

CHROM. 5878

# TRENNUNG KOMPLEXER STOFFGEMISCHE LIPOPHILER UND HYDROPHILER SUBSTANZEN DURCH GEL-VERTEILUNGSCROMATOGRAPHIE AN SEPHADEX LH-20\*

H.-J. KLIMISCH UND L. STADLER

*Forschungsinstitut der Cigarettenindustrie e.V., D 2 Hamburg 54 (B.R.D.)\*\**

(Eingegangen am 13. Dezember 1971)

## SUMMARY

*Separation of mixtures of lipophilic and hydrophilic compounds by gel distribution chromatography on Sephadex LH-20*

In comparison with the hydrophilic gels of the Sephadex G type, columns of the more lipophilic Sephadex LH-20 show important advantages in gel distribution chromatography because of the higher stability of these systems and the quantitative elution of compounds. The preparation of these columns is described. Possibilities for the separation of forty-seven compounds of various polarities are shown by comparing different solvent systems. The rate of recovery and loading capacity are determined with the help of radioactive-labelled compounds. A thin-layer chromatographic method for the rapid selection of the most favourable solvent system is developed.

## EINLEITUNG

Die Trennmöglichkeiten der Gel-Verteilungschromatographie (GVC) im Bereich komplexer Gemische lipophiler bis hydrophiler Substanzen sind wenig ausgenutzt worden. Bisher sind nur Arbeiten mit den hydrophilen Gelen der Sephadex G-Typen<sup>1,2</sup> bekannt. Schwierigkeiten in der Stabilität dieser Systeme und bei der Elution hydrophiler Substanzen schränken die Anwendung ein. Auf Grund seiner lipophilen und hydrophilen Eigenschaften sollte Sephadex LH-20 Vorteile bieten. Bei Sephadex LH-20 sind bisher nur der Ionenaustauschcharakter ähnlicher Systeme<sup>3</sup>, die Adsorptionseigenschaften des Gels bei Verwendung eines Lösungsmittelgradienten<sup>4</sup> oder die molekülsiebenden Eigenschaften des Gels angewandt worden. Bei einem GVC-Trennverfahren wirkt das Gelgerüst vorwiegend als inerter Träger der Lösungsmittelsysteme. Eine solche Säule besteht aus einem polaren Lösungsmittel (Alkohol-Wasser-Gemische), der stationären Phase, die sich im

\* Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf der 25th Tobacco Chemists Research Conference, Louisville, Ky., U.S.A., 6-8. Oktober 1971, vorgetragen.

\*\* Direktor: Prof. Dr. W. DONTENWILL.

Innenvolumen ( $V_i$ ) der Sephadex LH-20 Gelpartikel befindet, und aus der mobilen Phase, einem unpolaren Lösungsmittel (Hexan, Cyclohexan, Benzol), das die Gelpartikel als Aussenvolumen ( $V_o$ ) umgibt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Präparierung von GVC-Säulen, das Trennverhalten von 47 Substanzen verschiedener Verbindungsklassen sowie Änderungen der Auftrennung bei der Wahl verschiedener Lösungsmittelsysteme.

## MATERIAL UND METHODE

### *Material*

Als Gel wurde Sephadex LH-20 (Deutsche Pharmacia GmbH) in Chromatographiesäulen (Chromatonix) der Dimensionen  $25.4 \times 1090$  mm eingesetzt. Die Säulen wurden mit Hilfe der peristaltischen Pumpe Modell Vario-Perpex (LKB) entwickelt und die eluierten Substanzen mit dem Spektralphotometer PMQ II (Zeiss) mit Durchflussküvette, mit dem Differentialrefraktometer Lamidur (Winopal-Forschung) oder einzelne Fraktionen mit radioaktiv-markierten Substanzen mit dem Flüssigkeits-Scintillator Ansitron II (Picker-Nuclear) bzw. dünnschichtchromatographisch nachgewiesen.

Als Lösungsmittel wurden Methanol-Wasser (85:15) und (70:30) als stationäre Phase, Hexan und Benzol als mobile Phase eingesetzt.

