



Chromatographie I

WS 2022/23 R. Vasold

Chromatographie I

HPLC

Vorlesung

R. Vasold

Analytik - Abteilung

Institut für Organische Chemie

Prof. B. König

Kapitel I: Einführung

Kapitel II: Grundprinzipien

Kapitel III: Der chromatographische Prozeß

Kapitel IV: Das Chromatogramm

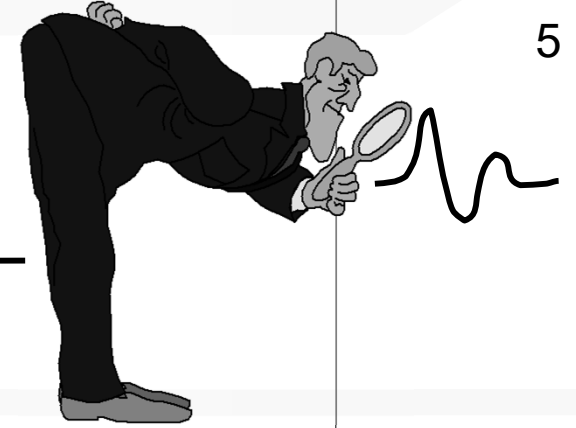
Kapitel V: Literatur



Kapitel I: Einführung

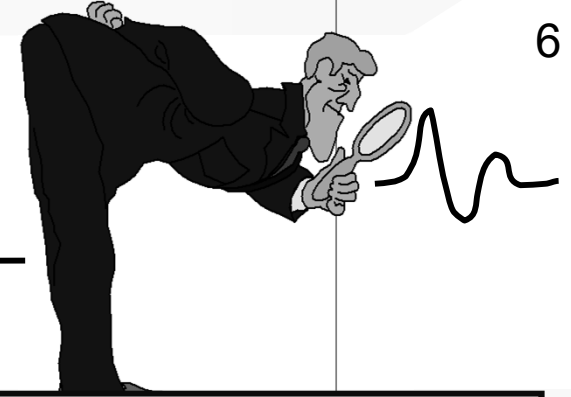
I Einführung

I.1 Was heißt *HPLC* ?

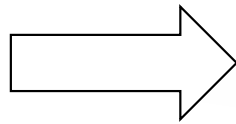


High
Performance-**P**ressure
Liquid
Chromatography

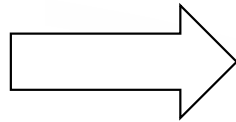
(= Hochleistungs/Druck
-Flüssig-Chromatographie)



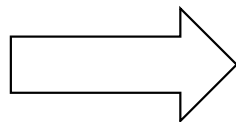
Unterschied zwischen moderner HPLC und klassischer Säulen-Chromatographie ?



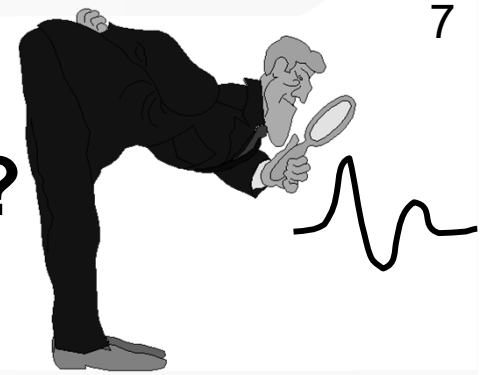
**wesentlich höhere Auflösung bei Trennung
(Trennung von bis zu 100 Komponenten/Lauf u. mehr)**



**Drastische Verkürzung der Analysendauer
(h → Bereich von Minuten)**

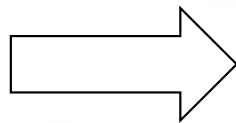


**Erhebliche Verbesserung der Empfindlichkeit
(ca. 10^{-9} g [ng] bis 10^{-12} g [pg])**

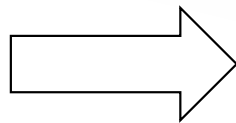


☆ **Notwendige Voraussetzung ist die Löslichkeit der zu analysierenden Substanz in einem geeignetem Solvens**

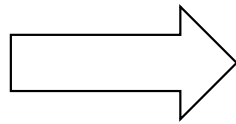
☆ **Die HPLC wird eingesetzt, wenn:**



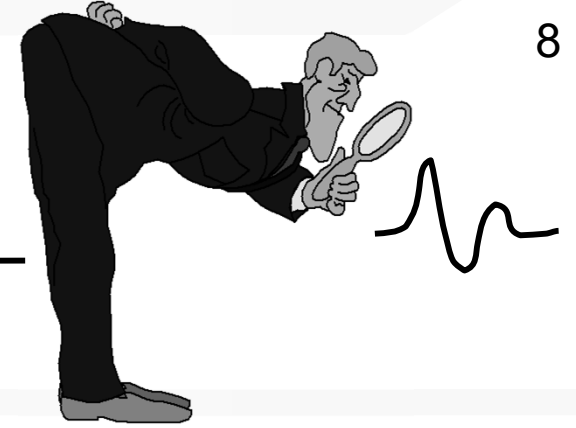
Substanzen schwer flüchtig oder nicht flüchtig sind (sonst alternativ Einsatz von GC)



Substanzen mit rel. hohem Molekulargewicht vorliegen (MW > 500)



es sich um thermisch instabile (leicht zersetzliche) Substanzen handelt.



- ➔ **Zur Reinheits- und Produktkontrolle chem. Substanzen**
- ➔ **Zur Analyse von Arzneistoffen**
- ➔ **Zur Bestimmung von Wirkstoffen in biolog. Matrices**
- ➔ **Zur Bestimmung von Schadstoffen (Umweltanalytik)**
- ➔ **Zur Trennung und Reinigung von Biopolymeren (Enzymen, Nukleinsäuren, Peptiden ...)**
- ➔ **Standardmethode in fast allen chem. Laboratorien**

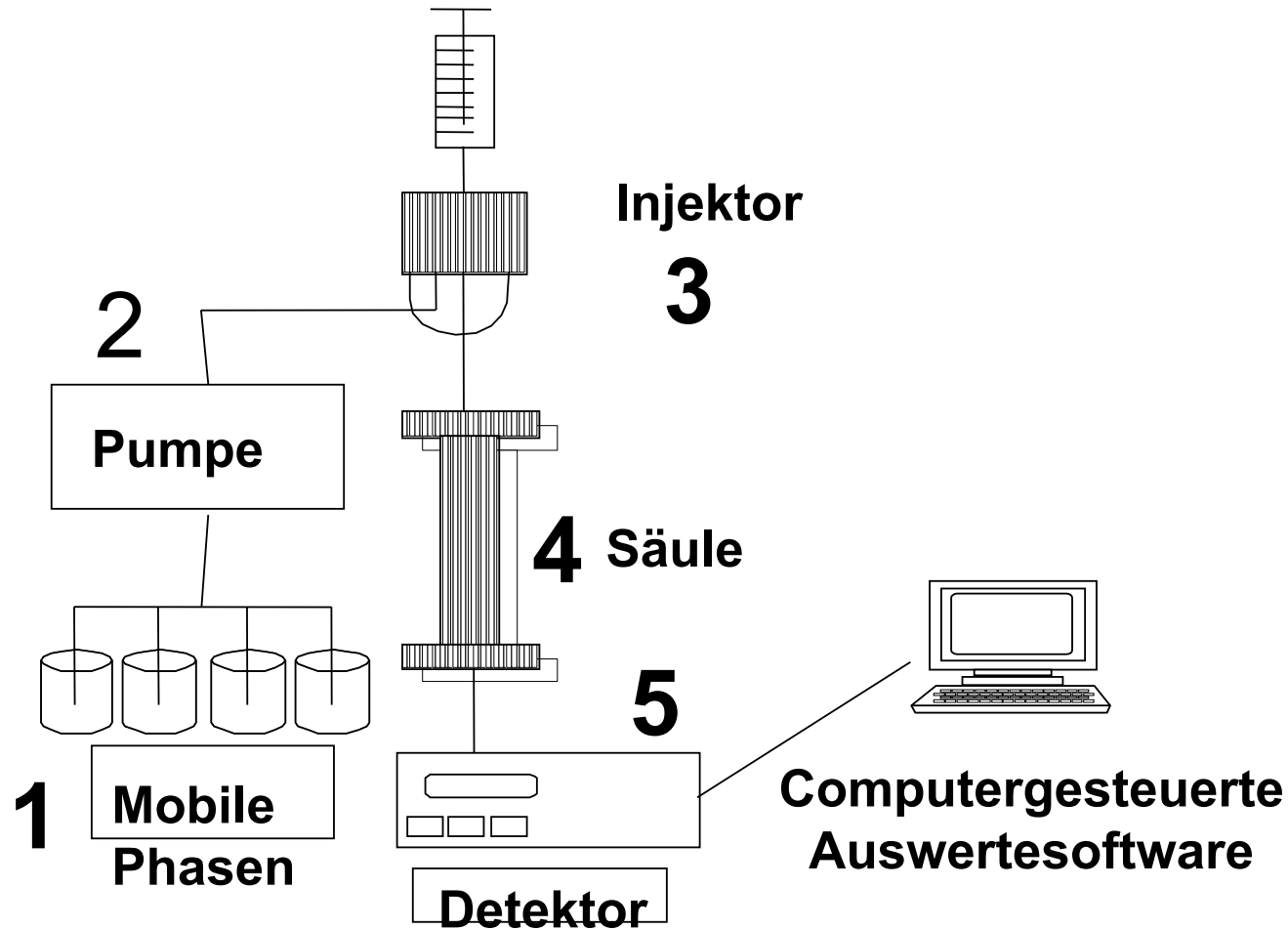


Abb. 1: Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage



Abb. 2: Moderner HPLC-Arbeitsplatz



Kapitel II: Grundprinzipien



Abb. 3: Durchführen einer Säulenchromatographie

II.1 Grundbegriff: Chromatographie

Historie: M. Tswett (1906)

Der Begriff „**Chromatographie**“ wurde 1906 bei der Beobachtung geprägt, als sich ein Extrakt aus grünen Blättern auf einer mit gepulvertem Zucker gefüllten Säule in verschieden gefärbte Einzelfarbstoffe (Chlorophyll, Carotin etc.) auftrennen ließ.

