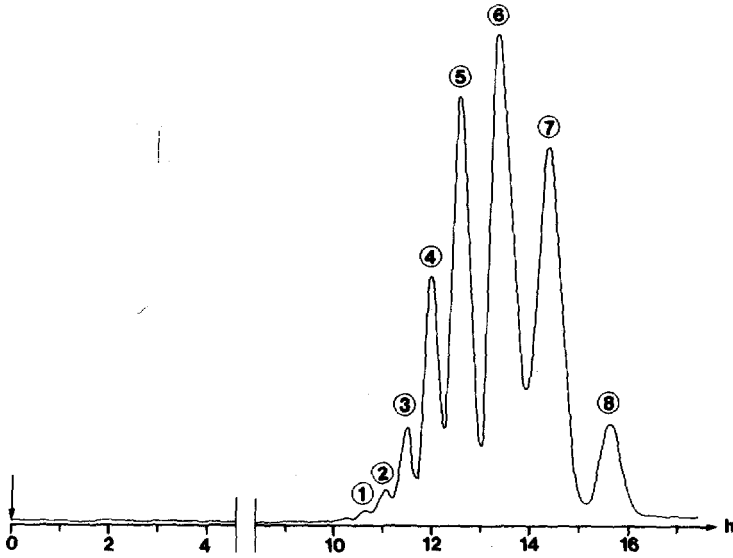


Fig. 12. Trennung von äthox. Bisphenol A (14 g). Säulen: 3 Stück wie in Fig. 1b, 15 ml Methanol/min.

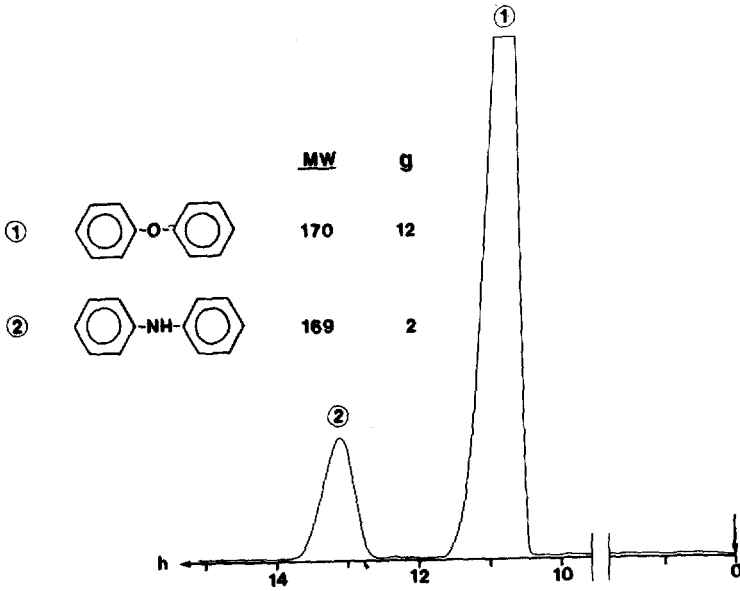


Fig. 13. Trennung von Diphenyläther (12 g) und Diphenylamin (2 g). Säulen: 2 Stück wie in Fig. 1b, 15 ml Methanol/min.

Adsorptions-Trennung innerhalb V_0 (Ausschlussvolumen) und V_i (Porenvolumen)

Bekanntlich ist eine exakte Bestimmung von V_i in der Gelchromatographie nicht ganz unproblematisch. In der präparativen Gelchromatographie wie wir sie seit Jahren praktizieren¹³, wird Wasser als Bezugssubstanz für die Bestimmung des Porenvolumens verwendet. Es ist das kleinste eingesetzte Molekül und sollte aus Methanol an Dextrangel keine Retardierung erfahren. An zwei von vielen Beispielen sollen die Adsorptionseffekte aufgezeigt werden. Fig. 4 zeigt wie stark Halogenatome im Molekül (Monochlorhydrid und 1,3-Dichlor-2-propanol) die Adsorption erhöhen. Dass aber auch andere funktionelle Gruppen im Molekül zu unterschiedlichen Retentionszeiten führen, zeigt Fig. 5. Diäthylentriamin (Molekulargewicht 103) wird viel früher eluiert als Diäthylenglykol (Molekulargewicht 106), d.h. aliphatische $-\text{NH}_2$ bzw. $-\text{NH}-$ vor $-\text{OH}$ bzw. $-\text{O}-$. Unter gleichen Bedingungen können auch Morpholin von Dioxan, Piperidin von Tetrahydropyran oder γ -Butyrolactam vom γ -Butyrolacton getrennt werden, um nur ganz wenige Beispiele mit bekannten Verbindungen zu nennen. Sind diese funktionellen Gruppen an Aromaten oder ungesättigten Verbindungen, dann ist die Elutionsreihenfolge umgekehrt.

