

Veronika R. Meyer

Praxis der Hochleistungs- Flüssigchromatographie

9. Auflage



**WILEY-
VCH**

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Veronika R. Meyer

**Praxis der Hochleistungs-
Flüssigchromatographie**

Veronika R. Meyer

Praxis der Hochleistungs- Flüssigchromatographie

9. Auflage



**WILEY-
VCH**

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

PD Dr. Veronika R. Meyer
EMPA St. Gallen
Eidgenössische Materialprüfungs-
und Forschungsanstalt
Metrologie in der Chemie
Lerchenfeldstrasse 5
9014 St. Gallen
SCHWEIZ

Das vorliegende Buch wurde sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autor und Verlag für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler keine Haftung

Bibliographische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

© 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
Weinheim

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

All rights reserved (including those of translation into other languages). No part of this book may be reproduced in any form – by photoprinting, microfilm, or any other means – nor transmitted or translated into a machine language without written permission from the publishers. Registered names, trademarks, etc used in this book, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

Printed in the Federal Republic of Germany

Gedruckt auf säurefreiem Papier.

Satz Bibliomania GmbH, Frankfurt am Main

Druck betz-druck GmbH, Darmstadt

Bindung J. Schäffer GmbH & Co. KG, Grünstadt

ISBN 3-527-30726-5

Dem Andenken von Otto Meyer gewidmet

Alles ist einfacher, als man denken kann,
zugleich verschränkter, als zu begreifen ist.

GOETHE, *Maximen*

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	<i>XI</i>
Vorwort zur neunten Auflage	<i>XI</i>
0	Wichtige und nützliche Gleichungen für die HPLC 1
1	Einleitung 4
1.1	HPLC: Eine leistungsfähige Trennmethode 4
1.2	Ein erstes HPLC-Experiment 5
1.3	Die flüssigchromatographischen Trennverfahren 6
1.4	Die HPLC-Apparatur 9
1.5	Sicherheit am HPLC-Arbeitsplatz 9
1.6	Vergleich von Hochleistungs-Flüssigchromatographie und Gaschromatographie 10
1.7	Druckeinheiten 12
1.8	Längeneinheiten 12
1.9	Wissenschaftliche Zeitschriften 12
1.10	Empfehlenswerte Bücher 14
2	Theoretische Grundlagen 15
2.1	Der chromatographische Prozess 15
2.2	Bandenverbreiterung 17
2.3	Das Chromatogramm und seine Aussage 22
2.4	Graphische Darstellung von Peakpaaren mit verschiedener Auflösung 28
2.5	Die Beeinflussung der Auflösung 33
2.6	Totvolumina (extra-column-Volumina) 39
2.7	Tailing 39
2.8	Peakkapazität und statistische Auflösungswahrscheinlichkeit 44
2.9	Temperatureinflüsse in der HPLC 47
2.10	Die Grenzen der HPLC 49
3	Pumpen 54
3.1	Allgemeines 54

3.2	Die Kurzhub-Kolbenpumpe	55
3.3	Unterhalt und Reparaturen	58
3.4	Andere Pumpentypen	59
4	Bereitstellung der Apparatur bis zur Probenaufgabe	61
4.1	Auswahl der mobilen Phase	61
4.2	Vorbereitung der mobilen Phase	63
4.3	Gradientensysteme	65
4.4	Kapillarleitungen	66
4.5	Fittings	69
4.6	Probenaufgabesysteme	70
4.7	Probelösung und Probevolumen	74
5	Lösungsmittleigenschaften	76
5.1	Tabelle organischer Lösungsmittel	76
5.2	Lösungsmittelselektivität	77
5.3	Mischbarkeit	79
5.4	Puffer	79
5.5	Haltbarkeit von mobilen Phasen	83
6	Detektoren	84
6.1	Allgemeines	84
6.2	UV-Detektoren	89
6.3	Brechungsindex-Detektoren	92
6.4	Fluoreszenz-Detektoren	94
6.5	Elektrochemische Detektoren	95
6.6	Lichtstreuungs-Detektoren	97
6.7	Andere Detektoren	98
6.8	Mehrfachdetektion	100
6.9	Indirekte Detektion	101
6.10	Kopplung mit Spektroskopie	102
7	Säulen und stationäre Phasen	108
7.1	Säulen für die HPLC	108
7.2	Vorsäulen	110
7.3	Allgemeines über stationäre Phasen	111
7.4	Silicagel	116
7.5	Chemisch modifiziertes Silicagel	118
7.6	Styrol-Divinylbenzol	122
7.7	Einige weitere stationäre Phasen	125
7.8	Vorsichtsmaßnahmen und Regeneration	127
8	Das Testen von HPLC-Säulen	132
8.1	Einfache Tests für HPLC-Säulen	132
8.2	Bestimmung der Korngröße	134