Chroma = Farbe / Graphiein = schreiben

Definition: Chromatographie

Mit dem Ausdruck „**Chromatographie**“ bezeichnet man einen **Trennprozess**, bei welchem das Probengemisch zwischen zwei **nicht miteinander mischbaren** Phasen im sog. chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird. Eine **Hilfsphase (stationäre Phase)** ruht dabei, während die andere **Hilfsphase (mobile Phase)** an ihr vorbei strömt.



II.2 Grundbegriff: Hilfsphasen

Stationäre Phase:

- ☆ **Meist** ist in der Chromatographie die stationäre Phase **fest** (Chromatographiebett).
- ☆ **Selten** ist die stationäre Phase **flüssig** (dann aber als unbeweglicher „stationärer“, flüssiger Film auf der Oberfläche eines Feststoffes aufgebracht z.B. als adsorbierter Wasserfilm auf Cellulose), oder als unbewegliche flüssige, sog. quasistationäre Phase im Inneren von porösen Kugeln (Gelpermeationschromatographie).

Mobile Phase:

Die mobile Phase kann sein:

- ☆ **gasförmig** → **Gaschromatographie** **GC**
- ☆ **flüssig** → **Liquidchromatographie** **LC/HPLC**

II Grundprinzipien

II.3 Grundbegriff: Verteilungskoeffizient K

beschreibt die unterschiedliche Verteilung der Substanzen zwischen **stationärer** Phase und **mobiler** Phase:

$$K = \frac{c_s(X)}{c_m(X)} \quad (1)$$

K = *Verteilungskoeffizient*

$c_s(X)$ = Stoffmengenkonzentration der Substanz X in der stationären Phase

$c_m(X)$ = Stoffmengenkonzentration der Substanz X in der mobilen Phase

II Grundprinzipien

II.4 Grundbegriff: Kapazitätsfaktor k

beschreibt die unterschiedliche Verteilung der Substanzen zwischen **stationärer** Phase und **mobiler** Phase :

$$k = \frac{n_s(X)}{n_m(X)} \quad (2)$$

k = Kapazitäts- oder Retentionsfaktor

$n_s(X)$ = Stoffmenge der Substanz X in/an der stationären Phase

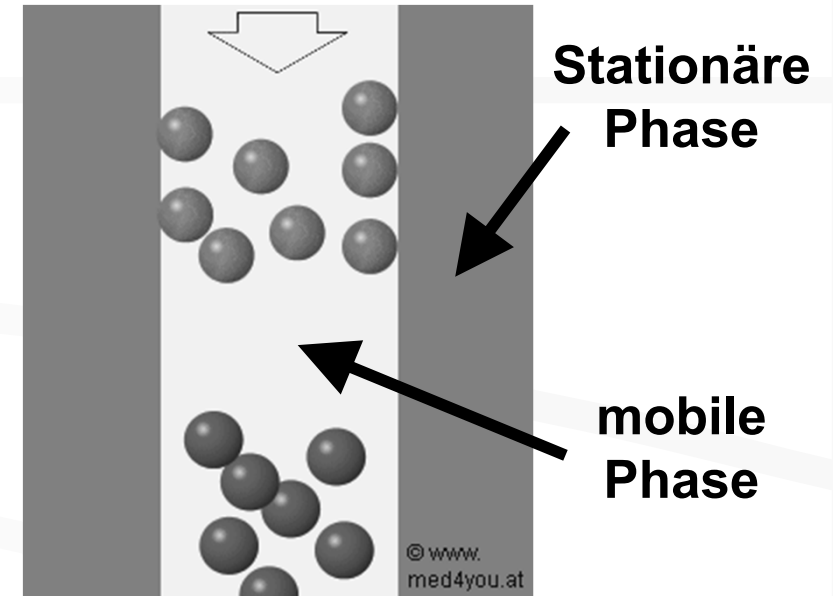
$n_m(X)$ = Stoffmenge der Substanz X in der mobilen Phase

Die unterschiedliche Wechselwirkung von Substanzen in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen ergibt eine Vielzahl unterschiedlicher Chromatographiearten:

II.5 Chromatographiearten (Auswahl)

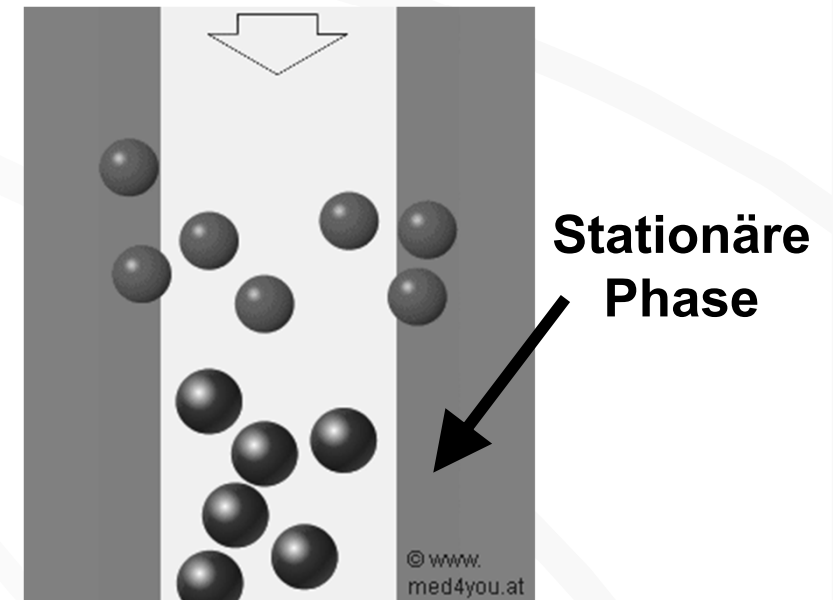
Trennung durch Adsorption

*Adsorptions-Chromatographie
flüssig / fest
(NP/RP-HPLC)*



Trennung durch Löslichkeit

*Verteilungs-Chromatographie
flüssig / flüssig*

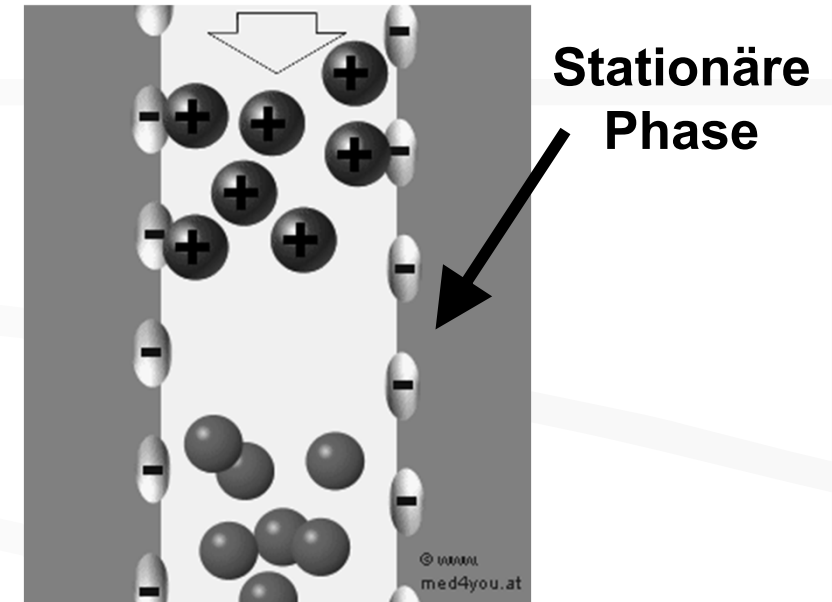


II Grundprinzipien

II.5 Chromatographiearten (Auswahl)

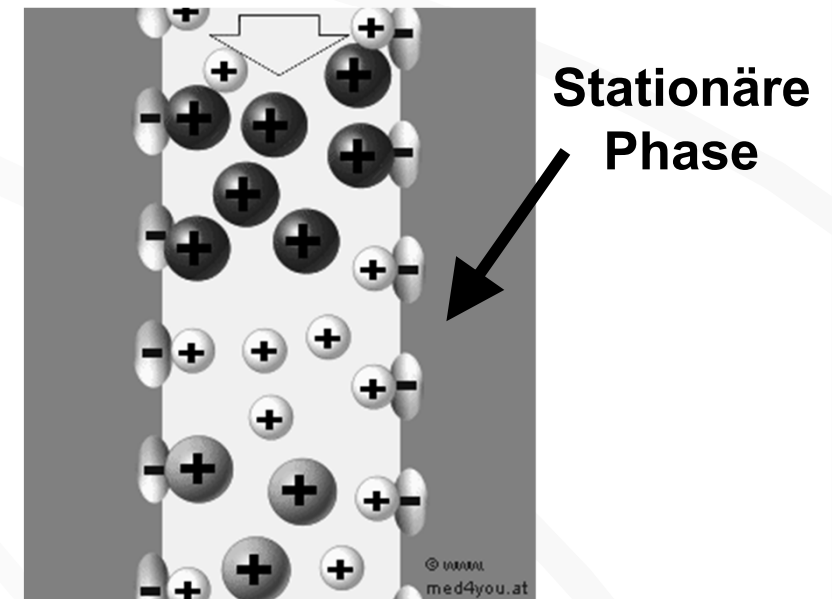
Trennung durch Ladung
(vereinfacht)

