

Hohe Trennstufenzahlen oder bessere Selektivitäten?

Herrn Prof. Dr. Klaus K. Unger zum 65. Geburtstag



Günter J. Eppert



Irene Schinke

Die chromatographische Auflösung zweier Peaks ist im wesentlichen durch die Trennstufenzahl der Trennsäule und durch die Selektivität des Phasensystems gegeben. Eine Investition in letztere zahlt sich immer aus. Die derzeitigen Möglichkeiten der Oberflächenmodifizierung an reinsten Silikagelen erlauben Synthesen hochselektiver Packungsmaterialien, die schon mit durchschnittlichen Trennstufenzahlen beste Voraussetzungen zu differenzierten Lösungen komplizierter Trennprobleme aufweisen. Es wurde herausgearbeitet, dass für eine gute Selektivität unpolare (hydrophobe) und polare (hydrophile) Wechselwirkungen prinzipiell wesentlich sind. Ihr Verhältnis sollte der Trennaufgabe angepasst sein. Eine Steigerung polarer Wechselwirkungen ist über die Erhöhung des Silanolgruppenanteils des RP-Materials oder über Amidgruppeneinbindungen in Alkylketten (Embedded Groups) möglich. Beide Wege können zu ähnlichen Ergebnissen führen. Die Problematik wird an den Trägern UltraSep ES PAH QC, UltraSep ES Chair, UltraSep ES RP18 M500 und UltraSep ES Amid RP18 diskutiert.

Keywords

Chromatographische Auflösung, Trennstufenzahlen, Phasenselektivität, Silikagele, Oberflächenmodifizierung, Silanolgruppen, Embedded Groups, NPS-Träger, RP-Phasen

Um die chromatographische Trennung zweier Verbindungen, d. h. die Auflösung ihrer Signale im Chromatogramm zu erreichen, kann man entweder die Trennstufenzahl der Trennsäule oder die Phasenselektivität des Trennsystems verbessern. Oft sind hohe Trennstufenzahlen das erklärte Ziel des Chromatographers, und die vielen Möglichkeiten zur Problemlösung durch Selektivitätsveränderungen werden unterschätzt. Zu Beginn der neunziger Jahre wurde die Entwicklung von Packungsmaterialien kleiner Korngröße in Form unporöser, monodisperser 1,5 µm – Teilchen (NPS-Träger) stark forciert. Man griff damit auf frühere Arbeiten zurück. 1983 hatte K. K. Unger solche Materialien für Proteintrennungen eingeführt [1]. Ziel der „Renaissance“ waren hohe Trennstufenzahlen, kurze Analysenzeiten und die allgemeine Anwendbarkeit der NPS-Träger auf beliebige Trennprobleme. In den letzten Jahren brachten mehr und mehr Firmen RP-Phasen mit Alkylketten eingebundenen (embedded) polaren Gruppen auf den Markt, ein Boom, der zu Recht die vernachlässigte Phasenselektivität in den Vordergrund stellt.

Theoretische Ausführungen

Die Auflösung R_S zweier Peaks ist im wesentlichen eine Funktion der Trennstufenzahl N (Einheit TP, Theoretical Plates) und der Phasenselektivität S . Es gilt $N = L/H_T$ (Trennsäulenlänge/Trennstufenhöhe). N stellt ein Maß für die Trennwirksamkeit der Säule dar und nicht etwa ein Maß für die Trennleistung. Die Trennleistung des Systems ist als Leistungsgröße zeitbezogen und gegeben durch $\dot{N} = N/t_{RI}$ (Trennstufenzahl/Bruttoretentionszeit) mit der Einheit TP/s.

