

EIN APPARATIV EINFACHES SYSTEM UND SÄULEN HÖCHSTER TRENNLEISTUNG  
ZUR PRÄPARATIVEN MITTELDRUCK-FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

G. Helmchen und B. Glatz

1978

Institut für Organische Chemie, Biochemie  
und Isotopenforschung der Universität Stuttgart

Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren wurde wesentlich durch Zusammenarbeit mit K. Haug und G. Zembrak (Werkstatt dieses Instituts) gefördert.

Chromatographische Messungen sind P. Schott-Kollat und vor allem W. Schühle, Untersuchungen zur Packtechnik ebenfalls diesem sowie D. Flockerzi und G. Silber zu verdanken.

	Seite
EINLEITUNG	1
1. GRUNDBEGRIFFE DER FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE	3
1.1 Charakteristische Daten einer Trennsäule	4
Retentionszeit, Varianz, Symmetrieindex (S.4); Bodenzahl, Bodenhöhe (S.5); Van Deemter-Gleichung: Einfluß der Korngröße und der Elutionsgeschwindigkeit auf die Bodenhöhe (S.6); Kapazitätsfaktor ( $R_F$ -Wert), Totzeit, Totvolumen (S.9); Zeitbedarf eines chromatographischen Laufs, Druckab- fall, Permeabilität (S.11)	
1.2 Beschreibung der Trennung eines Substanzgemisches	14
Trennfaktor (S.14); Auflösung (S.15)	
1.3 Substanzbeladung	18
1.4 Dosiervolumen	19
2. KONZEPTION EINER CHROMATOGRAPHIESÄULE	23
2.1 Säulenform und -dimension	23
Säulenform, Substanzaufgabe (S.23); Säulendurch- messer (S.24); Länge (S.25); Gesamtgröße (S.26); Werkstoff (S.26)	
2.2 Adsorbentien, Korndurchmesser, Druckbereich	27
Kieselgel, Druckabfall, Zeitbedarf (S.27); Reversed- -phase Adsorbens (S.30)	
2.3 Packungsmethoden, Lebensdauer	33
3. DAS VERFAHREN	35
3.1 Beschreibung der Apparatur	35
Eluensvorratsbehälter (S.35); Pumpe (S.35); Leitun- gen (S.35); Pulsationsdämpfer (S.36); Manometer (S.37); Filter (S.37); Aufgabesystem (S.37); Trennsäulen (S.41) Detektoren (S.41); Schreiber (S.43); Sammeln der Fraktionen (S.43)	
3.2 Packen der Säulen	43
3.2.1 Trockenpackung von Kieselgel mit Korndurchmesser $>50\mu$	43
3.2.2 Naßpackung von Kieselgel mit Korndurchmesser 15-25 $\mu$	43

	Seite
A1. Allgemeine Hinweise, Sicherheitsvorkehrungen (S.44)	
A2. Entgasung von Wasser und Adsorbenssuspensionen (S.45)	
A3. Vorbehandlung und Silanisierung der Säulen (S.45)	
B. Packen einer Säule Typ B (S.45)	
C. Packen einer Säule Typ C (S.49)	
D. Test auf Bodenzahl und Symmetrieindex (S.50)	
E. Wiederaufbereitung von Kieselgel (S.51)	
3.3 Rückgewinnung von Lösungsmitteln	52
4. MESSERGEBNISSE, DISKUSSION	54
4.1 Permeabilität	54
<p>Theorie: Permeabilität und Lineargeschwindigkeit in axialsymmetrischen, speziell kegelstumpfförmigen Säulen (S.54);  Dynamische Korngröße von Merck LiChroprep 15-25<math>\mu</math> (S.58); Permeabilität von präparativen Säulen mit Durchmesser 2.4 (Typ B) und 4 cm (Typ C), Meßergebnisse (S.60); Druckwiderstand von präparativen Säulen, Diskussion (S.64)</p>	
4.2 Effizienz: Peakform, van Deemter-Kurven	71
<p>Peakform (S.75); Bodenzahl, Symmetrieindex, Reproduzierbarkeit (S.76); Lebensdauer (S.76); Beweis des Nicht-Vorliegens eines Infinite-diameter-Effekts, Beladbarkeit (S.79); Effizienz, van Deemter-Kurven (S.83)</p>	
LITERATURVERZEICHNIS	93

## EINLEITUNG

In der organischen Chemie bedient man sich seit 1931 [2a] der präparativen Adsorptionsflüssigkeitschromatographie (LC); 1938 wurde die Durchlaufelutionstechnik eingeführt [2b]. Diese Arbeitsweise, im folgenden als "konventionelle Säulenchromatographie" bezeichnet, hat sich für präparative Zwecke bis heute im wesentlichen unverändert erhalten.

Als analytische Methoden sind ab etwa 1960 die Dünnschichtchromatographie (DC) und ab ca. 1970 die Hochdruck- oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) hinzugekommen. Die außerordentlich leistungsstarke HPLC wurde geboren, als die in der viel früher entwickelten Gaschromatographie erarbeiteten allgemeinen theoretischen Grundlagen der Chromatographie auf die Flüssigkeitschromatographie angewendet wurden. Die analytische HPLC hat infolge starker Nachfrage durch industrielle Produktkontrolle, klinische Chemie, Pharmazie und Umweltschutz einen enormen Aufschwung genommen und darf wohl als nahezu ausgereifte Methode angesehen werden [3,4].

Infolge von Unkenntnis oder Nichtbeachtung der Bedürfnisse des organischen Chemikers wurde die Entwicklung der präparativen LC fast völlig vernachlässigt, obwohl die konventionelle Säulenchromatographie eine sehr ineffektive Methode ist. Als ihre Hauptnachteile erscheinen

- niedrige Trennleistung
- geringe Reproduzierbarkeit und deshalb starke Abhängigkeit von der Geschicklichkeit der Ausführenden
- mühsame und ungenaue Auswertung der Resultate (üblicherweise durch DC)
- hoher Zeitaufwand
- in der Regel nur einmalige Verwendung und daher Verschwendung des Adsorbens.

Einen ersten bedeutenden Fortschritt bei der Überwindung dieser Nachteile stellen die 1973 auf dem Markt erschienenen Lobar-Fertigsäulen der Fa. Merck dar (Erfinder: F.Eisenbeiß und S.Ehlerding [5]). Sie zeichnen sich gegenüber den konventionel-

len Säulen durch höhere Trennleistung bei kürzerer Chromatographiedauer aus. Den Erfindern kommt das Verdienst zu, das schwierige Problem der Substanzauftragung für beliebige Säulendurchmesser optimal gelöst zu haben.

Die im folgenden beschriebenen eigenen Arbeiten wurden 1974 mit dem Ziel begonnen, die relativ teuren Fertigsäulen - die Füllmethode wird geheimgehalten - zu reproduzieren. Dieses war nicht schwierig [6].

Im Laufe der Zeit mußten Säulen und chromatographisches System in vielfältiger Weise modifiziert und verbessert werden, um den Bedürfnissen des präparativen organischen Chemikers optimal zu dienen. Insbesondere mußte es narrensicher gemacht werden, denn der durchschnittliche Benutzer zeigte wenig Neigung zur Vertiefung in die Feinheiten der Apparatur. Es wurde schließlich ein einfaches, völlig reproduzierbares Verfahren zur Packung präparativer Säulen mit bisher nur in der analytischen HPLC erreichter Trenngüte gefunden.

Während unserer Bemühungen wurden von Chromatographiespezialisten vereinzelt Untersuchungen über Trennsäulen "präparativen Formats" publiziert. Diese Arbeiten werden bei der Diskussion unserer Resultate zitiert, da sie in der Regel mit relativ speziellen Punkten befaßt sind. Daneben wurden und werden zahlreiche einfache "neue" Methoden angepriesen. Die entsprechenden Arbeiten gehören meist in den Bereich der "wissenschaftlichen Trivialliteratur", erkenntlich an der Vernachlässigung jeglicher Theorie und fehlender Charakterisierung der Trennleistung anhand inzwischen allgemein akzeptierter Meßgrößen. Derartige Arbeiten werden hier nicht berücksichtigt.

## 1. GRUNDBEGRIFFE DER FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Der apparative Aufbau eines modernen Chromatographiesystems ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

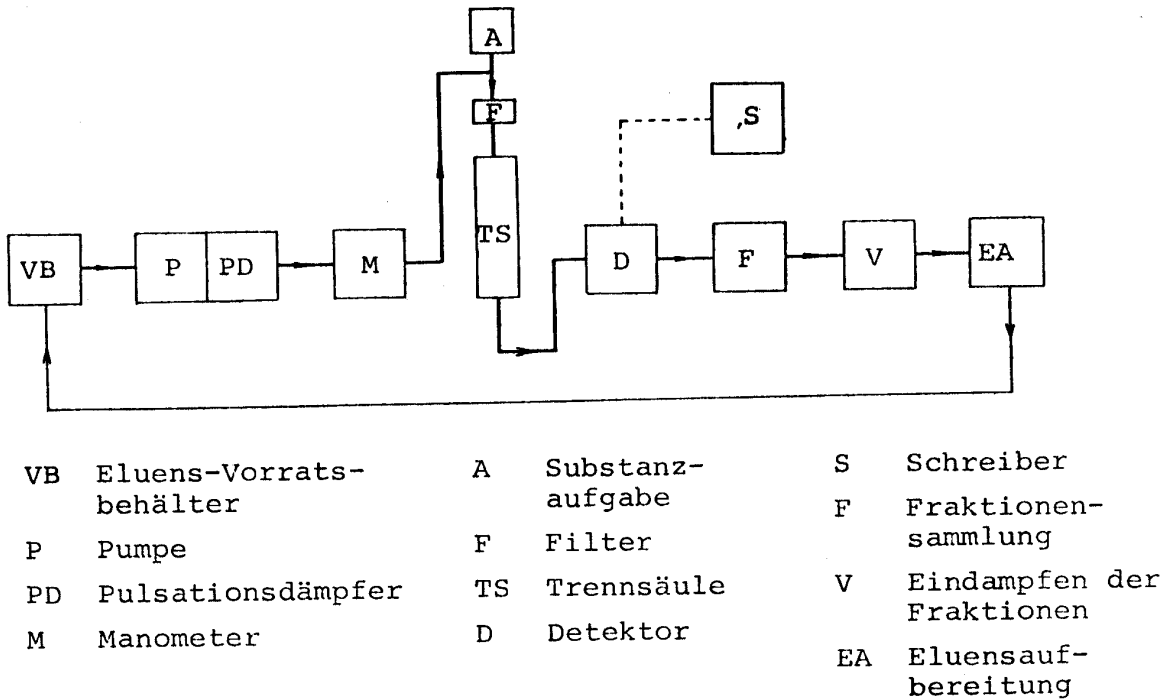


Abb. 1 Schema eines Flüssigkeitschromatographen

Eine möglichst konstant fördernde Dosierpumpe (P) transportiert das Eluens aus dem Vorratsbehälter (VB) über das Substanzaufgabesystem (A) nach Passieren eines Filters (F) durch die Trennsäule (TS). Konventionelle Pumpen benötigen einen Pulsationsdämpfer (PD) zur Glättung des Eluensstromes. Ein Manometer (M) dient zur Überwachung des Drucks und indirekt zur Messung der Strömungsgeschwindigkeit. Die in A aufgegebenen Substanzen erzeugen nach ihrer Elution im Detektor (D, UV-Spektrometer oder Differentialrefraktometer) Signale, die verstärkt und mittels eines Schreibers (S) registriert werden. Nach Maßgabe des auf dem Schreiber gezeichneten Chromatogramms werden Fraktionen (F) aufgefangen und schließlich eingedampft (V). Die hierbei anfallenden Lösungsmittel müssen vor ihrer Wiederverwendung als

Eluens im allgemeinen speziell aufbereitet werden (EA). Bei analytischer Arbeitsweise fallen die Teile F, V und EA im allgemeinen fort.

### 1.1 Charakteristische Daten einer Trennsäule

Retentionszeit, Varianz, Symmetrieindex. - Die Beurteilung der Leistungsfähigkeit einer Trennsäule erfolgt durch Größen, die aus dem chromatographischen Verhalten einer reinen Substanz abgeleitet sind. Das vom Detektor erzeugte Signal, der Peak, entspricht im Idealfall einer Gaußfunktion, sofern der Schreiber-ausschlag der Konzentration proportional ist (Abb. 2).

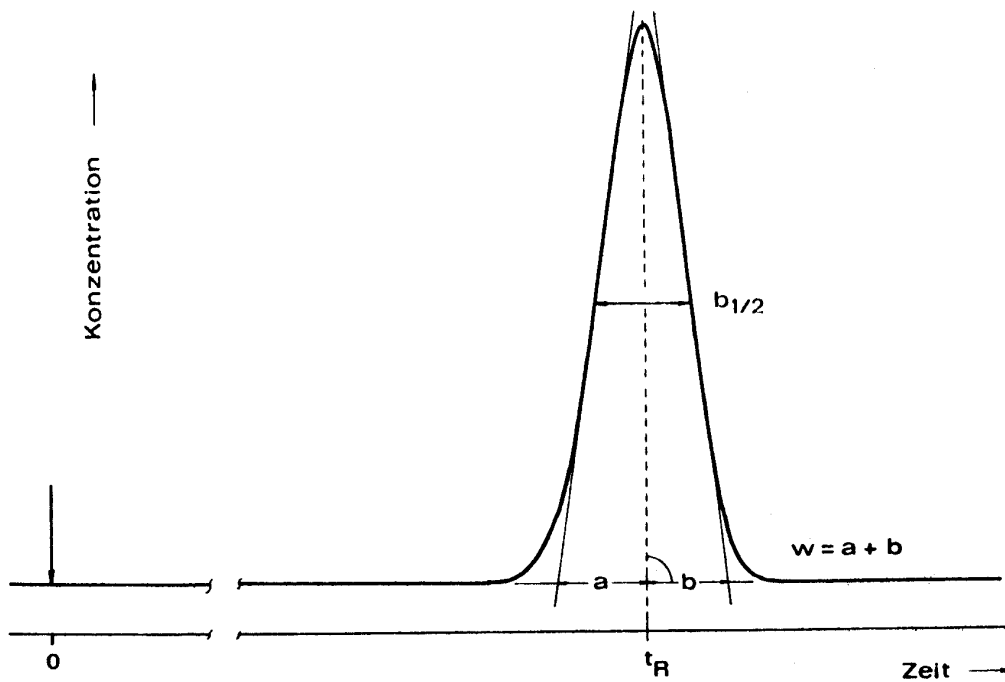


Abb. 2 Chromatographische Charakterisierung eines Peaks



Lage und Form des Peaks werden durch die Retentionszeit  $t_R$ <sup>1)</sup>, die Zeitspanne zwischen Aufgabe der Substanz und Auftreten des Peakmaximums im Detektor, und die Varianz  $\sigma_t$ , den halben Abstand zwischen den Wendepunkten der Peakflanken, beschrieben. In der Praxis findet man oft von der Gaußform abweichende Peakformen; Ursache dafür kann eine mangelhafte Säulenpackung oder Nichtlinearität der Adsorptionsisotherme sein. Derartige Abweichungen werden durch den sog. Symmetrieindex SI grob<sup>2)</sup> charakterisiert (vgl. Abb. 2).

$$SI = b/a, \text{ wobei } a + b = w \quad \text{Gl. 1}$$

Bodenzahl, Bodenhöhe. - Je schmaler ein Peak bei gegebener Retentionszeit ist, desto größer ist die Trennleistung der Säule. Zur zahlenmäßigen Erfassung dient die "Zahl der theoretischen Böden" N, kurz Bodenzahl N:

$$N = (t_R/\sigma_t)^2 \quad \text{Gl. 2}$$

Statt der Varianz  $\sigma_t$  benutzt man im allgemeinen die dem Chromatogramm leichter zu entnehmenden Größen "Peakbreite auf halben Höhe"  $b_{1/2}$  oder die Basisbreite w (vgl. Abb. 2); w ist die Strecke zwischen den Schnittpunkten der Wendetangenten mit der Basislinie:

$$N = 8 \ln 2 (t_R/b_{1/2})^2 = 5.54 (t_R/b_{1/2})^2 \quad \text{Gl. 3}$$

bzw.

$$N = 16 (t_R/w)^2$$

N ist näherungsweise, aber nicht vollständig substanzunabhängig; es müssen Testsubstanz und Eluens daher stets angegeben werden.

- 
- 1) Eine fundamentalere Größe ist das Retentionsvolumen  $V_R$ ; im Gegensatz zu  $t_R$  ist  $V_R$  von der Geschwindigkeit des Eluens unabhängig.  $V_R$  wird selten direkt gemessen, vielmehr nach  $V_R = t_R \cdot F$  berechnet (F = Durchflußgeschwindigkeit [Volumen/Zeit]).
  - 2) Ähnlich einfach ist der "Peakasymmetriefaktor" [7] definiert. Eine exakte Erfassung erfordert aufwendige Computerberechnungen. Das Problem ist ausführlich in [7] diskutiert.

Für eine homogen gepackte Säule ist die Bodenzahl  $N$  der Säulenlänge  $L$  proportional,  $N \sim L$ , weshalb zur Charakterisierung der Packungsqualität das "Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens"  $H$ , kurz die Bodenhöhe  $H$ , dient:

$$H = L/N \quad \text{Gl. 5}$$

Oft werden mehrere ( $n$ ) Säulen hintereinandergeschaltet. Die Gesamtbodenzahl  $N_G$  ist dann nicht gleich der Summe der Bodenzahlen  $N_i$  der einzelnen Säulen; vielmehr ist die Gesamtbodenhöhe  $H_G$  das nach der Länge  $L_i$  der Einzelsäulen gewichtete arithmetische Mittel (bei gleichem Durchmesser der Einzelsäulen) [8]:

$$H_G = 1/L \sum_{i=1}^n L_i H_i \quad \text{Gl. 6}$$

$$N_G = L/H_G \quad \text{Gl. 7}$$

Hieraus ist als wichtige Lehre zu ziehen: die schlechteste Säule bestimmt die Gesamtbodenzahl entscheidend, d. h. eine schlechte Säule kann ein Ensemble guter Säulen verderben. Man sollte also nur Säulen gleicher Bodenhöhe koppeln. Genaue Angaben für beliebige Kombinationen findet man in [8].

van Deemter-Gleichung: Einfluß der Korngröße und der Eluengeschwindigkeit auf die Bodenhöhe. - Bodenzahl und damit Bodenhöhe ändern sich mit der Geschwindigkeit des Eluens. Der Zusammenhang wird durch die van Deemter-Gleichung, eine der Grundgleichungen der Chromatographie, beschrieben (vgl. Abb. 3):

$$H = A + B/u + C \cdot u \quad \text{Gl. 8}$$

$u$  ist die Lineargeschwindigkeit des Eluens, d. h. die Geschwindigkeit mit der ein "Eluens-Flüssigkeitspaket" durch die Säule transportiert wird. Die Konstanten  $A$ ,  $B$ ,  $C$  besitzen folgende Bedeutung:

$$A = 2 \lambda d_p ; \quad B = 2 \gamma D_m ; \quad C = \omega d_p^2 / D_m + C_s \quad \text{Gl. 8a,b,c}$$

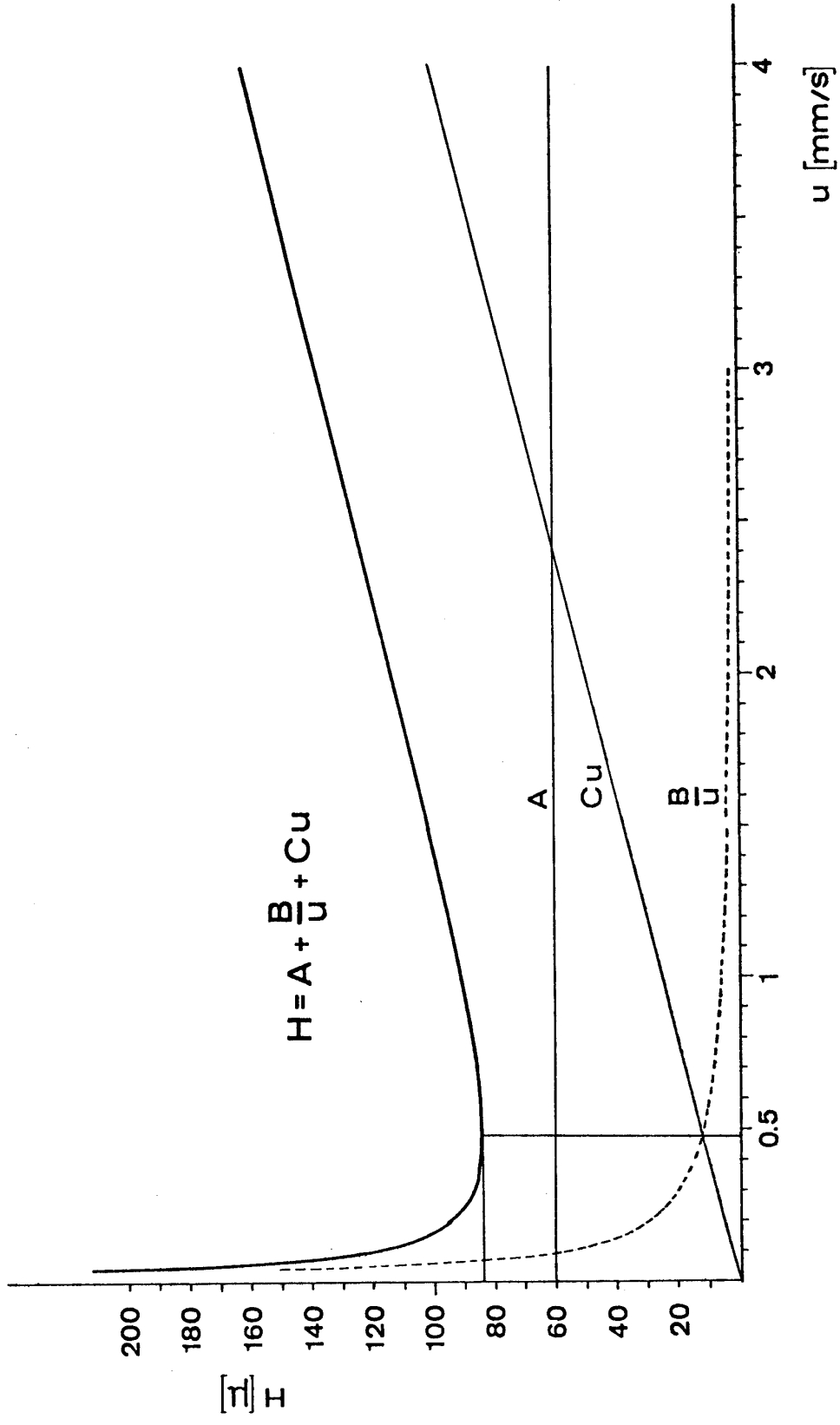


Abb. 3 Van Deemter-Kurve; die Werte entsprechen einer nach Halász typischen guten LC-Säule [ $H=3dp + (6/u) + (dp/16)u$ ], gefüllt mit Adsorbens der Korngröße  $dp=20\mu$

- $d_p$  : Durchmesser des Adsorbens-Korns.
- $\lambda$  : "Packungsfaktor" genannte empirische Konstante, welche die Qualität der Packung charakterisiert ( $\lambda \approx 1$ )
- $D_m$  : Diffusionskoeffizient der Testsubstanz im Eluens.  $D_m$  kann näherungsweise aus der sog. Wilke-Chang-Gleichung <sup>m</sup>[9] berechnet werden.
- $\gamma$  : Als "Labyrinthfaktor" bezeichnete empirische Konstante ( $< 1$ ), welche die Behinderung der freien Diffusion durch die Adsorbenskörner berücksichtigt.
- $\omega$  : Empirische Konstante, abhängig von Packung, Säulendurchmesser und -form.
- $C_s$  : Dieser Term beschreibt Diffusionsvorgänge auf den Adsorbenskörnern; er kann in der IC vernachlässigt werden ( $C_s = 0$ ).

Die Diskussion von Gl. 8 sei auf einige für die Praxis grundlegende Punkte beschränkt:

- Die Funktion  $H(u)$  besitzt ein Minimum  $H_0(u_0)$ . Es muß bei Eluengeschwindigkeiten  $u > u_0$  gearbeitet werden. Nach Halasz [11] kann bei  $u > 1\text{mm/s}$  und  $d_p > 10\mu$  der B-Term vernachlässigt werden.
- Eine Chromatographiesäule ist um so besser, je kleiner A und C sind. Der wichtigste Parameter ist eindeutig  $d_p$ , der Teilchendurchmesser. Da  $\lambda$  bestenfalls gleich 1 sein dürfte, beträgt die Bodenhöhe  $H_0$  einer bestmöglich gepackten Säule 2 Teilchendurchmesser.
- Es ist demnach "unfair", die H-Werte von Säulen aus Teilchen von verschiedenem Durchmesser zu vergleichen. Ein faires Maß ist die sog. reduzierte Bodenhöhe  $h$ :

$$h = H/d_p \quad \text{Gl. 9}$$

Halasz und Mitarbeiter [11] haben sich bemüht, "praxisnahe" Richtwerte für die Konstanten A, B, C von Gl. 8 anzugeben. Sie setzen  $\lambda=1.5, \gamma=1, D_m=3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  (apolare Elution, z. B. KW und Methylenchlorid; Molmasse der Testsubstanz 100-250). Setzt man diese Werte in Gl. 8 ein und verwendet die Dimensionen  $H[\mu]$ ,  $d_p[\mu]$ ,  $u[\text{mm/s}]$ , so folgt als Näherung

$$H = 3d_p + \frac{6}{u} + \frac{d_p^2}{16} u \quad \text{Gl. 8d}$$

Die Teilchengröße  $d_p$ , die in der Praxis natürlich nie eine Konstante darstellt, wird "dynamisch" nach Gl. 23 (s. u.) bestimmt. Die Kurven in Abb. 3 sind für den Fall  $d_p = 20\mu$  berechnet worden.

Kapazitätsfaktor ( $R_F$ -Wert), Totzeit, Totvolumen. - Das chromatographische Elutionsverhalten einer Substanz kann durch die Retentionszeit  $t_R$  nicht eindeutig charakterisiert werden, da diese von der Geschwindigkeit des Eluens sowie den Säulendimensionen und anderen apparativen Gegebenheiten abhängt. Eine physikalisch signifikante Größe ist der Kapazitätsfaktor  $k'$ , der bei gegebenen physikalischen Bedingungen (Eluens, Adsorbens, Temperatur) eine Stoffkonstante analog zum  $R_F$ -Wert der Dünnschichtchromatographie darstellt:

$$k' = (t_R - t_0)/t_0 = (V_R - V_0)/V_0 \quad \text{Gl. 10}$$

Zwischen dem  $k'$ - und dem  $R_F$ -Wert besteht der einfache Zusammenhang<sup>1)</sup>:

$$k' = (1/R_F) - 1 \quad \text{Gl. 11}$$

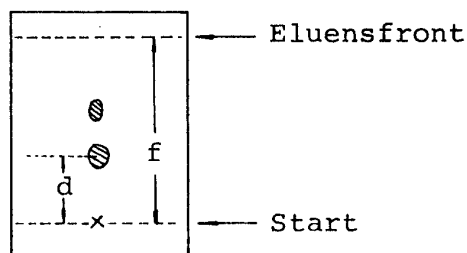
Die physikalische Bedeutung von  $k'$  resultiert aus der Tatsache, daß  $k'$  der Gleichgewichtskonstanten  $K$  für die Verteilung eines Stoffes zwischen Eluens und Adsorbens proportional ist.

$$k' \sim K \quad \text{Gl. 12}$$

1) Diese Beziehung besitzt für die DC<sup>2)</sup> nur näherungsweise Gültigkeit, da im allgemeinen die Säulen- und die Dünnschichtchromatographiebedingungen einander nicht vollständig äquivalent sind.

2) Zur Erinnerung:

$$R_F = d/f$$



$t_0$ , die sog. Totzeit, entspricht der Zeit, welche jede Substanz in Toträumen verbringt, d. h. Räumen ohne Wechselwirkung mit dem Adsorbens; Toträume sind etwa Leitungen, der Detektor und die Hohlräume zwischen den Körnern des Adsorbens.  $t_0$  entspricht gleichzeitig der Retentionszeit einer nicht adsorbierten Substanz. Diese bewegt sich mit der Lineargeschwindigkeit  $u$  durch die Säule, weshalb gilt:

$$t_0 = L/u \quad \text{Gl. 13}$$

Den entsprechenden Peak bezeichnet man als Inertpeak.

Die Bestimmung von  $t_0$  bzw.  $u$  bereitet Schwierigkeiten [10]. Als exaktes Verfahren ist vorgeschlagen worden, das isotonenmarkierte Eluens als Inertsubstanz zu verwenden, was natürlich Detektionsschwierigkeiten aufwirft. Als annähernd inert gilt bei Eluentien, die Kohlenwasserstoffe enthalten, das niedrigere Homologe des Kohlenwasserstoffs; im allgemeinen wird Pentan als Inertsubstanz verwendet.

