



Chromatographie II ***HPLC*** ***Seminar***

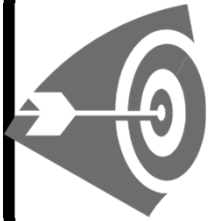
Chromatographie II

HPLC Praktikum (nur Theorie)

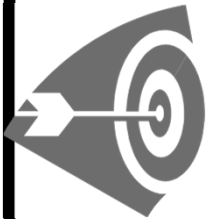
- I.1 Einleitung (*siehe Skript Praktikum*)
- I.2 Ziele des Praktikums
- I.3 Die stationäre Phase
- I.4 Die mobile Phase
- I.5 Die Pumpe(n)
- I.6 Die Injektionseinheit
- I.7 Die Detektoreinheit
- (I.8 Die Software)
- I.9 Die Methode des ISTD
- I.10 Aufgaben zum theoretischen Teil

I.2 Ziele des Praktikums

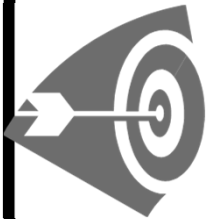
Nach diesem Praktikum soll man u.a.:



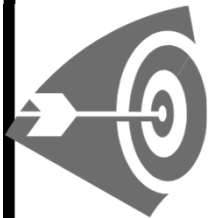
Ziel 1 Über den Aufbau einer HPLC-Anlage, sowie über stationäre und mobile Phase Bescheid wissen.



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



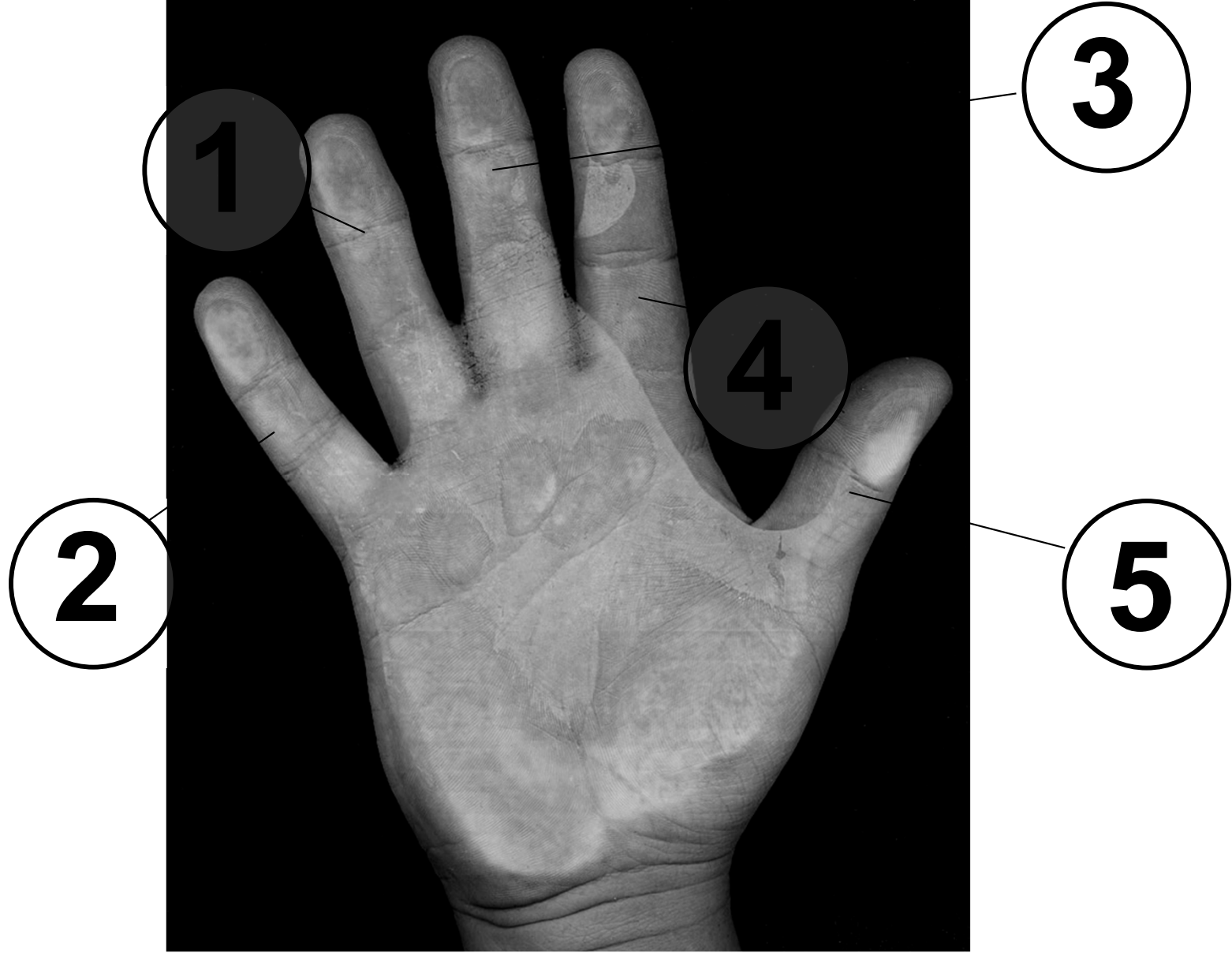
Ziel 3 Wichtige chromatographische Kenngrößen (z.B. t_m , $t_R(X)$, V_m , $V_R(X)$, u_m , $u(X)$, k etc.) bestimmen können.



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



Kapitel I Theoretischer Teil



I.2.1 Komponenten der HPLC Anlage

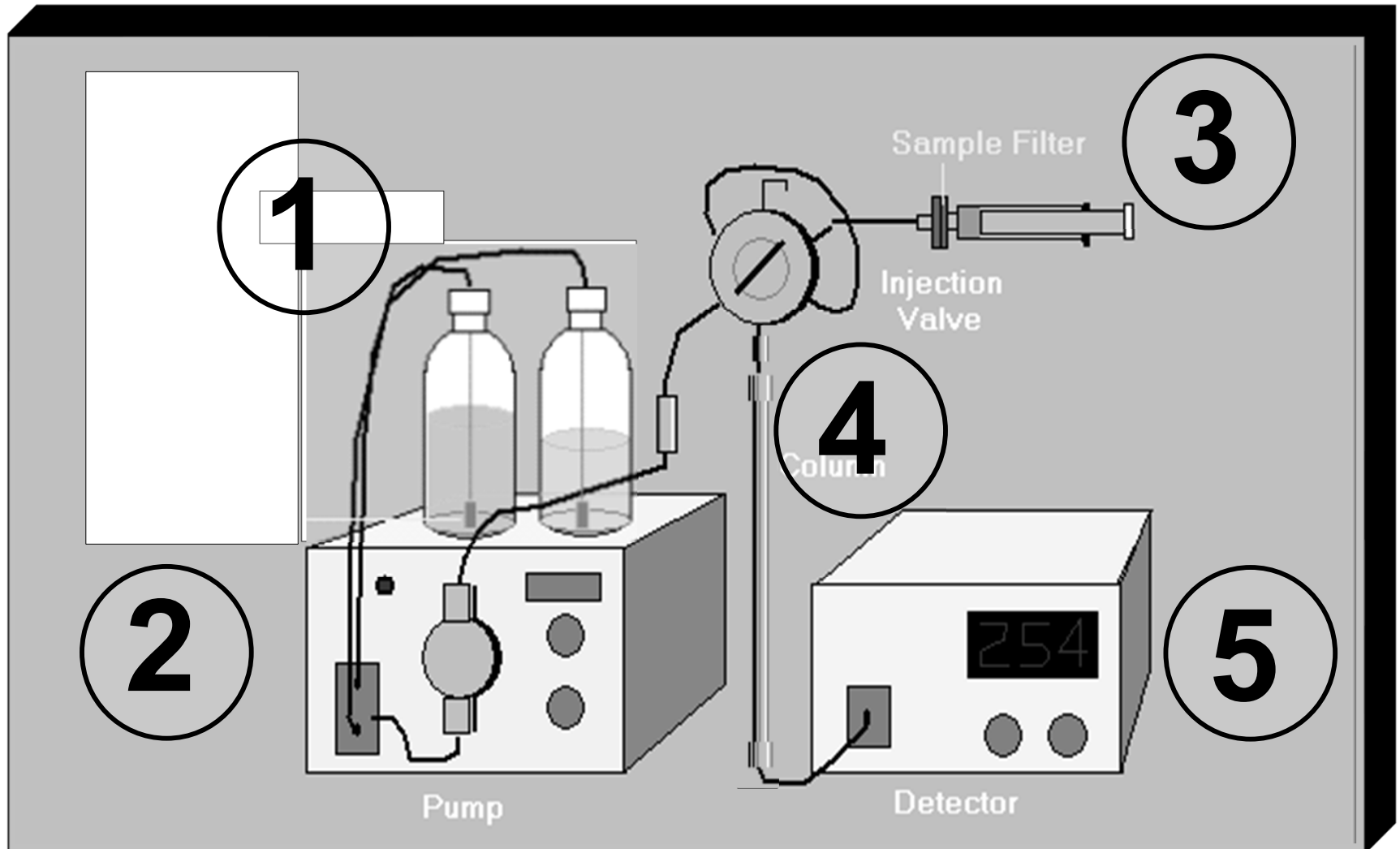


Abb. I.2.1: Komponenten eines HPLC-Systems

I.3 Die Stationäre Phase

Adsorptions-Chromatographie teilt sich auf in:

Normal-Phase-Chomatographie:

NP

Stationäre Phase
polar

Mobile Phase
unpolar

Reversed-Phase-Chomatographie:

RP

Stationäre Phase
unpolar

Mobile Phase
polar

I.3 Die Stationäre Phase

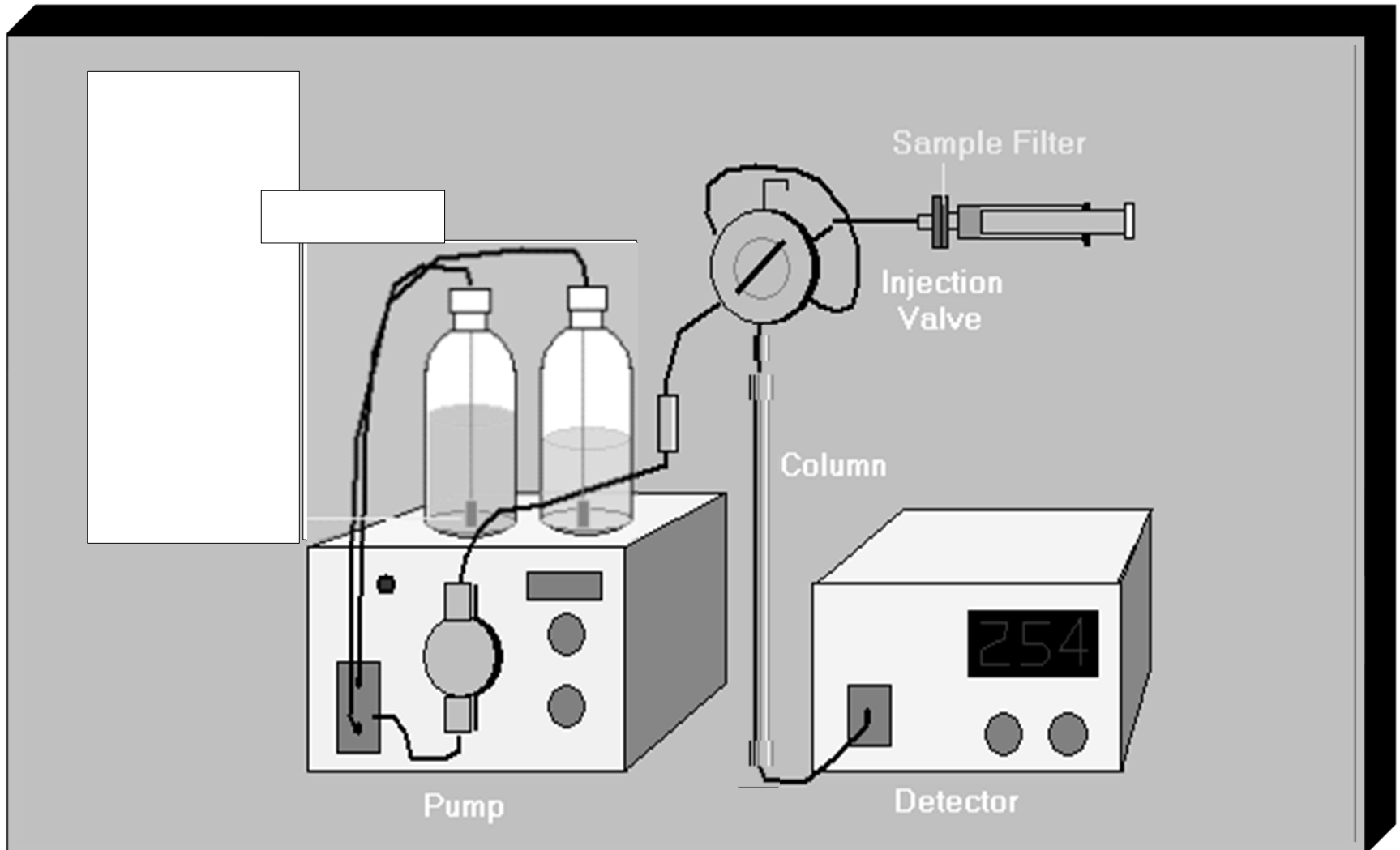


Abb. I.3.1: Komponenten eines HPLC-Systems (Säule)

