

Gelchromatographie, eine Methode zur Stofftrennung aufgrund von Molekulargewichtsunterschieden*

H. DETERMANN

Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt am Main

Summary

Gel chromatography, a method for the size separation of various kinds of molecules, is performed in an experimentally very simple way. A selection of analytical and preparative applications is summarized. Special stress is laid upon the industrial use.

Einteilung

1. Prinzip
 - 1.1. Gele
 - 1.2. Trennschema
 - 1.3. Volumenwerte
 - 1.4. Elutionsparameter
2. Versuchstechnik
 - 2.1. Materialien
 - 2.2. Geräte
 - 2.3. Kleinster Maßstab
3. Anwendung
 - 3.1. Präparativ
 - 3.1.1. Gelfiltration
 - 3.1.2. Gelchromatographie
 - 3.2. Analytisch
 - 3.2.1. Molekulargewichtsbestimmung
 - 3.2.2. Molekulargewichtsverteilung

Einleitung

Die Gelchromatographie ist an und für sich ein Spezialfall der Flüssigkeitschromatographie, die bereits auf TSWETT zurückgeht. Sie unterscheidet sich jedoch – wie

wir gleich sehen werden – in ganz wesentlichen Punkten von den anderen hierher gehörenden Techniken (Adsorption, Ionenaustausch, Verteilung), indem nämlich keine Anreicherung der gelösten Stoffe in der stationären Phase stattfindet. Nachdem die Flüssigkeitschromatographie durch einige neue Techniken (z. B. Gaschromatographie) zurückgedrängt worden war, hat sie durch die Einführung der «Gelfiltration» durch PORATH und FLODIN¹ vor nunmehr bald zehn Jahren einen enormen Aufschwung genommen².

1.1. Gele

Gele bestehen *definitionsgemäß*³ meist aus zwei Komponenten: der dispergierten Substanz (in unserem Fall dem Gelbildner) und dem Dispersionsmittel (dem Lösungsmittel). Beide durchdringen einander und sind in sich zusammenhängend. Die Kohärenz beider Systeme ist das wesentliche Merkmal eines Gels, d. h. man kann innerhalb des jeweiligen Systems von jedem Punkt aus jeden beliebigen anderen Punkt erreichen, ohne jemals das System verlassen zu müssen. Die Kohärenz des Dispersionsmittels zeigt sich darin, daß die Diffusion kleiner Moleküle praktisch mit der gleichen Geschwindigkeit vonstatten geht wie in der reinen Lösung. Das Gelgerüst besteht in der Regel aus Makromolekülen, die an Haftpunkten bzw. in Haftbereichen miteinander verbunden sind, je nachdem, welche Art energetischer Wechselwirkung zwischen den (meist) Fadenmolekülen besteht. Man spricht im ersten Fall von Hauptvalenzgelen: die Molekülketten sind durch homöopolare Bindungen zu

* Vortrag am 13. September 1968 anlässlich der ILMAC in Basel.

einem dreidimensionalen Netzwerk verbunden (Beispiel: Polystyrol/DVB-Kopolymerisat). Im zweiten Fall liegt ein Nebenvalezzgel vor, das dadurch entsteht, daß lineare Polymerketten durch sekundäre Bindungskräfte verbunden werden (Beispiel: Gelatine). Es liegt in der Natur der Sache, daß die Gele vom zweiten Typ durch Veränderung der Umweltbedingungen in den Lösungszustand übergehen können, während die Hauptvalenzgele unter allen Bedingungen sehr stabil sind. Entfernt man aus einem solchen Gel das Lösungsmittel, besser: das Quellmedium, dann schrumpft es in den meisten Fällen (Xerogel), um beim Hinzufügen des Dispersionsmittels wieder zu quellen. Die Größe der Gelporen hängt damit vom Grad der Quellung und diese wiederum vom Lösungsmittel sowie von der Anzahl der Verknüpfungsstellen zwischen den Polymerketten ab. Eine Reihe von porösen Polymeren verlieren nicht oder nur sehr wenig ihre Struktur, wenn das Dispersionsmittel entfernt wird (Trocknung).

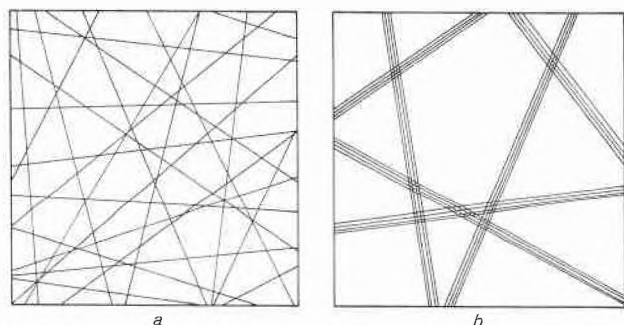


Abb.1. Schema für die Netzstruktur von Gelen. a) herkömmliche Gele, b) makroporöse Polymere. Die Anzahl der Striche symbolisiert die Polymerkonzentration; diese ist in beiden Fällen gleich. Der Unterschied in der Porengröße ist evident

Auf Abb.1 sind schematisch die beiden Geltypen – im Gleichgewicht mit dem Dispersionsmittel – dargestellt. Man kann sich vorstellen, daß Schnittpunkte der Linien im linken Bild (konventionelles Gel) die Bereiche der Vernetzung darstellen. Die Anzahl der gezeichneten Linien (Polymerketten) ist in beiden Fällen gleich, im rechten Bild ist ein (makroporöses) Aerogel schematisiert. Das Bündeln der Polymerfäden kann man entweder durch einen sehr hohen Vernetzergehalt bei der Polymerisation erreichen, oder sekundäre Bindungskräfte bewirken die Ausbildung solcher Haftzonen. Beide Geltypen werden als Trennmateriale für die Gelchromatographie herangezogen, worauf später noch eingegangen wird.

1.2. Trennschema

Wir betrachten nun eine Grenzfläche zwischen Gel und reinem Lösungsmittel. Das Lösungsmittel sei dabei mit dem Dispersionsmittel des Gels identisch. Enthält

nun das Lösungsmittel außerhalb des Gels einen gelösten Stoff, dessen Moleküle größer sind als die größten Poren im Gel, so bleibt die Diffusion aus. Nimmt man aber immer kleinere gelöste Moleküle, dann wird für sie schließlich ein Teil der Gelporen zugänglich. Die Verteilung der Moleküle hängt dann von der Porengröße (der Geldichte) ab. Ist das Molekulargewicht des gelösten Stoffes klein im Verhältnis zur Geldichte, so stellt die Gelphase für die Diffusion keinerlei Hindernis dar. Im Gleichgewicht befinden sich nun ebenso viele Moleküle im Gel wie in der überstehenden Lösung.

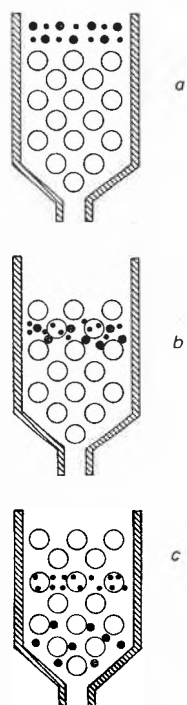


Abb.2. Schema der Gelchromatographie in drei Phasen

Theoretisch könnte man sich vorstellen, daß durch Vorbeiströmen von gelösten Molekülen verschiedener Größe an solchen Oberflächen eine Auftrennung zustande kommt. Sehr viel wirksamer muß die Trennung werden, wenn man das Gel granuliert und so die Grenzfläche vervielfacht, also auch die Zeit für die Einstellung des Diffusionsgleichgewichts enorm vermindert. Füllt man die Gelpartikel mit Lösungsmittel in ein senkrecht montiertes Glasrohr, so bewirken sie beim Durchsickern einer Lösung von verschiedenen großen Molekülen deren Auftrennung, wenn mit reinem Lösungsmittel nachgewaschen wird. In Abb.2 ist der Vorgang schematisch wiedergegeben, wobei der besseren Übersicht wegen nur zwei Molekülsorten (große und kleine Punkte) und die Gelpartikel (Kreise) wiedergegeben worden sind. Abb. 2a zeigt den Zustand unmittelbar nach Aufbringen der Zone auf die Packung aus Gelpartikeln (das Gelbett). Für die Diffusion der kleinen Moleküle ist das Gel kein Hindernis. Sie verbreiten sich gleichmäßig über den ganzen Querschnitt des Glasrohrs, während die großen Mole-

