

Kap. 1. Chromatographie

Zusammenfassung. Die Chromatographie ist eine analytische Methode zur Trennung von Stoffen. Sie ist also ein Trennverfahren und muss somit immer mit einem Bestimmungsverfahren gekoppelt sein. Der Name Chromatographie geht auf das erste chromatographische Verfahren zurück, als Pflanzenblätter mit Aceton extrahiert wurden und die Lösung durch eine Glassäule gefüllt mit fein gepulvertem Zucker fließen gelassen wurde. Auf der Säule traten mehrere grüne, orange und gelbe Zonen der getrennten Blattfarbstoffe auf. Deshalb auch der Name (*chromos*: griech. *Farbe*). Diese (erste) Methode der Chromatographie heißt **Säulen-Chromatographie**.

Alle chromatographischen Verfahren beruhen darauf, dass die Substanzgemische zwischen einer stationären (unbeweglichen) und einer mobilen (beweglichen) Phase durch Adsorptions-, Verteilungs- oder Austauschkräfte mehr oder minder aufgeteilt werden. Die stationäre Phase kann z.B. ein Feststoff (Adsorptions-Chromatographie, Austausch-Chromatographie) oder ein auf dem Feststoff befindlicher dünner Flüssigkeitsfilm (Verteilungs-Chromatographie) sein. Die mobile Phase, gleichzeitig Träger der zu untersuchenden Substanzgemische, muss eine mit der stationären Phase nicht mischbare Flüssigkeit oder ein indifferentes Gas (Gas-Chromatographie) sein.

Eine Variante ist die **Dünnschicht-Chromatographie (DC, engl. TLC)**. Dabei wird eine Paste der oben erwähnten Trägerstoffe in dünner Schicht auf Trägerplatten (aus Glas oder dicker Alu-Folie) aufgetragen und danach getrocknet. Einige μL der zu untersuchenden Lösung werden auf die Schicht gebracht und eingetrocknet. In einem verschlossenen Glasbehälter (Trennkammer) lässt man nun ein Laufmittel (z.B. Wasser, schwache Säuren oder Basen, organische Lösungsmittel, oder deren Gemische) von unten nach oben wandern. Die eingetrockneten Substanzen werden aufgenommen, verschieden weit mitgeführt und so getrennt.

Die **Papier-Chromatographie (PC)** arbeitet mit Streifen aus speziellem Filterpapier, ebenfalls meist aufsteigend. Die Arbeitsmethode entspricht der der Dünnschicht-Chromatographie.

Mit Hilfe der **Gas-Chromatographie (GC)** werden Substanzen von einem inerten Trägergas transportiert, vom Säulenmaterial unterschiedlich stark zurück gehalten und kommen somit zu unterschiedlichen "Retentionszeiten" am Detektor am Ende der Kapillare ("Säule") an. Man verwendet entweder Glas- oder Stahl-Säulen (gepackte Säulen) mit einem i. D. von 2 – 4 mm. Sie sind mit der stationären Phase (dem "Säulenmaterial") z.B. Silicagel gefüllt oder aber sog. Kapillarsäulen (i. D. 0.2 – 0.75 mm) aus synthetischem Quarz (Fused Silica), die auf ihrer Innenseite mit einem sehr dünnen Film (0.1 – 0.8 μm) an stationärer Phase (meist Polysiloxane) beschichtet sind. Für die Entwicklung chromatographischer Methoden erhielten die Briten *Martin* und *Synge* 1952 den Nobelpreis für Chemie.

Bei der **Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)** werden meist Edelstahlsäulen (ID 2-4 mm) verwendet. Darin befindet sich die sehr dicht gepackte stationäre Phase (2-5 μm Partikel). Dadurch sind sehr leistungsfähige und schnelle Trennungen bzw. Analysen möglich. Dies erfordert allerdings relativ hohe Drücke der flüssigen mobilen Phase (150 – 400 bar). Bei Verwendung von Partikeldurchmessern $< 2 \mu\text{m}$ werden sogar Drücke von 600 - 1000 bar benötigt, um die mobile Phase durch die Stationäre Phase zu bewegen. Man spricht hier von sog. UHPLC = **Ultra-High-Performance-LC**).

Detektionemethoden: In der GC verwendet man zur Detektion u. a. die Wärmeleitfähigkeit des Trägergases, die elektrische Leitfähigkeit eines Brenngases (Flammen-Ionisations-Detektor; FID), oder leitet das Eluat in ein Massenspektrometer. In der DC verwendet man fluoreszierende Platten (deren Fluoreszenz durch den Spot unsichtbar wird, sodass dieser im UV-Licht als dunkler Fleck erscheint), des Weiteren Sprühreagenzien (für chromogene Reaktionen) sowie zur quantitativen Auswertung Reflektometer ("Scanner"), die die Spots optisch abtasten. Daneben verwendet man in der DC Methoden wie z. B. Eluieren und Wiederauflösen, Abtötung von aufgebrauchten Bakterien (beim Nachweise von getrennten Antibiotika) und die Autoradiographie bei der Trennung radioaktiver Stoffe. Die Effluat der Flüssig-Chromatographie werden photometrisch, fluorimetrisch, refraktometrisch oder elektrochemisch detektiert, und können ebenfalls mit anderen Verfahren kombiniert werden, z. B. mit der Massen-Spektrometrie (GC-MS-Kopplung). Die Chromatographie in ihren vielseitigen Erscheinungsformen ist die wichtigste Trennmethode für organische Verbindungen.

1.1. Grundlagen

Der Botaniker M. Tswett (1872 – 1919) gilt als Entdecker der Chromatographie. Im Jahr 1906 beschrieb er die für die Adsorptions-Chromatographie grundlegende flüssig-chromatographische Trennung von Blattfarbstoffen (Ber. Dtsch. Botan. Ges 24/1906 S.384-393). Blattextrakte wurden mittels Petrolether durch kleine, mit Calciumcarbonat gefüllte Glassäulen gedrückt. Inspiriert von den dabei beobachteten Farbzonen (*chromos* = griech.: Farbe) gab er der Methode auch ihren Namen.

Mit dem Ausdruck Chromatographie bezeichnet man heute einen Trennprozess, bei welchem die Komponenten eines Probengemisches zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen im sog. chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt werden. Eine Hilfsphase (stationäre Phase) ruht dabei, während die andere Hilfsphase (mobile Phase) an ihr vorbei strömt.

Die heutige Bedeutung des Begriffs Chromatographie ist sehr allgemein. Sie ist eines von vielen physikalisch-chemischen Trennverfahren. Die Trennung erfolgt ohne Stoffumwandlung und ohne Phasenumwandlung, aber unter Verwendung von sog. Hilfsphasen.

1.1.1. Die stationäre Phase

Zu einer chromatographischen Trennung von Substanzen kommt es, wenn die zu trennenden Substanzen unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen zeigen, wobei die eine Phase ruht (stationäre Phase) während die andere (mobile Phase) an der ruhenden Phase vorbei bewegt wird.

Bei den meisten Ausführungsarten der Chromatographie ist die stationäre Phase fest (das Chromatographie-Bett). Nur selten ist die stationäre Phase flüssig (dann aber als unbeweglicher "stationärer", flüssiger Film auf der Oberfläche eines Feststoffes aufgebracht, wie z.B. als adsorbierter Wasserfilm auf Cellulose), oder aber als unbewegliche, flüssige, sog. quasistationäre Phase im Inneren von porösen Kugeln (Gel-Permeations-Chromatographie; GPC) oder auf der Innenwand von GC-Kapillarsäulen. Von besonderer Bedeutung sind feste Phasen (z.B. SiO_2), deren Oberflächen chemisch modifiziert sind, z. B. durch Belegen mit Alkylketten unterschiedlicher Länge (siehe HPLC).

1.1.2. Die mobile Phase

Die mobile Phase auf dem üblicherweise festen Träger kann flüssig ("Liquid Chromatography"; = LC) oder gasförmig sein (Gas Chromatography; GC). Sie trägt die Analyte weiter.

1.1.3. Grundbegriff: Der Verteilungskoeffizient K

Die unterschiedliche Verteilung der Substanzen zwischen stationärer und mobiler Phase kann durch den Verteilungskoeffizienten beschrieben werden. Er ist wie folgt definiert:

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

Hierin ist: K der Verteilungskoeffizient

$c_s(X)$ die Stoffmengenkonzentration der Substanz X in der festen Phase

$c_m(X)$ die Stoffmengenkonzentration der Substanz X in der mobilen Phase.

1.1.4. Grundbegriff: Kapazitäts- oder Retentionsfaktor k

Setzt man für die Stoffmengenkonzentration in Gleichung (1) die Stoffmenge der Substanz X ein, so erhält man den sog. Kapazitätsfaktor k (auch Retentionsfaktor) genannt:

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

Hierin ist: k der Kapazitäts- oder Retentionsfaktor

$n_s(X)$ die Stoffmenge der Substanz X in der festen Phase

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

Diese Definition des Retentionsfaktors gilt streng genommen nur, solange die Verteilung der Substanz X auf die beiden Phasen unabhängig ist von der eingesetzten Stoffmenge bzw. von der sich ergebenden Konzentration. Bei höheren Konzentrationen (Überladung eines Chromatographiesystems) kann es in einer Phase z.B. zur Bildung von Aggregaten kommen, bei zu niedrigen Konzentrationen z.B. zu Dissoziationsvorgängen.

Auf Grund der unterschiedlichen Verteilungen von Substanzen in zwei miteinander nicht mischbaren Phasen ergibt sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Ausführungsformen der Chromatographie. Sie sollen im Folgenden besprochen werden.

1.1.5. Ausführungsformen der Chromatographie

1.1.5.1. Unterschiedliche Löslichkeit: Verteilungschromatographie

In der Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie werden die Probekomponenten, ähnlich wie beim Ausschütteln im Scheidetrichter, zwischen zwei nicht miteinander mischbaren, flüssigen Phasen verteilt. In einer Säule erfolgt dieser Prozess, d.h. die Gleichgewichtseinstellung mehrere tausend Mal. Die eine der beteiligten Flüssigkeiten ist die mobile Phase, die andere befindet sich z.B. als dünner Film auf der Oberfläche oder in den Poren eines körnigen, in die Säule gefüllten Trägermaterials. Bei dieser Art der Säulenflüssig-Chromatographie wird also ein Phasensystem benutzt, das aus einer flüssigen mobilen und einer flüssigen stationären Phase besteht. In der klassischen Verteilungschromatographie verwendet man z.B. Flüssig-Flüssig-Systeme wie Di-2-cyanomethylether

und n-Heptan, Acetonitril und Cyclohexan oder n-Octanol und Pufferlösungen.