Vielfach wird die folgende Methode benutzt. Für ein gerades Rohr mit dem Innenradius  $R$  besteht zwischen der sehr leicht zu messenden Durchflußgeschwindigkeit  $F$  (Volumen/Zeit) und der Lineargeschwindigkeit  $u$  der triviale Zusammenhang

$$F = \pi R^2 u \quad \text{Gl. 14}$$

Der Tatsache, daß die Chromatographiesäule mit Adsorbens gefüllt ist, wird durch einen "Porosität" genannten Korrekturfaktor Rechnung getragen:

$$F = \epsilon_T \pi R^2 u \quad \text{Gl. 15}$$

$\epsilon_T$  muß empirisch bestimmt werden. Für übliches Kieselgel der Porenweite 60 Å wurde  $\epsilon_T = 0.84 \pm 0.05$  gefunden<sup>1)</sup> [11]. Aus den Gl. 13 und 15 folgt:

$$t_0 = L \pi R^2 \epsilon_T / F \quad \text{Gl. 16}$$

Eine sehr viel bessere, vor allem für präparative Säulen geeignete Methode wurde von uns gefunden; sie scheint in der chromatographischen Literatur noch nicht erwähnt zu sein. Man füllt die Chromatographiesäule samt Zu- und Ableitungen nacheinander mit zwei Flüssigkeiten unterschiedlicher Dichte,  $d_1$  und  $d_2$ , und wägt sie, was die Massen  $M_1$  und  $M_2$  ergibt. Das Flüssigkeitsvolumen der Säule, das dem Totvolumen  $V_0$  gleich ist, berechnet sich

---

1) Nach eigenen Messungen und Literaturangaben erscheint dieser Wert etwas hoch; realistischer dürfte sein:  $\epsilon_T = 0.75 \pm 0.1$ .

aus diesen Werten zu

$$V_0 = (M_1 - M_2) / (d_1 - d_2) \quad \text{Gl. 17}$$

Aus der trivialen Beziehung  $F = V_0 / t_0$  folgt

$$t_0 = V_0 / F \quad \text{Gl. 18}$$

bzw. (Gl. 18 kombiniert mit Gl. 13):

$$u = L \cdot F / V_0 \quad \text{Gl. 19}$$

Zeitbedarf eines chromatographischen Laufs, Druckabfall, Permeabilität. - Die Zeitdauer eines chromatographischen Laufs wird durch die Retentionszeit des letzten interessierenden Peaks, mit dem Kapazitätsfaktor  $k'$ , bestimmt. Wie man aus Gl. 10 und 13 leicht herleitet, gilt:

$$t_R = \frac{L}{u} (1 + k') \quad \text{Gl. 20}$$

Die Säulenlänge  $L$  und der Kapazitätsfaktor  $k'$  sind durch die zur Trennung erforderlichen chromatographischen Bedingungen im allgemeinen vorgegeben. In weiten Grenzen variiert werden kann die Geschwindigkeit  $u$  des Eluens. Daher ist Schnelligkeit der Chromatographie weitgehend mit hoher Eluengeschwindigkeit synonym. Die Einstellung einer gewünschten Lincargeschwindigkeit  $u$  muß aber durch Überwinden eines Druckes  $\Delta p$  erzwungen werden. Es gilt die wichtige Beziehung<sup>1)</sup>:

$$\Delta p = \frac{1}{K} \cdot \eta Lu \quad \text{Gl. 21}$$

$\Delta p$ : Druckabfall der Trennsäule [ $\text{dyn}/\text{cm}^2$ ] ( $1 \text{ dyn}/\text{cm}^2 = 1.000 \cdot 10^{-6} \text{ bar} = 1.0197 \cdot 10^{-6} \text{ kp}/\text{cm}^2$ ).

$\eta$ : Viskosität des Eluens [Poise] ( $1 \text{ cP} = 10^{-2} \text{ Poise}$ )

$K$ : "Spezifische Permeabilität" [ $\text{cm}^2$ ] genannte Konstante, die den

---

1) Bei Berechnungen von  $K$  bereitet die Wahl der Dimensionen gelegentlich Schwierigkeiten. Die "zusammenpassenden" CGS-Einheiten sind deshalb explizit angegeben.

Druckabfall der Säulenpackung charakterisiert. Je größer  $K$ , desto weniger Druckabfall wird durch die Säulenpackung verursacht;

$L$  [cm],  $u$  [cm/s].

Neben der "spezifischen Permeabilität"  $K$ , die die relativ problematische Messung der Lineargeschwindigkeit  $u$  erfordert, wird häufig eine auf die Volumengeschwindigkeit  $F$  bezogene "Permeabilität"  $K_F$  angegeben:

$$K_F = \epsilon_T \cdot K \quad \text{Gl. 21a}$$

Der Zusammenhang zwischen  $K_F$  und  $F$  kann leicht durch Kombination von Gl. 21 mit Gl. 15 hergestellt werden:

$$\Delta p = \frac{1}{K} \frac{\eta \cdot L \cdot F}{\epsilon_T \pi R^2} = \frac{1}{K_F} \cdot \frac{\eta L}{\pi R^2} F \quad \text{Gl. 22}$$

(Dimensionen im CGS-System: Wie unter Gl. 21, zusätzlich  $F$  [cm<sup>3</sup>/s],  $R$  [cm],  $K_F$  [cm<sup>2</sup>]).

$K_F$  ist für zylindrische Säulen leichter zu messen als  $K$ ; deshalb wird überwiegend  $K_F$  angegeben.

$K_F$  ist eine wichtige Größe noch aus einem anderen Grund. Empirisch wurde ein Zusammenhang zwischen  $K_F$  und der Teilchengröße  $d_p$  gefunden [12]. Unter den Voraussetzungen

- (a) irreguläre (nicht-sphärische) poröse Teilchen<sup>1)</sup>,
- (b) Säulen vom Durchmesser 3-6 mm<sup>2)</sup>

gilt in guter Näherung

- 1) Adsorbentien mit kugelförmigen porösen Teilchen besitzen einen erheblich höheren  $K_F$ -Wert. Derartiges Material ist neuerdings auf den Markt gekommen.
- 2) Säulen größeren Durchmessers ( $R > 10$  mm) besitzen offenbar eine geringere Permeabilität als typische analytische Säulen, die in den oben angegebenen Bereich fallen.



$$K_F = 10^{-3} d_p^2 \quad (\text{naß gepackte Säule}) \quad \text{Gl. 23a}$$

$$K_F = 5 \cdot 10^{-4} d_p^2 \quad (\text{trocken gepackte Säule}) \quad \text{Gl. 23b}$$

Gl. 23a und b sind außerordentlich nützlich und werden viel verwendet. Sie ermöglichen eine experimentell sehr einfache Korngrößenbestimmung. Insbesondere helfen sie aus der Verlegenheit, auf welche Korngröße die van-Deemter-Kenngrößen zu beziehen sind, falls ein Adsorbens mit einem breiten Korngrößenspektrum vorliegt. Man bezeichnet die nach Gl. 23a,b bestimmte Korngröße aus naheliegenden Gründen als "dynamische Korngröße". In dieser Arbeit wird hierfür das Symbol  $d_{pd}$  benutzt.

Gl. 21 zeigt, warum man die moderne Flüssigkeitschromatographie als "Hochdruckflüssigkeitschromatographie" bezeichnet: Kurze Chromatographiedauer (Gl. 20) bedingt hohe Eluengeschwindigkeit und diese hohen Druckabfall.

Der Druckabfall einer Chromatographiesäule wird oft durch eine Gleichung beschrieben, die man durch Kombination von Gl. 22 und 23a erhält:

$$\Delta p = \frac{10^3 \eta L}{\pi} \frac{1}{d_p^2 \cdot R^2} \cdot F \quad \text{Gl. 24}$$

Gleichung 24 suggeriert, daß ein durch Teilchenverkleinerung bedingter Anstieg des Druckabfalls durch Vergrößerung des Säulenradius unter Erhaltung der chromatographischen Eigenschaften einer Säule kompensiert werden könne. Diese Ansicht ist falsch. Durch die Vergrößerung des Säulenradius kann nur der Durchfluß  $F$  bei gleichem Druck erhalten bleiben. Die Lineargeschwindigkeit dagegen sinkt! Die Lineargeschwindigkeit aber bestimmt die Zeitdauer des chromatographischen Laufs!

Es folgt hieraus: schnelle Hochleistungschromatographie kann nur durch hohen Druck erreicht werden. Eine Mittel- oder Niederdruckchromatographie steht der Hochdruckchromatographie entweder in der Zeitdauer oder in der Trenngüte nach.

## 1.2 Beschreibung der Trennung eines Substanzgemisches

Mit Hilfe der oben definierten Größen kann das chromatographische Verhalten, insbesondere die Leistungsfähigkeit einer Trennsäule gekennzeichnet werden. Zur Beschreibung der Trennung eines Substanzgemisches benötigt man weitere Ausdrücke. Die Theorie beschränkt sich im allgemeinen auf die Behandlung von Substanz- bzw. Peakpaaren. In Abb. 4 ist der Standardfall dargestellt.

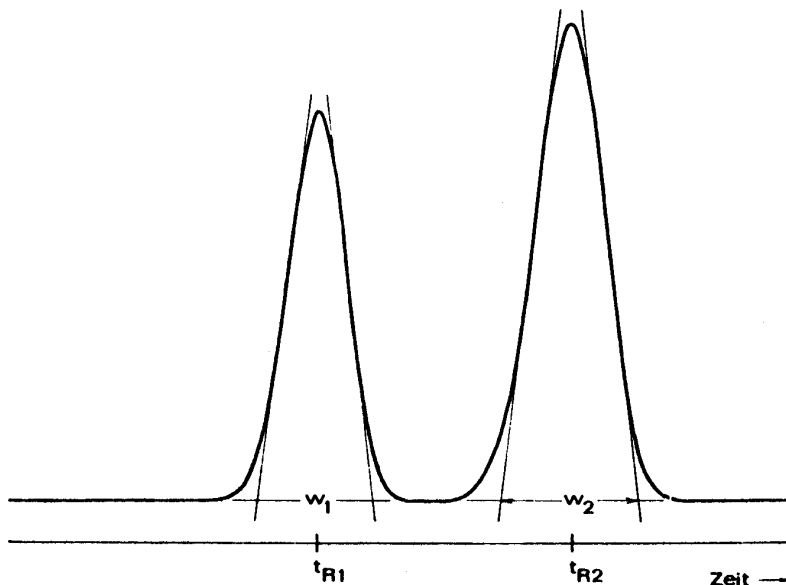


Abb. 4 Zur Charakterisierung eines Peakpaares benötigte Größen

Trennfaktor. - Physikalische Grundgröße zur Charakterisierung des relativen Adsorptionsverhaltens ist der Trennfaktor  $\alpha$  ( $t_{R2} > t_{R1}$ ):

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad \text{Gl. 25}$$

Da, vgl. S. 9,  $k'$  der Gleichgewichtskonstanten für die Verteilung eines Stoffes zwischen Eluens und Adsorbens proportional ist, folgt aus Gl. 25 nach dem üblichen thermodynamischen Formalismus

$$\Delta(\Delta G) = -RT \ln \alpha \quad \text{Gl. 26}$$

$\alpha$  bzw.  $\Delta(\Delta G)$  sind von apparativen Gegebenheiten unabhängige Stoffkonstanten für Substanzpaare.

$\alpha$  kann näherungsweise aufgrund Gl. 11 aus dem Dünnschichtchromatogramm bestimmt werden:

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = \frac{(1/R_{F2}) - 1}{(1/R_{F1}) - 1} \approx R_{F1} / R_{F2} \quad \text{Gl. 27}$$

Auflösung. - Zur Charakterisierung der Trennung zweier Substanzen in einem spezifischen Chromatogramm dient die Auflösung  $R_s$ :

$$R_s = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (t_{R2} > t_{R1}) \quad \text{Gl. 28}$$

Es ist anhand Abb. 4 leicht ersichtlich, daß für die vollständige Trennung  $R_s \geq 1$  erforderlich ist.

Die Auflösung ist eine Funktion des Trennfaktors  $\alpha$ , der relativen Peakverbreiterung während der Chromatographie (ausgedrückt durch die Bodenzahl  $N$  der Trennsäule) und der Verweilzeit des Stoffpaares auf dem Adsorbens (ausgedrückt durch den Kapazitätsfaktor des später eluierten Peaks):

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right) \quad \text{Gl. 29}$$

Diese Gleichung ist eines der Fundamente der Chromatographie. Sie ermöglicht es, drei für die Praxis wichtige Gesichtspunkte quantitativ zu erfassen:

1. Die Auflösung  $R_s$  ist der Wurzel aus der Bodenzahl proportional. Da  $N \sim L$ , bedeutet dies: zur Verdopplung der Auflösung eines Stoffpaares ist eine Vervierfachung der Säulenlänge nötig, bzw. die Verdopplung der Säulenlänge verbessert die Auflösung nur um das 1.4-fache.
2. Der Zusammenhang von Auflösung und Kapazitätsfaktor wird aus Abb. 5, in welcher der in Gl. 29 enthaltene Quotient  $k'_2 / (k'_2 + 1)$

als Funktion von  $k_2'$  graphisch dargestellt ist, eindrücklich sichtbar.

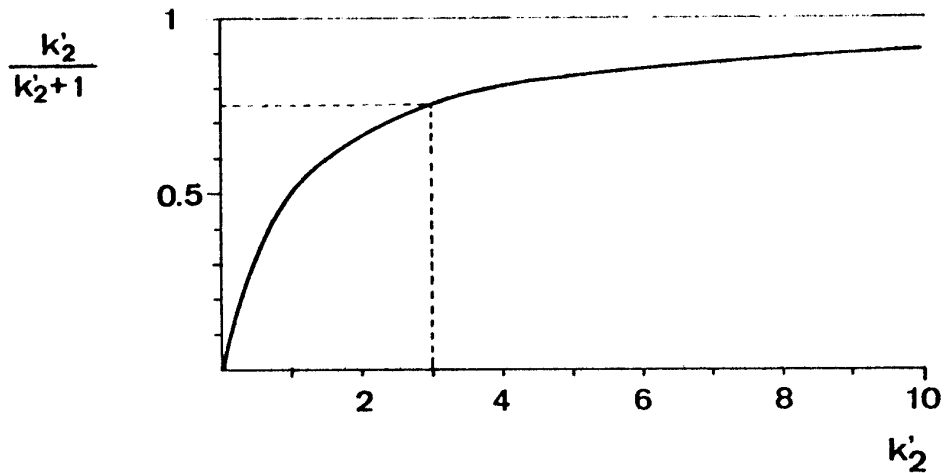


Abb. 5 Zur Abhängigkeit der Auflösung  $R_s$  vom Kapazitätsfaktor  $k_2'$  [ $R_s \sim k_2' / (k_2' + 1)$ ]

Der Quotient  $k_2' / (k_2' + 1)$  und damit die Auflösung vergrößert sich mit steigendem Kapazitätsfaktor bis zum Grenzwert 1 für  $k_2' \rightarrow \infty$ . Da der Kapazitätsfaktor die Zeitdauer der Chromatographie bestimmt (vgl. S. 11), muß ein Kompromiß geschlossen werden. Als optimaler Wert erscheint  $k_2' = 3$ , da im Bereich darunter eine sehr starke, darüber nur noch eine schwache Abhängigkeit der Auflösung von  $k_2'$  vorliegt.

Dem Wert  $k' = 3$  entspricht im DC nach Gl. 27 ein  $R_F$ -Wert von nur 0.25! Zu frühe Elution der zu trennenden Substanzen ist wohl die häufigste Sünde, die beim Chromatographieren begangen wird.

3. Gleichung 29 ermöglicht eine Vorausberechnung der Trennstufenzahl, die für eine präparativ vollständige Trennung ( $R_s > 1$ ) gegebener Schwierigkeit - ausgedrückt durch den Trennfaktor  $\alpha$  erforderlich ist.  $\alpha$  kann unter analytischen Bedingungen (HPLC oder DC, vgl. Gl. 27) leicht bestimmt werden. Der Zusammenhang ist in Abb. 6 graphisch dargestellt ( $k_2' = 5$ ).

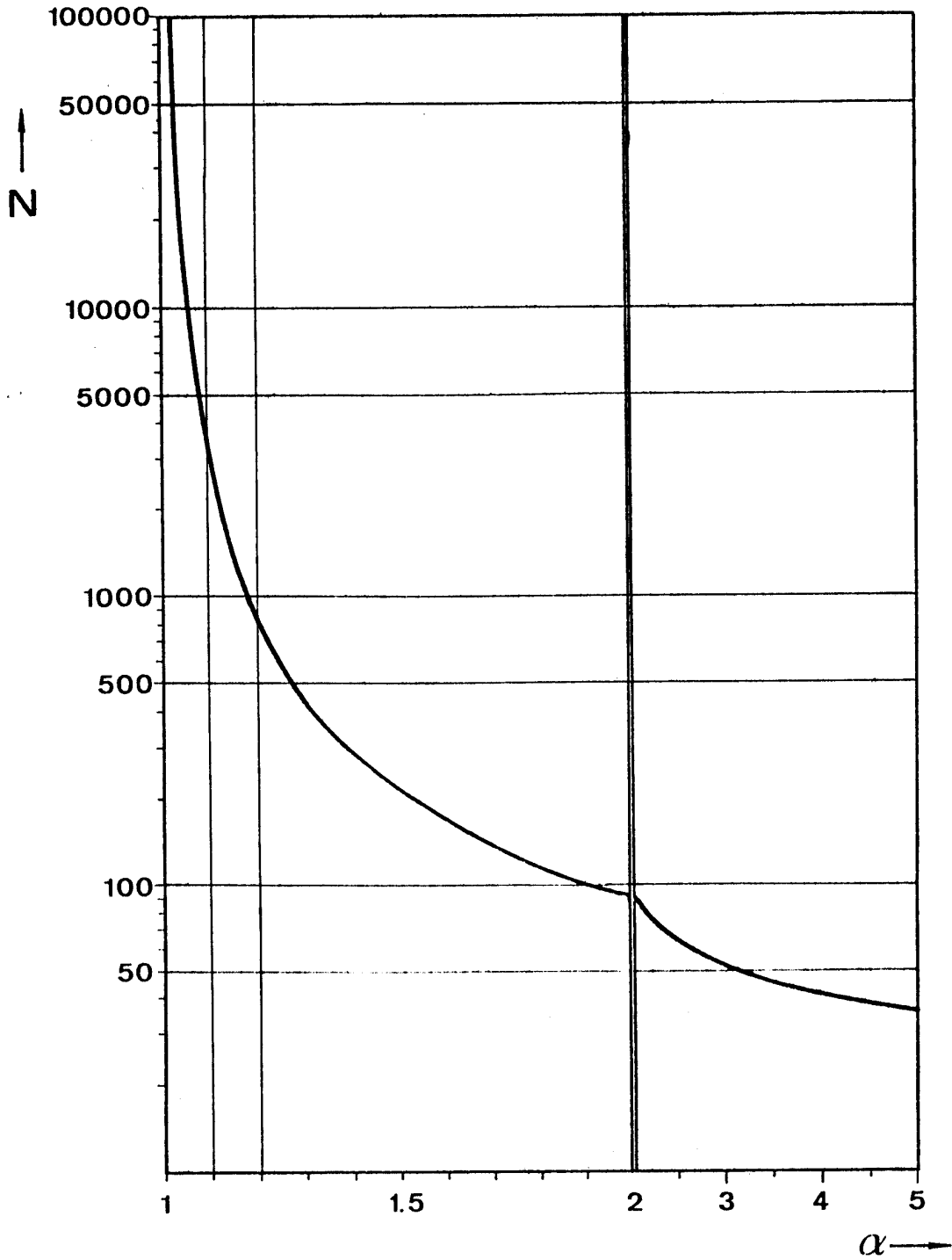


Abb. 6 Zur vollständigen Trennung ( $R_S=1$ ) nötige Bodenzahl  $N$  in Abhängigkeit vom Trennfaktor  $\alpha$  ( $k'=5$ ) (halblogarithmische Auftragung).

Man erkennt, daß die für eine vollständige Trennung nötige Bodenzahl im Bereich bis  $\alpha \sim 1.2$  nur wenig variiert, für  $\alpha < 1.1$  aber extrem ansteigt. Für die Praxis ist hieraus eine wichtige Schlußfolgerung zu ziehen: Eine Trennung mit  $\alpha < 1.03$  ist mit den heute verfügbaren Säulen (maximale Bodenzahl ca. 30'000) kaum durchführbar. Wie man Abb. 6 entnimmt, ist es praktisch wenig sinnvoll, durch Kopplung von Säulen größere Bodenzahl  $N$  bereitzustellen. Man suche vielmehr geduldig nach einem Eluens, für das größere  $\alpha$ -Werte gelten. Falls dies nicht gefunden wird, sollte ein anderes Adsorbens gewählt werden.

### 1.3 Substanzbeladung

Alle bisher angeführten Kennzahlen und Gleichungen setzen ideale Verhältnisse, d. h. eine unendlich geringe Menge an zu trennender Substanz voraus. Abweichungen vom idealen Verhalten treten bei handelsüblichem Kieselgel (spez. Oberfläche  $\sim 400 \text{ m}^2/\text{g}$ , Porenweite  $60 \text{ \AA}$ ) bereits ab ca.  $2 \cdot 10^{-4} \text{ g}$  Substanz pro g Adsorbens auf.

Es sind verschiedene Methoden benutzt worden, um die Belastbarkeit zu charakterisieren. Als Beladung  $B$  sei definiert: g Substanz pro g Adsorbens. Man mißt entweder die Bodenhöhe  $H$  oder die Retentionszeit  $t_R$ , bzw. den Kapazitätsfaktor  $k'$ , in Abhängigkeit von  $B$ . Die Funktionen  $H(\log B)$  und  $t_R(\log B)$  zeigen einen Verlauf wie er in Abb. 7 dargestellt ist. Als "lineare Kapazität"  $B_0$  wird definiert: (a) Der  $B$ -Wert bei dem eine 10-prozentige Verringerung von  $t_R$  bzw.  $k'$  eintritt [13]; (b) Der  $B$ -Wert des Knickpunktes der Funktion  $H(\log B)$ . Die beiden Definitionen führen in etwa zum gleichen  $B_0$ -Wert<sup>1)</sup>.

Für analytische Messungen und Testuntersuchungen arbeitet man im Bereich  $B < B_0$ . Das präparative Arbeiten findet fast ausschließlich im Überladungsbereich  $B > B_0$  statt.

---

1) Als weitere Definition ist in der Literatur [14] zu finden:  
(c) Der  $B$ -Wert, bei dem eine Erhöhung von  $H$  um 100 % eintritt. Diese Definition ist unbrauchbar, da der  $B_0$ -Wert in starkem Maße vom Minimalwert für  $H$  abhängt. Man wird auf diesen Punkt im Zusammenhang mit eigenen Ergebnissen zurückkommen.

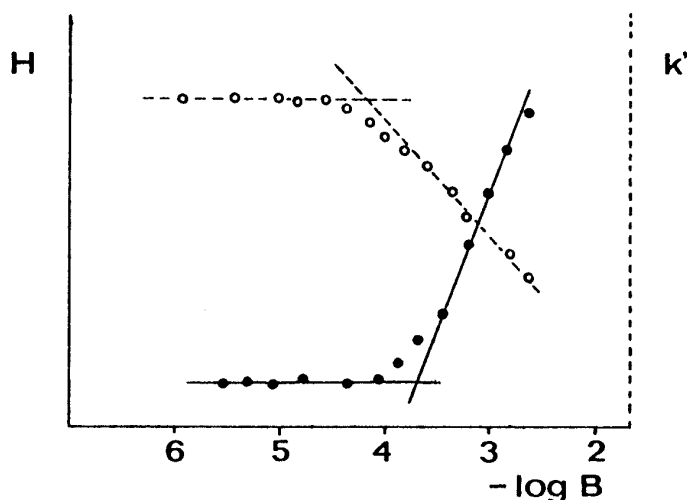


Abb. 7 Abhängigkeit der Bodenhöhe  $H$  (—) bzw. des Kapazitätsfaktors  $k'$  (-----) von der Beladung  $B$  (g Substanz pro g Adsorbens)

Leider liegen über das Verhalten von Trennsäulen im Bereich  $B > B_0$  keine systematischen Untersuchungen vor. Von erheblicher Bedeutung könnte die Beobachtung sein [14], daß offenbar der  $B_0$ -Wert für Substanzen mit sehr kleinem  $k'$ -Wert ( $k' < 0.3$ ) ca. 10-fach höher ist, als für solche mit üblichen  $k'$ -Werten ( $k' > 1$ ). Eine sorgfältige Untersuchung dieses Phänomens könnte interessante Aufschlüsse ergeben. Vorausgehen müßte allerdings Grundlagenarbeit über die Charakterisierung von "überladenen Peaks". Diese besitzen keine Gauß-Form. Daher sind die oben angeführten Definitionen der chromatographischen Kennzahlen nur bedingt sinnvoll.

#### 1.4 Dosiervolumen

Außer einer infinitesimalen Substanzbeladung wird in der "Standard-Theorie" ein vernachlässigbar kleines Dosiervolumen ( $V_D$ ) angenommen. Diese Annahme ist natürlich in der Praxis nur bedingt gültig, denn im allgemeinen wird die Substanz in gelöster Form dosiert. Speziell das präparative Arbeiten erfordert oft hohe Probenverdünnung, z. B. wegen schlechter Löslichkeit. Es ist deshalb von einigem Nutzen, die Auswirkung des Dosiervolumens  $V_D$  auf die Trennleistung - ausgedrückt durch die

Varianz  $\sigma$  bzw. Bodenhöhe  $H$  - zu kennen. Der Effekt kann mittels der folgenden Gleichung (Ableitung s. u.) leicht berechnet werden.

$$\frac{H}{H_0} - 1 = \frac{1}{D^2} N_0 \frac{1}{(1 + k')^2} \frac{V_D^2}{V_0^2} \quad \text{Gl. 30}$$

- $H$ : Bodenhöhe der Testsubstanz bei Applikation im Dosier-  
volumen  $V_D$ ;
- $H_0$ : Bodenhöhe für den Idealfall  $V_D \rightarrow 0$ ;
- $\frac{H}{H_0} - 1$ : ist demnach die relative Zunahme der Bodenhöhe gegenüber dem Fall  $V_D \rightarrow 0$ ; z. B. bedeutet eine 100%ige Zunahme:  $H = 2 H_0$ , d. h.  $(H/H_0) - 1 = 1$ ;
- $D$ : ist eine Konstante, die bei Dosierung der Substanzlösung als "sauberer" Propfen 3.5 beträgt. In der Praxis ist  $D$  wegen Unvollkommenheit des Dosiersystems in der Regel kleiner,  $D \sim 2-3$  (vgl. [15]);
- $N_0$ : Bodenzahl für den Idealfall  $V_D \rightarrow 0$ ;
- $k'$ : Kapazitätsfaktor der Testsubstanz (vgl. S. 9)
- $V_D$ : Dosiervolumen, d. h. Volumen, in dem die Testsubstanz in die Trennsäule eingeführt wird;
- $V_0$ : Totvolumen der Trennsäule (vgl. S. 11)

Als vielleicht wichtigste Lehre für die Praxis kann aus Gl. 30 gefolgert werden: ist es infolge schlechter Löslichkeit notwendig, die zu trennende Substanz stark zu verdünnen, d. h.  $V_D$  groß zu machen, so kann die dadurch drohende Verschlechterung der Trennleistung durch Vergrößerung von  $k'$  aufgefangen werden. Allerdings muß ein Nachteil in Kauf genommen werden: hohes  $k'$  bedeutet späte Elution, dieses lange Zeitdauer des Chromatogramms.

Gl. 30 ermöglicht nach Umformung in einfacher Weise die Berechnung des maximalen Volumens, das bei noch tolerierbarem Verlust an Trenngüte ( $H$ ) aufgegeben werden kann (Auflösen nach  $V_D$  und Ziehen der Wurzel):

$$V_D = \sqrt{\frac{H}{H_0} - 1} \frac{D(1 + k')}{\sqrt{N_0}} V_0 \quad \text{Gl. 30a}$$

$V_0$  läßt sich aus dem Leervolumen  $V_{\text{leer}}$  der Säule nach  $V_0 = \epsilon_T V_{\text{leer}}$  berechnen<sup>1)</sup>.

1) Gl. 16 wird beidseitig mit  $F$  multipliziert und  $F \cdot t_0 = V_0$  (Gl. 18) eingesetzt. Für Kieselgel gilt:  $\epsilon_T = 0.75 \pm 0.1$ .



Ein praktisches Beispiel möge den Wert der obigen Gleichungen demonstrieren: Welches Volumen darf maximal in eine gute präparative Kieselgel-Säule ( $L = 40 \text{ cm}$ ,  $R = 2 \text{ cm}$ ,  $N_0 = 8000$ ) injiziert werden, wenn eine Verschlechterung von  $H_0$  (Fall  $V_D \rightarrow 0$ ) um nur 20 % toleriert werden soll ( $k'$  sei 3)?

$$V_0 = \epsilon_T L \pi R^2 = 0.75 \cdot 40 \cdot \pi \cdot 2^2 \text{ cm}^3 = 377 \text{ cm}^3$$

$$V_D = \sqrt{0.2} \cdot \frac{2.5(1+3)}{\sqrt{8000}} \cdot 377 \text{ cm}^3 = \underline{\underline{19 \text{ cm}^3}}$$

Die Ableitung von Gl. 30 wurde aufbauend auf Angaben von Karger und Mitarbeitern [15] durchgeführt. Im Gegensatz zur bisherigen Gepflogenheit, wird das Volumen, nicht die Zeit, als chromatographische Variable gewählt (vgl. Fußn. 1, S. 5). Die entsprechenden Gleichungen erhält man aus den angegebenen sehr einfach, indem man alle Zeiten mit  $F$  (Durchfluß) multipliziert. Die so erhaltenen Gleichungen werden im folgenden mit der früheren, aber mit einem Strich modifizierten Nummer bezeichnet.

Theoretische Größe zur Charakterisierung der Peakbreite ist die Varianz  $\sigma_v$  ( $\sigma_v = \sigma_t \cdot F$ ). Es kann gezeigt werden (Literaturangaben s. [15]), daß sich die Varianz  $\sigma_v$  eines Peaks aus der Summe der Quadrate der Varianzen aller zur Peakverbreiterung beitragenden Effekte ergibt, hier die Dosierung  $\sigma_{vD}$  und die durch die Säule verursachte "natürliche" Peakverbreiterung  $\sigma_{v0}$  im Falle  $V_D \rightarrow 0$ :

$$\sigma_v^2 = \sigma_{vD}^2 + \sigma_{v0}^2 \quad (\text{Gl. A})$$

In [15] wird nun angesetzt:

$$\sigma_D = \frac{1}{D} V_D \quad (\text{Gl. B})$$

Einsetzen ergibt:

$$\sigma_v^2 = \frac{V_D^2}{D^2} \sigma_{v0}^2 \quad (\text{Gl. C})$$

Gl. C enthält die gesamte relevante Information. Die Konstante  $D$  kann experimentell leicht bestimmt werden<sup>1)</sup>:  $\sigma_v^2$  wird über die Bodenzahl  $N$  (Gl. 2') bei Applikation von  $V_D$ ,  $\sigma_v$  aus der auf den Fall  $V_D \rightarrow 0$  extrapolierten Bodenzahl  $N_0$  berechnet<sup>2)</sup>.

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma_t^2} = \frac{V_R^2}{\sigma_v^2} \quad (\text{Gl. 2'})$$

$$N_0 = \frac{t_R^2}{\sigma_{v0}^2} \quad (\text{Gl. 2''})$$

1)  $D$  ist von Interesse zur Charakterisierung des Aufgabesystems; dieses ist um so besser, je größer  $D$ .

2) Die Messung erfolgt auf die übliche Weise nach Gl. 3 oder 4.

