

CHROM. 4568

BEITRAG ZUR SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN ANALYTIK

R. KLAUS UND G. WEBER

Analytisches Zentrallaboratorium der Fa. E. Merck, Darmstadt (B.R.D.)

(Eingegangen am 25. November 1969)

SUMMARY

Column chromatographic analysis

The column described simplifies chromatographic separations carried out in conjunction with subsequent quantitative analysis. The additional expenditure on a recording photometer is small when compared with that involved in the *in situ* evaluation in thin-layer chromatography. For laboratories handling only a limited number of samples the column technique could be particularly suitable, even though the time required is somewhat longer than with thin-layer chromatography.

The column is described in detail and, in addition to continuous loading, enables a comparatively simple photometric measurement of the eluate. The influence of varying flow rates on the analysis time and the separation efficiency is examined. Examples of pharmaceutical and clinical applications of the technique are given.

Nachdem die rapide Entwicklung der Dünnschichtchromatographie in den letzten Jahren die säulenchromatographischen Trennverfahren etwas in den Hintergrund treten liess, ist neuerdings wieder eine zunehmende Anwendung der Säulen-Technik unverkennbar. An dieser Tatsache dürften u.a. die von den Herstellern der Adsorptionsmaterialien neu eingeführten Präparate nicht unbeteiligt sein. Es ist nicht verwunderlich, dass sich diese Gegebenheiten auch auf dem Verfahrens-Sektor in neuen Impulsen auszudrücken beginnen.

Die Erweiterung der Chromatographie von einem reinen Trennverfahren zu einem quantitativen Analysenverfahren ist naturgemäß durch die verschiedensten Stadien gekennzeichnet.

So erfolgte bei den säulenchromatographischen Trennungsgängen nach einer Identifizierung der einzelnen Fraktionen deren Bestimmung zunächst gravimetrisch. Die weitere Entwicklung führte schliesslich zu automatisch arbeitenden Fraktions-sammlern. Bei einem Teil dieser kommerziell hergestellten Geräte werden genau dosierte Volumina des Eluates in Reagenzgläsern aufgenommen und anschliessend in diesen durch die verschiedensten Nachweismethoden, über die zusammenfassende Literaturangaben¹ gemacht sind, analysiert.

Der Analysengang bei neueren Geräten besteht darin, dass das Eluat vor dem eigentlichen Fraktionssammler eine Zelle passiert, in welcher eine kontinuierliche

Messung vorgenommen werden kann. Die in ihren Kapazitäten sehr verschiedenen Messzellen mancher Geräte lassen nun mitunter optimale chromatographische Aussagen nicht zu, und zwar bei solchen Trennproblemen, bei denen die Gesamt-Elutionsvolumina der einzelnen Fraktionen in der Größenordnung des jeweiligen Zelleneinfassungsvermögens liegen.

Weitere Einschränkungen sind bei einer Reihe von Geräten, einerseits, bedingt durch die Verbindungsschläuche zwischen Säulenauslauf und Messzelle, in dem Auftreten unerwünschter Messwerte (besonders bei Analysen in dem unteren Grenzbereich des jeweiligen Indikationsverfahrens) andererseits z.B. bei photometrischen Bestimmungen in der mitunter begrenzten Wahl des spektralen Messlichtes zu verzeichnen. Zu erwähnen ist hier der Einsatz von Hg-Lampen als Lichtquellen mit den intensivsten Linien $\lambda = 366 \text{ nm}$ und $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Die im folgenden beschriebene Anordnung bedient sich eines kontinuierlichen photometrischen Nachweises. Sie zeichnet sich neben einem relativ geringen chromatographisch-apparativen Aufwand bei einfachster Handhabung — z.B. einer vollkommen unkritischen Justierung der Messzelle an nahezu jedes handelsübliche Photometer — gerade durch ein extrem kleines photometrisches Messvolumen aus. Nicht unerwähnt sei der ohne Aufwand mögliche Einsatz der Säule für fluorometrische Analysen². Dieser Sachverhalt sowie die einfache Auswertung der Durchfluss-Elutionskurven sollten auf die ausbaufähige Stellung der Säulentchnik im Gesamtbereich der Chromatographie hinweisen.

VERSUCHSANORDNUNG

Der eigentliche chromatographische Teil der Versuchsanordnung besteht aus einer speziell konstruierten Quarzsäule, über die die nachstehenden Angaben gemacht werden. In dem Bestreben, das tote Volumen zwischen Säulenauslauf und Messzelle bei kleinstem Messzelleninhalt auf ein Minimum zu reduzieren, wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.5 mm an den Auslauf einer etwa 30 cm langen und ca. 15 mm weiten Quarzsäule angeschmolzen (Fig. 1). Eine Ableitung der sich bei dem Trennungsgang am Säulenauslauf unter Umständen ansammelnden Luft erfolgt über ein ebenfalls in Fig. 1 ersichtliches Röhrchen.