*Ionenaustausch-
Chromatographie*



Trennung durch Ladung
(realistisch)

*Ionenaustausch-
Chromatographie*

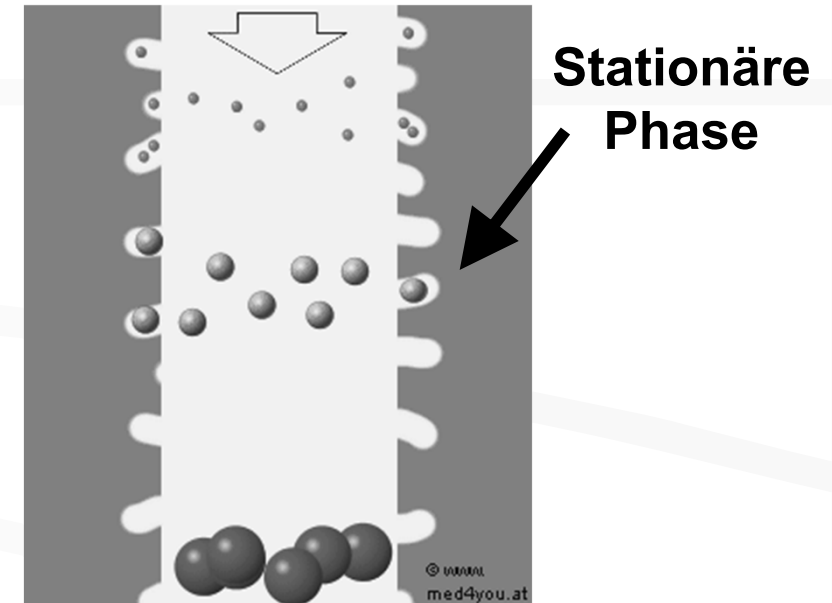


II Grundprinzipien

II.5 Chromatographiearten (Auswahl)

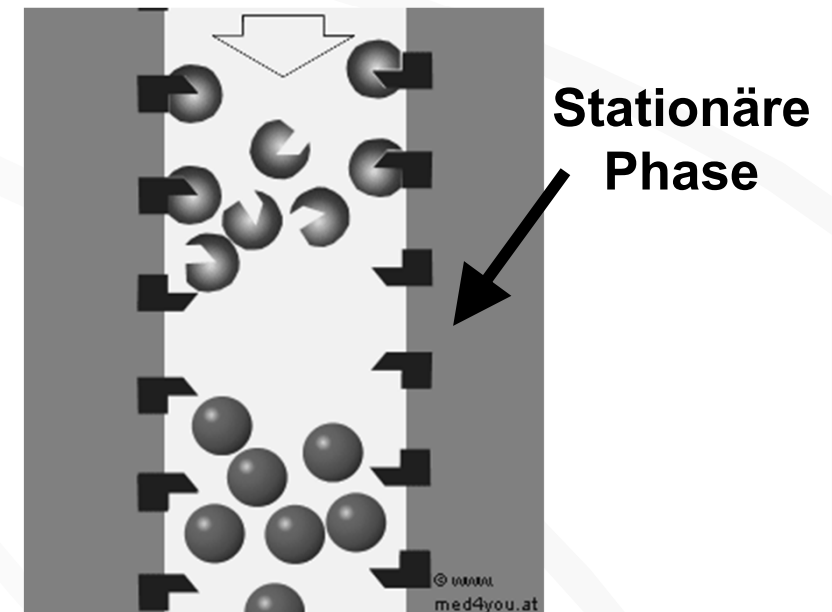
Trennung durch Größe/Gestalt

Ausschluß-Chromatographie
SEC, GPC



Trennung durch Affinität

Affinitäts-Chromatographie
z.B. Antigen/Antikörper





Kapitel III: Der chromatographische Prozeß

III Der chromatographische Prozeß²¹

III.1 Der Trennvorgang

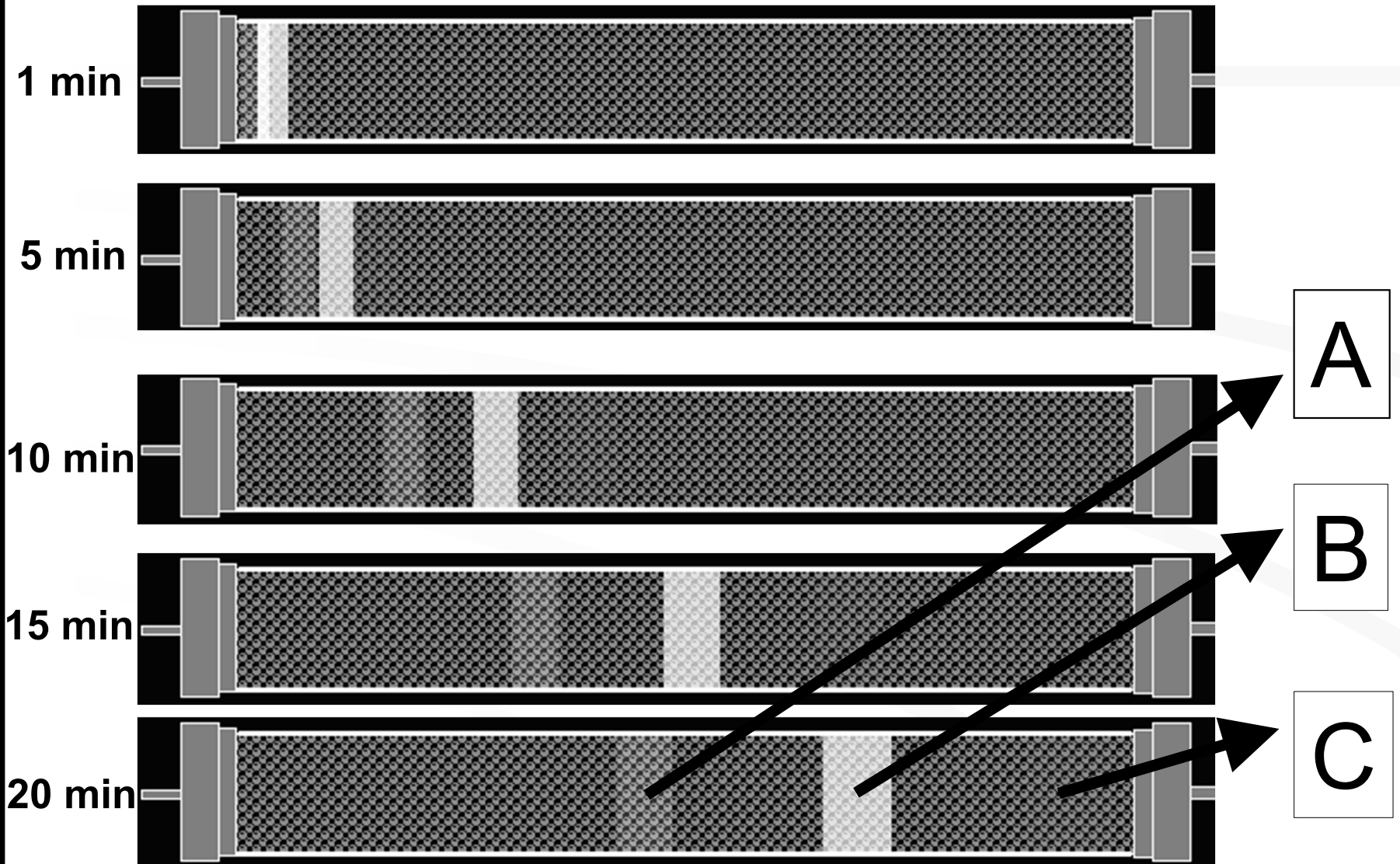


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf einer chromatographischen Trennung

III.2 Definitionen

Definition: Chromatogramm

Mit dem Ausdruck „**Chromatogramm**“ bezeichnet man die graphische Auftragung der Größenwerte einer Größe (z.B. der Absorption), die am Ende der stationären Phase, also z.B. am Säulenausgang, in der mobilen Phase gemessen werden, gegen die Zeit oder das Volumen der mobilen Phase.



Definition: Retentionsvolumen / -Zeit

Das Volumen der mobilen Phase, das die stationäre Phase vom Moment der Probenaufgabe bis zum Erscheinen der Substanz **X** als Peak im Detektor (Chromatogramm) passiert hat, nennt man das Retentionsvolumen der Substanz X: $V_R(X)$

Die zugehörige Zeit nennt man die Retentionszeit: $t_R(X)$.



$$V_R(X) = F \cdot t_R(X) \quad (3)$$

Retentionsvolumen [ml]

Retentionszeit [min]

Volumenfließgeschwindigkeit [ml·min⁻¹]

Von besonderem Interesse ist neben der Volumenfließgeschwindigkeit aber auch die sog. lineare Fließgeschwindigkeit

III.4 Die lineare Fließgeschwindigkeit u



Die **lineare** Wanderungsgeschwindigkeit $u(X)$ der Substanz X muß der **linearen** Wanderungs-(Fließ)-Geschwindigkeit der mobilen Phase u_m direkt proportional sein.

d.h. $u(X)$ wird immer kleiner u_m oder höchstens gleich u_m sein.

$$u(X) \propto u_m \quad \text{und} \quad u(X) \leq u_m \quad (4)$$



Der Proportionalitätsfaktor $\chi_m(\mathbf{X})$ muß also zwischen **0** und **1** liegen.

$$u(\mathbf{X}) = \chi_m(\mathbf{X}) \cdot u_m \quad (5)$$

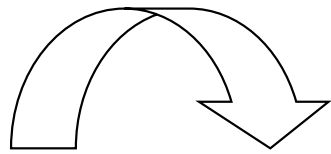
Es kann sich bei $\chi_m(\mathbf{X})$ nur um den **Stoffmengenanteil** der Substanz **X** in der **mobilen Phase** handeln, weil ja die Substanz **X** nur dann überhaupt mit der Geschwindigkeit u_m transportiert werden kann.