Es schien uns sinnvoll, die Bedeutung der Gl. C dadurch zu erhellen, daß die üblichen charakteristischen Daten, Bodenhöhe H und Bodenzahl N, explizit vorkommen. Man geht folgendermaßen vor:

Einsetzen von Gl. 2' bzw. Gl. 2" in Gl. 5 ergibt:

$$H = 1, \frac{\sigma_V^2}{V_R^2} \quad (\text{Gl. D}) \quad \text{und} \quad \sigma_{V_0}^2 = \frac{H_0}{L} V_R^2 \quad (\text{Gl. E})$$

Gl. A und E werden in Gl. D eingesetzt:

$$H = \frac{(\sigma_{VD}^2 + \sigma_{V_0}^2) H_0}{\sigma_{V_0}^2} = \frac{H_0 \sigma_{VD}^2}{\sigma_{V_0}^2} + H_0 \quad (\text{Gl. F})$$

Gl. F wird umgeordnet zu

$$\frac{H}{H_0} - 1 = \frac{\sigma_{VD}^2}{\sigma_{V_0}^2} \quad (\text{Gl. G})$$

Mit Gl. G ist ein günstiges praktisches Maß für die Verschlechterung der Trennqualität infolge von  $V_D$  gewonnen.  $V_D$  erscheint explizit bei Einsetzen von Gl. B in Gl. G:

$$\frac{H}{H_0} - 1 = \frac{V_D^2}{D^2 \sigma_{V_0}^2} \quad (\text{Gl. H})$$

$\sigma_{V_0}$  kann via Gl. 2" ersetzt werden durch

$$\sigma_{V_0}^2 = V_R^2 / N_0 \quad (\text{Gl. I})$$

$V_R$  ist keine fundamentale Größe; es wird nach Gl. 19 und 20 (mit  $t_{RF} = V_R$ ) eliminiert:

$$V_R = (1 + k') V_0 \quad (\text{Gl. J})$$

Einsetzen von Gl. J in I führt zu

$$\sigma_{V_0}^2 = (1 + k')^2 V_0^2 \cdot \frac{1}{N_0} \quad (\text{Gl. K})$$

Einsetzen von Gl. K in H ergibt schließlich Gl. 30.

## 2. KONZEPTION EINER CHROMATOGRAPHIESÄULE

Bei der Entwicklung eines neuen Typs chromatographischer Trennsäulen müssen primär folgende Faktoren beachtet werden:

- Säulenform, Substanzaufgabe
- Säulendurchmesser
- Säulenlänge
- Werkstoff
- Art des Adsorbens
- Teilchendurchmesser und Kornverteilung
- Packungsmethode.

### 2.1 Säulenform und -dimension

Säulenform, Substanzaufgabe. - Als Standardform der Flüssigkeitschromatographiesäule hat sich der Zylinder bewährt. Bei Säulen größeren Durchmessers bereitet es allerdings erhebliche Schwierigkeiten, das Eluens am Säulenanfang so einzuleiten, daß - entgegen der durch Abb. 8a veranschaulichten "natürlichen" Strömung - eine über den gesamten Querschnitt gleichmäßige Eluengeschwindigkeit, entsprechend Abb. 8b resultiert. Falls dieses nicht gelingt, treten erhebliche Verluste an Trennleistung und

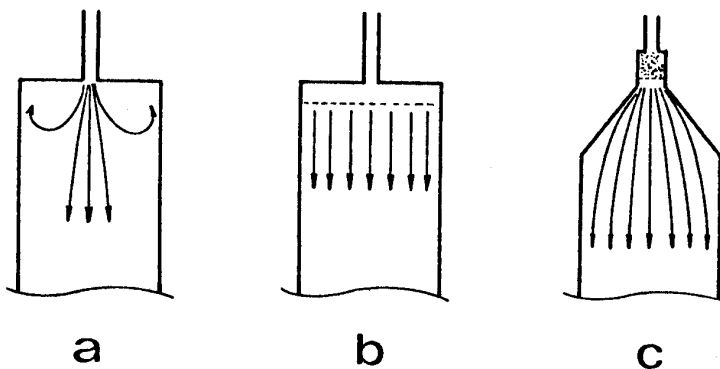


Abb. 8 Strömungsprofile am Säuleneingang

"seltsame" Peakformen auf, z. B. Doppelpeaks oder Schwanzbildung. Im allgemeinen werden komplizierte Zusammenstellungen von Siebplatten, Fritten, Glaskugeln und dergleichen auf die Adsorbenspackung gelegt; dennoch gelingt die Lösung des Problems in der Regel nur unvollkommen.

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde eine optimale Lösung durch Eisenbeiß und Öhlerding aufgezeigt [5]: konische Form von Säulenanfang und -ende entsprechend Abb. 8c. Die Wirksamkeit dieses Prinzips scheint darauf zu beruhen, daß die "toten Ecken" des Zylinders (Abb. 8a) einfach abgeschnitten sind. Nach eigenen Untersuchungen ist die spezielle Geometrie, d. h. der Neigungswinkel u. dergl., des Konus unwichtig. Bei Versuchen mit Farbstoffen wurden stets vollkommen scharfe, gerade Zonen unabhängig von Eluengeschwindigkeit, Säulendurchmesser, Substanzbeladung und -konzentration gefunden.

Die konische Form besitzt einen Nachteil: die Säulenlänge ist praktisch festgelegt. In einem speziellen Fall wäre variable Säulenlänge erwünscht, für sog. Reversed-phase-Adsorbentien, d. h. Kieselgel, dessen freie OH-Gruppen durch langkettige Alkylgruppen modifiziert sind. Das gepackte Bett derartiger Adsorbentien ist elastisch und seine Länge variiert mit der Strömungsgeschwindigkeit. Es sollte daher bei hoher Strömungsgeschwindigkeit irreversibel durch Verschieben der Säulenverschlüsse zusammengepreßt werden.

Säulendurchmesser. - Neuere Untersuchungen [16] über die Abhängigkeit der Trennleistung vom Durchmesser ergaben, daß - entgegen früherer Vorstellungen - die Bodenhöhe mit steigendem Durchmesser abnimmt. Als Grund dafür werden im allgemeinen die Einflüsse der Säulenwandung angesehen. So konnten Knox und Mitarbeiter [17] zeigen, daß die Packungsstruktur noch in einer Entfernung von ca. 30 Teilchendurchmessern von der Wand deutlich von derjenigen weiter im Innern der Säule verschieden ist. In dieser Randzone liegt eine inhomogene Packung mit schlechten chromatographischen Eigenschaften vor. Man sollte daher den

Durchmesser der Säule so groß wählen, daß die Menge des Adsorbens in der Wandregion weniger als 5 % der Gesamtmenge beträgt.

Ein origineller Vorschlag zur Vermeidung von Wandeffekten stammt von Knox und Parcher [16]: Man könnte Substanzen in der Mitte der Säule derart auftragen, daß sie auf ihrem Weg durch die Säule lediglich in der Mittelregion verbleiben, die Wandregion aber nicht erreichen. Man errechnete, daß dies bei punktförmiger Substanzaufgabe möglich ist, wenn die Säulendimensionen folgende Bedingung erfüllen:

$$A \geq \frac{4R^2}{d_p L} \quad \text{Gl. 31}$$

Die experimentelle Überprüfung dieses sogenannten "Infinite-diameter-Effekts" ergab [18], daß mit A-Werten bis zu 45 eine Verringerung der Bodenhöhe H zu erreichen ist. Obwohl der Beitrag des Infinite-diameter-Effekts bei, wie in der Praxis üblich, nicht punktförmiger Substanzauftragung undefiniert ist<sup>1)</sup>, erweist sich der A-Wert als brauchbare empirische Kennzahl einer Trennsäule.

Es sei nochmals (vgl. S. 13) darauf hingewiesen, daß der Durchmesser der Trennsäule theoretisch keinen chromatographisch signifikanten Einfluß auf den Durchfall besitzt (s. Gl. 21). In der Praxis findet man allerdings eine Verminderung der Permeabilität mit zunehmendem Durchmesser<sup>2)</sup>.

Länge. - Im Gegensatz zu konventionellen Chromatographiesäulen, die nur auf einer Seite fest verschlossen sind und somit nicht hintereinandergeschaltet werden können, muß man bei modernen beidseitig verschlossenen Säulen wenig Überlegungen bezüglich der Säulenlänge anstellen, da sie je nach Schwierigkeit des Trenn-

---

1) Erstaunlicherweise bestimmen viele der wenigen mit präparativen Säulen befaßten Autoren die Bodenzahlen, bzw. -höhen mit "Infinite-diameter"-Aufgabe. So gewonnene Kennzahlen müssen als unzulässig bezeichnet werden, denn beim präparativen Arbeiten ist die nur mit "analytischen Mengen" mögliche "Infinite-diameter"-Substanzaufgabe völlig sinnlos.

2) Das Problem wird bei der Präsentation der Resultate diskutiert.

problems durch Hintereinanderschaltung mehrerer Säulen variiert werden kann. Die Gesamtsäulenlänge wird lediglich durch den Druckabfall (s. Gl. 21) begrenzt.

Gesamtgröße. - Die Gesamtgröße der Säulen, ausgedrückt durch die Adsorbensmenge pro Säule, muß sich den Erfordernissen der Praxis anpassen. Wir haben mit Säulen des Inhalts 60 g, 300 g und 1000 g Kieselgel Erfahrungen gesammelt. Die bei einmaliger Dosierung auftrennbare Substanzmenge hängt natürlich von der Schwierigkeit des Trennproblems, d. h. dem Trennfaktor  $\alpha$  ab. Als über viele typisch organisch-chemische Gemische gemittelte Erfahrungswerte können etwa gelten (Korngröße 20  $\mu$ ,  $N \sim 10000$ )

60 g Kieselgel:	bis 1 g Substanz
300 g Kieselgel:	bis 5 g Substanz
1 kg Kieselgel:	bis 20 g Substanz

Die 1 kg-Säule hat sich aus mehreren Gründen als nicht günstig erwiesen. 1. Beim Lösungsmittelwechsel - moderne Chromatographie-säulen werden wiederverwendet - sind zur Umkonditionierung große Mengen an Lösungsmitteln erforderlich. Je nach dem Unterschied in der Polarität von neuem und altem Eluens ca. 3-10 l pro 1 kg Kieselgel. 2. Für unerfahrene Benutzer, im Hochschullaboratorium fast die Regel, ist die Vorausabschätzung der richtigen Detektoreinstellung und die Beurteilung des Chromatogramms im Entstehen, d. h. der Fraktionenwechsel, sehr problematisch. 3. Es fallen relativ große Volumina pro Fraktion an, u. U. mehrere Liter, deren Eindampfung mit den üblichen Rotationsverdampfern unpraktisch ist.

Als bester Kompromiß zwischen Ökonomie und Mengendurchsatz erscheint die 300 g-Säule und mehrfache Dosierung. Bei einem leichten Trennproblem,  $\alpha > 2$ , können pro Tag ca. 30 - 50 g, bei einem mittleren,  $\alpha = 1.5-2$ , ca. 10 g, bei einem schwierigen Trennproblem,  $\alpha < 1.3$ , ca. 2 g Substanz durchgesetzt werden.

Werkstoff. - Üblicherweise verwendet man Trennsäulen aus Edelstahl in der Flüssigkeitschromatographie. Da die Herstellung von

Säulen aus diesem Material, insbesondere von solchen mit konischen Enden, sehr aufwendig ist, entschieden wir uns für Glas als Werkstoff. Die Herstellung beliebig geformter Glasröhrchen ist trivial. Allerdings ist der Druckbereich der Säulen beschränkt.

## 2.2 Adsorbentien, Korndurchmesser, Druckbereich

Kieselgel, Druckabfall, Zeitbedarf. - Unter den vielen heute im Handel angebotenen Adsorbentien nimmt Kieselgel aus folgenden Gründen eine überragende Stellung ein:

- relativ günstiger Preis
- für viele Substanzklassen verwendbar
- in den meisten Lösungsmitteln unlöslich
- ausgezeichnete chromatographische Eigenschaften (hohe Porosität, große spezifische Oberfläche, gute mechanische Stabilität)
- in vielen engklassierten Korngrößen erhältlich
- günstige Packungseigenschaften
- hohe Lebensdauer, regenerierbar
- relativ leicht chemisch modifizierbar (z. B. Reversed-phase-Adsorbentien, s. u.)
- gute Qualität von Kieselgel-DC-Platten und daher einfache und schnelle Vorproben möglich (Ermittlung des Eluens).

Alle diese Punkte spielen für die präparative LC eine wichtige Rolle.

Entscheidender Parameter für die Konzeption der Chromatographiesäulen ist die Korngröße  $d_p$ . Hierdurch wird einerseits die Bodenhöhe  $H$  (s. Gl. 8-8d) und damit die Qualität, andererseits der Druckabfall (s. Gl. 21-23) festgelegt. Der Druckabfall, genauer gesagt die Permeabilität, determiniert wesentlich den apparativen Aufwand, die maximale Säulenlänge (d. h. auch maximale Bodenzahl)

und den Zeitbedarf des chromatographischen Laufs<sup>1)</sup>.

Wir setzen voraus<sup>1)</sup>, daß die Korngröße so klein wie möglich sein sollte. Die Wahl wurde durch zwei Punkte diktiert, 1. den Preis und 2. den Entschluß, Glas als Werkstoff zu verwenden, was den Druckbereich auf ca. maximal 20 bar begrenzt.

Um die Preissituation zu beleuchten, sind in Abb. 9 die Preise eines bekannten Herstellers in Relation zur Korngröße und zur Kornverteilung gesetzt. Als guter Kompromiß erscheint das Material mit der nominellen Korngröße 15-25  $\mu$ . Bei guter Packung,  $H \sim 3 d_p$  im Minimum der van Deemter-Kurve, sollten bei einer Säulenhöhe von 30-50 cm ca. 5000-10000 theoretische Böden pro Säule erreicht werden können. Das entspricht in etwa der Trennleistung von Standard-HPLC-Säulen (analytisch).

Die Situation des Druckabfalls bzw. Werkstoffs Glas, sei indirekt diskutiert. Wichtigste Konsequenz aus dem Druckabfall ist der Zeitbedarf eines chromatographischen Laufs. Die zur Berechnung nötige Formel ist Gl. 20; durch Kombination mit Gl. 21, 21a, 22 und 23a bzw. b erhält man:

$$t_R = \eta(1 + k') \varepsilon_T \frac{1}{\Delta p} \frac{L^2}{n d_p^2} \quad \text{Gl. 32}$$

( $n = 1$  naß oder  $n = 0.5$  trocken gepackte Säule)

Wie früher ausgeführt (vgl. S. 11), entspricht der Zeitbedarf des chromatographischen Laufs der Retentionszeit des letzten Peaks. Wenn man dessen  $k'$ -Wert großzügig mit 10 ansetzt, erhält man die in Abbildung 10 dargestellten  $t_R(\Delta p)$ -Kurven für eine typische präparative Säule<sup>2)</sup>. Da 20 bar für Glassäulen den maxi-

---

1) Weitere Punkte sind: "Substanzdurchsatz" (Menge an getrennter Substanz/Zeit) und Lösungsmittelbedarf. Die Frage nach der optimalen Korngröße bezüglich des Substanzdurchsatzes wird in der chromatographischen Literatur viel diskutiert, sie ist aber noch nicht in durchsichtiger Weise geklärt. Der Lösungsmittelbedarf ist natürlich um so geringer, je kleiner die Bodenhöhe ist, da die Konzentration der Substanz der Bandenbreite umgekehrt proportional ist.

2) Es wurde  $n = 1$  gesetzt, es muß allerdings hinzugefügt werden, daß Gl. 23a nur für analytische Säulen gilt.



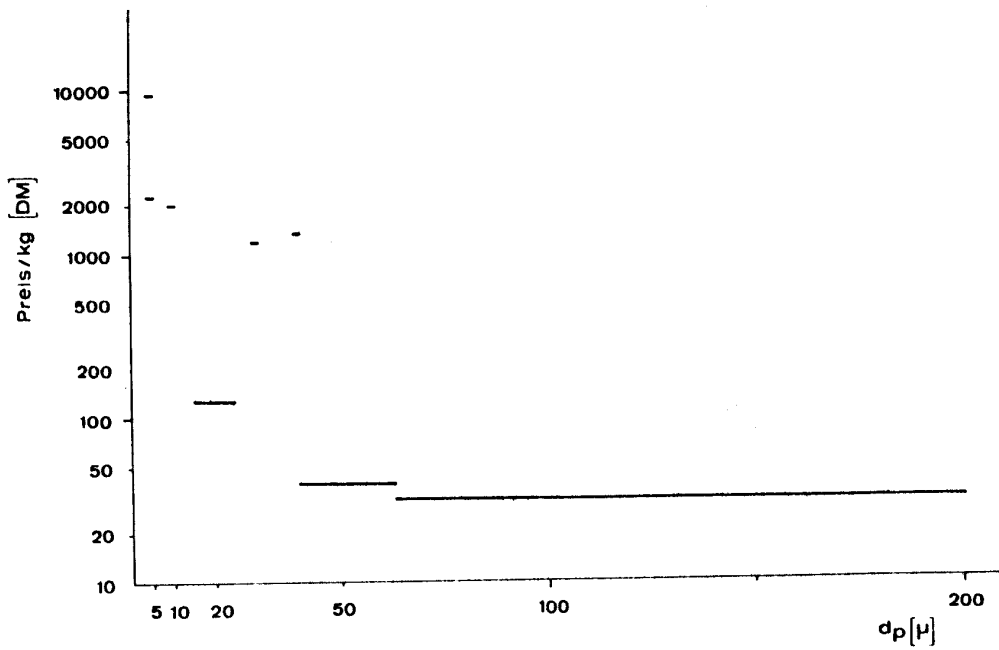


Abb. 9 Preise für Kieselgel zur Chromatographie (nach Katalog 1976 der Fa. Merck, Darmstadt); halblogarithmische Darstellung

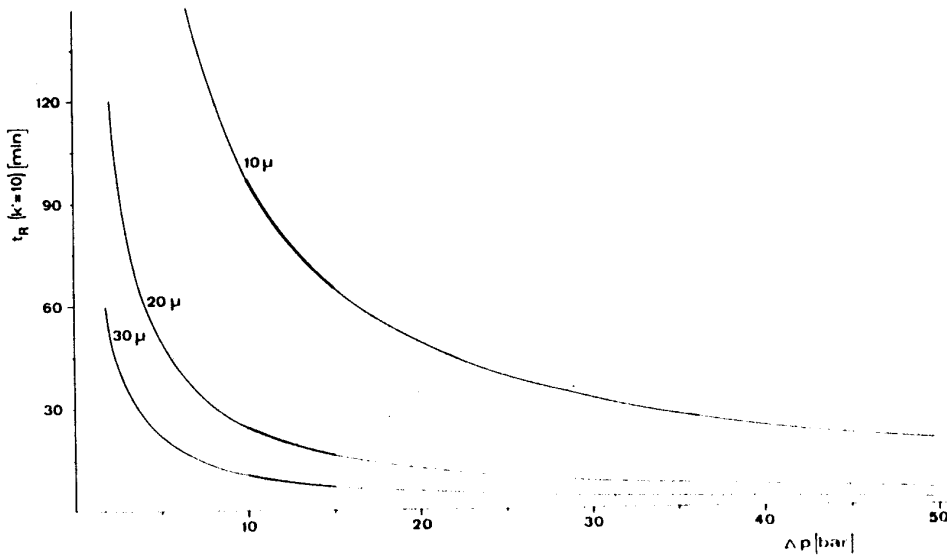


Abb. 10 Zeitbedarf eines chromatographischen Laufs als Funktion der Korngröße des Adsorbens und des Druckabfalls (nach Gl. 32;  $L=40$  cm; Eluens: Ethylacetat,  $\eta=0.441$  cP;  $n=1$ )

malen Druck darstellt, muß mit einem Arbeitsbereich von 10-15 bar gerechnet werden. Mit einer typischen Chromatographiedauer von ca. 15 - 30 min bietet die Korngröße  $\sim 20 \mu$  auch hier einen guten Kompromiß.

Es sei auf die interessante Struktur der Gl. 32 bzw. der in Abb. 10 dargestellten Kurven hingewiesen. Offensichtlich gibt es einen steilen, ungünstigen und einen sehr flachen Ast; Korngröße bzw. Druckbereich sollten so gewählt werden, daß der typische Arbeitsbereich gerade hinter dem Knickpunkt, also am Anfang des flachen Astes liegt. Man kann die Kurven aber bei jeder Korngröße durch Veränderung von L nach Wunsch adjustieren, denn  $t_R \sim (L/d)^2$ . Es erhebt sich die Frage: Welche d-L-Kombination<sup>R</sup> ist die<sup>P</sup> günstigste? Die Antwort können wir z. P. Zt. noch nicht geben<sup>1)</sup>.

Reversed-phase-Adsorbens. - Die Trennwirkung des Kieselgels beruht im wesentlichen auf der unterschiedlichen Wechselwirkung der an der Oberfläche angeordneten Silanolgruppen mit den zu trennenden Substanzen. Je nach ihrer Entfernung voneinander (4-5 Hydroxylgruppen/100 Å<sup>2</sup>) liegen die Silanolgruppen frei vor oder bilden Wasserstoffbrücken untereinander (Abb. 11). Da sie verhältnismäßig sowohl reaktiv als auch sauer sind (pH [SiOH]  $\sim 3-5$ ), eignet sich Kieselgel schlecht zur Trennung sehr polarer oder säureempfindlicher Substanzen, da solche teilweise irreversibel adsorbiert oder zersetzt werden. Ebenfalls schlecht werden Substanzen ohne Wasserstoffbrückenakzeptoren oder -donatoren, z. B. Kohlenwasserstoffe, getrennt.

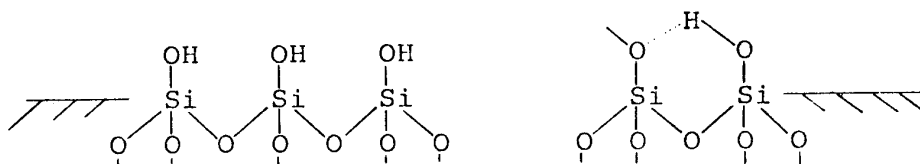


Abb. 11 Schematische Darstellung der Oberfläche des Kieselgels

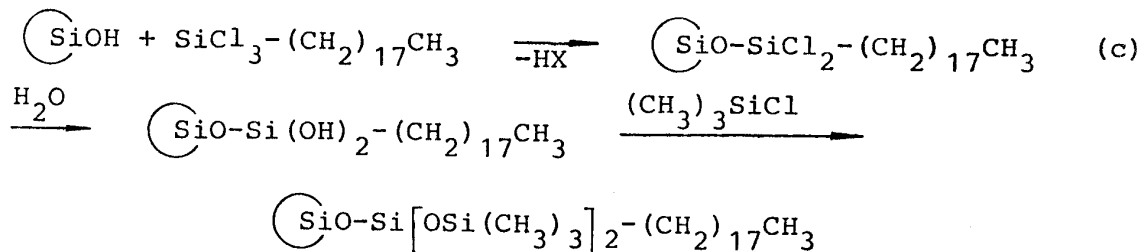
1) An dem Problem wird gearbeitet.

Infolge seiner hervorragenden chromatographischen Eigenschaften bemüht man sich seit ca. zehn Jahren, die Oberfläche des Kieselgels durch Belegung mit Substanzen anderer Funktionalität zu modifizieren, um seine hohe Adsorptionsenergie bzw. Reaktivität herabzusetzen und/oder andere Selektivität zu erzielen. Während dies in der Gaschromatographie durch physikalische Belegung des Trägers mit verschiedenen Flüssigkeiten seit Jahren praktiziert wird, treten in der Flüssigkeitschromatographie - insbesondere bei präparativer Arbeitsweise - infolge der Löslichkeit der Phasen im Eluens Probleme auf. Man versucht daher, die Phasen über die in der Abb. 11 dargestellten Silanolgruppen chemisch zu binden.



Es zeigte sich, daß nach (a) modifizierte Kieselgele infolge ihrer Hydrolyseempfindlichkeit nur unter Feuchtigkeitsausschluß gehandhabt werden können, nach (b) modifizierte jedoch über einen größeren pH-Bereich (~2-8) hydrolysebeständig sind (Übersicht: [19]).

Von den derzeit auf dem Markt angebotenen nach (b) modifizierten Kieselgelen hat sich das sogenannte C<sub>18</sub>-Reversed-phase-Adsorbens (ODS-Phase) in der Analytik als wertvolle Ergänzung zum Kieselgel besonders durchgesetzt. Es wird folgendermaßen hergestellt:



Infolge seines Kohlenwasserstoffcharakters zeigt es lipophile, nicht wie Kieselgel hydrophile Eigenschaften. So werden unpolare Substanzen, die mit Kieselgel nur wenig wechselwirken, stark adsorbiert, während polare Verbindungen, die auf Kieselgel nur

schlecht oder überhaupt nicht eluiert werden, wenig zurückgehalten werden. Analog dazu kehrt sich die eluotrope Reihe des Eluens um. So wirken beispielsweise Hexan oder Benzol stärker eluotrop als Methanol oder Wasser. Als Eluentien werden in der Regel Gemische von Wasser (oder Pufferlösungen) mit Methanol, Acetonitril oder Essigsäure verwendet.

Die Herstellung von Reversed-phase-Adsorbentien ist nicht ganz unproblematisch. Zum einen tritt neben den obigen Reaktionen leicht Polymerisation auf, wenn Wasser nicht rigoros ausgeschlossen ist. Zum anderen ist es schwierig, alle OH-Gruppen des Kieselgels zur Reaktion zu bringen. Bis heute gibt es offenbar kein voll befriedigendes, reproduzierbar belegtes Handelsprodukt.

Üblicherweise werden die Belegungsreaktionen im Batch-Verfahren durchgeführt und das modifizierte Adsorbens wird dann gepackt. Kriterien zur Beurteilung derartiger Säulen sind die chromatographischen Kennzahlen, der Kohlenstoffgehalt (ca. 18 % für die ODS-Phase) und Tests zur Erkennung freier OH-Gruppen (Methylrot-Test, chromatographischer Test [20]).

Eine interessante Alternative wurde neuerdings von Gilpin und Mitarbeitern erprobt: chemische Modifizierung auf fertig gepackten Kieselgelsäulen [21]. Die Resultate sind allerdings bis jetzt wohl nicht brauchbar. So wurden nur die ersten beiden Reaktionen der obigen Sequenz c durchgeführt, dabei lediglich eine Belegung von ~1 % Kohlenstoff [22] erreicht. Beim Studium der Gilpinschen Arbeiten erkennt man leicht, daß hier versucht wurde, eine gute Idee mit schlechter organischer Chemie zu realisieren. Wir haben uns des Problems angenommen und auf einfache Weise 18-20 % Kohlenstoff-Gehalt erzielt bei weitgehender Erhaltung der chromatographischen Eigenschaften der ursprünglichen Säulen [1].

### 2.3 Packungsmethoden, Lebensdauer

Im Lauf der Zeit sind zahllose Packungsmethoden erprobt worden. Nur wenige haben sich bewährt. Leider haben sich mehrere Dogmen gebildet, die falsch und der Entwicklung hinderlich waren. Um einige Beispiele zu nennen: Während langer Zeit glaubte man, daß Säulen mit Durchmesser  $>10$  oder  $<3$  mm schlechte Packungen ergeben. Ersteres ist sicher, letzteres nach neueren Untersuchungen wahrscheinlich falsch. Ein anderes allgemein akzeptiertes Dogma besagt, daß Sedimentation strikt vermieden werden muß. Wie unsere im folgenden dargelegten Resultate belegen, stimmt auch das nicht. Ferner wird immer wieder behauptet, Trockenpacken sei einfacher als Naßpacken. Dieses mag für die maschinelle Ausführung stimmen. Bei manueller Arbeitsweise besteht nach unserer Erfahrung kein signifikanter Unterschied. Einige Regeln scheinen indessen richtig zu sein, zumindest haben wir sie bestätigt gefunden:

- Entscheidend für eine gute Packung ist die Vermeidung von Teilchenagglomeration. Offenbar deswegen sollten Partikel mit  $d_p < 20-30 \mu$  naß gepackt werden!
- Die Permeabilität trocken gepackter Säulen ist geringer als die naß gepackter (s. Gl. 23a,b). Schon aus diesem Grund ist die Naßpackung vorzuziehen.
- Wichtig scheint bei Naßpackung der Einfluß der Flüssigkeit zu sein, in der suspendiert wird. Kieselgel wird offenbar in Wasser oder wasserhaltigen Flüssigkeiten quasi "solvatisiert", was der Agglomeration entgegenwirkt.
- Jedes käufliche Adsorbens, so gut es auch klassiert sein mag, enthält infolge von Abrieb sehr feine Teilchen. Diese müssen durch Sedimentieren oder Windsichten entfernt werden; andernfalls ist die Permeabilität der Säulen schlecht.

Unsere Erfahrung ist: Es gibt keine universell anwendbare Packungsmethode. Für jeden Säulentyp und jedes Adsorbens muß ein Optimum durch Experimentieren gefunden werden.

Neben den chromatographischen Kennzahlen ist die "Lebensdauer" der Säulen ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Packung.

So erhält man bei manchen Methoden Säulen, die während kurzer Zeit nach der Herstellung exzeptionell gute Eigenschaften aufweisen, dann aber schlagartig und irreversibel nachlassen. Der Grund dafür ist offenbar, daß zunächst ein lockeres Korngitter mit besonders guten chromatographischen Eigenschaften vorliegt, das unter Kanalbildung und dergleichen kollabiert. Packungsmethoden, bei denen solche Säulen häufig anfallen, sind unbrauchbar. Naturgemäß neigen ihre Erfinder dazu, nur die besonders guten Eigenschaften hervorzuheben. Aus diesem Grunde sind Chromatographiespezialisten meistens sehr skeptisch gegenüber ungewöhnlich guten Ergebnissen.

### 3. DAS VERFAHREN

#### 3.1 Beschreibung der Apparatur

Das Grundschemata der Apparatur ist in Abb. 1 (S. 3) dargestellt. Für alle in unserer Werkstatt hergestellten Teile liegen technische Zeichnungen vor, die auf Wunsch zur Verfügung gestellt werden (Kennzeichnung im Text durch  $\Delta$ ).

Eluensvorratsbehälter. - Die Ansaugleitung der Pumpe ist ein Teflonschlauch (Länge 1.20 m) vom Innendurchmesser 2 mm, dessen Ende mit einem darübergezogenen dicken Glasrohr (Länge 30 cm) beschwert ist. Jedes beliebige transportable Gefäß kann als Eluensvorratsbehälter dienen. Nach unseren Erfahrungen (Siemens Flüssigkeitschromatograph S 100) sind irgendwie fest eingebaute Vorratsbehälter von konstantem Volumen außerordentlich unpraktisch.

Pumpe. - Gut bewährt hat sich eine Dosierpumpe Typ FL 1 der Firma Lewa, Leonberg (Kolbendurchmesser 12 mm, Keramik-Kolben, PTFE-Dichtungen). Die Pumpe ist stufenlos regulierbar und fördert bei einem Maximaldruck von 45 bar maximal 150 ml/min<sup>1)</sup>.

Störungen: Gelegentlich werden die Ventile durch Fusseln oder Plastikstückchen verschmutzt; die Pumpe fördert dann trotz der Kolbenbewegung nicht. Zur Beseitigung schraubt man die Ventile auf (zuerst das (untere) Ansaugventil) und spült die Kugeln.