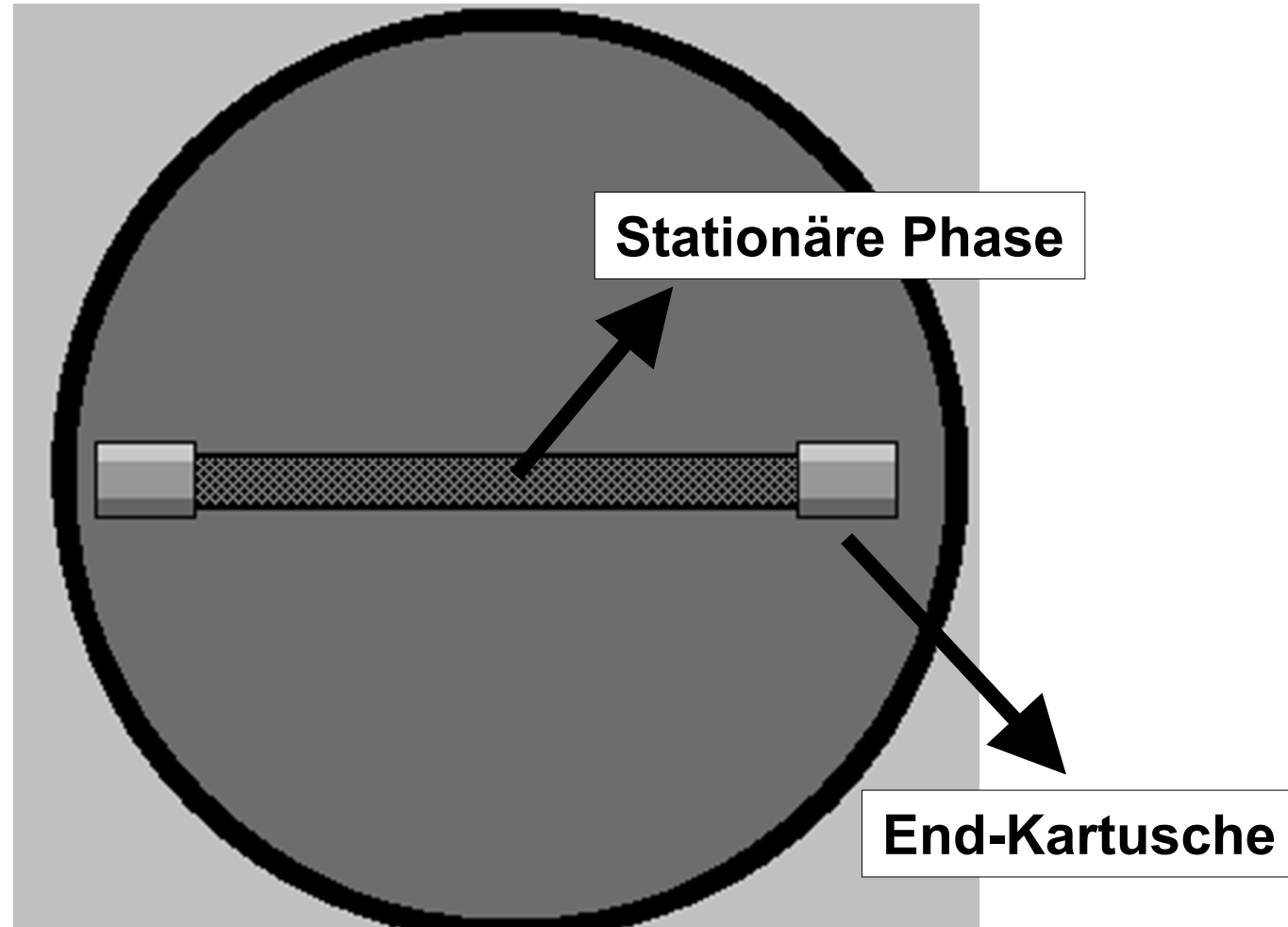


Abb. I.3.2: Darstellung einer HPLC-Säule

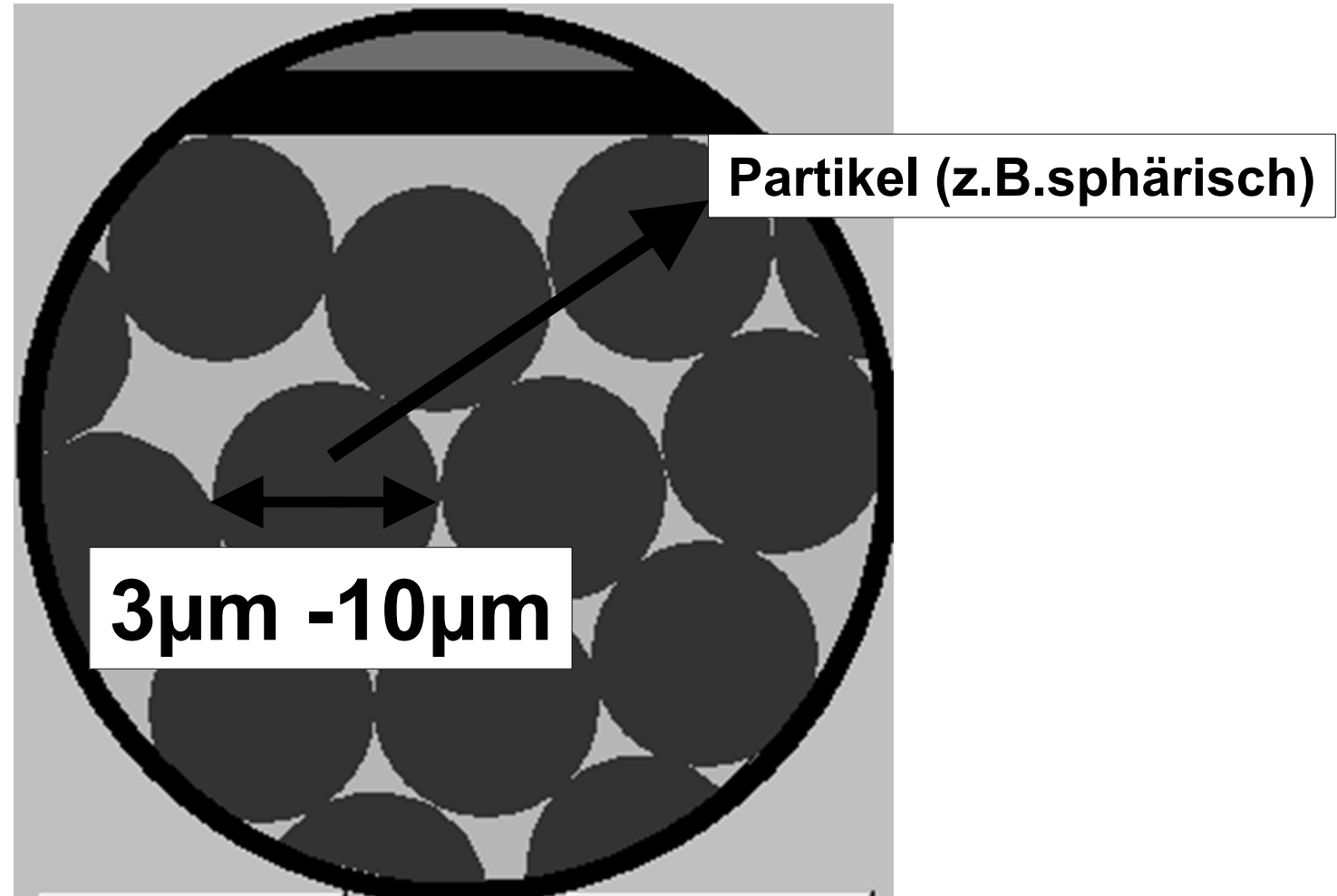


Abb. I.3.3: Darstellung der Einzelpartikel

I.3.1 Beispiele stationärer Phasen

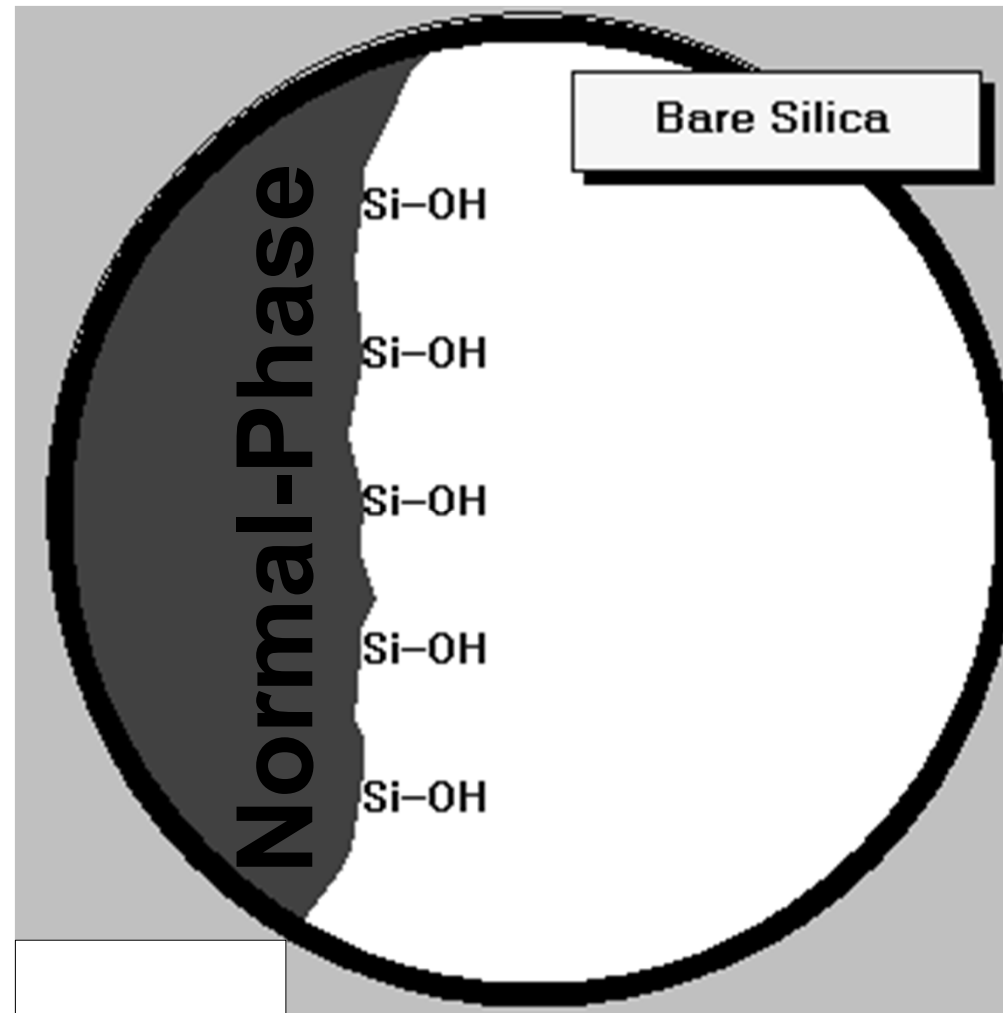


Abb. I.3.1.a: Material mit polaren Silanol- (SiOH)- Endgruppen

I.3.1 Beispiele stationärer Phasen

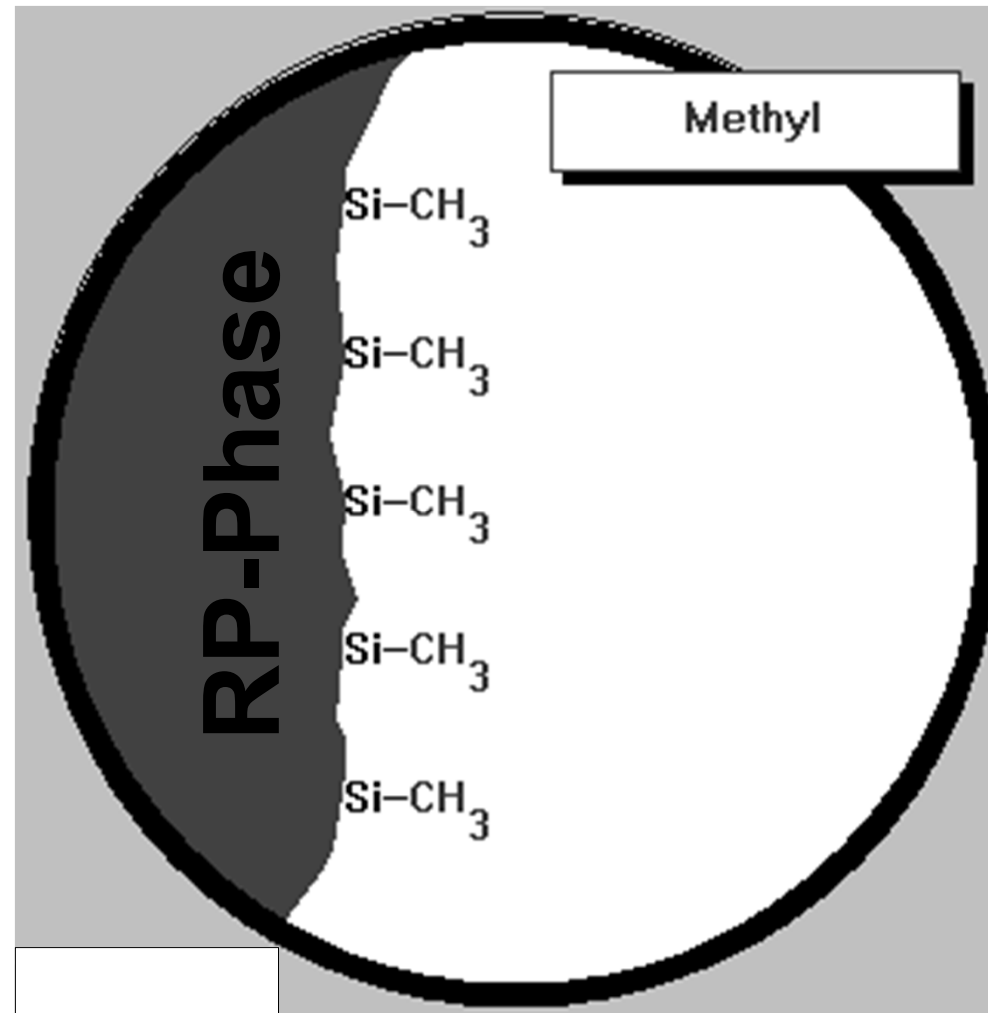


Abb. I.3.1.b: Material mit unpolaren CH_3 -Endgruppen

I.3.1 Beispiele stationärer Phasen

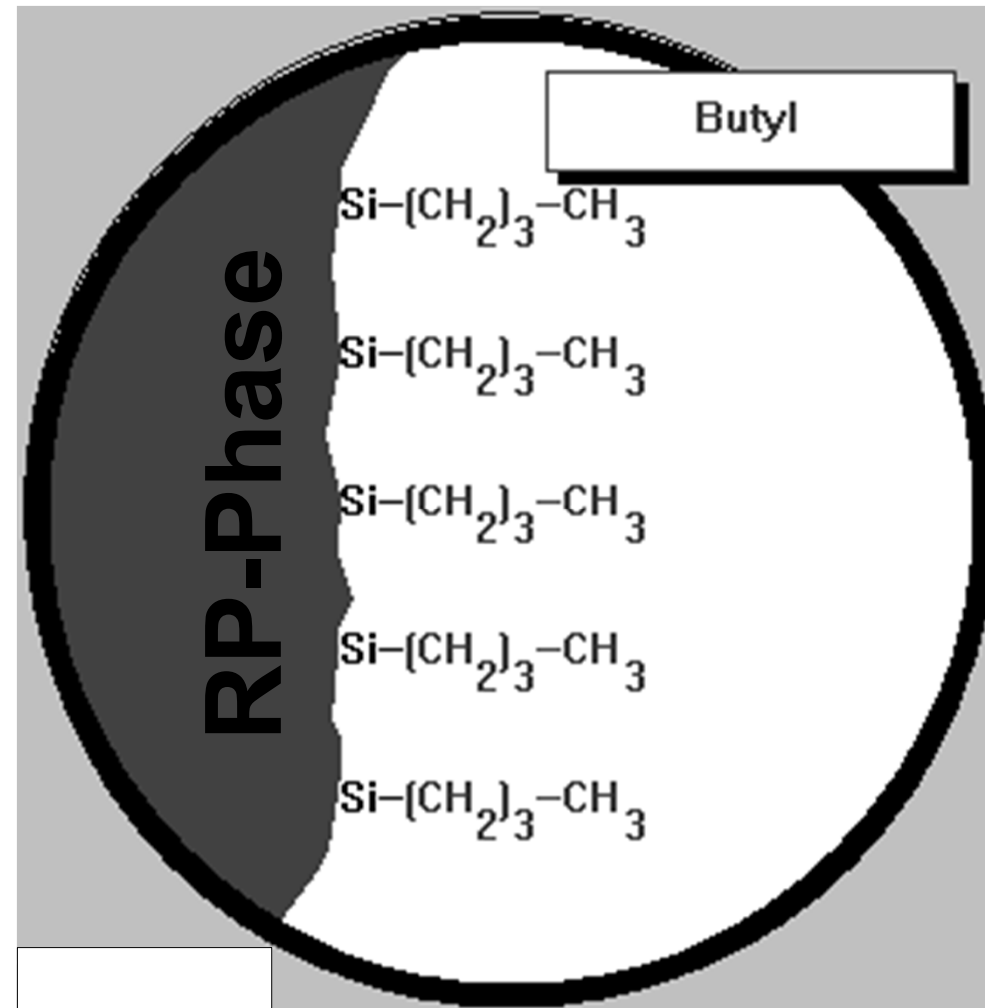


Abb. I.3.1c: Material mit unpolaren C4-Endgruppen

I.3.1 Beispiele stationärer Phasen

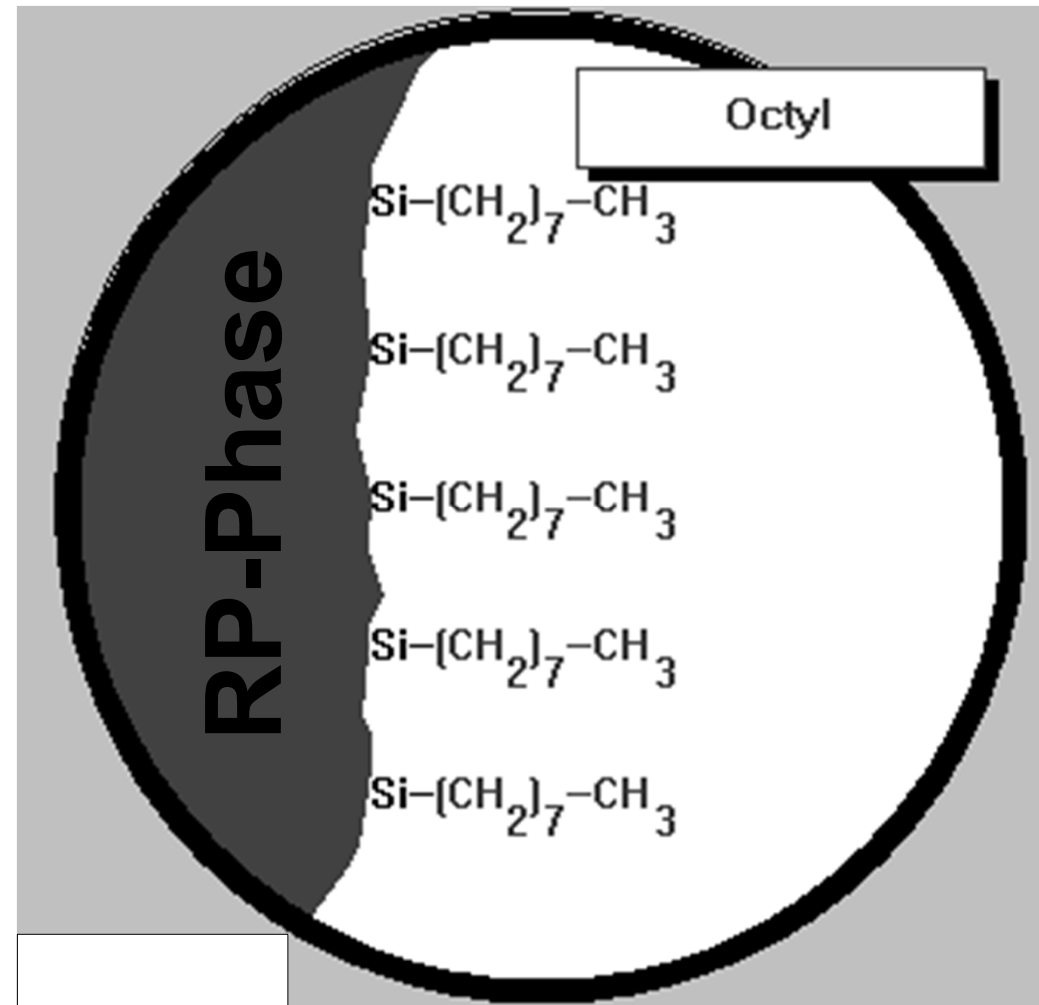