Dieser **Stoffmengenanteil** ist wie folgt definiert:

III.6 Zusammenhang $\chi_m(X)$ und k

$$\chi_m(X) = \frac{n_m(X)}{n_s(X) + n_m(X)} = \frac{1}{\frac{n_s(X)}{n_m(X)} + 1} = \frac{1}{k + 1} \quad (6)$$

$$u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m = \frac{1}{k + 1} u_m \quad (7)$$



k = Retentions-/Kapazitätsfaktor

$$\frac{u_m}{u(X)} = k + 1 \quad (8)$$

III.6.1 Grenzfälle

siehe (5)
$$u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m$$

Da für jeden Stoffmengenanteil gilt: $0 \leq \chi_m(X) \leq 1$

Erhält man zwei Grenzfälle:

1.) Für $\chi_m(X) = 0 \implies u(X) = 0$

d.h. es befindet sich **keine** Substanz **X** in der mobilen Phase - **alles** ist an die **stationäre** Phase gebunden, d.h. **keine Wanderung** der Substanz

2.) Für $\chi_m(X) = 1 \implies u(X) = u_m$

d.h. es befindet sich die **gesamte** Substanz **X** in der **mobilen** Phase – die Substanz **X** hat somit keine Wechselwirkung mit der stationäre Phase, d.h. **Wanderungsgeschwindigkeit** von **X** gleich der der **mobilen Phase**.

Die Zeit zwischen dem Aufbringen der Substanz **X** auf die Säule und dem Auftauchen der Substanz **X** im Detektor, die im **2. Fall** verstreicht, wenn also keine Wechselwirkung der Substanz **X** mit der stationären Phase stattfindet, bezeichnet man häufig als sog. „**Totzeit t_0 oder Durchbruchzeit t_m** “ der Säule.

Analog dazu wird das zugehörige Volumen als sog. „**Totvolumen V_0 oder Durchbruchvolumen V_m** “ der Säule bezeichnet.

von der **IUPAC** empfohlen:

Durchbruchsvolumen bzw. Durchbruchszeit

V_m und t_m

III.8.1 Durchbruchsvolumen V_m und -zeit t_m

Definition: Durchbruchsvolumen / -zeit

Als **Durchbruchsvolumen V_m** bzw. **-zeit t_m** wird dasjenige **Volumen** (bzw. die dazu **korrespondierende Zeit**) bezeichnet, das benötigt wird, um eine **nicht-retardierende** Substanz von der **Injektionsstelle** bis zur **Detektionsstelle** zu befördern. Dieses Volumen umfaßt also genau genommen zusätzlich zum **Volumen der mobilen Phase im Säulenbett V_{mob}** die „**Totvolumina**“ des **Gerätes** z.B. im Einspritzventil, in den Verbindungskapillaren, im Detektor etc..

t_m Ist für alle Substanzen während einer chromatographischen Analyse **gleich**.

Die Auftrennung unterschiedlicher Substanzen kommt ausschließlich dadurch zustande, daß sich diese auf Grund ihrer chemischen Beschaffenheit zusätzlich **unterschiedlich lange** in der **stationären Phase** aufhalten und somit zu unterschiedlichen **Retentionszeiten** eluieren, d.h. getrennt werden .





Anmerkung !

Da bei modernen HPLC-Anlagen diese **eigentlichen „Totvolumina des apparativen Systems“** auf ein **Minimum** reduziert sind (durch minimale Kapillardurchmesser, optimierte Gerätegeometrie etc.), können diese Parameter zur **Vereinfachung der Problematik** hier **vernachlässigt** werden, und es wird im Folgenden davon ausgegangen, daß t_m ausschließlich von der **Säulenlänge** beeinflusst wird, und sich die **Wanderungsgeschwindigkeiten $u(x)$** um u_m bei konstanter Flußrate auf die **Säulenlänge** beziehen.

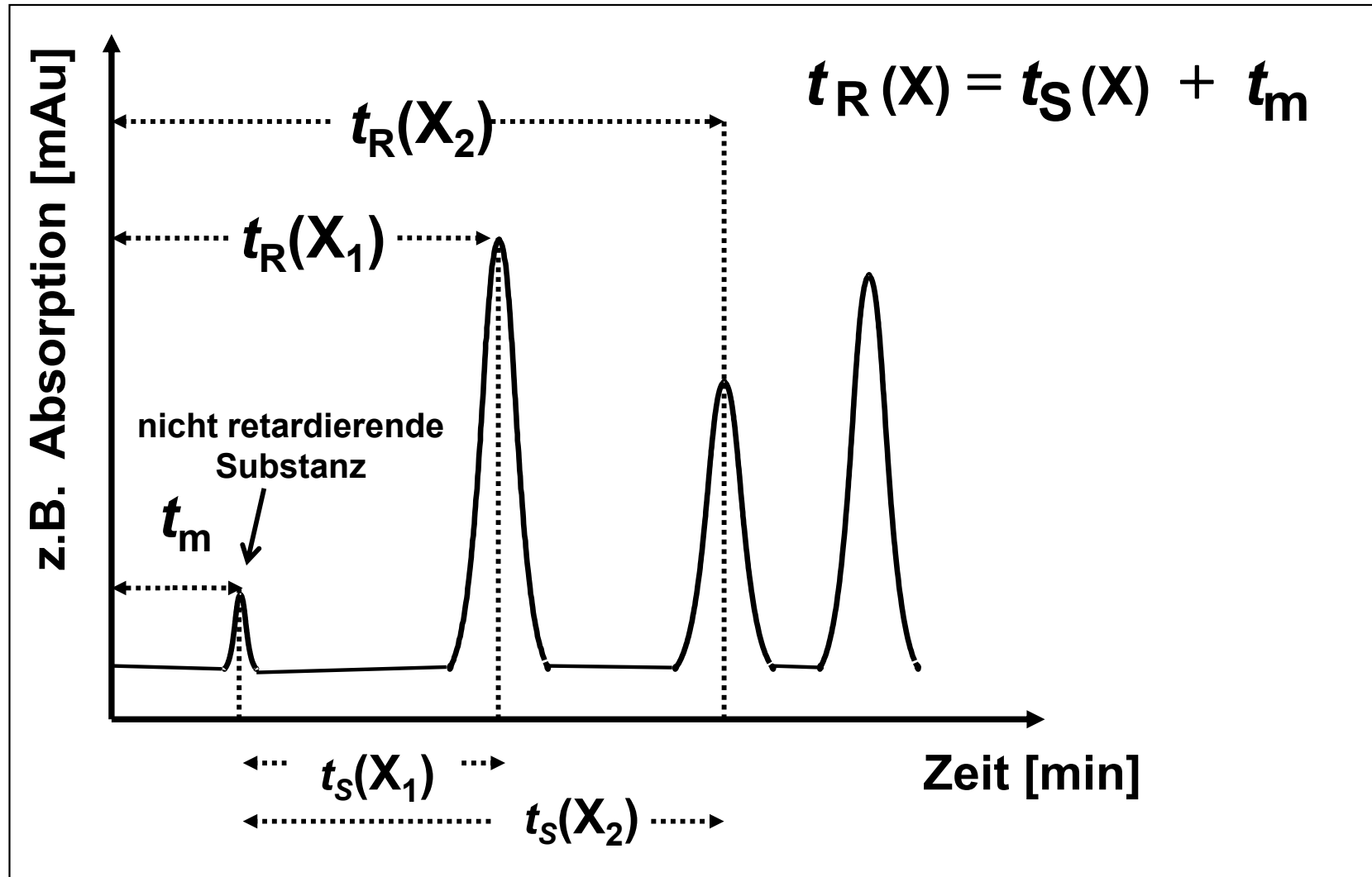


Abb. 5: Musterchromatogramm mit $t_S(X)$ als Aufenthaltszeit der Komponente X in der stationären Phase

III.8.3 Bestimmung von t_m und $t_R(X)$ 

Wovon sind **Durchbruchszeit** t_m und **Retentionszeit** $t_R(X)$ abhängig ?