Es empfiehlt sich nicht, die Ansaugleitung der Pumpe mit einem Filter zu versehen; wenn doch, dann allenfalls mit einem Sieb oder einer dünnen groben Pritte. Druckabfall auf der Saugleitung ist zu vermeiden.

Leitungen. - Ausgenommen die Ansaugleitung der Pumpe, bestehen alle Leitungen aus Teflonschlauch 1x1.5 mm. Der Schlauch wird

---

1) Für aggressive Medien dürfte eine Membranpumpe mit PTFE-Auskleidung besser sein.

Frühe Versuche, das Eluens durch Inertgasdruck aus einem geschlossenen Behälter zu fördern, waren sehr unbefriedigend. So ist der Eluenswechsel sehr umständlich, das Eluensvolumen ist begrenzt und u. U. treten Gasblasen im Detektor auf. Vor allem stellt jedes komprimierte Gas eine enorme Gefahrenquelle dar, falls nicht wohldurchdachte und geprüfte Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.

entweder über Metallröhrchen geschoben oder nach der in Abb. 12 schematisch dargestellten Methode fixiert ( $\Delta$ ). Die Fixierung ist für alle Verbindungen vor dem Ausgang des Manometers notwendig. Die Handhabung des glatten Teflonschlauchs erfolgt mittels eines Dorns (zur Aufweitung) und eines Sandpapierstreifens (zum Festhalten).



Abb. 12 Fixierung von Schläuchen

- a Teflonschlauch
- Gewinde

Pulsationsdämpfer ( $\Delta$ ). - Wir verwenden einen Pulsationsdämpfer Typ MPD 3 der Firma Lewa, Leonberg. Er ist in Abb. 13 schematisch dargestellt. Das Totvolumen beträgt nur 2 ml. Der Dämpfer arbeitet einwandfrei im Bereich "Gasdruck:Eluendruck" 1:1 bis 1:3. Die Einstellung des Gasdrucks muß ohne Flüssigkeitsgegen-  
druck erfolgen (d. h. bei abgestellter Pumpe)<sup>1)</sup>.

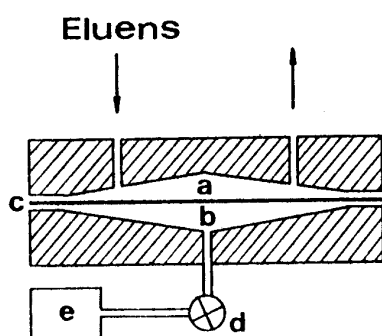


Abb. 13 Pulsationsdämpfer

- a vom Eluens durchströmter Raum
- b Stickstoff
- c Stahlmembran (Fa. Lewa)
- d Ventil (Fa. Lewa)
- e Stickstoffbombe mit Reduzierventil und Manometer

1) Die mechanische Dämpfung arbeitet nach demselben Prinzip wie die elektrische, d. h. es ist ein Kondensator (= Dämpfer) und ein Widerstand notwendig. Den Widerstand stellt die Trennsäule dar. Die Dämpfung ist allerdings deutlich besser, wenn zwischen Dämpfer und Manometer eine Stahlkapillare als Widerstand geschaltet wird.



Manometer. - Es wird verwendet: ein Rohrfeder-Druckmeßgerät mit Drosselorgan zwischen Druckfilter und Meßgerät, Gehäuse Glycerin-gefüllt, der Fa. Haenni, Stuttgart, Typ DRO 63/411.111, 0-25 bar, FÜD 06/1/33. Der Einbau in die Apparatur wird von unserer Werkstatt vorgenommen ( $\Delta$ ). Das Gerät arbeitet aus dem unten angegebenen zweiten Grund nicht einwandfrei. Die Ausrüstung mit einer Überdrucksicherung ist geplant (von derselben Firma erhältlich; ebenso auch Manometer mit eingebautem Schutz).

Auf zwei generell wichtige Punkte, betreffend Manometer in der LC, sei hingewiesen: 1. Das Manometer muß gegenüber dem Eluens vollständig abgeschlossen sein. Übliche Rohrfeder-Manometer sind offen, was zu manchmal sehr ärgerlicher "Verschleppung" des Eluens führt. 2. Der Maximaldruck muß mindestens 30 % über dem höchsten Arbeitsdruck liegen, andernfalls tritt bei Unachtsamkeit sehr leicht "Überdrehung" und irreversible Verbiegung der Rohrfeder auf; dieses ist daran zu erkennen, daß der Zeiger nicht in die Nullage zurückgeht. Ein solches Manometer zeigt im allgemeinen zu niedrige Werte an und ist deshalb eine Gefahrenquelle!

Filter. - Es ist unbedingt notwendig, daß zwischen Injektions-system und Trennsäule sowie vor Ventilen Filter eingeschaltet sind. Dünne G3-Glasfritten, mit Teflon gegen Stahl abgedichtet, haben sich ausgezeichnet bewährt. Das essentielle Filter ist im Aufgabesystem eingebaut.

Aufgabesystem. - Ein gut funktionierendes Aufgabesystem ist außerordentlich wichtig. Jede Unvollkommenheit an diesem Teil der Apparatur ist eine Quelle ständigen Ärgers. Die praktischen Erfahrungen über mehrere Jahre zeigten, daß drei sich wenig überschneidende Aufgabestellungen vorkommen: 1. Für die im folgenden beschriebenen Säulen beträgt das übliche Aufgabevolumen ca. 1-10 ml; die Pumpe wird während der Dosierung abgestellt (stopped-flow-Technik). 2. Bei sehr schlecht löslichen Substanzen ist gelegentlich ein Aufgabevolumen von 20-80 ml erforderlich. 3. Für Testmessungen, z. B. die Bestimmung der Bodenzahl, müssen kleine Volumina ( $\mu$ l-Bereich) in das strömende Eluens dosiert werden. Wir be-

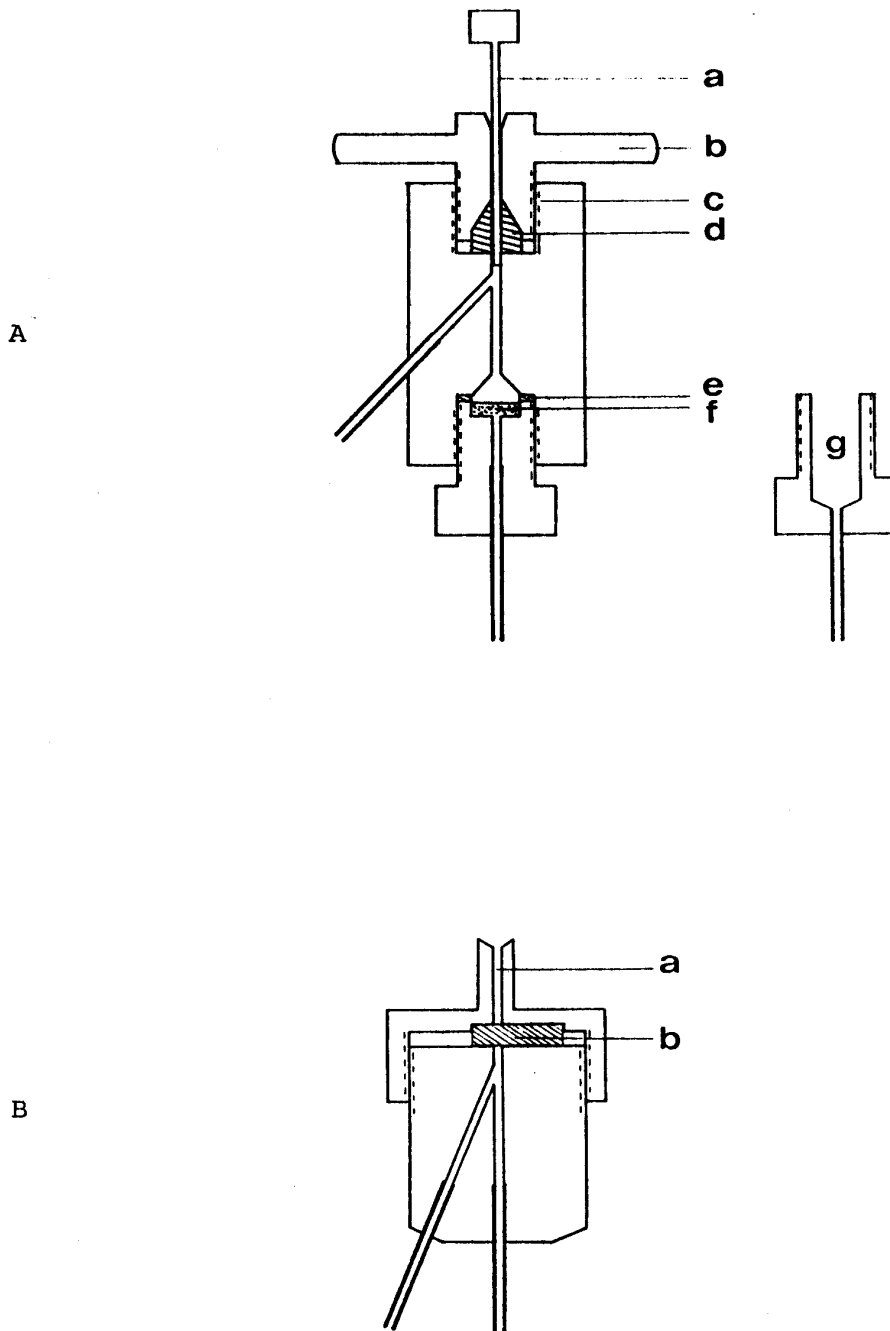


Abb. 14 Aufgabesysteme

- a-d, f s. Text S. 39
- e Dichtring, Teflon
- g mit Watte oder Glaswolle zu füllender Topf als Alternative zum Filter f

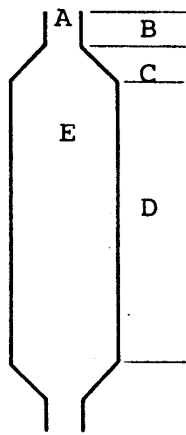
nötigen drei Geräte zur Erfüllung dieser Aufgaben. Das zuerst beschriebene wird am häufigsten verwendet. Es besteht aus zwei Teilen:

- Eine Hamilton-Spritze, Typ Serie 1000 N, mit Teflon-Kolben. Der Inhalt der Spritze kann 1, 2.5 oder 5 ml betragen. Der Außendurchmesser der Kanüle ist, was für die Funktion des Injektors essentiell ist, konstant (0.71 mm). Größere Spritzen sind nicht zu empfehlen, da die auszuübende Kraft (Überwindung des Säulendruckabfalls) unpraktisch hoch ist.
- Der eigentliche Injektor, Abb. 14 A ( $\Delta$ ), wird bei fließendem Eluens durch den Teflon-Konus d und den Edelstahlstift a gedichtet, dessen Durchmesser dem der Spritzenkanüle gleich ist. Zur Injektion wird die Pumpe abgestellt, der Stift a herausgezogen und die Spritze eingeführt, eventuell durch leichtes Andrehen der Schraube c, mit Stiften d zur Erhöhung der Hebelwirkung, gedichtet. Die Substanzlösung passiert eine Fritte (G2) f, bevor sie in die Säule eintritt.

Die Dosierung großer Volumina (20-80 ml) war bisher selten notwendig. Großvolumige Spritzen sind unpraktisch (s.o.), Vielfachinjektion mit einer kleinen Spritze zeitraubend und unbequem. Nicht vollkommen, aber brauchbar ist die folgende Methode: Die Substanzlösung von definiertem Volumen wird in ein Stahlrohr (Länge: 12 cm, Innend.: 3 cm) eingefüllt, von dessen konisch verjüngtem unteren Ende eine Leitung (eingelötetes Metallröhrchen, Teflonschlauch) zur Trennsäule führt. Das Rohr wird mit einem Deckel verschlossen (Gewinde, Teflonring als Dichtung), der an eine Stickstoffbombe über ein Reduzierventil mit Manometer angeschlossen ist (s. Pulsationsdämpfer). Die Lösung wird mittels 3-5 bar Stickstoffdruck in die Trennsäule dosiert, der Vorgang dabei durch Messung des verdrängten Eluensvolumens (Meßzylinder am Säulenausgang) verfolgt.

Für die Bestimmung der Bodenzahl und andere Messungen, bei denen die Dosierung im allgemeinen in das strömende Eluens erfolgen muß, verwenden wir den Septum-Injektor nach Abb. 14 B ( $\Delta$ ). Injiziert wird mittels einer 10  $\mu$ l-GC-Spritze. Die Konstruktion dürfte aus der Abbildung klar ersichtlich sein: a ist ein Führungsrohr, b das Septum (versetzbar, Typ Hamilton 100513, 12 mm Durchmesser). Eine analoge Ausführung ( $\Delta$ ) enthält zusätzlich ein Filter (f oder g von Abb. 14 A).

Ein Septum-Injektor ist für präparative Zwecke nicht allzu gut geeignet. Er arbeitet zwar bis ca. 10 bar befriedigend, bei höherem Druck, insbesondere mit wässrigen Lösungen (Reversed-phase)



	Typ		
	B	C	D
A (KPG)	10.00	10.00	10.00
B	25	25	25
C	20	25	35
D	250	400	650
E (Innendurchm.)	24	39.5	60
Wandstärke	1.75 ±0.25	2.5 ±0.25	3.5 ±0.5 [a]

[a] Es empfiehlt sich, statt dessen die Wandstärke  $5 \pm 0.5$  mm zu nehmen.

Abb. 15 Glassäulen (Maße in mm; Glassorte: Duran 50)

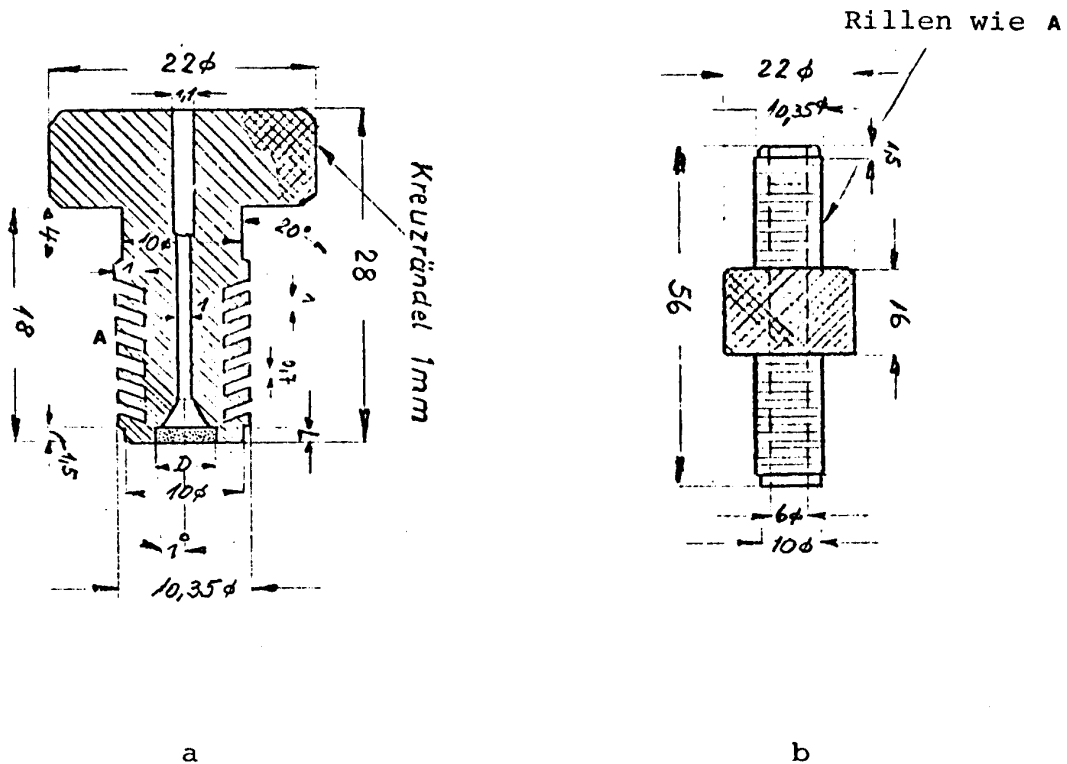


Abb. 16 Verschlussstopfen und Zwischenstück (Maße in mm). D und L nach Frittengröße (siehe); Material: PTFE (Teflon)

treten aber Schwierigkeiten auf<sup>1)</sup>. Das zu den Lobar-Säulen (Merck) angebotene Aufgabesystem fanden wir unbrauchbar.

Trennsäulen. - Die symmetrischen Trennsäulen bestehen aus Glasrohren mit konisch verjüngten Enden, vgl. Abb. 15. Es werden drei Größen, Typ B, C, D verwendet; die Maße sind in Abb. 15 angegeben. Die dichtenden Enden bestehen aus KPG-Rohr (wichtig!).

Verschlossen werden die Säulen mit gerippten Teflonstopfen entsprechend Abb. 16a, einer technischen Zeichnung mit den genauen Angaben. Die Stopfen enthalten Edelstahlrohre, die aus zersägten Spritzenkanülen hergestellt sind. Sie sollten 1.5 cm aus den Stopfen herausragen. Über die Stahlröhrchen werden Teflonschläuche gezogen. Nach unseren Erfahrungen ist das System bis ca. 20 bar stabil. Bei höherem Druck springt entweder der Schlauch ab, oder der obere Teflonstopfen wird herausgedrückt. Dem kann entweder durch Umwickeln des Stopfens mit Teflonband (in jeder Werkstatt vorhanden) oder durch Einspannen beider Stopfen mit Stativklammern entgegengewirkt werden. Die Stopfen werden unter drehender Bewegung vorsichtig in die Säulen eingedrückt. Sicherheitshalber umwickelt man die Hände mit einem Handtuch. Nie Gewalt anwenden!

Zur Packung der Säulen werden jeweils zwei Säulen verschiedenen Typs mittels des "Zwischenstücks", Abb. 16b, verbunden und senkrecht aufgestellt. Die größere obere Säule wird im folgenden als "Vorsäule" bezeichnet.

Detektoren. - Nach unseren Erfahrungen ist der UV-Detektor allen anderen Detektoren vorzuziehen, vorausgesetzt natürlich, die zu trennenden Substanzen absorbieren im UV<sup>2)</sup>. Sehr gut bewährt hat

---

1) Weitere Hinweise s. [6]

2) Natürlich muß das Eluens im Gebiet der Substanzabsorption transparent sein. Ausgenommen Aromaten, erfüllen die üblichen Eluenten diese Bedingung ab  $\lambda > 250-260$  nm. Viele Substanzen absorbieren in diesem Gebiet bereits nicht mehr. Mit den recht unversetzten Eluengemischen Petrolether (bzw. reine Alkane)/Tetrahydrofuran oder besser Dimethoxyethan (Kieselgel) oder Wasser/Methanol bzw. Acetonitril (Reversed-phase) kann man bis herab zu  $\lambda \sim 200$  nm arbeiten.

sich ein Gerät "Spectrochrom M" der Fa. Gilson (Verkauf durch Fa. Abimed, Düsseldorf) mit variabler Wellenlänge (200-650 nm). Billige Geräte arbeiten im allgemeinen bei der festen Wellenlänge  $\lambda \sim 255$  nm. Für viele Zwecke reicht das aus, nicht aber für sehr stark oder sehr schwach absorbierende Substanzen. Hier ist meist das Gebiet  $\lambda > 280$  oder  $\lambda \sim 220-230$  nm erforderlich. Anders als in der analytischen HPLC, ist das Volumen der Meßzelle für das präparative Arbeiten nicht sonderlich wichtig, d. h. es kann relativ groß sein (beim obigen Gerät: 150  $\mu$ l)<sup>1)</sup>.

Weniger empfindlich, aber nahezu universell ist das Differential-Refraktometer. Wir verwenden ein Gerät (Typ 5100) der Fa. Knauer, Berlin. Ein Refraktometer muß gut thermostatisiert werden. Dieses wird in der Regel dadurch bewirkt, daß vor die Meßzelle eine längere, in einen Wärmeaustauscher (Metallblock) eingebettete Kapillare geschaltet ist. Diese bewirkt, wenn sie eng ist, einen hohen Druckabfall; ist sie weit, so ist die Thermostatisierung schlecht (hohes Rauschen). Deshalb schließt man das Differentialrefraktometer auf die in Abb. 17 dargestellte Weise in einen Nebenzweig des Eluentsstromes<sup>2)</sup>.

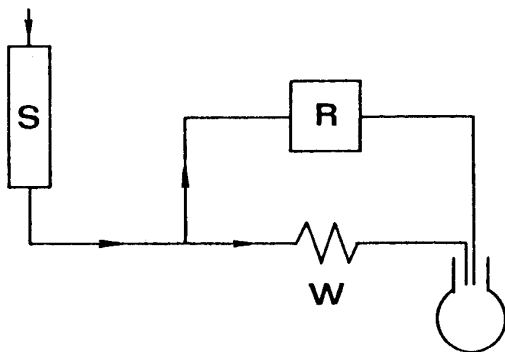


Abb. 17 Anschluß eines Differential-Refraktometers

S Trennsäule  
R Differential-Ref.  
W Strömungswiderstand  
(kurze Stahlkapillare)

1) Falls man sich für ein anderes Gerät entscheidet, sollte man darauf achten, daß Zu- und Abflußkapillare so weit sind, daß auch bei hohem Durchfluß (150 ml/min) kein signifikanter Druckabfall auftritt.

2) Die Strömungsgeschwindigkeit auf den Wegen über R und W, Abb.17, ist nicht gleich. Man bestimmt den Unterschied mit Hilfe einer farbigen Probesubstanz.

Schreiber. - Der Schreiber sollte neben der richtigen Eingangsspannung und einem praktikablen Schreibgerät (sehr brauchbar sind Filzschreiber) unbedingt die folgenden Vorschubgeschwindigkeiten besitzen: 12, 3, 1, 0.2 cm/min. Sehr zu empfehlen ist ein Zweikanal-Schreiber, womit beide Detektoren gleichzeitig betrieben werden können.

Sammeln der Fraktionen. - Ein Fraktionensammler ist überflüssig. Die Fraktionen werden in 0.5-1 l-Schliffkolben aufgefangen derart, daß sie ohne lästiges Umfüllen am Rotationsverdampfer eingeeengt werden können.

Ein kleines Ärgernis ist oft, daß der vom Detektor kommende Teflonschlauch nicht fixiert ist. Hierfür empfiehlt sich das in Abb. 18 dargestellte "Gerätchen", welches man auf den Schliff des Auffangkolbens setzt.

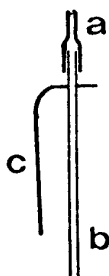


Abb. 18 Ausflußvorrichtung

- a Schlauch vom Detektor
- b Edelstahlröhrchen
- c Blechstreifen (Breite 8 mm, Länge 55 mm)

### 3.2 Packen der Säulen

#### 3.2.1 Trockenpackung von Kieselgel mit Korndurchmesser >50 $\mu$

Es wurden zwei Verfahren entwickelt, die ausführlich in [6] beschrieben sind.

#### 3.2.2 Naßpackung von Kieselgel mit Korndurchmesser 15-25 $\mu$

Das im folgenden beschriebene Verfahren ergibt reproduzierbar Säulen höchster Trenngüte, auch in der Ausführung durch Anfänger. Voraussetzung für das Gelingen ist relativ peinliche Einhaltung der Vorschriften. Die als besonders wichtig erkannten Punkte sind durch Unterstreichen hervorgehoben.

Das Verfahren besteht in einer Sedimentation gefolgt von einem "Festpumpen" des Adsorbens. Auf die zu füllende Säule ("Packsäule") wird mittels des "Zwischenstücks" (S. 40, Abb. 16b) die nächstgrößere Säule ("Vorsäule") aufgesetzt. In diesem Arrangement wird zunächst sedimentiert und dann wird unter Druck bis maximal 16 bar Flüssigkeit hindurchgepumpt.

A1. Allgemeine Hinweise, Sicherheitsvorkehrungen. - Vollständig, d. h. gasblasenfrei mit einer Flüssigkeit gefüllte Glasgeräte unter Druck stellen keine Gefahrenquelle dar. Beim Zerplatzen fällt das Gerät ohne Treibeffect auseinander<sup>1)</sup>. Verletzungen sind allenfalls durch (praktisch senkrecht) herabfallende Glassplitter möglich. Es empfiehlt sich trotzdem, während des Packungsvorganges (Typ C mit Vorsäule D)<sup>2)</sup> einen Schutzschirm aus gelochtem Blech aufzustellen und eine Schutzbrille aufzusetzen. Solange die Vorsäule angeschlossen ist, arbeitet man am besten auf dem Fußboden, nicht auf dem Labortisch.

Im Gegensatz zu Flüssigkeiten stellen komprimierte Gase immer eine Gefahrenquelle dar. Während des Packvorganges ist deshalb streng darauf zu achten, daß sich keine Gasblasen im System, insbesondere nicht in der Vorsäule, befinden! Die Entgasung von Wasser und Adsorbenssuspensionen muß sorgfältig durchgeführt werden.

Eine weitere potentielle Gefahrenquelle ist Glasbruch beim Einsetzen oder Herausnehmen von Teflonstopfen und Zwischenstück! Stets eine drehende Bewegung durchführen, keine Gewalt anwenden, die Hände mit einem Handtuch umwickeln!

Die Druckbelastung der Vorsäule ist wesentlich größer als die der Packsäule, denn in ihr besteht praktisch kein Druckabfall. Eine Säule mit größerem Durchmesser als dem von Typ D sollte in Glasausführung nicht als Vorsäule verwendet werden<sup>1)</sup>.

- 1) Die Vorsäule Typ D ist bei uns einmal, bei Kollegen zweimal gerissen. In allen drei Fällen war der Druck von 16 bar (s.u.) beträchtlich überschritten worden. Für die Packung von Säulen größer als Typ C dürfte eine Vorsäule aus Stahl erforderlich sein.
- 2) Das Auseinanderfallen kann durch Umwickeln der Säule D mit Tesafilm oder ähnlichem Material verhindert werden.



A2. Entgasung von Wasser und Adsorbenssuspensionen. - Die zu entgasende Flüssigkeit oder Suspension wird in einem Schliff-Rundkolben über einen Schliffkern mit Hahn und Olive an der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Luft entweicht nach kurzer Zeit unter mäßigem Aufschäumen. Man hält danach noch ca. 5 min unter vollem Vakuum, schließt den Hahn und läßt auf Raumtemperatur erwärmen (kein Schliffett!).

A3. Vorbehandlung und Silanisierung der Säulen. - Vor- und Hauptsäule werden mit dest. Wasser und Aceton gespült, getrocknet und über das Zwischenstück gekoppelt. Es wird einseitig verschlossen (Teflon-Stopfen mit kurzem Teflonschlauch in den ein Stahlstift gesteckt ist) und eine Lösung von 2 ml Trimethylchlorsilan in 18 ml absol. Benzol oder Toluol eingefüllt. Nach Verschließen wird ca. 2 min kräftig geschüttelt, so daß die gesamte Glasoberfläche gut benetzt wird. Danach wird sorgfältig mit Aceton, dann Wasser und wieder Aceton gespült und an der Luft oder im Stickstoffstrom getrocknet.

B. Packen einer Säule Typ B

B1. Die unten mit einem Teflon-Stopfen (Fritte G2) verschlossene Säule B wird an einem stabilen Stativ befestigt. Der Stopfen wurde folgendermaßen vorpräpariert: man zieht über das Metallröhrchen einen ca. 5 cm langen Teflonschlauch (1x1.5 mm) und verdrängt die Luft aus Stopfen und Schlauch, indem man dest. Wasser hindurchdrückt (z. B. mit Hilfe einer Plastik-Spritzflasche) oder -pumpt. Der Teflonschlauch wird dann durch Einstecken eines Metallstiftes fest verschlossen. Während der Sedimentation darf kein Wasser unten abfließen.

Man füllt mit entg. dest. Wasser bis zur oberen Verengung auf, entfernt Luftblasen sorgfältig (Klopfen mit Korkring oder "Herausziehen" mit einem Teflonschlauch, an dem sie relativ fest haften), füllt dann weiter randvoll auf, dreht das Zwischenstück vorsichtig hinein und füllt es aus einer Pipette vollends auf. Dann setzt man die Vorsäule (Typ C)

oben auf, richtet das fest gekoppelte Säulenpaar lotrecht aus und füllt mit entg. dest. Wasser bis gerade über den (unteren) Konus der Vorsäule auf. Wiederum achte man auf Luftblasen! Sie halten sich besonders im Zwischenstück oft hartnäckig.

- B2. 80-85 g Kieselgel MERCK LiChroprep Si 60, 15-25  $\mu$ , (Bestell-Nr. 9336) werden in einem 1 l-Schliff-Rundkolben mit 800 ml dest. Wasser homogen aufgeschlämmt, die Suspension läßt man während 30-40 min ungestört sedimentieren. Dann wird die überstehende Trübe vorsichtig - aber vollständig - abdekantiert, der Rückstand in 250 ml entgastem dest. Wasser aufgeschlämmt und die Suspension nach A2 entgast.

Die frisch entgaste und homogen aufgewirbelte Suspension wird zügig - aber unter möglichst geringer Erzeugung von Luftblasen - in die nach B1 vorbereiteten Säulen gefüllt. Man füllt mit entg. dest. Wasser randvoll auf und verschließt mit einem Teflon-Stopfen. Zur Sedimentation bleiben die Säulen während 10-12 Std. (über Nacht) ungestört stehen.

- B3. Nach vollendeter Sedimentation saugt man die überstehende, in der Regel leicht trübe Flüssigkeit mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe (Teflon-Schlauch 2-3 mm Innendurchm.) ab und füllt mit entg. dest. Wasser randvoll wieder auf, wobei die Oberfläche des abgesetzten Kieselgels möglichst wenig gestört werden sollte.

In die randvolle Vorsäule wird (oben) ein Teflonstopfen ohne Fritte (drehend) eingesetzt. Dabei läßt man das Wasser aus dem Röhrchen quellen, so daß die Luft aus dem Stopfen verdrängt wird. Die Säulen werden (oben) an die luftblasenfrei mit entgastem dest. Wasser gefüllte Pumpe-Dämpfer-Manometer-Kombination angeschlossen (genügend vorpumpen!). Im ganzen System, speziell in der Vorsäule, dürfen keine größeren Luftblasen vorhanden sein.