Bei routinemässigen Analysen einer grösseren Anzahl von Proben stellt das Aufbringen der Substanzen auf die Säule nach den herkömmlichen Verfahren einen entscheidenden Zeitfaktor dar. Gelingt es neben einer diesbezüglichen Vereinfachung darüber hinaus, das Beschicken der Säule unabhängig von einem bereits laufenden Trennungsgang vorzunehmen, so dürfte eine entsprechend gebaute Säule ein Optimum an analytischem Komfort erbringen. Eine Lösung dieses Problems ist aus Fig. 2 zu ersehen. Ein in 20 cm Höhe über dem Säulenauslauf seitlich angeschmolzener, mit einem Gummipuffer versehener Stutzen erlaubt mit Hilfe einer geeigneten Spritze, z.B. "Terumo Micro MSG 50", das Aufbringen der Analysensubstanz in die bis zu einer Höhe von etwa 25 cm mit der stationären Phase gefüllten Säule. Während des Einspritzvorganges auftretende unerwünschte Wirbelbildung, die nicht ohne Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Elutionskurven sind, lassen sich durch eine angemessene Einspritzgeschwindigkeit vermeiden.

Des weiteren kann zur Wahl beliebiger Durchflussgeschwindigkeiten die Elutionsflüssigkeit des Vorratsgefäßes über ein Manometer unter Druck gesetzt werden.

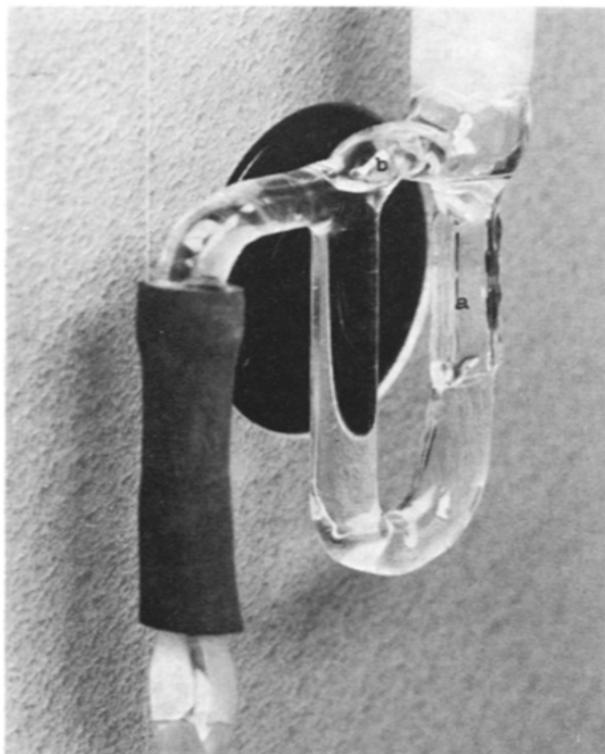


Fig. 1. Säulenauslauf mit angeschmolzener Quarzküvette (a) und Entlüftungsrohr (b).



Fig. 2. Proben-Einspritzstutzen.

Diese Technik ist, wie in der Literatur³ beschrieben, der Unterdruckanalyse überlegen.

Fig. 3 zeigt eine Gesamtansicht der Messanordnung. Die Messzelle der vorstehend erwähnten Säule liegt in der optischen Achse eines Photometers, z.B. eines Spektralphotometers PMQ II der Firma Carl Zeiss, Oberkochen. Die Justierung, die, wie bereits angedeutet, aufgrund der Abmessungen der Zelle vollkommen unkritisch ist, kann sowohl zwischen Leuchte und Monochromator als auch zwischen Monochromator und Strahlungsempfänger erfolgen. Für die Registrierung der Elutionskurven wird neben einem Transmissions-Extinktionswandler ein entsprechender Schreiber verwendet.