küle nicht in das Gel eindringen können, so daß ihnen nur das Lösungsmittel zwischen den Gelpartikeln (äußeres Volumen) zur Verfügung steht (Abb.2b). Beim Nachwaschen mit Lösungsmittel findet aber der Stofftransport nur in diesem äußeren Volumen statt, so daß die großen Moleküle rascher transportiert werden als die kleinen (Abb.2c), die ja durch zwischenzeitliche Diffusion in die (ruhende) Gelphase verlangsamt werden. Enthielte die Mischung noch mittelgroße Bestandteile, so würden diese – im Diffusionsgleichgewicht – nur einen bestimmten Teil der Gelphase aufsuchen. Die Komponenten unseres Gemischs werden also das mit Gelpartikeln gefüllte Rohr in der Reihenfolge abnehmenden Molekulargewichts verlassen, wie es ihrer – durch Diffusion bedingten – Aufenthaltsdauer in der ruhenden Gelphase entspricht.

1.3. Volumenwerte

Um die Ergebnisse einer Gelfiltration zu dokumentieren, bedient man sich in der Regel eines *Elutionsdiagramms*. Dazu zeichnen wir auf der Ordinate die Konzentration und auf der Abszisse das Volumen des Eluats auf (vgl. Abb.3)

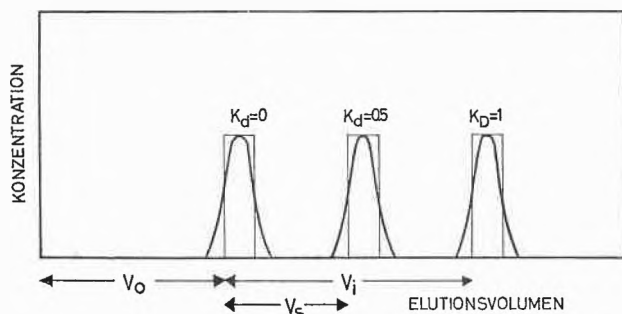


Abb.3. Konstruktion eines Elutionsdiagramms; V_o = äußeres Volumen; V_i = inneres Volumen; V_s = Separationsvolumen (die stark ausgezogenen Kurven geben das wirkliche Verhalten wieder, während die Kästen theoretisch zu erwarten wären)

Das Eluat, gemessen vom Aufbringen der Substanzen bis zur Elution der Komponente in maximaler Konzentration, bezeichnet man als *Elutionsvolumen* (V_e). An einer gegebenen Gelpackung wird eine bestimmte Substanz mit dem gleichen Elutionsvolumen eluiert. Ganz große Moleküle können nicht in die Gelkörner eindringen; sie sollten also mit dem zwischen den Gelkörnern befindlichen Lösungsmittelvolumen eluiert werden ($V_e = V_o$). Von den kleinen Molekülen kann man erwarten, daß sie alle Bereiche der Gelphase durchdringen, so daß man für ihre Elution die Summe aus äußerem und innerem Volumen benötigt ($V_e = V_o + V_i$).

Besonders wichtig und interessant ist nun aber das Verhalten von Substanzen, die weder ganz ausgeschlossen werden noch ganz frei diffundieren können. Ihnen steht für die Diffusion nur ein Bruchteil (K_d) des inneren

Volumens zur Verfügung, so daß ihr Elutionsvolumen sich nach

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i$$

berechnen läßt.

Das *Gesamtvolumen* der Gelpackung (V_t = total volume) setzt sich dem nach aus drei Anteilen zusammen: dem Volumen zwischen den Gelkörnern (V_o = outer volume), dem Lösungsmittelvolumen innerhalb der Gelpartikel (V_i) und dem Volumen der Gelmatrix (V_m).

$$V_t = V_o + V_i + V_m.$$

Das Gesamtvolumen der Gelpackung (V_t) ist natürlich leicht zu messen, indem man den Rauminhalt der Kolonne von der Auflage des Gelbetts bis zu seinem oberen Rand bestimmt. Das *äußere Volumen* ermittelt man einfach dadurch, daß man einen hochmolekularen Stoff (der nicht in die Gelkörner eindringen kann) an der Gelpackung chromatographiert. Das Lösungsvolumen, das zwischen dem Start und dem Erscheinen dieses Stoffs im Eluat die Säule verläßt, entspricht genau der Flüssigkeitsmenge, die sich zwischen den Gelpartikeln befindet. Für die Charakterisierung von wäßrigen Gelen eignet sich z. B. ein hochmolekulares gefärbtes Polysaccharid (Blue Dextran, Pharmacia, Uppsala). Man kann aber natürlich alle löslichen Substanzen verwenden, von denen man sicher weiß, daß ihr Molekulargewicht jenseits der Ausschußgrenze (M_{lim}) liegt. Bei der Chromatographie von homologen Polymeren manifestiert sich diese Grenze im Molekulargewicht desjenigen Stoffs, der gerade überhaupt nicht mehr in die Gelphase eindringen kann. Er hat dann das gleiche Elutionsvolumen (entsprechend dem äußeren Volumen V_o) wie alle höhermolekularen Stoffe. Für die im Handel befindlichen Gele ergibt sich die Ausschußgrenze in etwa aus den in den Broschüren der Hersteller^{4,5} tabellierten Trennbereichen.

Schwieriger ist es mit der Bestimmung der beiden anderen Volumina (V_i und V_m). Das *innere Volumen* (V_i) hängt natürlich mit der Porosität des Gels zusammen. Stark quellbare oder poröse Gele enthalten relativ viel Lösungsmittel und wenig Matrix, während Partikel aus wenig quellbaren Gelen natürlich mehr Festkörper und weniger Flüssigkeit enthalten. Für Xerogele, wie Sephadex, läßt sich V_i noch relativ einfach berechnen, wenn man das Lösungsmittelaufnahmevermögen (S_r = solvent regain) kennt. Man braucht dann nur die Einwaage an Trockengel (a) mit S_r zu multiplizieren und durch die Dichte (ρ) des Lösungsmittels zu dividieren:

$$V_i = \frac{a \cdot S_r}{\rho}.$$

Das Matrixvolumen (V_m) ist natürlich bei den starren Aerogelen deutlich höher, man kann hier V_i auch nicht so einfach berechnen.

1.4. Elutionsparameter

In der Papier- und Dünnschichtchromatographie hat sich der sogenannte R_f -Wert hervorragend zur Beschreibung des Elutionsverhaltens der Stoffe bewährt. Für die Gelchromatographie kann man verschiedene Stoffkonstanten definieren, die unabhängig von den Dimensionen für einen Stoff an einem bestimmten Gel charakteristisch sind. In Tabelle 1 sind die meßbaren Volumenwerte nochmals zusammen mit diesen Elutionskonstanten zusammengestellt. Natürlich kann man, ähnlich wie beim R_f -Wert, das Elutionsvolumen durch eines der konstanten Volumina der Gelpackung dividieren und dadurch normieren; die so gewonnenen Konstanten hängen aber bezüglich ihrer Genauigkeit von der absoluten Größe ab.

Obwohl der K_d -Wert von Anbeginn mit der «Gelfiltration an Sephadex» verbunden wurde⁶, hat er sich doch niemals zur Beschreibung von Versuchsergebnissen allgemein durchsetzen können. Das hängt mit der Unsicherheit in der Bestimmung von V_i zusammen.