- B4. Man entfernt den am unteren Ende der Säulen befindlichen Verschluß-Teflonschlauch und pumpt entg. dest. Wasser von

oben nach unten durch die Säulenkombination. Dabei beginnt man mit kleinstem Pumpenhub und steigert den Druck jeweils um 1 bar derart, daß sich für jeweils ca. 1 min Druckkonstanz einstellt. Hierbei ist zügig aber kontinuierlich, nicht ruckhaft, zu arbeiten. Wichtig ist insbesondere gute Dämpfung des Eluens (Einstellung des Dämpfers s. S. 36). Nach Erreichen eines Enddruckes von 13-15 bar pumpt man bei konstantem Druck noch ca. 5 min und schaltet die Pumpe ohne Veränderung des Hubs ab. Beispiel:

Druck [bar]	6	7	8	9	10	11	12	13
Durchfl. [ml/min]	1.8	2.1	2.4	2.7	2.9	3.2	3.6	4.0

(Dieses sind nur Anhaltswerte, die nicht genau reproduziert werden müssen).

Das Wasser wird nun aus der Vorsäule abgesaugt, die Wandung mit 2mal je 50-100 ml Aceton (Entgasung unnötig) gespült und das wässrige Aceton abgesaugt oder abgehebert. Die Vorsäule wird randvoll mit Aceton (nicht entg.) gefüllt, die Pumpe-Dämpfer-Manometer-Kombination mit Aceton konditioniert und an die Säulen luftblasenfrei angeschlossen.

Beginnend mit demselben Hub wie bei Beendigung des Wasserpumpens wird nun Aceton hindurchgepumpt. Nachdem die relativ gut zu erkennende Acetonfront das Zwischenstück passiert hat, erhöht man den Pumpenhub kontinuierlich bis ein Druck von 13 bar<sup>1)</sup> erreicht ist und reguliert auf diesen Druck fortlaufend nach, denn der Druckabfall des Kieselgels nimmt mit zunehmendem Acetongehalt stetig ab (die Viskosität des Acetons ist kleiner als die des Wassers). Insgesamt werden 500-700 ml Aceton hindurchgepumpt und die Pumpe dann wieder ohne Veränderung des Hubs abgestellt. Beispiel (wiederum nur Anhaltswerte):

Acetonvolumen [ml]	100	200	300	400	500	600	750
Durchfluß [ml/min]	10	11.5	12	12.5	13	13	13

---

1) Man kann auch auf ein höheres Druckniveau gehen, max. ca. 16 bar.

Das Aceton wird aus der Vorsäule abgehebert und diese unter Drehen vorsichtig vom Zwischenstück abgezogen. Dann zieht man, ebenfalls unter Drehen, das Zwischenstück aus der Packsäule, ohne die Kieselgeloberfläche zu beschädigen. In beiden Fällen muß langsam gearbeitet werden, andernfalls kann das Adsorbensbett infolge von Unterdruck reißen. Die Säule wird mit einem Teflon-Schlauch (Fritte G2), der fest auf dem Kieselgel aufsitzen soll, verschlossen.

Mit derselben Einstellung des Pumpenhubs wie vor Beendigung des Acetonpumpens wird nun Petrolether (tief)/Ethylacetat (95/5) gepumpt. Da die Viskosität dieses Gemisches kleiner ist als die des Acetons, tritt zunächst nur ein Druck von 3-4 bar auf. Auf etwa diesen Wert muß der Dämpfer eingestellt werden. Starke Pulsation in dieser Phase ruiniert die Säule. Der Druck wird durch Erhöhung des Kolbenhubs wiederum stetig gesteigert, derart, daß sich für jeweils ca. 1 min ein konstanter Wert einstellt. Nach Erreichen von 13 bar<sup>1)</sup> wird bei diesem Druck ca. 1 l hindurchgepumpt. Beispiel:

Druck [bar]	3.5	5	7	8	9	10	11	12	13
Durchfl. [ml/min]	12.5	20.5	30.0	40.5	44.5	50	55	60	66

Während der Druck- bzw. Durchflußerhöhung senkt sich die Packung ab. Der Stopfen wird nach dem Abschalten der Pumpe herausgenommen und trockenes Kieselgel nachgefüllt, derart, daß der Stopfen danach nahezu voll hereingedrückt werden kann und fest auf der Packung aufsitzt.

- B5. Die Säule ist nun betriebsbereit. Sie sollte wie unten beschrieben auf Bodenzahl und Symmetrieindex getestet werden. Wir vermerken die Testwerte und das Herstellungsdatum wischfest auf einem Etikett, zusätzlich einen Pfeil der die Richtung des Flußes bei der Packung angibt. In dieser Richtung wird die Säule auch später ausschließlich betrieben.

Die Säulen werden verschlossen aufbewahrt (Verschluß ist ein

---

1) Man kann auch auf ein höheres Druckniveau gehen, max. ca. 16 bar.

Teflonschlauch, der an beiden Enden über die Metallröhrchen der Stopfen geschoben ist). Es spielt aber offenbar keine Rolle, wenn die Säulen partiell austrocknen. Die enthaltene Luft löst sich beim Durchpumpen von Lösungsmitteln auf.

### C. Packen einer Säule Typ C

Ausgenommen Unterschiede im Druck, Durchfluß etc. entspricht das Verfahren dem oben beschriebenen.

Die Punkte A1-A3 gelten in gleicher Weise.

C1. Vorsäule ist die Säule Typ D, sonst ist nach B1 zu verfahren.

C2. 330 g des unter B2 angegebenen Kieselgels werden in 1.5 l dest. Wasser "homogen" aufgeschlämmt. Die Suspension läßt man 75 min sedimentieren. Dann wird die überstehende Trübe vorsichtig - aber vollständig - abdekantiert, der Bodensatz in 1 l entg. dest. Wasser aufgeschlämmt, die Suspension entgast und luftblasenfrei in die Vorsäule eingefüllt. Man läßt 20-25 Std. ungestört sedimentieren.

C3. Man verfährt wie bei B3. angegeben.

C4. Man geht prinzipiell gleich vor wie unter B4 angegeben; der Enddruck sollte aber bei jeder der drei Flüssigkeiten mindestens 16 bar betragen, zur Orientierung mögen wieder die Druck-Durchfluß-Werte eines typischen Falles dienen:

#### Wasser

Druck [bar]	6	8	10	12	14	16
Durchfl. [ml/min]	4.0	6.5	8.3	9.5	10.5	11.5

Nach Erreichen des Enddrucks von 16 bar wird noch 5 min bei konstantem Hub weitergepumpt.

#### Aceton

Insgesamt werden ca. 2 l Aceton hindurchgepumpt. Der Druck wird kontinuierlich auf 16 bar nachgeregelt.

Volumen [l]	0.5	1.0	1.5	2.0
Durchfl. [ml/min]	14.0	18.5	20.0	22.0

Vorsäule und Zwischenstück werden abgenommen und Petrol-  
ether (tief)/Ethylacetat (95/5) bis zum konstanten End-  
druck von 16 bar gepumpt.

Petrolether (tief)/Ethylacetat (95/5)

Druck [bar]	6	8	10	12	14	16
Durchfl. [ml/min]	22	30	55	78	90	105

C5. Die Säule wird getestet und etikettiert (vgl. B5).

D. Test auf Bodenzahl und Symmetrieindex

Die Säule wird an einen Septum-Injektor ohne Filter (Abb.14B)  
angeschlossen und der UV-Detektor benutzt. Es werden folgen-  
de Bedingungen gewählt:

Eluens:	Petrolether (tief)/Ethylacetat (95/5)
Durchfluß:	Säule Typ B, 20 ml/min, Säule Typ C, 50 ml/min (Messung mit Meßzylinder und Armbanduhr (Sekundenzeiger) oder Stoppuhr).
Detektor:	Wellenlänge 265 nm, 0.5 Extinktionseinheiten
Schreiber-Vorschub:	12 cm/min
Testlösung:	40 mg Naphthalin in 2 ml Eluens

2 µl (Typ B) bzw. 5 µl (Typ C) der Testlösung werden mittels  
einer 10 µl-Spritze in das laufende System injiziert, dabei  
jeweils der Zeitpunkt auf dem Schreiber markiert (Detektor,  
Knopf "Marker"). Es werden mindestens 2 Injektionen im Ab-  
stand von ca. 1.5 min vorgenommen. Die Peakhöhe sollte ca.  
80 % des Vollausschlags betragen.

Auswertung<sup>1)</sup>:  $N = 5.54 (t_R/b_{1/2})^2$  S.I. = a/b, vgl. Abb. 2.

1) Bei besonders guten Säulen tritt kurz hinter dem Naphthalin  
ein flacher Peak auf (scheinbares Tailing). Es handelt sich  
um eine Verunreinigung im Naphthalin.

Die Säulen, deren Druck-Durchflußwerte oben angegeben sind, besaßen  $N = 6900$ ,  $SI = 1.01$  (B);  $N = 8300$ ,  $SI = 1.06$  (C).

Säulen mit  $N < 5000$  (B) bzw.  $N < 7500$  (C) und  $SI > 1.1$  sind nicht akzeptabel. Sie sollten geleert und neu gepackt werden. Mißlingen der Säulenpackung (ca. eine von 20 Säulen) kann nach unserer Erfahrung nur bei Nichtbeachtung eines der oben als wesentlich markierten Punkte geschehen.

#### E. Wiederaufbereitung von Kieselgel

Beim Packen fällt aus Vorsäule und Zwischenstück "überschüssiges" Kieselgel an. Es wird mittels Aceton in ein Gefäß gespült und gesammelt. Ca. eine von 20 Säulen mißlingt. Man entleert die Säule, indem man einen Stopfen entfernt und von oben nach unten Aceton hindurchpumpt (eventuell ist zusätzliches "Stochern" mit einem Draht erforderlich).

Zur Wiederaufbereitung derartigen Kieselgels, was nur nach Ansammeln von ca.  $>300$  g lohnt, dekantiert man Aceton mehrmals ab, schlämmt in dest. Wasser auf und entfernt feine Anteile nach B2 (1. Absatz). Man schlämmt dann wieder in dest. Wasser auf und saugt auf einer Nutsche mit Filterpapier ab. Man beläßt einige Stunden an der Wasserstrahlpumpe, füllt dann in eine Schale um und trocknet 2-3 Tage bei  $130^{\circ}\text{C}$  im Trockenschrank. Klumpen werden durch vorsichtiges Schütteln oder Drücken beseitigt. Man verfähre vorsichtig, damit keine feinen Anteile entstehen.

Auch stark verschmutztes Kieselgel aus lange benutzten Säulen kann aufbereitet werden. Man entleert, wäscht mit Aceton und Wasser und erwärmt mit konz. Salpetersäure (ca. 1 l/300 g Kieselgel) während 2-3 Std. auf dem Wasserbad. Dann wird dekantiert, mehrmals mit dest. Wasser aufgeschlämmt und dekantiert, schließlich wie oben beschrieben abgesaugt, gut ausgewaschen (pH-Test) und getrocknet.

Das wiederaufbereitete Kieselgel sollte nicht ohne spezielle Maßnahmen zur Säulenpackung verwendet werden: Oft liegt Teilchenaggregation vor, die mit bloßem Auge kaum zu erkennen ist. Es empfiehlt sich, die wässrigen Suspensionen vor dem Einschlämmen in die Säulen während ca. 20 min einer Ultraschallbehandlung zu unterziehen.

### 3.3 Rückgewinnung von Lösungsmitteln

Die Chromatographie auf Säulen hoher Bodenzahl erfordert pro Einheit zu trennender Substanz prinzipiell weniger Lösungsmittel als die konventionelle Säulenchromatographie. Da aber wesentlich schneller gearbeitet wird, ist der Lösungsmittelverbrauch relativ hoch. Wir entwickelten folgendes einfache Verfahren zur Rückgewinnung. Alle Fraktionen werden an einem mit einem Manostat<sup>1)</sup> versehenen Rotationsverdampfer eingedampft. Das Destillat wird<sup>2)</sup> bezüglich seiner Zusammensetzung, die sich bei Gemischen stets etwas ändert, durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Das Verfahren ist in Abb. 19<sup>3)</sup>, einer typischen Laborvorschrift, erläutert. Es hat gegenüber anderen (z. B. Dichtebestimmung) zwei wesentliche Vorteile: (a) Es läßt sich auf Gemische anwenden, die Petrolether, d. h. ein Multikomponentengemisch, enthalten; (b) es berücksichtigt implizit geringe Veränderungen im Wassergehalt der Lösungsmittel. Mit anderen Worten, das Lösungsmittel wird nicht bezüglich seiner genauen Zusammensetzung, sondern bezüglich seiner chromatographischen Eigenschaften analysiert. Die Dichtebestimmung erweist sich bei Gemischen mit chlorierten Verbindungen als vorteilhaft (Aräome-

- 
- 1) Der Manostat besteht lediglich aus geeichten Siedekapillaren, die in einem Gefäß zwischen Rotationsverdampfer und Wasserstrahlpumpe geschaltet sind. Je nach Siedepunkt des einzudampfenden Lösungsmittels stehen solche mit 100, 200, 300 und 400 Torr zur Verfügung. Sehr gut bewährt hat sich auch ein "Vakuum-Regler" der Fa. Glas-Keller, Basel.
  - 2) In manchen Fällen empfiehlt es sich, kurz über Calciumchlorid zu trocknen und nochmal bei Normaldruck zu destillieren.
  - 3) Die Ausarbeitung der Methode ist Herrn G. Nill zu verdanken.



ter sind ungeeignet; einfacher und genauer ist die Verwendung von 25- oder 50-ml-Meßkolben und Waage).

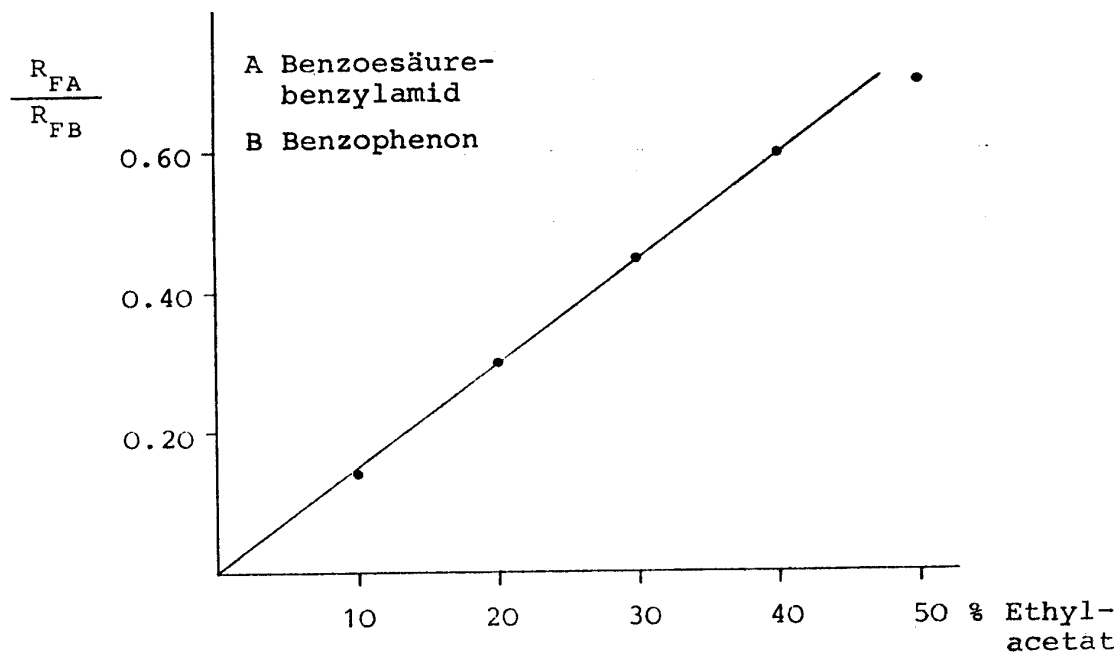


Abb. 19 Zur dünn-schichtchromatographischen Bestimmung der Zusammensetzung von Petrolether (tief)/Ethylacetat-Gemischen (falls der Gehalt an Ethylacetat >50 %, muß mit Petrolether verdünnt und dann die DC durchgeführt werden).

#### 4. MESSERGESBNISSE, DISKUSSION

##### 4.1 Permeabilität

Die Messung der Permeabilität,  $K$  bzw.  $K_F$  (s. Gl. 21 bzw. 22) ist aus zwei Gründen wichtig. Zum einen charakterisiert sie den Druckabfall einer Säule, zum anderen erlaubt sie die Bestimmung der dynamischen Korngröße  $d_{pd}$  (s. Gl. 23). Für Adsorbentien mit relativ breiter Kornverteilung, wie das hier verwendete, stellt  $d_{pd}$  die Referenzgröße zur Beurteilung der Säulenqualität anhand der van Deemter-Gleichung dar.

Die früher angegebenen Gl. 21 und 22 gelten nur für zylindrische Säulen. Unsere präparativen Säulen besitzen konische Teilstücke. Um diese korrekt zu erfassen, müssen entsprechende Formeln benutzt werden. In der Literatur fanden wir sie nicht. Wir haben deshalb Gl. 21 und 22 verallgemeinert und allgemeine Ausdrücke zur Berechnung der Permeabilität beliebig geformter, aber axialsymmetrischer Säulen selbst hergeleitet.

Theorie: Permeabilität ( $K, K_F$ ) und Lineargeschwindigkeit ( $u$ ) in axialsymmetrischen, speziell kegelstumpfförmigen Säulen. - Der Druckabfall einer zylindrischen Säule beträgt (vgl. S. 12):

$$\Delta p = \frac{1}{K_F} \frac{\eta}{\pi} \frac{L}{R^2} \cdot F \quad \text{Gl. 22}$$

Wir denken uns eine beliebig geformte, aber rotationssymmetrische Säule als aus Zylindern infinitesimaler Länge  $dL$  zusammengesetzt; deren Druckabfall  $d\Delta p$  beträgt

$$d\Delta p = \frac{1}{K_F} \frac{\eta}{\pi} \cdot F \cdot \frac{dL}{R^2}$$

Der Gesamtdruckabfall ergibt sich durch Summation, im Grenzfall  $dL \rightarrow 0$  durch Integration:

$$\Delta p = \frac{1}{K_F} \frac{\eta}{\pi} F \int_0^{L_S} \frac{dL}{R^2} = \frac{1}{K_F} \frac{\eta}{\pi} F G \quad \text{Gl. 33}$$

$L_S$  bezeichnet die Gesamtlänge der Säule.

Das Integral  $G$  enthält die gesamte Information über die Geometrie der Säule; wir bezeichnen es deshalb als "Geometriefaktor"  $G$ .

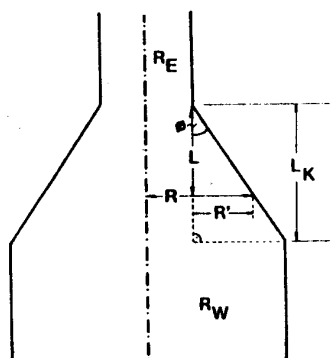


Abb. 20 Definitionen zur Geometrie eines Kegelstumpfs

$$R' = L \operatorname{tg} \phi$$

$$R = R_E + R' = R_E + L \operatorname{tg} \phi$$

$$\operatorname{tg} \phi = (R_W - R_E) / L_K$$

Für einen Zylinder ist  $R$  konstant, deshalb ergibt die Integration  $G$  in trivialer Weise:  $G = L/R^2$ . Für einen Kegelstumpf (bisher lax als "Konus" bezeichnet) muß die Funktion  $R(L)$  angegeben werden. Die nötigen Angaben sind in Abb. 20 zusammengestellt. Für einen Kegelstumpf der Länge  $L_K$  folgt:

$$G_K = \int_0^{L_K} \frac{dL}{R^2} = \int_0^{L_K} \frac{dL}{(L \operatorname{tg} \phi + R_E)^2} = - \left[ \frac{1}{\operatorname{tg} \phi (L \operatorname{tg} \phi + R_E)} \right]_0^{L_K} =$$

$$= \frac{1}{R_E \operatorname{tg} \phi} - \frac{1}{\operatorname{tg} \phi (L_K \operatorname{tg} \phi + R_E)} ;$$

mit  $L_K \operatorname{tg} \phi + R_E = R_W$  bzw.  $\operatorname{tg} \phi = (R_W - R_E) / L_K$  (vgl. Abb. 20) ergibt sich:

$$G_K = \frac{1}{R_E \operatorname{tg} \phi} - \frac{1}{R_W \operatorname{tg} \phi} = \frac{1}{\operatorname{tg} \phi} \left( \frac{1}{R_E} - \frac{1}{R_W} \right) = \frac{L}{R_W - R_E} \left( \frac{1}{R_E} - \frac{1}{R_W} \right) =$$

$$G_K = \frac{L_K}{R_W R_E} \tag{Gl. 34}$$

Der Beitrag des konischen Teils der Säulen entspricht also dem eines Zylinders gleicher Länge und einem Radius, der dem geometrischen Mittel der beiden Kegelstumpfradien entspricht.

Für den Gesamtgeometriefaktor unserer, aus technischen Gründen natürlich nicht ganz symmetrischen Säulen folgt aus Gl. 33 und 34 sowie den in Abb. 21 festgelegten Bezeichnungen:

$$G = \frac{L_{E1} + L_{E2}}{R_E^2} + \frac{L_W}{R_W^2} + \frac{L_{K1} + L_{K2}}{R_E R_W}, \tag{Gl. 35a}$$

$$\Delta p = \frac{1}{K_F} \frac{\eta}{\pi} \cdot F \cdot G \quad \text{bzw.} \tag{Gl. 35b} \tag{=Gl. 33}$$

$$K_F = \frac{F \cdot \eta}{\Delta p \cdot \pi} G \tag{Gl. 35c}$$

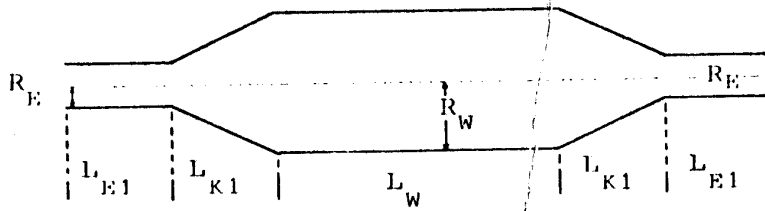


Abb. 21 Zur Berechnung des Geometriefaktors benötigte Größen

In analoger Weise muß Gl. 21, die den Druckabfall in Relation zur Lineargeschwindigkeit setzt, modifiziert werden.

$$\Delta p = \frac{1}{K} \eta L u \quad \text{Gl. 21}$$

In nicht-zylindrischen Röhren ist  $u$  nicht konstant, sondern bei konstantem Durchfluß  $F$  eine Funktion des Säulenradius bzw. -querschnitts. Es besteht also die Aufgabe  $u$  in Abhängigkeit von der Säulenlänge, wobei am Säuleneingang  $L = 0$  gelte, anzugeben. Als Bezugs-Meßgröße wird die Totzeit  $t_0$  gewählt. Die Länge der Säule sei wieder als  $L_S$  bezeichnet.

$t_0$  ist Zeit, nach der ein bei  $L = 0$  (Säulenanfang) gestartetes Flüssigkeitspaket bei  $L_S$  (Säulenende) austritt. Nach Standard-schulphysik ist

$$u(L) = \frac{dL}{dt} \quad \text{bzw.} \quad dt = \frac{dL}{u(L)}$$

Durch Integration erhält man

$$\int_0^{t_0} dt = \int_0^{L_S} \frac{dL}{u} \quad \text{bzw.} \quad t_0 = \int_0^{L_S} \frac{dL}{u(L)}$$

Zur Lösung des Integrals muß  $u$  als Funktion von  $L$  angegeben werden. Da  $F$  konstant sein soll, gilt der Massenerhaltungssatz:

$$\frac{u(L)}{u(L_j)} = \frac{A(L_j)}{A(L)}, \quad \text{wobei } A(L) \text{ bzw. } A(L_j) \text{ die Querschnittsfläche an der Stelle } L \text{ bzw. } L_j \text{ angibt.}$$

$$u(L) = \frac{A(L_j)}{A(L)} u(L_j)$$

Einsetzen in das Integral ergibt

$$t_0 = \int_0^{L_S} \frac{A(L) dL}{A(L_j) \cdot u(L_j)}, \quad \text{worin } A(L_j) \text{ und } u(L_j) \text{ Konstanten sind, daher folgt}$$

$$t_0 = \frac{1}{A(L_j) \cdot u(L_j)} \int_0^{L_S} A(L) dL = \frac{V_S}{A(L_j) \cdot u(L_j)} \quad \text{bzw.}$$

$$u(L_j) = \frac{V_S}{t_0 \cdot A(L_j)}$$

Da die Stelle  $L_j$  beliebig war, gilt allgemein:

$$u(L) = \frac{V_S}{t_o} \frac{1}{A(L)} \quad \text{Gl. 36}$$

Gl. 36 erlaubt die Berechnung der Lineargeschwindigkeit  $u$  an jeder Stelle der Säule aus den integralen Meßgrößen: Volumen der leeren Säule  $V_S$ , Totzeit  $t_o$  und Querschnittsfläche  $A$ .

Die Modifizierung von Gl. 21 ist nun leicht durchzuführen. Wir nehmen wieder infinitesimale Bereiche mit konstantem  $u(L)$  an und integrieren:

$$\begin{aligned} d\Delta p &= \frac{1}{K} \eta u(L) dL \\ \Delta p &= \frac{1}{K\eta} \int_0^{L_S} u(L) dL \end{aligned} \quad \text{Gl. 37}$$

Einsetzen von Gl. 36 ergibt

$$\Delta p = \frac{1}{K\eta} \int_0^{L_S} \frac{V_S}{t_o} \frac{dL}{A(L)} = \frac{1}{K\eta} \frac{V_S}{t_o} \int_0^{L_S} \frac{dL}{A(L)}$$

Das hier auftretende Integral ist ein alter Bekannter, denn  $A_L = \pi R^2(L)$ :

$$\Delta p = \frac{1}{K\eta} \frac{V_S}{t_o} \frac{1}{\pi} \int_0^{L_S} \frac{dL}{R(L)}, \text{ d. h.}$$

$$\Delta p = \frac{1}{K} \frac{\eta}{\pi} \frac{V_S}{t_o} G \quad \text{bzw.} \quad \text{Gl. 38a}$$

$$K = \frac{1}{\Delta p t_o} \frac{\eta}{\pi} \cdot V_S \cdot G \quad \text{Gl. 38b}$$

Zur Berechnung von  $K$  ist also die Messung von  $\Delta p$ ,  $t_o$  und der geometrischen Größen  $V_S$  und  $G$  nötig. Wie man jedem Handbuch entnimmt beträgt das Volumen  $V_K$  eines Kegelstumpfs (Def. s. Abb. 20):

$$V = \frac{\pi \cdot L}{3} (R_E^2 + R_W^2 + R_E \cdot R_W)$$

Mit den Definitionen aus Abb. 21 ergibt sich

$$V_S = (L_{E1} + L_{E2}) \pi R_E^2 + L_W \pi R_W^2 + \frac{(L_{K1} + L_{K2}) \pi}{3} (R_E^2 + R_W^2 + R_E R_W) \quad \text{Gl. 38c}$$

In weniger grundsätzlicher, aber einfacherer Weise hätte Gl. 38b aus Gl. 35c mit Hilfe der Porosität  $\epsilon_{\pi}$  (vgl. S. 10) hergeleitet werden können. Diese Größe sei nunmehr eingeführt, einerseits

als Kontrolle, andererseits weil sich weitere nützliche Beziehungen ergeben:

$\epsilon_T$  ist nach Gl. 21a definiert zu

$$\epsilon_T = K_F/K \quad \text{Gl. 21a}$$

Einsetzen von Gl. 35c und 38b ergibt:

$$\epsilon_T = \frac{F \cdot t_o}{V_S} \quad \text{Gl. 39}$$

Gl. 39 enthält nur Meßgrößen und erlaubt die direkte Bestimmung von  $\epsilon_T$  ohne den Druckabfall messen zu müssen. Mit  $F \cdot t_o = V_o$  (vgl. S. 11) ergibt sich weiter:

$$\epsilon_T = V_o/V_S \quad \text{Gl. 40}$$

Unter Anwendung unserer auf S. 11 angegebenen Methode (s. Gl. 17) kann  $\epsilon_T$  über Gl. 40 ohne jede chromatographische Messung bestimmt werden.

Dynamische Korngröße  $d_{pd}$  von Merck LiChroprep 15-25  $\mu$ . - Grundlage zur Bestimmung von  $d_{pd}$  ist die empirische Gl. 23. Sie gilt nur für analytische Säulen (3-6 mm Durchmesser).

Eine Säule vom Durchmesser 3 mm wurde mittels einer Balanced-density-Technik [23] gepackt. Das Adsorbens entstammte derselben Charge wie die präparativen Testsäulen (1 kg-Flasche). Die Meßwerte  $\Delta p(F)$  sowie alle weiteren relevanten Angaben sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die dynamische Korngröße beträgt  $d_{pd} = 20.4 \mu$ .

Der Wert von  $\epsilon_T = 0.76$  für die Porosität ist ein für analytische Säulen typischer Wert. So fanden wir für Säulen 30x0.3 cm und 20x0.3 cm, die mit Merckosorb SI 60, 5  $\mu$  (Kieselgel,  $d_p=5\mu$ ) gepackt waren,  $\epsilon_T = 0.75 \pm 0.02$  als Mittelwert über ca. 100 Messungen (Druckbereich: 30-200 bar, Eluens: Hexan/Ethylacetat 8:2 und 1:1).

Tabelle 1 Permeabilität  $K$ ,  $K_F$  und dynamische Korngröße  $d_{pd}$  von "Kieselgel Merck Si 60, 15-25  $\mu$ " [a]

$\Delta p$ [a] [bar]	F[b] [ml/min]	$t_o$ [c] [min]	u[c] [mm/s]	$K_F \cdot 10^9$ [d] [cm <sup>2</sup> ]	$K_F \cdot 10^9$ [e] [cm <sup>2</sup> ]	$\epsilon_T$ [f]	$d_{pd}$ [g] [ $\mu$ ]
20	1.67	1.55	5.24	4.23	5.62	0.75	20.6
30	2.50			4.22			20.5
40	3.33	0.788	10.3	4.22	5.53	0.76	20.5
50	4.17			4.22			20.6
60	4.90	0.537	15.1	4.14	5.41	0.77	20.3
70	5.63			4.10			20.3
80	6.38	0.406	20.0	4.04	5.37	0.75	20.1
90	7.20			4.05			20.4
----- Mittel:				4.15	5.48	0.76	20.4

- [a] Meßapparatur: Siemens Flüssigkeitschromatograph S 200, Säulenlänge:  $L = 48.7$  cm, -radius 0.15 cm; Eluens: Ethylacetat, Temp. 25°C. Säulenpackung: Balanced-density-Technik nach W.Strubert [23];
- [b] Messung mit Meßzylinder und Stoppuhr;
- [c] Tetrachlorethylen als Inertsubstanz, UV-Detektor 254 nm;
- [d]  $K_F = (F/\Delta p) \cdot \eta \cdot L / (\pi R^2)$  (Gl. 22),  $\eta$ (Ethylacetat, 25°C) = 0.441 cP [24];
- [e]  $K = \eta L^2 / (\Delta p \cdot t_o)$  (Gl. 21);
- [f]  $\epsilon_T = K_p / K$  (Gl. 21a);
- [g]  $d_{pd} = \sqrt{1000 K_F}$  (Gl. 23a).

