



Chromatographie II  
WS 2022/23 R. Vasold

# Chromatographie II

# HPLC

## Seminar



# Chromatographie II

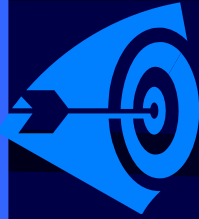
## HPLC Praktikum (nur Theorie)

2

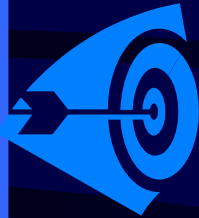
- I.1 **Einleitung** (*siehe Skript Praktikum*)
- I.2 **Ziele des Praktikums**
- I.3 **Die stationäre Phase**
- I.4 **Die mobile Phase**
- I.5 **Die Pumpe(n)**
- I.6 **Die Injektionseinheit**
- I.7 **Die Detektoreinheit**
- (I.8 **Die Software**)
- I.9 **Die Methode des ISTD**
- I.10 **Aufgaben zum theoretischen Teil**

## I.2 Ziele des Praktikums

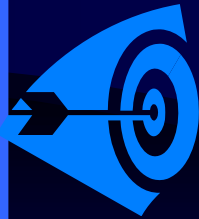
Nach diesem **Praktikum** soll man u.a.:



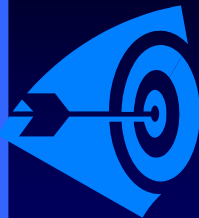
**Ziel 1** Über den Aufbau einer **HPLC-Anlage**, sowie über **stationäre** und **mobile Phase** Bescheid wissen.



**Ziel 2** Über die **Einzelbestandteile** (wie z.B. **Pumpen**, **Injektoreinheit** und **Detektoren**) Bescheid wissen.



**Ziel 3** Wichtige **chromatographische Kenngrößen** (z.B.  $t_m$ ,  $t_R(X)$ ,  $V_m$ ,  $V_R(X)$ ,  $u_m$ ,  $u(X)$ ,  $k$  etc.) bestimmen können.