Ferner gilt $S = \ln\alpha$. α ist der Selektivitätskoeffizient oder Trennfaktor zweier Komponenten, gegeben durch das Verhältnis ihrer Nettoretentionsgrößen t'_{RI} bzw. k_f . Vgl. hierzu Tab. 1 [2]. Die allgemeine Gleichung [3] für die Auflösung zweier Gaußpeaks der Komponenten 1 und 2 lautet explizit

$$R_S = \sqrt{N_2} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \cdot \frac{\bar{k}}{(1 + k_2) + (1 + k_1) \sqrt{(N_2 / N_1)}} \quad (1)$$

Für $N_2 = N_1$ ergibt sich hieraus die empfehlenswerte Näherungsgleichung von Said [4]:

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot 2 \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \cdot \frac{\bar{k}}{(1 + \bar{k})} \quad (2)$$

\bar{k} ist das arithmetische Mittel der Kapazitätsfaktoren (Nettoretentionszeit/Totzeit) der Komponenten. Im praktisch relevanten Bereich $1 < \alpha < 1,5$ gilt $S = 2 \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} = \ln\alpha$ [3].

$\sqrt{N} = E$ heißt Effektivität. Wenn man diese Größen in Gl. (2) einführt, folgt die vereinfachte Beziehung

$$R_S = E \cdot S \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{\bar{k}}{(1 + \bar{k})} \quad (3)$$

und schließlich

$$\boxed{R_S = E \cdot S \cdot C} \quad (4)$$

Der für die Auflösung meist weniger wichtige Kapazitätsterm und der Zahlenfaktor wurden mit dem Buchstaben C zusammengefasst.

Die Effektivität E (bzw. die Trennstufenzahl N) der Trennsäule ist abhängig vom Partikeldurchmesser d_p , der Trennsäulenlänge L , dem eingestellten Volumenfluss \dot{V} , der Art der Kompaktphase (stationären Phase) KPh , der Zusammensetzung der fluiden Phase (mobilen Phase) FPh und der Trenntemperatur T (praktisch auch noch von der für die Bestimmung von N gewählten Verbindung):

$$E = \sqrt{N} = f(d_p, L, \dot{V}, KPh, FPh, T) \quad (5)$$

Die Selektivität S stellt lediglich eine Funktion von KPh , FPh und T dar:

$$S = f(KPh, FPh, T) \quad (6)$$

Welches Potential bietet die Trennsäulen-Effektivität?

Zur Interpretation von Gl. (5) muß man wissen (Lehrbücher der HPLC), dass

Tab. 1: α ist der Selektivitätskoeffizient, t'_{Ri} die Nettoretentionszeit (Bruttoretentionszeit minus Totzeit). Die Selektivität S setzt sich additiv aus den Bereichen der stationären (Index KPh) und der mobilen (Index FGh) Phase zusammen. ΔG° ist die partielle molare freie Standardenthalpie des Phasenübergangs der betreffenden Komponente, und es gilt $\Delta\Delta G_{21}^\circ = -RT \cdot S$.

$\alpha = t'_{R2}/t'_{R1}$	1	1,04	1,20	2,72
$S = S_{KPh} + S_{FGh} = \ln \alpha$	0	0,04	0,18	1,00
$S \cdot 100$	0	4	18	100
$-\Delta\Delta G_{21}^\circ / \text{kJ/mol}$	0	0,1	0,45	2,5

Tab. 2: Eigenschaften der Non Porous Silica (NPS) Träger.

Vorteile der 1,5 μm NPS-Träger

- keine stagnierende fluide Phase (es gibt keine Poren)
- monosphärische Partikel (alle Partikel haben gleichen Durchmesser)
 - kleine Diffusionswege, hohe Trennstufenzahlen bis 350 000 TP/m; 350 000 TP/m → (4,6 x 33 mm) ~ 12 000 TP
- gegenüber porösen Teilchen geringerer Druckabfall
- sehr schnelle Trennungen sind möglich (<1 min)

Nachteile der NPS-Träger

- geringe spezifische Oberfläche*
 - Eluensänderung bei Methodentübertragung**
 - geringe Probenkapazität, schnelle Kontamination
 - nur kleine externe Gerätevarianzen sind zulässig
 - bei Spurenanalysen hohe Detektorempfindlichkeit erforderlich
 - Begrenzte Modifizierungsmöglichkeiten

* die wirksame Oberfläche beträgt 4 m²/ pro ml Säulenvolumen
 **bei RP-Material ist der Wasseranteil im Eluens zu erhöhen

Tab. 3: Oberflächenmodifizierungsmöglichkeiten bei Silikagelen.