QUANTITATIVE ANALYSEN

Bevor nähere Einzelheiten über die mit der beschriebenen Anordnung möglichen quantitativen Analysen gemacht werden, sei über die Verwendung der Messanordnung zur Festlegung günstiger Arbeitsbedingungen für ein vorgegebenes Trennproblem berichtet. Es werden hierbei die in der einschlägigen Literatur⁴ bereits mehrfach veröffentlichten Ergebnisse theoretischer Untersuchungen für elutions-chromatographische Trennungen als bekannt vorausgesetzt. Nach diesen besteht u.a. zwischen der Halbwertsbreite (in Volumeneinheiten) der Elutionsbanden und der Strömungsgeschwindigkeit des Eluens über die effektive Bodenhöhe ein direkt proportionaler Zusammenhang. Des Weiteren sei auf eine ebenfalls in der vorstehend zitierten Literaturstelle abgeleitete Beziehung hingewiesen, welche eine Unabhängigkeit des zum



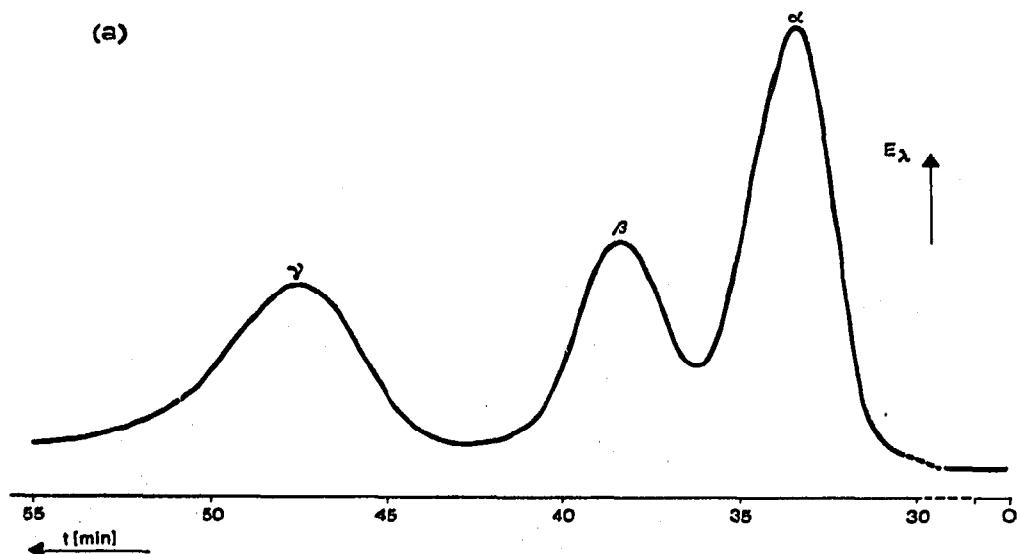
Fig. 3. Gesamtansicht der Messanordnung. a = Leuchte; b = Trennsäule; c = Monochromator; d = Empfänger; e = Anzeigegerät; f = Transmissions-Extinktions-Wandler; g = Schreiber.

Durchwaschen des Konzentrationsmaximums einer Komponente erforderlichen Eluensvolumens von der Strömungsgeschwindigkeit beinhaltet. Da diese wie weitere, z.B. die günstigste Strömungsgeschwindigkeit selbst betreffende Angaben unter idealisierten Voraussetzungen abgeleitet wurden, ist eine Ermittlung der dem jeweiligen Trennproblem angepassten, unter Umständen von der Theorie abweichenden Bedingungen zweckmäßig. Die Festlegung dieser Parameter wird durch die in dieser Arbeit eingesetzten Säule, wie nachfolgend am Beispiel der Durchflussgeschwindigkeit erläutert wird, wesentlich erleichtert.

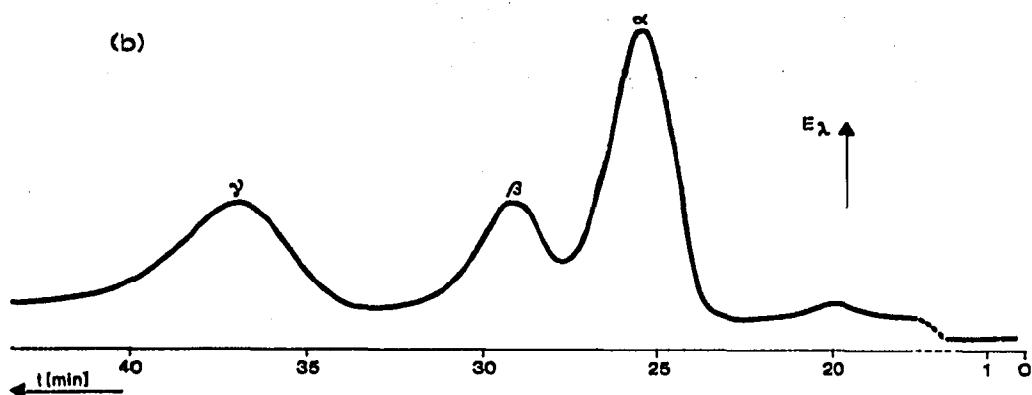
Wie bereits erwähnt, ist die Durchflussgeschwindigkeit der Säule in gewissen Grenzen variierbar. Diese Möglichkeit ist für die Routine insofern von Bedeutung, als mit zu erwartenden kleineren Retentionszeiten bei grösseren Durchflussgeschwindigkeiten ein nicht unerheblicher Zeitgewinn verbunden sein sollte.