**Ziel 4** Eine **quantitative Bestimmung** mit der Methode des **Internen Standards** durchführen können.

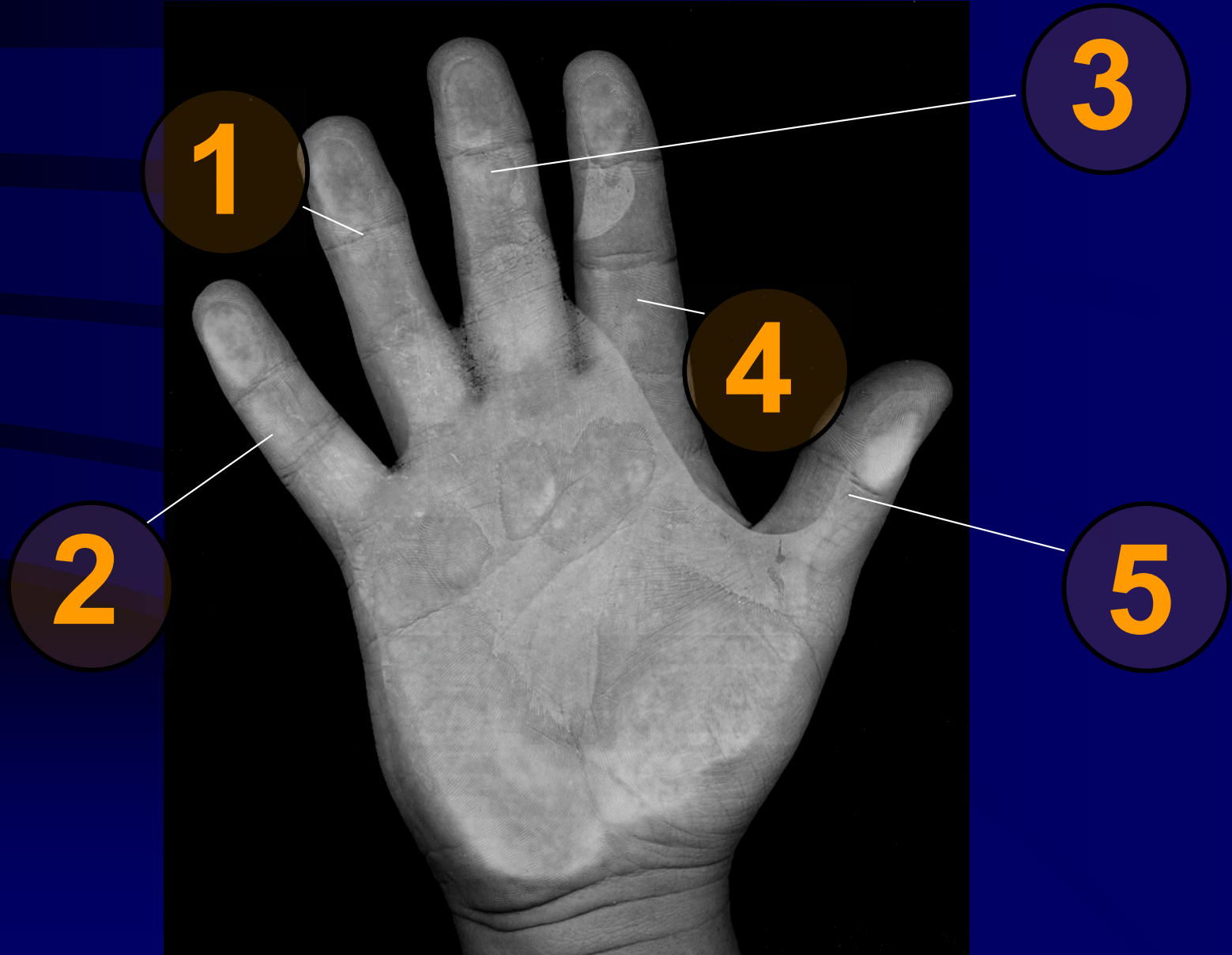


Chromatographie II  
WS 2022/23 R. Vasold



## *Kapitel I Theoretischer Teil*

## I.2.1 Komponenten der HPLC Anlage



## I.2.1 Komponenten der HPLC Anlage

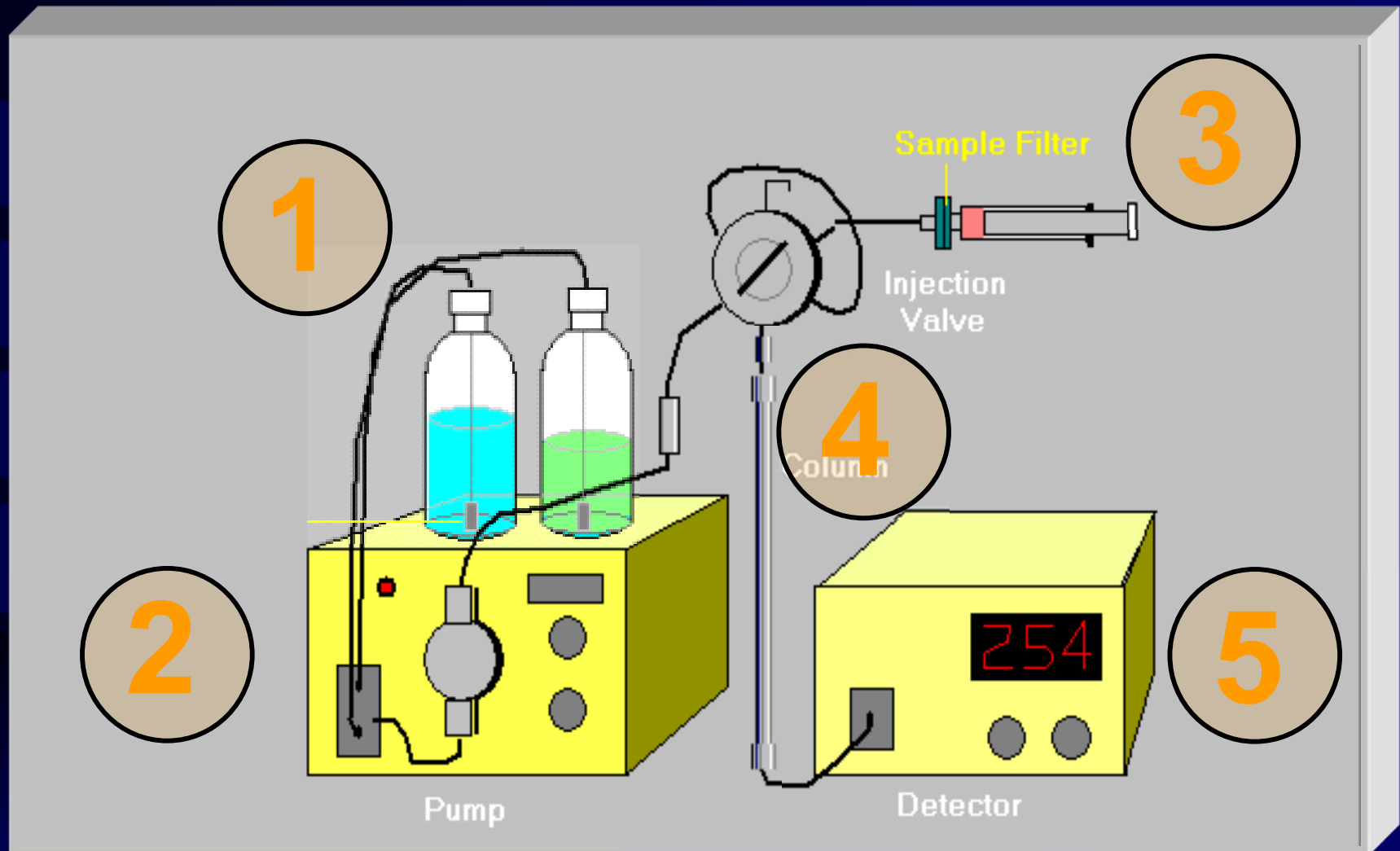


Abb. I.2.1: Komponenten eines HPLC-Systems



## I.3 Die Stationäre Phase

**Adsorptions-Chromatographie** teilt sich auf in:

**Normal-Phase-Chomatographie: NP**

Stationäre Phase  
polar

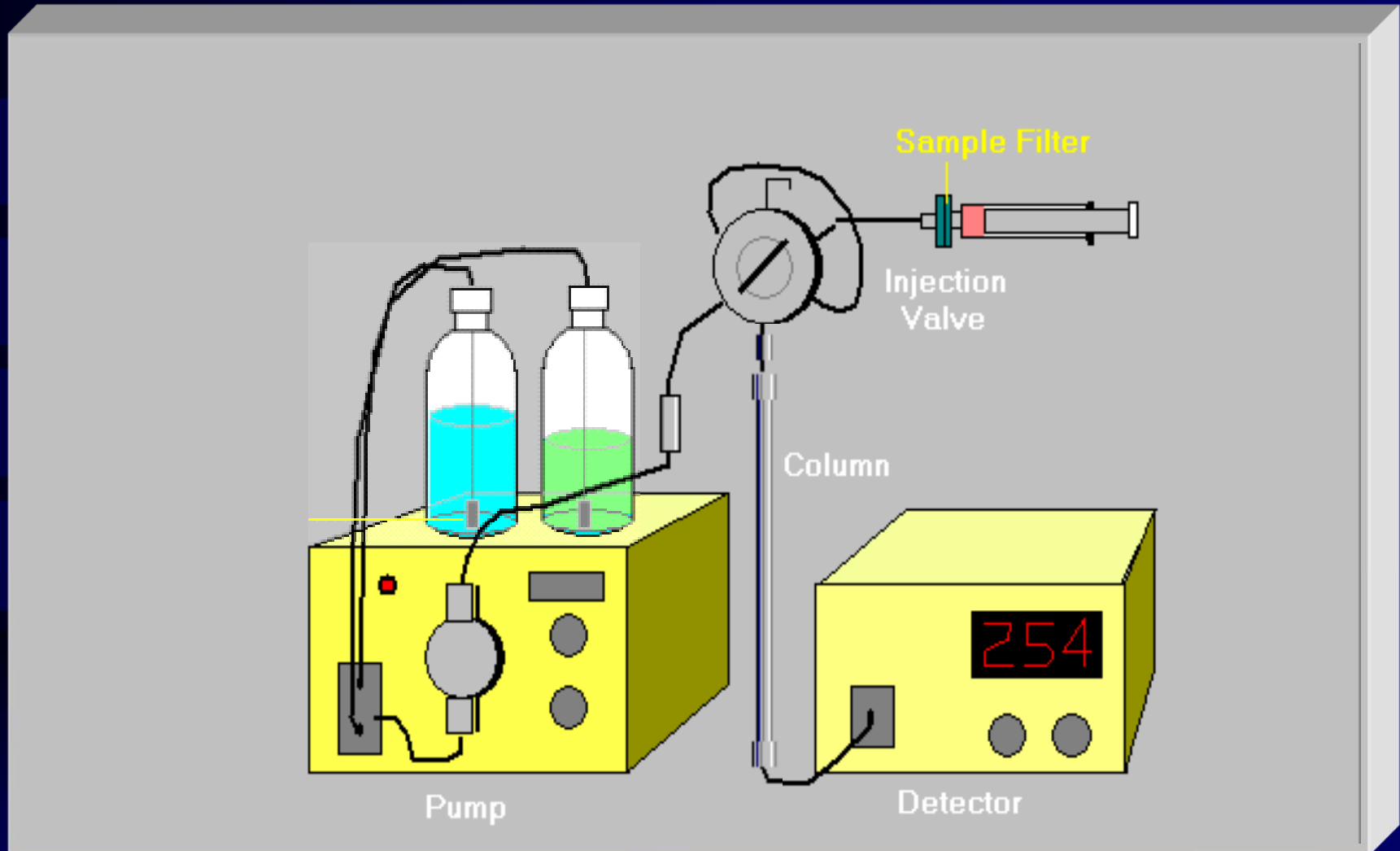
Mobile Phase  
unpolar

**Reversed-Phase-Chromatographie: RP**

Stationäre Phase  
unpolar

Mobile Phase  
polar

## I.3 Die Stationäre Phase



**Abb. I.3.1: Komponenten eines HPLC-Systems (Säule)**



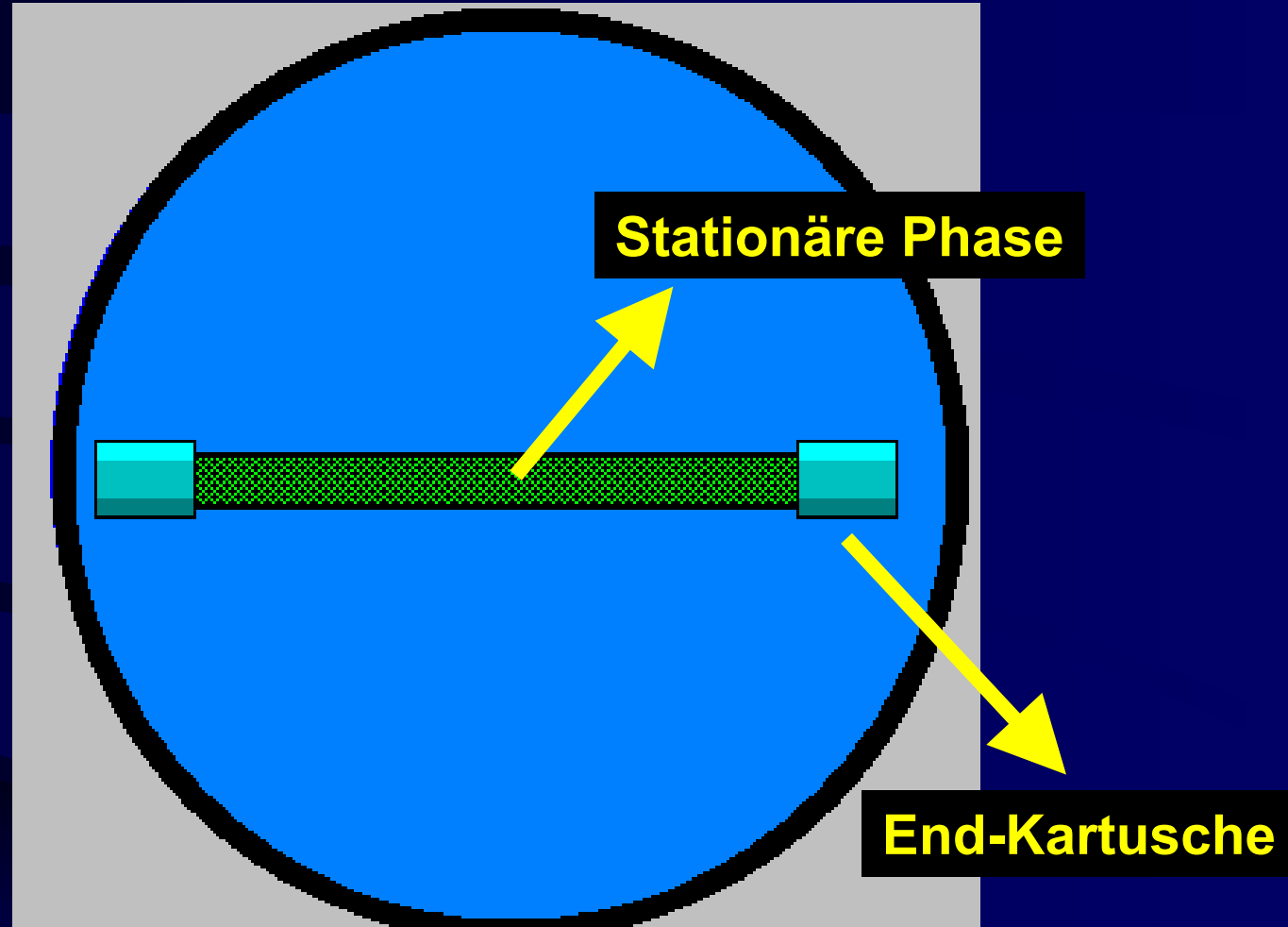


Abb. I.3.2: Darstellung einer HPLC-Säule

## I.3 Die Stationäre Phase

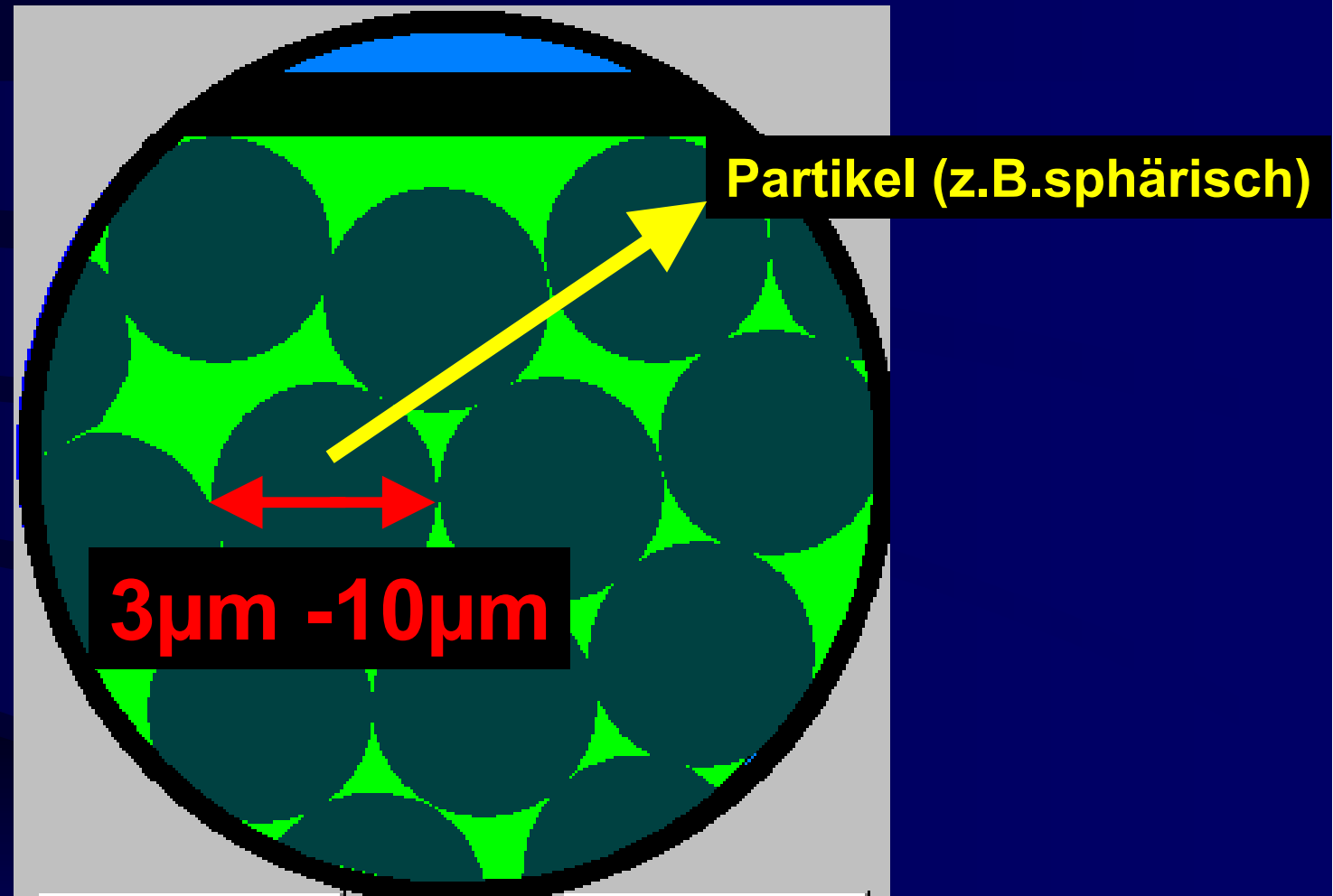
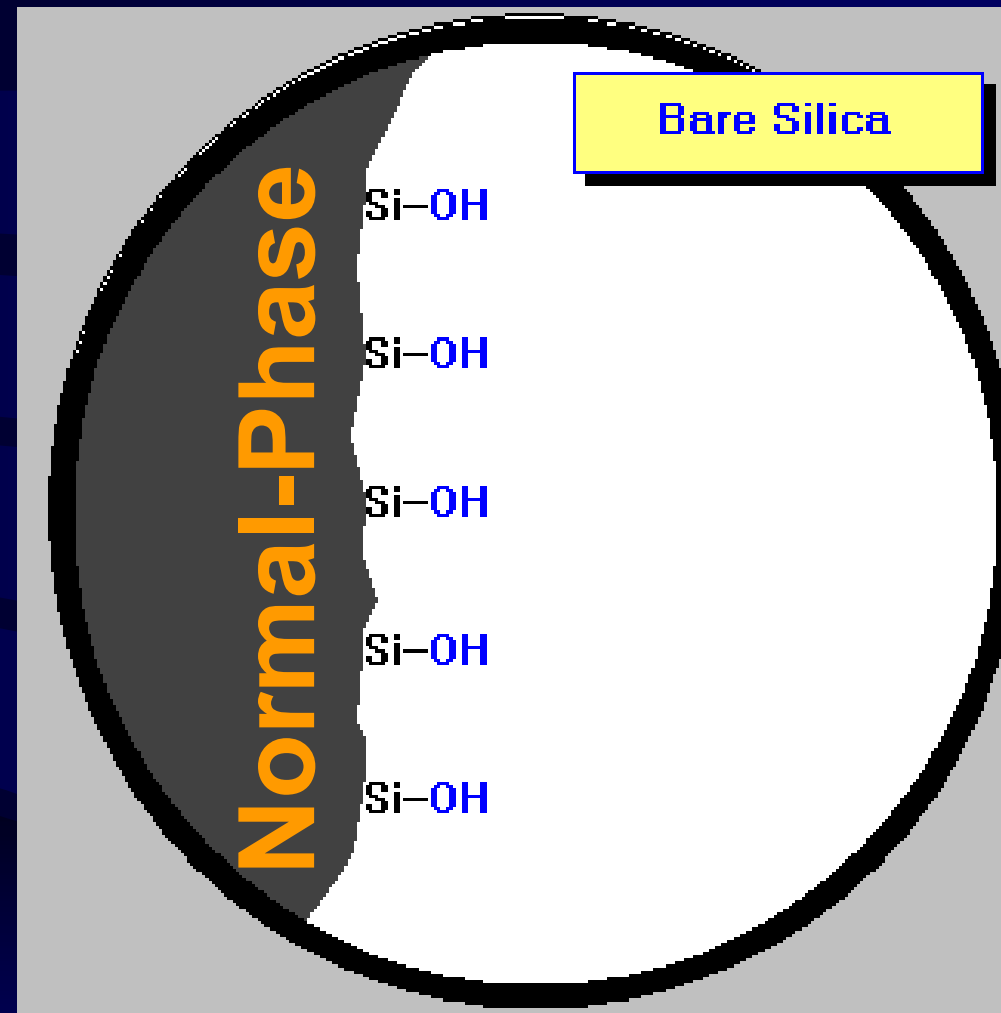