8.3	Bestimmung der Totzeit	135
8.4	Das Testgemisch	137
8.5	Dimensionslose Größen zur Charakterisierung von HPLC-Säulen	139
8.6	Die van Deemter-Gleichung aus reduzierten Größen und ihre Nützlichkeit für die Säulendiagnose	142
8.7	Diffusionskoeffizienten	144
9	Adsorptions-Chromatographie	147
9.1	Was heißt Adsorption?	147
9.2	Die eluotrope Reihe	149
9.3	Selektivitätseigenschaften der mobilen Phase	152
9.4	Wahl und Optimierung der mobilen Phase	153
9.5	Anwendungsbeispiele	155
10	Umkehrphasen-Chromatographie	160
10.1	Prinzip	160
10.2	Mobile Phasen in der Umkehrphasen-Chromatographie	161
10.3	Selektivität und Stärke der mobilen Phase	164
10.4	Stationäre Phasen	167
10.5	Methodenentwicklung in der Umkehrphasen-Chromatographie	170
10.6	Anwendungsbeispiele	172
10.7	Hydrophobic-Interaction-Chromatographie	176
11	Chromatographie mit chemisch gebundenen Phasen	178
11.1	Einführung	178
11.2	Eigenschaften spezieller Phasen	178
12	Ionenaustausch-Chromatographie	184
12.1	Einführung	184
12.2	Prinzip	184
12.3	Eigenschaften von Ionenaustauschern	186
12.4	Der Einfluss der mobilen Phase	188
12.5	Spezielle Möglichkeiten für den Ionenaustausch	190
12.6	Praktische Hinweise	192
12.7	Anwendungsbeispiele	194
13	Ionenpaar-Chromatographie	197
13.1	Einführung	197
13.2	Praxis der Ionenpaar-Chromatographie	198
13.3	Anwendungsbeispiele	201
13.4	Anhang: UV-Detektion mit Hilfe von Ionenpaar-Reagenzien	201
14	Ionenchromatographie	204
14.1	Prinzip	204
14.2	Unterdrückungstechniken	205

14.3	Phasensysteme	205
14.4	Anwendungen	208
15	Ausschluss-Chromatographie	210
15.1	Prinzip	210
15.2	Das Kalibrierchromatogramm	213
15.3	Molekülmassenbestimmungen mit Ausschluss-Chromatographie	216
15.4	Hintereinanderschalten von Ausschluss-Säulen	219
15.5	Phasensysteme	220
15.6	Anwendungen	221
16	Affinitäts-Chromatographie	226
16.1	Prinzip	226
16.2	Affinitäts-Chromatographie als Spezialfall der HPLC	227
16.3	Anwendungsbeispiele	229
17	Wahl der Methode	232
18	Möglichkeiten zur Lösung des Elutionsproblems	237
18.1	Das Elutionsproblem	237
18.2	Lösungsmittelgradienten	238
18.3	Säulen zusammenschalten	243
18.4	Die Optimierung eines isokratischen Chromatogramms mit vier Lösungsmitteln	245
18.5	Die Optimierung der übrigen Parameter	248
18.6	Gemischte stationäre Phasen	252
19	Analytische HPLC	255
19.1	Qualitative Analyse	255
19.2	Spurenanalyse	257
19.3	Quantitative Analyse	261
19.4	Wiederfindung	267
19.5	Peakhöhen- und Peakflächenmessung zur quantitativen Analyse	269
19.6	Integrationsfehler	272
19.7	Die Detektionswellenlänge	274
19.8	Gerätetest, Validierung und Systemeignungstest	276
19.9	Messunsicherheit	278
19.10	Derivatisierung	280
19.11	Unerwartete Peaks: Geister- und Systempeaks	283
20	Präparative HPLC	285
20.1	Problemstellung	285
20.2	Die Praxis der präparativen HPLC	286
20.3	Überladungseffekte	289
20.4	Proben sammeln	292

