



Doctoral Thesis

Charakterisierung und Einsatzmöglichkeiten verschiedener Säulenmaterialien zur Gelpermeation in der Hochdruck-Flüssig-Chromatographie

Author(s):

Bentele, Verena

Publication Date:

1980

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000215255> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 6631

CHARAKTERISIERUNG UND EINSATZMOEGlichkeiten
VERSCHIEDENER SAEULENMATERIALIEN ZUR
GELPERMEATION
IN DER HOCHDRUCK-FLUESSIG-CHROMATOGRAPHIE

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
VERENA BENTELE
eidg. dipl. Apothekerin
geb. am 26. Oktober 1944
von St. Gallen

angenommen auf Antrag von
Prof.Dr.P.P. Speiser, Referent
Prof.Dr.M. Soliva, Korreferent

1980

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Kieselgel wurde für den Einsatz in der Gelpermeation (HPLC) thermisch modifiziert und der Einfluss der thermischen Behandlung (500°C - 1000°C) auf physikalische und chemische Eigenschaften des Trägermaterials untersucht. Bis zu Temperaturen von 800°C konnte keine bedeutende Veränderung der Partikelgrösse, der Schüttdichte und des für die GPC relevanten Porenvolumens festgestellt werden, während die BET-Oberfläche mit steigender Temperatur abnimmt. Der Effekt auf die chemischen Eigenschaften wurde in verschiedenen chromatographischen Systemen (adsorptions- und gel-chromatographischen mit organischen und wässrigen Eluenten) ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass durch die thermische Behandlung bis 800°C keine irreversible Desaktivierung des Kieselgels (Lichrosorb[®] Si 100) erreicht werden konnte. Eine solche wurde erst beim gesinterten Produkt (1000°C) signifikant.

Durch Belegung der Oberfläche mit Trimethylchlorsilan (TMCS) wurde ein stark desaktiviertes Material erhalten, dessen Aktivität durch die verbleibenden Silanolgruppen bestimmt wird. Mit dieser lipophilen C_1 , sowie mit C_2 -, C_8 - und C_{18} -gebundenen Phasen konnten niedrig molekulare Substanzen (Aglykone und Glykoside der Cardenolid-Gruppe) molekulargewichts-spezifisch getrennt werden. Die Trennwirksamkeit eines sich der Gelpermeation überlagernden Umkehr-Phasen-Effektes war bei Verwendung von geeigneten Eluenten gering.

Die Elution dieser niedermolekularen Substanzen erfolgte auch an organischen Trägermaterialien auf Polystyrol-Divinyl-Benzol-Basis in der Reihenfolge abnehmender Molekulargewichte. Verteilungs-Effekte tragen im speziellen bei sehr kleinen Molekülen zur Trennung bei. Durch die Inkompatibilität dieser Gele mit Alkoholen und wässrigen Eluenten ist ihr Einsatz auf die Analytik von Substanzen beschränkt, die in den zulässigen, relativ schwach polaren organischen Lösungsmitteln löslich sind.

Sie erwiesen sich als geeignet für die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der synthetischen Polymere: Polymilchsäure und Polymethylmethacrylat.

Für stark polare Substanzen wurden kommerziell erhältliche

Säulenmaterialien mit hydrophiler Belegung auf Kieselgelmatrix (in Fertigsäulen) oder auf porösen Gläsern eingesetzt.

An diesen Trägermaterialien mittlerer Polarität wurden die untersuchten Peptide (Cyclosporin A und Oxytocin) aus reinen Pufferlösungen verzögert eluiert. Durch Verwendung von Eluenten-Gemischen mit Acetonitril konnte die Adsorption weitgehend zurückgedrängt werden.

Bei der Elution von globulären Proteinen konnte bei gegebenem pH-Wert des Eluenten eine starke Abhängigkeit der Retention vom isoelektrischen Punkt (I.P.) des Proteins beobachtet werden. Eine gelchromatographische Trennung konnte für Substanzen erhalten werden, deren isoelektrischer Punkt unterhalb des pH-Wertes des Eluenten liegt.

Die Molekulargewichtsverteilung von Gelatine konnte bei den Porengrößen der erhältlichen Materialien nicht bestimmt werden, da diese vom Porenvolumen ausgeschlossen blieb. Der Abbau von Gelatine B konnte aber gelchromatographisch verfolgt werden. Mit Ausnahme der porösen Gläser handelt es sich bei den untersuchten Säulenmaterialien um Korngrößen von 10 μm . Mit diesen Partikeln werden Säulenpackungen mit bedeutend besseren Trennleistungen erhalten, als mit den 60 μm -Partikeln der porösen Gläser. Die mittleren Porengrößen der untersuchten Säulenmaterialien erstrecken sich von 4 bis 10⁶ nm bei sehr unterschiedlichen Porengrößenverteilungen. Bei anorganischen Trägern wurden im allgemeinen breitere Porengrößenverteilungen gefunden als bei den organischen Gelen (mit Ausnahme von MikroPak[®] GMH-6) was einen grösseren Trennbereich, aber eine entsprechend geringere Auflösung zur Folge hat.