Permeabilität von präparativen Säulen mit Durchmesser 2.4 (Typ B) und 4 cm (Typ C); Meßergebnisse. - Die Messungen erfolgten mit Adsorbens, das derselben Charge entstammte, die für die oben beschriebene analytische Säule verwendet wurde. Die Druck-Durchfluß- bzw.  $t_0$ -Kurven waren im Meßbereich (bis 10 bar) streng linear, sowohl für die B- als auch für die C-Säule<sup>1)</sup>.

Als Meßapparatur wurde unsere in Abschnitt 3.1 vorgestellte Apparatur verwendet. Um den Einfluß des Dämpfers so gering wie möglich zu halten, wurde zwischen Dämpfer und Manometer als Widerstand eine Stahlkapillare geschaltet, so daß der Eluentsstrom bereits ohne Säule praktisch pulsationsfrei war; d. h. Trennsäule und Eluenserzeugung waren dynamisch entkoppelt. Das Manometer war ein offenes Rohrfedergerät der Fa. Haenni, Typ DRF 160/111.111, 0-25 bar, Güteklasse 0.6<sup>2)</sup>.

Leitungen, Stopfen und Detektor besitzen im Bereich  $F \sim 40$  ml/min erhebliche Druckwiderstände, für die unbedingt korrigiert werden muß. Es wurden daher vor und nach jeder Messung die Stopfen aus der Säule herausgenommen, in ein leeres kurzes KPG gesteckt, und der Druckabfall gemessen.

Typische Druck-Durchfluß-Kurven sind in Abb. 22, die Meßergebnisse in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

Die Auswertung erfolgte nach Gl. 35a-c und Gl. 38a,b. Wie an diesen Gleichungen leicht abzulesen, ist von großem Einfluß der Geometriefaktor G. Zu diesem tragen die engen Endrohre sowie die konischen Teile der Säulen erheblich bei. Um den Beitrag klar hervortreten zu lassen, sei als Beispiel die explizite Berechnung des  $K_F$ -Wertes der C-Säule angegeben, deren Meßwerte in Abb. 22 dargestellt sind:

$$K_F = \frac{F'}{\Delta P} \cdot \frac{\eta}{\pi} \left( \frac{L_{E1} + L_{E2}}{R_E^2} + \frac{L_{K1} + L_{K2}}{R_E R_W} + \frac{L_W}{R_W^2} \right) \quad \text{Gl. 35}$$

$$K_F = \frac{37.4}{60 \cdot 8.975 \cdot 10^6} \cdot \frac{0.444 \cdot 10^{-2}}{\pi} \left( \frac{0.7+0.8}{0.5^2} + \frac{2.8+2.4}{0.5 \cdot 1.97} + \frac{39.2}{1.97^2} \right) \text{ cm}^2$$

$$K_F = 9.816 \cdot 10^{-11} \cdot (6.00 + 5.28 + 10.10) \text{ cm}^2$$

$$K_F = 2.10 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2$$

1) Genaue Maße dieser Säulen sind in Abb. 15 angegeben.

2) Die Güteklasse entspricht dem maximalen prozentualen Meßfehler, hier 0.6 % bzw. 0.15 bar.



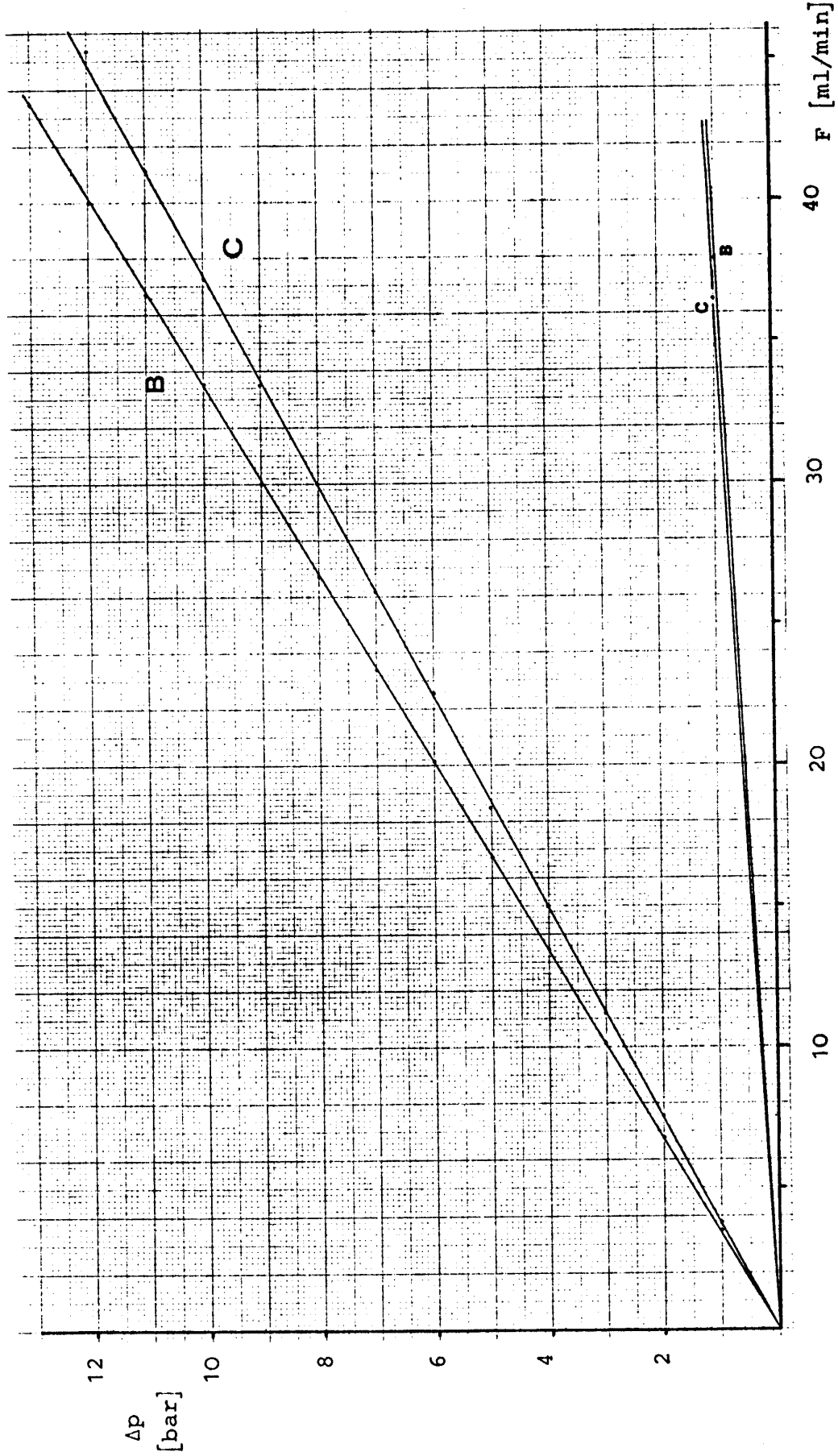


Abb. 22 Druck-Durchfluß-Messungen für präparative Säulen Typ B und C, gefüllt mit Kieselgel Merck LiChroprep 15-25  $\mu$ ; untere Kurven: Druckabfall von Leitungen und Stopfen.

Tabelle 2 Permeabilität  $K$ ,  $K_F$  von präparativen Säulen vom Durchmesser 2.4 (Typ B) und 4 cm (Typ C); Meßmethode und Auswertung s. Text; Eluens: Ethylacetat.

Typ	Nr.	F [cm <sup>3</sup> /min]	t <sub>O</sub> [min]	Δp [bar]	Δp <sub>kor</sub> [bar]	G [cm <sup>1</sup> ]	V <sub>S</sub> [cm <sup>3</sup> ]	V <sub>O</sub> [cm <sup>3</sup> ]	K <sub>F</sub> ·10 <sup>9</sup> [cm <sup>2</sup> ]	K·10 <sup>9</sup> [cm <sup>2</sup> ]	ε <sub>T</sub> (V <sub>O</sub> /V <sub>S</sub> )
B	1	8.87 12.75 26.05	9.64 4.82 3.25	3.0 6.0 9.0	2.70 5.41 8.13	28.31	120.3	85.5 85.6 84.7	2.18 2.18 2.13	3.07 3.06 3.02	0.71 0.71 0.70
B	2	9.35 18.50 27.55	9.01 4.53 3.03	3.0 6.0 9.0	2.70 5.41 8.13	27.89	118.0	84.2 83.8 83.5	2.27 2.25 2.23	3.18 3.16 3.15	0.71 0.71 0.71
B	3	8.30 16.45 24.55	10.37 5.20 3.48	3.0 6.0 9.0	2.74 5.49 8.23	29.48	121.0	86.1 85.6 85.4	2.13 2.11 2.09	2.99 2.98 2.97	0.71 0.71 0.71
B	4	8.08 16.25 24.15	10.42 5.17 3.49	3.0 6.0 9.0	2.75 5.50 8.26	29.82	120.5	84.2 84.0 84.3	2.06 2.08 2.06	2.95 2.98 2.94	0.70 0.70 0.70
B	5	8.55 17.00 25.90	9.80 4.84 3.23	3.0 6.0 9.0	2.83 5.66 8.48	29.58	121.0	83.8 82.3 83.7	2.11 2.10 2.13	3.05 3.08 3.08	0.69 0.68 0.69
B	6	7.95 15.78 23.60	10.52 5.34 3.57	3.0 6.0 9.0	2.75 5.50 8.25	31.28	120.6	83.6 84.3 84.3	2.13 2.12 2.11	3.08 3.03 3.02	0.69 0.70 0.70
B	7	8.25 16.50 24.40	10.22 5.12 3.45	3.0 6.0 9.0	2.73 5.45 8.19	29.59	118.5	84.3 84.5 84.2	2.12 2.12 2.08	2.97 2.97 2.93	0.71 0.71 0.71
-----											
Mittel:											
2.13 3.03 0.70											
±0.06 ±0.07 ±0.01											
-----											

C	1	10.58	33.39	3.0	2.74	22.87	513.9	353.3	2.10	3.06	0.69	
		21.15	16.95	6.0	5.47			358.5	2.10	3.01	0.70	
		31.83	11.04	9.0	8.21			351.4	2.11	3.08	0.68	
C	2	11.50	30.08	3.0	2.69	21.38	507.0	345.9	2.16	3.16	0.68	
		22.50	15.36	6.0	5.38			345.6	2.10	3.09	0.68	
		33.50	10.31	9.0	8.26			345.4	2.04	3.00	0.68	
Mittel:												
										2.10	3.07	0.69

Wie man sieht, stammt ca. die Hälfte des Gesamtdruckabfalls von den - verhältnismäßig kurzen - engen und konischen Teilen der Säule. Hierdurch kommt über G eine gewisse Ungenauigkeit in die Meßwerte hinein: die exakte Festlegung der Maße dieser Teile ist wegen unvermeidbarer Unvollkommenheit der Glasbearbeitung nicht möglich. Der Fehler dürfte bei ca. 5 % liegen. Die obige Rechnung zeigt auch, daß eine Nichtberücksichtigung dieser Säulenanteile, d. h. die Approximation eines Zylinders, zu groben Fehlern führen muß.

Druckwiderstand von präparativen Säulen, Diskussion. - K und  $K_F$  charakterisieren die Permeabilität (Durchlässigkeit) von Trennsäulen unter Abstraktion bzw. Normierung der Säulengeometrie, nicht aber der Teilchengröße. Da nun in der Regel verschiedene Autoren verschiedene Teilchengrößen verwenden, können die Resultate nicht verglichen werden. Auch wären anstelle von K,  $K_F$  Maße erwünscht, die mit dem Druckwiderstand zunehmen, nicht wie K,  $K_F$  abnehmen. Die schottische Schule um Knox, Edinburgh, hat aufgrund folgender Überlegungen die günstigen Größen "Resistenz"  $\phi$  und  $\phi_F$  vorgeschlagen [3c].

Es wurde bereits erwähnt, vgl. Gl. 23a,b, daß die Permeabilität nach empirischen Daten dem Quadrat des Teilchendurchmessers  $d_p$  proportional ist. Das Inverse des Proportionalitätsfaktors stellt bereits die gesuchte Größe dar:

$$K = \frac{1}{\phi} d_p^2 \quad \text{bzw.} \quad K_F = \frac{1}{\phi_F} d_p^2 \quad \text{Gl. 41a,b}$$

$\phi$  und  $\phi_F$  werden als "Resistenz" bezeichnet und werden explizit berechnet zu:

$$\phi = d_p^2/K \quad \text{bzw.} \quad \phi_F = d_p^2/K_F \quad \text{Gl. 42a,b}$$

Wegen  $K_F = \epsilon_T K$  folgt

$$\phi = \epsilon_T \phi_F \quad \text{Gl. 43}$$

$\phi$  und  $\phi_F$  stellen also bezüglich Säulengeometrie und Teilchendurchmesser normierte sowie mit dem Druckwiderstand zunehmende Maße dar.

Die früher angegebenen Gl. 23a,b sind somit Spezialfälle von Gl. 41b:

$$K_F = \frac{1}{1000} d_P^2 \quad (\text{Naßpackung}) \quad \text{Gl. 23a}$$

$$K_F = \frac{1}{2000} d_P^2 \quad (\text{Trockenpackung}) \quad \text{Gl. 23b}$$

Der Sachverhalt läßt sich damit reformulieren: Die Resistenz  $\phi_F$  von analytischen Säulen (3-6 mm Innendurchmesser) beträgt  $\phi_F=1000$  bei Naßpackung,  $\phi_F=2000$  bei Trockenpackung.

Unsere Resultate lassen sich nunmehr bequem diskutieren und mit denen anderer Autoren vergleichen. Leider liegen die Dinge hier etwas im argen: In den ohnehin nur wenigen Arbeiten sind die benötigten Kennzahlen oft nicht einmal angegeben. Die verwertbaren Literaturdaten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Nach Tabelle 3 besitzen die präparativen Säulen einen erheblich größeren Druckwiderstand als die analytische Säule, d. h. der Druckwiderstand nimmt mit dem Durchmesser zu<sup>1)</sup>. Wenn man von dem sehr speziellen Fall der Godbille-Devaux-Säule absieht, stimmt dieses Resultat mit den Ergebnissen anderer Autoren (vgl. Tabelle 4) überein. Dieses, sowie die ausgezeichnete Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse dürfte triviale Ursachen, wie Verstopfung der Säulen durch feine Anteile<sup>2)</sup>, ausschließen.

Als naheliegende Erklärung bieten sich Wandeffekte an. Es wurde bereits erwähnt, daß nach Arbeiten von Knox und Mitarbeitern [17] die Wandregion eine ca. 30 Teilchendurchmesser starke Schicht mit

---

1) Für unsere Säulen muß diese Aussage noch überprüft werden, denn es wurde mit verschiedenen Packverfahren gearbeitet. Wir sind dabei, eine Serie von Säulen mit Durchmessern 3, 10 und 16 mm mittels unseres Sedimentationsverfahrens zu packen und zu testen.

2) Eine kompetente Untersuchung dieses Punktes wurde kürzlich publiziert [28].

lockerer Packung und daher schlechten chromatographischen Eigenschaften darstellt. Um diesen Punkt zu beleuchten, haben wir den prozentualen Anteil der Wandregion bezüglich der Säulenquerschnittsfläche ( $\%A_w$ ) berechnet und in die Tabellen 3 und 4 eingetragen:

$$\%A_w = 6000 \frac{d_p}{R} \quad \text{Gl. 44}$$

Diese Beziehung wurde folgendermaßen abgeleitet: Die Querschnittsfläche der Säule beträgt  $\pi R^2$ , die Dicke der Wandregion  $30 d_p$ , was einer Querschnittsfläche  $\pi R^2 - \pi (R - 30 d_p)^2$  entspricht. Der prozentuale Anteil zur Gesamtquerschnittsfläche ist damit

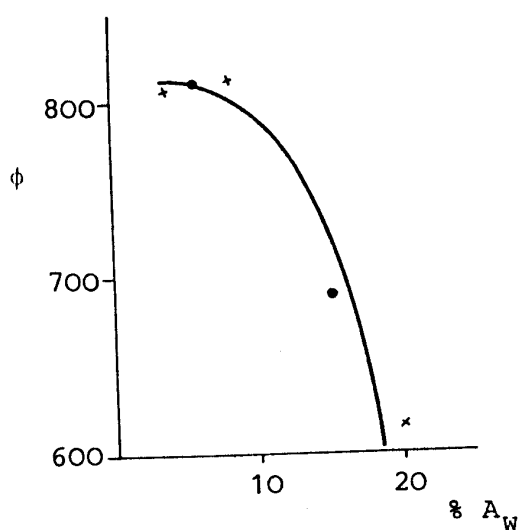
$$\%A_w = \frac{\pi R^2 - \pi (R - 30 d_p)^2}{\pi R^2} 100.$$

Triviale algebraische Manipulationen ergeben

$$\%A_w = 6000 \frac{d_p}{R} - 90000 \left(\frac{d_p}{R}\right)^2 \quad \text{Gl. 45}$$

Da die Berechnung nur für den Bereich  $d_p \ll R$  sinnvoll ist, wird der quadratische Term vernachlässigt.

Der Vergleich von  $\%A_w$ - und  $\phi$ -Werten läßt eine gewisse Korrelation erkennen. So scheinen unsere und Wehrli's Daten zu belegen, daß die Resistenz  $\phi$  unterhalb ca.  $10 \% A_w$  vom Durchmesser unabhängig ist, was mit der Wandeffekt-Hypothese im Einklang stehen würde. Hiermit nicht vereinbar sind die Werte von Beck und Halasz,



obwohl das Packverfahren dieser Autoren dem von Wehrli sehr ähnlich ist. Das Rätsel löst sich bei Inspektion der Beck-Halasz-Arbeit schnell: Die Säule vom Durchmesser 21.6 mm besitzt konische Enden, der K-Wert wurde jedoch unter Annahme eines Zylinders berechnet. Dieses führt über den G-Faktor (vgl. S. 60) zu einem um 50 % zu hohen K-Wert! Die von uns nach Gl. 38b berechneten Werte sind in Tabelle 4 (in Klammern) ebenfalls eingetragen. Die korri-

gierten Werte stimmen ausgezeichnet mit denen von Wehrli überein.

Tabelle 3 Mittelwerte aus Tabelle 2 für  $K$ ,  $K_F$  und andere den Druckwiderstand charakterisierende Größen ( $\phi$ ,  $\phi_F$ ,  $\%A_W$  s. Text)

Durchmesser [mm]	$\%A_W$	$K_F \cdot 10^9$ [cm <sup>2</sup> ]	$K \cdot 10^9$ [cm <sup>2</sup> ]	$\epsilon_T$	$\phi_F$	$\phi$
3	82	4.15	5.48	0.76	1000[a]	760[a]
24	10	2.10	3.03	0.70	1980	1370
39.5	6	2.13	3.07	0.69	1950	1355

[a] Per definitionem festgelegte Werte

Tabelle 4 Literaturübersicht: Resistenz  $\phi$  von Trennsäulen in Abhängigkeit von Säulendurchmesser 2R und Packmethoden

$d_p$ [ $\mu$ ]	2R [mm]	$\%A_W$	$K \cdot 10^9$ [cm <sup>2</sup> ]	$\phi$	Adsorbens	Pack- methode	Lit.
35-75	2.1	"310"	17.9	1690[a]	sphärisches poröses Kieselgel	trocken <sup>[b]</sup> (Standard)	De Stefano Beachell 1972 [25]
35-75	10.9	60	13.8	2192[a]			
5	3.0	20	0.405	617	Kieselgel	naß	Wehrli
5	7.4	8	0.308	812	Merckosorb	(Standard)	1975 [26]
5	17.3	3.5	0.310	806	Si 100		
10	18.0	6.5	1.3	769	Kieselgel LiChrosorb Si 60	naß (speziell)	Godbille, Devaux 1976 [14b]
10	4.0	15	1.45	690	Kieselgel	naß	Beck,
10	21.6	5.5	0.851 (1.23)[c]	1157 (813)[c]	LiChrosorb Si 100	(Standard)	Halasz 1978 [27]

[a] Hier unter der Annahme  $d_p=55\mu$  berechnet.

[b] Die Standard-Trockenpacktechnik: Einfüllen von kleinen Portionen gefolgt von leichtem Aufstampfen, s. [3] oder [6].

[c] Korrigierte Werte für die darüberstehende Eintragung.

Zur Verdeutlichung sind die korrigierten Halasz-Beck-( $\cdot$ ) sowie Wehrli-Daten( $x$ ) für  $\phi$  gegen die  $\%A_W$ -Werte vorstehend graphisch dargestellt. Alle anderen Daten, unsere eingeschlossen, können für die graphische Darstellung nicht verwertet werden, da vollkommen andere Packverfahren angewendet wurden.

Natürlich sind mit diesem Resultat die Wandeffekte nicht bewiesen. Die Hypothese gewinnt aber an Überzeugungskraft, wenn man bedenkt, daß die oben der  $\%A_W$ -Berechnung zugrunde gelegten Annahmen von Knox und Mitarbeitern aus Messungen von Bodenzahlen - eine Größe die mit dem Druckwiderstand primär nicht verwandt ist - gewonnen wurden. Möglicherweise gibt es eine bessere Hypothese. Eine eingehende Diskussion ist jedoch aufgrund der sehr mageren und "inhomogenen" experimentellen Unterlagen nicht möglich. Der gesamte Fragenkomplex "Resistenz-Durchmesser" bedarf dringend einer gründlichen und kompetenten Untersuchung (vgl. Fußnote 1 auf S. 65).

Einige in der Literatur verzeichnete Beobachtungen sowie weitere Besonderheiten der in den Tabellen 3 und 4 enthaltenen Daten verdienen einen Kommentar:

- Nach unseren sowie den Ergebnissen in [25], [26] und [14b] sind die  $\phi$ - bzw. K-Werte vom Druck bzw. von der Durchflußgeschwindigkeit unabhängige Größen. Im Gegensatz hierzu und offenbar der gesamten Literatur über analytische Säulen (3-6 mm Durchmesser) stehen Ergebnisse von Beck und Halasz [27]. Es wurden Säulen mit 4, 21.6 und 44 mm Durchmesser untersucht. Die beiden größeren Säulen besaßen konische Enden. Mit Adsorbentien vom Korndurchmesser 10-15 oder 35-50 $\mu$  zeigten beide stark durchfluß- bzw. druckabhängige K-Werte<sup>1)</sup>. Ein solcher Effekt ist natürlich unerwünscht. Unserer Meinung nach handelt es sich um einen auf fehlerhafter Säulenkonstruktion beruhenden Artefakt: Die konischen Teile wurden bis zu einem Radius  $R_E=0.5$  mm (vgl. Abb. 21)

---

1) Es wurde bereits erwähnt, daß die K-Werte an dieser Arbeit falsch berechnet wurden; bei der 21.6 mm-Säule sind sie um 50 %, bei der 44 mm-Säule um 100 % zu hoch.



verjüngt. Deshalb treten an Säulenein- und -ausgang extreme Lineargeschwindigkeiten, eventuell Turbulenzen auf. Eine triviale Erklärung wäre Verstopfung des Säulenausgangs durch Absinken des Säulenbetts, denn es wurde stets eine Zunahme des Druckwiderstandes mit steigendem Durchfluß gefunden. Diese Erklärung kann aber wohl ausgeschlossen werden, da etwas so Triviales bei Spezialisten nicht vorkommen dürfte.

- Einen ungewöhnlich niedrigen Druckwiderstand besitzt die Säule von Godbille und Devaux. Es wurde ein originelles neues Verfahren angewendet, bei dem eine sehr rasche Packung des Bettes resultiert. Offenbar ist es deshalb sehr locker und möglicherweise (vgl. S. 34) nicht stabil.
- Unsere präparativen Säulen besitzen einen hohen Druckwiderstand. Interessanterweise stimmt der  $K$ - bzw.  $\phi$ -Wert ziemlich genau mit dem für Trockenpackung typischen überein. Dieses deutet auf ein sehr dicht gepacktes Bett ohne Teilchenagglomeration hin [29]. Mit dieser Vermutung stimmen weitere Daten überein: die verhältnismäßig niedrige Porosität  $\epsilon_T$ , extreme Trenngüte und sehr hohe Lebensdauer der Säulen (s. u.).

Leider erweisen sich wegen des hohen  $K$ -wertes unsere Säulendimensionen als nicht optimal (vgl. Abschnitt 2.2). Sie wurden zwar für die jetzt verwendete Kieselgel-Sorte konzipiert, unsere Messungen der Permeabilität und der Bodenzahl zeigen aber eindeutig, daß die Kornverteilung im Verlaufe von ca. 1.5 Jahren vom Hersteller zugunsten feinerer Anteile verändert wurde. Aus diesem Grunde sollten die C-Säulen um ca. 25 % verkürzt werden. Man kann das leicht aufgrund folgender Überlegungen einsehen.

Gl. 32 gibt den Zeitbedarf  $t_R$  ( $k'=10$ ) eines chromatographischen Laufs als Funktion der Säulenlänge  $L$ , des Teilchendurchmessers  $d_p$  und des Druckabfalls  $\Delta p$  an.  $t_R$  ( $\Delta p$ )-Kurven wurden unter der Annahme  $L = 40$  cm ( $\sim C$ -Säule) und eines Standard- $K_F$ -wertes für analytische Säulen ( $\phi=1000$ ), Gl. 32a, berechnet und sind in Abb. 10 dargestellt. Wir können diese Werte für die präparati-

ven Säulen beibehalten, müssen aber eine "effektive" Teilchengröße aufgrund des tatsächlichen  $K_F$ -wertes (Tabelle 3) nach Gl. 23a bzw. 41b ( $\phi_F=1000$ ) berechnen:

$$K_F = \frac{1}{\phi} \cdot d_p^2; \quad \text{Gl. 41b}$$

mit  $K_F=2.115 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2$  (Tabelle 3, Mittelwert der B- und C-Säule) sowie  $\phi_F=1000$  folgt

$$d_p = \sqrt{1000 \cdot 2.115 \cdot 10^{-9}} \text{ cm} = 14.5 \mu.$$

Um es nochmals mit anderen Worten zu sagen: unsere präparativen Säulen verhalten sich bezüglich des Druckwiderstands wie naß gepackte analytische Säulen aus Teilchen der Korngröße  $d_p=14.5\mu$ . Wie man Abb. 10 mit etwas Imagination entnimmt, liegt der Arbeitsbereich ( $\Delta p=10-15$  bar) für diese Korngröße bereits etwas weit im ansteigenden, ungünstigen Ast der  $t_R(\Delta p)$ -Kurve. Wie auf S. 30 ausgeführt wurde, läßt sich eine Adjustierung über die Säulenlänge leicht durchführen, da nach Gl. 32

$$t_R \sim \left(\frac{L}{d_p}\right)^2 \quad \text{gilt und deshalb im Falle} \quad \frac{L_1}{d_{p1}} = \frac{L_2}{d_{p2}}$$

für zwei Säulen (No.1 und 2), diese dieselbe  $t_R(\Delta p)$ -Kurve besitzen - Gleichheit anderer Parameter ist natürlich vorausgesetzt.

Als Lehre muß gezogen werden: Man kann sich nicht über einen längeren Zeitraum auf Konstanz der Eigenschaften von Handelsprodukten verlassen. Die Permeabilität sollte deshalb gelegentlich gemessen werden<sup>1)</sup>. Derartige Messungen sind also durchaus keine Spielerei, wie es manchem Organiker-Kollegen vielleicht vorkommen mag.

---

1) Etwa "gleichaltrige" 1 kg-Chargen zeigten keinen Unterschied. Das nötige Know-how vorausgesetzt, benötigt man für eine saubere Messung samt Auswertung ca. einen halben Tag.

#### 4.2 Effizienz: Peakform, van Deemter-Kurven

Wie in Abschnitt 1.1 ausführlich dargelegt wurde, beurteilt man die Leistungsfähigkeit einer Trennsäule durch die van Deemter-Kurve, d. h. die Funktion  $H(u)$ :

$$H = A + B/u + Cu \quad \text{Gl. 8}$$

Die Aufnahme der Kurve erfordert die Messung der Lineargeschwindigkeit  $u$ , was im allgemeinen über die Retentionszeit des Inertpeaks nach Gl. 13 (vgl. S. 10 f) erfolgt, sowie der zugehörigen Bodenhöhen  $H$  nach

$$H = L/N \quad \text{Gl. 5 (S. 6) und} \quad N = 5.54 (t_R/b_{1/2})^2 \quad \text{Gl. 3}$$

Zur Messung von  $N$  vgl. S. 5 sowie speziell Abb. 2 auf S. 4.

Die durch solche Messungen zu erhaltenen Zahlen sind nur bedingt objektiv. Man sollte folgende Punkte beachten:

- a. Die chromatographischen Kennzahlen bilden nur dann eine signifikante Bewertungsgrundlage, wenn symmetrische Peaks mit annähernd Gauß-Kurvenform vorliegen. Eine grobe Charakterisierung gibt der Symmetrieindex  $SI$  (vgl. Gl. 1, S. 5). Besser ist die Abbildung eines stark vergrößerten Peaks.
- b. Es besteht eine gewisse Neigung, zur Charakterisierung eine besonders gute Säule heranzuziehen, vgl. S. 34. Um diese Verfälschung auszuschließen, sollte eine Statistik über die Testergebnisse angefertigt werden (Bodenzahl unter Standard-Testbedingungen, vgl. S. 50, Symmetrieindex).
- c. Die Charakterisierung der Säulen muß unter den für das präparative Arbeiten typischen Bedingungen vorgenommen werden. Diese sind in vielen Punkten denen beim analytischen Arbeiten gleich. Es gibt aber einen sehr wichtigen Unterschied: die Substanzaufgabe. In der Analytik ist neben hoher Bodenzahl vor allem

Empfindlichkeit wichtig. Beides kann durch Ausnutzung des sog. Infinite-diameter-Effekts gesteigert werden (vgl. S. 25). Man erzeugt diesen Effekt, indem man die Substanz mittels eines speziellen Aufgabesystems punktförmig in die Säulenachse appliziert. Gewisse geometrische Bedingungen vorausgesetzt (vgl. S. 25), wandert sie dann in einer schmalen Zone, ohne die Säulenwand zu erreichen. Hierdurch wird einerseits eine hohe Konzentration im Eluat erreicht (Nachweisempfindlichkeit), andererseits die Effizienz maximiert, da radiale Inhomogenität der Säulenpackung, die in der Nähe der Wand besonders groß ist, sich minimal auswirkt.