Für den konkreten Fall der anwendungstechnischen Prüfung neuer Adsorptionsmaterialien, es handelt sich um Cellulosemonoacetat, soll dieser Effekt untersucht werden. Die Testlösung setzte sich aus drei Komponenten zusammen: Aus den Verbindungen Quaterphenyl und Anthracen mit relativ geringen Unterschieden der Retentionszeiten und Benzanthracen mit einer grösseren Retentionszeitdifferenz. Fig. 4 zeigt die unter den in der Legende angegebenen Bedingungen bei verschiedenen Durchflussgeschwindigkeiten v erhaltenen Elutionskurven.

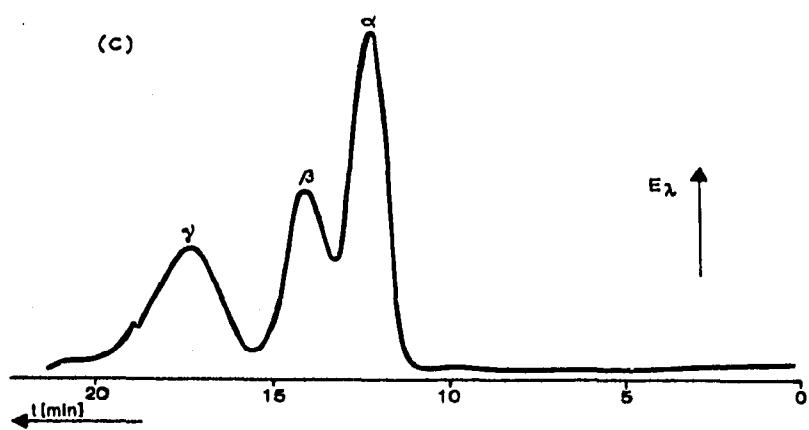
(a)



(b)



(c)



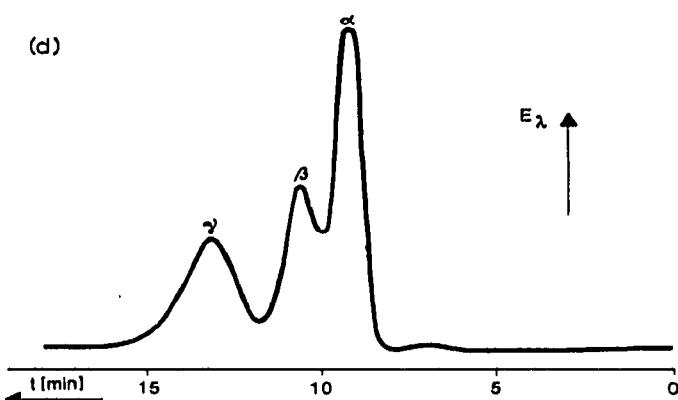


Fig. 4. Extinktions-Zeit-Kurven der säulenchromatographischen Trennung eines Testgemisches von Quaterphenyl (α), Anthracen (β) und Benzanthracen (γ) bei verschiedenen Durchflussgeschwindigkeiten. Analysenbedingungen: Stationäre Phase: Cellulosemonoacetat. Aufgetragene Menge: je 0.2 ml enthaltend 20 μg Quaterphenyl, 2 μg Anthracen und 20 μg Benzanthracen. Elutionsflüssigkeit: Methanol-Äther-Wasser (55:25:20). Durchflussgeschwindigkeit: (a) 0.85 ml/min, (b) 1.15 ml/min, (c) 2.30 ml/min und (d) 2.90 ml/min. Wellenlänge (λ): 250 nm.

Definiert man als Retentionsvolumen V_R das Produkt aus Retentionszeit t_R und Durchflussgeschwindigkeit v

$$V_R = t_R \cdot v$$

so zeigt diese Grösse, wie in Fig. 5 für die Konzentrationsmaxima der drei Komponenten dargestellt, nur eine sehr geringe, mit der Theorie nicht ganz im Einklang