- ☆ z.B. von den Abmessungen der Säule (**Länge: L**)
- ☆ z.B. von den Wanderungsgeschwindigkeiten u_m , $u(X)$

Durchbruchsvolumen

$$t_m = \frac{L}{u_m} = \frac{V_m}{F}$$

(9)

Retentionsvolumen

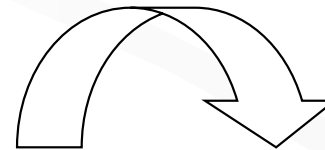
$$t_R(X) = \frac{L}{u(x)} = \frac{V_R(X)}{F}$$

(10)

$$\frac{t_R(X)}{t_m} = \frac{V_R(X)}{V_m} = \frac{u_m}{u(X)} \quad (11)$$

berücksichtigt man
die bekannte Beziehung

$$(8) \quad \frac{u_m}{u(X)} = k + 1$$



ergibt sich:

III.8.4 Zusammenhang t_m , $t_R(X)$ und k

$$\frac{t_R(X)}{t_m} = k + 1 \quad (12)$$

Auflösen von Gleichung (17) nach k dem Kapazitäts- oder Retentionsfaktor liefert:

$$k = \frac{t_R(X)}{t_m} - 1 \quad (13)$$

III.9.1 Bedeutung des Kapazitätsfaktors k

$$(13) \quad k = \frac{t_R(X)}{t_m} - 1$$

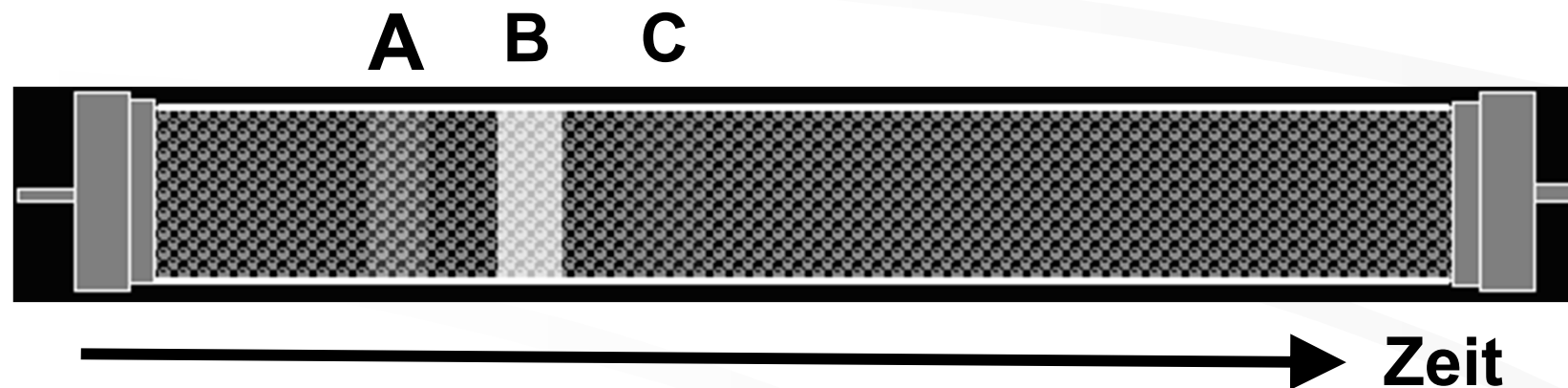
Definition: Kapazitäts-(Retentions)faktor

Um „**Chromatogramme**“, die z.B. an verschiedenen langen oder unterschiedlich dicken Säulen oder bei unterschiedlicher Flußgeschwindigkeit gemessen wurden, vergleichen zu können, bedient man sich einer dimensionslosen Größe, dem **Kapazitäts-(Retentions)faktor k** .

Der **Kapazitäts-(Retentions)faktor k** einer Substanz **X** ist eine auf die Durchbruchzeit „normierte Elutionsgröße“.

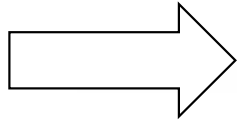


Es gibt mehrere Möglichkeiten, den chromatographischen Trennprozess genauer zu beschreiben.



Ziel:

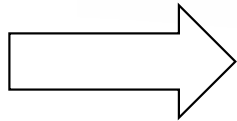
Die Position **jeder einzelnen Komponente** im chromatographischen Trennsystem und ihre dortige **Konzentrationsverteilung** in Abhängigkeit von der **Zeit** bestimmt zu können.



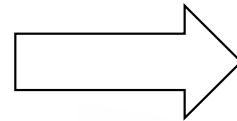
Ein möglicher Ansatz:



**Theorie der Böden
(theoretisches Trennstufenmodell)**



**Übertragung der Theorie der fraktionierten
Destillation auf die Säulenchromatographie**



**Übernimmt Begriffe von Bodenhöhe und
Bodenzahl**

Anschaulich, aber natürlich nur näherungsweise richtig, da die Annahme einer wiederholten Einstellung separater Gleichgewichte beim Vorliegen einer bewegten mobilen Phase eher unrealistisch ist

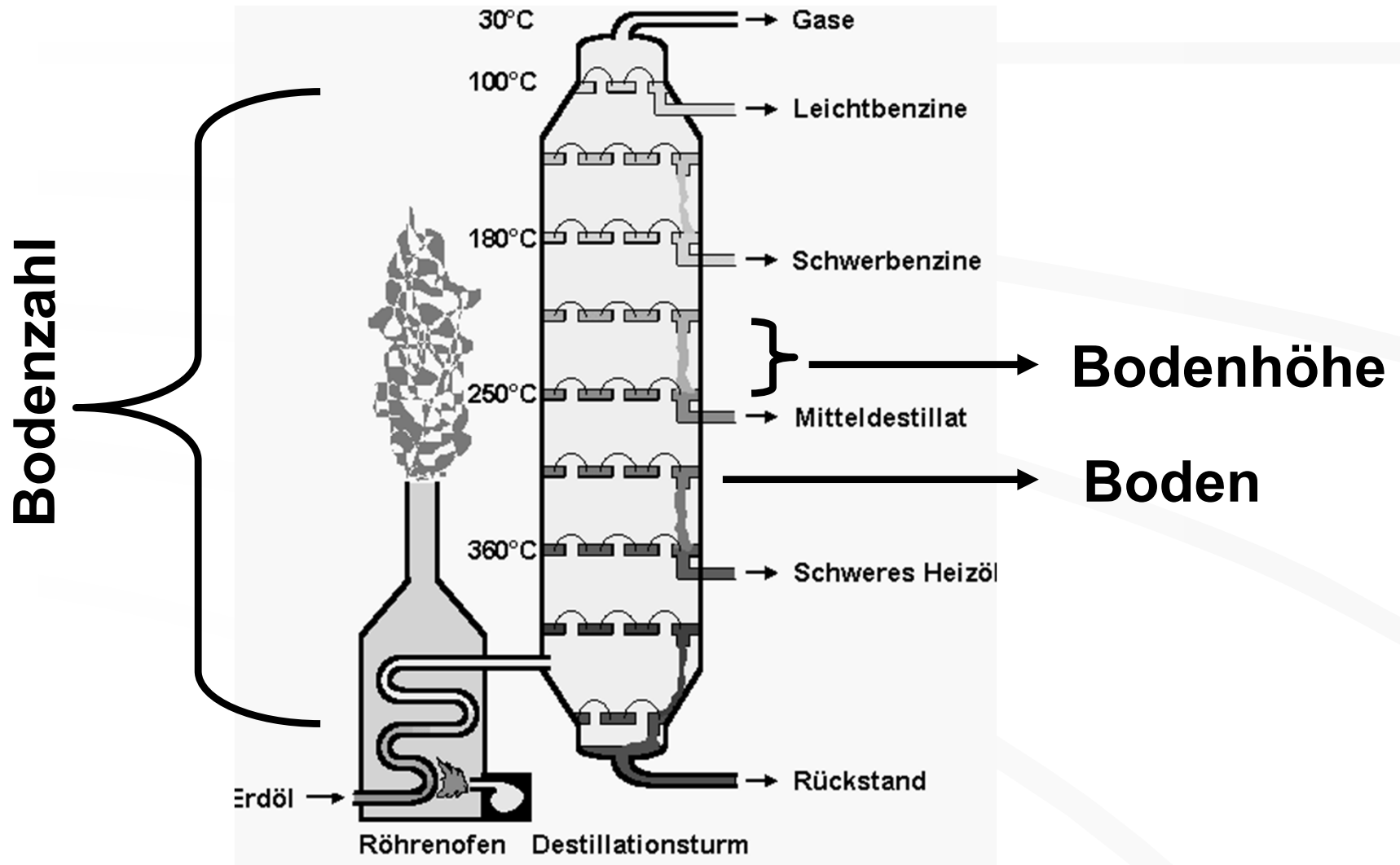


Abb. 6: Beispiel eines Destillationsturms

Bodenhöhe = Trennstufenhöhe H

Bodenzahl = Trennstufenzahl N_z

Definition: Trennstufenhöhe

Die Trennstufenhöhe H (die Höhe eines Theoretischen Bodens), oder **HETP** (*height equivalent to one theoretical plate*) ist die Strecke, auf der sich beim Fließen der mobilen Phase das Gleichgewicht einmal einstellt.



Wie hängen Trennstufenhöhe H und Trennstufenzahl N_z in der Chromatographie voneinander ab ?

III.10.1.1 Beeinflussung von H und N_z

Trennstufenhöhe und Trennstufenzahl hängen wie folgt voneinander ab:

Länge der Säule

$$H = \frac{L}{N_z}$$

(14)

→

$$N_z = \frac{L}{H}$$

(15)

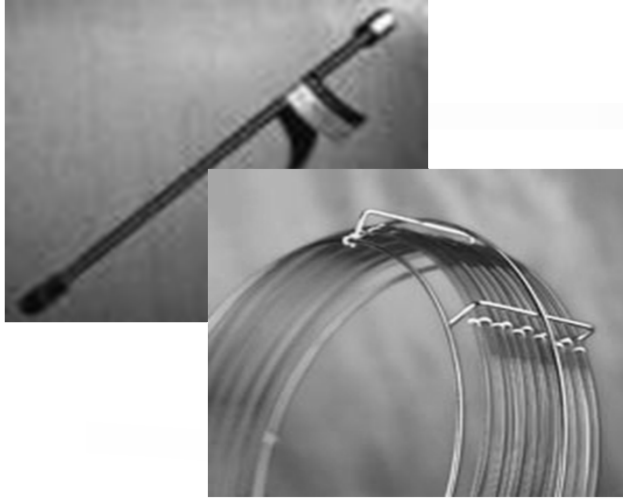
$$H = \frac{L}{N} = 1000 \times \frac{L}{8} \times \ln 2 \left[\frac{W_{(0,5)}}{t_R} \right]^2$$

Bedeutung:



N_z charakterisiert somit die **Leistungsfähigkeit** einer Trennsäule. Je besser die Säule gepackt wurde (kleine Trennstufenhöhe), und je länger sie ist, desto größer ist die **Trennstufenzahl** und somit die **Trennleistung**.