Wegen dieser Schwierigkeiten hat man einen anderen Parameter gesucht, durch den man das Elutionsverhalten von Substanzen, denen nur ein Teil der Gelphase zugänglich ist, besser beschreiben kann. Besonders geeignet für eine allgemeine Anwendung erscheint die von LAURENT und KILLANDER⁷ definierte Konstante K_{av} (av = available), die sich vom K_d -Wert dadurch unterscheidet, daß anstelle des inneren Volumens (V_i) das gesamte Volumen der Gelphase ($V_g = V_t - V_o = V_i + V_m$) zu ihrer Berechnung verwendet wird. Hier sind alle Größen einfach zu messen. Der Unterschied zwischen K_d und K_{av} ist um so geringer, je poröser (stärker quellbar) das betrachtete Gel ist. Bei den Gelen mit hoher Polymerkonzentration besteht natürlich ein beträchtlicher Unterschied. Die in Tabelle 1 definierten Konstanten erlauben ein Urteil darüber, ob die Trennung zweier Stoffe an einer vorgegebenen Gelpackung überhaupt möglich ist oder nicht.

Tabelle 1. Elutionsparameter bei der Gelchromatographie

Parameter	Bemerkung
V_e	Vergleich nur an ein und derselben Gelpackung möglich
V_e/V_i V_e/V_o	empfindlich gegen Unterschiede in der Packungsdichte, größte Genauigkeit bei kleinem V_e
$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$	Unsicherheit in der Bestimmung von V_i , größte Genauigkeit bei großem V_e
$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$	alle Volumina einfach zu messen, größte Genauigkeit bei großem V_e

Man kann (bei Kenntnis von V_i und V_o einer Gelpackung) z. B. aus den K_{av} -Werten das sogenannte *Separationsvolumen* (V_s) berechnen, das ist das Lösungsmittelvolumen, durch welches die Maxima der beiden Sub-

stanzen (mit den K_{av} -Werten K'_{av} und K''_{av}) im Verlauf der Elution voneinander getrennt werden.

$$V_s = V'_e - V''_e = (K'_{av} - K''_{av})(V_t - V_o).$$

Wegen der – diffusionsbedingten – Verbreiterung der Banden muß das Separationsvolumen natürlich etwas größer (als hier berechnet) gewählt werden, damit eine einigermaßen vollständige Trennung gewährleistet ist. Nach der Gleichung ist aber V_s direkt V_t proportional, so daß man (bei konstanter Differenz der K_{av} -Werte) natürlich an einer größeren Gelpackung auch ein größeres Separationsvolumen erzielen kann.

2.1. Materialien

Ein für die Gelchromatographie geeignetes Gel sollte in Form kleiner, möglichst gleichmäßiger Kugeln hergestellt werden können, damit durch Diffusionsunterschiede keine Verbreiterung der Banden eintritt. Die meisten käuflichen Materialien erfüllen diese Forderung, indem mehr oder weniger enge Siebfraktionen für die verschiedenen Anwendungen angeboten werden.

Unter den Xerogelen, die durch Quellung im Lösungsmittel ihre poröse Struktur erst bekommen, ist das Dextrangel *Sephadex* der hervorragendste Vertreter. AB Pharmacia, Uppsala, hat durch die Entwicklung dieses Trennmediums die Gelchromatographie – zunächst Gelfiltration genannt – eigentlich begründet. Heute gibt es *Sephadex* in einer Vielzahl von Typen (vgl. Tabelle 2) mit sehr unterschiedlichen Trennbereichen. Über 90% der über 2000 Arbeiten, in denen die Gelchromatographie bisher eingesetzt wurde, sind unter Verwendung von *Sephadex* ausgeführt worden.

Tabelle 2. Eigenschaften der käuflichen *Sephadex*-Gele

Typ	Wasser- aufnahme (ml/g)	Gelbett- volumen (ml/g)	Trennbereich (Molekulargewicht von Dextranen)
G-10	1,0	2 bis 3	bis 700
G-15	1,5	2,5 bis 3,5	bis 1500
G-25	2,5	4 bis 6	100 bis 5000
G-50	5,0	9 bis 11	500 bis 10000
G-75	7,5	12 bis 15	1000 bis 50000
G-100	10	15 bis 20	1000 bis 100000
G-150	15	20 bis 30	1000 bis 150000
G-200	20	30 bis 40	1000 bis 200000

Während das Dextrangel durch Reaktion von vorgebildeten Dextranketten mit bifunktionellen Reagenzien entsteht, wird das Polyacrylamidgel durch Kopolymerisation von mono- und bifunktionellen Monomeren hergestellt. *Bio-Gel* ist das einzige Handelsprodukt, welches hier eine gewisse Verbreitung gefunden hat. In Tabelle 3 sind die verschiedenen Typen davon anhand ihrer Trennbereiche vorgestellt.

Tabelle 3. Eigenschaften der käuflichen Bio-Gele

Typ	Wasser- aufnahme (ml/g)	Gelbett- volumen (ml/g)	Trennbereich (Molekulargewicht globulärer Proteine)
P-2	1,6	3,8	200 bis 2000
P-4	2,6	6,1	500 bis 4000
P-6	3,2	7,4	1000 bis 5000
P-10	5,1	12	5000 bis 17000
P-30	6,2	14	20000 bis 50000
P-60	6,8	18	30000 bis 70000
P-100	7,5	22	40000 bis 100000
P-150	9,0	27	50000 bis 150000
P-200	13,5	47	80000 bis 300000
P-300	22,0	70	100000 bis 400000

Man kann nicht unbeschränkt für die Auftrennung immer größerer Moleküle immer porösere Xerogele herstellen, weil die anwendungstechnischen Eigenschaften dann immer schlechter werden. Bereits Sephadex G200 oder Bio-Gel P300 erfordern bei der Handhabung gewisse Kunstgriffe. Agarose hat sich zunächst empirisch als ein Gelbildner erwiesen, der aufgrund der Nebenvallenzen dieses Polysaccharids eine makroporöse Struktur ausbildet⁸. Dieses Material nimmt eine Art Zwischenstellung ein, denn die Perlen sind noch sehr weich, und sie schrumpfen auch enorm, wenn das Lösungsmittel entzogen wird. *Sagavac* und *Sepharose* heißen die in verschiedenen Typen auf dem Markt befindlichen Produkte für Trennungen bis hinauf zu Viren und Zellpartikeln.

Wesentlich bessere technologische Eigenschaften hat ein Gel aus Cellulose, das wir⁹ entwickelt haben. Man erhält es durch Ansäuern von einer Celluloselösung in Schweizers Reagens, suspendiert in einem organischen Lösungsmittel. Hierbei entstehen Partikel aus weitgehend amorphem Cellulose-Regenerat. Diese Partikel haben eine sehr starre Struktur; der Grad ihrer Porosität läßt sich durch die Konzentration der zum Regenerieren eingesetzten Celluloselösung regulieren. Wir haben das anhand eines Testgemisches aus *Coli*-Bakterien, hochmolekularem Dextran und Benzylalkohol⁹ zeigen können.

Alle bisher besprochenen Gele sind vorwiegend für wäßrige Systeme gedacht. Zur Verwendung in organischen Lösungsmitteln gibt es nicht eine solche Auswahl von Möglichkeiten. Alkyliertes Sephadex G25 besitzt in verschiedenen Lösungsmitteln molekülsiebende Eigenschaften, wenn man die hier besonders ausgeprägten Affinitätskräfte beherrschen kann¹⁰. Auf dem Markt ist lediglich Sephadex LH20, welches naturgemäß nur im unteren Molekulargewichtsbereich wirksam ist. Für die Untersuchung von Plastikmaterialien ist aber besonders der Bereich hoher Molekulargewichte interessant. Es scheint so, als ob die Weichheit stärker quellbarer Gele in organischen Lösungsmitteln noch mehr ausgeprägt ist. Daher hat hier das Prinzip der makroporösen Polymeren (Gele zweiter Art) mit dem *Styragel*, einem Kopolymeren aus Styrol mit viel Divinylbenzol, großen Erfolg gehabt¹¹. Es gibt dieses Material in sehr verschiedenen

Porositätsabstufungen mit ganz hervorragenden anwendungstechnischen Eigenschaften. Man kann, weil es nicht quellbar ist, in sehr vielen verschiedenen Lösungsmitteln damit arbeiten.