Abb. I.3.1.d: Material mit unpolaren C8-Endgruppen

I.3.1 Beispiele stationärer Phasen

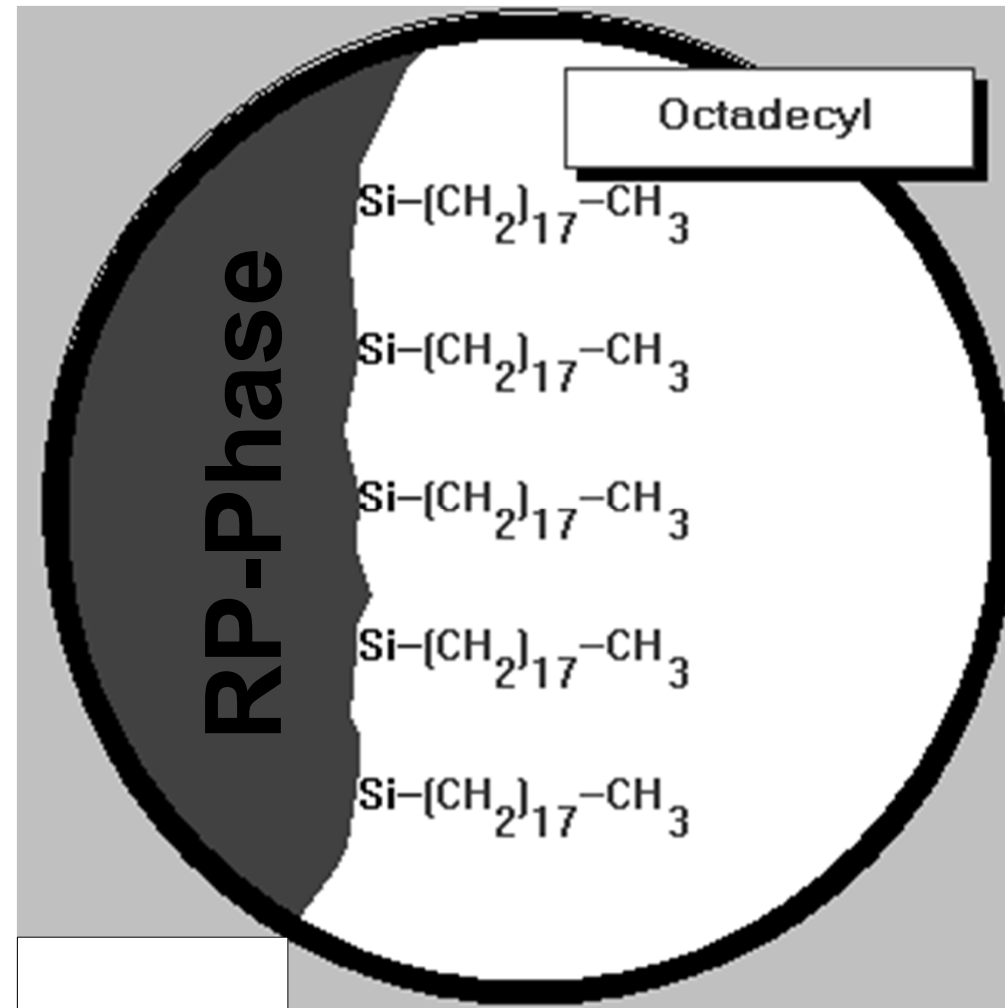


Abb. I.3.1e: Material mit C18-Endgruppen

I.3.1 Beispiele stationärer Phasen

Im Praktikumsversuch wird folgende Säule eingesetzt:

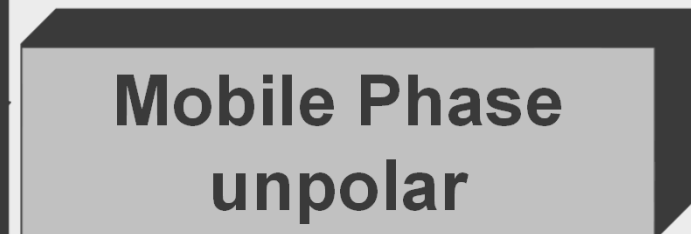
<i>Hersteller:</i>	<i>Fa. Phenomenex</i>
<i>Dimensionen:</i>	<i>150 mm x 4.6 mm (ID)</i>
<i>Material:</i>	<i>3 μm</i>
<i>stationäre Phase:</i>	<i>C18</i>

I.4 Die mobile Phase

Adsorptions-Chromatographie teilt sich auf in:

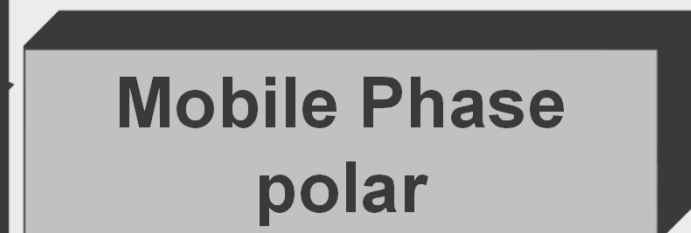
Normal-Phase-Chromatographie:

NP



Reversed-Phase-Chromatographie:

RP



I.4 Die mobile Phase

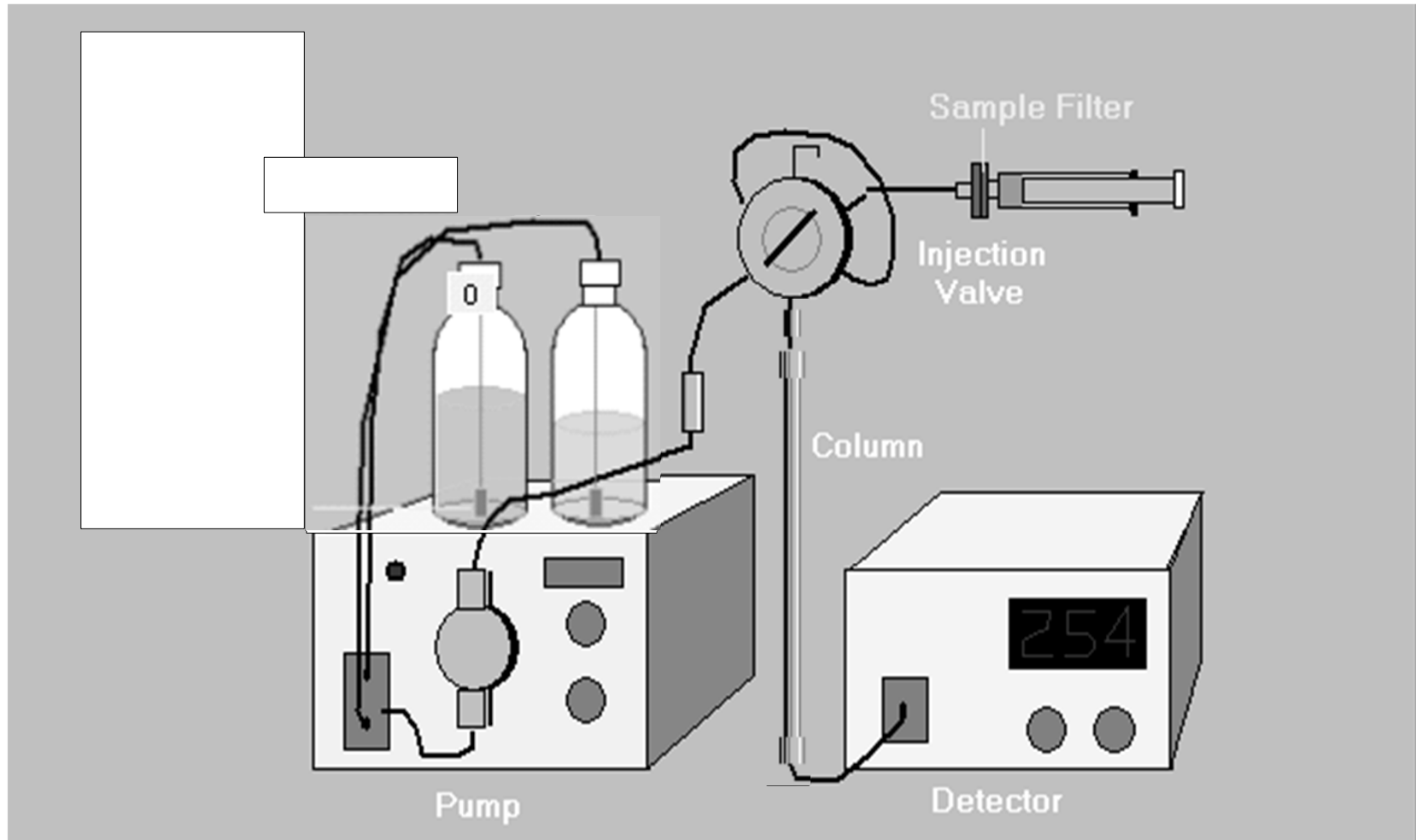


Abb. I.4.1: Komponenten eines HPLC-Systems (Eluenten)

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


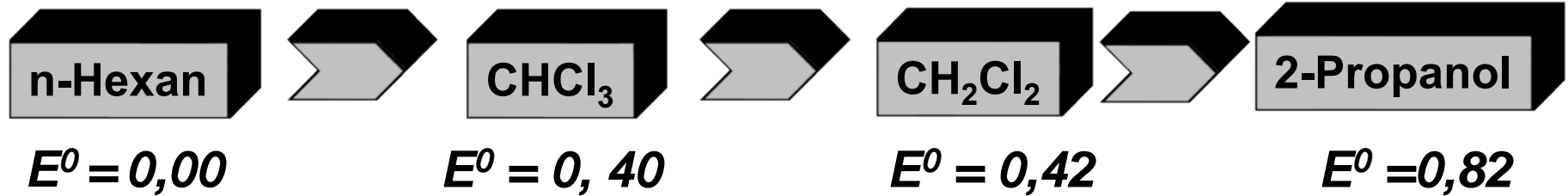


Abb. I.4.1.a: Die Eluotrope Reihe (Auszug)

I.4.1 Die Eluotrope Reihe



Polarität \rightarrow

Für die Normalphasen-(NP)-Chomatographie gilt:

Elutionskraft steigt \rightarrow

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

Beispiel für die Normalphasen-(NP):

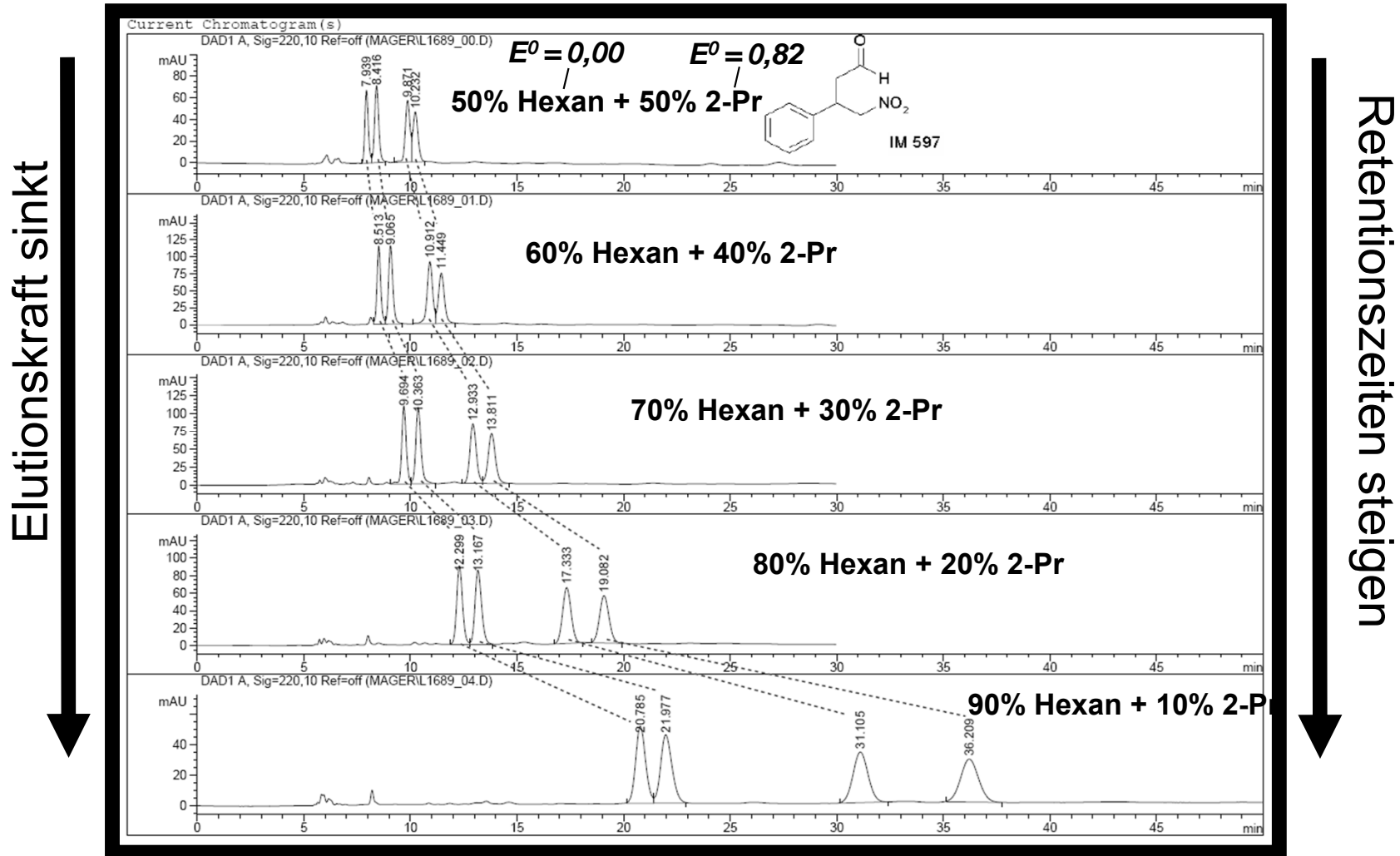
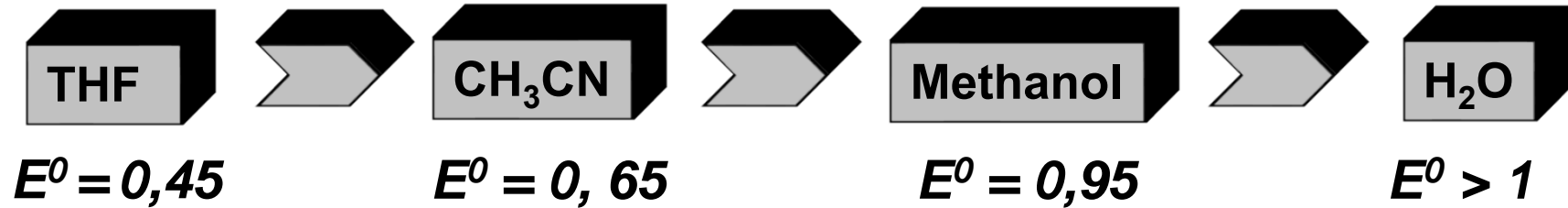


Abb. I.4.1.b: Entwicklung einer NP-Trennung (isokratisch)

I Theoretischer Teil

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:

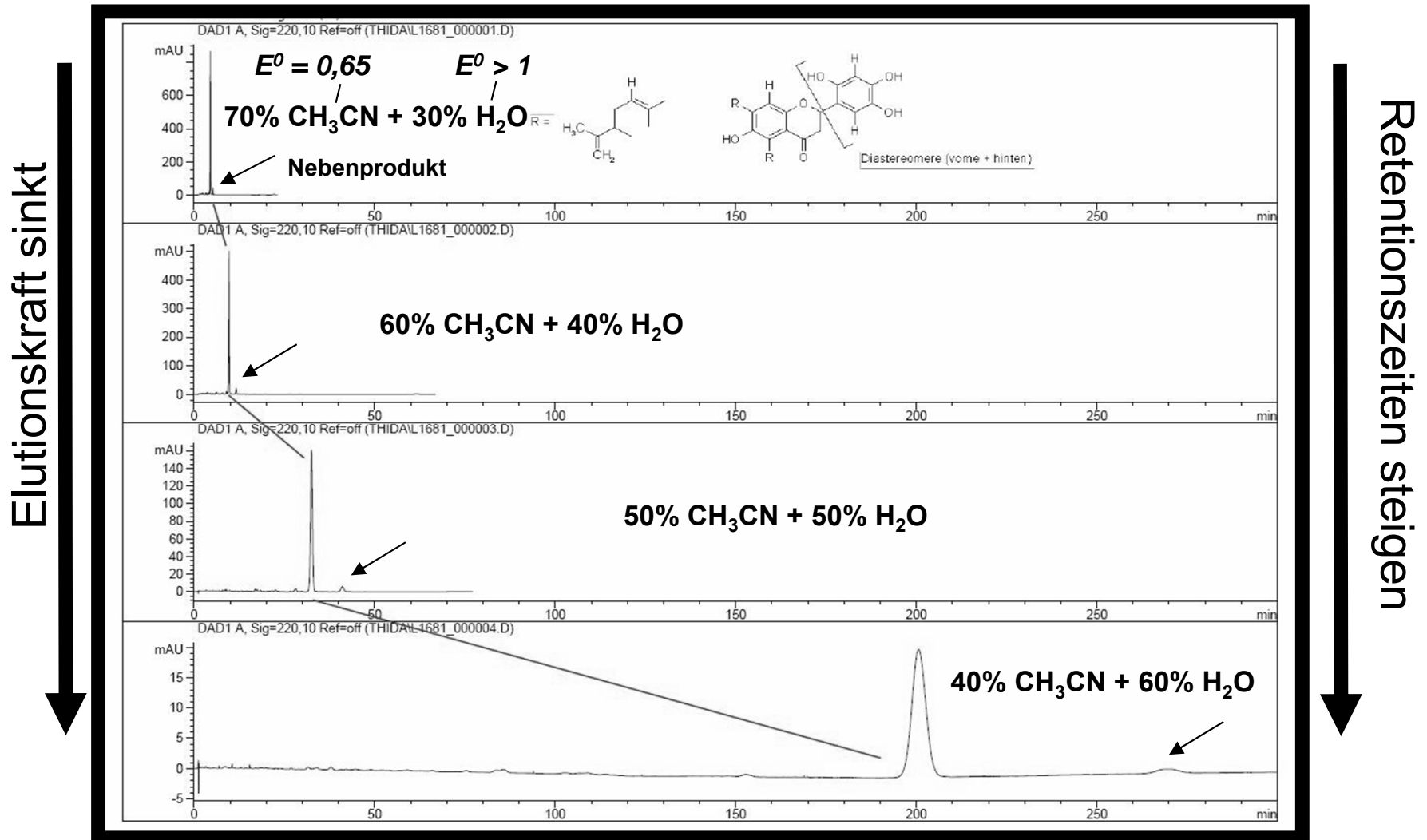


Abb. I.4.1.c: Entwicklung einer RP-Trennung (isokratisch)