III.10.1.3 Einfluß von u_m auf H und N_z



Gegeben sind z.B.:

- ☆ Dimensionen d. Säule: (Länge, Dicke)
- ☆ Füllung d. Säule (Material, Porenweite Partikelgröße etc.)

Für den Experimentator einzig variierbar soll sein:
Fluß, bzw. die Fließgeschwindigkeit u_m der
mobilen Phase durch die Säule.



bei **drastischer** Erhöhung des Flusses kann sich das
Gleichgewicht weniger oft einstellen -> **Trennung schlechter**

bei **drastischer** Erniedrigung des Flusses kommen immer
mehr **Diffusionsvorgänge** ins Spiel -> **Trennung schlechter**

III.10.1.4 Das H/u-Diagramm

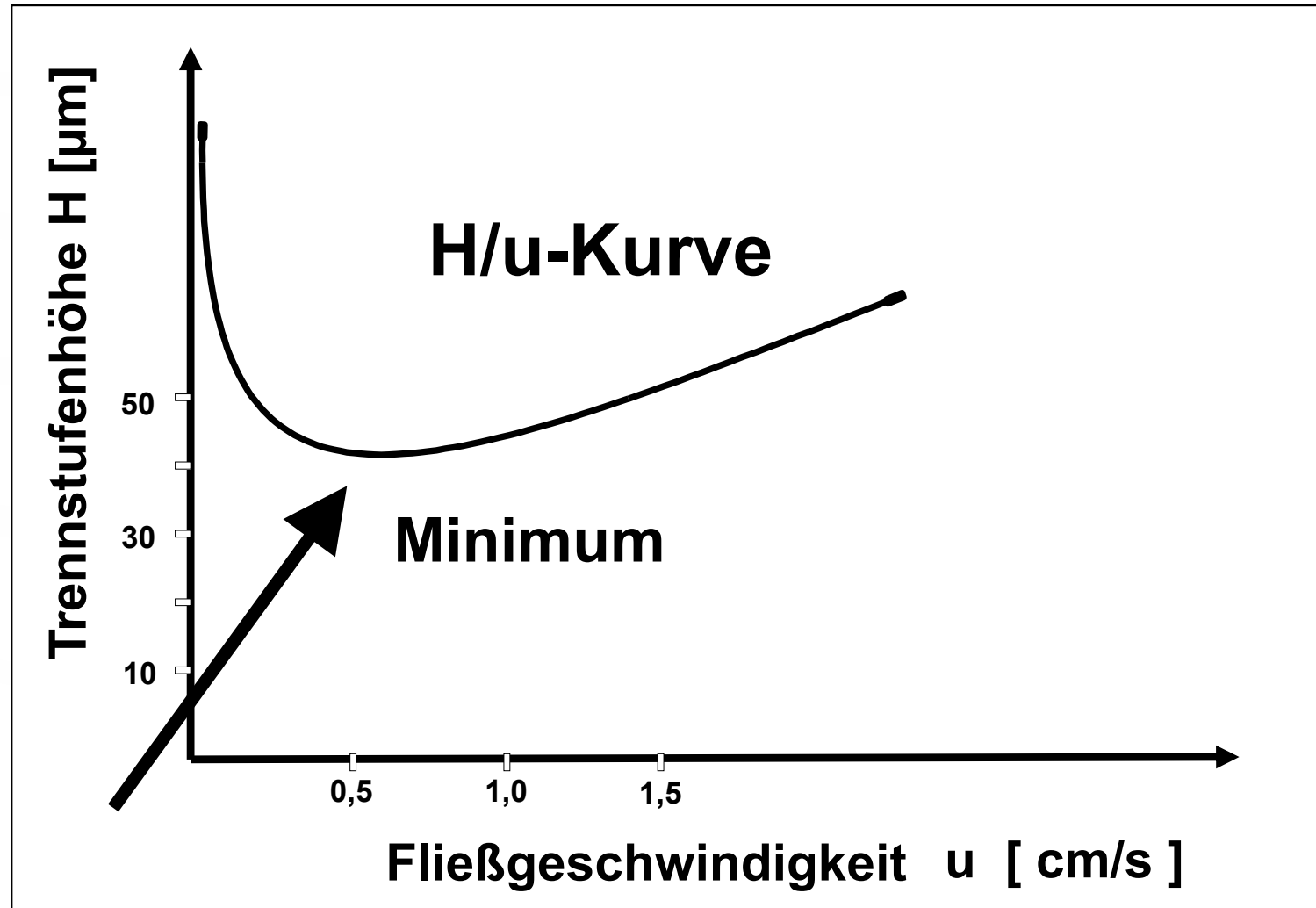
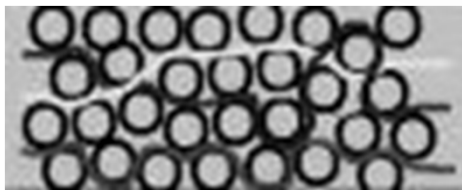


Abb. 7: H/u-Diagramm zur Bestimmung des optimalen Flusses

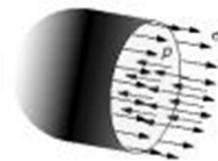
III.11 Die van Deemter-Gleichung

Hierbei handelt es sich um eine empirische Gleichung mit folgenden Größen:

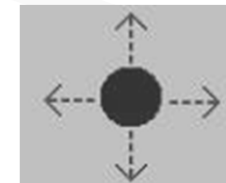
$$H = A + \frac{B}{u_m} + C \cdot u_m \quad (16)$$



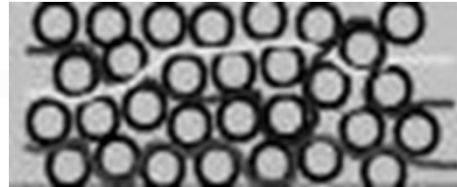
**Eddy-Diffusion
(Wirbeldiffusion)
A-Term**



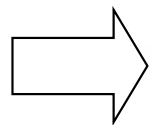
**Longitudinal-
Diffusion
B-Term**



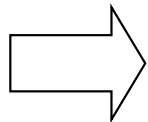
**Stoffaustausch-
-Anteil
C-Term**



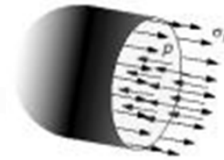
Eddy-Diffusion (Wirbeldiffusion) A-Term



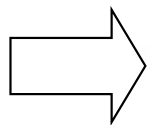
beschreibt die Bandenverbreiterung, die von der Geometrie der Festphasenteilchen und von der Packung dieser Teilchen in der Säule herrührt.



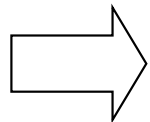
Statistisch gesehen haben einige Probenmoleküle einen relativ kurzen Weg, während andere gezwungen sind, einen „Umweg“ zu machen.



Longitudinal- Diffusion B-Term



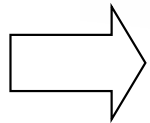
**berücksichtigt: Strömungsverteilung !
Laminare Strömung (Molekültransport) ist in der
Mitte zwischen zwei Partikeln größer als in der
Nähe der Packungspartikel.**



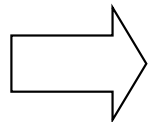
**berücksichtigt: Diffusion der Moleküle !
beschreibt im H/u-Diagramm eine Hyperbel
und ist in der LC zu vernachlässigen.**



**Stoffaustausch
-Anteil
C-Term**



**berücksichtigt: Kinetische Beiträge!
Geschwindigkeit des Stoffaustausches
zwischen stationärer und mobiler Phase.**



**Geschwindigkeit des Massentransportes der
Probenmoleküle in die Poren der stat. Phase
und aus ihnen heraus .**

III Der chromatographische Prozeß⁴⁸

III.11 Die van Deemter-Gleichung

Die **H/u-Kurve** erhält man nach Addition aller drei Terme der van-Deemter- Gleichung:

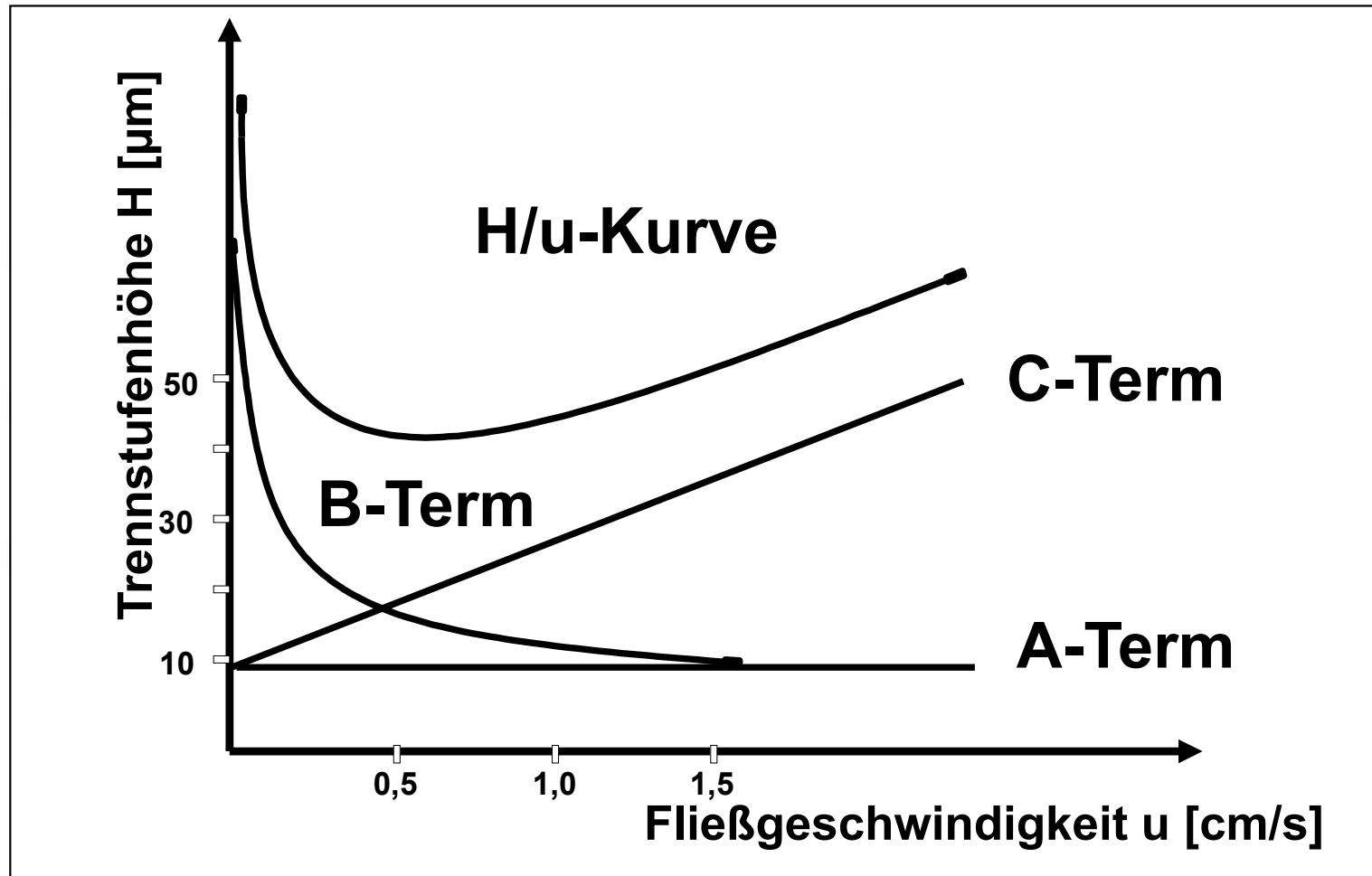


Abb. 8: H/u-Diagramm mit den Termen der Van-Deemter-Gleichung

III.12 Facit der van Deemter Gleichung

In der Chromatographie ist man bestrebt, gute Trennungen in relativ kurzen Analysenzeiten durchzuführen. D.h. man versucht eine minimale Trennstufenhöhe bei möglichst flacher H/u Kurve zu erzielen.

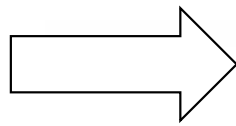
Dies läßt sich erreichen durch:

- ⇒ **Geringe Korngrößen**
(Einfluß auf A-Term und C-Term)
- ⇒ **Enge Korngrößenverteilung bzw. dichte Packung**
(Einfluß auf B-Term)
- ⇒ **Geringer Säulendurchmesser**
(Einfluß auf A-Term und B-Term)

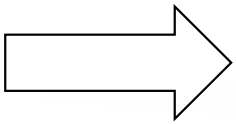


Kapitel IV: Das Chromatogramm

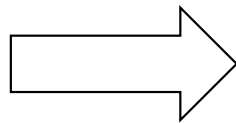
IV.1 Qualitative Aussagen



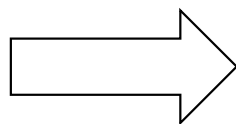
z.B. Zuordnung von Substanzen über identische Retentionszeit $t_R(x)$.



Ggf. Injektion von Referenzsubstanzen.



z.B. Identifizierung von Substanzen über UV-APEX-Spektren (Diodenarray), siehe Seminar und Praktikum.

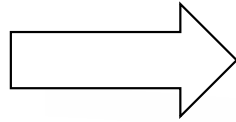


z.B. Identifizierung von Substanzen über Isoplot und 3-D-Plot .

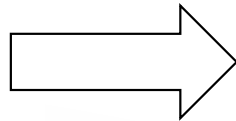
IV.2 Quantitative Aussagen



Die Fläche eines Peaks ist der eingespritzten Stoffmenge proportional



Dadurch hat jede Substanz für jede Chromatographiebedingung ihren eigenen Proportionalitätsfaktor.



Diese Proportionalitätsfaktoren können durch Injektion von Kalibriergemischen, die die zu bestimmenden Substanzen in bekannter Konzentration enthalten, ermittelt werden (Methode des Internen Standards - siehe Seminar und Praktikum)

IV Das Chromatogramm

IV.3 Kenngrößen des Chromatogramms

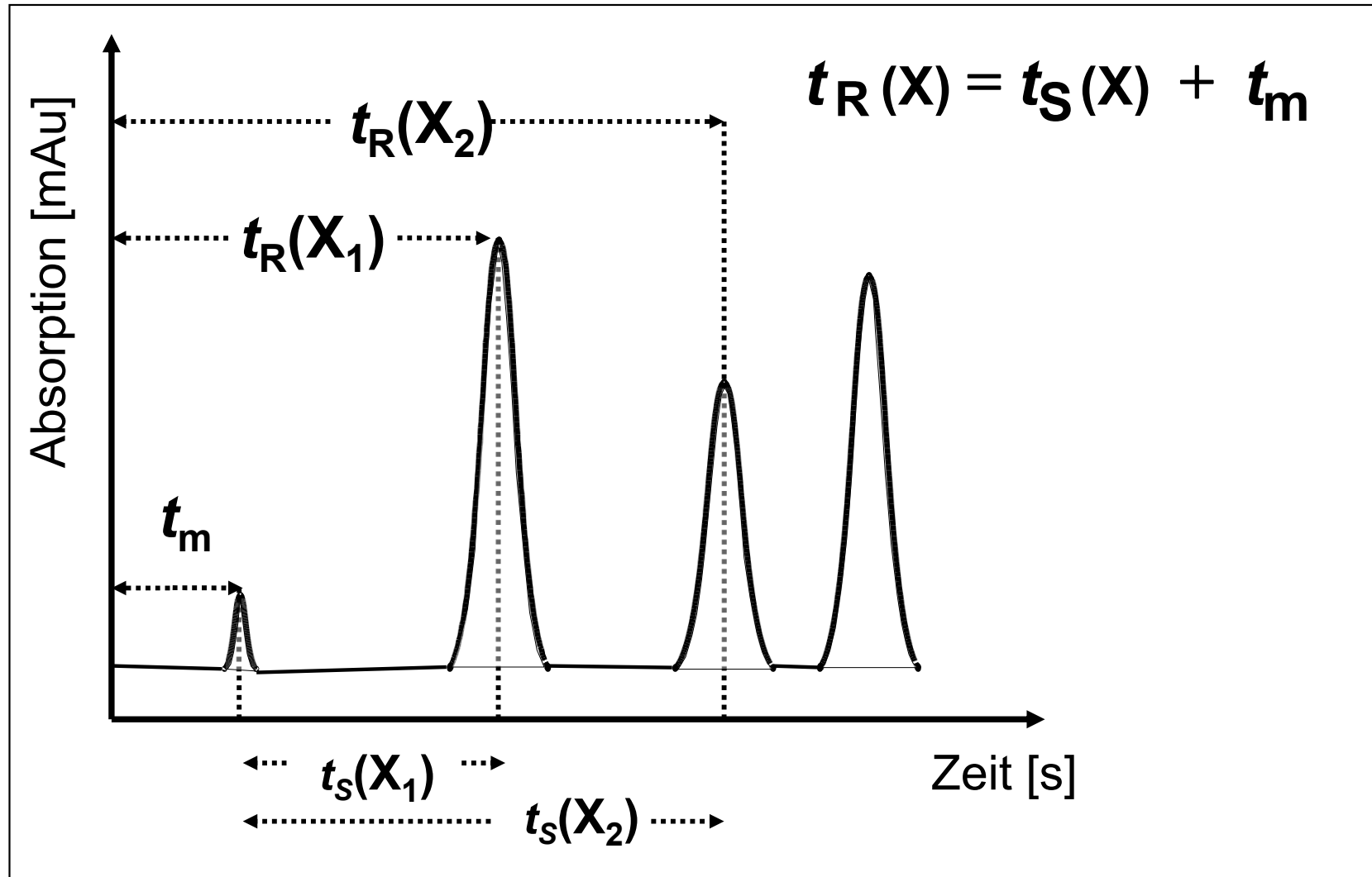


Abb. 9: Musterchromatogramm mit $t_s(X)$ als Aufenthaltszeit der Komponente X in der stationären Phase