1.1.5.2. Unterschiedliches Adsorptionsverhalten: Adsorptionschromatographie

In der Adsorptions-Chromatographie kommt die Verzögerung der Probensubstanzen dadurch zustande, dass die Probenmoleküle an der stationären Phase unterschiedlich stark adsorbiert werden. Die Stärke der Adsorption bestimmt das Ausmaß der Verzögerung. Bei der Adsorptions-Chromatographie kann man – je nach stationärer Phase – zwischen zwei prinzipiellen Kategorien von Phasensystemen unterscheiden, nämlich

- * dem Normalphasensystem (= NP-Chromatographie)
- * dem Umkehrphasensystem (= RP-Chromatographie)

Das NP-System enthält eine polare stationäre Phase und eine unpolare mobile Phase, beim RP-System verhält es sich genau umgekehrt, daher auch der Name *Reversed-Phase-Chromatographie*.

Sie ist mittlerweile die wohl am häufigsten angewendete Form der Flüssig-Chromatographie. Die folgende Tabelle gibt Beispiele für stationäre und mobile Phasen für die NP- und die RP-Chromatographie.

Stationäre und mobile Phasen in der NP-Chromatographie. Die stationären Phasen sind meist unpolar gemacht (durch "end-capping"), die mobilen Phasen sind relativ polar.

Phasensystem	Stationäre Phase	Mobile Phase
Normal-Phase (NP)	SiO ₂ , Al ₂ O ₃	Heptan/Hexan; Cyclohexan;
	SiO ₂ ~(CH ₂) _n -NH ₂ *	Chloroform; Dichlormethan
	SiO ₂ ~(CH ₂) _n -CN*	Dioxan; Methanol

* diese stationären Phasen können sowohl im NP-als auch im RP-Modus eingesetzt werden.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über gängige stationäre und mobile Phasen in der RP-Chromatographie. Frage: Was ist der Unterschied zu den Materialien in der obigen Tabelle?

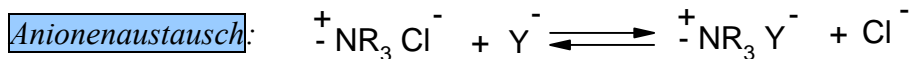
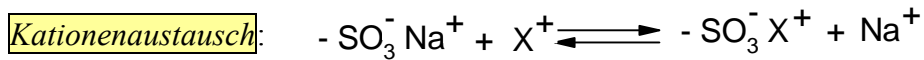
Phasensystem	Stationäre Phase	Mobile Phase
Reversed-Phase (RP)	SiO ₂ ~(CH ₂) _n -CH ₃	Methanol/Wasser; Methanol/ Puffer; Acetonitril/Wasser; Acetonitril/Puffer + Zusätzen von Trifluoressigsäure (TFA), von THF oder Dioxan
	(z.B. C ₄ , C ₈ , C ₁₂ , C ₁₈)	
	SiO ₂ ~Phenyl	
	SiO ₂ ~(CH ₂) _n -CN*	

* diese stationären Phasen können sowohl im NP-als auch im RP-Modus eingesetzt werden.

Wenn Umkehrphasen mit unterschiedlichen Alkylkettenlängen (z.B. C₄, C₈, C₁₂, C₁₈) verwendet werden, steigt der hydrophobe Charakter dieser RP-Träger mit steigender Kettenlänge bei gleicher Ligandendichte. Daher sind die Retentionszeiten z.B. auf RP 18 (= C₁₈)-Trägern länger als z.B. auf RP 8 (= C₈)-Trägern. Bei einer gegebenen RP-Säule wird die Verzögerung der zu trennenden Substanzen durch die Veränderung der Polarität des Fließmittels (Eluens) reguliert. Dies geschieht im Wesentlichen durch die Veränderung des Wassergehalts.

1.1.5.3. Unterschiedliche elektrostatische Wechselwirkung: Ionenaustausch-Chromatographie

In der Ionenaustausch-Chromatographie werden geladene Substanzen getrennt. Die Verzögerung der einzelnen Analyte kommt durch elektrostatische Wechselwirkung mit der stationären Phase zustande. Sollen kationische (anionische) Substanzen getrennt werden, benötigt man entsprechend Kationen (-Anionen)-austauscher. Generell kann der Ionenaustauschprozess durch folgende Beziehung dargestellt werden:



Bei einem Ionenaustauscher sind ionische Gruppen (z.B. Sulfo oder Ammonium) über eine Abstandsgruppe kovalent an eine polymere Matrix gebunden (Polystyrolharz). Die Ladung der Festionen wird durch bewegliche Gegenionen kompensiert (meist Na^+ bei Sulfo und Cl^- bei $-\text{NR}_3^+$). Während des Ionenaustauschprozesses wird dann das Gegenion z.B. Na^+ gegen das Proben-Ion X^+ ausgetauscht. Dieser Vorgang ist ein Gleichgewichtsprozess. Das Ausmaß der Verzögerung des Kations X^+ richtet sich nach der Stärke der Bindung an die Austauschergruppe (Sulfo). Es werden daher Ionen mit hoher Ladung stärker verzögert als solche mit geringerer Ladung. Bei gleicher Ladung werden jene Ionen stärker verzögert, deren Hüllen leichter polarisierbar sind.

Da auch Aminosäuren ionisch sind (und zwar bei jedem pH-Wert), sind auch sie über IC auftrennbar. Aminosäuren sind bei hohen pH-Werten anionisch, bei mittleren pH-Werten zwitterionisch, bei niedrigen pH-Werten kationisch.

1.1.5.4. Unterschiedliche Größe oder Gestalt: Größen-Ausschluss-Chromatographie (SEC), wie z.B. Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Die SEC (= *Size-Exclusion-Chromatography*) unterscheidet sich grundsätzlich von allen bislang kennengelernten Methoden der Chromatographie. Die Packung der Säule besteht aus einem porösen Material. Den Analyten, die zu groß sind, um in die Poren der Packung einzudiffundieren, steht lediglich das Volumen zwischen den einzelnen "Körnern" der stationären Phase zur Verfügung. Sie werden gleichsam "ausgeschlossen". Ihnen erscheint die Säule wie mit massiven, undurchdringlichen Kugeln gefüllt. Diese Moleküle (z. B. große Proteine) werden von der mobilen Phase auf dem schnellstmöglichen Weg durch die Säule transportiert, weil sie nicht in die Hohlräume der stationären Phase eindiffundieren können.

Sind dagegen auch kleinere Moleküle (kleine Proteine) anwesend, können diese in die Poren der stationären Phase diffundieren. Somit werden diese gegenüber den großen Molekülen verzögert (da sie längere Wege wandern) und damit getrennt. Das Lösungsmittel tritt nicht in Wechselwirkung mit der

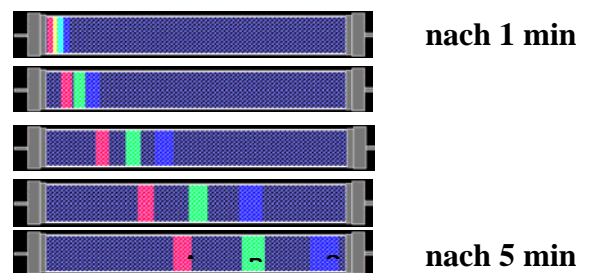
stationären Phase, durchfließt aber alle Poren der stationären Phase und kann diese somit vollständig durchdringen (sog. totale Permeation). Deshalb erscheint das Lösungsmittel bei der SEC – im Gegensatz zu jedem anderen säulenchromatographischen Verfahren – nicht als erstes, sondern als letztes Signal im Detektor. *Frage:* Mit Hilfe welcher Methode kann man die (farblosen!) Proteine erkennen, wenn sie am Ende der Säule austreten? Leider kann man hier nicht wirklich gut derivatisieren.

1.1.6. Der chromatographische Prozess

Ein Verständnis des chromatographischen Prozesses ist vor allem deshalb erforderlich, um entscheiden zu können, welche Chromatographie für ein bestimmtes Trennproblem in Frage kommt. Die Wahl der angemessensten Methode ist ein typischer Fall einer wichtigen Entscheidung im analytischen Gesamtprozess (siehe bei diesem unter Stufe 3: Wahl und Validierung der Methode)!

1.1.6.1 Der Trennvorgang

Zeitlicher Verlauf einer chromatogr. Trennung (Adsorption) eines Probengemisches, das aus drei Einzelkomponenten (A, B, C) besteht. Mit steigender Verlaufszeit (von oben nach unten: nach 1, 2, 3, 4 und 5 min) der Trennung werden die Abstände der Banden größer, allerdings auch breiter. Die entsprechende graphische Auftragung der Größenwerte gegen die Zeit heißt Chromatogramm.



1.1.6.2 Definition eines Chromatogramms

Mit dem Ausdruck "Chromatogramm" bezeichnet man die graphische Auftragung der Größenwerte einer Größe (z.B. der Absorption in mAU = milli-Absorption-Unit), 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.

1.1.6.3 Definition der Retentionszeit und des Retentionsvolumens

Die Retentionszeit ist wesentlich einfacher zu messen als etwa das Retentionsvolumen. Beide Größen hängen jedoch über folgende Beziehung mit der sog. Volumenfließgeschwindigkeit F (kurz Fluss oder Flussrate) zusammen, die sich z. B. an einer HPLC Pumpe leicht einstellen lässt und meist konstant gehalten wird:

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

1.1.6.4. Das Retentionsvolumen $V_R(X)$

ist definiert als

$$V_R(X) = F \cdot t_R(X) \quad (\text{Gl. 3})$$

Hier ist $V_R(X)$ das Volumen der stationären Phase Retentionsvolumen [mL];
 F die Volumenfließgeschwindigkeit der mobilen Phase [mL/min], und
 $t_R(X)$ die Retentionszeit [min].