RP - Phasen

$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{O} - \text{Si} - \text{R}(n) \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad n = 1, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 18, 30^*$

$\begin{array}{c} \text{O} \backslash \text{CH}_3 \\ \text{O} \quad \text{Si} - \text{R}(n) \end{array}$

$\begin{array}{c} \text{O} \backslash \\ \text{O} - \text{Si} - \text{R}(n) \\ \text{O} \backslash \end{array}$

horizontale und vertikale Polymerisation

Endcapping
Belegungsdichte
→ SiOH Durchgriff

Normal - Phasen

Chirale Phasen

* Anzahl der Ketten-C-Atome

Umgekehrt proportional zum Partikeldurchmesser (gilt für $d_p < 10 \mu\text{m}$) und proportional zur Trennsäulenlänge wächst. $N \propto 1/d_p$, L bietet vordergründig günstige Möglichkeiten zur Erzielung einer verbesserten Auflösung durch die weitere Steigerung der Trennsäuleneffektivität via Senkung des Partikeldurchmessers unter den derzeit meist verwendeten Größenbereich von 5 bis 7 μm . Aber gleichzeitig wächst der entsprechende Trennsäulenvordruck umgekehrt proportional zum Quadrat des Partikeldurchmessers, $\Delta P \propto 1/d_p^2$, L, was diesem Vorhaben schnell Grenzen setzt. So ist es hauptsächlich bei der Anwendung poröser Silikagele bis herab zu 3 μm Partikeldurchmessern mit Säulenlängen von maximal 250 mm geblieben. Solche Trennsäulen können 150 000 TP/m erreichen, jedoch mit wässrigen Eluenten, je nach den Bedingungen, auch weit mehr als 300 bar Säulenvordruck ergeben. Letzteres wird beim gegenwärtigen Gerätestandard weniger gern in Kauf genommen. Mit 1,5 μm (unporösen) NPS-Trägern lassen sich 350 000 TP/m erreichen. Um den Vordruck bei diesen Teilchen akzeptabel zu halten, werden kurze Säulen (4,6 x 33 mm) angeboten. Effektiv hat man dadurch bestenfalls 12.000 TP zur Verfügung, weniger als mit porösen 5 μm Partikeln in einer 250 mm langen Säule. Allerdings gestatten die kurzen Säulen ein sehr schnelles Arbeiten (Tab. 2), und es lassen sich Trennleistungen von 200TP/s glatt realisieren. Abb.1 zeigt ein Chromatogramm an porösem Silikagel UltraSep ES PAH, bei dessen Herstellung (anders als vorstehend beschrieben) nach einem Konzept verfahren wurde, das über hohe spezifische Phasenselektivität für alle Polyaromaten Grundlinientrennung an-

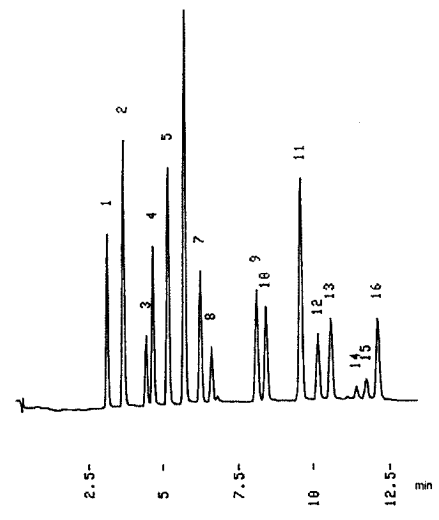


Abb. 1: Probe: 16 polycyclische Kohlenwasserstoffe nach EPA; Träger: UltraSep ES PAH QC, 4 μm ; Säule: 60 x 3 mm; Eluens: Acetonitril (AN)/Wasser (W), Gradient 40-100 Vol. - % AN/ 12 min; Fluss: 1 ml/min; Detektionswellenlänge: 254 nm; Raumtemperatur