Abb. I.3.3: Darstellung der Einzelpartikel

## I.3.1 Beispiele **stationärer Phasen**



**Abb. I.3.1.a: Material mit polaren Silanol- (SiOH)- Endgruppen**

## I.3.1 Beispiele stationärer Phasen

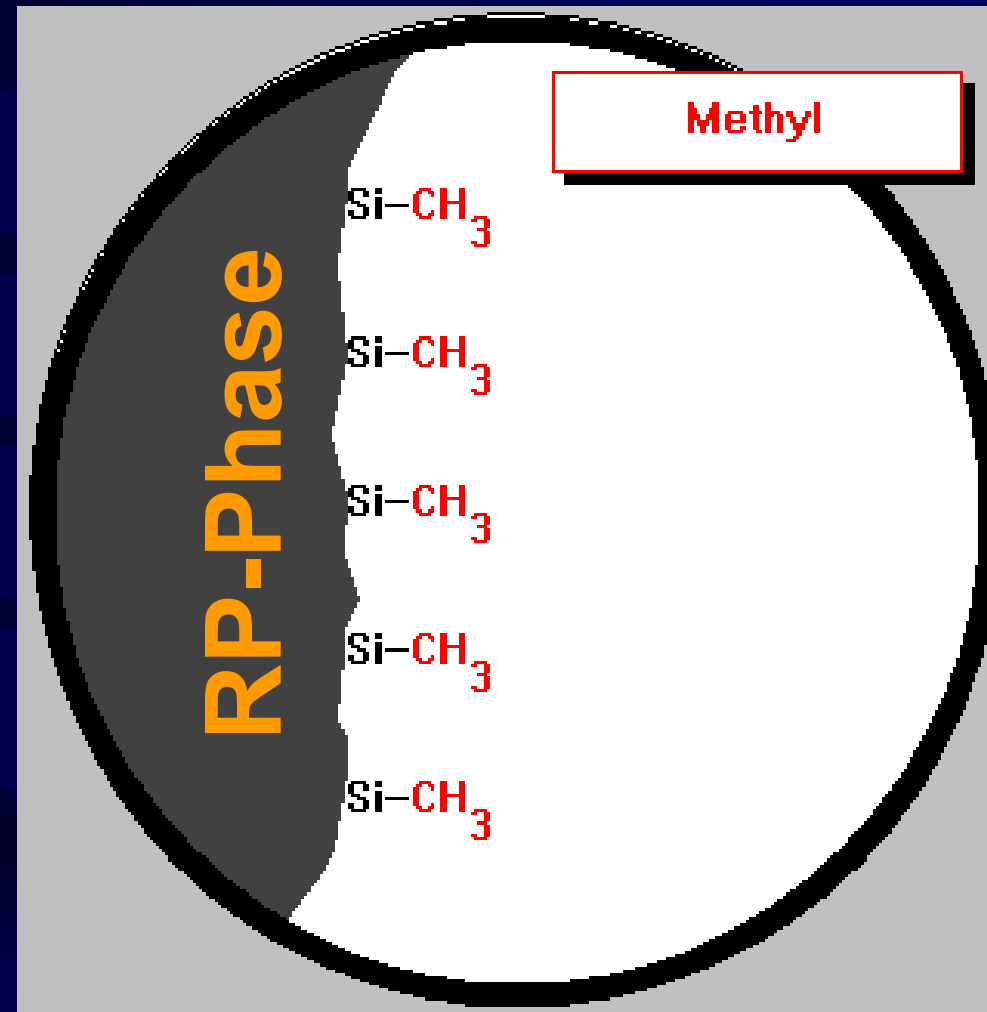


Abb. I.3.1.b: Material mit unpolaren CH<sub>3</sub>-Endgruppen

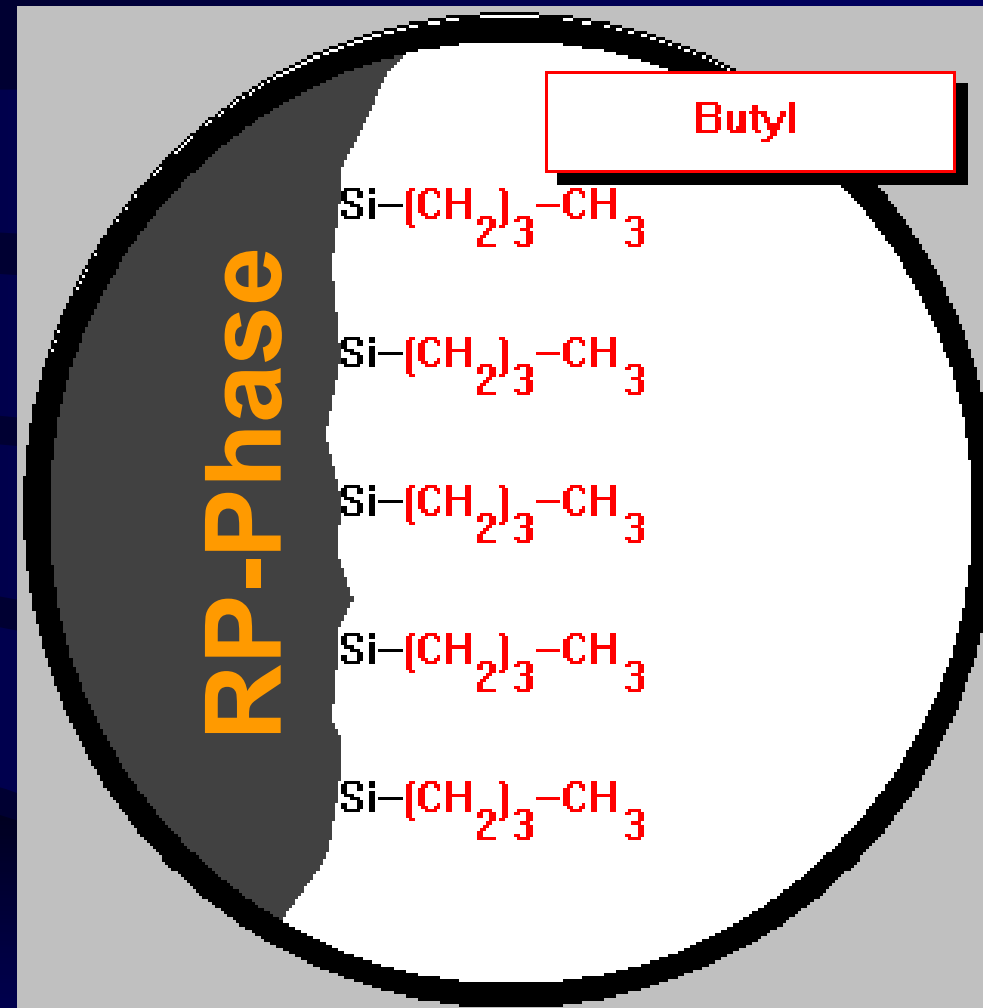
I.3.1 Beispiele **stationärer Phasen**

Abb. I.3.1c: Material mit unpolaren C4-Endgruppen

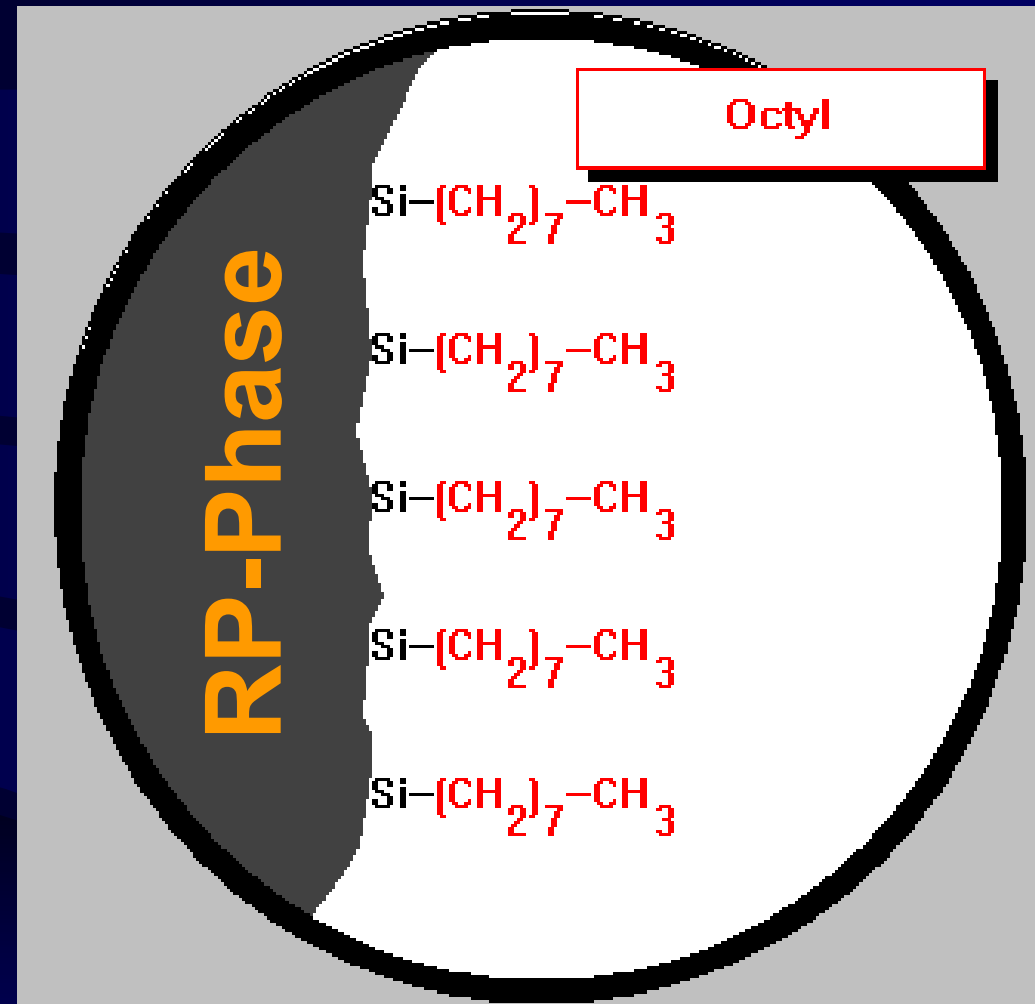
I.3.1 Beispiele **stationärer Phasen**

Abb. I.3.1.d: Material mit unpolaren C8-Endgruppen

## I.3.1 Beispiele stationärer Phasen

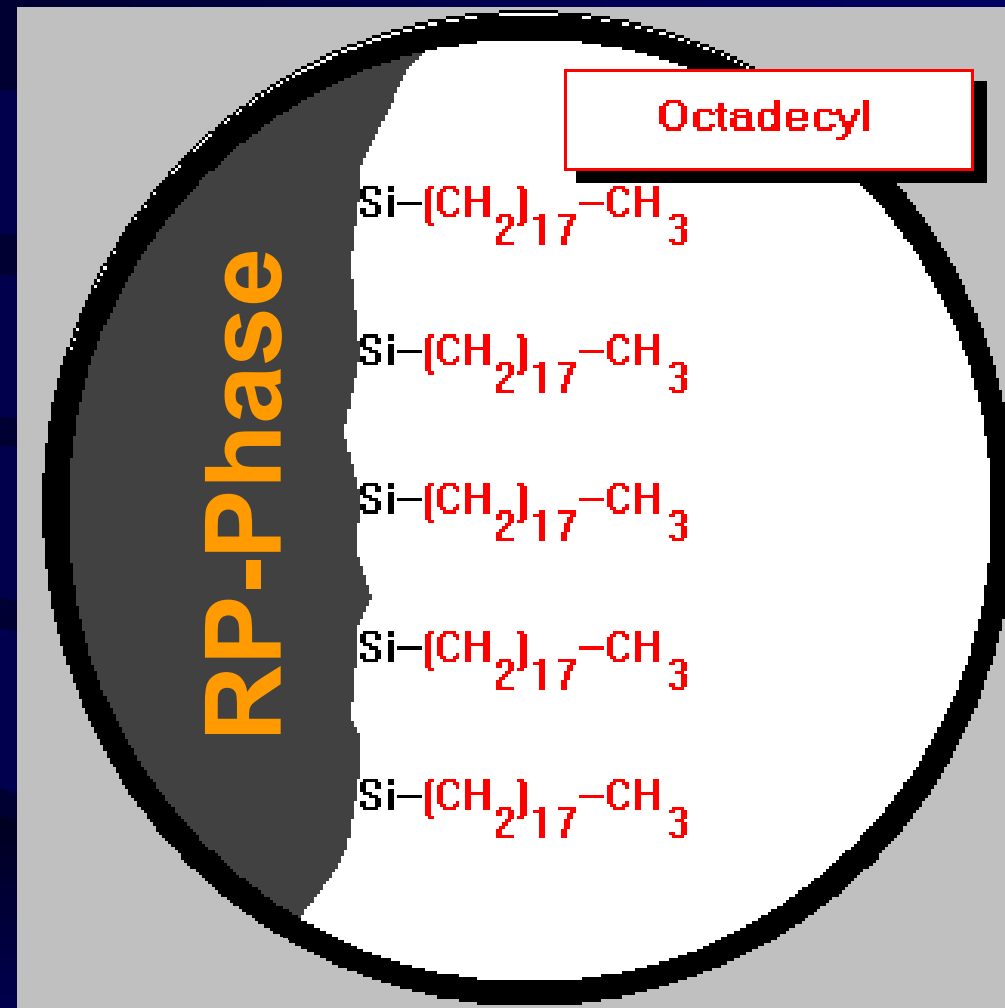


Abb. I.3.1e: Material mit C18-Endgruppen



## I.3.1 Beispiele **stationärer Phasen**

Im Praktikumsversuch wird folgende Säule eingesetzt:

<b>Hersteller:</b>	<b>Fa. Phenomenex</b>
<b>Dimensionen:</b>	<b>150 mm x 4.6 mm (ID)</b>
<b>Material:</b>	<b>3 <math>\mu\text{m}</math></b>
<b>stationäre Phase:</b>	<b>C18</b>