### *Präparierung der Säulen*

Das in Methanol-Wasser gequollene Gel wurde in die Säule gefüllt und danach die Säule solange mit Hexan bzw. Benzol gespült, bis kein Methanol-Wasser mehr aus der Säule austrat. Es tropfte dann ein klares Hexan- bzw. Benzoleluat aus der Säule, während vorher entweder Methanol-Wasser oder ein trübes Lösungsmittelgemisch eluierten. Die jeweils eingesetzten Lösungsmittelphasen wurden vorher durch Schütteln gegeneinander abgesättigt.

### *Recovery*

Quantitative Untersuchungen wurden mit den radioaktiv-markierten Substanzen [ $9\text{-}^{14}\text{C}$ ]Anthracen und D,L-[ $2'\text{-}^{14}\text{C}$ ]Nikotin vorgenommen. Das in mehrere Fraktionen aufgeteilte Eluat wurde vermessen und die Ergebnisse zur Bestimmung der Elutionskurve sowie der Recovery herangezogen.

### *Belastbarkeit*

Die Belastbarkeit der Säulen wurde mit verschiedenen Einwaagen an Anthracen bestimmt, teilweise unter steigendem Zusatz an Belaststoffen wie Naphthalin und Guajacol. Dabei wurde das Aufgabevolumen von 2 ml konstant gehalten.

### *Trennverhalten der Säulen*

Die in Tabelle III aufgeführten Testsubstanzen wurden nacheinander auf die Säule gegeben und die Säule in aufsteigender Richtung mit der unpolaren Phase entwickelt. Waren die Substanzen bis 1700 ml nicht eluiert, so wurden die Substanzen in absteigender Entwicklungsrichtung mit der Polarphase Methanol-Wasser ausgewaschen. Die Säule wurde im Anschluss daran wieder mit Hexan oder Benzol umgestellt. Die günstigste Elutionsgeschwindigkeit lag bei 120 ml/h.

Von den in Tabelle III genannten Substanzen wurden die Verteilungskoeffizienten in verschiedenen Phasenpaaren nach einer abgewandelten Methode von JENTOFT UND GOUW<sup>5</sup> bestimmt. Wir änderten die Methode so ab, dass man durch Einengen einer Phase und nachfolgendem Aufnehmen der Substanz in einem reinen Lösungsmittel eine höhere Reproduzierbarkeit des Verfahrens erreicht.

#### *Screening Test auf Sephadex LH-20 Dünnschichtplatten*

Die 20 × 40 cm Glasplatten werden mit einem Shandon-Streichgerät in einer Schichtdicke von 1.2 mm mit in 70% bzw. 85% Methanol gequollenem Sephadex LH-20 belegt und genau 10 min bei Zimmertemperatur getrocknet. Die in Tabelle V genannten N-Heterozyklen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) werden 5 cm vom Plattenrand aufgetragen und in einem Neigungswinkel von 4° in absteigender Richtung mit Hexan, gesättigt mit Methanol, entwickelt. Eine flachgelegte Chromatographiekammer für Papierchromatogramme eignet sich als Entwicklungsgefäß. Zur Kammersättigung mit dem Lösungsmittel wird der mit Papier belegte Boden der Kammer mit der mobilen Phase getränkt. Das Lösungsmittelreservoir ist mit dem oberen Ende der Dünnschichtplatte durch einen Papierstreifen (Schleicher & Schüll 2043b Mgl) verbunden. Nach ca. 1 h ist die Chromatographie bei einer Laufstrecke von 30 cm beendet. Die  $R_F$ -Werte werden nach dem in der Chromatographie üblichen Verfahren berechnet. Der Nachweis der Substanzen erfolgt unter UV-Bestrahlung mit einer Hg-Lampe bei 254 und 356 nm.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auf Grund des sowohl lipophilen als auch hydrophilen Charakters von Sephadex LH-20 sind GVC-Säulen sehr viel stabiler als Säulen mit nur hydrophilen Trägergelen der Sephadex G-Typen. So kann nach einer Elution der Säule mit Methanol-Wasser anschliessend sofort wieder mit Hexan oder Benzol zu einem biphasischen Trennsystem umgestellt werden, ohne die Säule neu zu füllen. Eine wassertempertierte Säule wurde vier Monate lang ununterbrochen zu Trennungen herangezogen und erwies sich als stabil. Die Stabilität einer solchen biphasischen Säule ist umso grösser, je mehr sich die Dichten der unpolaren und polaren Phasen unterscheiden. Eine für die Anwendung der Trenntechnik wesentliche Beobachtung stellen die in der Literatur bei hydrophilen Gelsäulen beschriebenen Schwierigkeiten dar, dass speziell polare Stoffe nicht quantitativ wieder eluierbar sind.