In der chromatographischen Praxis sind jedoch vor allem die linearen Wanderungs-Geschwindigkeiten (d. h. wo befindet sich die Komponente X nach einer gewissen Laufzeit in meinem System?) die eigentlich interessanten Größen. Für den Zusammenhang zwischen linearer Fließgeschwindigkeit und Volumenfließgeschwindigkeit gilt:

1.1.6.5. Der Zusammenhang zwischen u_m und $u(X)$

Es ist einzusehen, dass die lineare Wanderungsgeschwindigkeit $u(X)$ der Substanz X, der linearen Wanderungsgeschwindigkeit der mobilen Phase u_m direkt proportional sein muss, und dass $u(X)$ immer kleiner als bzw. höchstens gleich u_m sein kann.

$$u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m \quad (\text{Gl. 4})$$

Bei dem Proportionalitätsfaktor $\chi_m(X)$, der dimensionslos sein und zwischen 0 und 1 liegen muss, kann es sich nur um den Stoffmengenanteil der Substanz X in der mobilen Phase handeln, denn die Substanz X wird mit der Geschwindigkeit u_m nur dann transportiert, wenn sie sich in der mobilen Phase aufhält. Dieser Stoffmengenanteil ist im Folgenden definiert und hängt nach (2) mit dem Retentionsfaktor k zusammen.

1.1.6.6. Der Zusammenhang zwischen $\chi_m(X)$ und k

$$\chi_m(X) = \frac{n_m(X)}{n_s(X) + n_m(X)} = \frac{1}{\frac{n_s(X)}{n_m(X)} + 1} = \frac{1}{k + 1} \quad (\text{Gl. 5})$$

Unter Berücksichtigung von (6) erhält man:

$$u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m = \frac{1}{k + 1} u_m \rightarrow \frac{u_m}{u(X)} = k + 1 \quad (\text{Gl. 6})$$

Da für jeden Stofftransport gilt: $0 \leq \chi(X) \leq 1$ erhält man die beiden Grenzfälle:

- | | |
|--|---|
| 1.) Für $\chi_m(X) = 0$ ergibt sich $u(X) = 0$ | d.h. es befindet sich keine Substanz X in der mobilen Phase ($n_m(X)=0$), weil alles an die stationäre Phase gebunden ist, d.h. <u>keine Wanderung</u> des Analyten |
| 2.) Für $\chi_m(X) = 1$ ergibt sich $u(X) = u_m$ | d.h. es befindet sich die gesamte Substanz X in der mobilen Phase ($n_s(X)=0$), d.h. Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten |

entspricht der Wanderungsgeschwindigkeit der mobilen Phase

1.1.6.7. Die „Totzeit“ t_0 oder „Durchbruchzeit“ t_m

Die Zeit, die im zweiten Fall verstreicht, wenn also keine Wechselwirkung der Substanz X mit der stationären Phase stattfindet bezeichnet man häufig als sog. "Totzeit" der Säule t_0 . Analog dazu wird das zugehörige Volumen als sog "Totvolumen" V_0 der Säule bezeichnet.

Der Gebrauch der Bezeichnungen "Totvolumen" oder "Totzeit" wird von der IUPAC wegen vieler Verwechslungsmöglichkeiten heute jedoch nicht mehr empfohlen. So ist mit dem sog. "Totvolumen" oft nicht nur das eigentliche Totvolumen der Säule gemeint, sondern zusätzlich auch das "Totvolumen" das durch die apparative Beschaffenheit des gesamten Gerätes verursacht wird (z. B. durch die Innenvolumina sehr langer Verbindungskapillaren oder nicht ideal angepasster Anschlüsse bzw. Konnektoren). Vom Sachverhalt her scheinen Begriffe wie "Durchbruchzeit" oder "Durchbruchsvolumen" angemessener.

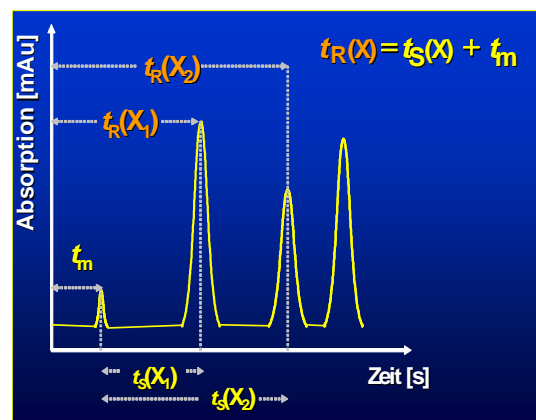
Die Definition von Durchbruchvolumen und -zeit:

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 (Durchbruchzeitmarker) von der Eingabe 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.

Es ist zu beachten, dass ein „Durchbruchzeitmarker“ nicht retardierend sein darf und vom Detektor erkannt werden muss (Detektierbarkeit).

Die Durchbruchzeit repräsentiert die für alle zu trennenden Substanzen gleiche Zeit (kürzest mögliche Zeit), die sie in der mobilen Phase des chromatographischen Systems zubringen müssen. Die Auftrennung der Substanzen kommt dadurch zustande, dass sich die Substanzen je nach Stärke der WW unterschiedlich lange in der stationären Phase aufhalten und so verzögert werden.

Musterchromatogramm mit der entsprechenden Durchbruchzeit t_m , den Retentionszeiten der Komponenten $t_R(X_1)$ und $t_R(X_2)$, sowie $t_S(X)$ als Aufenthaltszeit der Komponente X in der stationären Phase.



Doch wovon sind nun Durchbruchzeit und Retentionszeit abhängig? Diese Frage wird im Folgenden

beantwortet: Die Retentionszeit und die Durchbruchzeit hängen natürlich von den Abmessungen der verwendeten Säule (Länge: L) und von den Wanderungsgeschwindigkeiten $u_m(\mathbf{X})$ bzw. $u(\mathbf{X})$ ab. Ebenso wie Retentionsvolumen und Durchbruchvolumen von der Volumenfließgeschwindigkeit F abhängen. Damit ergeben sich folgende Beziehungen und Verhältnisse:

Durchbruchvolumen

Retentionsvolumen

$$t_m = \frac{L}{u_m} = \frac{V_m}{F} \quad (7) \qquad t_R(\mathbf{X}) = \frac{L}{u(\mathbf{X})} = \frac{V_R(\mathbf{X})}{F} \quad (8)$$

Bildet man den Quotienten aus Retentions- und Durchbruchzeit, so erhält man:

$$\frac{t_R(\mathbf{X})}{t_m} = \frac{V_R(\mathbf{X})}{V_m} = \frac{u_m}{u(\mathbf{X})} \quad (\text{Gl. 9})$$

Unter Berücksichtigung von (6) erhält man Gl. 9:

$$\frac{t_R(\mathbf{X})}{t_m} = \frac{V_R(\mathbf{X})}{V_m} = k + 1 \quad (\text{Gl. 10})$$

die wichtige Beziehung:

$$t_R(\mathbf{X}) = t_m \cdot (k + 1) \quad (\text{Gl. 11})$$

aus der man den Kapazitätsfaktor k berechnen lässt, wie im Folgenden beschrieben.

1.1.6.8. Berechnung des Kapazitätsfaktors k

Um "Chromatogramme", die an Geräten mit unterschiedlicher Totzeit (Durchbruchzeit) 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 somit eine auf die Durchbruchzeit "normierte Elutionsgröße".

$$k = \frac{t_R(\mathbf{X})}{t_m} - 1 \quad (\text{Gl. 12})$$

Der Kapazitätsfaktor ist damit für verschiedene Substanzen bei einem gegebenen System (Festphase und mobile Phase) unmittelbar vergleichbar und unabhängig von den Säulendimensionen. Ein Wert von z.B. $k = 5$ für eine Substanz bedeutet, dass diese Substanz mit der sechsfachen Durchbruchzeit der Säule eluiert wird. Für optimale Trennungen liegt k zwischen 1,5 und 5. Wenn $k = 0$, wird die Retentionszeit gleich der Durchbruchzeit, was bedeutet, dass eine solche Substanz praktisch

unretendiert durch die Säule wandert. Bei Werten von $k < 1,5$ findet im Allgemeinen zu wenig Wechselwirkung zwischen Substanz und stationärer Phase statt, was zu einem ungenügenden Trennergebnis führt. Bei $k > 5$ sind meist die Analysenzeiten zu lange, was zu breiten Peaks führen kann.

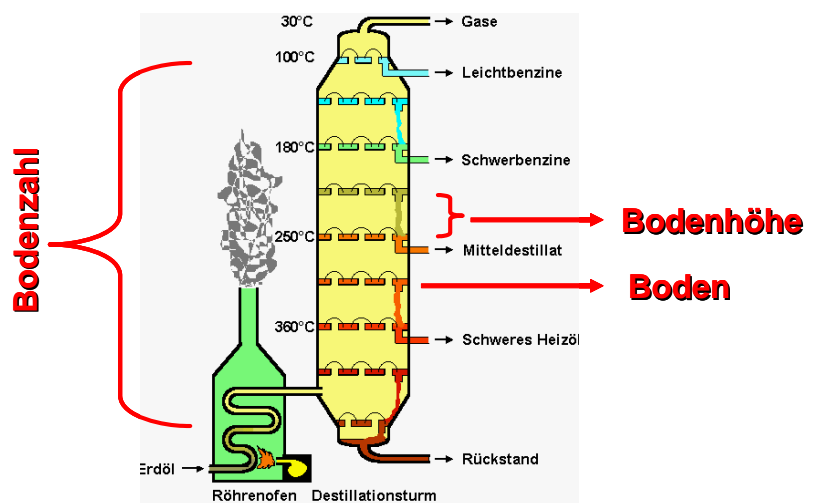
Der Quotient aus den Retentionsfaktoren k_2 und k_1 zweier benachbarter Peaks wird als Selektivität (oder Trennfaktor) α bezeichnet und gibt Aufschluss über die Güte einer Trennung (Gl. 13):

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

1.1.6.9. Die Theorie der Böden („theoretisches Trennstufenmodell“)

Dieses Modell ist eine Übertragung der Theorie der fraktionierten Destillation auf die Säulenchromatographie und übernimmt das dort verwendete Konzept der theoretischen Böden mit einer zugehörigen Bodenhöhe und Bodenzahl. Daher stammt auch die zwar anschauliche, aber nur näherungsweise richtige (die wiederholte Einstellung separater Gleichgewichte ist bei der bewegten mobilen Phase eher unrealistisch) Vorstellung von einer Trennstufenhöhe H und einer Trennstufenzahl N_z in der Säulenchromatographie.