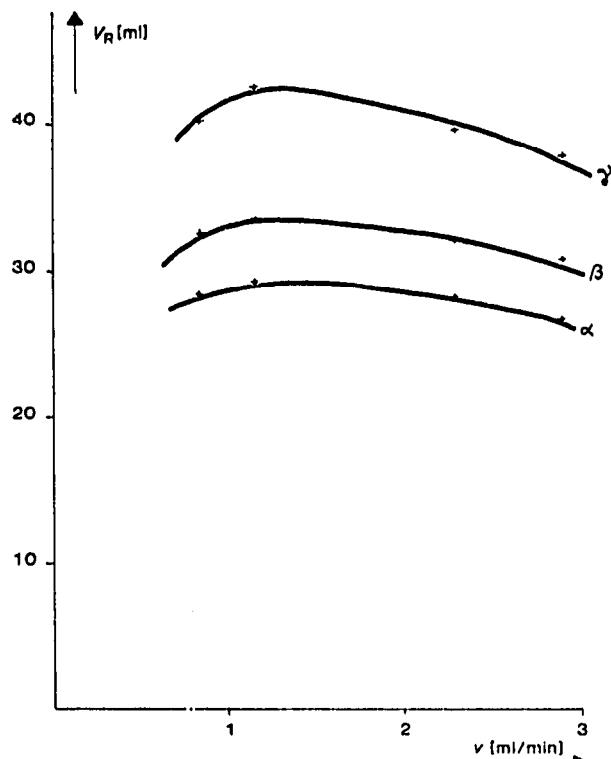


Fig. 5. Aus Fig. 4 resultierende Abhängigkeit der Retentionsvolumina V_R von den Durchflussgeschwindigkeiten v .

stehende Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit. Näherungsweise lässt sich jedoch die Aussage ableiten, dass die auf die Konzentrationsmaxima bezogenen Retentionszeiten der einzelnen Komponenten sich umgekehrt proportional zu den Durchflussgeschwindigkeiten verhalten. Die Wahl grösserer Durchflussgeschwindigkeiten bei dem vorgegebenen Trennproblem dürfte aber nur dann kompromisslos sein, wenn eine weitere charakteristische Eigenschaft — die Trennfähigkeit — durch grössere Retentionszeiten nicht wesentlich begünstigt wird. Wie aus Fig. 4 zu ersehen ist, nimmt die Halbwertsbreite der Elutionsbanden der einzelnen Komponenten mit zunehmenden Retentionszeiten ebenfalls zu. Führt man als Kriterium für die Trennfähigkeit den Quotienten aus Halbwertsbreite und Retentionszeit der jeweiligen Komponenten ein, so zeigt dieser in Übereinstimmung mit den in der Literatur veröffentlichten theoretischen Ergebnissen eine Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit des Eluens zugunsten kleinerer Durchflussgeschwindigkeiten. Aufgrund der Geringfügigkeit dieser Quotientenunterschiede besteht jedoch keine Veranlassung, mit kleineren Strömungsgeschwindigkeiten zu analysieren.

Mit einigen Anwendungen sowohl aus dem pharmazeutischen als auch aus dem klinischen Bereich sei der Einsatz der Säule zur quantitativen Bestimmung beschrieben.

Der direkte UV-absorptionsphotometrische Nachweis von Coffein neben den Bestandteilen eines Rauwolfiaextraktes ist aufgrund des von Reserpin wenig differenzierten Kurvenverlaufes (Fig. 6) mit grossen Schwierigkeiten verbunden.

Selbst eine UV-Analyse des als Wirkstoff in der Drogen enthaltenen Reserpin ist, bedingt durch weitere UV-absorbierende Komponenten der Drogen, nicht möglich.