Quantitative Untersuchungen mit [9-<sup>14</sup>C]Anthracen und D,L-[2'-<sup>14</sup>C]Nikotin sprechen dafür, dass bei den Sephadex LH-20 Säulen eine vollständige Wiedergewinnung sowohl für lipophile als auch für hydrophile Substanzen möglich ist (Tabelle I).

**TABELLE I**  
**RECOVERY RADIOAKTIV-MARKIERTER TESTSUBSTANZEN**

Substanz	Recovery (%)
[9- <sup>14</sup> C]Anthracen	99.6
D,L-[2'- <sup>14</sup> C]Nikotin	101.1

TABELLE II

BELASTBARKEIT Z.T. UNTER ZUSATZ VON NAPHTHALIN UND GUAJACOL UND NACHWEIS DER ELUTIONSVOLUMENKONSTANZ VON ANTHRACEN

Anthracen	Zusatz	$V_e$ max. (ml)
400 $\mu$ g	—	225
40 mg	—	224
400 $\mu$ g	10 mg Naphthalin	224
400 $\mu$ g	1 g Naphthalin	223
250 mg	250 mg Guajacol	224

Als weiteren Vorteil des Trennsystems ergab sich eine günstige Belastungskapazität der Säulen. Eine in Tabelle II ersichtliche Konstanz im Elutionsvolumen ( $V_e$ ) von Anthracen ist trotz steigender Zugabe von Belastsubstanzen gewährleistet. Die Elutionsvolumina schwanken um weniger als 1%. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Säule mit hydrophilen Verbindungen wie Guajacol oder mit lipophilen Substanzen wie Naphthalin belastet wird. Später durchgeführte Belastungsversuche mit einem so komplexen Gemisch wie Zigarettenrauchkondensat haben gezeigt, dass sich die Belastung bei Konstanz im Elutionsvolumen noch um den Faktor 10 erhöhen lässt. Damit ergibt sich eine Belastbarkeit von 25–30 mg Probensubstanz auf 1 g Trockengel.

Ein Grund für diese günstige Belastungsmöglichkeit dürfte in dem hohen Anteil an stationärer Phase im Trennsystem liegen. Nach der Bestimmung des Volumens  $V_0$  zwischen den Gelkörnern mit Polystyrol (MG = 10300),  $V_0 = 125$  ml, ergibt sich für eine  $25.4 \times 1090$  mm Trennsäule bei einer Geleinswaage von 110 g nach der Gleichung

$$V_t = V_0 + V_i + V_m$$

ein Wert von 321 ml für  $V_i + V_m$  ( $V_i$  = Volumen innerhalb der Gelpartikel;  $V_m$  = Volumen der Gelmatrix;  $V_t$  = Gesamtvolumen). Bei einem Quellfaktor des Gels von 2 fallen also 72% des Gesamtvolumens auf den Wert  $V_i + V_m$ . Dieser beträchtliche Anteil an stationärer Phase bewirkt eine hohe Trennleistung in Verbindung mit einer günstigen Belastbarkeit.