Beispiel eines Destillations-Turms



Definition: 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.

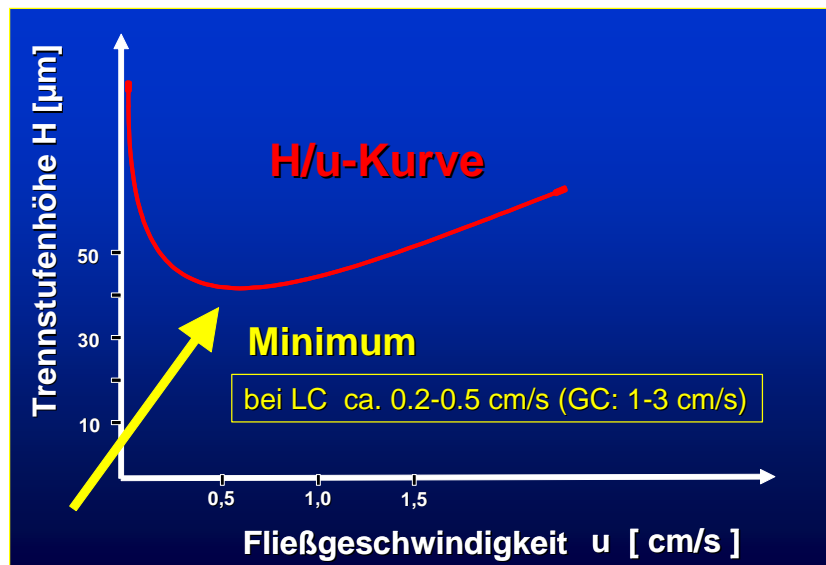
Es stellt sich nun als nächstes die Frage, wovon Trennstufenhöhe und Trennstufenzahl abhängig sind. Beide Größen hängen natürlich in erster Linie mit der Länge L der Chromatographiesäule zusammen gemäß Gleichung (13).

$$H = \frac{L}{N_z} \rightarrow N_z = \frac{L}{H} \quad (\text{Gl. 14})$$

Wird H minimal und N_z maximal, so wird die chromatographische Trennung optimal. N_z ist somit ein *Charakteristikum* für die Leistungsfähigkeit einer Trennsäule. Je besser z.B. eine Säule gepackt wurde (kleine Trennstufenhöhe) und je länger sie ist (große Trennstufenzahl), desto besser ist die damit zu erzielende Trennleistung.

Wie wirkt sich nun der Einfluss von H und N_z auf die lineare Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase aus? Macht man die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase immer größer, kommt es dazu, dass für die Gleichgewichtseinstellung nicht mehr genug Zeit bleibt und die Trennung wird sich verschlechtern. Reduziert man hingegen die Fließgeschwindigkeit immer mehr, so kommen zunehmend z.B. Diffusionsvorgänge mit ins Spiel und auch in diesem Extremfall würde sich die Trennung verschlechtern. Wo liegt also der optimale Flussbereich, bei dem die beste Trennleistung erzielt wird. Diese wichtige Information erhält man aus dem sog. H/u-Diagramm:

Typisches H/u-Diagramm, in dem die Trennstufenhöhe H in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit u_m der mobilen Phase graphisch dargestellt ist. Es existiert eine optimale Fließgeschwindigkeit, bei der die Trennstufenhöhe minimal ist und die Trennleistung optimal wird.



1.1.6.10. Die van-Deemter-Gleichung (klassische Prüfungsfrage!)

Im vorangegangenen Kapitel wurde das sog. H/u-Diagramm als wichtiges Hilfsmittel vorgestellt, das benötigt wird, um gute Trennungen in relativ kurzen Analysenzeiten durchführen zu können. Doch woraus resultiert diese Form der Kurve? Um das Zustandekommen dieser Kurvenform besser verstehen zu können, wird im Folgenden die zu Grunde liegende empirische *van Deemter*-Gleichung näher erläutert, die mit ihren verschiedenen Termen obigen Kurventyp additiv erzeugt: Wie bereits angemerkt handelt es sich hierbei um eine empirische Gleichung mit folgenden Größen:

$$H = A + \frac{B}{u_m} + C \cdot u_m$$

(Gl. 15)

Was bedeuten nun die einzelnen Größen in der *van-Deemter*-Gleichung?

Der A-Term: die *Eddy*-Diffusion (Wirbeldiffusion)

Der *A-Term* ist in erster Näherung von der Fließgeschwindigkeit unabhängig und beschreibt die Bandenverbreiterung. Sie resultiert aus der unterschiedlichen Geometrie der Festphasenteilchen und aus der unterschiedlichen Packung dieser Teilchen in der Trennsäule. Dieser Beitrag, den man *Eddy*-Diffusion (Wirbeldiffusion) nennt, beruht darauf, dass statistisch gesehen einige Analytmoleküle einen relativ kurzen Weg durch die Partikel der stationären Phase finden, während andere gezwungen sind, einen mehr oder weniger großen Umweg zu machen. Der **A-Term** der van Deemter-Gleichung wird im **H/u-Diagramm** durch eine zur **u**-Achse **parallele Linie** repräsentiert (siehe die Abb.).

Der B-Term: die Longitudinal-Diffusion

Der *B-Term* berücksichtigt zwei Beiträge zur sog. Longitudinaldiffusion der Probenmoleküle vom Peakzentrum weg in bzw. entgegengesetzt zur Strömungsrichtung, die der Fließgeschwindigkeit umgekehrt proportional sind:

- (a) die Strömungsverteilung: Die laminare Strömung der mobilen Phase und damit der Transport der Moleküle ist in der Mitte zwischen zwei Partikeln schneller, als nahe am Rand dieser Partikel.
- (b) Diffusion der Probenmoleküle: Dieser Beitrag hängt im Wesentlichen von den Eigenschaften der Probenmoleküle (Diffusionskoeffizient in der mobilen Phase), und den Eigenschaften der mobilen Phase (z.B. Viskosität, Temperatur) sowie von der Fließgeschwindigkeit ab.

Der *B-Term* ist unabhängig vom Partikeldurchmesser. Er spielt in der LC, anders als in der GC, keine große Rolle, weil die Diffusion in der flüssigen Phase im Vergleich zur Gasphase stark eingeschränkt ist. Im H/u-Diagramm wird der *B-Term* durch eine Hyperbel repräsentiert.

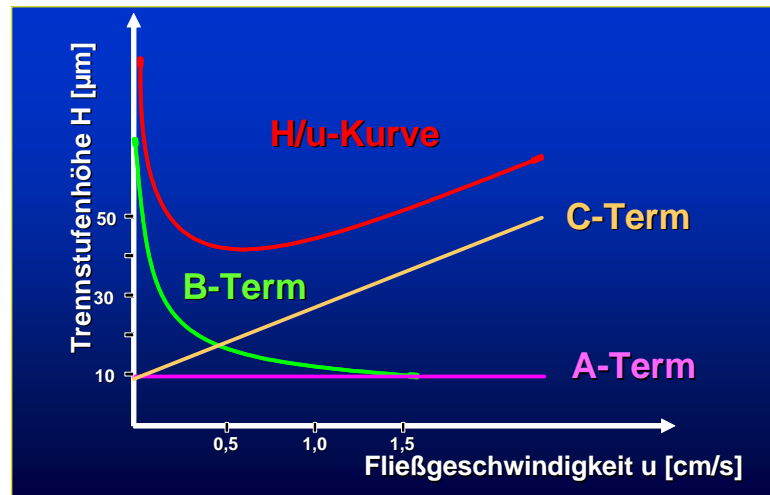
Der C-Term: der Stoffaustauschanteil

Der *C-Term* berücksichtigt verschiedene kinetische Beiträge, die direkt proportional der Fließgeschwindigkeit sind. Man kann diese zusammenfassen unter dem Oberbegriff "Geschwindigkeit des Stoffaustausches der Probenmoleküle zwischen stationärer und mobiler Phase" und umgekehrt. Wenn die stationäre Phase, wie in der LC ein Festkörper ist, gehören dazu:

- (a) Die Geschwindigkeit für die Gleichgewichtseinstellung der Adsorption u. Desorption. Dieser Beitrag ist unabhängig vom Partikeldurchmesser.
- (b) Geschwindigkeit des Massentransportes in die Poren hinein und wieder heraus: 95% aller stationären Phasen bestehen aus kugelförmigen (sphärischen) Partikeln, wobei der Partikeldurchmesser ca. 500-mal größer ist als der Porendurchmesser.
- (c) Geschwindigkeit des Massentransportes in den Poren: In den Poren kommen die zu trennenden Probenmoleküle nur durch Diffusion voran.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass der *C-Term* im Wesentlichen von der Partikelgröße beeinflusst wird. Im H/u-Diagramm wird der *C-Term* durch eine Gerade mit mehr oder weniger starker Steigung repräsentiert. (siehe S. 17).

Nach Addition aller drei Terme, die mit ihrem jeweiligen Einzelkurvenverlauf in nebenstehender Grafik abgebildet sind, erhält man das bekannte H/u-Diagramm, in dem die Trennstufenhöhe H in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit u_m der mobilen Phase graphisch dargestellt ist.



H/u-Diagramm und Terme der van-Deemter-Gleichung

Man ist natürlich bestrebt, möglichst gute Trennungen in relativ kurzer Zeit durchzuführen. Um eine minimale Trennstufenhöhe bei möglichst flacher H/u-Kurve zu erreichen, verwendet man:

- (a) geringe Korngrößen (Einfluss auf A -Term und C -Term)
- (b) enge Korngrößenverteilung bzw. dichte Packung (Einfluss auf B -Term)
- (c) geringe Säulendurchmesser (Einfluss auf A -Term und B -Term)

1.1.7. Das "Chromatogramm"

Die Begriffe Chromatogramm bzw. Retentionszeit und Retentionsvolumen wurden bereits in Kapitel 1.1.6.3 definiert. Darüber hinaus soll nun im Folgenden auf weitere wichtige Kenngrößen und Aussagen eingegangen werden, die aus einem Chromatogramm entnommen werden können.