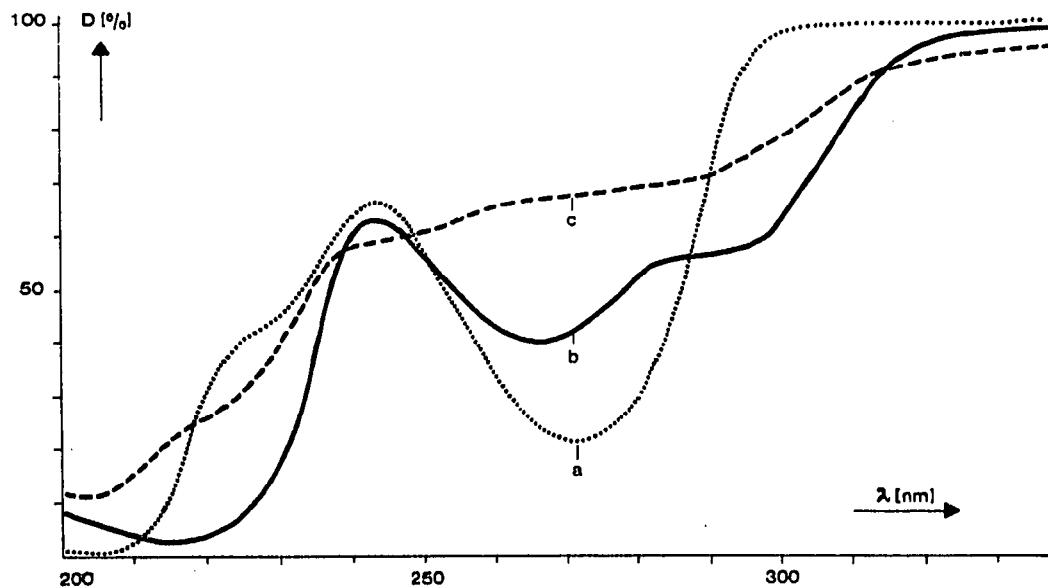


Fig. 6. UV-Durchlässigkeitsspektren von Lösungen von (a) Coffein (1.2 mg/100 ml Wasser), (b) Reserpin (1.0 mg/100 ml Wasser) und (c) *Rauwolfia serpentina* (1.2 mg/200 ml Wasser). Schichtdicke: 1 cm; Gegenküvette: Wasser.

Eine säulenchromatographische Trennung unter den in der Legende zu Fig. 8 angegebenen Bedingungen gibt jedoch Aufschluss über einen eventuell vorhandenen

Coffeingehalt bzw. gegebenenfalls über den Reserpinanteil. Die Festlegung der Retentionsvolumina der beiden Komponenten ist in Fig. 7 festgehalten. Aus der in diesem Falle linearen Registrierung der Trennung lässt sich für Coffein ein Wert V_t von 57.6 ml und für Reserpin ein solcher von 42.0 ml ermitteln. Überträgt man diese

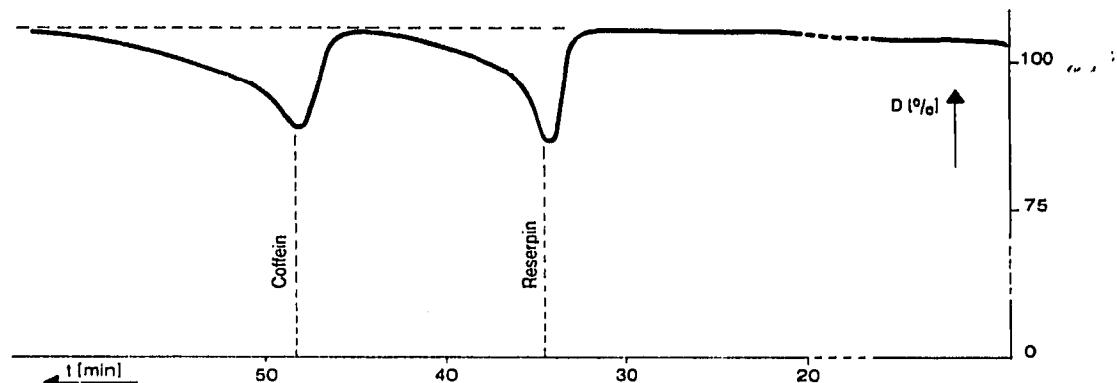


Fig. 7. Durchlässigkeit-Zeitkurve einer säulenchromatographischen Trennung von Reserpin und Coffein zur Festlegung der Retentionsvolumina V_t . Analysenbedingungen: Stationäre Phase: Aluminiumoxid sauer aktiv für die Chromatographie. Aufgetragene Menge: 60 µg Reserpin und 60 µg Coffein. Elutionsflüssigkeit: Methanol. Durchflussgeschwindigkeit: 1.2 ml/min. Wellenlänge (λ): 210 nm.

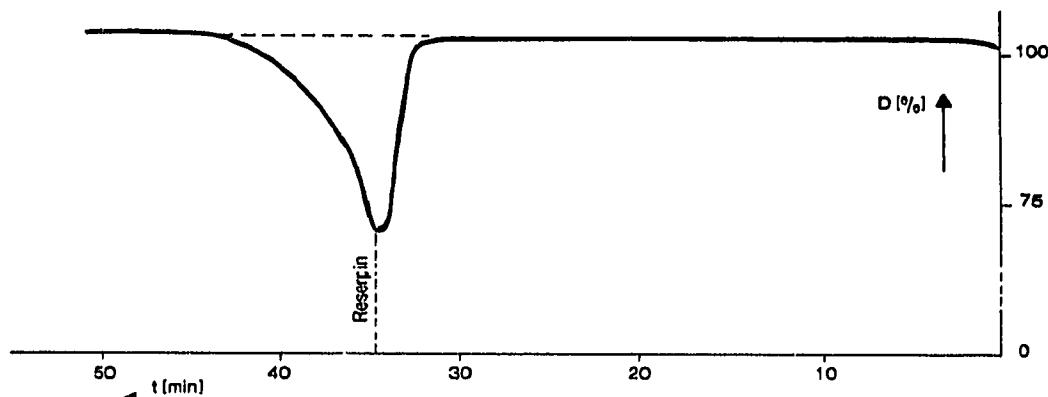


Fig. 8. Säulenchromatographischer Nachweis von Coffein in *Rauwolfia serpentina*. Analysenbedingungen: Stationäre Phase: Aluminiumoxid sauer aktiv für die Chromatographie. Aufgetragene Menge: 180 µg Extrakt. Elutionsflüssigkeit: Methanol. Durchflussgeschwindigkeit: 1.2 ml/min. Wellenlänge (λ): 210 nm.