I.4.2 Die isokratische-Elution

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

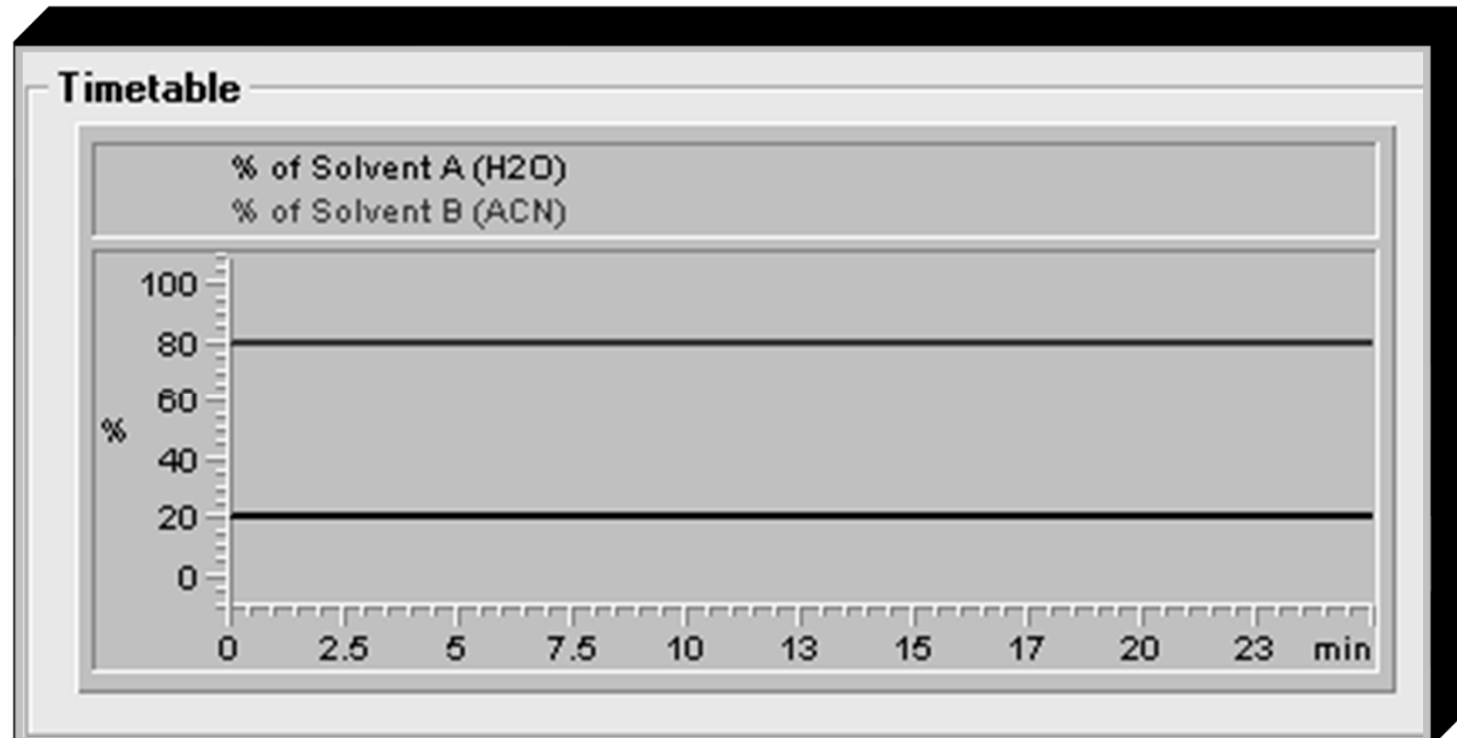


Abb. I.4.2.: Eluentenverlauf bei isokratischer Elution

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

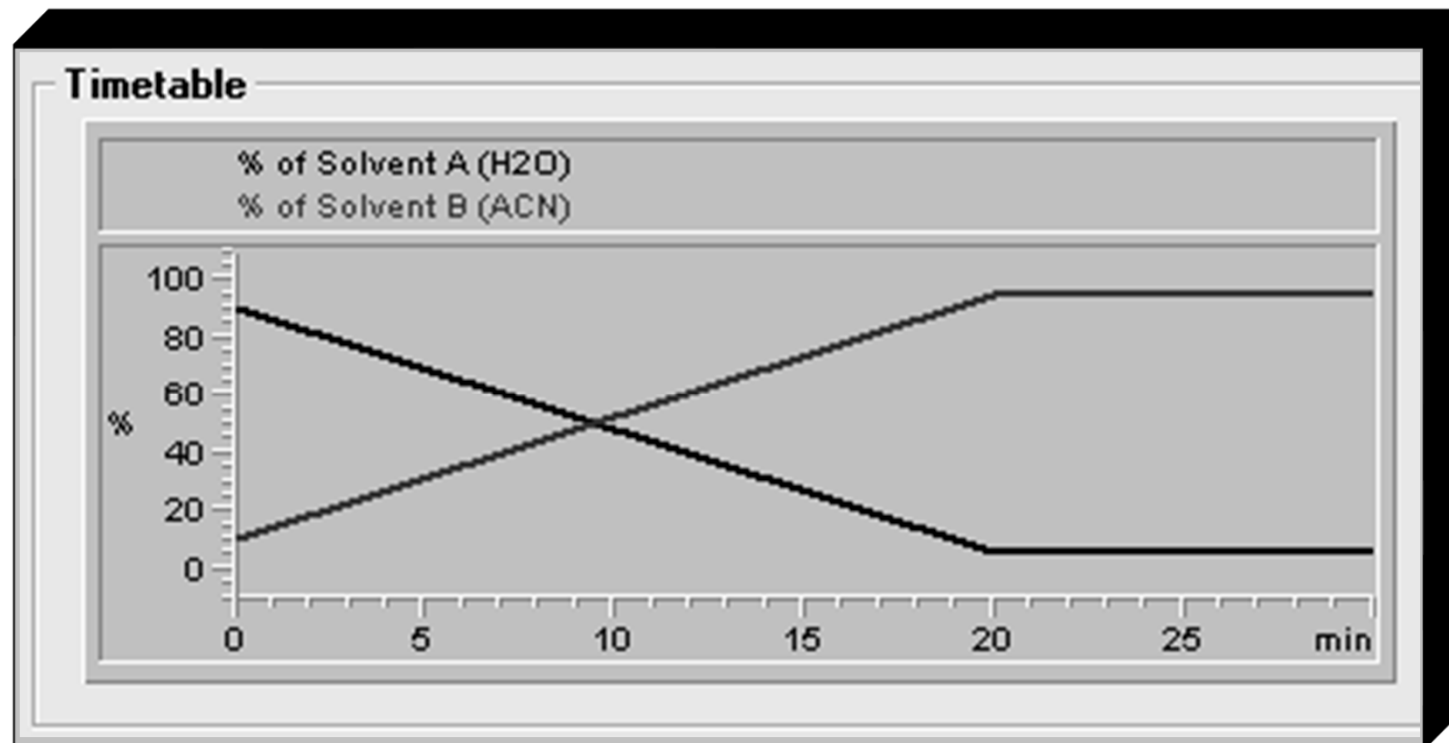


Abb. I.4.3: Eluentenverlauf bei Gradienten Elution

I.5 Die Pumpe / Injektor / Detektor

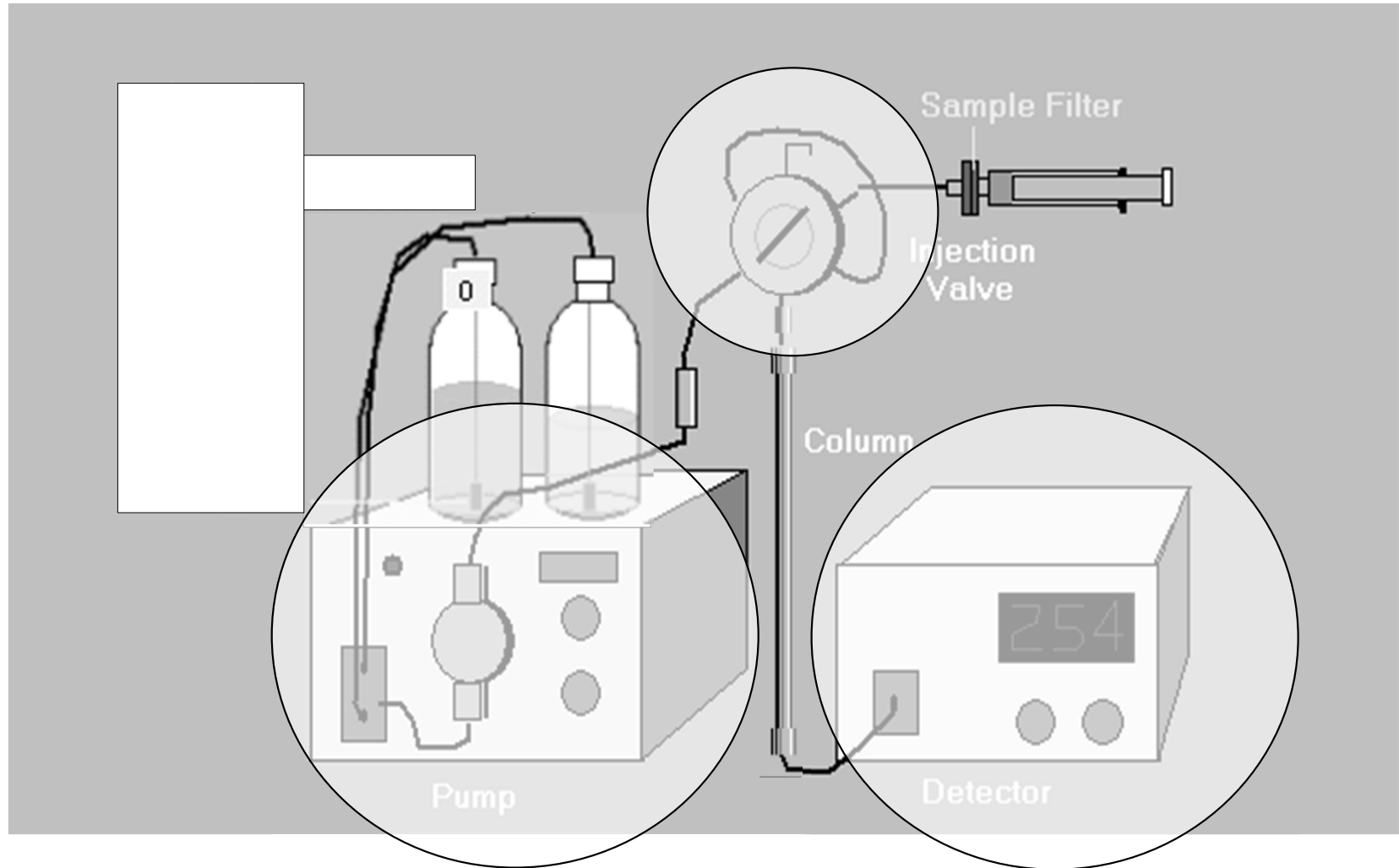


Abb. I.5.a: Komponenten eines HPLC-Systems (Pumpe, Detektor, Injektionseinheit)