1.1.7.1. Qualitative Aussagen

Die wichtigsten qualitativen Aussagen, die man aus einem Chromatogramm entnehmen kann, sind die Zuordnung einer Substanz z.B. über ihre spezifische Retentionszeit bzw. die erhaltenen Spektren (bei Verwendung eines DAD, MS-Detektors). Das Ergebnis kann ggf. durch Injektion der vermuteten Referenzverbindung unter exakt gleichen chromatographischen Bedingungen manifestiert werden.

1.1.7.2. Quantitative Aussagen

Die Fläche eines Peaks ist der eingespritzten Stoffmenge proportional. Dadurch hat jede Substanz für jede Chromatographiebedingung ihren eigenen Proportionalitätsfaktor KF_i . Diese Faktoren können durch Injektion von Kalibriergemischen, die die Analyte in bekannter Konzentration enthalten, ermittelt werden. Diese Methode wird auch als die Methode des Internen Standards bezeichnet (siehe Praktikumsskript).

1.1.7.2.1 Die Methode des Internen Standards

Beim Verfahren des Internen Standards gibt man sowohl der zu untersuchenden Probenlösung, als auch jeder Stammlösung eine weitere Komponente, den sog. Internen Standard (Tracer) zu. Eine Substanz, die als interner Standard eingesetzt werden soll, muss aber unbedingt einige wichtige Bedingungen erfüllen:

- ✓ sie darf nicht von vorneherein in der zu untersuchenden Realprobe vorkommen.
- ✓ sie muß chemisch stabil bzw. inert sein gegenüber den restlichen Komponenten in der Probe, sowie gegenüber dem Packungsmaterial der Säule und der verwendeten mobilen Phase.
- ✓ sie sollte in möglichst hoher Reinheit vorliegen.
- ✓ sie sollte über möglichst ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften (Retentionszeit, Detektorverhalten, Löslichkeit, etc.) wie die zu bestimmende Substanz verfügen.
- ✓ sie sollte von allen in der Realprobe enthaltenen Substanzen unter den chromatographischen Bedingungen gut getrennt werden und in vergleichbarer Konzentration zugesetzt werden.

Nach der Analyse einer Eichlösung, welche die Stammlösung mit den genauen Einwaagen der zu bestimmenden Probenkomponenten, die als reine Referenzsubstanzen verfügbar sein müssen, und den internen Standard in ähnlichen Konzentrationsverhältnissen wie in der Realprobe enthält, lässt sich für jede Substanz i ein sog. Kalibrierfaktor KF_i aus den Response-Faktoren f_{Tr} und f_i nach folgenden Zusammenhängen ermitteln:

$$(16) \quad f_i = \frac{a_i}{m_i}$$

f_i = Response-Faktor der Komponente i
 a_i = Fläche der Substanz i
 m_i = Masse der Komponente i

$$(17) \quad KF_i = \frac{f_{Tr}}{f_i} = \frac{m_i^K \cdot a_{Tr}^K}{m_{Tr}^K \cdot a_i^K}$$

KF_i = Kalibrierfaktor der Komponente i
 f_{Tr} = Response-Faktor des Tracers
 m_i^K = Masse der Komponente i in der Kalibrierlösung (K)
 m_{Tr}^K = Masse des Tracers in der Kalibrierlösung (K)
 a_{Tr}^K = Fläche des Tracers in der Kalibrierlösung (K)

$$(18) \quad m_i^x = \text{KF}_i \cdot \frac{a_i^x}{a_{Tr}^x} \cdot m_{Tr}$$

a_i^K = Fläche der Komponente i in der Kalibrierlösung (K)

m_i^x = Masse der Komponente i in der Probenlösung (X)

m_{Tr}^x = Masse des Tracers in der Probenlösung (X)

a_i^x = Fläche der Komponente i

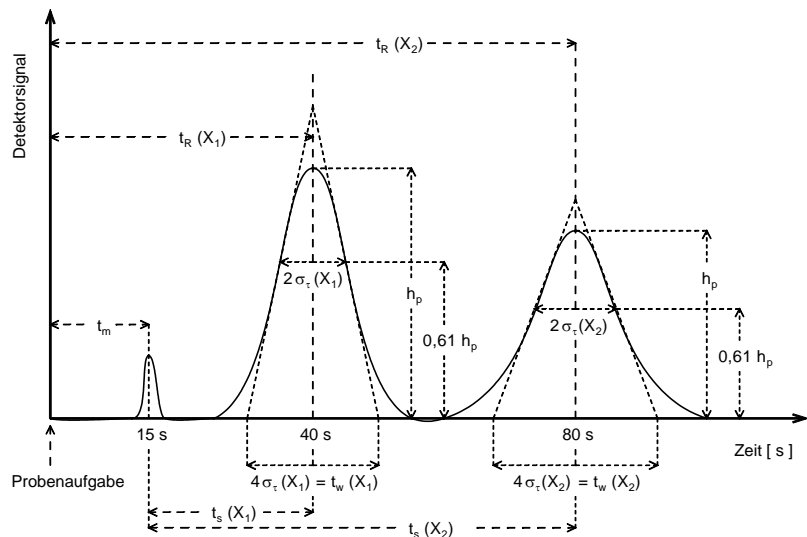
a_{Tr}^x = Fläche des Tracers

Da jeder Probenlösung der interne Standard in exakt gleicher Menge und gleicher Konzentration (Masse m_{Tr}) zugesetzt wird, lassen sich mit Hilfe der aus der Eichung ermittelten KF-Werte die Massen der gesuchten Komponenten nach Formel (17) ermitteln.

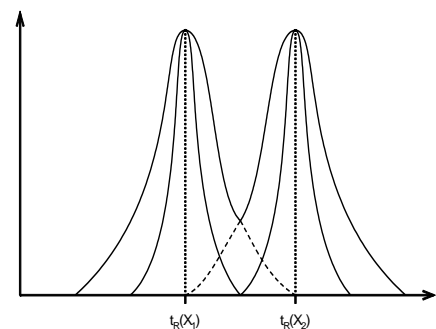
1.1.7.3. Weitere Kenngrößen des Chromatogramms

Im Idealfall sollten die Peaks eines Chromatogramms als symmetrische Gauss-Kurven eluieren. Aus einem solchen idealen Musterchromatogramm lassen sich dann weitere wichtige Größen, wie die diffuse Bandenverbreiterung $\sigma_t(X)$ sowie $t_w(X)$ als Basisbreite ablesen.

Muster-Chromatogramm mit den wichtigen Kenngrößen $\sigma_t(X)$ und $t_w(X)$



Die Auflösung zweier benachbarter Peaks hängt natürlich nicht nur von deren Trennfaktoren, sondern auch von der jeweiligen Peakbreite ab. Das kann man sich an nebenstehendem Chromatogramm klar machen: Die Retentionszeiten der beiden benachbarten Peaks und damit der Trennfaktor α (Gleichung 13) bleiben gleich, aber die Peakbreiten und damit die Auflösung ändern sich. Die Abb. zeigt ein schlecht aufgelöstes Paar von Peaks.



1.2. Die Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

1.2.1. Was bedeutet HPLC?

HPLC ist die Abkürzung für *High Pressure/Performance Liquid Chromatography*, = Hochleistungs- / Hochdruck Flüssig Chromatographie.

1.2.2. Charakteristika der HPLC

Unterschiede zwischen der HPLC und der klassischen Säulen- Flüssig-Chromatographie:

- (a) Durch die HPLC wird eine wesentlich höhere Auflösung bei der Trennung erreicht. Es können oft bis zu 100 Komponenten und mehr aus einem Gemisch gleichzeitig getrennt werden.
- (b) Die Analysenzeiten bei der HPLC sind drastisch verkürzt und zwar von Stunden (in der klassischen Chromatographie) in den Bereich von Minuten.
- (c) Die Empfindlichkeit beim Nachweis der getrennten Substanzen ist deutlich besser. Mittels moderner HPLC können heute Mengen von bis zu 10^{-10} g bestimmt werden.

1.2.3. Wann wird die HPLC angewendet?

Notwendige Voraussetzung für eine Untersuchung mittels HPLC ist die ausreichende Löslichkeit der zu analysierenden Substanz in einem geeigneten Solvens. Ist diese Voraussetzung gegeben, wird die HPLC überwiegend eingesetzt, wenn:

- (a) die Analyte schwerflüchtig oder nichtflüchtig sind (für flüchtige Substanzen bietet sich als Alternative die Gas-Chromatographie an).
- (b) die Analyte hohes Molekulargewicht aufweisen ($MW > 500$)
- (c) die Analyte thermisch instabil bzw. leicht zersetzlich sind.

1.2.4. Wo wird die HPLC eingesetzt?

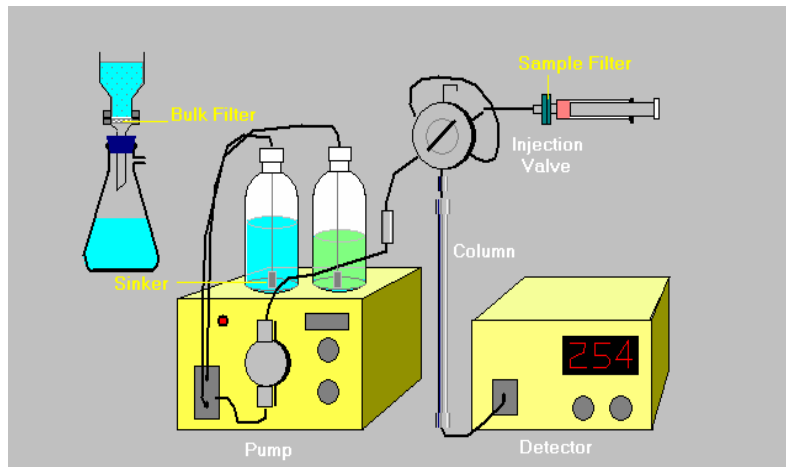
Die Entwicklung chromatographischer Analysenverfahren wurde in den letzten Jahren enorm beschleunigt. Im Folgenden werden daher einige wichtige Einsatzgebiete der HPLC genannt:

- * Reinheits- und Produktkontrolle chemischer Substanzen
- * Analyse von Arzneistoffen
- * Trennung von Metall-Chelat-Komplexen (Schwermetall-Analytik)
- * Bestimmung von Wirkstoffen in biologischen Matrices
- * Bestimmung von Schadstoffen (Umweltanalytik)
- * Analytik und Aufreinigung von Biopolymeren (Enzyme, Nukleinsäuren, Peptide etc.)
- * Standardmethode in fast allen chemischen Laboratorien.