Nach diesen Charakteristiken der Säuleneigenschaften prüften wir das Trennverhalten der Säulen mit den in Tabelle III genannten Testsubstanzen. Dabei wurde die Säule bis 1700 ml, dem vierfachen des Gelbettvolumens, mit Hexan oder Benzol eluiert. Lipophile Substanzen wie Paraffine, Terpene, Fettsäureester und PAH wurden sehr schnell von der Säule eluiert. Stoffe wie Äther, Ketone und auch Chinone verblieben mit zunehmend polarerem Charakter länger auf der Säule. Hydrophile Substanzen schliesslich wie Amine, Aminosäuren, Zucker, Phenole, Polyalkohole und einige N-Heterozyklen konnten erst nach dem Umstellen auf das Elutionsmittel Methanol-Wasser von der Säule gewaschen werden. Sie verblieben also gelöst in der stationären Phase auf der Säule. Man erreicht so eine sehr effektive Trennung lipophiler von hydrophilen Substanzgruppen, aber auch deutliche Abtrennungen von Substanzen mittlerer Polarität.

Je nach Auswahl des Lösungsmittelsystems können eine günstigere Auftrennung von Substanzen oder eine schnellere Elution erreicht werden. Zur Auswahl

TABELLE III

## TRENNVERHALTEN VON TESTSUBSTANZEN

Lösungsmittelsysteme: (I) Methanol-Wasser (85:15)/Hexan; (II) Methanol-Wasser (70:30)/Hexan; (III) Methanol-Wasser (70:30)/Benzol; Säule, 25.4 × 1090 mm; Geleinswaage, 110 g Sephadex LH-20; Elutionsgeschwindigkeit, 120 ml/h. Die mit einem Strich (—) gekennzeichneten Substanzen sind bis 1700 ml mit Hexan nicht eluierbar. Ihre Elution erfolgt erst mit Methanol-Wasser.

Substanz	V <sub>e</sub> max. (ml)		
	System I	System II	System III
Dibenz[ <i>a,h</i> ]acridin	354	216	143
Dichinoly	400	230	143
Acridin	1650	995	229
Acridan	1580	840	183
Carbazol	1690	1483	
Chinolin	—		
Indol	—		
Skatol	—		
1-Aminoanthracen	—		
Nikotinsäureamid	—		
Acetanilid	1700		
Anisol	286		
Veratrol	860		
1,2,4-Trimethoxybenzol	1175		
Methylanisol	200		
3-Methyl-5-äthylphenol	—		
Naphthol	—		
Palmitinsäure	163		
Benzoessäure	—		
Acetophenon	1100		
Anthrachinon	570		
Naphthochinon	—		
Benzophenon	481		
Anilin	—		
Octylamin	—		
Nikotin	—		
1-Glutaminsäure	—		
Glycerin	—		
Saccharose	—		
Dodecan	121		
Octadecan	131		
Octacosan	132		
Limonen	136		
Cholesterin	134		
Stearinsäuremethylester	125		
Linolensäuremethylester	125		
Benzoessäuremethylester	440		
Naphthalin	222	162	152
Anthracen	226	161	146
2-Methylantracen	220		
Phenanthren	236		
Naphthacen	242	170	
1,2-Benzanthracen	267		
3,4-Benzpyren	284	175	143
Benzofuran	302		
Dibenzofuran	224	163	
Xanthen	195		

TABELLE IV

VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN  $K^a$  VON TESTSUBSTANZEN

$K^a$  = Konzentration lipophile Phase/Konzentration hydrophile Phase; I, II, III = Lösungsmittelpaare entsprechend Tabelle III.

Substanz	$K^a$		
	I	II	III
Anthracen	5.4	17	27
Benzo[a]pyren	8.1	35	—
Acridin	0.24	0.66	12.1
Acridan	0.26	1.58	12.4
Dibenz[a,h]acridin	3.45	—	—
1-Amino-anthracen	0.16	—	—

des am besten geeigneten Lösungsmittelpaares eignen sich mehrere orientierende Verfahren. Entweder bestimmt man den Verteilungskoeffizienten (Tabelle IV) einer Testsubstanz gegenüber dem Lösungsmittelpaar. Beim Vergleich der Zahlenwerte in Tabelle IV mit den in Tabelle III aufgeführten Elutionsvolumina zeigt sich eine umgekehrte Proportionalität zwischen Verteilungskoeffizienten und Elutionsvolumen.