I.4 Die **mobile Phase**

**Adsorptions-Chromatographie** teilt sich auf in:

**Normal-Phase-Chomatographie:**

**NP**

**Stationäre Phase  
polar**



**Mobile Phase  
unpolar**

**Reversed-Phase-Chomatographie:**

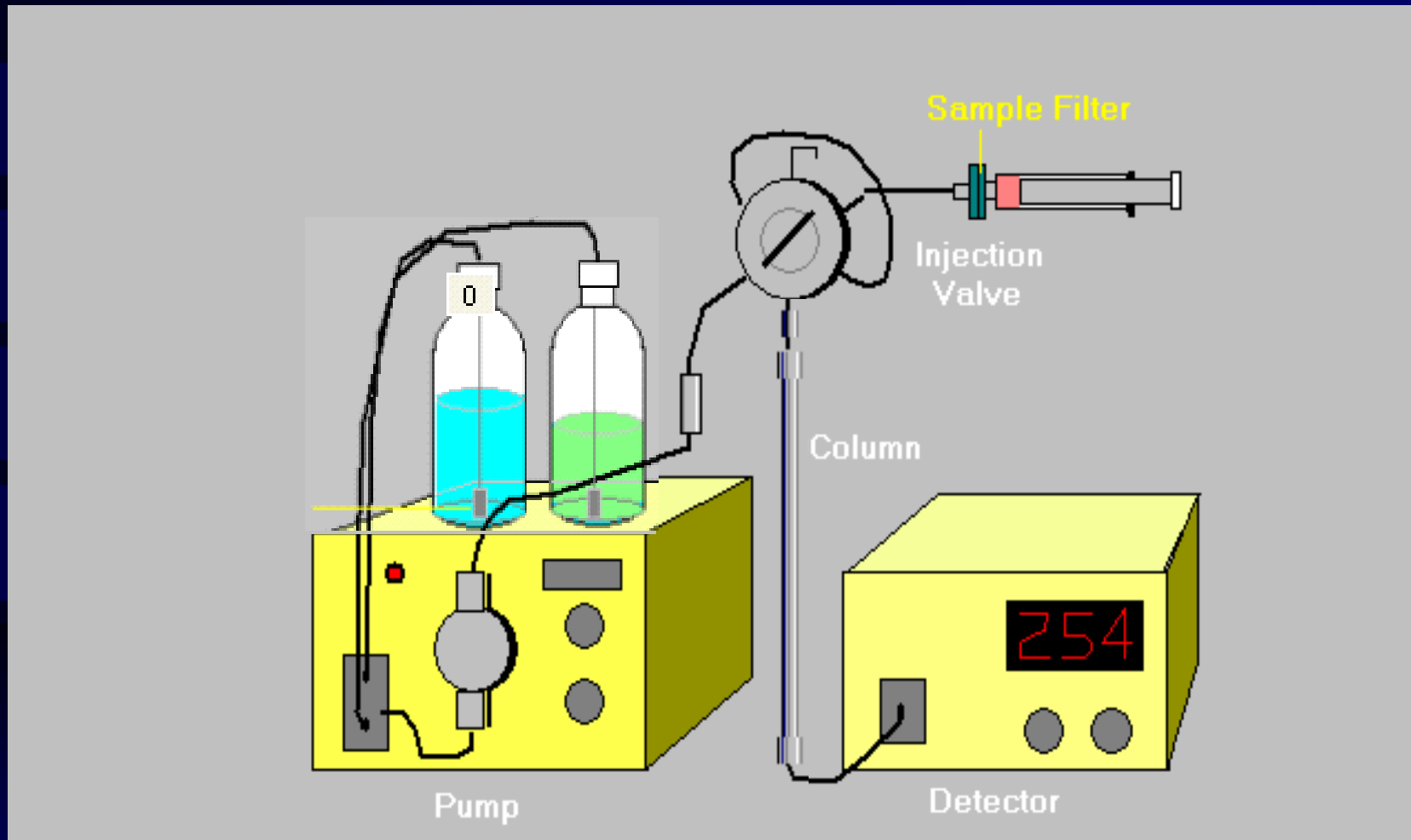
**RP**

**Stationäre Phase  
unpolar**



**Mobile Phase  
polar**

## I.4 Die mobile Phase



**Abb. I.4.1: Komponenten eines HPLC-Systems (Eluenten)**

# I Theoretischer Teil

## I.4.1 Die **Eluotrope Reihe**

= Anordnung der Laufmittel nach steigender Elutionskraft  $E^0$  ( $\triangleq$  Polarität) bezogen auf NP-Phase (empirisch bestimmt)

hauptsächliche  
Verwendung  
in

	Eluent	Elutionskraft [ $E^0$ ( $Al_2O_3$ )]	UV-Grenze [nm]
NP-Chromatographie	n-Hexan	0,00	190
	Toluol	0,29	285
	Chloroform	0,40	245
	Dichlormethan	0,42	230
	Aceton	0,56	330
	Essigsäureethylester	0,58	260
RP-Chromatographie	Dimethylsulfoxid	0,62	270
	Diethylamin	0,63	275
	Acetonitril	0,65	190
	2-Propanol	0,82	210
	Methanol	0,95	205
	Wasser	>1,11	<190



Abb. I.4.1.a: Die Eluotrope Reihe (Auszug)

I.4.1 Die **Eluotrope Reihe**

**Polarität**

Für die Normalphasen-(NP)-Chomatographie gilt:

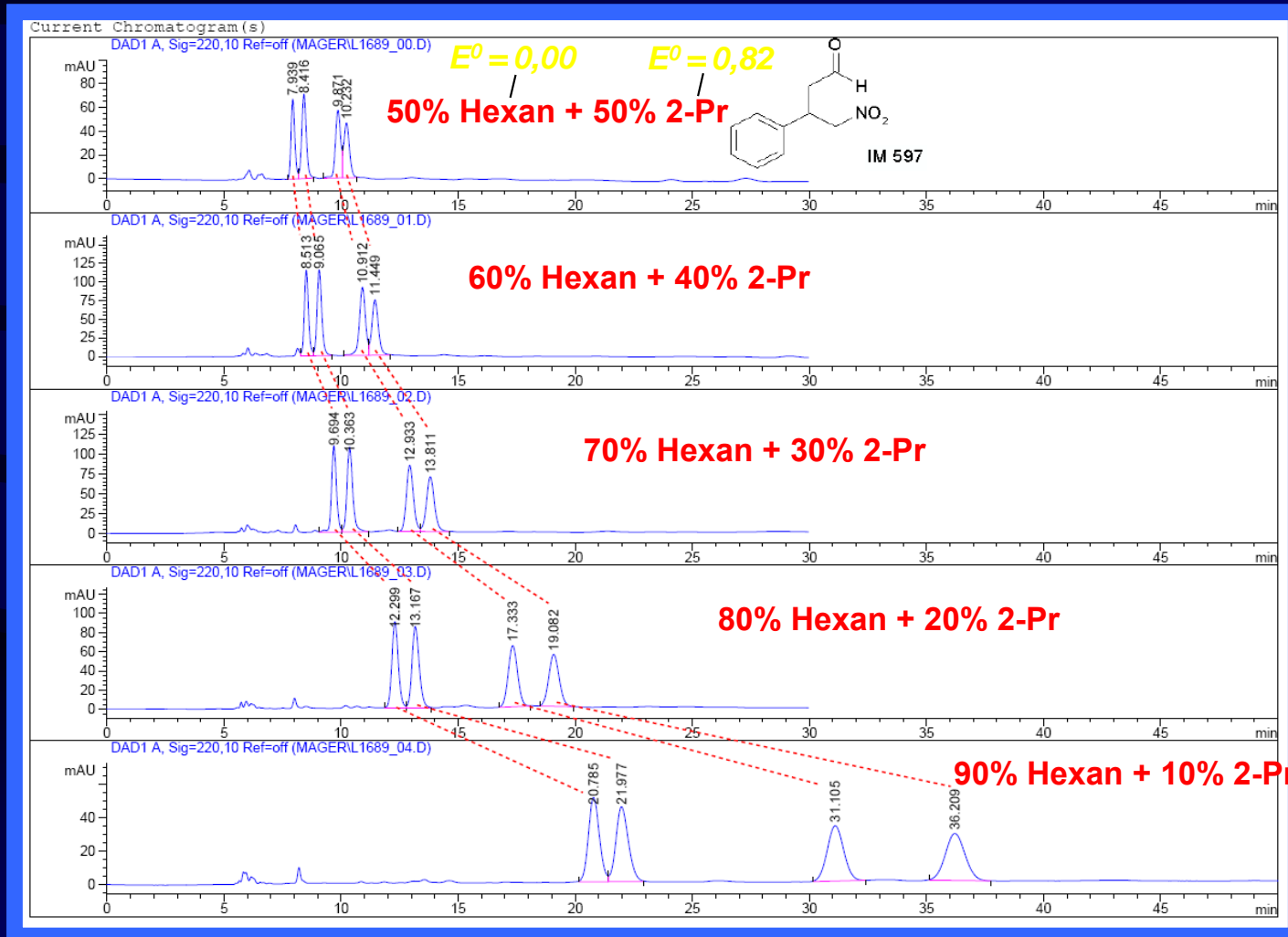
**Elutionskraft steigt**

*Elutionskraft = Fähigkeit des Fließmittels Substanzen in der Säule weiter zu befördern*

# I Theoretischer Teil

## I.4.1 Die Eluotrope Reihe

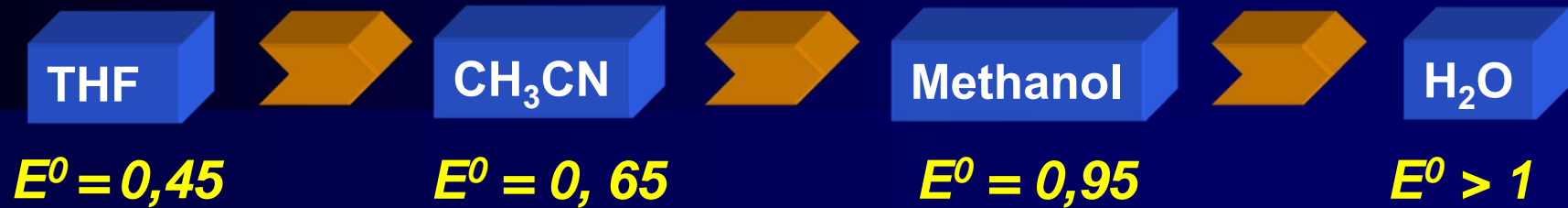
### Beispiel für die Normalphasen-(NP):



Elutionskraft sinkt

Retentionszeiten steigen

Abb. I.4.1.b: Entwicklung einer NP-Trennung (isokratisch)

I.4.1 Die **Eluotrope Reihe**

**Polarität**

Für die Reversed-Phase-(RP)-Chomatographie gilt:

**Elutionskraft sinkt**

*Elutionskraft = Fähigkeit des  
Fließmittels Substanzen in  
der Säule weiter zu befördern*



# I Theoretischer Teil

## I.4.1 Die Eluotrope Reihe

### Beispiel für die Reversed-Phase-(RP)-Chomatographie:

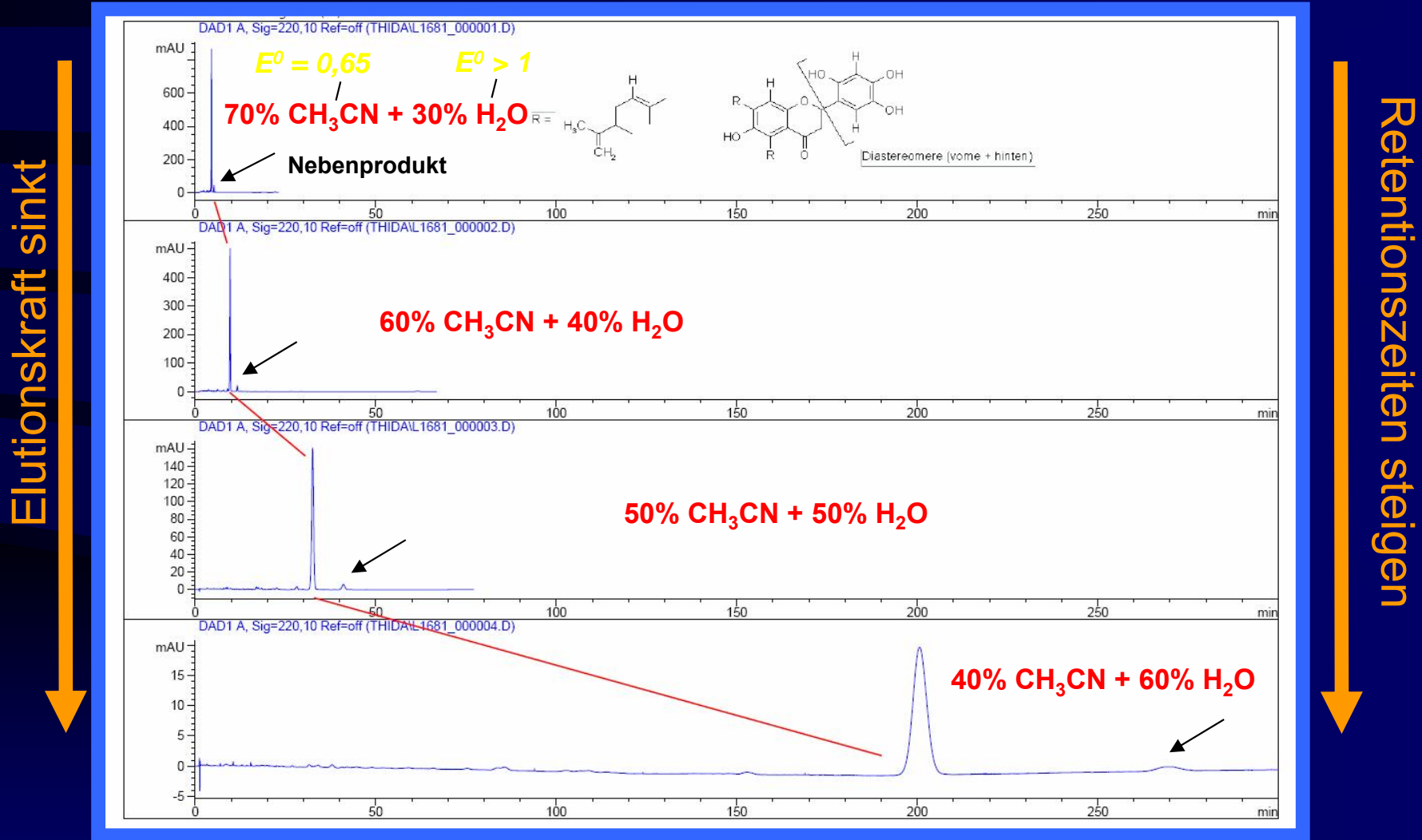
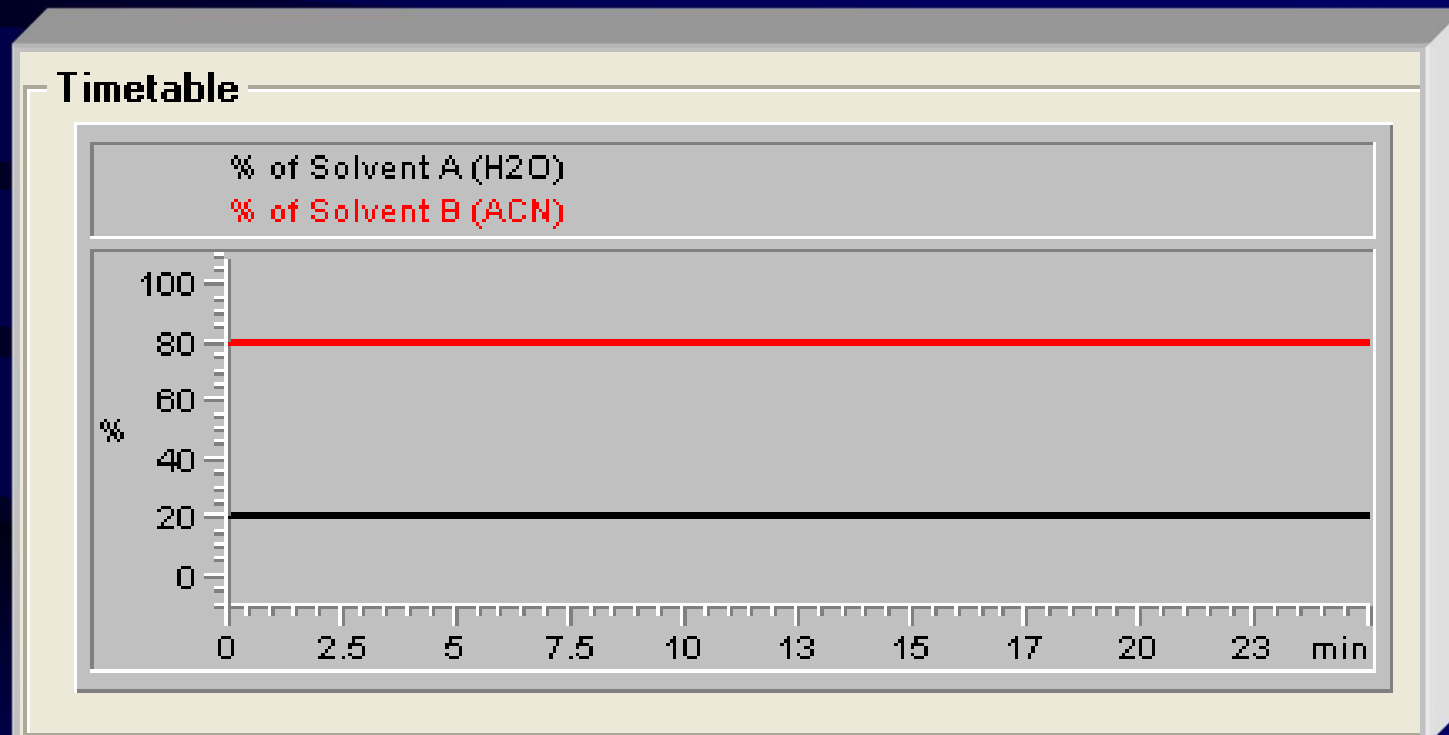