1.2.5. Wie wird die HPLC durchgeführt?

Flüssig-Chromatographie bedeutet, dass ein Lösemittel(gemisch) verwendet wird, in dem die Probe, d. h. das Substanzgemisch, gelöst ist. Die Probe wird vom Fließmittel (= Eluent) durch das chromatographische System transportiert und dabei in Einzelkomponenten aufgetrennt.

Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage. Für die HPLC benötigt man eine Apparatur (= chromatographisches System), bestehend aus: Mobiler Phase (Eluent), Versorgungseinheit (Pumpe), Injektionseinheit (Probengeber), Trennsäule, Detektor und Auswerteeinheit (computergesteuerte Auswertesoftware oder Integrator).



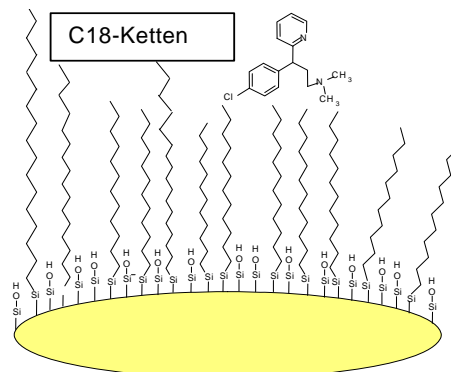
Die Probe wird mittels einer Dosiervorrichtung aufgegeben und mit dem Fließmittel (Eluent) durch die Säule mit meist konstanter Volumenfließgeschwindigkeit gefördert. In der Säule findet die Trennung in die Einzelkomponenten statt. Die Analyte werden in der Säule im Vergleich zum Fließmittel verzögert transportiert. Entsprechend ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften werden sie unterschiedlich stark zurückgehalten und verlassen das Säulenende in der Reihenfolge zunehmender Verzögerung.

1.2.6. Die Normalphasen-Chromatographie (NP-HPLC)

Die am häufigsten eingesetzten stationären Phasen in der NP-Chromatographie sind Aluminiumoxid und Silica-Gel. An den unterschiedlichen stationären NP-Phasen werden überwiegend nichtionische, sowie unpolare bis mittelpolare Substanzen getrennt. Die Retention steigt mit zunehmender Polarität. Bei der NP-Chromatographie nehmen die Kapazitätsfaktoren k bei vergleichbarer Molekülgröße in folgender Reihenfolge zu: gesättigte Kohlenwasserstoffe < Olefine < Aromaten < Halogenide < Sulfide < Ether < Nitroverbindungen < Ester < Aldehyde < Ketone < Alkohole < Amine < Sulfone < Sulfoxide < Amide < Carbonsäuren.

1.2.7. Die Reversed-Phase-Chromatographie (RP-HPLC)

Die Chromatographie an chemisch gebundenen Umkehr-Phasen (RP-HPLC) gehört heute zu den fast ausschließlich verwendeten Techniken in der HPLC. Das Phasensystem in der Reversed-Phase-HPLC besteht aus einer unpolaren stationären und einer polaren mobilen Phase. Die stationären RP-Phasen gehören zu den sog. chemisch modifizierten Kieselgelphasen. Bei den RP-Phasen ist die ursprünglich polare, nicht chemisch modifizierte, Kieselgeloberfläche durch



kovalent gebundene, hydrophobe Reste (z.B. C-18-Ketten [RP-18], C-12-Ketten [RP12], C-8-Ketten [RP8] usw.) unpolar gemacht worden (sog. "endcapping").

Schematische Darstellung eines RP18-Materials (stark vereinfacht)

RP-HPLC-Phasen haben gegenüber NP-HPLC-Phasen aber eine Reihe von Vorteilen. Neben der öfteren Wiederverwendbarkeit liegt der wesentliche Vorteil in der schnelleren Einstellung des Gleichgewichts beim Eluentenwechsel und der deutlich erhöhten Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten.

Im RP-Modus werden Analyten mit zunehmend hydrophobem Charakter verzögert, d. h. die Retention steigt in der Regel mit abnehmender Polarität an. Bei der RP-Chromatographie nehmen somit die Kapazitätsfaktoren k bei vergleichbarer Molekülgröße in der Reihenfolge: Säuren < Amine < Alkohole < Phenole < Ester < Ether < Aldehyde < Ketone < Aromaten < Aliphaten zu.

1.2.8. Die mobile Phase (der Eluent) in der HPLC

In der Normal-Phasen-Chromatographie besteht die mobile Phase aus einem unpolaren organischen Lösungsmittel(-gemisch), dem in bestimmten Fällen etwas polares Lösungsmittel oder gar Wasser (in geringen Mengen) zugesetzt wird.

Definition der Eluotropen Reihe: Die Elutionskraft oder "Stärke" der verschiedenen Eluenten ist eine empirische Größe. Sie wurde für jeden Eluenten als Zahlenwert bestimmt. Als Symbol dafür verwendet man E^0 oder ϵ^0 . Die so gefundene Reihenfolge von schwachen zu mittleren bis hin zu starken Eluenten nennt man die *Eluotrope Reihe*.

Es zeigt sich, dass in der *Eluotropen Reihe* die Eluenten nach ihrer Polarität geordnet sind. Ein (in der NP-Adsorptionschromatographie) starker Eluent ist polar, ein schwacher ist unpolar:

Eluotrope Reihe (Auszug)

<i>Eluent</i>	<i>Polarität [E^0]</i>	<i>UV-Grenze [nm]</i>
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
Dimethylsulfoxid	0,62	270
Diethylamin	0,63	275
Acetonitril	0,65	190
Ethanol	0,88	210
Methanol	0,95	205
Wasser	>1,11	<190

Lit: Meyer V.R. „Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie“, Salle+Sauerländer 7, S. 110ff

In der RP-Chromatographie ist es umgekehrt: Stark polare Eluenten (z.B. Wasser) verzögern die

Elution. Beimengen von dazu schwächer polaren Eluenten (z.B. MeOH, Acetonitril) beschleunigen sie. Frage: Welche der Lösungsmittel in der Tabelle oben sind mit Wasser mischbar?

1.2.9. Die Elution

In der HPLC unterscheidet man zwischen isokratischer Elution und Gradientenelution. Bei der isokratischen Elution ändert sich die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Trennung nicht. Bei der Gradienten-Elution schon !. Sind dabei 2 unterschiedliche Eluenten beteiligt, spricht man von binären Gradienten, bei einer Beteiligung von 3 oder sogar 4 Eluenten, von ternären bzw. quaternären Gradienten.

1.2.10. Pumpen

Die in der HPLC verwendeten Pumpen müssen eine konstante und reproduzierbare Fließgeschwindigkeit gewährleisten können. Von der Fließgeschwindigkeit sind die Retentionszeiten der Peaks und damit die Reproduzierbarkeit der Messung abhängig.

1.2.11. Die Injektionseinheit

Für die Probenaufgabe werden praktisch nur noch Dosierschleifen (z.B. in 6-Port-Ventilen) oder davon abgeleitete Ventile verwendet (siehe Vorlesung). Moderne HPLC-Anlagen sind fast ausschließlich mit einer automatischen Probengeber-Einheit ausgestattet. Die Vorteile liegen vor allem in der außerordentlichen Reproduzierbarkeit und Präzision des Einspritzvorganges.

1.2.12. Detektoren

Der am häufigsten eingesetzte Detektor ist der photometrische Detektor. Es gelten die Gesetze der Photometrie (Lambert-Beer etc.). Die Durchflusszelle wird als „Küvette“ angesehen. Die gängigsten Lichtquellen sind die Deuteriumlampe (UV-Bereich) bzw. die Wolfram Lampe (VIS-Bereich).

Aber auch andere Detektoren sind weit verbreitet. In der klinischen und Pharma-Analytik ist dies der elektrochemische Detektor. Hier wird eine Spannung von z.B. 50 – 500 mV angelegt und der Strom gemessen (einige micro- oder nano-Ampere), der als Folge der elektrochemischen Oxidation oder Reduktion des Analyten fließt. Er ist proportional zur Konzentration des Analyten.

Fluoreszenz-Detektoren bestehen aber durch unerreichte Nachweisstärke, vor allem bei Laser-Anregung der Fluoreszenz. Sie können aber nur auf fluoreszierende Substanzen angewendet werden.

Die Detektion über den Brechungs-Index (RI) bei Analyten, die schlecht oder gar nicht absorbieren, nicht oxidierbar oder reduzierbar sind, und auch nicht fluoreszieren (z.B. Fette, organische Polymere und Weichmacher, Polyalkohole wie Zucker, Sorbit vieler Kaugummis etc.) ist leider wenig nachweisstark, zudem sehr temperaturempfindlich und nicht für Gradientenelution geeignet.

Organische Ionen wiederum können idealerweise mit einem Leitfähigkeits-Detektor nachgewiesen

werden.

Die folgende Tabelle beschreibt häufig eingesetzte Detektoren (eine klassische Prüfungsfrage).