Schnellere und direkt systembezogene Orientierungen ermöglichen ein Screening Test auf Sephadex LH-20 Dünnschichtplatten. Die  $R_F$ -Werte der in Tabelle V genannten Substanzen zeigen deutlich den Wert solcher dünn-schicht-verteilungs-chromatographischer Voruntersuchungen. So lässt sich z.B. eine Mischung der N-Heterozyklen Acridin, Acridan und Carbazol mit dem Lösungsmittelsystem II, Methanol-Wasser (70:30)/Hexan, besser trennen, während eine günstigere Auftrennung von PAH mit dem Lösungsmittelsystem I, Methanol-Wasser (85:15)/Hexan, erfolgen kann. Eine Trennung der PAH von den N-Heterozyklen wird durch einen erhöhten Wassergehalt des Methanols ebenfalls verbessert. Ein Vergleich der  $R_F$ -Werte des dünn-schicht-chromatographischen Verfahrens mit den in den Tabellen II und V zusammengestellten Elutionswerten der Säulenchromatographie zeigt ein ähnliches

TABELLE V

## DÜNNSCHICHT-VERTEILUNGSCROMATOGRAPHIE AUF SEPHADEX LH-20 PLATTEN

Lösungsmittelsysteme: I = Methanol-Wasser (85:15)/Hexan; II = Methanol-Wasser (70:30)/Hexan. Elutionsvolumina ( $V_e$ ) aus der Tabelle III.

Substanz	I		II	
	$R_F$ -Werte	$V_e$ (ml)	$R_F$ -Werte	$V_e$ (ml)
Acridin	0.18	1650	0.4	995
Acridan	0.19	1580	0.48	840
Carbazol	0.17	1690	0.15	1483
Phenanthren	0.74	236		
Anthracen	1.00	226	0.93	161
1,2-Benzanthracen	0.56	267		
Naphthacen	0.59	242		
3,4-Benzpyren	0.54	284	0.91	175

Trennverhalten der Substanzen in den unterschiedlichen Chromatographieverfahren. Damit eignet sich diese Methode gut als Screening Test zur Auswahl geeigneter Lösungsmittelsysteme.

Wie zum Teil bereits abgeschlossene Versuche zeigen, eignet sich das Verteilungschromatographische Trennverfahren an Sephadex LH-20 Säulen zur Trennung komplexer Stoffgemische in hydrophile und lipophile Substanzen, ebenso aber zur Auftrennung von Substanzklassen wie z.B. PAH.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Zur Trennung komplexer Stoffgemische lipophiler und hydrophiler Substanzen zeigt eine Verteilungschromatographie an lipophilen Sephadex LH-20 auf Grund hoher Systemstabilität und quantitativer Elution Vorteile im Vergleich zu hydrophilen Sephadex G-Typen. Die Präparation einer Säule wird beschrieben. Anhand von siebenundvierzig Verbindungen verschiedener Substanzklassen werden unter Variation der Lösungsmittel Trennmöglichkeiten aufgezeigt. Recovery und Belastbarkeit werden teilweise mit radioaktiv-markierten Substanzen bestimmt. Ein dünn-schicht-verteilungschromatographisches Verfahren wird beschrieben, das sich zur schnellen Auswahl günstiger Lösungsmittelsysteme eignet.

#### LITERATUR

- 1 R. E. WUTHIER, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 558.
- 2 C. TERNER, E. I. SZABO UND N. L. SMITH, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 15.
- 3 G. V. KISSELEV, *Biokhimiya*, 34 (1969) 483.
- 4 P. J. HELMSING, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 131.
- 5 R. E. JENTOFT UND T. H. GOUW, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 1787.

*J. Chromatogr.*, 67 (1972) 291-297