strebt und der Trennwirksamkeit eine untergeordnete Rolle beimisst. Mit 4 μm Partikeln, wie in Abb. 1, kann man natürlich zusätzlich kurze Analysenzeiten erhalten; aber die gleiche Qualität der Trennung zeigen auch Partikel vom doppelten Durchmesser, und der Säulenvordruck ist dann niedrig. Der Spielraum zur Erhöhung von R_s über N ist an gepackten Säulen generell gering: Zwei Peaks seien unzureichend getrennt mit einer Auflösung von $R_s = 0,8$, gemäß Gl. (4) als Produkt aus $E = 100$, $S = 0,04$ und $C = 0,2$. Erhöht man R_s durch $S = 0,075$ auf 1,5, resultiert Grundlinientrennung der Peaks; das kann möglicherweise schon mittels S_{FGh} allein erreicht werden. Der gleiche Auflösungsgrad von 1,5 errechnet sich mit $E = 190$ und $S = 0,04$. Aber $E = 190$ entspricht rd. 36.000 TP und kann nur mit 3 μm -Material und entsprechend großem ΔP realisiert werden.

Welches Potential bietet die Trennsäulen-Selektivität?

Entsprechend Gl. (6) ist die erreichbare Selektivität bei einer Trennung in erster Linie von der gewählten Kompaktphase (stationären Phase) KPh abhängig. Mit anderen Worten: das Packungsmaterial der Trennsäule, seine Art und Oberflächenmodifizierung spielen die entscheidende Rolle. Sie bestimmen in erster Instanz die Spezifik und Stärke der Wechselwirkungen mit den Zielkomponenten. Bereits kleinste Unterschiede können große Effekte ergeben. Tab. 3 zeigt verschiedene Phasentypen und Modifizierungsmöglichkeiten an Silikagelen mit Alkyl- oder Chlorsilanen. Chirale Phasen und Normalphasen werden nicht betrachtet.

Die Einflußnahme auf das Selektivitätsverhalten beginnt bereits mit der Gelsynthese durch gezielte Einstellung der Textur (spezifische Oberfläche, mittlerer Porendurchmesser, spezifisches Porenvolumen) und dominiert bei der Oberflächenmodifizierung des Gels durch Wahl von Funktionalität und Art des eingesetzten Silans. Selbstverständlichkeit sind heute hochreine metallfreie Silikagele, wie das von SepServ hergestellte UltraSep ES. Es nahm lange Zeit unter der früheren Bezeichnung „ES Gel Leuna“ hinsichtlich Reinheit und Inertheit gegenüber polaren und basischen Verbindungen eine Spitzenstellung ein [5]. Der Grund liegt in der aus destilliertem Tetraethoxysilan durchgeführten Herstellung dieser Gele (ab 1975). Die Bedeutung von Tetraethoxysilan als hochreines, definiertes Ausgangsmaterial für Kieselgele hatte Unger schon 1965 erkannt [6].

Eine sehr wichtige Einflußgröße auf das Selektivitätsverhalten von RP-Trägern ist ihre Belegungsdichte mit Alkylresten. Der Trennmechanismus an diesen Phasen beruht zwar vordergründig auf hydrophoben Wechselwirkungen [7], aber mehr oder weniger stark greifen stets hydrophile Wechselwirkungen durch vorhandene ungebundene Silanole in das Trenngeschehen ein. Dieser „Silanoldurchgriff“, den man über die Belegungsdichte der Alkylreste maximieren oder minimieren und über das sog. Endcapping noch weiter reduzieren kann, ist für viele Trennungen ausschlaggebend. Es erscheint ausgesprochen unzumutbar, wenn manche Anwender nur RP-Träger mit Endcapping einsetzen wollen. Sie vergeben eine wichtige Optimierungsmöglichkeit, weil sie irrtümlicherweise glauben, dass Silanole generell zu Tailing führen [5]. Besonders günstige Möglichkeiten zur Erzeugung trennproblembezogener Selektivitäten bieten trifunktionelle Silane durch wahlweise Anwendbarkeit der sog. horizontalen und vertikalen Polymerisation während der Herstellung.