<i>HPLC-Detektoren</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Nachweisgrenze</i>	<i>Linearität</i>
UV/VIS bzw. DAD (Dioden-Array-Det.)	selektiv für UV/VIS-aktive Analyte (ca. 190-950 nm)	ca. 0,3 ng/mL	ca. 1×10^4
RI (Refractive-Index-Det.)	Analyte mit unterschiedlichem Brechungsindex zum Eluenten (temperaturabhängig, keine Gradientenelution möglich, wenig empfindlich)	ca. 0,7 µg/mL	ca. 3×10^3
FLD (Fluorescence-Det.)	selektiv nur für fluoreszierende Analyte	ca. 0,2 pg/mL (!)	ca. $10^3 - 10^4$
ECD (Electro-Chemical-Det.)	selektiv nur für oxidierbare bzw. reduzierbare Analyte	ca. 1,0 pg/mL (!)	-
CD (Conductivity-Det.)	Ionen	a)	ca. 10^5
ELSD (Evaporative-Light Scattering-Det.)	z.B. Zucker, Salze (Gradientenelution möglich)	-	-
MSD (Mass-Selective-Det.)	für alle im MS ionisierbaren Analyte	-	-

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

Frage: Welche Gruppen von (bio)organischen Verbindungen liegen bei pH 7.0 als Ionen vor und können somit mit dem Leitfähigkeitsdetektor nachgewiesen werden? *Antwort:* Aminosäuren, Proteine, DNA/RNA; Fettsäuren, alle Carbonsäuren. Nicht ionisch sind hingegen: Zucker, Fette, Alkohole, etc.

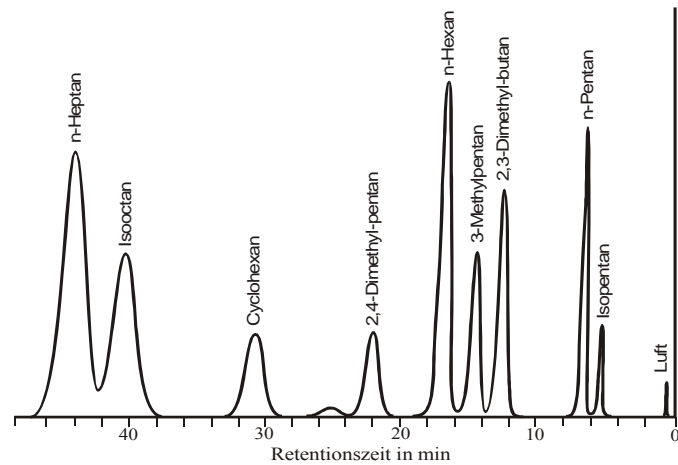
1.3. Die Gas-Chromatographie (GC)

1.3.1. Was bedeutet GC?

Unter dem Begriff der Gas-Chromatographie (GC) werden physikalisch-chemische Trennmethode zusammengefasst, bei denen, eine Stoffmenge durch Verteilung zwischen einer ruhenden ("stationären") und einer sich bewegenden ("mobilen") Phase erfolgt. Ein GC-System besteht also wiederum aus zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, von denen die eine sich an der anderen vorbeibewegt. Die Gaschromatographie umfasst alle chromatographischen Methoden, bei denen die mobile Phase ein Gas ist.

Während bei der Flüssig-Chromatographie an der Selektivität des chromatographischen Systems sowohl die stationäre als auch die mobile Phase beteiligt sind, resultiert bei der GC die Selektivität ausschließlich aus der stationären Phase. Im Gegensatz zur Liquidchromatographie, die eine allgemein anwendbare und schonende Methode zur Analyse unbekannter, in adäquaten Lösungsmitteln lösbarer, Substanzgemische darstellt, beschränkt sich die GC auf solche Substanzgemische, die bis zu einer bestimmten Grenze unzersetzt in den Gaszustand überführt werden können.

GC einer Mischung aliphatischer Kohlenwasserstoffe. Die Zeitskala verläuft von rechts nach links. Derartig wirksame und schnelle Trennungen von Flüssigkeitsgemischen waren vor der Erfindung der GC-Analytik (erste Anfänge 1943 – 1947; Nobelpreis 1946) undenkbar.



1.3.2. Wann wird die GC angewendet?

Notwendige Voraussetzung für eine Untersuchung mittels GC ist ein ausreichender Dampfdruck des Analyten bei höchstmöglicher Arbeits-(Injektions)temperatur, die jedoch noch unterhalb der Zersetzungstemperatur der Substanz liegen muss (ca. 250 - 300°C). Ist diese Voraussetzung gegeben, kann die GC eingesetzt werden zur Analyse von:

- * Gasen (Injektion z.B. mittels Gasschleifen)
- * Flüssigkeiten (Injektion mittels Mikroliterspritzen bzw. Autosamplern)
- * Feststoffen (Injektion als Lösung oder mit Feststoffdosiersystem)

1.3.3. Wo wird die GC eingesetzt?

Da mit der Gaschromatographie, ähnlich wie bei der HPLC, eine sehr selektive und vollständige Trennung von Stoffgemischen möglich ist, ergeben sich vielfältigste Anwendungsgebiete:

- * Qualitative Analyse (Substanzidentifizierung)
- * Quantitative Analyse (Konzentrationsbestimmung vieler Komponenten gleichzeitig)
- * Reinheits- und Produktkontrolle chemischer Substanzen

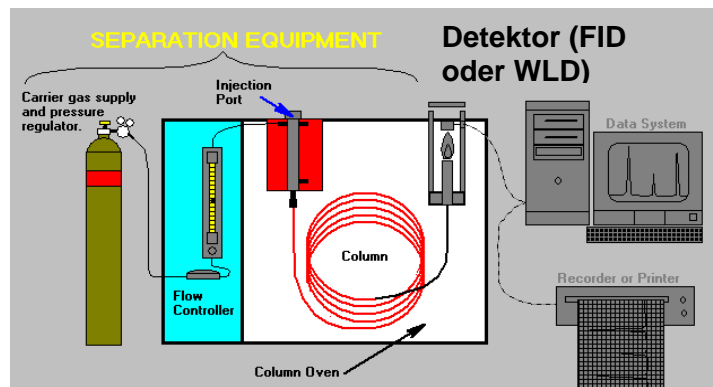
Typische Beispiele:

- * Analytik von Arzneistoffen
- * Analytik von Parfums
- * Analytik von Alkohol, Getränken
- * Analytik von Heiz- und Treibstoffen bzw. deren Verbrennungsprodukten (z. B. Autoabgase)
- * Analytik von gasförmigen oder verdampfbaren Schadstoffen (Umweltanalytik).

1.3.4. Wie wird die GC durchgeführt?

Eine GC-Trennung wird in folgenden, kontinuierlich nacheinander ablaufenden Teilschritten durchgeführt. Zunächst wird das Gas bzw. die verdampfbare Substanz über einen Injektor in eine Trennsäule gegeben. Dort werden die Analyte mit Hilfe eines Trägergases (z.B. He od. H₂) durch die thermostatisierte Säule transportiert, wo der eigentliche Trennvorgang stattfindet.

Schematische Darstellung einer GC-Anlage. Die getrennten Analyte passieren dann nacheinander einen geeigneten Detektor, der jeden einzelnen Bestandteil anzeigt. Der Detektor ist an einen Rechner angeschlossen, die die erzeugten Chromatogramme aufzeichnet und auswertet. Der GC setzt sich also im Wesentlichen zusammen aus Proben-aufgabereinheit, Pneumatik, Ofen mit Temperatursteuerung, Trennsäule und Detektor.



1.3.5. Die stationäre Phase in der GC

In der GC werden als stationäre Phasen entweder adsorbierende Festkörper oder adsorbierende Flüssigkeiten eingesetzt. Man unterscheidet daher grundsätzlich zwischen zwei Säulentypen:

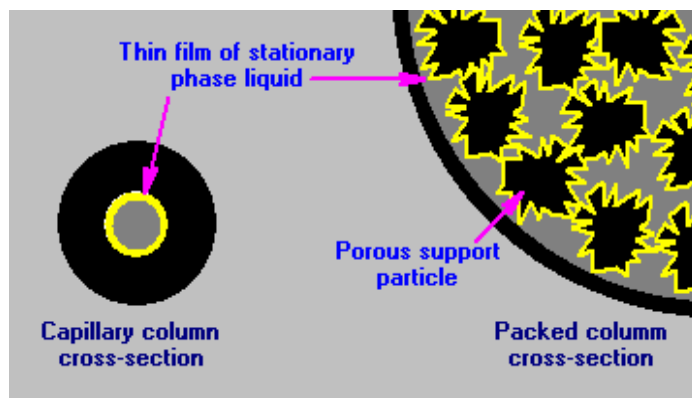
* Gepackte Säulen (packed columns):

bestehen aus einem Glas- oder Metallrohr (2 - 4 mm Innendurchmesser, Länge: 0.5 – 4 m), das mit einem Säulenmaterial gefüllt ist. Als stationäre Phasen werden hierbei entweder feste Adsorbentien oder Trennflüssigkeiten, die auf einem Träger (z.B. Kieselgur) aufgebracht sind, verwendet. Feste Adsorbentien werden häufig bei Bestimmung von Gasen oder kleinen organischen Molekülen verwendet. Als Adsorbentien dienen hierbei u.a. z.B. Kieselgel, Al_2O_3 oder Aktivkohle.

* Kapillarsäulen (open tubular columns):

bestehen aus langen (ca. 30 – 60 m) und sehr dünnen Glas- oder Quarzröhren. Bei den Kapillarsäulen werden als stationäre Phasen sehr häufig Silikonöle und Polyethylenglykole eingesetzt. Bei den Silikonölen (Polysiloxanen) hängt die Polarität von der Zusammensetzung ab: Die Kapillarenwand ist in der Regel aus synthetischem Quarz (engl. „fused silica“) hergestellt und auf der Innenseite mit der Trennflüssigkeit beschichtet. Es werden in der Regel Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0.2 – 0.75 mm verwendet. Bei Kapillaren mit 0.2 mm Innendurchmesser liegen die Schichtdicken der Trennflüssigkeit (Film) bei 0.1 – 0.8 μm . Bei Kapillaren mit größerem Innendurchmesser beträgt die Schichtdicke bis zu 5 μm . Je größer die Schichtdicke der Trennflüssigkeit ist, desto größer ist zwar die Beladbarkeit (Kapazität) der Säule, je geringer ist aber auch ihre Trennleistung (warum?)

Querschnittsansicht einer gepackten GC-Säule (Ausschnitt rechts) im Vergleich zu einer modernen Dünnschicht-GC-Kapillarsäule. Der aufgetragene Film ist gelb dargestellt. Da mit Kapillarsäulen außerordentlich hohe Auflösungen erzielt werden, spricht man hier auch von sog. HRGC (*High Resolution GC*).



Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über häufig eingesetzte GC-Säulen. In der modernen Kapillar-Gaschromatographie werden fast ausschließlich Säulen vom WCOT-Typ eingesetzt.