20.5	Rezyklieren	294
20.6	Verdrängungs-Chromatographie	294
21	Trennung von Enantiomeren	297
21.1	Problemstellung	297
21.2	Chirale mobile Phasen	299
21.3	Chirale flüssige stationäre Phasen	300
21.4	Chirale feste stationäre Phasen	301
21.5	Indirekte Enantiomerentrennung	307
22	Spezielle Möglichkeiten	309
22.1	Mikro- und Kapillar-HPLC	309
22.2	Schnelle und superschnelle HPLC	310
22.3	HPLC mit superkritischen mobilen Phasen	313
22.4	Elektrochromatographie	316
23	Anhang 1: Angewandte HPLC-Theorie	318
24	Anhang 2: Durchführung des Gerätetests	326
24.1	Allgemeines	326
24.2	Durchführung des Tests	327
24.3	Dokumentation, Grenzwerte und Toleranzen	331
25	Anhang 3: Ursachen und Behebung von Problemen in der HPLC	333
26	Anhang 4: Füllen von HPLC-Säulen	341
	Register der Stofftrennungen	345
	Sachwortregister	347

Vorwort

Das Manuskript zu diesem Buch entstand aus den Arbeitsunterlagen zu einem Weiterbildungskurs der Laboranten-Vereinigung Bern. Um den ganz verschiedenen Interessen der Teilnehmer zu entsprechen, waren die Kursunterlagen so zu gestalten, dass jedermann einen Gewinn daraus ziehen konnte. So legt diese Einführung in die Kunst leistungsfähiger flüssigchromatographischer Trennungen gleichen Wert auf Theorie und Praxis; das eine ist ohne das andere wenig sinnvoll. Die im Bild gezeigten Chromatogramme sollen verdeutlichen, welchen Nutzen die HPLC im eigenen Labor bringen kann. Ich hoffe, die Ausführungen seien so leicht verständlich, dass sie den unbelasteten Anfänger wie auch den Fortgeschrittenen zum Lesen und Nacharbeiten ermuntern.

An dieser Stelle danke ich allen irgendwie beteiligten Instituten der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bern für ihre Unterstützung, vorab dem Institut für organische Chemie und Herrn Professor Dr. H. Arm. Viel Hilfe fand ich bei zahlreichen Herstellerfirmen chromatographischer Geräte in Form von schriftlichen Unterlagen, Demonstrationen und persönlichen Diskussionen. Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Lektor M. Röthlisberger vom Verlag Sauerländer für die angenehme Zusammenarbeit.

Bern, im November 1978

Veronika R. Meyer

Vorwort zur neunten Auflage

Wie wir es mittlerweile mehr als gewohnt sind, sind Änderungen in allen Bereichen unseres Lebens eine Konstante geworden. Eine über zwanzig Jahre dauernde erfolgreiche Zusammenarbeit mit dem Verlag Sauerländer ist zu Ende gegangen. Ich danke hier nochmals diesem Verlag für die immer zuverlässige und sorgfältige Arbeit bei der Herausgabe der „Praxis der HPLC“. Nun hat das Buch ein frisches, ansprechendes Kleid erhalten, wobei der Inhalt, wie bei jeder Neuauflage, aktualisiert und verbessert wurde. Die Kapiteleinteilung ist gegenüber der achten Auflage unverändert geblieben, ganz neu sind nur die Abschnitte über die Haltbarkeit von mobilen Phasen, über Phasensysteme in der Ionenchromatographie und über Messunsicherheit. Einige Gleichungen in Abschnitt 0 haben jetzt andere Zahlenwerte, weil eine Porosität von 0,65 bei Umkehrphasen realistischer ist als der früher verwendete Wert von 0,8.

Ich danke Waltraud Wüst und Steffen Pauly vom Verlag Wiley-VCH für ihren Einsatz und die verständnisvolle Zusammenarbeit. Ihnen, liebe Leserin, lieber Leser, wünsche ich ein vertieftes Verständnis in Sachen HPLC und viel Erfolg bei der Anwendung.

St. Gallen, im Dezember 2003

Veronika R. Meyer

0

Wichtige und nützliche Gleichungen für die HPLC

Dies ist ein Kompendium. Die Gleichungen werden in den Kapiteln 2 und 8 erklärt.