Für das präparative Arbeiten ist eine hohe Bodenzahl ebenfalls sehr erwünscht, hohe Nachweisempfindlichkeit aber unwichtig. Wichtig dagegen ist hoher Durchsatz, was sich nur bei Ausnutzung des gesamten Säulenquerschnitts erreichen läßt. Das Aufgabesystem muß dieses gewährleisten. Unter Infinite-diameter-Bedingungen gewonnene Kenngrößen sind unsignifikant, schlimmer, sie sind irreführend.

Der Nachweis des Nichtvorliegens eines Infinite-diameter-Effekts ist bei Glassäulen sehr einfach: man konditioniert die Säule mit Chloroform, wodurch die Kieselgelpackung durchsichtig wird und appliziert einen Farbstoff. Bei Stahlsäulen verrät sich der Infinite-diameter-Effekt durch einen besonders kleinen  $B_0$ -Wert der Beladungskurve (vgl. S. 18).

d. Es wurde schon erwähnt, daß die Bodenzahl bzw. -höhe nur näherungsweise substanzunabhängig ist. Sieht man von speziellen Effekten ab, z. B. Salzbildung bei Aminen, gilt die Regel: sehr früh eluierte Substanzen  $k' < 0.5$  spiegeln die Eigenschaften der Apparatur und der Säulenpackung, spät eluierte die Eigenschaften des Adsorbens wieder<sup>1)</sup>. Für Testzwecke wird daher

---

1) Offenbar hat sich bisher keiner der Chromatographiespezialisten die Mühe gemacht, Erfahrungen über die Abhängigkeit der Bodenhöhe  $H$  vom Kapazitätsfaktor  $k'$  der Testsubstanz in ausführlicher Form zu publizieren. Man findet nur hier und dort kurze Bemerkungen, z. B. in [3c], S.172, [11] S.265, [9] S.286.

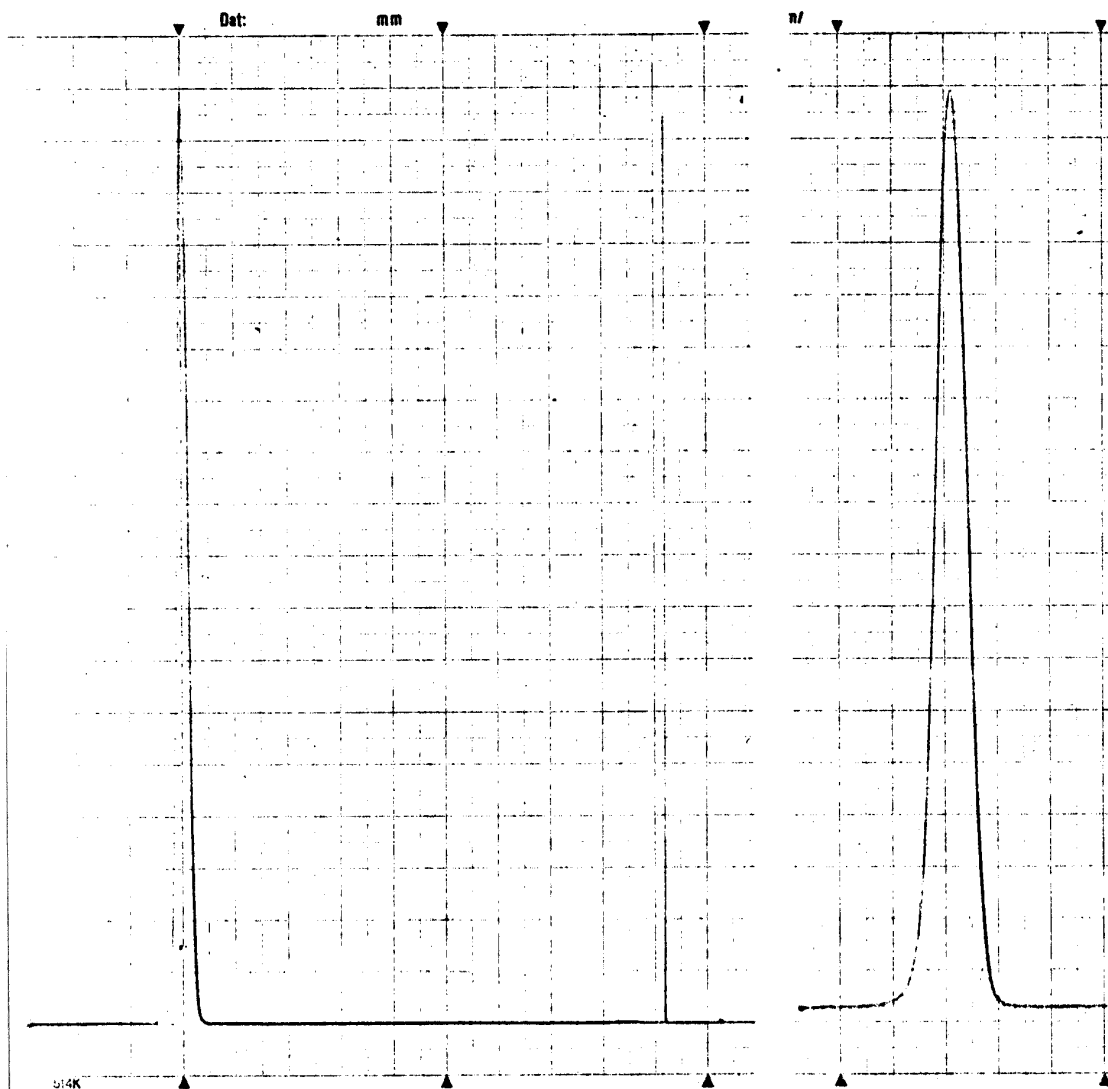


Abb. 23 Zur Charakterisierung der Peakform  
(Säule Typ C; Standard-Testbedingungen (s. S. 50); Nullpunkt der Zeitachse in  
allen Fällen auf der rechten Seite des Peaks) Schreiber-Vorschubgeschwindig-  
keiten:  
a 1 cm/min,    b 3 cm/min,    c 12 cm/min

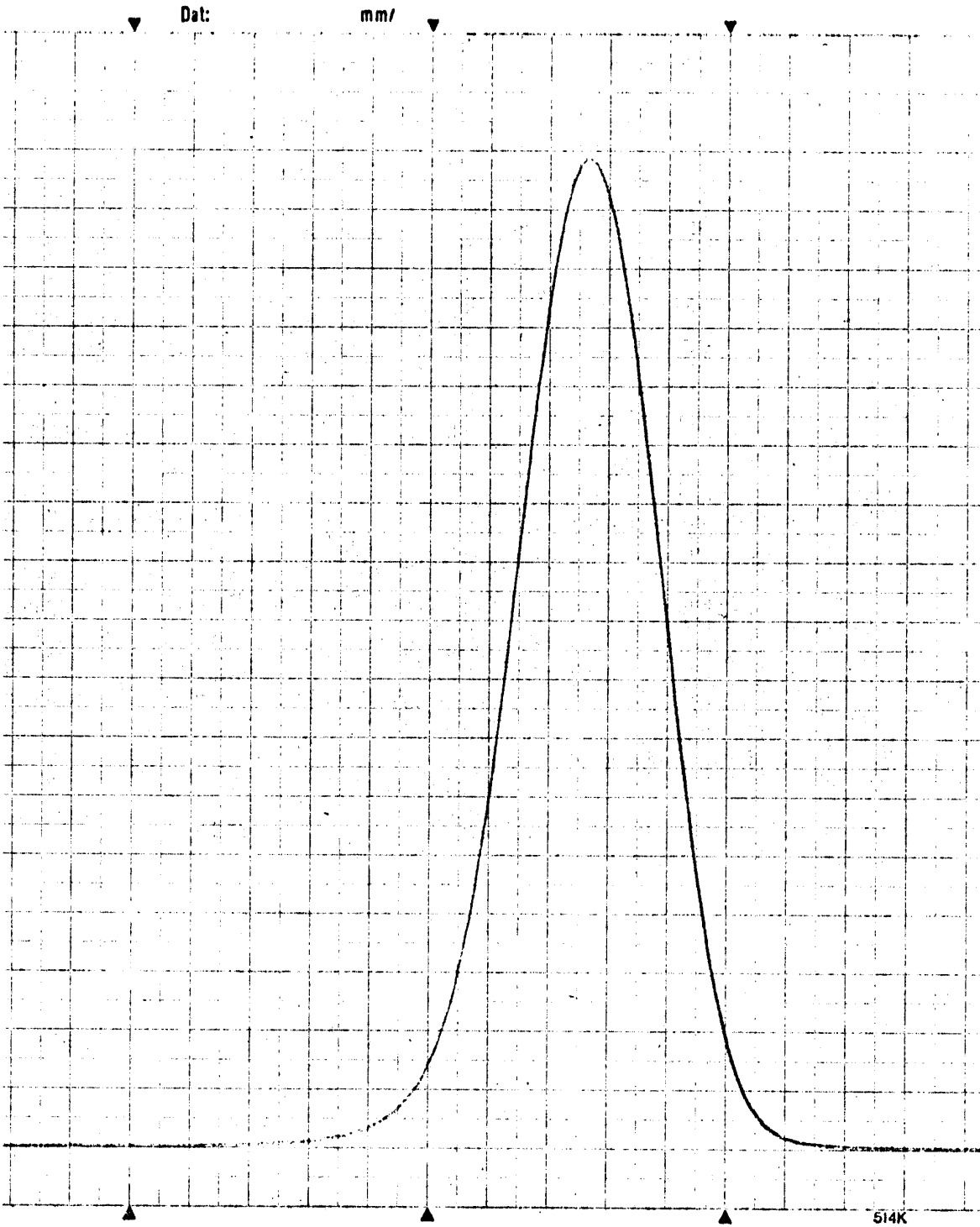


Abb. 23c

frühe Elution gewählt. Typische Systeme sind etwa: Hexan/Acetonitril 99/1, Phenanthren ( $k'=0.2$ ) [29], und n-Heptan, Benzol ( $k' = 0.3$ ) [27]. Unser Testsystem ist Petrolether(tiefs.)/Ethylacetat 95/5, Naphthalin ( $k' = 0.25$ ). Das Multikomponentensystem Petrolether wurde aus Kostengründen gewählt. Der Ethylacetatzusatz dient zur Ausnivellierung des Einflusses von Wasser.

Peakform. - Die Beurteilung der Peakform ist nur möglich, wenn ein Chromatogramm unter starker Dehnung der Zeitachse aufgenommen wird. Zur Demonstration sind in Abb. 23 drei bei verschiedenen Schreiber-Vorschubgeschwindigkeiten registrierte Peaks des Naphthalins (Säule Typ C, Standard-Testbedingungen s. S. 50) abgebildet. Üblich ist die erste Darstellung (Vorschubgeschwindigkeit 1 cm/min). Hieraus kann weder die Bodenzahl hinreichend genau ermittelt, noch die Peakform, speziell die Peaksymmetrie beurteilt werden.

Wie gut die Peakform einer Gauß-Funktion entspricht, läßt sich durch Ausmessen der Peakbreite auf verschiedenen Bruchteilen der maximalen Peakhöhe in sehr einfacher Weise abschätzen. Für eine Gaußkurve gilt<sup>1)</sup>:

$$\frac{b_{0.100}}{b_{0.500}} = 1.83 \qquad \frac{b_{0.135}}{b_{0.607}} = \frac{4\sigma}{2\sigma} = 2 \qquad \text{Gl. 46}$$

$b_n$ : Peakbreite bei der Peakhöhe  $nH_{\max}$  (z. B. ist  $b_{0.5}$  die Peakbreite auf halber Höhe,  $b_{1/2}$  von Abb. 2).

$\sigma$ : Standardabweichung (=Varianz) der Gauß-Funktion; Messung durch  $\sigma = 0.5 b_{0.6066}$  oder  $\sigma = b_{0.5}/\sqrt{5.54}$

Für den in Abb. 23c dargestellten Peak gilt:  $b_{0.100}/b_{0.500} = 1.80$  und  $b_{0.135}/b_{0.607} = 1.96$ . Es werden also in sehr guter Näherung Gauß-Peaks erzeugt<sup>2)</sup>.

1) Eine ausführliche Beschreibung der für die Chromatographie wichtigen Eigenschaften der Gauß-Funktion s. [3c], S.17.

2) Diese Art der Peak-Charakterisierung ist allgemein nicht üblich. Wir haben sie deshalb nur gelegentlich durchgeführt.

Bodenzahl, Symmetrieindex, Reproduzierbarkeit. - Als Standard-Test auf Effizienz wurde für jede Säule die Bodenzahl und der Symmetrieindex (vgl. 3.2.2 D (S.50)) bestimmt. Die Kennzahlen von allen während eines definierten Zeitraumes von uns selbst und einigen Kollegen nach dem in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Verfahren hergestellten Säulen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Man achte auf die Wortwahl des vorstehenden Satzes: nicht in die Liste aufgenommen wurden Säulen, bei deren Herstellung wichtige Punkte der Vorschrift unbeachtet geblieben, d. h. grobe Fehler vorgekommen waren. Z. B. verwendete Ausführer V bei den ersten fünf Säulen nicht entgastes Wasser; W vergaß bei seiner ersten Säule das Einschalten des Dämpfers. Die Reproduzierbarkeit des Verfahrens muß als außergewöhnlich gut bezeichnet werden. Hinzu kommt, daß Ausführende V-X keine Erfahrung mit moderner Flüssigkeitschromatographie besaßen.

Die Bodenzahl N ist nur eine brauchbare Kennzahl, wenn neben der Konstanz der Testbedingungen auch die Konstanz der Säulenlänge L gewährleistet ist. Im vorliegenden Fall stammten alle Säulen aus einer Glasbläserei, in der strikt nach der Norm von Abb. 15 gearbeitet wird. Trotzdem beträgt die Schwankung in L ca.  $\pm 1$  cm, was durch mehr oder weniger tiefes Eindrücken der Stopfen bedingt ist. Wir empfehlen, zukünftig statt der Bodenzahl N die Bodenhöhe H ( $= L/N$ ) als Kenngröße zu verwenden. Dabei muß L die gesamte Länge der Kieselgelschicht, also von Fritte zu Fritte, darstellen.

Lebensdauer. - Es existiert keine allgemein akzeptierte Definition des Begriffes Lebensdauer. Wir wollen darunter den Zeitraum verstehen, in dem die Bodenzahl zu ca. 80 % erhalten bleibt und der Symmetrieindex nicht schlechter als 1.2 ist; es wird dabei vorausgesetzt, daß die Säule unter üblichen Laborbedingungen rege, d. h. mehrmals pro Woche benutzt wird. Wir haben nur einige Stichproben vorgenommen (s. n. S.). Diese Zahlen sowie die allgemeine Erfahrung beim präparativen Arbeiten deuten auf eine Lebensdauer von ca. 1 Jahr. Eine so hohe Lebensdauer ist aber nur zu erreichen, wenn der Säule ein gewisses Minimum an Pflege zuteil wird. Auf folgende Punkte sollte man speziell achten:



Tabelle 5 Statistik über die von verschiedenen Personen nach dem in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Verfahren hergestellten und getesteten Trennsäulen

Säulen- tpy	Ausführender	Nr.	Bodenzahl	Symmetrieindex
			N	SI
B	U	1	6610	1.19
		2	6750	1.02
		3	7300	1.01
		4	5320	1.04
		5	6650	1.01
		6	6630	1.06
		7	6340	1.01
		8	6230	1.03
		9	7360	1.03
		10	6080	1.02
		11	7350	1.07
		12	6650	1.05
		13	7730	1.02
		14	7100	1.04
		B	V	15
1	7500			1.07
2	6850			1.07
3	6300			1.04
4	5000			1.05
5	6600			1.02
B	W	6	5900	1.02
		1	6600	1.05
		2	6900	1.02
Anzahl:		23	Mittel: 6620±650	1.04±0.04
C	U	1	8070	1.08
		2	11590	1.03
C	V	1	12000	1.03
C	W	1	9500	1.01
C	X	1	8500	1.04
		2	10400	1.01
		3	11000	1.02
Anzahl:		7	Mittel: 10150±1510	1.03±0.03

Säule Typ	Datum	N	SI
B	12.2.77	5500	1.11
	4.4.78	5000	
B	25.8.77	6800	1.14
	6.7.78	5940	
B	30.8.77	7200	1.05
	4.4.78	6650	
	6.7.78	3480	

a. Fast jedes Rohprodukt einer chemischen Reaktion enthält hochpolare Verunreinigungen, die mit dem für die durchzuführende Trennung optimalen Lösungsmittel nicht eluiert werden. Der Anteil läßt sich durch ein DC, das einer präparativen Trennung ohnehin immer vorausgehen muß, im allgemeinen leicht abschätzen. Wenn der Anteil hoch ist, sollte die Lösung der Substanz im Eluens durch eine kurze Säule aus grobem Kieselgel filtriert werden. Trotzdem sammeln sich polare Verunreinigungen allmählich an. Man entfernt sie von Zeit zu Zeit, indem man die Säule mit einem relativ polaren Eluens (z. B. Aceton-Methanol 9:1) konditioniert. Eine zur Hälfte schwarzbraun gefärbte Säule, deren Adsorbenskörner eventuell von einer dicken Schicht Fremdschicht umhüllt oder gar zusammengeklebt sind, wird wohl keine sehr hohe Effizienz aufweisen.

b. Während der ersten Wochen nach der Herstellung senkt sich das Kieselgelbett im allgemeinen noch leicht ab, besonders rasch, wenn nicht für gute Dämpfung gesorgt wird. In dem von Kieselgel freien Raum bilden sich offenbar Wirbel, die - vor allem, wenn der freie Raum bereits in den konischen Teil ragt - zu Spaltenbildung im Adsorbensbett und dann irreversiblen Ruin der Säule führen. Um diesen Fall zu vermeiden, ist dafür Sorge zu tragen, daß der obere Stopfen stets fest und lückenlos auf dem Adsorbens sitzt. Man muß ihn, sofern ein Absetzen auftritt, sofort weiter hineindrücken. Ist Anschlag des Stopfenrandes am Glas erreicht, wird etwas Kieselgel nachgefüllt. Vorher sollte allerdings die oberste Schicht (2-4 mm Tiefe) mit einem Spatel sauber herausgekratzt werden (glatte Oberfläche), da sie praktisch immer irreversibel verschmutzt ist.

Beweis des Nicht-Vorliegens eines Infinite-diameter-Effekts; Beladbarkeit. - Wie einleitend ausgeführt wurde, läßt sich das Vorliegen eines Infinite-diameter-Effekts an der zu niedrigen Substanzbeladbarkeit, ausgedrückt durch die lineare Kapazität  $B_0$  (vgl. S. 18), erkennen. Abb. 24 zeigt die Beladungskurve  $H(\log B)$  einer mit Kieselgel  $d_p = 15-25 \mu$  naß gepackten (a) sowie zum Vergleich einer mit Kieselgel  $d_p \sim 70 \mu$  trocken gepackten (b) Säule Typ B [6].  $B_0$  (g Nitrobenzol/g Adsorbens) entspricht dem B-Wert des Knickpunktes der Kurven (vgl. Def. (b), S. 18):

$$B_0 (d_p = 15-25 \mu, \text{ naß gepackt}) = 3.7 \cdot 10^{-4} \text{ g/g}$$
$$B_0 (d_p \sim 70 \mu, \text{ trocken gepackt}) = 2.8 \cdot 10^{-4} \text{ g/g.}$$

Die Werte liegen in dem für Kieselgel der Porenweite  $60 \text{ \AA}$  typischen Bereich  $B_0 = 2-5 \cdot 10^{-4} \text{ g/g}$  [14,20,27]. Sie beweisen, daß ein Infinite-diameter-Effekt nicht vorliegt. Dem geringen Unterschied in den  $B_0$ -Werten der beiden Säulen kommt keine Bedeutung zu, da die Messung von  $H$  im Gebiet  $B > B_0$  nicht sehr genau ist (Peak-Deformation). Der Vergleich der beiden Kurven ist aber in anderer Hinsicht aufschlußreich. Nach der Definition (c) für die lineare Kapazität (vgl. S. 18, Fußnote 1) würde gelten  $B_0 = 6.6 \cdot 10^{-4} \text{ g/g}$  (a) und  $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ g/g}$  (b). Wie man anhand der Abbildung leicht einsieht, wird der große Unterschied der Werte durch den Unterschied in der Lage des minimalen  $H$ -wertes der Kurven verursacht. Der  $B_0$ -Wert nach Definition (c) ist daher eine Funktion der Korngröße und somit unbrauchbar.

Die Kurve b aus Abb. 24 ist [6] entnommen, Kurve a wurde unter gleichen Bedingungen wie b folgendermaßen gemessen. Säule: Typ B, Bodenzahl (Naphthalin, Standard-Test)  $N = 5500$ , Länge der Kieselgel-Schicht  $L = 290 \text{ mm}$ ; für die Beladungskurven: Testsubstanz Nitrobenzol,  $k' = 1.7$ , im Eluens Petrolether(tiefs.)-Ethylacetat 95:5, Durchfluß  $20 \text{ ml/min}$ ; Injektor entsprechend Abb. 14 A. Injiziert wurden Lösungen steigender Konzentration von Nitrobenzol im Eluens, Dosiervolumen  $0.5 \text{ ml}$ . Die Wellenlänge des Detektors wurde so adjustiert, daß die Peakhöhe konstant blieb ( $352-413 \text{ nm}$  bei  $3.125-600 \text{ mg Nitrobenzol}/0.5 \text{ ml Lösung}$ ). Die relativ gute Peakform über den gesamten B-Bereich erlaubte die Bestimmung von  $H$  nach Gl. 2 und Gl. 5.

Der obige Test ist auf Säulen beliebiger Art anwendbar. Für Säulen mit Glasmantel ist er eigentlich unnötig, da hier die

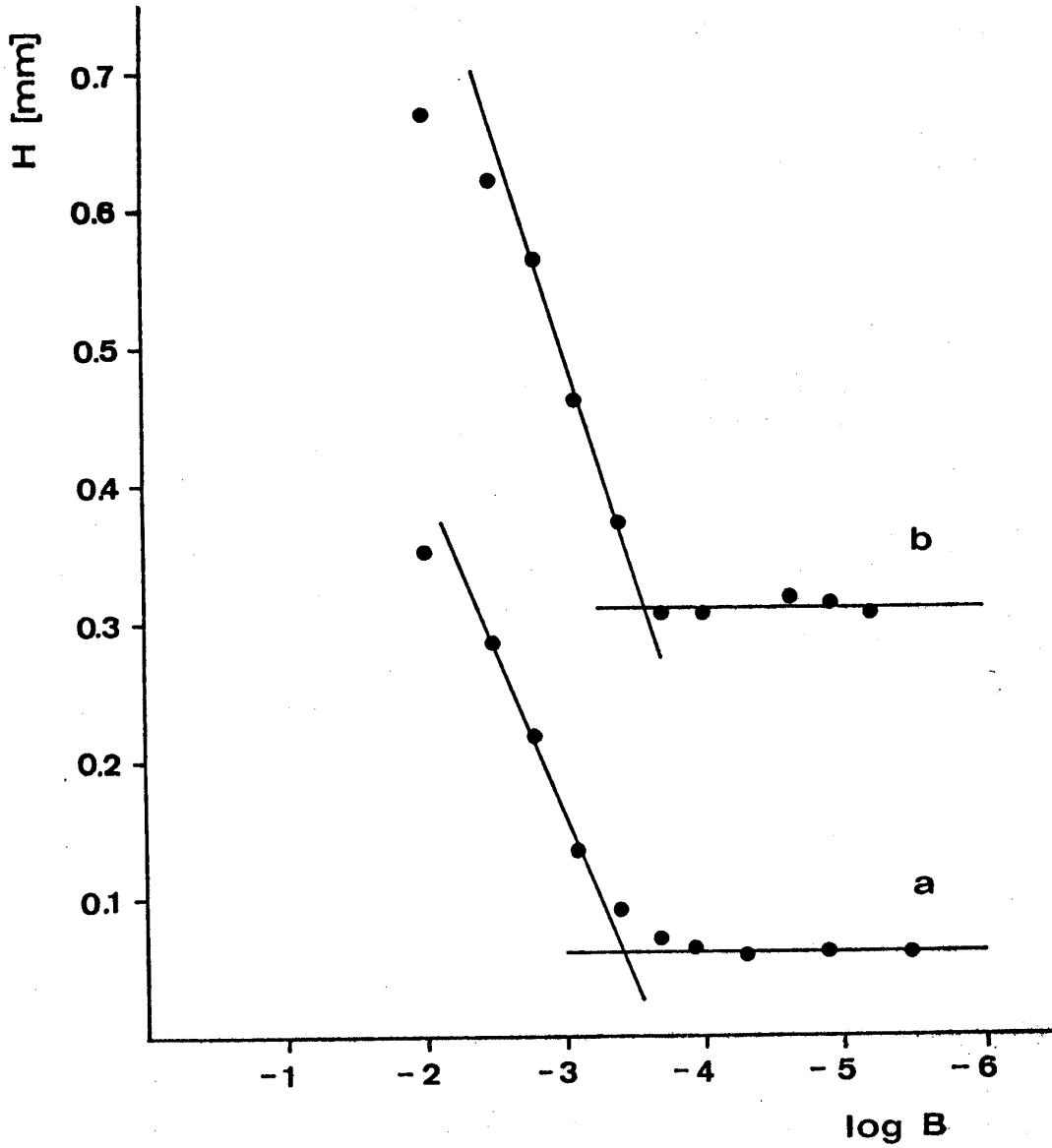


Abb. 24 Beladbarkeit von Säulen Typ B  
B [g Nitrobenzol/g Kieselgel]; Bedingungen s. S. 79  
a naß gepackte Säule,  $d_p = 15-25 \mu$   
b nach [6] trocken gepackte Säule,  $d_p \sim 70 \mu$

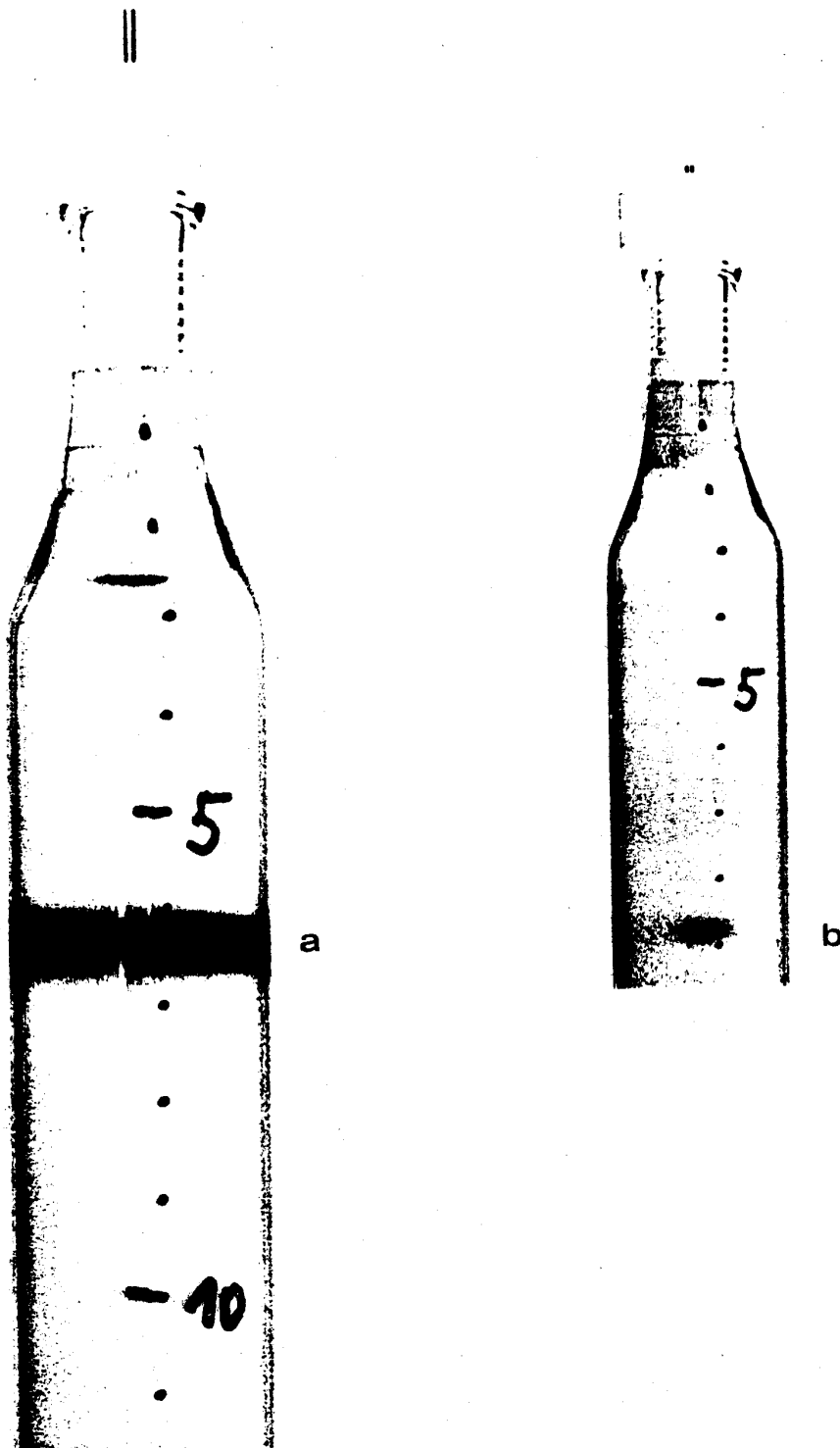


Abb. 25 Substanzzonen  
(Eluens: Chloroform, Testfarbstoff: 4,6,8-Trimethylazulen)  
a übliche Auftragung mit Injektor entsprechend Abb. 14 A  
b speziell erzeugter Infinite-diameter-Effekt (s. Text  
S. 82)

Substanzzonen direkt sichtbar gemacht werden können. Man konditioniert die Säule mit Chloroform, wodurch sie praktisch durchsichtig wird und appliziert die Chloroform-Lösung eines Farbstoffs (4,6,8-Trimethylazulen)<sup>1)</sup>. Als Beispiel ist in Abb.24a der Test für eine Säule Typ B dargestellt. Man beachte die außerordentliche Schärfe der Zone.