<i>Kenngröße</i>	<i>konventionelle, gepackte Säule</i>	<i>Dünnschicht Kapillarsäulen</i>
Säulenlänge (ca.)	0,5 - 4 m	30 – 60 m
Säulendurchmesser (ID)	2 - 4 mm	0,2 - 0,75 mm
Säulenmaterial	Glas, Edelstahl	Synthetischer Quarz (fused silica)
Stationäre Phase	SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , Aktivkohle bzw. auf z.B. Diatomeenerde* (SiO ₂) aufgetragene dünne Trennflüssigkeiten	sehr dünner Film (0,1-0,8 µm) aus z.B. Polydimethylsiloxanen auf Innenseite der Kapillarwand
Belastung mit Probe	groß (1 mg)*	klein (< 1mg)*
Trägergasgeschwindigkeit	60 mL/min*	1 mL/min*
Anzahl der theoret. Böden N_z	3000*	150.000*
Bodenhöhe	0,7 mm*	ca. 0,3 mm*

Quelle: http://www.analytik.ethz.ch/praktika/phys_anal/GC/GCSkript2011.pdf

1.3.6. Die mobile Phase (Trägergas) in der GC

Als Trägergas wird in den meisten Fällen Helium bzw. Wasserstoff verwendet. Die Trägergase müssen von besonderer Reinheit sein. Von der mobilen Phase wird außerdem gefordert, dass sie weder mit den Analyten noch mit dem Trägermaterial (d. h. mit dem stationären Flüssigkeitsfilm) bei hohen Temperaturen reagiert.

1.3.7. Die Temperatur

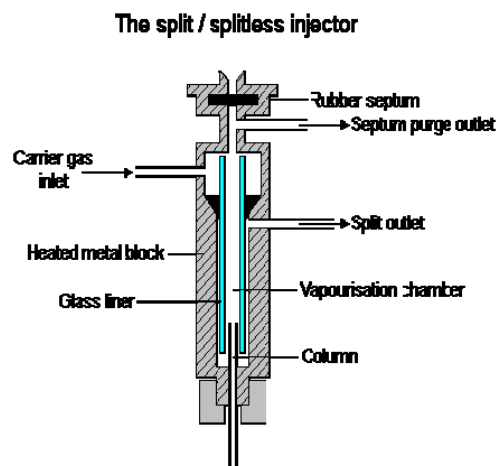
Bei der isothermen GC wird die Säulentemperatur während der Trennung konstant gehalten. Bei der temperatur-programmierten GC wird die Säulentemperatur während der Trennung linear mit der Zeit verändert.

1.3.8. Die Injektionseinheit

Der Injektor dient zur Einbringung der Probe in das Trennsystem. Wichtig dabei ist, dass beim Einspritzvorgang eine möglichst schmale Startbande produziert wird, d.h. dass die Probe auf möglichst kleinem Raum an den Säuleneingang gebracht wird. Das Probengemisch wird meist in einem flüchtigen Lösungsmittel gelöst und mit Hilfe einer Spritze (meist mittels Autosampler) in den Injektor injiziert. Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten von Injektoren:

(a) Beim "*split/splitless injector*" wird die Probenlösung über ein Septum in den Verdampfungsraum injiziert. Durch die dort herrschende Temperatur (200 -300 °C) verdampft

die Probe und es entsteht eine Dampfwolke, welche mit Hilfe des Trägergases in die Säule transportiert wird. Die Probenaufnahme auf die Säule kann hierbei entweder komplett (splitless-mode), oder durch Variation der Split-einstellung nur teilweise (*split-mode*) erfolgen. Der *split-mode* kommt vor allem bei relativ konzentrierten Probenlösungen zum Einsatz.

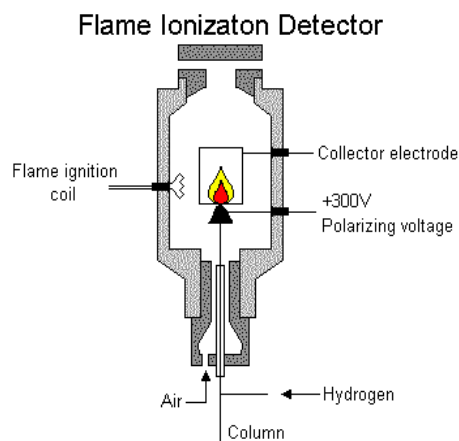


(b) Beim sog. "on-column injector" (siehe Praktikumsskript) wird dagegen die Spritzenkanüle direkt in die Trennsäule eingeführt und somit die Probenlösung direkt in die Kapillare injiziert (in der Regel kalt).

1.3.9. Detektoren

Die Chromatographie ist eine Trennmethode und benötigt immer einen Detektor. Der meist verwendete Detektor in der GC ist der Flammen-Ionisations-Detektor (*flame ionization detector*, FID). Gegenüber anderen Detektoren weist er den Vorteil großer Empfindlichkeit und einen breiten Anwendungsbereich auf. Der FID ist praktisch auf sämtliche kohlenstoffhaltige Verbindungen empfindlich und kaum auf bestimmte Substanzklassen beschränkt. Der WLD ergänzt den FID und kann auch nicht pyrolysierebare (bzw. nicht brennbare) Gase und Dämpfe nachweisen, z. B. CO₂, H₂O, N₂, O₂, CCl₄ sowie Edelgase.

Schematische Darstellung eines FID-Detektors. In der Wasserstoff-Flamme werden organische Moleküle in die Flamme zu Radikalen pyrolysiert, die durch angeregte Sauerstoffatome und OH-Radikale oxidiert und ionisiert werden. Die so erzeugten Ionen werden von der Collector-Electrode angezogen, wodurch ein Strom fließt, welcher der Probenmenge proportional ist.



Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht (Auswahl) über häufig eingesetzte GC-Detektoren (klass. Prüfungsfrage!).

GC-Detektoren	Anwendung	Nachweisgrenze	Linearität
FID (Flame-Ionization-Det.)	selektiv für alle ionisierbaren Komponenten in H ₂ /Luft-Flamme (z.B. Kohlenwasserstoffe)	ca. 10 -100 pg* organic compd	ca. 1 x 10 ⁷
TCD (Thermal-Conductivity-Detector)	für alle Analyte mit unterschiedlicher thermischer Leitfähigkeit zum Trägergas	< 400 pg*	ca. 1 x 10 ⁶

ECD (Electron-Capture-Detector)	selektiv besonders für Analyte mit Heteroatomen	ca. 0,05 - 1 pg*	ca.1 x 10 ⁴
NPD (Nitrogen-Phosphorus-Det.)	selektiv für stickstoff- und phosphorhaltige organische Analyte	ca. 0,1 – 10 pg*	ca.1 x 10 ⁴
MSD (Mass-Selective-Det.)	für alle im MS ionisierbaren Analyte	ca.10 pg – 10 ng*	ca.1 x 10 ⁵

Quelle: Buffington R., Wilson M.K., „Detectors for Gas Chromatographie“ a practical primer, Hewlett Packard, 1987

1.4. Die Dünnschicht-Chromatographie

Die DC ist eine sehr verbreitete chromatographische Trennmethode. Sie ist kostengünstig, vielseitig, überall ohne großen Geräteaufwand einsetzbar und schnell. Man verwendet dünne DC-Platten, die aus einem mechanischen Träger (meist eine festere Alu-Folie) und einer darauf aufgetragenen Schicht aus Silicagel bestehen. Die zu untersuchende Probe (engl. *sample*, nicht *probe*!) wird als Lösung mit einer Kapillare auf den unteren Rand der Platte aufgebracht (Versuch!). Danach wird die DC-Platte in ein Lösungsmittelbad (das sog. "Laufmittel") gestellt, das sich in einer Glaskammer befindet, und zugedeckt. Man lässt das Laufmittel (oft ein Gemisch aus Butanol, Essigsäure und Wasser) langsam aufsteigen. Nach Trennung auf der Platte werden die einzelnen Komponenten über deren Farbintensität nachgewiesen, oft erst nach Besprühen mit einem chromogenen Reagens. Die DC ist auf leicht flüchtige Stoffe naturgemäß nicht anwendbar. Die DC wird vorwiegend auf organische Stoffe angewendet. Aber auch Metallionen können auf diese Weise getrennt werden, indem man sie z. B. in einen farbigen Metall-Liganden-Komplex überführt, z. B. mit Xylenol-Orange. Man setzt sie auch ein, um den Fortgang chemischer Reaktionen zu verfolgen, indem man alle paar Minuten ein DC macht und die Abnahme der Ausgangsverbindung bzw. die Zunahme des Produktes verfolgt.

Versuch: Trennung der organischen Farbstoffe verschiedener Kugelschreiber und Filzstifte mittels DC. Die Farben werden zuerst mit Aceton extrahiert. Von diesem Extrakt wurden dann ca. 2 µL mit Hilfe einer dünnen Kapillare auf die DC-Platte aufgebracht und mit dem Laufmittel Chloroform-Butanol "entwickelt". Man findet je nach Hersteller zahlreiche gelbe, grüne, blaue und rote Flecken.

Versuch: Chromatographie und Identifikation von Aminosäuren. Vier Aminosäuren werden einzeln und als Gemisch als kleine runde Flecken ihrer ca. 1%-igen wässrigen Lösungen auf eine DC-Platte (Silicagel) aufgetragen. Nach dem Trocknen der Flecken durch Föhnen wird mit einem Gemisch aus 75 mL Butanol, 20 mL Eisessig und 15 mL Wasser (v/v) aufsteigend chromatographiert. Nach einer Stunde markiert man den oberen Lösungsmittelrand, lässt die Platte an der Luft oder im Trockenschrank trocknen, taucht sie in eine 1%-ige Lösung von Ninhydrin in Methanol, und erwärmt kurz im Wärmeschrank (oder föhnt warm). Es entstehen violette Flecken. Die Identifikation der Aminosäuren erfolgt über die R_F-Werte (an Hand der R_F-Werte der reinen Aminosäuren). Reproduzierbare Ergebnisse werden nur erhalten, wenn identische Trägermaterialien und Laufmittel verwendet werden und bei gleichen Temperaturen gearbeitet wird. Auch auf die Kammersättigung ist zu achten.