Retentionsfaktor:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Trennfaktor, α -Wert:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Auflösung:

$$R = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_{\frac{1}{2}1} + w_{\frac{1}{2}2}}$$

Zahl der theoretischen Trennstufen:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{\frac{1}{2}}} \right)^2 = 2\pi \left(\frac{h_p \cdot t_R}{A_p} \right)^2$$

$$N \sim \frac{1}{d_p}$$

Höhe einer theoretischen Trennstufe:

$$H = \frac{L_c}{N}$$

Asymmetrie, Tailing:

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}} \quad \text{oder} \quad T = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

2 | 0 Wichtige und nützliche Gleichungen für die HPLC

Lineare Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase:

$$u = \frac{L_c}{t_0}$$

Porosität der Säulenpackung:

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{Säule}} - V_{\text{Füllmaterial}}}{V_{\text{Säule}}}$$

Lineare Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase wenn $\varepsilon = 0,65$ (chemisch gebundene Phase):

$$u[\text{mm/s}] = \frac{4F}{d_c^2 \cdot \pi \cdot \varepsilon} = 33 \frac{F[\text{ml/min}]}{d_c^2[\text{mm}^2]}$$

Totzeit, Durchbruchzeit wenn $\varepsilon = 0,65$:

$$t_0[\text{s}] = 0,03 \frac{d_c^2[\text{mm}^2] L_c[\text{mm}]}{F[\text{ml/min}]}$$

Reduzierte Trennstufenhöhe:

$$h = \frac{H}{d_p} = \frac{L_c}{N \cdot d_p}$$

Reduzierte Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase:

$$v = \frac{u \cdot d_p}{D_m} = 1,3 \cdot 10^{-2} \frac{d_p[\mu\text{m}] F[\text{ml/min}]}{\varepsilon \cdot D_m[\text{cm}^2/\text{min}] d_c^2[\text{mm}^2]}$$

Reduzierte Fließgeschwindigkeit in normaler Phase (Hexan, Probe mit kleiner molarer Masse, d. h. $D_m \approx 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{min}$) wenn $\varepsilon = 0,8$:

$$v_{\text{NP}} = 6,4 \frac{d_p[\mu\text{m}] F[\text{ml/min}]}{d_c^2[\text{mm}^2]}$$

Reduzierte Fließgeschwindigkeit in umgekehrter Phase (Wasser/Acetonitril, Probe mit kleiner molarer Masse, d. h. $D_m \approx 6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{min}$) wenn $\varepsilon = 0,65$:

$$v_{\text{RP}} = 33 \frac{d_p[\mu\text{m}] F[\text{ml/min}]}{d_c^2[\text{mm}^2]}$$

Beachte: Optimale Geschwindigkeit bei ca. $v = 3$; dann ist $h = 3$ bei sehr guter Säulenpackung (Probe mit kleiner molarer Masse, gute Stoffaustauschenschaften).

Reduzierter Strömungswiderstand wenn $\varepsilon = 0,65$:

$$\Phi = \frac{\Delta p \cdot d_p^2}{L_c \cdot \eta \cdot u} = 3,1 \frac{\Delta p[\text{bar}] d_p^2[\mu\text{m}^2] d_c^2[\text{mm}^2]}{L_c[\text{mm}] \eta[\text{mPas}] F[\text{ml/min}]}$$

Beachte: $\Phi = 500$ für sphärische Packung, bis 1000 für irreguläre Packung.

$$\Delta p \sim \frac{1}{d_p^2}$$

Gesamt-Analysenzeit:

$$t_{\text{tot}} = \frac{L_c \cdot d_p}{v \cdot D_m} (1 + k_{\text{last}})$$

Gesamt-Lösungsmittelverbrauch:

$$V_{\text{tot}} = \frac{1}{4} L_c \cdot d_c^2 \cdot \pi \cdot \varepsilon (1 + k_{\text{last}})$$

$$V_{\text{tot}} \sim d_c^2$$

A_p	Peakfläche
$a_{0,1}$	Breite der Peakvorderseite auf 10% der Höhe
$b_{0,1}$	Breite der Peakrückseite auf 10% der Höhe
d_c	Innendurchmesser der Säule
D_m	Diffusionskoeffizient der Probe in der mobilen Phase
d_p	Korndurchmesser der stationären Phase
F	Volumenstrom der mobilen Phase
f	Breite der Peakvorderseite auf 5% der Höhe
h_p	Peakhöhe
k_{last}	Retentionsfaktor des letzten Peaks
L_c	Säulenlänge
t_R	Retentionszeit
t_0	Totzeit, Durchbruchzeit
V	Volumen
w	Peakbreite
$w_{\frac{1}{2}}$	Peakbreite in halber Höhe
$w_{0,05}$	Peakbreite in 5% der Höhe
η	Viskosität der mobilen Phase
Δp	Druckverlust