Nahezu universell verwendbar und auch technisch ideal zu handhaben ist ein neuerdings erhältliches makroporöses Kieselgel, *Porasil*, das sich gelegentlich schon als hervorragendes Trennmedium erwiesen hat¹². Hier sind allerdings die möglicherweise sehr starken Wechselwirkungskräfte zwischen der Kieselsäure und – namentlich bei biologisch interessanten Molekülen – den gelösten Stoffen noch nicht genügend untersucht.

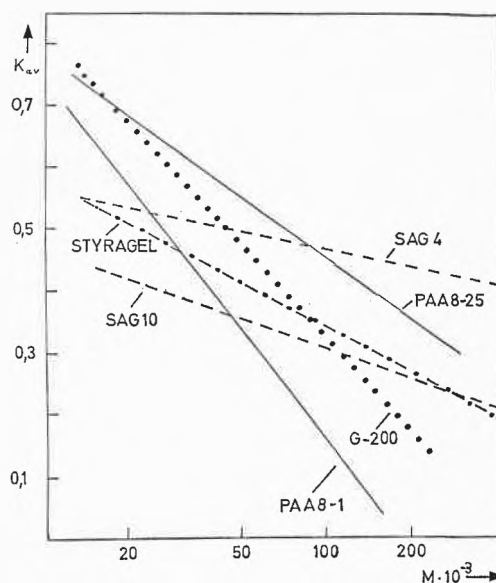


Abb. 4. Trenncharakteristik für verschiedene Gele: Polyacrylamid mit 1% Vernetzter (PAA 8-1) und mit 25% Vernetzter (PAA 8-25); Agarose 4% (SAG 4) und 10% (SAG 10); Sephadex G-200, Styragel $5 \cdot 10^4$ Å. Ordinate: Elutionsverhalten von Makromolekülen; Abszisse: Molekulargewicht

Man könnte sich fragen, ob in Anbetracht der hervorragenden Eigenschaften von makroporösen Polymeren die herkömmlichen Gele überhaupt noch eine Chance haben. Für die Beurteilung dieser Frage ist die Aufnahme der Trenncharakteristik entscheidend. In Abb. 4 ist für einige Materialien die Abhängigkeit des Elutionsverhaltens vom Molekulargewicht aufgezeichnet. Man erkennt, daß ein vorgegebener Molekulargewichtsunterschied sowohl sehr große als auch relativ kleine Unterschiede im Elutionsverhalten bewirken kann. Es ist also für die Beurteilung eines Gels als Trennmedium nicht allein entscheidend, wie weit man die Ausschlußgrenze in immer höhere Molekulargewichtsbereiche verschieben kann.

2.2. Geräte

Die für die erfolgreiche Ausübung der Gelchromatographie notwendige Geräteausstattung unterscheidet sich eigentlich in nichts von der für eine andere Flüssigkeits-

chromatographie sinnvollen. Immerhin hat aber wegen des Aufschwungs durch die Gelchromatographie die Industrie nun eine Reihe von wesentlichen Erleichterungen geschaffen.

Wie bereits mehrfach gesagt, gibt die Handhabung der weichen Gele oft große experimentelle Probleme auf. Daher ist es manchmal zweckmäßig, wenn man nicht nur ein einfaches verjüngtes Glasrohr mit Watte als Unterstützung des Gelbetts verwendet, sondern wenn man eines der vielfach angebotenen Chromatographierohre verwendet. Gleichwertige Konstruktionen werden hierzulande in den verschiedensten Abmessungen z. B. von den Firmen

Pharmacia
Whatman
Glenco-Serva
LKB

angeboten. Oft hat man ganze Chromatographiesysteme mit diversen Hähnen, Verbindungsstücken und anderen Erleichterungen entwickelt².

Das Detektorsystem ist auch hier von entscheidender Bedeutung. Ein enorm zuverlässiges und relativ einfaches Durchflußphotometer (LKB Uvicord) war jahrelang fast ausschließlich im Gebrauch. Inzwischen sind andere, empfindlichere, spezifischere oder universellere Meßprinzipien dazugekommen, die bisher jedoch nur relativ selten angewendet werden:

Brechungsindex
Adsorptionswärme
Flammenionisation
Leitfähigkeit

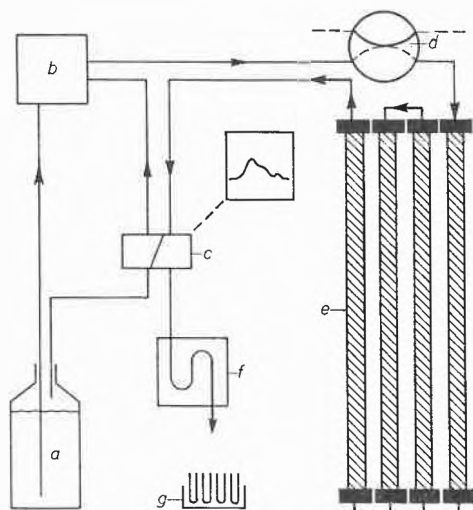


Abb. 5. Schematische Darstellung des Waters-Gelpermeationschromatographen. Aus einem Reservoir (a) wird mit einer Pumpe (b) Lösungsmittel über einen (nicht gezeichneten) Druckminderer durch die Referenzzelle des Differentialrefraktometers (c) gepumpt. Ein weiterer Strom geht durch einen Hahn (d), wo er eine gemessene Menge Lösung aufnehmen kann, durch die vier Trennsäulen (e) (je $0,95 \times 120$ cm) in die andere Zelle des Detektors. Von dort geht es über das Siphon (f) in den Fraktionensammler (g). Alle Verbindungen und die Kolonnen sind druckfest in Edelstahl ausgeführt

Es gibt ein komplettes Gerät für die sogenannte Gelpermeationschromatographie, das aus einer Anzahl von Styragel-Kolonnen, einer Pumpe und einem Differentialrefraktometer besteht. Das GPC von Waters Ass. (Abb. 5) ist mittlerweile in einigen hundert Exemplaren in den Untersuchungslaboratorien der Kunststoffindustrie in aller Welt verbreitet.

Inzwischen hat die Gelfiltration auch in den Bereich der industriellen Fertigung einen Durchbruch erzielt, seit es geeignete Geräte gibt, mit deren Hilfe man große Volumina beherrschen kann. Das *Sephomatic*-System erlaubt in seinen großen Ausführungsformen den Durchsatz von mehreren hundert Litern Lösung/Stunde.

Auch für eher technische Zwecke spielt die Korbzentrifuge (Abb. 6) bei der Handhabung sehr viskoser Lösungen eine Rolle¹³. Das Gelbett wird hier horizontal durchströmt, wobei die Probe mit einer künstlich erhöhten Schwerkraft durchgepreßt wird. In diesem Fall besteht die Packung nur aus den gequollenen Gelkörnern ohne umgebendes Lösungsmittel.