Grössen auf das Messwert-Zeit-Spektrum der zu analysierenden Substanz (Fig. 8), so erkennt man neben der guten Reproduzierbarkeit des Wertes V_t für Reserpin weiterhin das Fehlen von Coffein in dem *Rauwolfia*-Extrakt. Als abschliessende Beurteilung soll für die Analyse die Aussage "Coffein unter den gewählten optimalen Bedingungen nicht nachweisbar" als ausreichend betrachtet werden.

Für die Einsatzmöglichkeit der Säulenchromatographie auf dem klinischen Sektor dürften vereinfachte Arbeitsweisen eine gewisse Belebung erwarten lassen. Bei der Frühdiagnose von Tumoren einschliesslich des Krebses wird von einigen Autoren⁵ der Ausscheidung von Histaminopurin in biologischen Flüssigkeiten erhöhte Bedeutung beigemessen. Eine quantitative Bestimmung dieser Verbindung mit Hilfe der Säulenchromatographie ist durchaus möglich. Auch sie bietet gegenüber der

direkten UV-Analyse den Vorteil, weitgehend frei von Störungen durch die restlichen Bestandteile der Untersuchungssubstanz zu sein.

Zur Erstellung einer Eichkurve chromatographiert man unter den in der Legende zu Fig. 9 angegebenen Bedingungen je 0.1 ml einer Lösung von 2.5 und 5 mg Histaminopurin in 5 ml Wasser. Fig. 9 gibt die logarithmisch registrierten Elutionskurven der Eich- und Probelösungen wieder, Fig. 10 die durch Integration der Kurven (a) bzw. (b) erhaltene Eichkurve. In der zu analysierenden biologischen Flüssigkeit — es handelte sich um menschlichen Harn — konnte Histaminopurin nicht nachgewiesen werden. Ein Wiederfindungsversuch ergab aus der Eichkurve für die einem Normalharn zugesetzte Menge von 5 mg/5 ml einen Wert von 4.8 mg/5 ml.