1 Einleitung

1.1

HPLC: Eine leistungsfähige Trennmethode

Eine leistungsfähige Trennmethode muss in der Lage sein, Mischungen mit einer großen Anzahl von ähnlichen Analyten aufzulösen. Abbildung 1.1 zeigt ein Beispiel. Acht Benzodiazepine können in 70 Sekunden getrennt werden.

Ein derartiges Chromatogramm liefert unmittelbar qualitative und quantitative Information: Die Elutionszeit (Zeit, nach welcher das Signal auf dem Schreiber oder Bildschirm erscheint) ist bei den gewählten Bedingungen für jeden Stoff des Gemisches charakteristisch; und sowohl Fläche als auch Höhe jedes Signals ist zur Menge des entsprechenden Stoffes proportional.

Wir sehen an diesem Beispiel, dass diese Chromatographie-Methode sehr leistungsfähig ist, das heißt, sie liefert gute Trennungen in kurzer Zeit. HPLC ist die Abkürzung für

High Performance Liquid Chromatography
Hoch-Leistungs-Flüssig-Chromatographie

A. J. P. Martin und R. L. M. Syngé, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358.

Schon die „Erfinder“ der modernen Chromatographie, *Martin* und *Syngé*, zeigten 1941 mit theoretischen Überlegungen, dass für eine wirksame Chromatographie in flüssiger Phase

- *sehr kleine Teilchen* für die stationäre Phase und dementsprechend
- *hoher Druck* zum Durchpressen der mobilen Phase

notwendig sind. HPLC heißt deshalb auch

High Pressure Liquid Chromatography
Hoch-Druck-Flüssig-Chromatographie

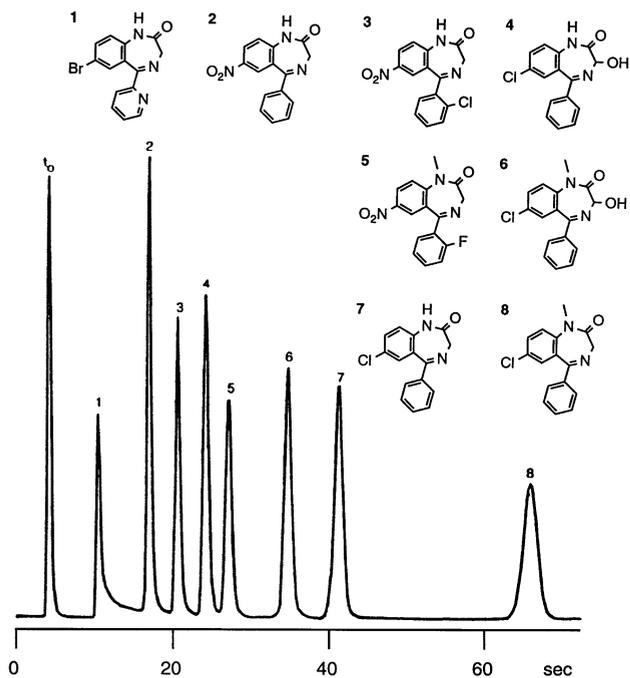


Abb. 1.1 HPLC-Trennung von Benzodiazepinen (nach T. Welsch, G. Mayr und N. Lammers, InCom-Sonderband Chromatography, Düsseldorf 1997, S. 357)
 Probe: je 40 ng; Säule: 4,6 mm × 3 cm; stationäre Phase: ChromSphere UOP C18 1,5 µm (unporös); mobile Phase: 3,5 ml/min Wasser/Acetonitril 85:15; Temperatur: 35°C; Detektor: UV 254 nm; 1) Bromazepam; 2) Nitrazepam; 3) Clonazepam; 4) Oxazepam; 5) Flunitrazepam; 6) Hydroxydiazepam (Temazepam); 7) Desmethyldiazepam; 8) Diazepam (Valium)

1.2

Ein erstes HPLC-Experiment

Obwohl die Bestimmung von Coffein in Kaffee ein einfaches Anfänger-Experiment darstellt, ist es empfehlenswert, sich von einer Person mit Erfahrung auf dem zur Verfügung stehenden Gerät helfen zu lassen.