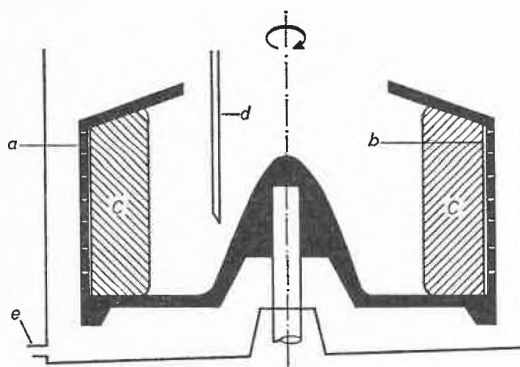


Abb. 6. Schematische Schnittzeichnung durch eine Korbzentrifuge; a) durchlöcherter Rotor; b) Filtereinlage; c) Gelbett; d) Einlaßrohr; e) Auslauf

2.3. Kleinster Maßstab

Wir haben vorhin gesehen, daß man – mit Hilfe geeigneter Apparaturen – auch große Substanzmengen handhaben kann. Hierfür werden später auch noch Beispiele vorgestellt werden. Erwähnt werden soll hier nur, daß man für kleinste Mengen auch noch eine spezielle Technik heranziehen kann, die Dünnschicht-Gelchromatographie. Hierbei handelt es sich gewissermaßen um eine offene Säule, d. h. das feuchte Gel ist auf einer Glasplatte ausgebreitet. Dies hat den Vorteil, daß man mehrere Proben leicht nebeneinander auftragen kann. Natürlich handelt es sich hier ausschließlich um eine analytische Technik. Die Platte wird dann, wie das aus Abb. 7 ersichtlich ist, über ein Filtrierpapier mit einem Lösungsmittelreservoir verbunden. Sie wird während der chromatographischen Trennung in geringem Abstand mit einer zweiten Platte («Sandwich») bedeckt, um das Austrocknen zu verhindern.

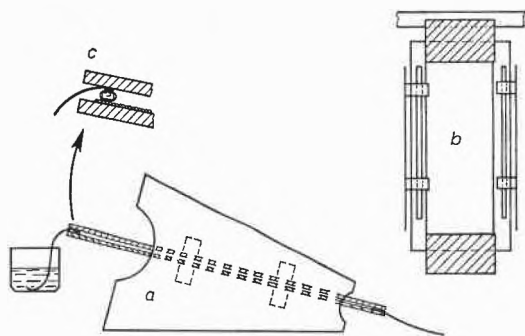


Abb. 7. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Dünnschicht-Gelchromatographie; a) Längsschnitt; b) Ansicht von oben; c) Detail der Papierauflage

3. Anwendungsbeispiele

Die Einsatzmöglichkeiten der Gelchromatographie lassen sich im Grunde in zwei Hauptgruppen einteilen: Sie ist zunächst ein Verfahren, um sehr große von sehr kleinen Molekülen zu trennen. Das bedeutet, daß das Molekulargewicht der einen Molekülsorte außerhalb der Ausschlußgrenze des verwendeten Gels liegt, während das Gel von der anderen Molekülsorte gänzlich durchdrungen werden kann. Diese Anwendung ist noch am ehesten mit einem Sieben oder mit einer Filtration zu vergleichen. Daher soll hierfür die Bezeichnung «Gel-filtration» gewählt werden. Liegt aber ein Gemisch von Molekülen abgestufter Größe vor, so muß man ein Gel wählen, dessen Fraktionierungsbereich möglichst diese Spanne überdeckt. Naturgemäß müssen dann – wegen der geringeren Unterschiede im Elutionsvolumen – die Versuchsbedingungen sehr sorgfältig gewählt werden. Diese Art von Trennoperationen soll hier mit «Gelchromatographie» bezeichnet werden.

3.1.1. Gelfiltration

Im Sinne der gegebenen Definition handelt es sich bei den als Gelfiltration im engeren Sinne zu beschreibenden Beispielen immer um die Trennung von Stoffen mit erheblichen Molekulargewichtsunterschieden. Besonders in der «Gelfiltration» tritt die Stofftrennung durch Chromatographie an porösen Gelen in Konkurrenz zu der seit langem gebräuchlichen Dialyse. Die Gelfiltration hat gegenüber der Dialyse den ganz wesentlichen Vorteil der erheblich kürzeren Versuchsdauer. Diese ist bei geschickter Wahl der Versuchsbedingungen unabhängig von der Größe des Ansatzes. Das kann bei empfindlichen Naturstoffen von ganz entscheidender Bedeutung sein. Einer noch stärkeren Verbreitung der Gelfiltration – anstelle der Dialyse – steht oft das Argument entgegen, daß eine Verdünnung der hochmolekularen Komponente befürchtet wird. Dies ist aber nur dann der Fall, wenn das Volumen der Probelösung nicht im rechten Verhältnis zu dem der Gelpackung steht.

Falls man beim Fraktionieren einen geringen Verlust an den Komponenten in Kauf nimmt, kann man beide (große und kleine Moleküle) praktisch unverdünnt isolieren. Dies gelingt immer dann, wenn man das *Volumen des Gelbettes* dem Volumen der zu entsalzenden Lösung, das meist vorgegeben ist, optimal *anpaßt*:

Wenn die Makromoleküle von den Gelkörnern ganz ausgeschlossen werden ($K_{av} = 0$) und die Salze ganz frei diffundieren können ($K_{av} = 1$), so ist der Unterschied im Elutionsvolumen gleich dem inneren Volumen der Gelpackung. So groß sollte dann auch das für eine vollständige Trennung gerade noch tragbare Probevolumen sein. Wenn man noch in Rechnung setzt, daß eine ganz freie Diffusion der Salze selten gegeben ist ($K_{av} < 1$) und die Banden sich überdies im Verlauf der Chromatographie etwas verbreitern, dann kommt man zu dem Schluß, daß das Probevolumen etwa 75% vom inneren Volumen betragen kann. Für die Sephadex-Gele G-25 und G-50 bedeutet dies, daß man ein Volumen von 40% des *gesamten Gelbettvolumens* starten kann und noch eine vollständige Entsalzung erhält.

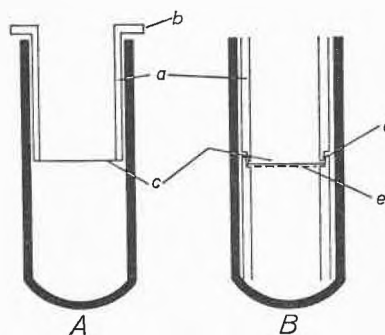


Abb. 8. Umrüstung eines gewöhnlichen Zentrifugenglases zu einer Korbzentrifuge; a) Plexiglasrohr; b) Haltering; c) Nylonnetz; d) Klebestelle; e) Unterstützung

Bei Nichtbeachtung dieser Vorschrift muß man oft eine beträchtliche Verdünnung in Kauf nehmen. Mit Hilfe einer besonderen Technik gelingt es aber auch mit Sephadex, empfindliche Polymerlösungen zu konzentrieren. Man bringt trockenes Sephadex G-25 (coarse) in verdünnte Lösung ein, läßt dieses quellen und entfernt das gequollene Gel durch Zentrifugieren. Hierzu bedient man sich vorteilhaft einer Siebzentrifuge. Abb. 8 zeigt einen Adapter für gewöhnliche Zentrifugengläser. Man kann mit Hilfe einer solchen einfachen Einrichtung in einem Schritt eine vielfache Konzentrierung erreichen (vgl. Tabelle 4). Für größere Mengen eignet sich dann wieder die vorhin gezeigte Korbzentrifuge.

Im Gegensatz zu allen anderen chromatographischen Trennmethode ist die Gelfiltration weitgehend unempfindlich gegenüber der Konzentration in der Probelösung. Lediglich der Viskositätsunterschied zwischen Probe und Elutionsmittel beeinträchtigt das Trennergebnis.

Tabelle 4. Konzentrierungsversuche mit Sephadex G-25 (coarse)

	Pepsin	Dextran
Wäßrige Lösung (ml)	35	50
Gehalt (mg/ml)	4,2	2
Sephadex G-25 (coarse) (g)	8	10
Wäßrige Lösung (ml)	16,5	25,5
Gehalt (mg/ml)	8,4	3,92
Konzentrierungsfaktor	2,1	1,96
Ausbeute (%)	95	100

Hochkonzentrierte und daher recht viskose Polymerlösungen lassen sich aber mit Hilfe der vorhin angedeuteten Zentrifugentechnik dennoch entsalzen, indem die Schwerkraft für den Transport der Probelösung künstlich erhöht wird. Für größere Mengen bedient man sich mit Vorteil der Korbzentrifuge. Das Gel befindet sich als Kuchen in dem Zentrifugenkorb; man kann das Wasser zwischen den Gelkörnern (V_0) abschleudern, so daß beim nachträglichen Aufgeben der Probe keine Verdünnung auftritt. Tabelle 5 zeigt ein Beispiel für die Trennung zwischen 160 g Dextran und 32 g Kochsalz in 500 ml Wasser¹³.