IV.5 Das Problem schlecht getrennter Peaks

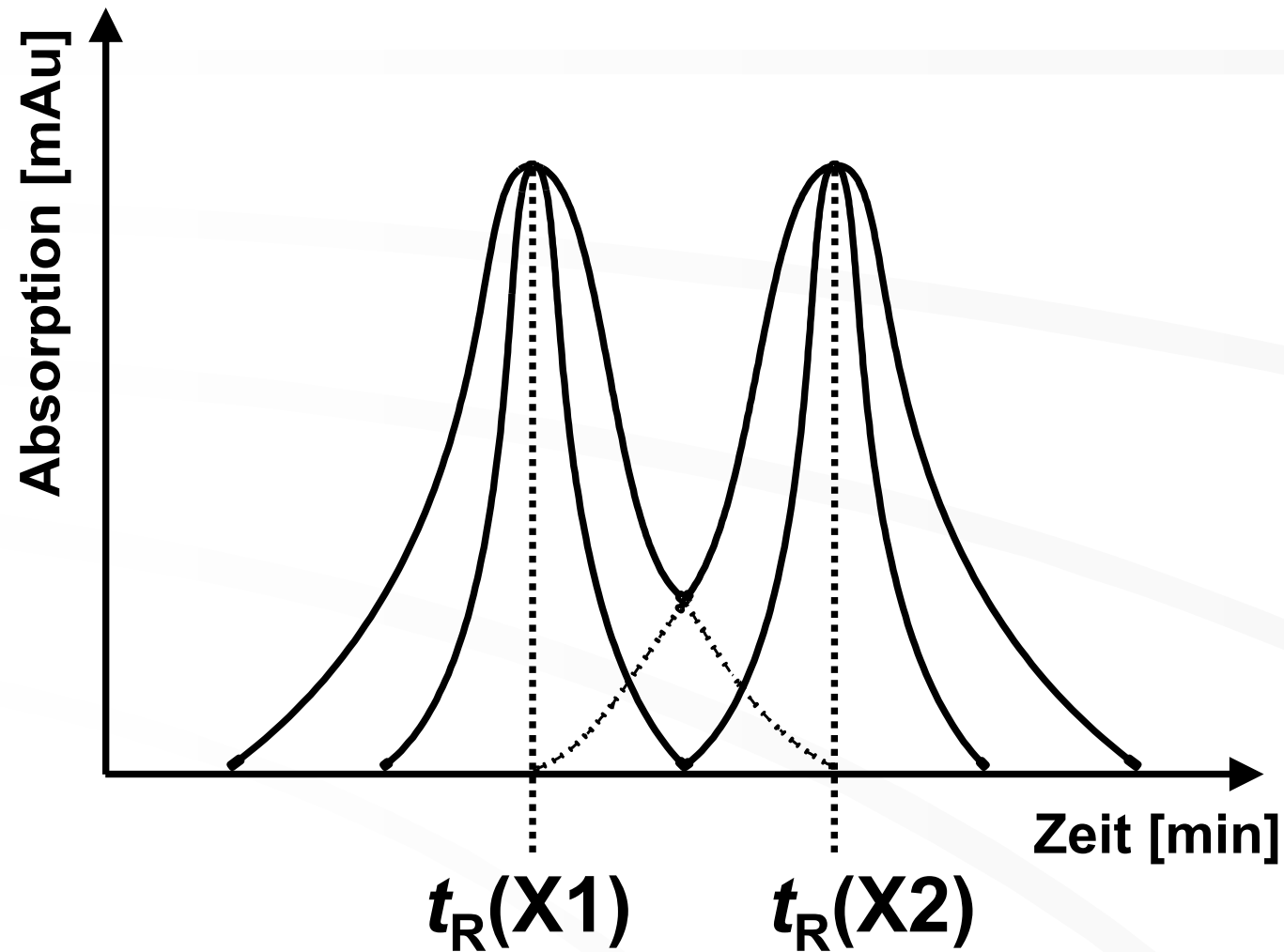


Abb. 10: Chromatogramm mit schlecht aufgelöstem Peakpaar

IV Das Chromatogramm

IV.6 Die Selektivität (Trennfaktor) α

beschreibt die Güte der Trennung zweier benachbarter Peaks

Wird gebildet aus dem Quotienten der beiden Retentionsfaktoren k_2 und k_1

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_s(X_2)}{t_s(X_1)} \quad \text{mit } k_2 \geq k_1 \quad (17)$$

$$\alpha = 1$$



Keine Trennung

$$1 < \alpha < 5$$



optimale Trennung

IV.7 Die Auflösung R_S

Die geometrische Definition lautet:

$$R_S = \frac{(t_R(X_2) - t_R(X_1))}{0,5 (t_w(X_1) + t_w(X_2))} \quad (18)$$

Basisbreite vom Peak
der Komponente X1

Basisbreite vom Peak
der Komponente X2

IV.8 Das Gaußprofil

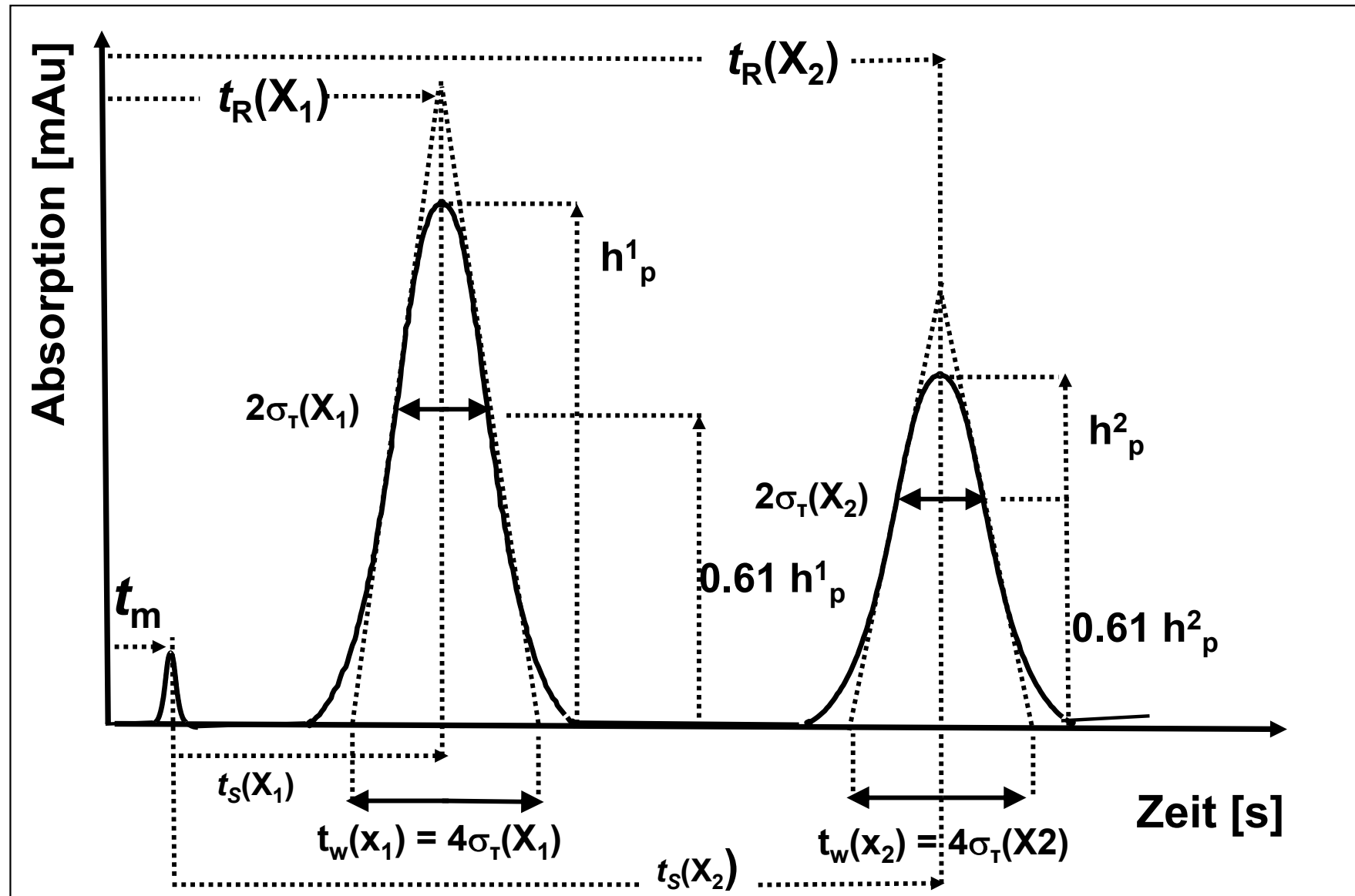


Abb. 11: Musterchromatogramm mit t_w als Basisbreite und $\sigma_T(X)$ als Diffuse Bandenverbreiterung

IV Das Chromatogramm

IV.9 Bewertung der Auflösung R_S

$$R_S = 1$$



Peaks liegen um ihre mittlere Basisbreite auseinander d.h. Überlappung 3%

$$1 < R_S < 1.5$$



fast vollständige (meist ausreichende) Trennung

$$1.25 < R_S < 1.5$$



vollständige, gute Trennung

$$R_S > 1.5$$



meist unnötig gute Trennung d.h. zu lange Retentionszeit



Kapitel V: Literatur

**Snyder L.R., Kirkland J.J.,
Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley.**

**Meyer V.R.,
Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie,
Salle+Sauerländer.**

**Unger K.K.,
Handbuch der HPLC, GIT Verlag.**

**Scott R.P.W.,
Chromatographic Detectors, Jack Cazes, Cherry Hill,
New Jersey**

**Huber L., George, S.A.,
Diode Array Detection in HPLC, Jack Cazes, Cherry Hill,
New Jersey**