Bei Kenntnis der notwendigen Randbedingungen liefert die Synthese maßgeschneiderter RP-Phasen exzellente Ergebnisse. Ein Kundenbeispiel soll dabei speziell die Bedeutung der Wechselwirkungen der Silanolgruppen illustrieren. Die zur Diskussion stehende Aufgabe war eine präparative Isolierung relevanter Nebenprodukte eines in der Entwicklung befindlichen Pharmakons mit basischen Gruppen und einer Carboxygruppe. Obwohl vom Bearbeiter 20 (!) kommerzielle Phasen auf ihre Eignung getestet wurden, darunter z. B. Kromasil C18, µBondapak C18, Hypersil ODS und

UltraSep ES Pharm RP18E, konnte keine befriedigende Trennung erreicht werden. Auch XTerra RP18 ergab keine Lösung des Problems. Mit XTerra (Waters) wurde übrigens ein Material verwendet, das matrixintern Methylgruppen trägt. Hierin liegt eine weitere Modifizierungsmöglichkeit von Silikagelen, die sog. Bulk-Modifizierung, die auf Unger zurückgeht [8].

Der Grund des Misserfolgs mit all diesen „verschiedenen“ Trägern lag sicherlich in erster Linie darin, dass die Hersteller von Standardphasen i. allg. hohe Bedeckungsgrade ihrer Materialien anstreben, woraus eine gewisse Uniformität resultiert. Erst die zielgerichtete Synthese eines durch Methyloctadecylgruppen derivatisierten UltraSep ES-Gels mit geringer Oberflächenbedeckung (5,5 % C) und somit ausreichender Anzahl nicht umgesetzter Silanolgruppen ergab ein geeignetes Packungsmaterial, das die Nebenprodukte ausgezeichnet auftrennte und dem Bearbeiter auf diese Weise ihre präparative Isolierung erlaubte (UltraSep ES RP18 M 500).

Wenn zur Trennung polarer Verbindungen, wie in obigem Beispiel, erst das Zusammenspiel hydrophober und hydrophiler Wechselwirkungen durch Silanole zu optimalen Ergebnissen führt, sollten auch in oder an Alkylketten gebundene polare Gruppen eine solche Rolle übernehmen und unter Abschirmung der Silanole spezifische Wechselwirkungen aufbauen. Auf dieser Überlegung beruht die Entwicklung von UltraSep ES Chair (Abb. 2), eines Trägers, der von SepServ seit 1993 hergestellt und verkauft wird. Seine Kette an der Träeroberfläche kann man sich als „Stuhl“ geformt vorstellen [9]. Sie erinnert an einen „fixierten Modifizierer“. Der Träger ist u. a. für schwierig zu chromatographierende Basen, wie z. B. Perazin, prädestiniert (Abb. 3). In den letzten Jahren wurden ähnliche Träger mit Alkylketten eingebundenen (internen) polaren Gruppen zunehmend unter der Bezeichnung „polar

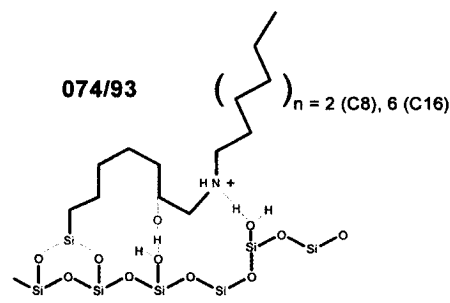


Abb. 2: Struktur und Oberflächenlage der Alkylkette mit 8 oder 16 C-Atomen am Träger UltraSep ES Chair (schematisch) mit eingebetteter Aminogruppe und mit einer Hydroxygruppe am Spacer