Abb. I.4.1.c: Entwicklung einer RP-Trennung (isokratisch)

## I.4.2 Die **isokratische-Elution**

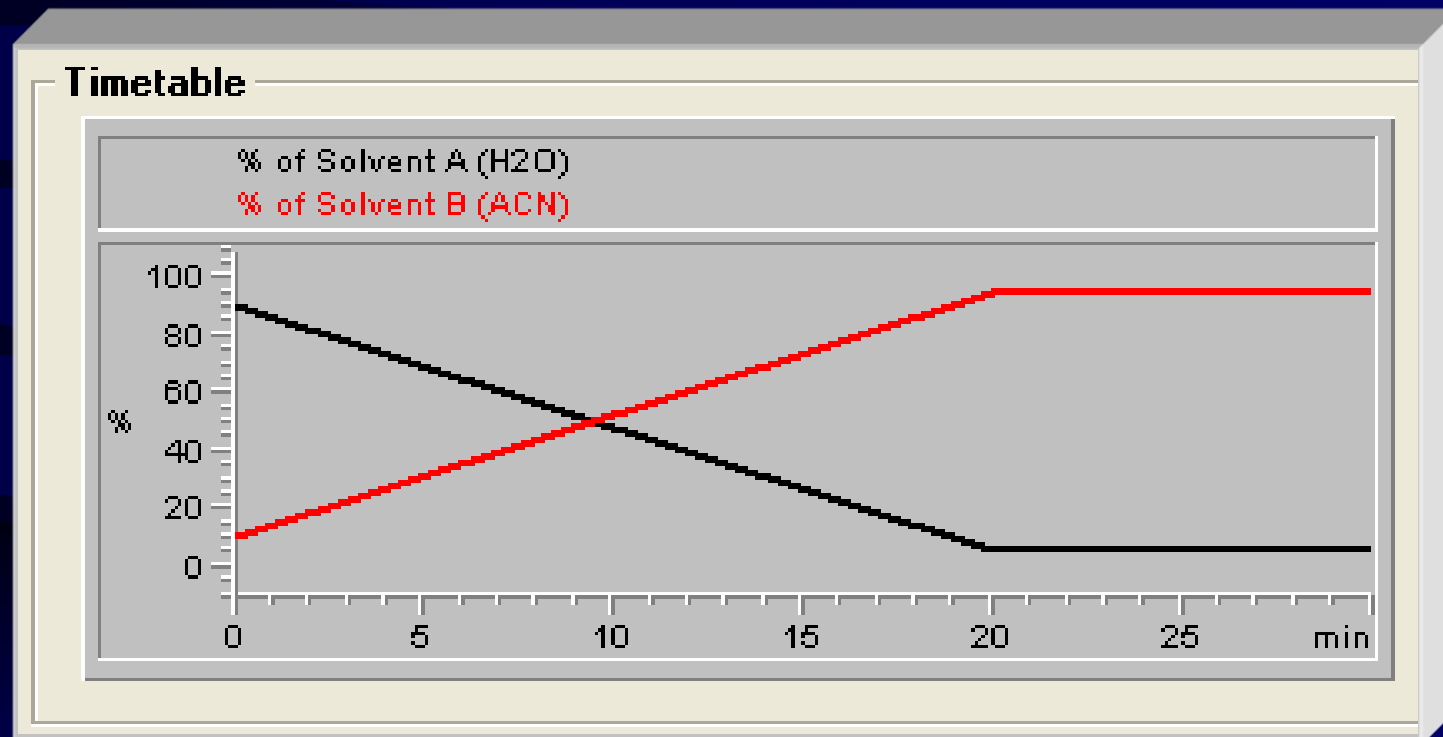
Die **Zusammensetzung** der **mobilen Phase** ändert sich während der chromatographischen Trennung nicht:



**Abb. I.4.2.: Eluentenverlauf bei isokratischer Elution**

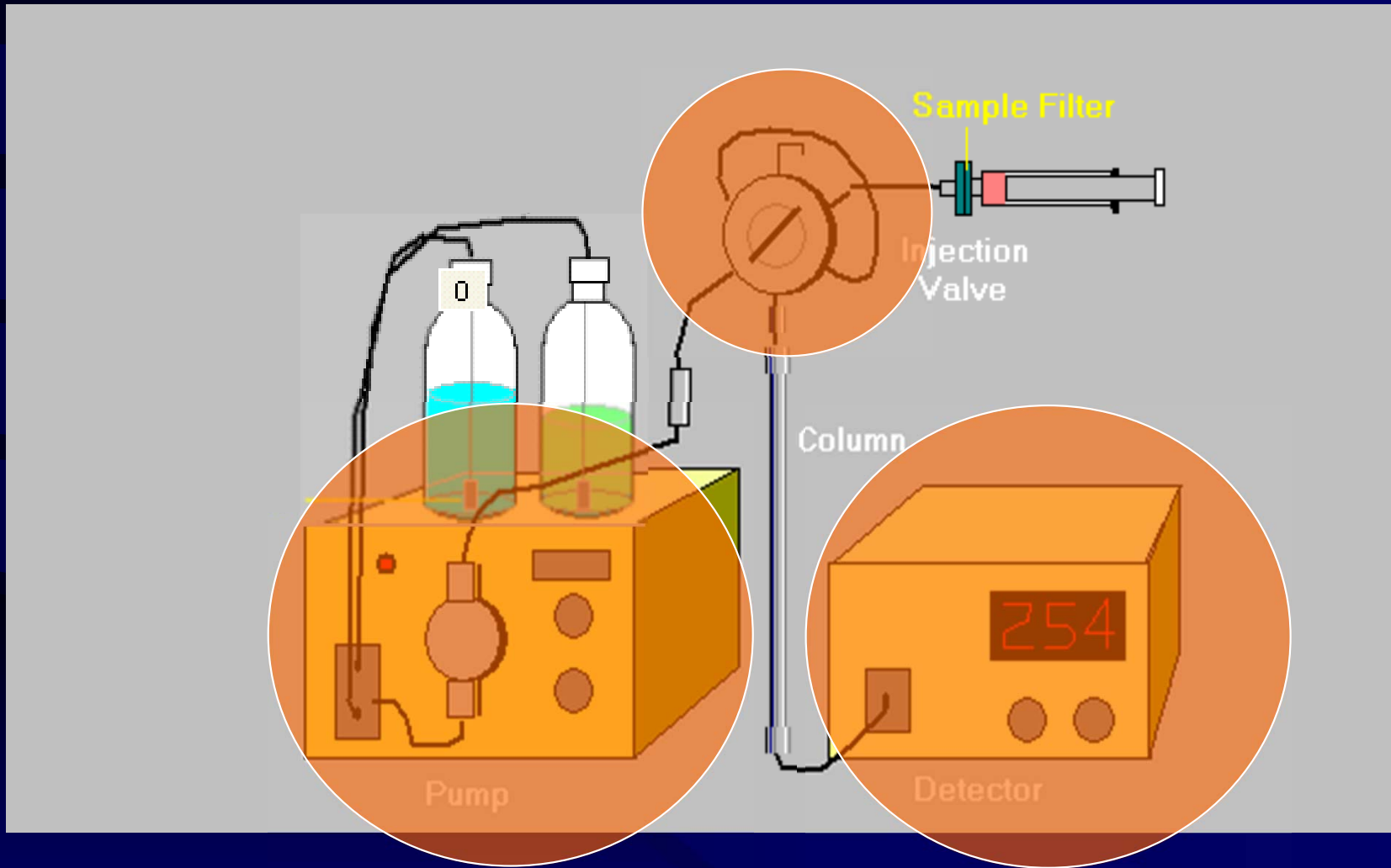
## I.4.3 Die **Gradienten-Elution**

Die **Zusammensetzung** der **mobilen Phase** ändert sich während der chromatographischen Trennung:



**Abb. I.4.3: Eluentenverlauf bei Gradienten Elution**

## I.5 Die **Pumpe / Injektor / Detektor**



**Abb. I.5.a: Komponenten eines HPLC-Systems (Pumpe, Detektor, Injektionseinheit)**

## I.5 Die Pumpe

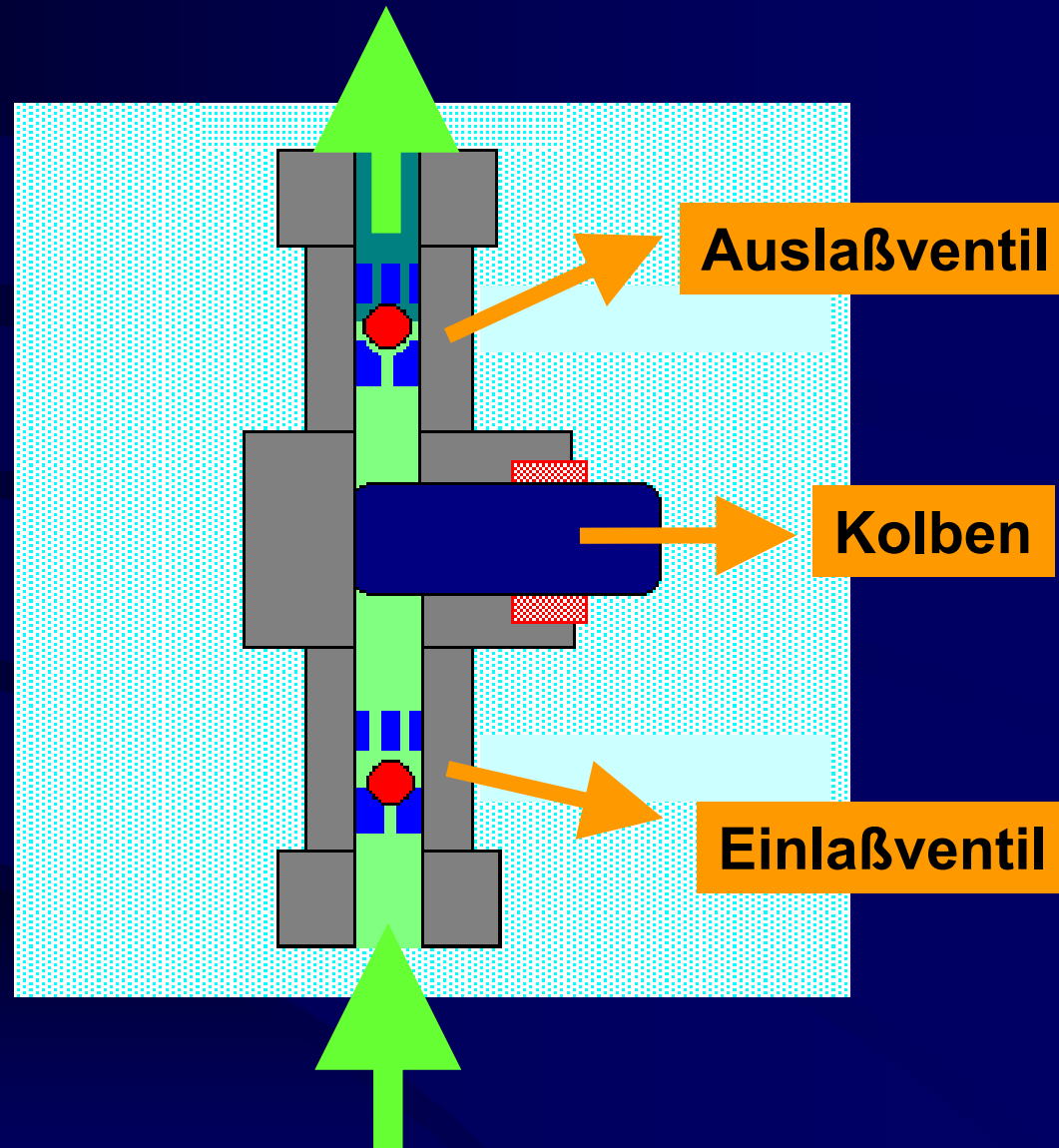
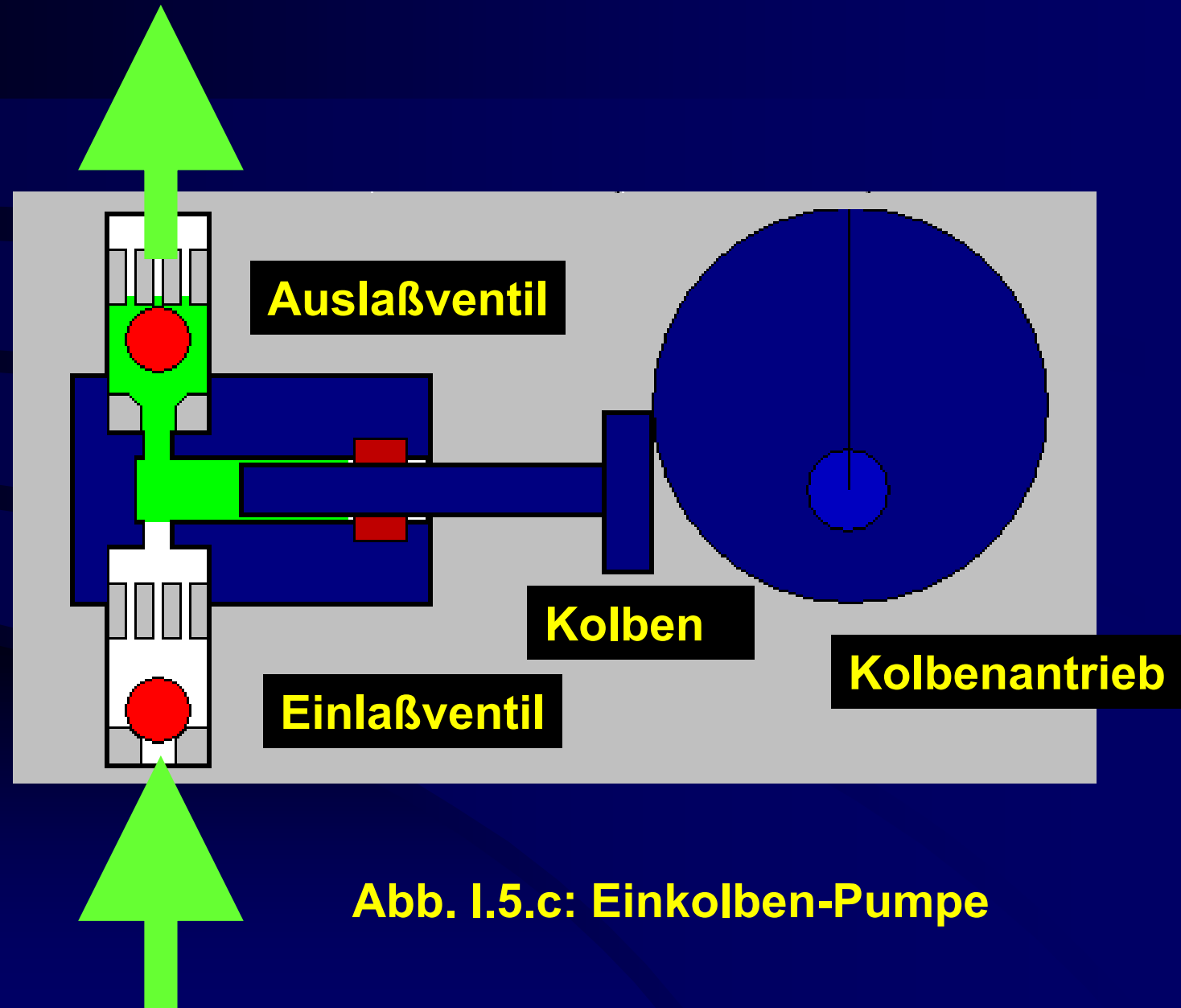


Abb. I.5.b: Kolbenpumpe

## I.5 Die Pumpe



## I.5 Die Pumpe

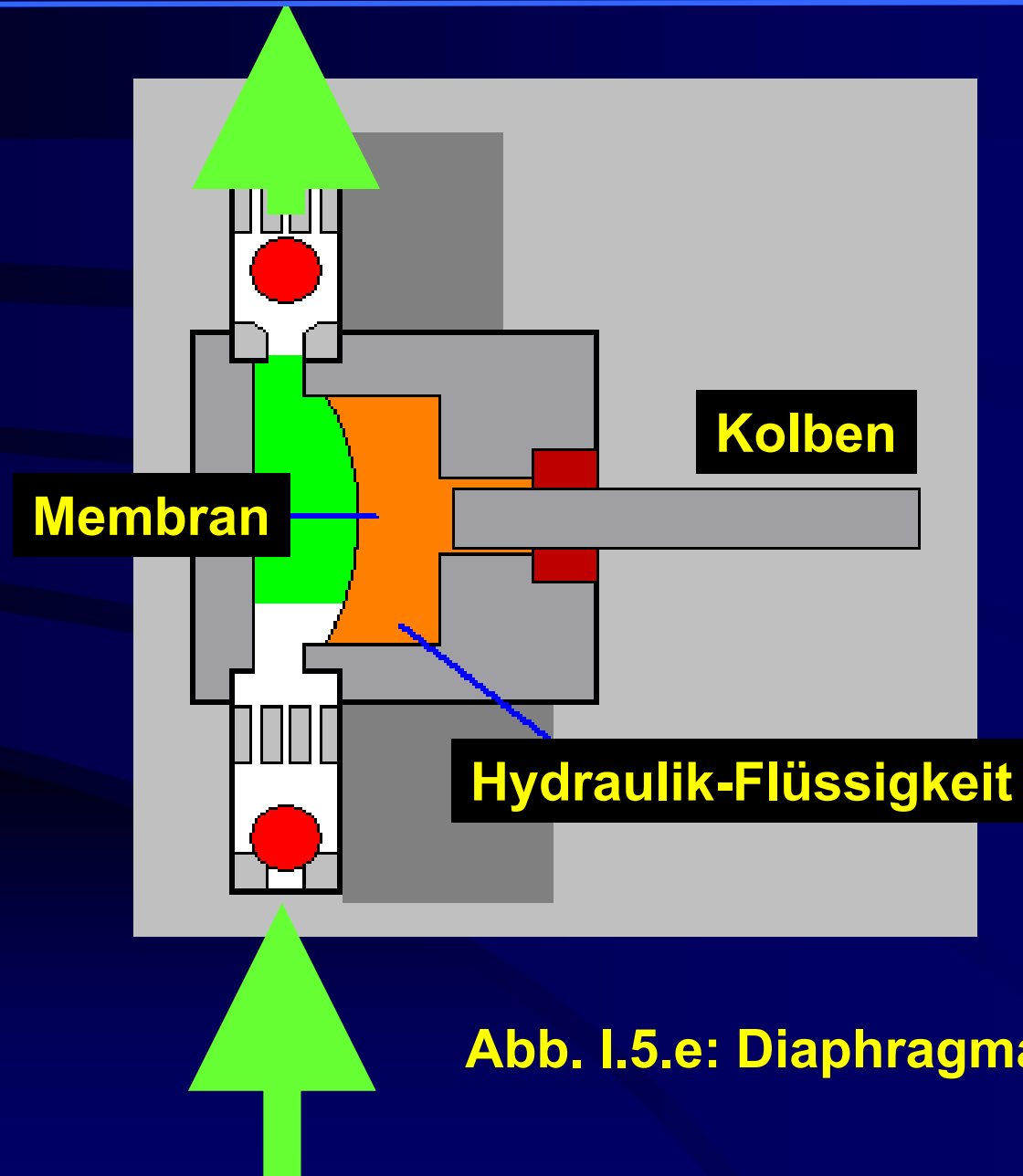
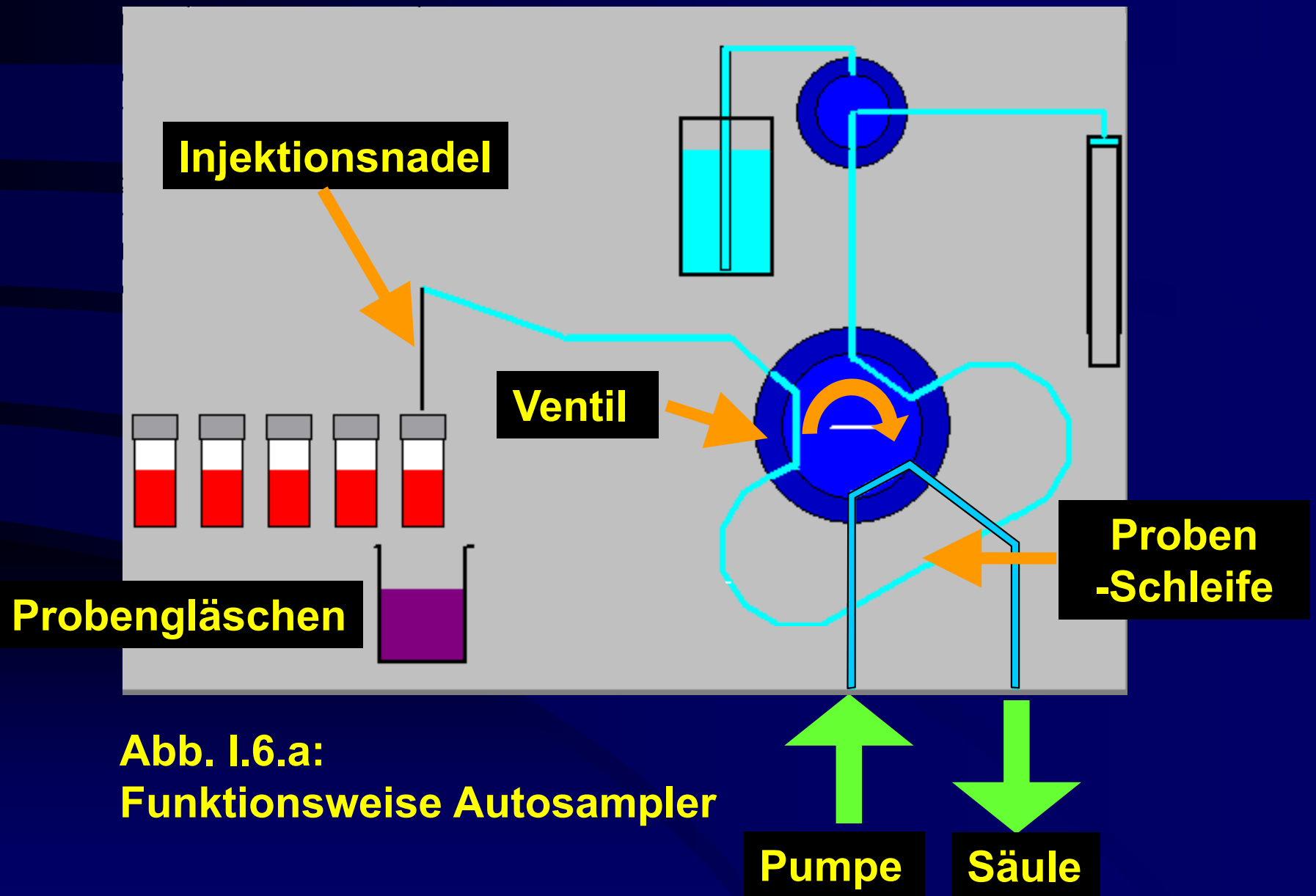