Am bequemsten ist es, wenn ein HPLC-System mit zwei Lösungsmittel-Vorratsflaschen benützt werden kann. Verwenden Sie Wasser und Acetonitril; beide Eluenten müssen filtriert (Porenweite < 1 µm) und entgast werden. Spülen Sie die Apparatur mit reinem Acetonitril. Schließen Sie eine so genannte Umkehrphasen-Säule (ODS oder C18, ebenso gut auch eine C8-Säule) in der korrekten Flussrichtung (falls angegeben) an und spülen Sie sie während etwa 10 Minuten mit Acetonitril. Die günstige Flussrate hängt vom Innendurchmesser der Säule ab: 1–2 ml/min bei 4,6 mm, 0,5–1 ml/min bei 3

mm und 0,3–0,5 ml/min bei 2 mm. Dann ändern Sie die Zusammensetzung der mobilen Phase auf Wasser/Acetonitril 8:2 und spülen Sie nochmals während 10–20 Minuten. Der UV-Detektor wird auf 272 nm eingestellt (aber 254 nm ist auch möglich). Brauen Sie einen Kaffee (aber nicht etwa einen coffeinfreien!) und nehmen Sie davon eine kleine Probe, bevor Sie Milch, Zucker oder Süßstoff zufügen und filtrieren Sie diese ($< 1 \mu\text{m}$). Man kann auch Schwarztee (ebenfalls ohne Zusätze) oder ein Colagetränk mit Coffein (vorzugsweise zuckerfrei) einsetzen. Diese Getränke müssen ebenfalls filtriert werden. Injizieren Sie 10 μl Probe. Ein Chromatogramm ähnlich demjenigen von Abbildung 1.2 wird erscheinen. Das letzte grosse Signal ist üblicherweise der Coffeinpeak. Falls er zu hoch ist, so müssen Sie weniger einspritzen und umgekehrt; die Abschwächung (Attenuation, Range) des Detektors kann ebenfalls angepasst werden. Es ist empfehlenswert, ein Probenvolumen zu wählen, das einen Coffeinpeak ergibt, der nicht höher als Extinktion 1 (absorption unit, AU) wird; dieser Wert wird am Detektor angezeigt. Falls der Peak spät erscheint, beispielsweise erst nach 10 Minuten, so muss der Acetonitrilgehalt in der mobilen Phase erhöht werden (man versuche Wasser/Acetonitril 6:4). Wird er früh und mit schlechter Auflösung zum ersten Peakhaufen eluiert, so verringert man den Acetonitrilgehalt (beispielsweise auf 9:1).

Der Coffeinpeak kann integriert werden, was eine quantitative Gehaltsbestimmung Ihres Getränks ermöglicht. Stellen Sie mehrere Kalibrierlösungen von Coffein in der mobilen Phase her, etwa im Bereich von 0,1 bis 1 mg/ml, und injizieren Sie diese. Für die quantitative Analyse können sowohl Peakflächen wie auch Peakhöhen ausgewertet werden. Die Kalibrierkurve sollte linear sein und durch den Ursprung verlaufen. Der Coffeingehalt im Getränk kann sehr unterschiedlich sein und der in der Abbildung genannte Wert von 0,53 mg/ml spiegelt nur den Geschmack der Autorin wider.

Nach Beendigung dieser Analysen spüle man die Säule wieder mit reinem Acetonitril.