Tabelle 5. Entsalzung einer hochviskosen Lösung mit Hilfe der Korbzentrifuge

Zentrifuge	MSE basket 3000
Auskleidung	1/32" Vyon (poröses Polyäthylen)
Gelbettvolumen	3 Liter
Typ	Sephadex G-25 (fine)
Probelösung	160 g Dextran + 32 g NaCl in 550 ml Wasser ($\eta_{rel} = 100$)
Zentrifugat	142 g Dextran + 1,7 g NaCl in 650 ml Wasser
Kapazität	110 min/Ansatz = 2 kg Dextran/24 Stunden

Bei den Substanzen, die durch Gelfiltration gereinigt oder untersucht werden sollen, handelt es sich meistens um Naturstoffe, die in Wasser löslich sind. Daher werden zu diesen Versuchen in Wasser quellbare Gele herangezogen. In der Mehrzahl aller Fälle wurde das Dextrangel Sephadex G-25 verwendet, das alle Stoffe mit Molekulargewichten größer als etwa 5000 im äußeren Volumen passieren läßt. Diesem entspricht etwa das Bio-Gel P-4 oder P-6. Oft haben die untersuchten Makromoleküle wesentlich höhere Molekulargewichte, so daß man ohne weiteres das z. B. stärker quellbare Sephadex G-50 heranziehen konnte. Dieses Gel hat gegenüber dem meist verwendeten zwei wesentliche Vorteile: Zum einen ergibt 1 g Trockengel bei der Quellung ein doppelt so großes Gelbettvolumen, wodurch das Verfahren viel wirtschaftlicher ist. Zum anderen befindet sich dann natürlich in der Säule nur halb soviel von der Matrix, wodurch eine etwa störende Wechselwirkung der Makromoleküle mit der Gelphase erheblich reduziert wird.

Die Versuchsanordnung kann bei der Gelfiltration denkbar einfach sein. Die hier verwendeten – relativ stark vernetzten – Gele werfen keine Probleme bezüglich ihrer Handhabung auf. Die Gelpackungen brauchen

nicht besonders lang zu sein. Meist hat sich ein Verhältnis von Durchmesser zu Höhe wie 1:5 bis 1:10 gut bewährt. Entscheidend ist lediglich das Volumen. Auch die Konzentration der Komponenten spielt keine wesentliche Rolle, es sei denn, die Viskosität der Probelösung würde zu hoch.

Anhand eines kürzlich publizierten¹⁴ aktuellen Problems bei der Gewinnung von Protein-angereichertem Milchpulver aus Molke soll die Verwendbarkeit der vorhin gezeigten industriellen Großanlagen demonstriert werden. Zucker und Salz sollen im Protein vermindert werden. Abb. 9 ist das Blockdiagramm des Sephamatic-Systems.

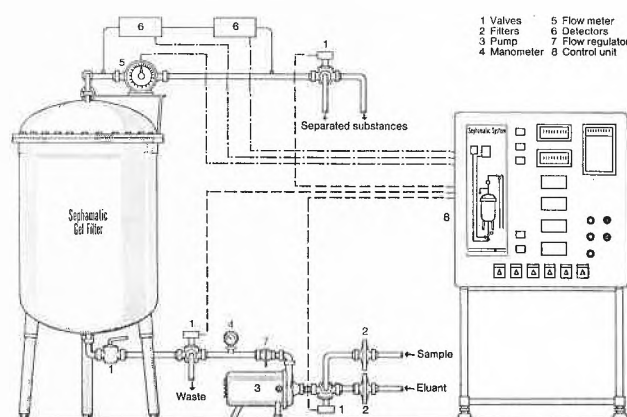


Abb. 9. Blockdiagramm für eine automatische Sephamatic-Anlage zur Gelfiltration im technischen Maßstab

Die Gelfiltration ist für das klassische Problem der «Entsalzung» von Kolloiden zur Methode der Wahl geworden. Daher wäre es sinnlos, hier auch nur die wesentlichsten Anwendungen alle referieren oder tabellieren zu wollen. Es sind bereits einige Möglichkeiten für Fehlerquellen aufgezeigt. Wenn die von Makromolekülen abzutrennenden niedermolekularen Stoffe keine Salze sind, so spricht man besser von einer «Gruppentrennung» aufgrund von Molekulargewichtsunterschieden. Hier kommen sehr viele verschiedene Möglichkeiten in Betracht. Oft resultiert ein solches Stoffgemisch aus Versuchen zur «Modifizierung von Makromolekülen». Dabei möchte man den Überschuß von Reagentien oder deren Umwandlungsprodukte nach der Reaktion wieder abtrennen. – Falls ein Polymeres mit niedermolekularen Stoffen in irgendeiner Wechselwirkung steht, so ermöglicht diese «Komplexbildung» in Verbindung mit der Gelfiltration bemerkenswerte präparative und analytische Möglichkeiten.

Chemische Umsetzungen an hochmolekularen Stoffen erfordern wegen der relativ geringen Reaktionsgeschwindigkeit erhebliche Reagentienüberschüsse. Diese Überschüsse müssen ebenso wie die möglichen Umwandlungsprodukte der Reagentien wieder entfernt werden. Besonders schonend kann dies wieder durch Gelfiltration erfolgen. Auch hier bewies die neue Technik der Gruppentrennung sehr bald ihre Überlegenheit über die

althergebrachte Dialyse. Das zeigen besonders die ausführlichen Versuche zur *Markierung* von Antikörpern mit *Fluorescein-Isothiocyanat*. Während man 5 bis 6 Tage dialysieren muß, um das angefärbte Protein wirklich frei von niedermolekularem Farbstoff zu bekommen, gelingt eine solche Reinigung an Sephadex G-25 oder G-50 in weniger als einer Stunde. Man kann sehr kleine Gelbettvolumina benutzen, weil die Trennung dadurch noch begünstigt ist, daß die niedermolekularen Farbstoffe von der Gelphase stark retardiert werden. Daher wird gelegentlich empfohlen, für jeden Versuch eine neue Säule zu verwenden.

3.1.2. Gelchromatographie

Wenn die Größenunterschiede zwischen den Komponenten eines Stoffgemischs nur gering sind, dann sind auch die zu erwartenden Unterschiede im Elutionsvolumen nicht groß. Hier würde man vielleicht besser von *Gelchromatographie* sprechen. Da das Separationsvolumen immer einen gewissen Bruchteil vom Gesamtvolumen des Gelbetts ausmacht, ist es klar, daß die Trennung – bei sonst gleichen Verhältnissen – um so besser wird, je länger die Säule ist. Natürlich muß auch die Porosität des verwendeten Gels dem Trennproblem optimal angepaßt sein. Man tut gut daran, die Wahl so zu treffen, daß möglichst nur eine der zu erwartenden Komponenten so groß ist, daß sie gar nicht in die Gelkörner eindringen kann. Streuen die Molekulargewichte über einen sehr großen Bereich, so wird man zweckmäßigerweise nach einer Vortrennung an einem Gel mit mittlerer Porosität die niedermolekulare Fraktion an einem engporigen und den hochmolekularen Anteil an einem weitporigen Gel erneut chromatographieren.

Die Chromatographie der Serumproteine an den verschiedenen Sephadex-Typen (Abb.10) illustriert diese Überlegung. Viele Enzymproteine neigen zu Assoziations- und Dissoziationserscheinungen, welche sich natürlich besonders einfach mit der Gelchromatographie nachweisen lassen.