Abb. I.5.e: Diaphragma-Pumpe

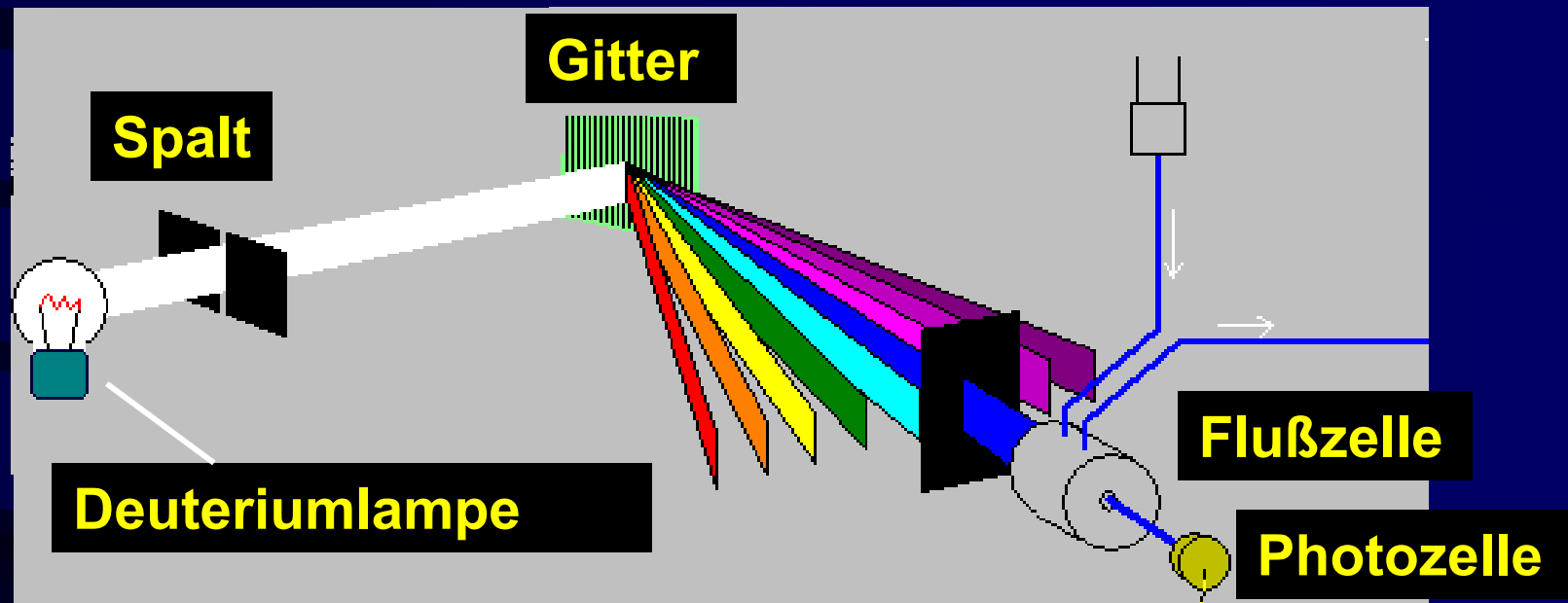


## I.6 Die Injektionseinheit



## I.7 Die Detektoreinheit

### I.7.1 Der UV/VIS-Detektor



**Abb. I.7: UV/VIS - Detektor (VWD oder MWD)  
jeweils nur eine Wellenlänge einstellbar**

## I.7 Die Detektoreinheit

### I.7.2 Der Diodenarray-Detektor (UV/VIS)

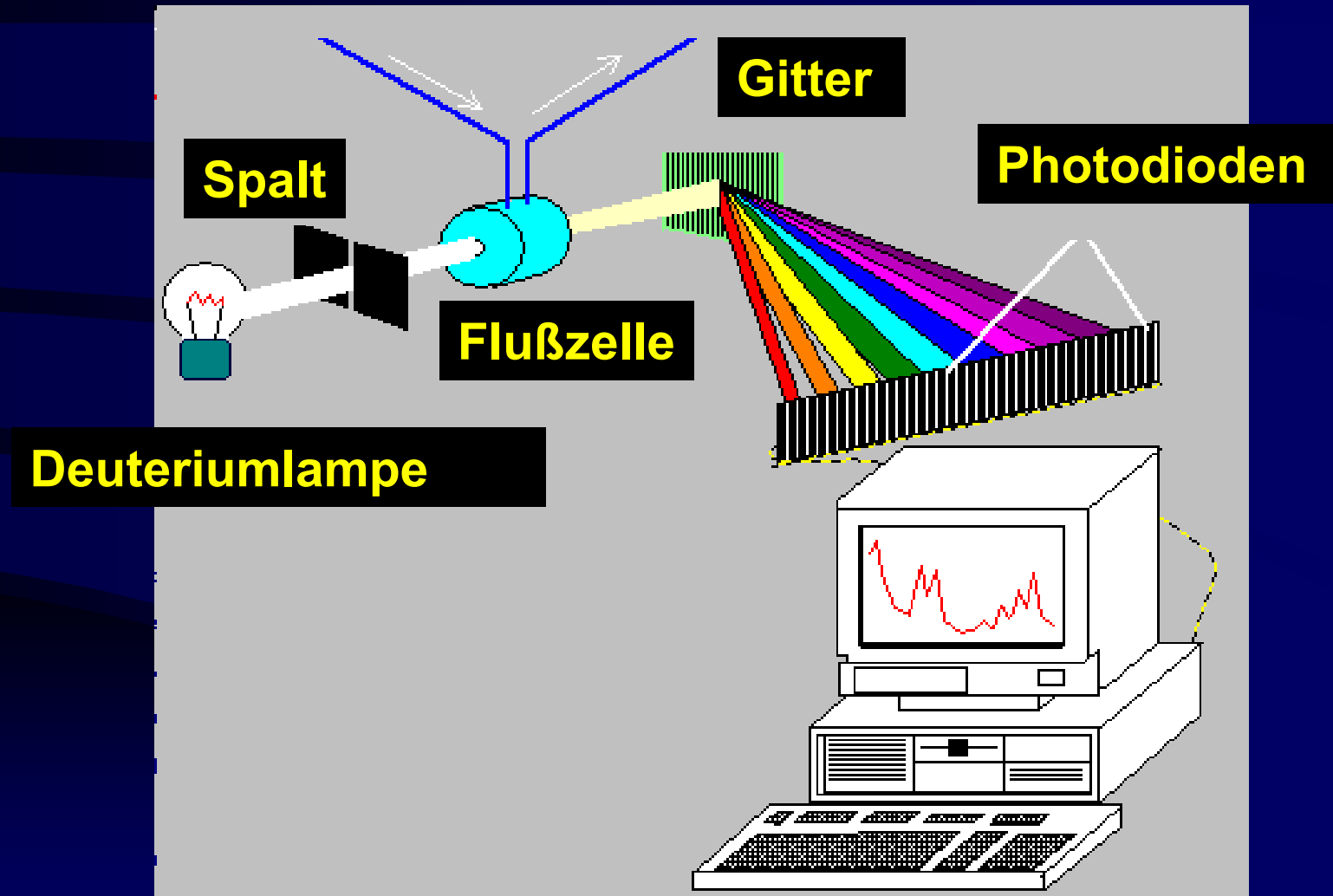


Abb. I.7.2: Der Photodiodenarray-Detektor

# I Theoretischer Teil

## I.7.2.1 Der ISO-Plot (DAD-Detektor)

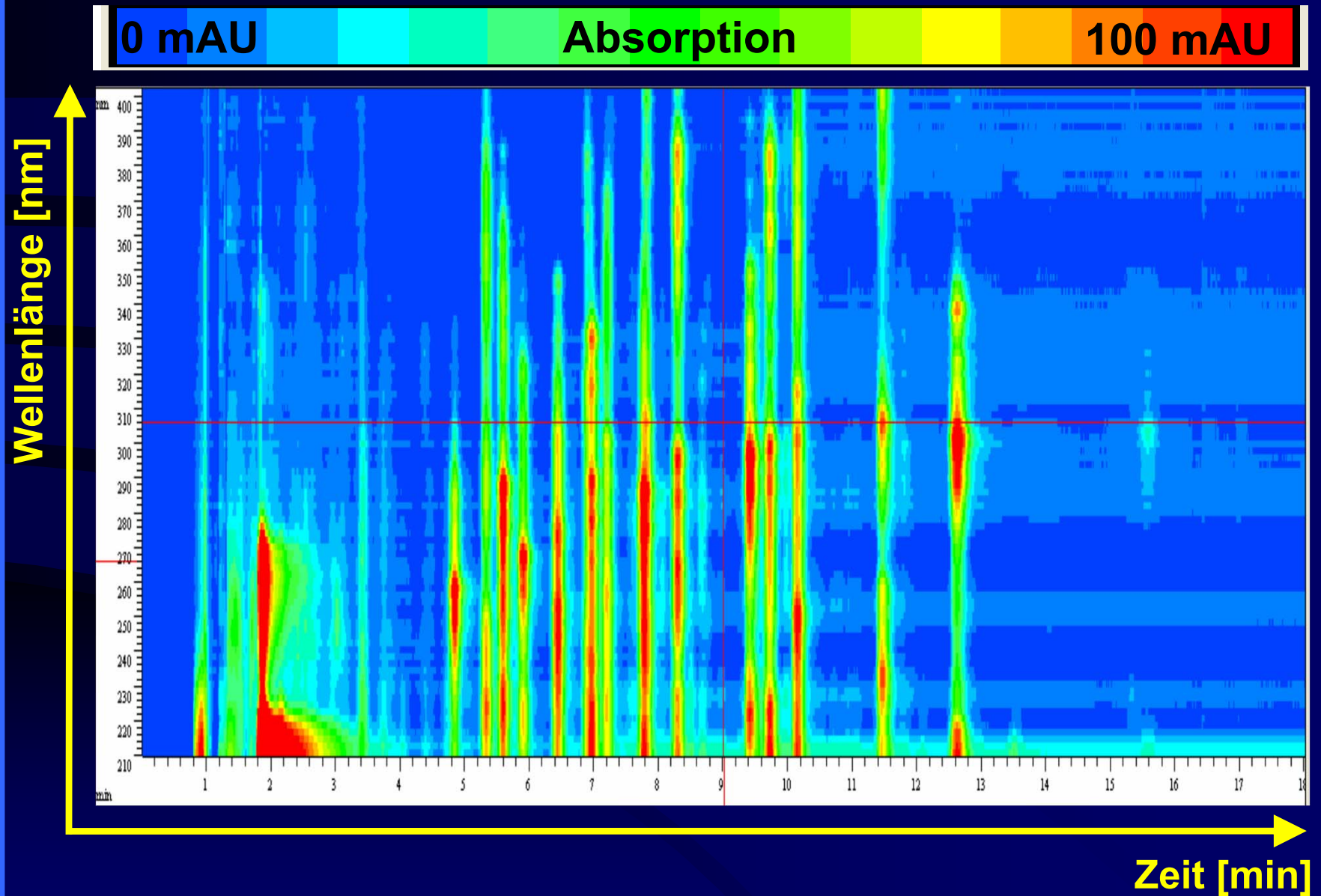


Abb. I.7.2.1: Isoplot einer chromatographischen Trennung

## I.7.2.2 Der 3D-Plot (DAD Detektor)

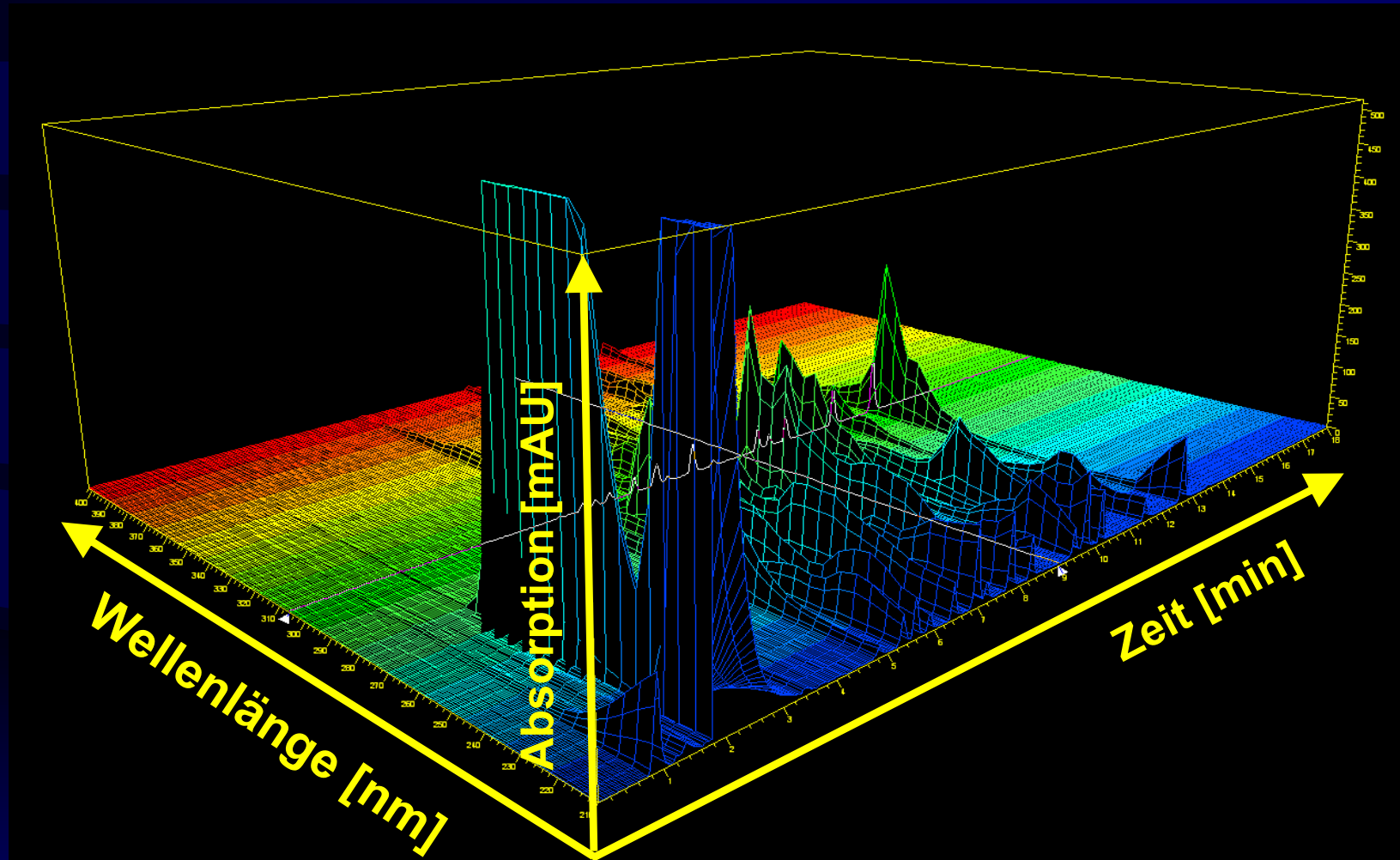


Abb. I.7.2.2: 3-D-Plot einer chromatographischen Trennung

## I.7.3 Der MS-Detektor

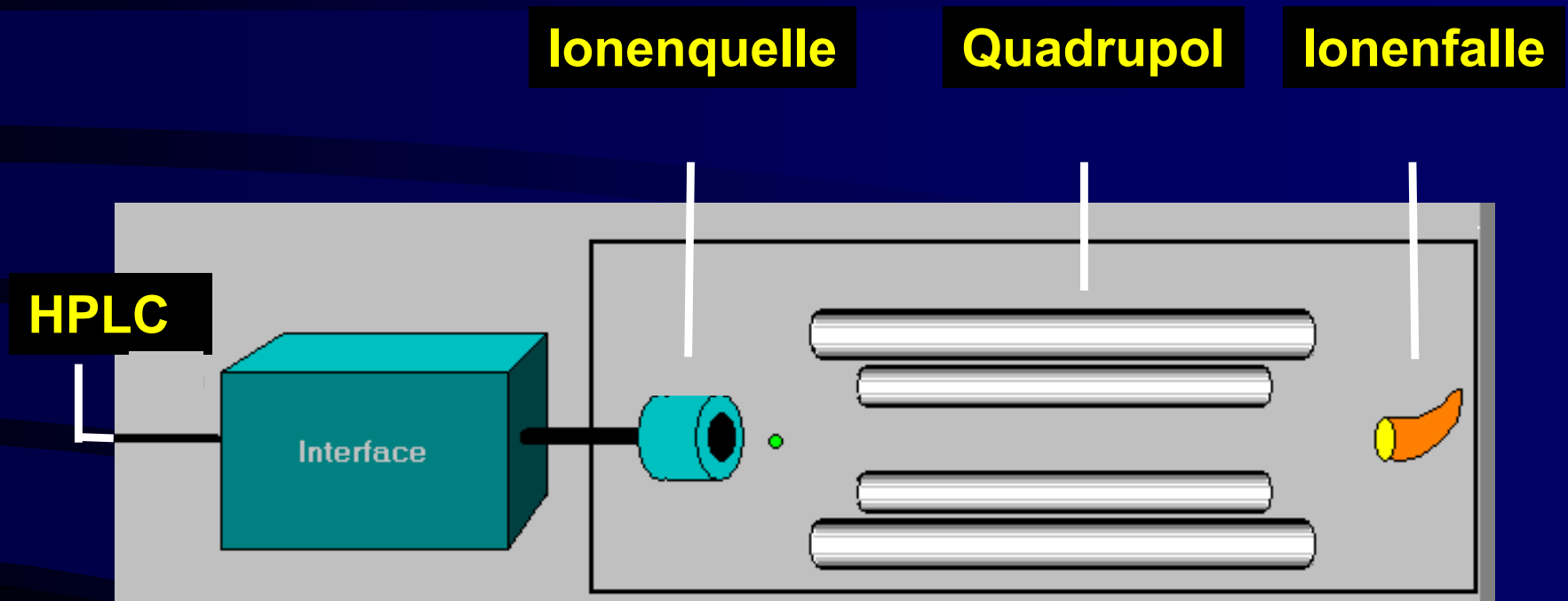


Abb. I.7.3: Vereinfachte Darstellung eines HPLC-MS-Detektors

# I Theoretischer Teil

## I.7.4 HPLC-Detektoren (Auswahl)

HPLC-Detektoren	Anwendung	Nachweisgrenze	Linearität
<b>UV/VIS DAD</b> (Diodenarray-Detektor);	selektiv für UV/VIS-aktive Analyte (ca. 190-950 nm)	ca. 0,3 ng/mL	1 x 10 <sup>4</sup>
<b>RI</b> (Refractive-Index-Det.) Brechungsindex	Analyte mit unterschiedlichem Brechungsindex zum Eluenten (temperaturabhängig, keine Gradientenelution, wenig empfindlich)	ca. 0,7 µg/mL	3 x 10 <sup>3</sup>
<b>FLD</b> (Fluorescence-Det.) Fluoreszenz	selektiv nur für fluoreszierende Analyte	0,2 pg/mL (!)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>
<b>ECD</b> (Elektro-Chemical-Det.) elektrochemisch	selektiv, nur für oxidierbare bzw. reduzierbare Analyte	ca. 1,0 pg/mL (!)	-
<b>CD</b> (Conductivity-Det.) Leitfähigkeit	Selektiv für Ionen	a)	ca. 10 <sup>5</sup>
<b>ELSD</b> (Evaporative-Light-Scattering-Det.) Verdampfungslichtstreuung.	Relativ Universell aber wenig empfindlich	modellabhängig	-
<b>MSD</b> (Mass-Selective-Det.) Masse	Relativ universell aber Analyte müssen ionisierbar sein.	modellabhängig	-

a) kann bis zu ca. 0,2% Unterschied in der Leitfähigkeit nachweisen.

**Abb. I.7.4: häufig eingesetzte HPLC-Detektoren**



## I.8. Software



## I.9 Die Methode des **Internen Standards**

...warum der Aufwand, wenn man exakt quantifizieren will ?

...warum ist eine externe Kalibrierung oft nicht ausreichend ?

- ➔ Es kann zu „ganz normalen“ **Schwankungen** zwischen den Läufen kommen, wie:
- ➔ Geringe Unterschiede im **Injektionsvolumen** (Luftblasen, manuelle Injektion).
- ➔ Veränderungen des **Säulenmaterials** im Laufe des Meßbetriebes.
- ➔ Veränderungen der **Umgebungstemperatur** etc.

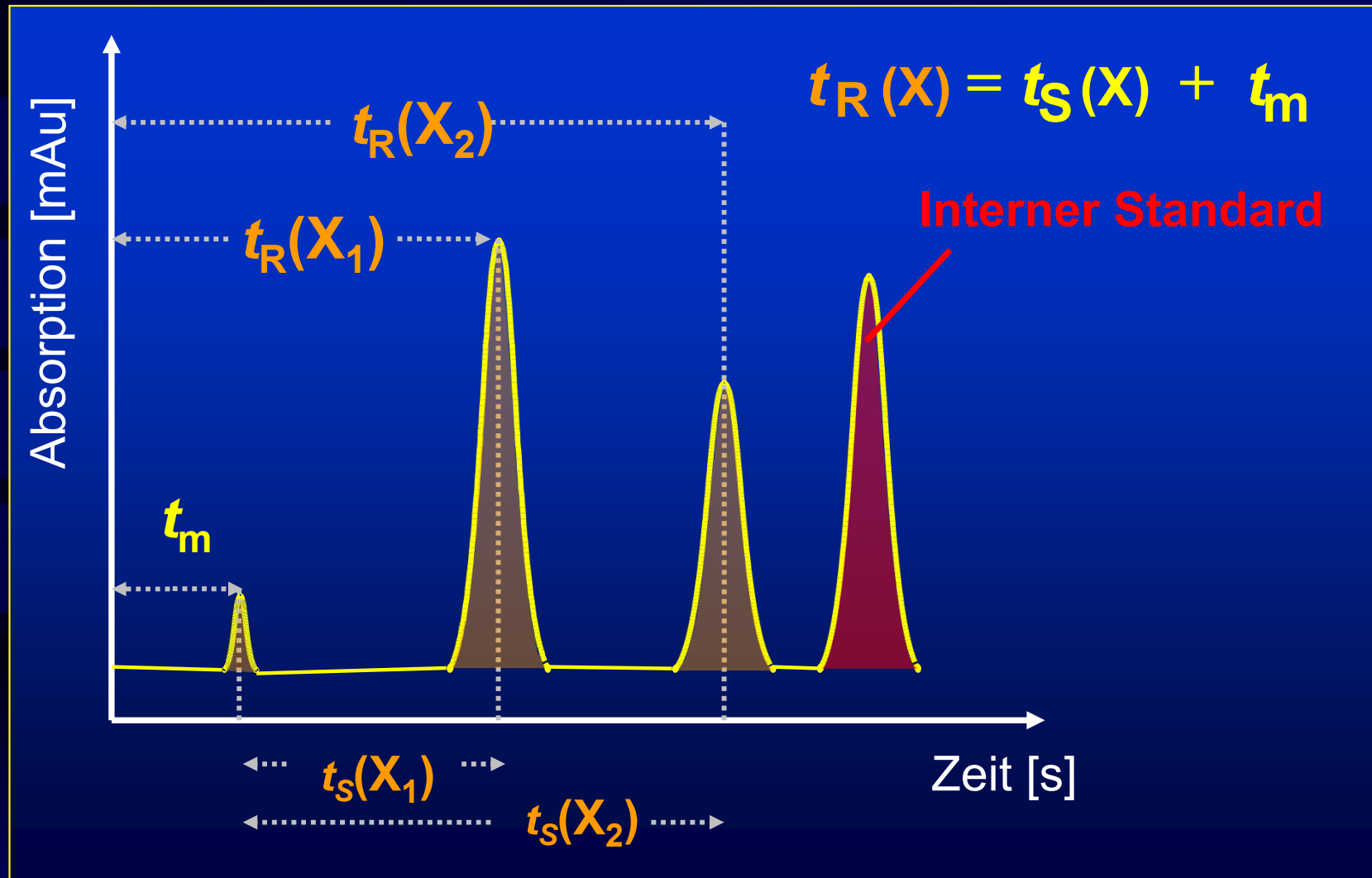
I.9 Die Methode des **Internen Standards**

Abb. I.9: Zugabe eines internen Standards (Tracer)