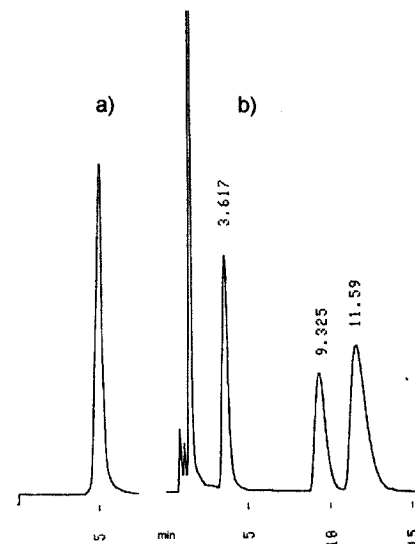


Abb. 3: Probe: a) α , α' -Bipyridyl, b) Clozapin (ohne Retentionsangabe), Perazin (3,6 min), Propriptylin (9,3 min), Amitriptylin (11,6 min); Träger: UltraSep ES Chair; Säule: 125 x 3 mm; Eluens: a) 10 mM TFA (Trifluoressigsäure) in W, b) 10 mM TFA AN/W=1/4 (V/V); Fluss: 0,25 ml/min; Detektionswellenlänge: 254 nm; Temperatur: 36 °C

embedded phases“ auf den Markt gebracht.

Als polare Einbettungen sind vor allem einzelne Amidgruppen oder Amidgruppen im Ensemble einer komplexeren Gruppierung (Harnstoff-, Carbamat(Urethan)gruppen) sowie Aminogruppen geeignet. Zur Synthese lassen

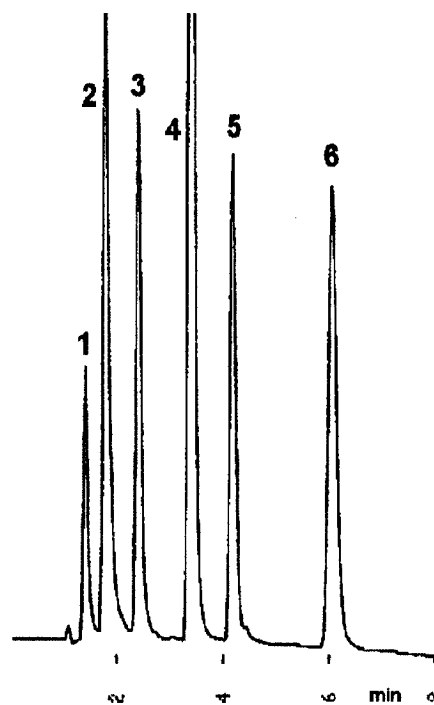


Abb. 4: Probe: Testmischung aus 1-6; Uracil (1), Pyridin (2), Phenol (3), N,N-Dimethylanilin (4), Toluol (5), 4-Butylbenzoesäure (6); Träger: UltraSep ES Amid RP18; Säule: 150 x 3 mm; Eluens: 50 mM Phosphorsäure pH 3,2/AN=35/65 (V/V); Fluss: 0,42 ml/min; Detektionswellenlänge: 254 nm; Raumtemperatur

sich bekannte Reaktionen heranziehen. Anfangs wurden 3-(Alkylamid)propylsilikagele mittels der schon von Emil Fischer zur Peptidsynthese verwendeten Säurechloridreaktion hergestellt [10]. Nachstehende Gleichungen formulieren einige bei SepServ verwendete Reaktionswege:

dargestellte typische Chromatogramm. Abb. 5 zeigt zum Vergleich links die Auftrennung desselben Gemisches unter denselben Bedingungen an einem normalen RP-Träger und rechts ein Chromatogramm, das man nach Endcapping des gleichen RP-Trägers erhält. Die weitestgehende Eliminierung der Silanole