Die Gelchromatographie spielt nicht nur bei der Reindarstellung von Makromolekülen, sondern auch bei der Ermittlung ihrer Struktur eine wichtige Rolle. So wur-

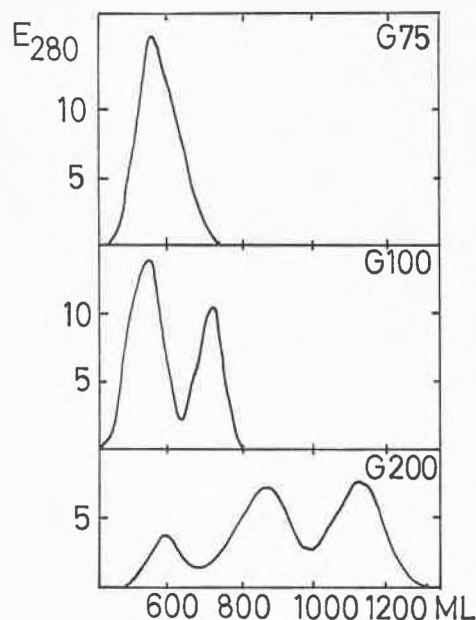


Abb.10. Schematische Darstellung der Auftrennung der Plasmaproteine an den verschiedenen Sephadex-Typen

den Oligopeptide vielfach an den dichteren Dextran-gelen fraktioniert. Ein besonders übersichtliches Beispiel stellt die sogenannte *Plasteinreaktion*¹⁵ dar (Tabelle 6), in deren Verlauf Oligopeptide unter Wasser-austritt (bei Pepsin-Katalyse) zu höhermolekularen Polypeptiden zusammentreten. Die verschiedenen Oligomeren lassen sich sehr schön an Sephadex G-25 trennen, wie in Abb.11 gezeigt ist. Ebenso sind natürlich Oligosaccharide, wie z. B. aus dem Abbau der Stärke, zu trennen und zu analysieren¹⁶.

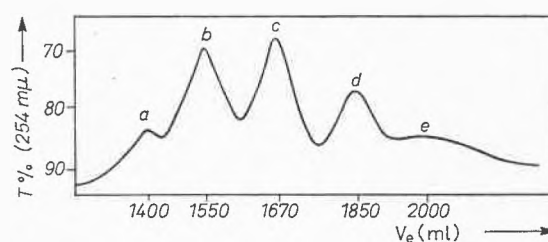


Abb.11. «Plasteins» aus Tabelle 6 an Sephadex G-25

Tabelle 6. «Plastein»-Kondensation eines Pentapeptids unter Pepsin-Katalyse

	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH
	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH
	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH
	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH
	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH
(e)	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH
(d)	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH
(c)	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH
(b)	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH
(a)	H-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Leu-Pro-Glu-Phe-OH

3.2.1. Molekulargewichtsbestimmung

An ein und derselben Säule ist das von der Molekülgröße abhängige Elutionsvolumen einer bestimmten Substanz sehr gut reproduzierbar. Daher liegt es nahe, nun umgekehrt vom Elutionsvolumen auf das Molekulargewicht einer unbekannten Substanz zu schließen. Hierzu ist natürlich notwendig, die Säule zu eichen, d. h. die Elutionsvolumina von Testsubstanzen mit deren Molekulargewichten in eine Beziehung zu setzen. Es ist so gut wie sicher, daß bei der Gelchromatographie von Makromolekülen die Trennung durch Differenzen in der molekularen Ausdehnung zustande kommt. Bei dem sehr unterschiedlichen Bau, den die Makromoleküle aufweisen können, ist die Beziehung zwischen Molekülgröße und Molekulargewicht aber für jeden Typ eine andere. Daher müssen die *Eichsubstanzen* möglichst eng mit den zu untersuchenden Stoffen verwandt sein.

Unter allen Polymeren nehmen die Proteine deswegen eine Sonderstellung ein, weil sie mit einem genau definierten Molekulargewicht schon in der Natur vorkommen. Daher sind sie auch meistens zur Standardisierung von in Wasser quellbaren Gelen herangezogen worden. Dabei ist zu beachten, daß bezüglich der Angaben über das Molekulargewicht bei vielen Proteinen in der Literatur mehr oder weniger erhebliche Abweichungen bestehen. Man kennt bei den globulären Proteinen außer dem chemischen Molekulargewicht meist auch die Abmessungen. Daher kann man mit Hilfe einer durch Proteine geeichten Säule oft auch Aufschluß über den Wirksamkeitsradius von anderen Makromolekülen erhalten.

Tabelle 7. Eichproteine für Abb. 12

Nr.	Protein	Molekulargewicht
1	Cytochrom c	13000
2	Ribonuclease A	13600
3	Myoglobin	17800
4	Trypsin-Inhibitor (Soja-Bohne)	21500
5	α -Chymotrypsin	22500
6	Trypsin	24000
7	Chymotrypsinogen A	25000
8	Pepsin	35500
9	Eialbumin	45000
10	Serumalbumin (Rind, monomer)	67000
11	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase	117000
12	Serumalbumin (Rind, dimer)	134000
13	Aldolase (Hefe)	147000
14	γ -Globulin (human)	140000
15	Alkoholdehydrogenase (Hefe)	150000
16	Katalase	230000
17	Kallikreininhibitor	6500
18	Trypsin-Inhibitor (Lima-Bohne)	8400
19	Methämoglobin	17000
20	Peroxydase-I	40000
21	α -Hydroxysteroiddehydrogenase	47000
22	Phosphoglyceratmutase	64000
23	Malatdehydrogenase	79000
24	Enolase	80000
25	Kreatinphosphatkinase	81000

Wie bereits besprochen wurde, läßt sich das Elutionsverhalten eines Stoffes bei der Gelchromatographie durch verschiedene, von dem Elutionsvolumen (V_e) abgeleitete Größen beschreiben. In der Praxis wird in den meisten Fällen von der linearen Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom Logarithmus des Molekulargewichts Gebrauch gemacht. Abb. 12 zeigt eine Schar solcher Eichgeraden für verschiedene Sephadex-Gele¹⁷ (Meßpunkte vgl. Tabelle 7).

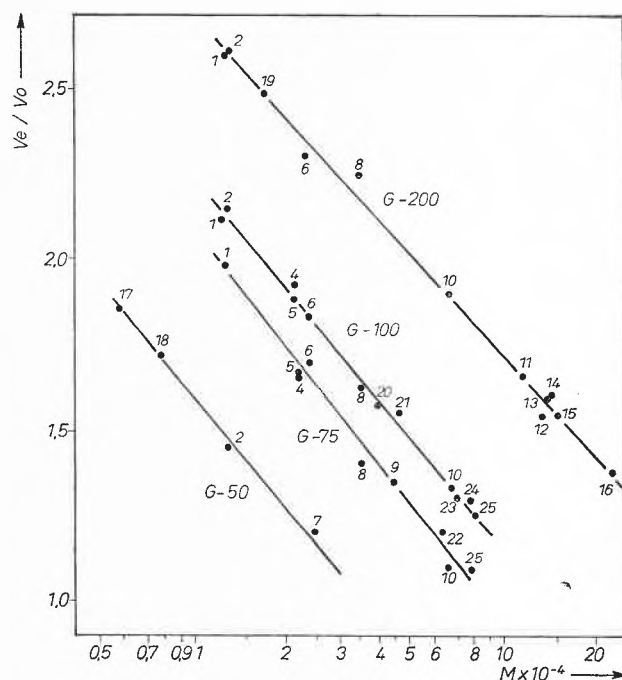


Abb. 12. Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom Molekulargewicht für die Proteine aus Tabelle 7

Die Experimente dazu stammen aus ganz verschiedenen Laboratorien. In Anbetracht der trotzdem nur geringen Abweichungen von der durch Fehlerrechnung ermittelten Geraden kann man den *Gleichungen* dieser Geraden (Tabelle 8) eine allgemeine Bedeutung zusprechen. Man braucht also von einer Sephadex-Gelpackung lediglich das Volumen außerhalb der Gelpartikel (V_0) zu kennen (bestimmt durch das Elutionsvolumen einer vollständig ausgeschlossenen Substanz), um von unbekannten globulären Proteinen aus dem Elutionsvolumen mit Hilfe dieser Gleichungen das entsprechende Molekulargewicht auszurechnen.