# I Theoretischer Teil

## I.9 Die Methode des **Internen Standards**

Die **Fläche** eines **Peaks** ist mit der **eingespritzten Stoffmenge** bzw. der **Massenkonzentration**  $m_i$  des Stoffes **proportional**:



$$a_i = f_i \cdot m_i \quad (1)$$

**Fläche der  
Komponente i**

**Responsefaktor  
der Komponente i**

**Massenkonzentration  
der Komponente i**

# I Theoretischer Teil

## I.9 Die Methode des **Internen Standards**

zu **bestimmende** Substanz **i**

**Tracer** Substanz

$$f_i = \frac{a_i}{m_i} \quad (2)$$

$$f_{Tr} = \frac{a_{Tr}}{m_{Tr}} \quad (3)$$

*Tr* = Tracer

$$KF_i = \frac{f_{Tr}}{f_i} = \frac{m_i^K \cdot a_{Tr}^K}{m_{Tr}^K \cdot a_i^K} \quad (4)$$

**Kalibrierfaktor der Komponente i**


***K* = Kalibrierlösung**

I.9 Die Methode des **Internen Standards**

$$\frac{f_{Tr}}{f_i} = \frac{m_i^x \cdot a_{Tr}^x}{m_{Tr}^x \cdot a_i^x} \quad (5)$$

$x$  = Probenlösung

Auflösen nach Massekonzentration der Komponente  $i$


$$m_i^x = \text{KF}_i \cdot \frac{a_i^x}{a_{Tr}^x} \cdot m_{Tr} \quad (6)$$

Aus Kalibriermessung vorher ermittelt

## I.10 Fragen zum Theoretischen Teil (Auswahl)

- 1.) In welche zwei grundlegenden Typen von **Phasensystemen** kann die **Adsorptionschromatographie** unterschieden werden?
- 2.) Erklären sie den Begriff „**endcapping**“.
- 3.) Welche Effekte hinsichtlich der Peakform können auftreten, wenn z.B. basische Substanzen (Amine, Phenole) auf **schlecht endgecappten RP-Phasen** chromatographiert werden (2 Beispiele)?
- 4.) Nennen Sie mindestens drei Vorteile, die **RP-Phasen** im Vergleich zu **NP-Phasen** aufweisen.
- 5.) Was versteht man unter der **Eluotropen Reihe**, wie wurde sie bestimmt, und welchem Ordnungsprinzip folgt sie?
- 6.) Welcher Zusammenhang besteht zwischen **E<sub>0</sub> (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)** und **E<sub>0</sub> (SiO<sub>2</sub>)** ?
- 7.) Zwischen welchen beiden **grundlegenden Arbeitsweisen** wird beim Einsatz der mobilen Phase während einer chromatographischen Trennung unterschieden und wie nennt man diese Formen der Elution?
- 8.) Erläutern sie in diesem Zusammenhang die Begriffe „**binärer**“, „**ternärer**“ und „**quaternärer**“ Gradient.
- 9.) Nennen sie zwei Gründe, warum Eluenten **entgast** werden sollten.
- 10.) Nennen sie vier mögliche Verfahren der **Eluentenentgasung**
- 11.) Wie ist der **Kalibrierfaktor K<sub>Fi</sub>** einer Komponente i definiert ?
- 12.) Nennen sie mindestens vier **Eigenschaften**, die ein geeigneter **Tracer** aufweisen muß.
- 13.) Nennen sie einen wesentlichen **Unterschied** zwischen dem **Bauprinzip** eines **VWD-Detektors** und eines **DAD-Detektors**.
- 14.) Erläutern sie in diesem Zusammenhang der Ausdruck: „**Inverse Optik**“. Nennen sie neben UV/VIS vier weitere Arten von **HPLC-Detektoren**.