Eine gelchromatographische Trennung, d.h. eine Trennung innerhalb des Permeationsbereiches der Säulenmaterialien, konnte bei geeigneter Wahl des chromatographischen Systems nahezu für alle Testsubstanzen erreicht werden. Eine einfache Zuordnung der Elutionsvolumina zu effektiven Molekulargewichten ist aber nur im Fall von homologen Reihen möglich, wofür die Trennsäule mit den gleichen Substanzen bekannter Molekulargewichte zu eichen ist. Eine Berechnung des Molekulargewichts aus der universellen Eichbeziehung, der nicht das Molekulargewicht, sondern das hydrodynamische Volumen als für die Trennung verantwortliche Grösse

zugrunde liegt, ist für die Aufklärung des Trennmechanismus in der GPC, nicht aber für die praktische Anwendung von Molekulargewichtsbestimmungen geeignet. Die Gültigkeit dieser Eichbeziehung muss für jedes verwendete chromatographische System zuerst untersucht werden, wofür eine Reihe von der GPC unabhängige Molekulargewichtsbestimmungen, sowie die Kenntnis der Grenzviskosität der Testsubstanzen erforderlich sind. Solche Messungen setzen das Vorhandensein von kostspieligen Apparaturen voraus (Ultrazentrifuge, Lichtstreuungs-Detektor oder Osmometer) und sind sehr zeitraubend.

Andererseits kann die Gelpermeation erfolgreich für viele Trennprobleme herangezogen werden, bei denen wohl eine molekülgrößen-spezifische Trennung verlangt wird, aber nicht nach wahren Molekulargewichten gefragt wird. Z.B.:

- Bestimmung der Dispersität der Molekulargewichte (Breite der Molekulargewichtsverteilung) von synthetischen Polymeren (Qualitätskontrolle)
- Gehaltsbestimmungen aus pharmazeutischen Formulierungen, bei denen sich Wirk- und Hilfsstoffe im Molekulargewicht signifikant unterscheiden
- Probenanreicherung aus biologischem Material u.a.m.

Während der Zeitspanne des Entstehens dieser Arbeit hat die Entwicklung von GPC-Säulenmaterialien für die HPLC enorme Fortschritte gemacht, so dass das Angebot an kommerziell erhältlichen Säulenmaterialien sehr breit gefächert ist. Dadurch sind heute die meisten durch klassische GPC gelösten Trennprobleme bei viel geringerem Zeitaufwand (bedingt durch kürzere Retentionszeiten) durch die HPLC-GPC lösbar geworden.

V. SUMMARY

For use as packing material for gel permeation chromatography irregular and spherical silica beads (Lichrosorb[®] Si 100 and Lichrospher[®] Si 500) have been thermally modified at temperatures ranging from 500[°] to 1000[°]C. The effect of thermal treatment on some of physical and chromatographic adsorption properties was tested using solutes of varying column capacity ratio with n-Hexan as the eluent. At temperatures below 850[°]C, where pore structure is not greatly changed, no significant irreversible deactivation was achieved when compared to the untreated hydrated silica gel. Considerable deactivation was only seen with the support which was treated at 1000[°]C and here sintering occurred.

These pretreated silica gels were, when also been modified with Trimethylmonochlorsilane, which leads to highly lipophilic supports showing poor activity for polar compounds in nonpolar eluents but reverse-phase adsorption in polar eluents.

The exclusion properties of the following commercially available packing materials for GPC have been investigated:

- inorganic gels (silica gels and controlled pore glasses)
- controlled surface porosity supports with chemically-bonded organic (hydrophilic and lipophilic) phases and
- organic gels (polystyrene divinylbenzene gels)

There relative merits for use as stationary phases in exclusion chromatography is discussed.

These supports were tested using compounds of varying polarity and in different molecular weight ranges. They include:

- GPC with organic eluents:
 - a) the elution behaviour of low molecular weight compounds and
 - b) determination of molecular weight distributions of synthetic polymers (polylactic acid and polymethylmethacrylate)
- GPC with aqueous eluents:
 - a) the elution behaviour of peptides (Cyclosporin A and Oxytocin) and
 - b) molecular weight determination of biopolymers (globular proteins and the elution behaviour of gelatine)