I.5 Die Pumpe

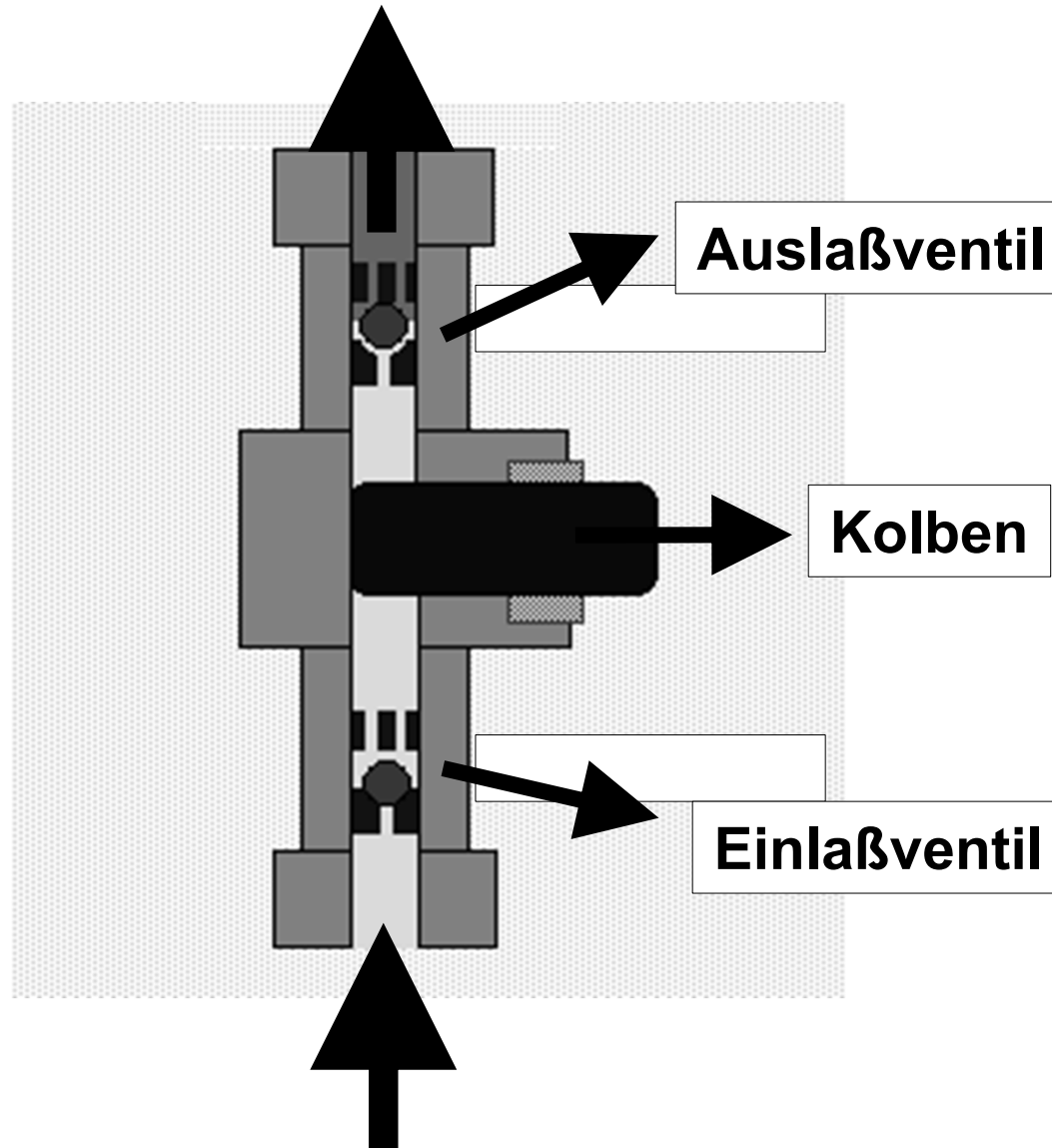


Abb. I.5.b: Kolbenpumpe

I.5 Die Pumpe

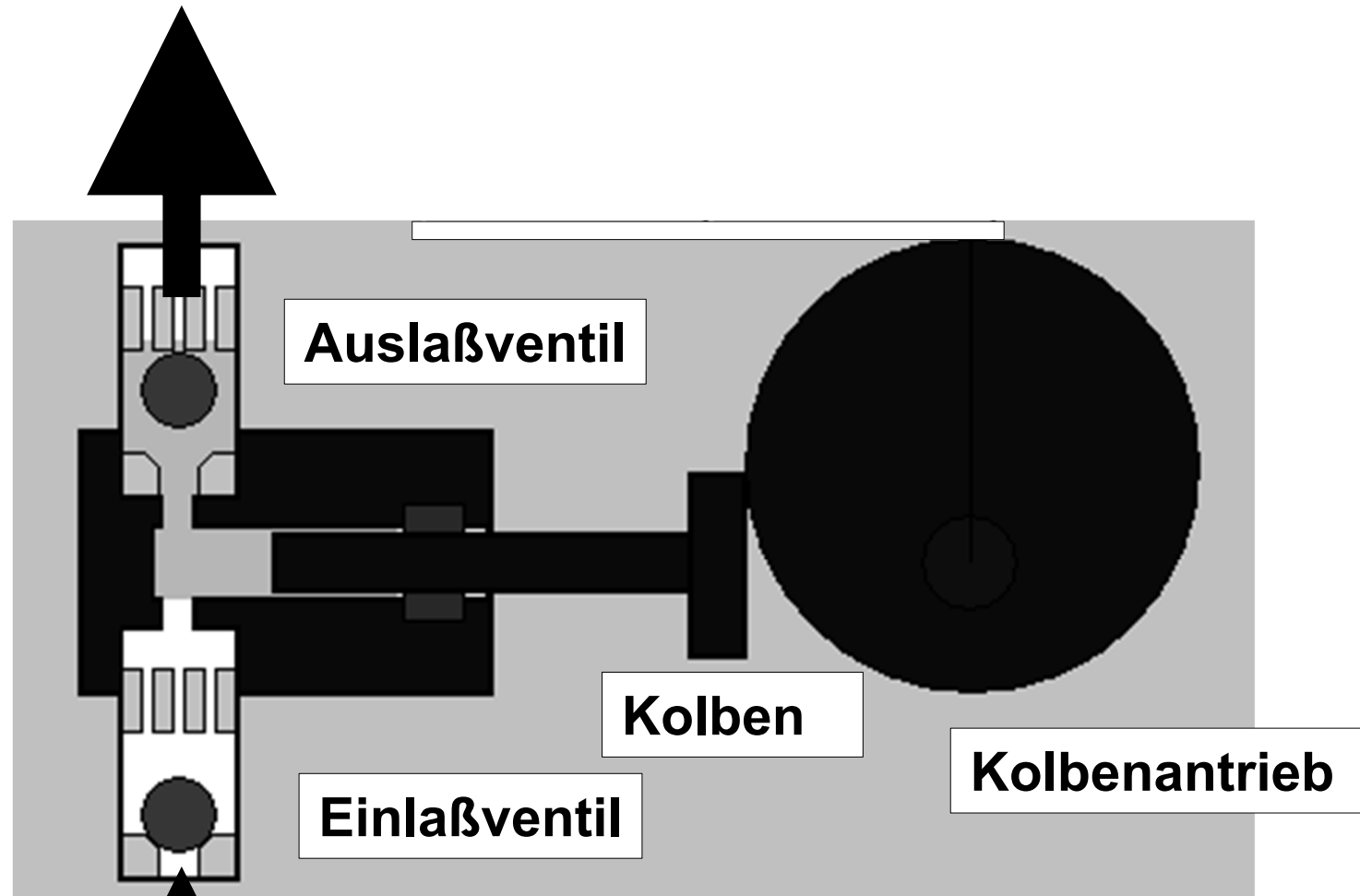


Abb. I.5.c: Einkolben-Pumpe

I.5 Die Pumpe

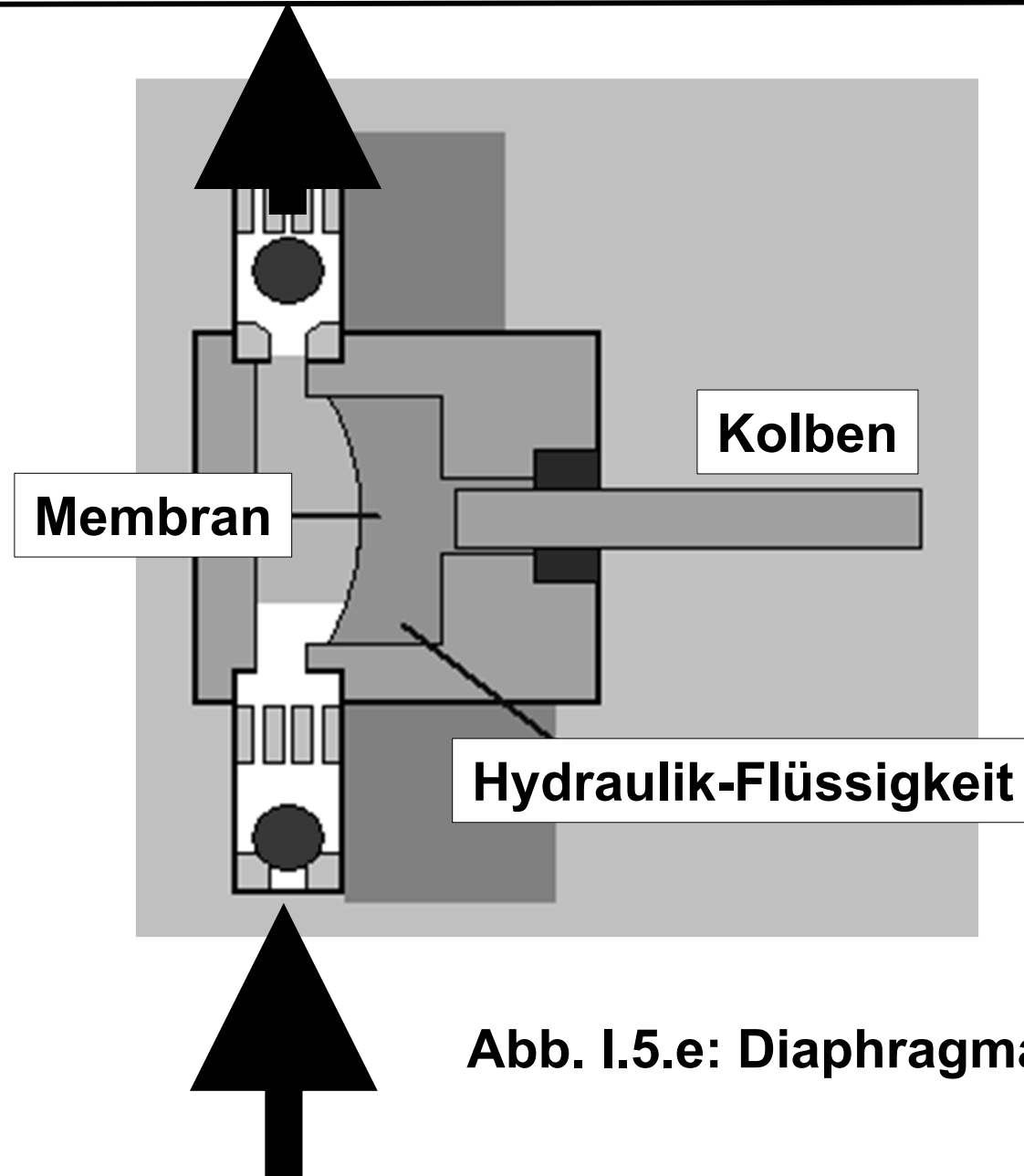
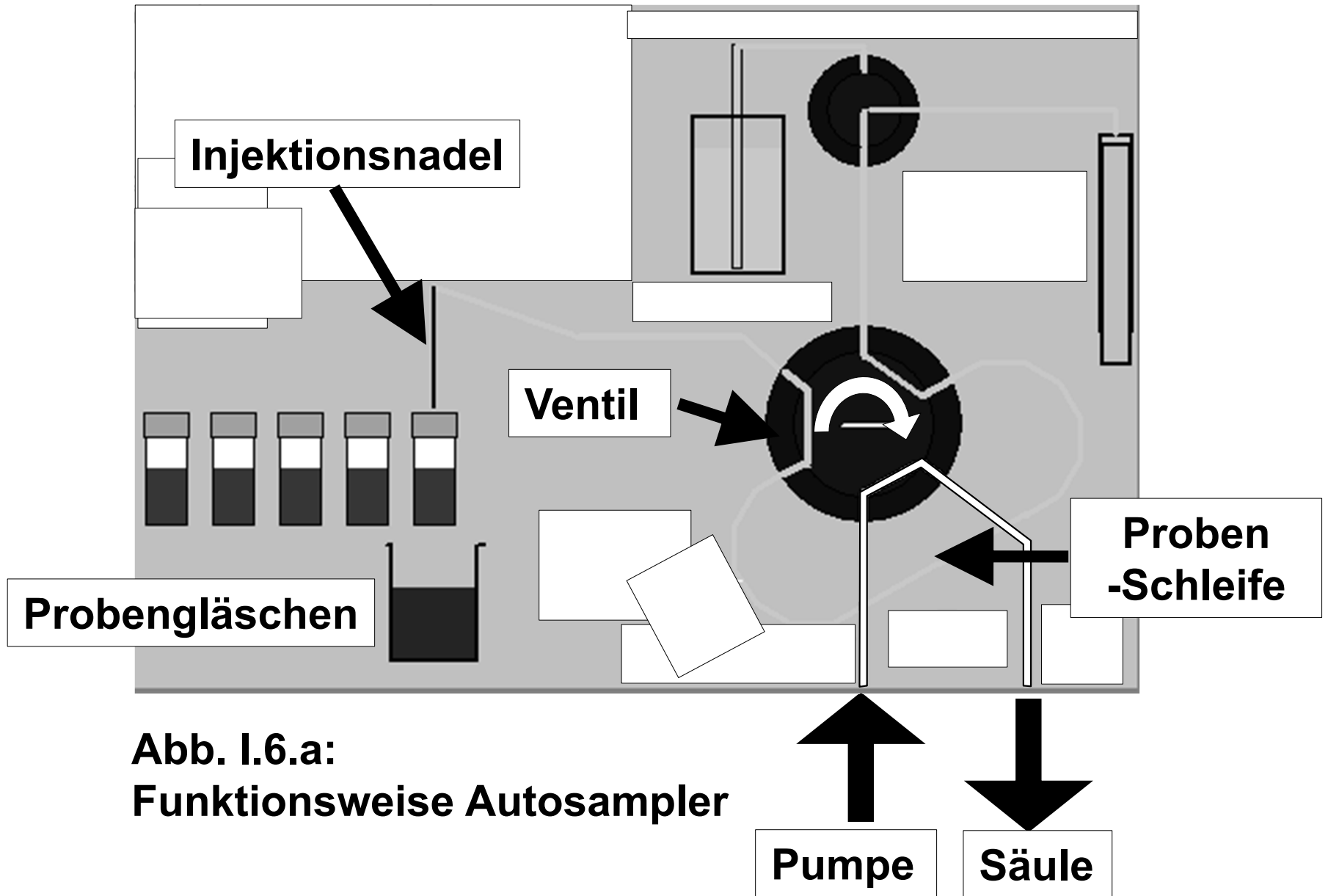
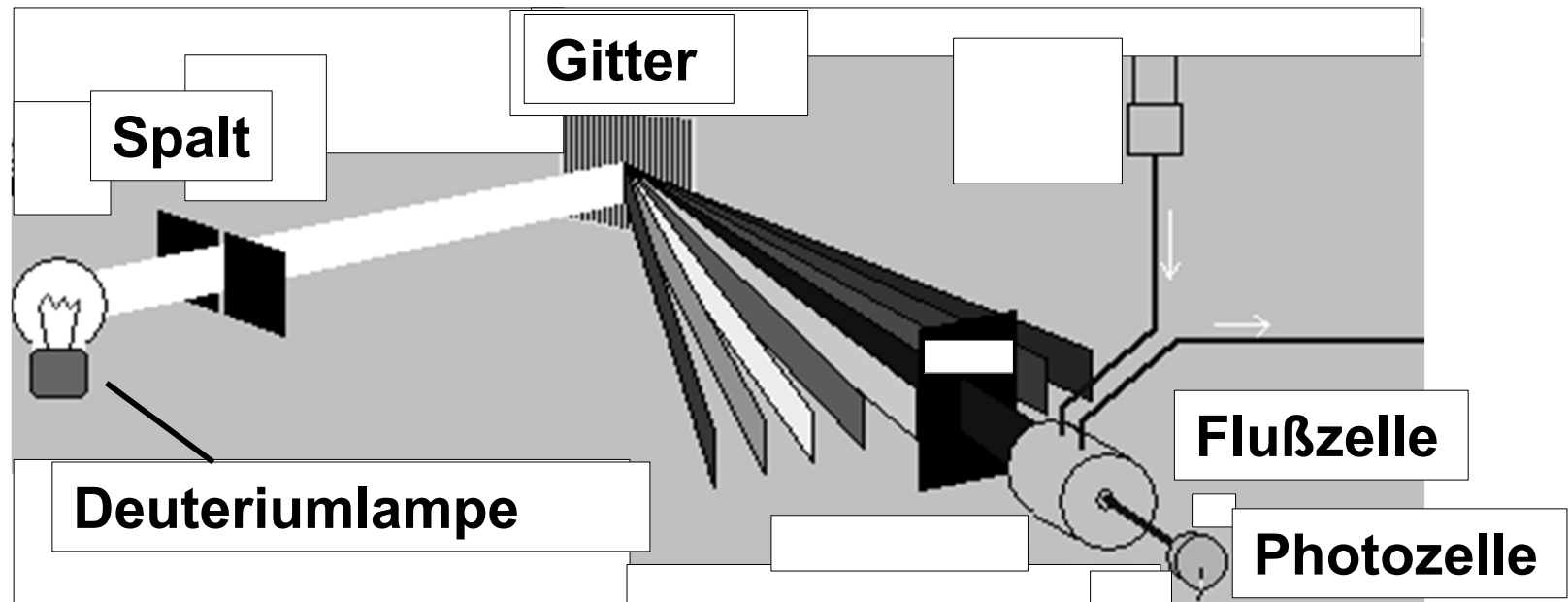