1.3

Die flüssigchromatographischen Trennverfahren

Adsorptions-Chromatographie

Das Prinzip ist aus der klassischen Säulenchromatographie oder Dünnschichtchromatographie bekannt: Als stationäre Phase dient ein relativ polares Material mit hoher spezifischer Oberfläche, meistens Silicagel (Kieselgel), aber auch Aluminiumoxid oder Magnesiumoxid. Die mobile Phase ist relativ apolar (Pentan bis Tetrahydrofuran). Die Trennung erfolgt durch unterschiedliche Adsorption der

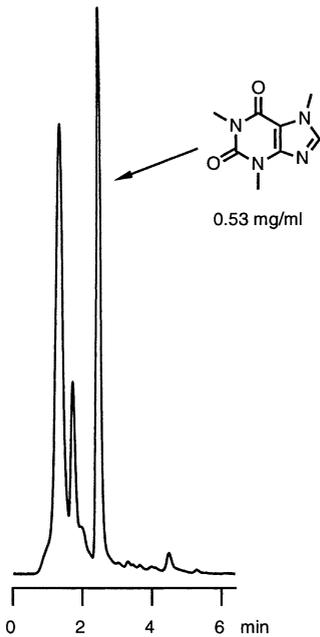


Abb. 1.2 HPLC-Trennung von Kaffee
 Säule: 2 mm × 15 cm; stationäre Phase:
 YMC 120 ODS-AQ 3µm; mobile Phase: 0,3
 ml/min Wasser/Acetonitril 8:2; Detektor: UV
 272 nm

verschiedenen Molekülsorten im Gemisch an der stationären Phase. Ein apolares Lösungsmittel (z. B. Hexan) eluiert langsamer als ein stärker polares (z. B. Ether): Faustregel: Polare Stoffe werden später eluiert als apolare.

(Gedächtnisstütze: polar heißt wasserlöslich, hydrophil; apolar heißt fettlöslich, lipophil.)

Umkehrphasen-Chromatographie

Reversed-phase-Chromatographie

Es gilt das Umgekehrte des oben Gesagten:

Die stationäre Phase ist sehr apolar. Die mobile Phase ist relativ polar (Wasser bis Tetrahydrofuran). Ein polares Lösungsmittel (z. B. Wasser) eluiert langsamer als ein weniger polares (z. B. Acetonitril). Faustregel: Apolare Stoffe werden später eluiert als polare.

Chromatographie an chemisch gebundenen Phasen

Die stationäre Phase ist durch eine chemische Reaktion kovalent an das Trägermaterial gebunden. Durch geeignete Wahl der Reaktionspartner lässt sich eine Vielzahl von stationären Phasen herstellen. Die oben erwähnte Umkehrphasen-Chromatographie ist der wichtig-

ste Spezialfall der Chromatographie an chemisch gebundenen Phasen.

Ionenaustausch-Chromatographie

Die stationäre Phase enthält ionische Gruppen (z. B. —NR_3^+ oder —SO_3^-), welche mit ionischen Gruppen der Probemoleküle in Wechselwirkung treten. Die Methode ist z. B. zur Trennung von Aminosäuren, Stoffwechselprodukten und organischen Ionen geeignet.

Ionenpaar-Chromatographie

Die Ionenpaar-Chromatographie eignet sich ebenfalls für die Trennung von ionischen Substanzen, eliminiert aber gewisse Probleme, die bei der Ionenaustausch-Chromatographie auftreten können. Die ionischen Probemoleküle werden durch ein geeignetes Gegenion „maskiert“. Die Hauptvorteile sind: man benötigt keine Ionenaustauscher, sondern die weit verbreiteten Umkehrphasensysteme; gleichzeitige Analyse von Säuren, Basen und Neutralstoffen ist möglich.

Ionenchromatographie

Für die Trennung von Ionen starker Säuren und Basen (z. B. Cl^- , NO_3^- , Na^+ , K^+) wurde die Ionenchromatographie entwickelt. Sie ist ein Spezialfall der Ionenaustausch-Chromatographie, von der sie sich aber durch apparative Besonderheiten unterscheidet.

Ausschluss-Chromatographie (Gelchromatographie)

Man unterteilt sie in Gel-Permeations-Chromatographie (mit organischen Lösungsmitteln) und Gel-Filtrations-Chromatographie (mit wässrigen Lösungen).

Die Ausschluss-Chromatographie trennt die Probemoleküle nach Molekülgröße, d. h. nach Molekülmasse. Die größten Moleküle werden am schnellsten eluiert, die kleinsten am langsamsten. Sie ist die elegante Methode der Wahl, wenn sich in einer Mischung Stoffe befinden, die sich in ihren Molekülmassen mindestens um 10% unterscheiden.