Der mit den Feinheiten der modernen Chromatographie weniger vertraute Leser mag sich fragen, wie eine Infinite-diameter-Zone aussieht. Der Effekt kann sehr einfach "erzeugt" werden: Die Säule wird oben mit einem Teflon-Stopfen ohne Fritte (vgl. Abb. 16) ausgerüstet und mit Chloroform konditioniert. Dann entfernt man den Eluens-Zuführungsschlauch, sticht die Kanüle einer mit konzentrierter Farbstoff-Lösung (s. o.) gefüllten 10 µl-GC-Spritze in das Kieselgelbett ein (Spitze ca. 0.5 cm unterhalb des Stopfens) und injiziert ca. 1 µl. Man erhält ein Farbstoff-Kügelchen direkt in der Achse des Adsorbensbettes. Pumpt man nach Anschließen des Teflon-Schlauches Chloroform, so wandert das Farbstoff-Kügelchen ohne signifikante Formänderung entlang der Säulenachse. Abb. 24b zeigt ein Beispiel. Das Experiment ist so verblüffend, daß man es unbedingt durchführen sollte, wenn sich die Gelegenheit ergibt. Am besten gelingt es bei den ersten Versuchen, denn nach mehrfacher Wiederholung ist im allgemeinen das Kieselgel so "zerstoehen", daß man eine schöne Kugel nicht mehr erhält.

---

1) Diese Verbindung ist als Testfarbstoff ungewöhnlich gut geeignet, da sie gleichzeitig einen hohen Extinktionskoeffizienten sowie sehr gute chemische Stabilität besitzt und apolar ist. Wir konnten keine andere farbige Verbindung finden, die diese drei Eigenschaften vereinigt. Nachteilig ist, daß sie nicht im Handel angeboten wird. Die Herstellung nach Organic Syntheses [30] ist aber einfach und sehr gut für das organisch-chemische Praktikum geeignet. Azulen selbst sowie das käufliche Guajazulen fanden wir wenig befriedigend.

Effizienz, van Deemter-Kurven. - Die van Deemter-Kurve<sup>1)</sup> bildet die Grundlage zur Beurteilung der Effizienz einer Trennsäule (vgl. Abschnitt 1.1):

$$H = A + B/u + C \cdot u \quad \text{Gl. 8}$$

Meßmethode. Es wurde mit Naphthalin im Eluens Petrolether (tief)-Ethylacetat 95:5 gearbeitet, wie es für den Standard-Test beschrieben ist (S. 50). Die Lineargeschwindigkeit  $u$  wurde über die Totzeit  $t_0$  (Inertsubstanz: Tetrachlorethylen [3a], S.51; [27]) nach  $u \stackrel{\circ}{=} L/t_0$  (vgl. S. 9 f) bzw. über das Totvolumen  $V_0$  nach Gl. 17-19 bestimmt. Die Messung der Bodenhöhe  $H$  erfolgte über die Bodenzahl  $N$  nach Gl. 2 und 5. Als Säulenlänge  $L$  wurde die gesamte Länge des Bettes, von Stopfen zu Stopfen, angesetzt. Das Eluat wurde ohne Stromteilung (splitting), d. h. total durch die Detektorküvette geleitet (UV, 265 nm). Die Meßresultate sind in Tabelle 6a-c, die zu den Abb. 26a-c korrespondieren, wiedergegeben. Bei der Säule Tab. 6b handelt es sich um eine der ersten von uns hergestellten. Die beiden anderen besaßen ein Alter von ca. 3 Monaten und waren bereits mehrfach für präparative Trennungen eingesetzt worden.

Zur Bestimmung der Konstanten A, B und C wurde die jeweils beste Approximation der Meßpunkte an Gl. 8 durch Probieren ermittelt. Außer A, B und C interessiert die Lage des Minimums  $H_0/u_0$  der van Deemter-Kurve. Man erhält diese Werte in trivialer Weise aus der ersten Ableitung:

$$\frac{dH}{du} = 0 \quad u_0 = \sqrt{B/C} \quad H_0 = A + 2\sqrt{BC} \quad \text{Gl. 48}$$

Alle für die Beurteilung der Effizienz wichtigen Größen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

---

1) Neuerdings setzt sich als Alternative die sog. Knox-Gleichung (Gl. 47) mehr und mehr durch [9]. Der Vorteil dieser Gleichung beruht auf der Verwendung der reduzierten Bodenhöhe  $h$  und der reduzierten Geschwindigkeit  $v$  als Variablen. Diese Größen sind bezüglich der Korngröße und des Diffusionskoeffizienten normiert, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Säulen-Typen bzw. Testbedingungen erreicht wird. Nachteilig für die Auswertung ist, daß ein großer Bereich der Geschwindigkeit  $u$  erforderlich ist. Aus diesem Grund kam Gl. 47 in dieser Arbeit nicht zur Anwendung.

$$h = A v^{0.33} + B/v + Cv; \quad h = H/d_p; \quad v = ud_p/D_m \quad \text{Gl. 47}$$

(Zur Bedeutung der Symbole s. S. 8).

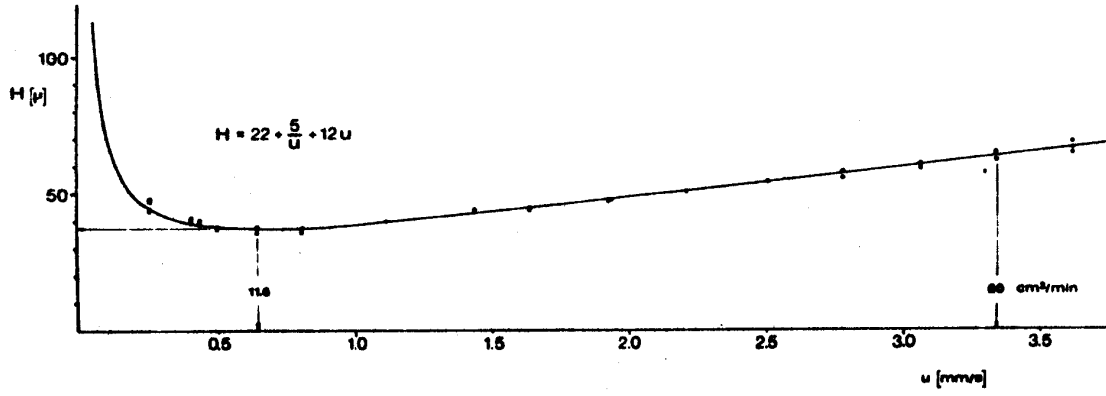


Abb. 26a

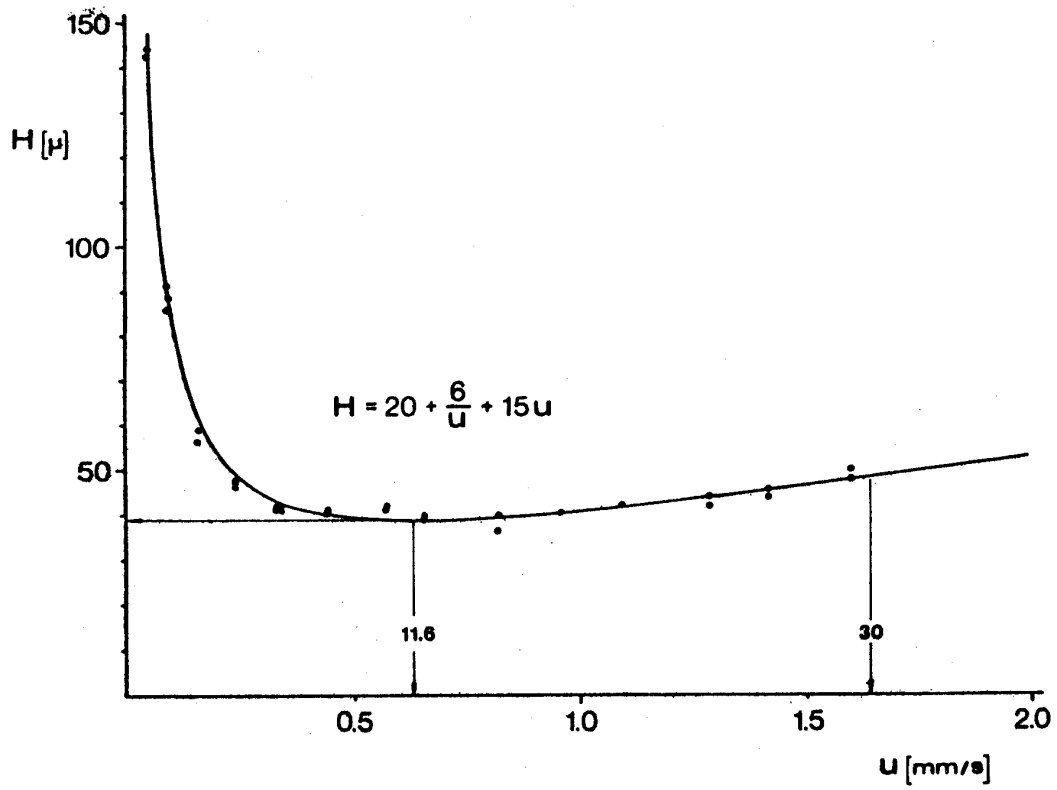


Abb. 26b



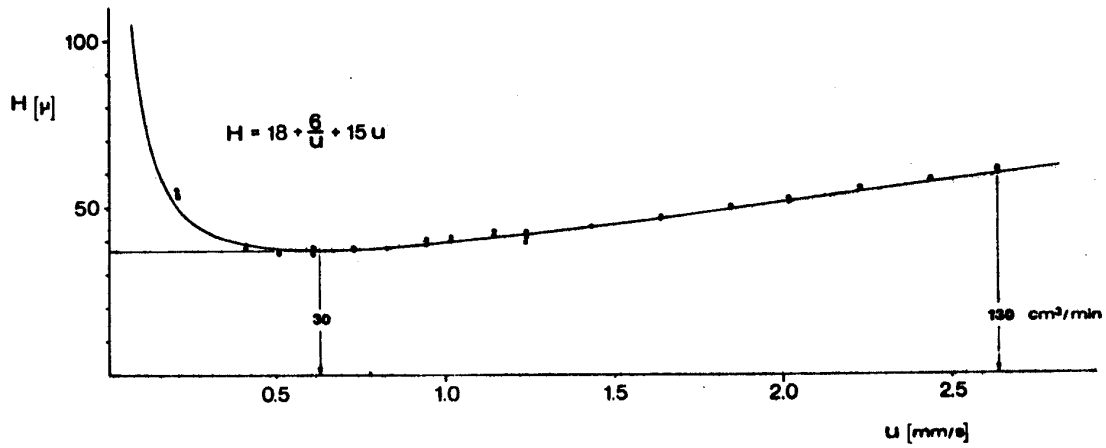


Abb. 26c

Abb. 26 van Deemter-Kurven, Naphthalin/Petrolether(tiefs.)-  
Ethylacetat 95:5  
a,b Säule Typ B; c Säule Typ C;  
Meßmethode s. Tabelle 6a-c sowie Text S. 83

Tabelle 6a Daten zur van Deemter-Kurve (Abb.26a) einer Säule B<sup>[a]</sup>;  
 Eluens: Petrolether(tief)-Ethylacetat (95:5);  
 Naphthalin ( $k'=0.255$ );  $t_0=t_R$  (Tetrachlorethylen);  
 L=29.7 cm.

F [ml/min]	$t_0$ [min]	u [mm/s]	N	H [ $\mu$ ]
4.8	19.07	0.260	6777	43.8
	19.13	0.259	6703	44.3
	19.18	0.258	6144	48.3
	19.35	0.256	6229	47.7
7.25	12.24	0.404	7174	41.4
	12.20	0.406	7394	40.2
	12.20	0.406	7641	38.9
7.95	11.24	0.440	7370	40.3
	11.24	0.440	7522	39.5
	11.23	0.441	7708	38.5
8.95	9.93	0.498	7970	37.3
	9.95	0.497	7974	37.2
	9.93	0.498	7803	38.1
11.55	7.68	0.645	7910	37.5
	7.68	0.645	7807	38.0
	7.69	0.644	8290	35.8
14.65	6.09	0.813	7855	37.8
	6.09	0.813	8123	36.6
	6.09	0.813	8002	37.1
20.25	4.41	1.122	7480	39.7
	4.41	1.122	7489	39.7
	4.42	1.121	7501	39.6
25.95	3.45	1.44	6739	44.1
	3.44	1.44	6722	44.2
	3.45	1.44	6742	44.1
29.5	4.014	1.642	6654	44.6
	3.015	1.642	6729	44.1
	3.015	1.642	6660	44.6
34.6	2.563	1.930	6230	47.7
	2.546	1.944	6264	47.4
	2.563	1.932	6310	47.1
39.5	2.240	2.210	5874	50.6
	2.245	2.205	5836	50.9
	2.245	2.205	5859	50.7
45.0	1.975	2.506	5470	54.3
	1.973	2.508	5438	54.3
	1.976	2.505	5529	53.7
49.95	1.778	2.784	5335	55.7
	1.777	2.786	5162	57.5
	1.776	2.787	5131	57.9
54.9	1.613	3.068	5052	58.8
	1.615	3.064	4909	60.5
	1.616	3.063	4869	61.0
60.0	1.483	3.338	4627	64.2
	1.483	3.338	4560	65.1
	1.483	3.338	4778	62.2
64.5	1.370	3.163	4312	68.9
	1.369	3.615	4586	64.8
	1.368	3.618	4460	66.6

[a] Nr 4 von Tabelle 2

Tabelle 6b Daten zur van Deemter-Kurve (Abb.26b) einer Säule B; Testbedingungen s. Tabelle 6a;  $t_0$  wurde nach der auf S.10 angegebenen Methode bestimmt:  $V_0=85.42 \text{ cm}^3$ ,  $t_0=LF/V_0$ ,  $L=28.0 \text{ cm}$ .

F [ml/min]	u [mm/s]	N	H [ $\mu$ ]
0.9	0.049	1955	143.2
		1957	143.3
		1927	145.3
1.7	0.093	3568	78.5
		3435	81.5
		3675	76.2
2.9	0.158	4808	58.2
		4760	58.8
		4930	56.8
4.3	0.235	5985	46.8
		6083	46.0
		5868	47.7
6.0	0.328	6760	41.4
		6670	42.0
6.2	0.339	6737	41.4
		6645	42.1
8.0	0.437	6863	40.8
		6992	40.0
		6919	40.5
10.4	0.568	6830	41.0
		6734	41.6
		6678	41.9
12.0	0.656	6924	40.4
		6905	40.6
		7135	39.2
15.0	0.819	6942	40.3
17.6	0.961	7694	36.4
		6942	40.3
20.0	1.093	6962	40.2
		6616	42.3
23.6	1.289	6604	42.4
		6719	41.7
26.0	1.420	6378	43.9
		6385	43.9
29.2	1.595	6183	45.3
		5830	48.0
		5594	50.1

Tabelle 6c Daten zur van Deemter-Kurve (Abb. 26c) einer Säule C, Testbedingungen wie in Tabelle 6a; L=45.3 cm.

F [ml/min]	t <sub>0</sub> [min]	u [mm/s]	N	H [μ]
10.15	36.98	0.204	8410	53.9
	36.85	0.205	8560	52.9
	36.73	0.206	8190	55.3
20.15	18.32	0.412	11860	38.2
	18.35	0.411	11750	38.6
	18.35	0.411	11740	38.6
25.02	14.72	0.513	12260	36.95
	14.79	0.511	12550	36.10
30.00	12.37	0.610	12480	36.3
	12.36	0.611	11910	38.0
	12.36	0.611	12470	36.3
35.90	10.36	0.729	12220	37.1
	10.36	0.729	12290	36.9
	10.37	0.728	11870	38.2
40.75	9.11	0.829	11960	37.9
	9.11	0.829	11970	37.8
	9.11	0.829	11960	37.9
46.20	7.98	0.946	11250	40.3
	7.98	0.946	11600	39.0
	8.00	0.944	11670	38.8
50.00	7.40	1.020	11070	40.9
	7.41	1.019	11000	41.2
	7.40	1.020	11530	39.3
56.00	6.58	1.147	10620	42.7
	6.60	1.144	10960	41.3
	6.60	1.144	10580	42.8
60.30	6.11	1.236	11460	39.5
	6.11	1.236	10610	42.7
	6.11	1.236	11020	41.1
71.00	5.25	1.438	10330	43.9
	5.26	1.435	10310	43.9
	5.26	1.435	10270	44.1
80.90	4.61	1.638	9700	46.7
	4.61	1.638	9650	46.9
	4.61	1.638	9650	46.9
91.90	4.08	1.851	9240	49.0
	4.09	1.846	9080	49.9
	4.09	1.846	9250	49.0
99.80	3.74	2.019	8880	51.0
	3.74	2.019	8670	52.2
	3.74	2.019	8660	52.3
110.0	3.38	2.234	8180	55.4
	3.38	2.234	8230	55.0
	3.38	2.234	8180	55.4
121.5	3.09	2.443	7780	58.2
	3.09	2.443	7760	58.4
	3.09	2.443	7810	58.0
130.0	2.86	2.640	7550	60.0
	2.87	2.631	7460	60.7
	2.86	2.640	7380	61.4

Tabelle 7 Aus den Daten der Tabellen 6a-c ermittelte van Deemter-Kenngrößen

Säule Typ	A [ $\mu$ ]	B [ $10^3 \mu^2/s$ ]	C [ $10^{-3} s$ ]	Meßbereich u [mm/s]	$u_0$ [mm/s]	H [ $\mu$ ]	H (u=5mm/s) [ $\mu$ ]
B	22	5	12	0.26-3.62	0.645	37.5	83
B	20	6	15	0.05-1.60	0.632	38.8	96.2
C	18	6	15	0.20-2.64	0.632	37.0	94.2
[a]	61	6	26		0.48	86.2	192.4

[a] Richtwerte nach Halász, Gl. 8d (S. 8) mit  $d_p = 20.4 \mu$ .

Für die Diskussion der Daten muß auf die am Anfang gegebenen Erläuterungen zur van Deemter-Gleichung (S.6-8) zurückgegriffen werden. Als Bewertungsgrundlage ist insbesondere Gl. 8d, deren Erfüllung nach Halász eine optimal gepackte Säule anzeigt, gut geeignet.

$$H = 3 d_p + \frac{6}{u} + \frac{d_p^2}{16} u \quad \text{Gl. 8d}$$

Die aus dieser Gleichung für  $d_p=20.4\mu$  (dynamische Korngröße des hier verwendeten Kieselgels, vgl. S.58) folgenden Werte für A, B und C sind in Tab. 7 eingetragen. Das graphische Komplement bildet Abb. 3 (Kurve nach Gl. 8d,  $d_p=20 \mu$ ).

Wie die vorher angeführten Meßresultate, belegen die Daten der Tabelle 7, daß das Packverfahren ausgezeichnet reproduzierbar ist. Für die verschiedenen dimensionierten Säulen Typ B und C besteht kein Unterschied in der Qualität des Adsorbensbettes. Es ist deutlich besser als nach Gl. 8d zu erwarten gewesen wäre. Der Vergleich der Kennzahlen, speziell des A-Terms, von Tab. 7 zeigt das eindeutig:

- Verhältnismäßig wenig signifikant ist Term B. Er beschreibt die longitudinale Diffusion in der mobilen Phase und ist daher primär eine Funktion des Diffusionskoeffizienten  $D_m$ :  $B=2 \gamma D_m$ . Die gute Übereinstimmung von Meß- und Richtwert belegt, daß  $D_m$  (Naphthalin) in Petroether-Ethylacetat 95:5 dem angenommenen Wert von  $3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/s$  nahe kommt.

- Term A charakterisiert die Güte der Packung. Der Wert von  $A \approx 1d_p$  ist um den Faktor drei "besser" als der Richtwert. Dieses außergewöhnlich gute Ergebnis bestätigt die Folgerung aus den Permeabilitätsmessungen: das neue Packverfahren liefert ein äußerst homogen und dicht gepacktes Adsorbensbett, Wandeffekte sind nicht vorhanden.
- Term C beschreibt den Stoffaustausch zwischen Eluens und Adsorbens. Er spiegelt hauptsächlich die Testbedingungen ( $D_m$ ) und die Qualität des Adsorbens (Porenstruktur etc.) wieder. Auch hier finden wir ein wesentlich besseres Ergebnis als nach Gl. 8 zu erwarten war. Das verwendete relativ breit klassierte und daher billige Kieselgel besitzt demnach ausgezeichnete chromatographische Eigenschaften: ein Kompliment an den Hersteller (Merck).

Das Zusammenwirken der durch die Terme A, B, C beschriebenen Effekte bestimmt die Effizienz der Trennsäule. Die maximale Trennleistung wird durch Arbeiten im Minimum der van Deemter-Kurve ( $H_0/u_0$ ) erreicht. Wir finden  $H_0 = 1.8-1.9 d_p$ , der Richtwert beträgt  $4.2 d_p$ . Auch  $u_0$  ist deutlich günstiger als der Richtwert (je höher  $u_0$ , desto schneller kann unter Optimalbedingungen gearbeitet werden). Schließlich ist in Tabelle 7 noch die Bodenhöhe H für die sehr hohe Eluengeschwindigkeit  $u = 5 \text{ mm/s}$  (250 ml/min für die Säule C!) angegeben. Selbst bei dieser extremen Geschwindigkeit sollten die Trennsäulen mehr als die doppelte Trennleistung besitzen, als es die Richtwerte vorhersehen lassen.

Das Wertepaar  $H_0/u_0$  sowie die im vorhergehenden Abschnitt bestimmte Permeabilität  $K_F$  erlauben die Abschätzung der maximalen Zahl an theoretischen Böden, die bis 20 bar mit unseren Säulen erreicht werden kann. Es lassen sich z. B. mit 3 hintereinandergeschalteten Säulen C bei 20 bar noch ca. 25 ml/min Durchfluß,  $u=0.51 \text{ mm/s}$  (vgl. Tab.6c) erzeugen. Die Gesamtsäulenlänge beträgt dann 135 cm und die Gesamtbodenzahl ca. 35000. Experimente mit gekoppelten Säulen haben diese Abschätzung bestätigt. Da die Chromatographiedauer unter den extremen Bedingungen relativ hoch ist (mehrere Stunden), wird man sie nur in

### Sonderfällen anwenden.

Gl. 8d ist aus den Erfahrungen mit analytischen HPLC-Säulen (3-6 mm Durchmesser) abgeleitet worden. Daß Säulen mit wesentlich größerem Durchmesser bessere Effizienz besitzen, ist einerseits verständlich, da Wandeffekte wegfallen, andererseits nicht selbstverständlich, denn es wird als zweiter nachteiliger Effekt ein Wärmestau bedingt durch Reibungseffekte beobachtet [11]. Aus diesem Grunde lassen sich mit den üblichen analytischen Säulen durch Hintereinanderschaltung keine sehr hohen Bodenzahlen erzielen. Auch die fast ideale Peaksymmetrie,  $SI=1.06 \pm 0.04$  (s. o.), wird mit analytischen Säulen nicht erreicht. Man betrachtet Werte  $SI < 1.5-2$  schon als gut. Es konnte kürzlich gezeigt werden [31], daß der Wärmestau bei 1 mm-Säulen nicht auftritt, weshalb Bodenzahlen von ca. 1 000 000 tatsächlich realisierbar geworden sind (geschätzte Obergrenze 10 000 000). Eine Untersuchung der Wärmeaustauschvorgänge in chromatographischen Säulen von präparativem Format wäre von großem Interesse.

Wie schon in der Einleitung dieser Arbeit gesagt wurde, gibt es leider nur wenige ernstzunehmende Arbeiten über präparative Flüssigkeitschromatographie, d. h. über Säulen vom Durchmesser  $> ca. 10$  mm. Unter diesen wiederum gibt es nur zwei, in denen Säulen mit einer Effizienz beschrieben werden, die der obigen nahekommt.

Von Godbille und Deveaux [14b] stammt ein sehr originelles Packverfahren, dessen Güte an Säulen vom Innendurchmesser 18 mm<sup>1)</sup> überprüft wurde. Mit engstklassiertem Kieselgel  $d_p=10 \mu$  wurde  $H_o=3.2 d_p$  bei  $u_o=0.36$  mm/s und  $SI=1.35$  erreicht. Der  $D_m$ -Wert des Testsystems war allerdings mit  $1.45 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s ungewöhnlich niedrig, so daß die Richtwerte entsprechend Gl. 8d nicht gelten. Gl. 8d stellt nur den Spezialfall einer allgemeinen Gleichung dar<sup>2)</sup>. Aus dieser folgt:  $H_o=4.2 d_p$ ,  $u_o=0.47$  mm/s. Auch das Godbille-Deveaux-Verfahren liefert also Säulen, die als sehr gut einzustufen sind.

---

1) Mit demselben Verfahren, das inzwischen kommerziell ausgewertet wird, lassen sich Säulen mit bis zu 8 cm Innendurchmesser packen. Leider ist über die Effizienz noch nichts publiziert worden.

2) Vgl. [32]:  $H=3 d_p + \frac{2 D_m}{u} + \frac{d_p^2}{5.3 D_m} u$ ; Einheiten wie auf S. 8 für Gl. 8d angegeben,  $D_m$  [10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/s].

In der zweiten Arbeit, von Beck und Halász [27], wird die Anwendung von Standard-Packtechniken für analytische Säulen auf Säulen größeren Durchmessers beschrieben. Zum einen wurden mit der üblichen Trockentechnik Teilchen  $d_p = 36-50 \mu$  in Säulen vom Durchmesser 4, 20 und 50 mm gepackt. Die Säulen mit dem größeren Durchmesser zeigten wesentlich bessere Effizienz als die analytische (4 mm). Die Richtwerte nach Gl. 8d wurden jedoch nicht erreicht. Unsere ebenfalls trocken gepackten älteren [6] sowie die käuflich erhältlichen Merck-Lobar-Säulen [5] besitzen eine bessere Effizienz ( $A \sim 2 d_p$ ). Das Standard-Naßpackverfahren wurde mit Teilchen  $d_p = 10 \mu$  und 10-15  $\mu$  auf Säulen mit 20 mm Innendurchmesser ausgedehnt. Hier entsprach der A-Term dem Richtwert, der C-Term war um den Faktor 1.5 besser. Über die Peakform wird leider nichts ausgesagt.

Der Vergleich sowohl mit den Richtwerten nach Halász als auch mit den besten in der Literatur verzeichneten Ergebnissen anderer Autoren belegt, daß das einfache und billige Verfahren dieser Arbeit präparative Trennsäulen liefert, die in ihrer Effizienz dem erreichbaren Optimum sehr nahe kommen.



LITERATURVERZEICHNIS

- [ 1 ] B.Glatz, G.Helmchen, unveröffentlichte Arbeiten 1976/77.
- [ 2 ] (a) R.Kuhn, E.Lederer, *Naturwissenschaften* 19, 306 (1931),  
Ber.Dtsch.Chem.Ges. 64, 1349 (1931);  
(b) M.Steiger, T.Reichstein, *Helv.Chim.Acta* 21, 546 (1938).
- [ 3 ] (a) H.Engelhardt, *Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie*,  
2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin 1977.  
(b) P.A.Bristow, *Liquid Chromatography in Practice*, hept,  
Macclesfield 1977.  
(c) P.A.Bristow, *Liquid Chromatography in Practice*, Hand-  
forth, Cheshire 1976.  
(d) R.P.W.Scott, *Contemporary Liquid Chromatography*,  
*Techniques of Chemistry*, Bd.11, John Wiley, New York  
1976.  
(e) *Basic Liquid Chromatography*, Spectra-Physics Technical  
Marketing Dptmt., Darmstadt und Santa Clara.  
(f) L.R.Snyder, J.J.Kirkland, *Introduction to Modern Liquid  
Chromatography*, Wiley-Interscience, New York 1974.  
(g) N.Hadden, *Basic Liquid Chromatography*, Varian Aerograph,  
U.S.A. 1971.  
(h) J.J.Kirkland (Ed.), *Modern Practice of Liquid Chromato-  
graphy*, Wiley-Interscience, New York 1971.
- [ 4 ] L.R.Snyder, *Principles of Adsorption Chromatography*, Marcel  
Dekker, New York 1968.
- [ 5 ] Merck Patent GmbH (Erf. F.Eisenbeiß, S.Ehlerding), D.O.S.,  
2132686 (18.Jan.1973) [*Chem.Abstr.* 78, 99584p (1973)].
- [ 6 ] B.Glatz, Dissertation, Universität Stuttgart 1976.
- [ 7 ] J.J.Kirkland, W.W.Yan, H.J.Stoklosa, C.H.Dilks Jr.,  
*J.Chromatog.Sci.* 15, 303 (1977).
- [ 8 ] J.Kwok, L.R.Snyder, J.C.Sternberg, *Anal.Chem.* 40, 118 (1968).
- [ 9 ] P.A.Bristow, J.H.Knox, *Chromatographia* 10, 279 (1977).
- [10] I.Halász in [3 h], S. 328.
- [11] I.Halász, *Z.Anal.Chem.* 277, 257 (1975).
- [12] I.Halász, M.Näfe, *Anal.Chem.* 44, 74 (1972).
- [13] L.R.Snyder, *Anal.Chem.* 39, 698 (1967).
- [14] (a) R.Endele, I.Halász, K.Unger, *J.Chromatogr.* 99, 377 (1974);  
(b) E.Godbille, P.Devaux, *J.Chromatogr.* 122, 317 (1976).
- [15] B.L.Karger, M.Martin, G.Guichon, *Anal.Chem.* 46, 1640 (1974).
- [16] J.H.Knox, J.F.Parcher, *Anal.Chem.* 44, 74 (1972).
- [17] J.H.Knox, G.L.Laird, P.A.Rasen, *J.Chromatogr.* 122, 129 (1976).
-

- [18] J.Vermont, M.Delenil, A.J.de Vries, L.L.Guillemain, Anal. Chem. 48, 1329 (1975).
- [19] V.Řehák, E.Smolková, Chromatographia 9, 219 (1976).
- [20] K.Karch, I.Sebastian, I.Halász, J.Chromatogr. 122, 3 (1976).
- [21] R.K.Gilpin, D.J.Camillo, C.H.Janicki, J.Chromatogr. 121, 13 (1976).
- [22] R.K.Gilpin, J.A.Korpi, C.A.Janicki, Anal.Chem. 47, 1498 (1975).
- [23] W.Strubert, Chromatographia 6, 50 (1973).
- [24] Handbook of Chemistry and Physics, 53.Aufl., The Chemical Rubber Co., Cleveland 1972/73.
- [25] J.J.DeStefano, H.C.Beachell, J.Chromatog.Sci. 10, 654 (1972).
- [26] A.Wehrli, Z.Anal.Chem. 277, 289 (1975).
- [27] W.Beck, I.Halász, Fresenius Z.Anal.Chem. 291, 340 (1978).
- [28] P.A.Bristow, J.Chromatogr. 149, 13 (1978).
- [29] P.A.Bristow, P.N.Brittain, C.M.Riley, B.F.Williamson, J.Chromatogr. 131, 57 (1977).
- [30] K.Hafner, H.Kaiser, Org.Synth.Coll.Vol.V, 1088.
- [31] R.P.W.Scott, P.Kucera, J.Chromatogr. 169, 51 (1979).
- [32] I.Halász, J.Aßhauer, R.Endele, J.Chromatogr. 112, 37 (1975).