Abb. I.5.e: Diaphragma-Pumpe



I.7.1 Der UV/VIS-Detektor



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

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

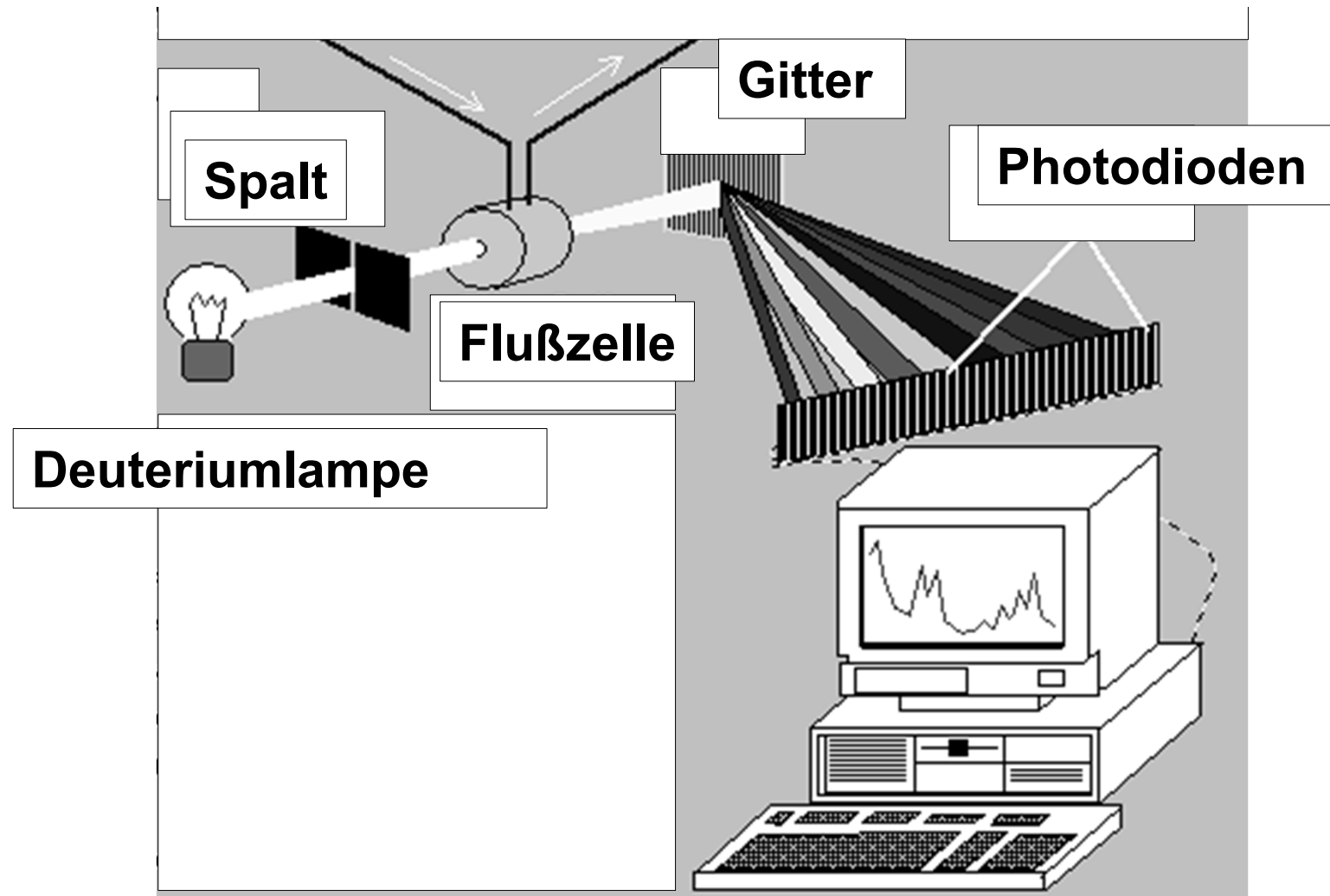


Abb. I.7.2: Der Photodiodenarray-Detektor

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

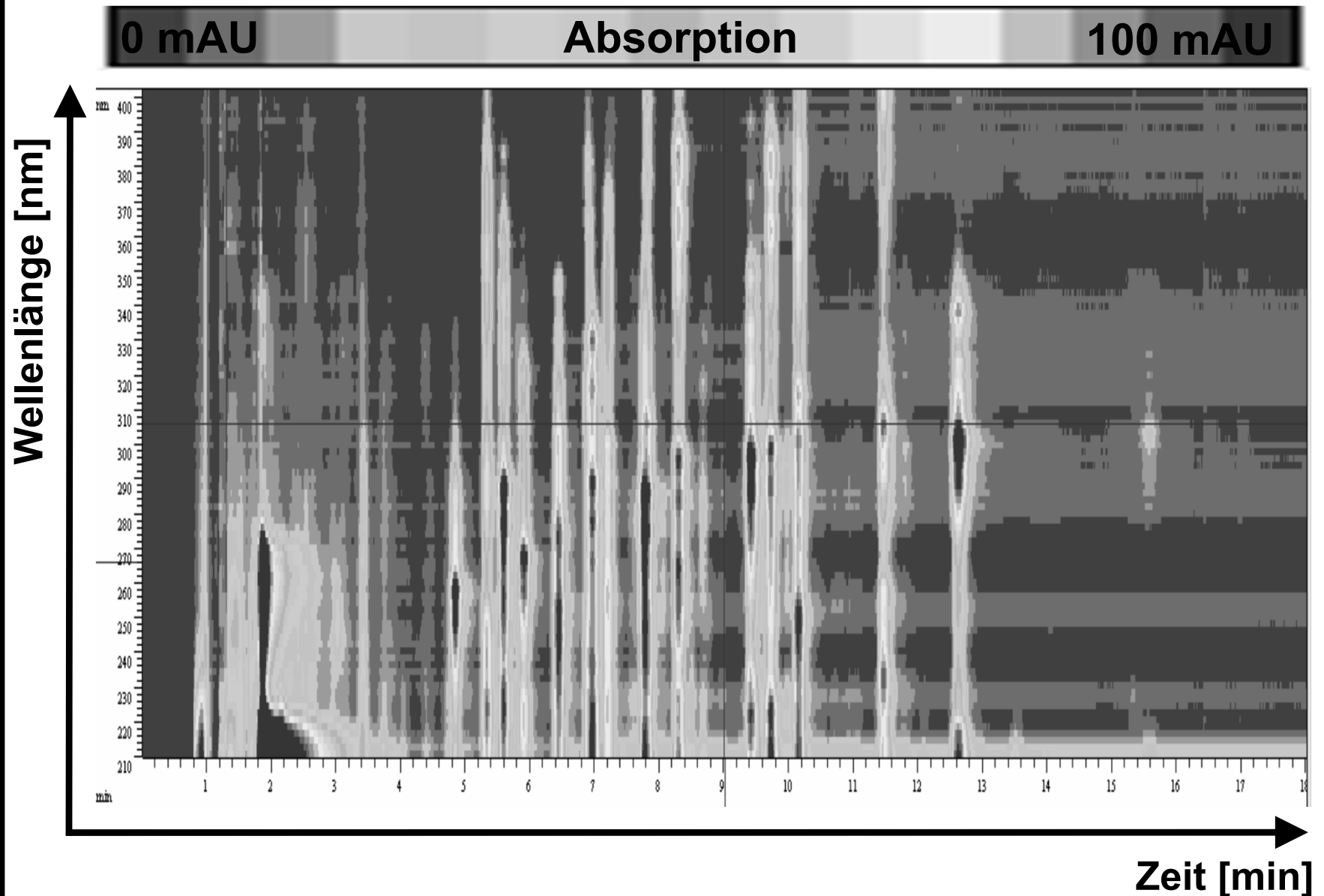


Abb. I.7.2.1: Isoplot einer chromatographischen Trennung

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

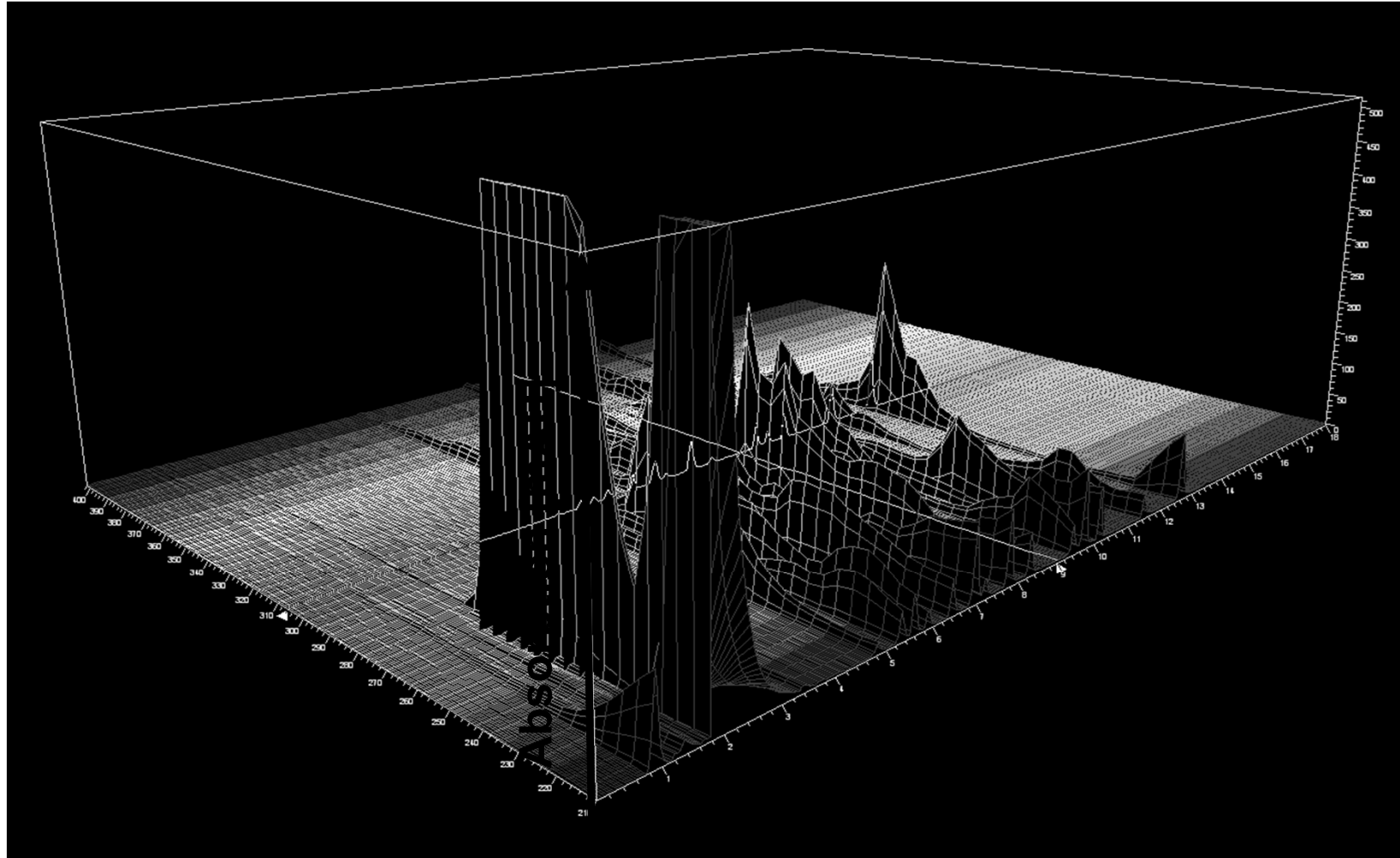


Abb. I.7.2.2: 3-D-Plot einer chromatographischen Trennung

I.7.3 Der MS-Detektor

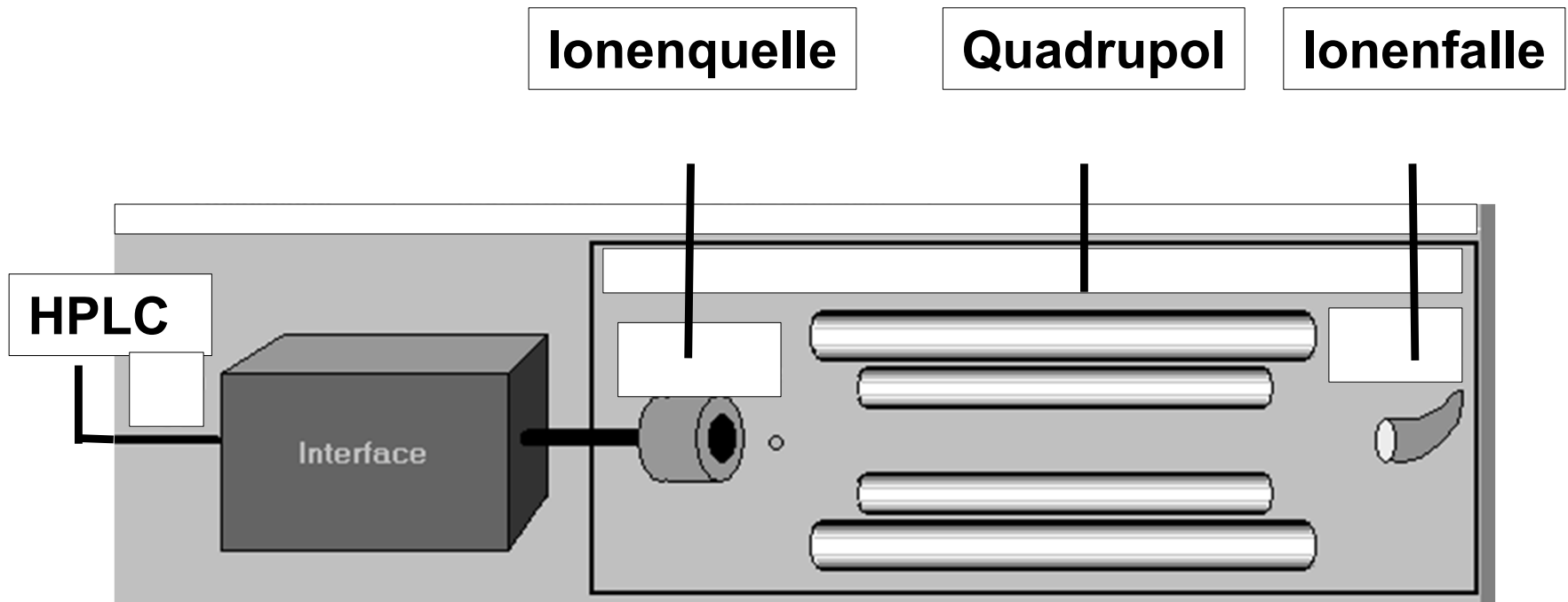


Abb. I.7.3: Vereinfachte Darstellung eines HPLC-MS-Detektors

I Theoretischer Teil

I.7.4 HPLC-Detektoren (Auswahl)

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

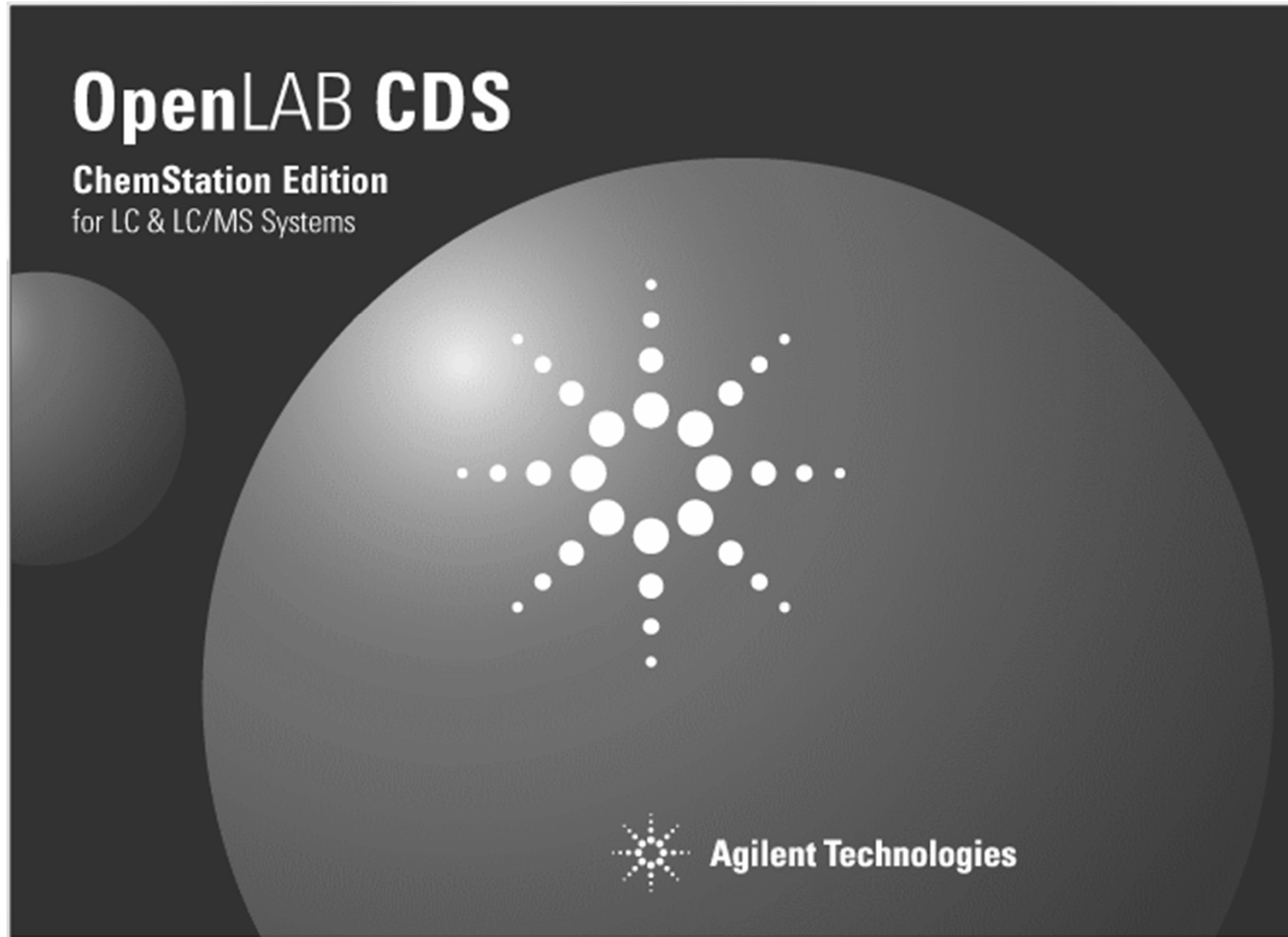


Abb. I.8: Software Open LAB ChemStation C.01.07 SR4