Trennungen aufgrund starker Adsorptionseffekte

Hier sollen einige charakteristische Beispiele aus zahlreichen Trennungen gezeigt werden, die aufgrund starker Adsorptions-Effekte (V_e (Elutionsvolumen) $>$ u. $\gg V_i$) zwischen gelöster Probenkomponente und stationärer Phase auftreten. Ganz allgemein kann festgestellt werden, dass Aromaten, Heterocyclen, ungesättigte Verbindungen sowie Moleküle mit Schwefel-, Stickstoff- und Halogenatomen stärker adsorbiert werden als Aliphaten und Cycloalkane, aber auch strukturisomere Verbindungen können sehr selektiv getrennt werden. Bei den einzelnen Trennungen konnten folgende für die Selectivität des Systems nützliche Adsorptions-Effekte beobachtet werden. Aliphaten werden vor Cycloalkanen und diese vor Aromaten eluiert¹³; Verbindungen mit $-\text{OCH}_3$ bzw. $-\text{OH}$ vor $-\text{SCH}_3$ bzw. $-\text{SH}$ (Fig. 6 und 7); $-\text{CH}_3$ vor $-\text{NH}_2$, Diphenylmethan ($-\text{CH}_2-$) vor Diphenyläther ($-\text{O}-$) vor Diphenylamin ($-\text{NH}-$, Fig. 8), Benzthiazol ($\neq \text{CH}$) vor 2-Amino- ($\neq \text{C}-\text{NH}_2$) vor 2-Mercaptobenzthiazol ($\neq \text{C}-\text{SH}$) (Fig. 9), Chlor- vor Brombenzol, Harnstoff ($-\text{CO}-$) vor Thioharnstoff ($-\text{CS}-$), Mono ($-\text{S}-$) vor Disulfiden ($-\text{S}-\text{S}-$) etc. Siehe dazu auch Tabelle I. Hydroxylgruppen am Aromaten erhöhen die Retentionszeit der Verbindung ganz erheblich. Sehr auffallend sind die guten Trennungen strukturisomerer Verbindungen wie sie die Fig. 10 und 11 sowie Tabelle II zeigen. Die Probenkapazität kann folgendermassen erhöht werden: die Säule verlängern oder was günstiger ist, den inneren Durchmesser vergrössern. Die Fig. 12 (die gleiche Probe wie in Fig. 2 jedoch ohne freiem Bisphenol A) und Fig. 13 zeigen Trennungen mit den grossen Säulen. In der Fig. 13 sieht man die selektive Trennung des aromatischen Äthers vom entsprechenden Amin. Unter gleichen Bedingungen kann man Dibenzylamin und Dibenzyläther trennen, mit dem Unterschied, dass das Amin vor dem Äther eluiert wird, ein schönes Beispiel für den Umkehr der Retentionszeiten: Aliphatisch gebundene $-\text{NH}-$ vor $-\text{O}-$ und aromatisch $-\text{O}-$ vor $-\text{NH}-$. Man kann sämtliche Trennungen von den "kleineren" problemlos auf die "grösseren" Säulen übertragen, mit dem Ergebnis, wesentlich grösseren Probenmengen gleich gut trennen zu können. Eine weitere Vergrösserung ist nicht nur denkbar sondern auch realisierbar.

Nach unserer Meinung und aufgrund der vorliegenden Erfahrungen gibt es ein

Riesenangebot an Trennproblemen, die mit Hilfe dieser Methode leicht und relativ schnell im präparativen Massstab durchgeführt werden können.

DANK

Den Herren H. Höhnlein, K. Rülke und J. Schubert gilt mein Dank für die sorgfältige Ausführung der experimentellen Arbeiten.

LITERATUR

- 1 H. Determann, *Gelchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
- 2 L. Fischer, *An Introduction on Gel Chromatography*, North-Holland, Amsterdam, 1969.
- 3 D. M. W. Anderson, I. C. M. Dea und A. Hendrie, *Talanta*, 18 (1971) 365.
- 4 R. Gladen, *GIT Fachz. Lab.*, 16 (1972) 1002, 1159.
- 5 W. Duppel, *GIT Fachz. Lab.*, 22 (1978) 586.
- 6 M. Wilk, J. Rochlitz und H. Bende, *J. Chromatogr.*, 24 (1966) 414.
- 7 M. Joustra, B. Söderqvist und L. Fischer, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 21.
- 8 E. Schröder und W. Mische, *Plaste Kautsch.*, 15 (1969) 258.
- 9 H. H. Oelert, *Z. Anal. Chem.*, 244 (1969) 91.
- 10 C. Wasternack, *Pharmazie*, 27 (1972) 67.
- 11 R. A. Anderson, C. J. W. Brooks und B. A. Knights, *J. Chromatogr.*, 75 (1973) 247.
- 12 R. A. Anderson, B. A. Knights und C. J. W. Brooks, *J. Chromatogr.*, 82 (1973) 337.
- 13 H. Henke, *Labor Praxis*, 4, April (1980) 62.
- 14 J. L. Mulder und F. A. Buytenhuys, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 459.
- 15 C. A. Streuli, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 56, 219 und 225.
- 16 H.-J. Klimisch und L. Stadler, *J. Chromatogr.*, 67 (1972) 291.
- 17 R. J. Lewis, *Chromatographia*, 11 (1978) 736.