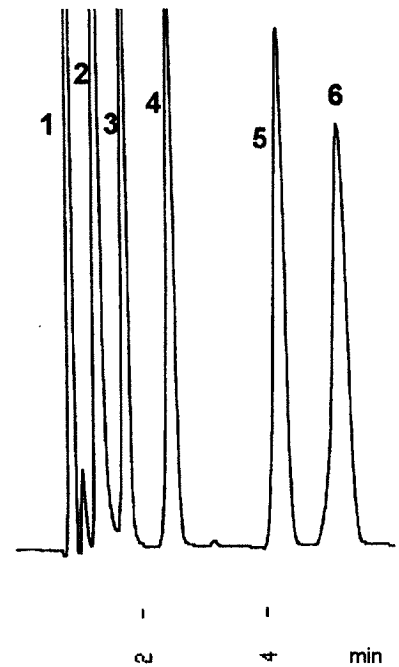


Abb. 6: Probe: Testmischung und Bezifferung 1–6 wie bei Abb. 4; Träger: UltraSep ES RP18 M500; Säule 150 x 3 mm; Eluens: 50mM Phosphorsäure pH 3,2/AN=60/40 (V/V); Fluss: 0,80 ml/min; Detektionswellenlänge: 254 nm; Raumtemperatur

beiden Trägertypen auf Wasserstoffbrückenbindungen basierenden Trennmechanismen.

Danksagung

Herrn Jürgen Bochynek, Schering AG Berlin, danken wir für die freundliche Erlaubnis zur Verwendung des „Kundenbeispiels“ in dieser Arbeit.

Die zitierte Literatur ist bei den Autoren sowie unter www.sepserv.com erhältlich.

Die Autoren

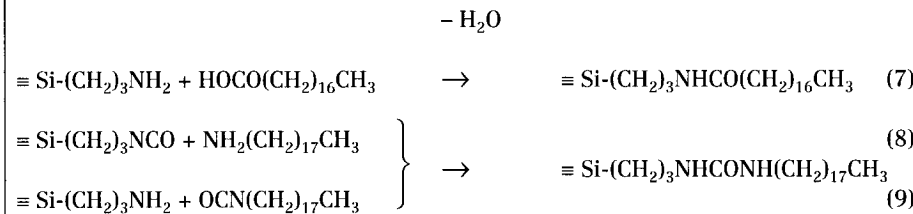
Dr. habil. Günter J. Eppert

Studium der Chemie und Promotion an der MLU Halle-Wittenberg, Habilitation an der Universität Leipzig, Facultas docendi an der TH Merseburg, Dozent für Analytische Chemie, Autor des Buches „Flüssigchromatographie“ HPLC – Theorie und Praxis (Springer-Verlag)

Dipl.-Chem. Irene Schinke

Chemielaborantenausbildung in den Buna-Werken in Schkopau, Chemieingenieurstudium an der Fachschule in Köthen, Diplom in Verfahrenchemie an der TH Merseburg

SepServ Separation Service Berlin
Helmholtzstrasse 2-9
10587 Berlin
Fax: 030/391 01 000
sepserv.berlin@t-online.de
www.sepserv.com



Gleichgültig, welche Gruppe eingefügt wird, ein inzwischen allgemein verwendetes Testgemisch ausgewählter polarer Verbindungen [11] ergibt das in Abb. 4

macht den für viele Trennungen pharmazeutischer Produkte gut eingeführten Träger für das gewählte Substanzgemisch unbrauchbar, ein markantes Beispiel für den Selektivitätsverlust an RP-Trägern durch Endcapping.

In Tab. 4 sind die Vorteile und Eigenschaften der neuen Phasen zusammengestellt. Den vielfach hervorgehobenen Phasenkollaps bei RP-Träger mit z. T. dramatischen Folgen [12] konnten wir an unseren UltraSep ES-Trägern bisher nicht beobachten. Möglicherweise spielt in diesen Fällen die Grundmatrix (Silikagel) eine wichtige Rolle.