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 Theoretischer Teil

I.9 Die Methode des Internen Standards

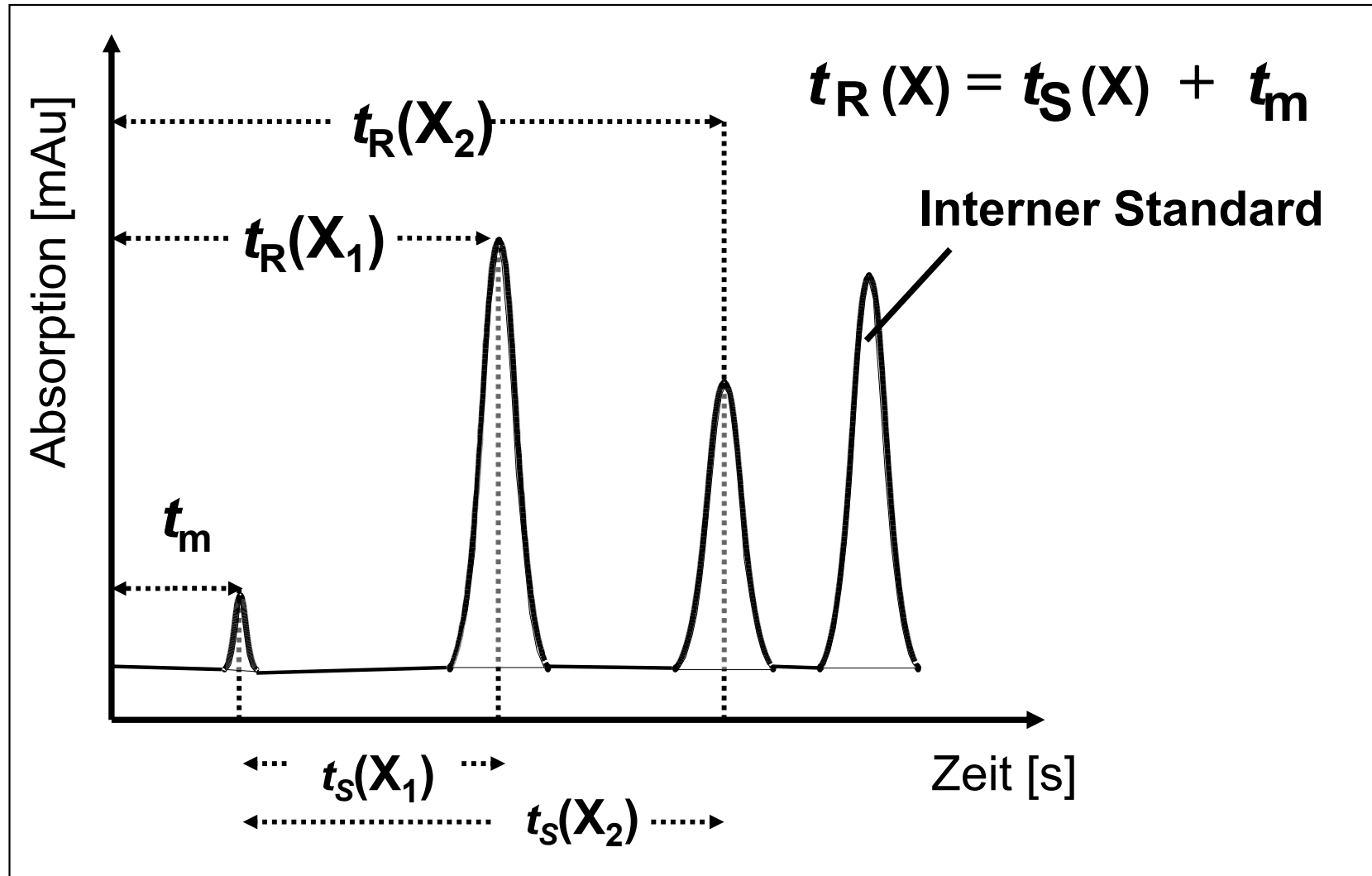


Abb. I.9: Zugabe eines internen Standards (Tracer)

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.9 Die Methode des Internen Standards

zu bestimmende Substanz i

Tracer Substanz

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

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

 $Tr = \text{Tracer}$

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

Kalibrierfaktor der Komponente i

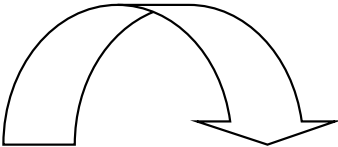
 $K = \text{Kalibrierlösung}$

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


$$m_i^x = \left(KF_i \right) \frac{a_i^x}{a_{Tr}^x} \cdot m_{Tr} \quad (6)$$

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_o (Al_2O_3) und E_o (SiO_2) ?
- 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_{Fi} 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.