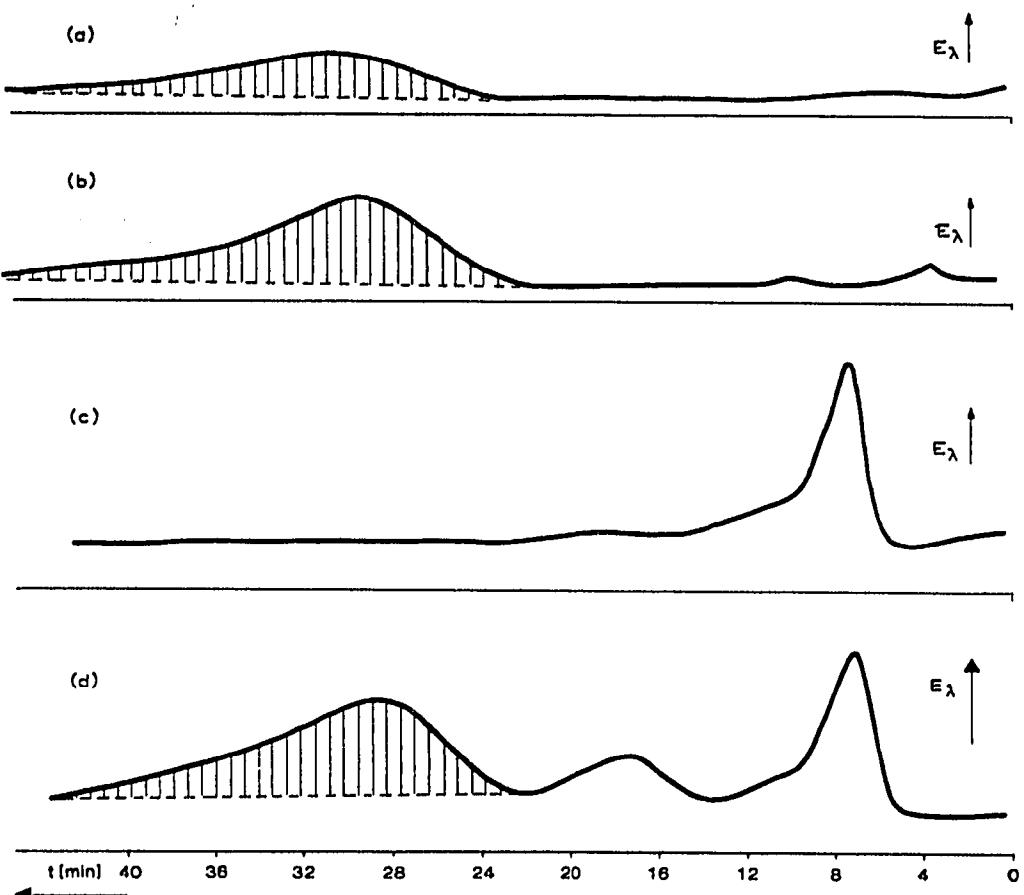


Fig. 9. Extinktions-Zeit-Kurven der säulenchromatographischen Analyse von Histaminopurin in Human-Harn. Analysenbedingungen: Stationäre Phase: PEI-Cellulose. Aufgetragene Menge: je 0.1 ml von (a) 2.5 mg Histaminopurin/5 ml Wasser, (b) 5 mg Histaminopurin/5 ml Wasser, (c) Human-Harn und (d) Human-Harn + 5 mg Histaminopurin/5 ml. Elutionsflüssigkeit: 1.5 M NaCl-Lösung. Wellenlänge (λ): 270 nm.

Abschliessend sei vermerkt, dass — bedingt durch den annähernd linearen Verlauf der Eichkurve — in dem gewählten Konzentrationsbereich eine quantitative Auswertung mit Hilfe einer Proportion unter Zugrundelegung eines einzelnen Kontrollwertes zu einer weiteren Vereinfachung der Analyse führt.

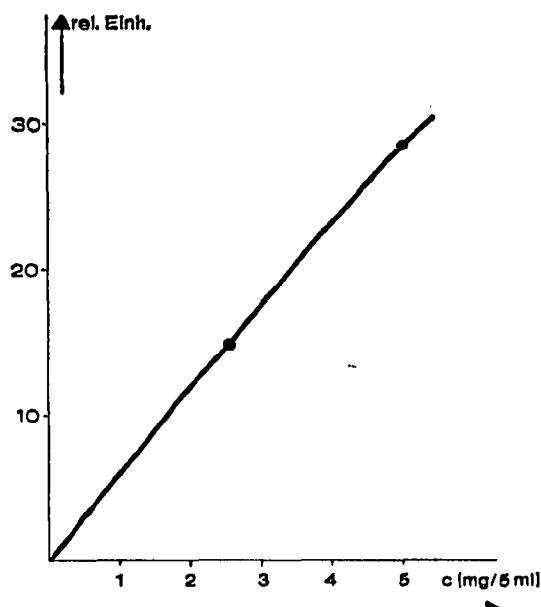


Fig. 10. Aus Fig. 9 resultierende Eichkurve: Integrierte Extinktions-Zeit-Kurven in Abhängigkeit des Histaminopurin-Gehaltes.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwendung der säulenchromatographischen Trennverfahren in Verbindung mit einer nachfolgenden quantitativen Analyse wird mit der erwähnten Säule mit einfachsten Mitteln ermöglicht: Der über die Anschaffung eines Photometers mit Registriereinrichtung hinausgehende zusätzliche chromatographisch-apparative Aufwand ist, vergleicht man ihn mit dem der *in situ*-Auswertung der Dünnschichtchromatographie, sehr gering. Für Laboratorien mit einem begrenzten Probenanfall dürfte daher die Säulentechnik auch bei einem gegenüber der Dünnschichtchromatographie etwas grösseren zeitlichen Aufwand besonders geeignet sein.

Im einzelnen wird in den vorstehenden Ausführungen eine chromatographische Säule beschrieben, die neben einer fortlaufenden Beschickung eine relativ günstige photometrische Messung des Eluates erlaubt. Bei veränderten Durchflussgeschwindigkeiten wird deren Einfluss auf die Analysenzeit bzw. auf das Trennvermögen untersucht. Mit Beispielen aus der pharmazeutischen bzw. klinischen Praxis wird die Anwendung des Verfahrens beschrieben.

LITERATUR

- 1 F. TURBA, *Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1954, S. 76 ff.
- 2 P. W. DANCKWORTH UND I. EISENBRAND, *Lumineszenz-Analyse im filtrierten ultravioletten Licht*, Geest und Portig KG, Leipzig, 1964, S. 68.
- 3 F. TURBA, *Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1954, S. 43.
- 4 W. FOERST, *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, Band 2, Teil 1, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, 1961, S. 160 ff.
- 5 H. BALLWEG, *Ann. Chem.*, 649 (1961) 114.