Für die neuen Phasen existieren sehr unterschiedliche Namen. Die Nomenklatur bei SepServ ist einfach: Name des Grundgels, Funktion, RP-Kette, Art des Endcappings, also z. B.: UltraSep ES Amid H RP18 P für ein Amidgel mit einer Harnstoffgruppierung (H), daran gebundener C18-Kette und polarem Endcapping (P).

Abschließend soll mit Abb. 6 unter Verwendung der oben verwendeten Standardtestmischung an UltraSep ES RP18 M500 gezeigt werden, dass die Polaritätserhöhung an RP-Trägern über polare Wechselwirkungen durch Silanolgruppen zu ganz ähnlichen Trennergebnissen führt wie die Einführung von Amidgruppen in Alkylketten bei den neuen Phasen (vgl. Abb. 4). Diese vielleicht etwas überraschende Tatsache resultiert aus den bei

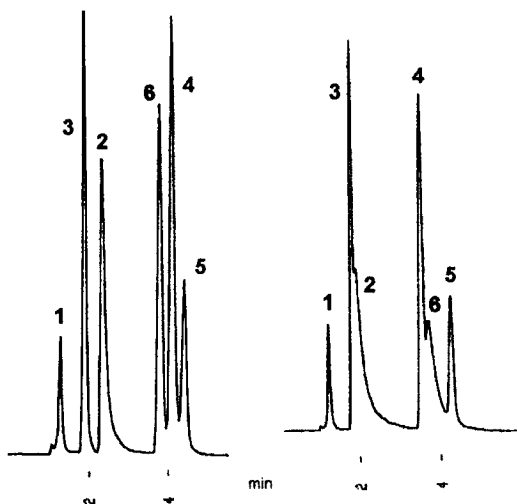


Abb. 5: Probe: Testmischung und Bezifferung wie bei Abb. 4; Träger: links UltraSep ES RP18 rechts UltraSep ES RP18 endcapped; Säule: 150 x 3 mm; Eluens: 50 mM Phosphorsäure pH 3,2/AN=35/65 (V/V); Fluss: 0,42 ml/min; Detektionswellenlänge: 254 nm; Raumtemperatur

Tab. 4: Vorteile und Eigenschaften polarer RP-Träger auf der Basis von „Polar Embedded Phases“.

Polar Embedded Phases

Vorteile:

Kombinierte

RP-Selektivität (unspezifisch) und polare Selektivität (spezifisch)

**Für polare und basische Analyte günstig
Abschirmung der Silanolgruppen (Shieldeffekt)
Kein Phasenkollaps in wässrigen Systemen**

Weitere Eigenschaften:

Hydrophob

Spacerkette meist 3 C-Atome

Keine verbesserte Hydrolyseresistenz

Literatur

- [1] Kinkel, J. N.: Kontakte (Darmstadt) 1986 (3) 28 - 35
- [2] Eppert, G.: Chem. Techn. 37, 384 – 386 (1985)
- [3] Eppert, G.: Z. Chem. 26, 325 –329 (1986)
- [4] Said, A. S.: J. Gas Chromatogr. 2, 60 – 71 (1964)
- [5] Eppert, G., Liebscher, G., Schinke, I.: Chromatographia 28, 9 – 14 (1989)
- [6] Unger, K. K.: „Herstellung und chromatographische Anwendung von Silicagelen mit definierter Hohlraumstruktur“, Dissertation, Darmstadt 1965
- [7] Horvath Cs., Melander W., Molnar I.: J. Chromatogr. 125, 129 – 156 (1976)
- [8] Unger, K. K., Becker N., Roumeliotis, P.: J. Chromatogr. 125, 115 – 127 (1976)
- [9] Nachr. Chem. Tech. Lab 45 (5) 532 (1997)
- [10] Czajkowska, T., Jaroniec, M.: J. Chromatogr. A 762, 147 – 158 (1997)
- [11] Majors, R. E.: LC·GC Europe 14 (5) 284 –301 (2001)
- [12] Wolcott, G., Dolan, W.: LC·GC International 12 (5) 260 –264 (1999)