Die Versuchstechnik ist bei der Molekulargewichtsbestimmung grundsätzlich die gleiche wie bei der Auftrennung von Stoffgemischen. Man hat lediglich *Elutionsvolumina* zu messen. Diese Messung wird um so genauer sein, je größer die Gelpackung ist. Wenn aber der Querschnitt groß ist, muß man (zum sicheren Nachweis im Eluat) eine entsprechend große Menge der Probelösung (bzw. der Eichsubstanzen) starten. Um dies zu vermeiden, wird man möglichst dünne, lange Säulen für die Molekulargewichtsbestimmung benutzen.

Tabelle 8. Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen von globulären Proteinen an Sephadex-Gelen

Gel-Typ	Gleichung	Erklärung
G-75	$\lg M = 5,624 - 0,752 (V_e/V_o)$	M = Molekulargewicht
G-100	$\lg M = 5,941 - 0,847 (V_e/V_o)$	V_e = Elutionsvolumen
G-200	$\lg M = 6,698 - 0,987 (V_e/V_o)$	V_o = Ausschlußvolumen
Allgemein	$\lg M = M_0 - (6,062 - 5,00 \cdot d) (V_e/V_o)$	d = Dichte des gequollenen Gels

Die Gelchromatographie steht bei der Bestimmung von Proteinmolekulargewichten in Konkurrenz zur Bestimmung der Sedimentationstanten in der Ultrazentrifuge. Der erhebliche apparative Aufwand letzterer Methode liefert Ergebnisse, die sicher exakter zu reproduzieren sind.

3.2.2. Molekulargewichtsverteilung

Ganz anders ist die Situation bei der Analyse von polydispersen Polymergemischen, wie sie immer in den synthetischen Hochpolymeren vorliegen. Hier kann man mit der Ultrazentrifuge sehr wenig ausrichten. Das Polymere müßte vorher erst fraktioniert und dann analysiert werden. Die hierfür bis vor wenigen Jahren noch ausschließlich üblichen Techniken waren ungeheuer zeitraubend, mühevoll und ungenau. Mit Hilfe der Gelchromatographie an einer vorher geeichten Gelpackung kann man heute Auftrennung und Analyse ungleich viel schneller, sparsamer und vollständig automatisch bewerkstelligen. Das vorhin kurz skizzierte GPC von Waters löst eine solche Aufgabe innerhalb von 4 Stunden. Durch die Vielzahl der Analysen, die jetzt möglich werden, treten naturgemäß wieder neue Probleme auf: für die Eichung stehen im wesentlichen nur einigermaßen einheitliche Polystyrolfraktionen zur Verfügung. Ein gewisses Unbehagen verursacht die Übertragung deren Werte auf andere Polymere. Immerhin scheint die Elution weitgehend vom Lösungsmittel und von der Temperatur unabhängig zu sein, wie sich aus Abb. 13 ergibt, in der Werte aus drei verschiedenen Analysen (A: Toluol, 90°; C: THF, 55°; D: Tetralin, 125°) zu einer Eichkurve vereinigt sind!

Die Aufnahme der Molekulargewichtsverteilung für einen Kunststoff ist mit dieser Methode heute kein Problem mehr. Der Vergleich mit den herkömmlichen Methoden der Polymerfraktionierung ergibt eine sehr weitgehende Übereinstimmung. Die Zeit ist nicht mehr fern, wo auch der Kunststoffverarbeiter zur Charakterisierung seines Rohstoffes ein Gelchromatogramm verlangen kann, statt sich auf mehr oder weniger pauschale Viskositätswerte verlassen zu müssen.

Es war nicht möglich, in solch einer Zusammenfassung sämtliche Anwendungsformen der Gelchromatographie zu besprechen. Vor allem sind hier die Wege zur Sub-

stanztrennung *ohne* Molekulargewichtsunterschiede mit Hilfe dieser Gele ausgelassen worden. Ebenso mußten wir auf die Erörterung der für die Trennwirkung vorgeschlagenen Mechanismen verzichten und uns hier auf die eingangs erwähnten einfachen Modellvorstellungen beschränken. Wir haben hier – schon wegen des chemisch-technischen Anlasses – besonders auch Wert gelegt auf Hinweise zum Einsatz der neuen Methode in der chemischen Industrie.

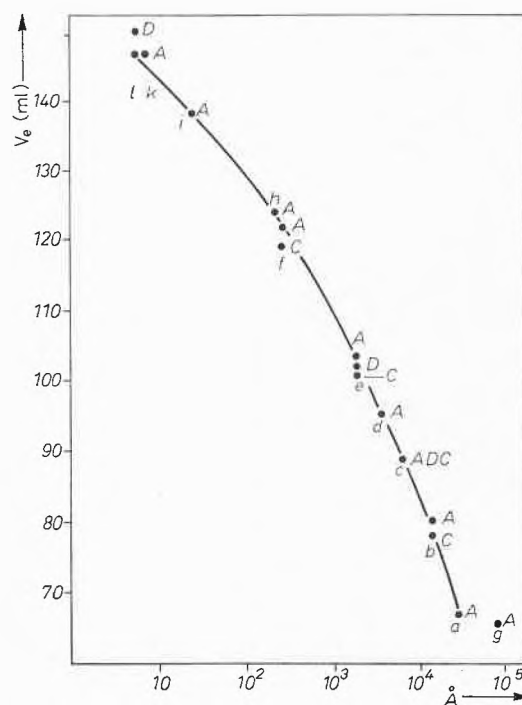


Abb. 13. Das Elutionsvolumen von Polystyrol-Standards (a–g), zwei Polyäthylenglykolen (h, i), (k) *ortho*-Dichlorbenzol und (l) Aceton an einem $5 \cdot 10^4$ -Å-Polystyrol-Gel in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Polymeren in Å (Ordinate); Gelbett $0,775 \times 366$ cm = (172 ml)

4. Literatur

1. J. PORATH und P. FLODIN, *Nature* 183 (1959) 1657.
2. Vgl. H. DETERMANN, *Gelchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York 1967.
3. J. STAUFF, *Kolloidchemie*, S. 669 ff., Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1960.

4. Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala (Schweden).
5. Biorad Laboratories, Richmond (Kalifornien, USA).
6. K. A. GRANATH und P. FLODIN, *Makromol. Chem.* 48 (1961) 160.
7. T. C. LAURENT und J. KILLANDER, *J. Chromatogr.* 14 (1964) 317.
8. A. POLSON, *Biochim. Biophys. Acta* 50 (1961) 565.
9. H. DETERMANN, H. REHNER und TH. WIELAND, *Makromol. Chem.* 114 (1968) 263.
10. E. NYSTRÖM und J. SJÖVALL, *J. Chromatogr.* 17 (1965) 574; *Anal. Biochem.* 12 (1965) 235.
11. K. H. ALTGELT und J. C. MOORE, Gel Permeation Chromatography, in CANTOW (Herausgeber), *Polymer Fractionation*, Academic Press, New York 1966.
12. A. J. DE VRIES, M. LE PAGE, R. BEAU und C. L. GUILLEMIN, *Anal. Chem.* 39 (1967) 935.
13. B. GELOTTE und A. EMNÉUS, *Chem.-Ing.-Techn.* 38 (1966) 445.
14. L. EK, *Proc. Biochem.* 3 (1968) 25.
15. H. DETERMANN und R. KÖHLER, *Liebigs Ann. Chem.* 690 (1965) 197.
16. P. FLODIN und K. ASPBERG, *Biological Structure and Function*, Band 1, S. 345, New York 1961.
17. H. DETERMANN und W. MICHEL, *J. Chromatogr.* 25 (1966) 303.
18. J. C. MOORE und J. G. HENDRICHSON, *J. Polymer Sci. (Part C)* 8 (1965) 233.