Affinitäts-Chromatographie

Hier ist eine hochspezifische biochemische Wechselwirkung die Ursache der Trennung. Die stationäre Phase enthält ganz bestimmte Molekülgruppen, welche nur dann eine Probe adsorbieren können, wenn gewisse räumliche (sterische) und ladungsmäßige Voraussetzungen erfüllt sind (vgl. die Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper). Mit der Affinitäts-Chromatographie lassen sich Proteine (Enzyme wie auch Strukturproteine), Lipide etc. ohne großen Aufwand aus komplexen Mischungen isolieren.

1.4 Die HPLC-Apparatur

Eine HPLC-Apparatur kann modular zusammengestellt sein, d. h. aus einzelnen Instrumenten bestehen oder als Kompaktgerät gebaut sein. Beim modularen Konzept ist man flexibler, wenn ein Bestandteil ausfällt, und die einzelnen Geräte müssen nicht alle vom gleichen Hersteller stammen. Wer aber nicht gerne selbst kleinere Reparaturen ausführt, ist mit einer Kompaktanlage besser bedient. Sie ist nicht platz sparer als eine modular aufgebaute Apparatur.

Ein HPLC-Instrument besteht mindestens aus den Teilen, die in Abbildung 1.3 gezeigt sind: Vorrat an mobiler Phase, Zuleitung mit Fritte, Hochdruckpumpe, Probenaufgabesystem, Säule, Detektor sowie Datenerfassung, in den meisten Fällen kombiniert mit Datenverarbeitung. Die Säule ist zwar das wichtigste Element, üblicherweise aber auch das kleinste. Für temperaturkontrollierte Trennungen steckt sie in einem Thermostaten. Oft arbeitet man mit mehreren Lösungsmitteln, sodass noch Mischung und Steuerung notwendig sind. Geschieht die Datenerfassung mit einem Computer, so kann dieser auch die Kontrolle der ganzen Apparatur übernehmen.

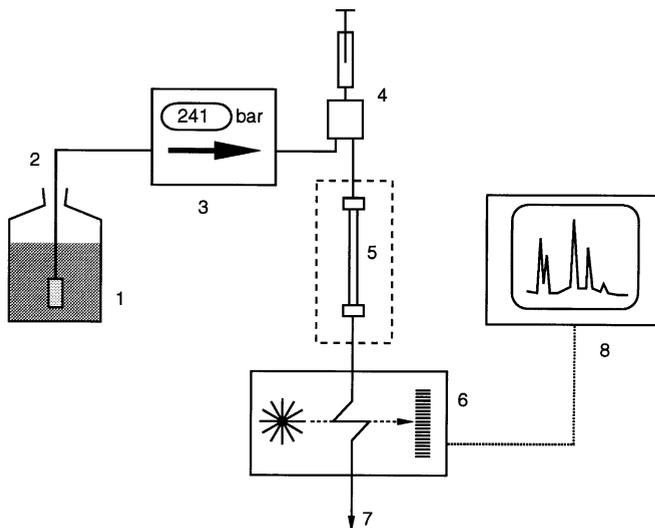


Abb. 1.3 Schema einer HPLC-Apparatur
 1) Lösungsmittelvorrat, 2) Zuleitung mit Fritte, 3) Pumpe (mit Digitalanzeige des Drucks), 4) Probenaufgabe, 5) Säule, eventuell thermostatisiert, 6) Detektor, 7) Abfall, 8) Datenerfassung und -verarbeitung

1.5

Sicherheit am HPLC-Arbeitsplatz

Beim Arbeiten mit HPLC sind drei Gesundheitsrisiken zu beachten:

- Giftige Lösungsmittel
- Lungengängige stationäre Phasen
- Gefahren durch die Verwendung hoher Drucke.

Die kurz- und langfristigen Risiken durch Lösungsmittel und Dämpfe sind allgemein bekannt, doch werden sie meist zuwenig beachtet. Zur guten Arbeitspraxis gehört das Verschließen der Vorrats- und Abfallflaschen mit gelochten Plastikklappen. Das Loch ist so klein, dass nur der als Zu- oder Ableitung dienende Teflonschlauch Platz findet. So können keine gesundheitsgefährdenden Dämpfe in die Laborluft gelangen (und die hochreinen Lösungsmittel sind vor Staub geschützt). Lösungsmittel sollen nur im gut ziehenden Abzug umgefüllt werden.

Wenig bekannt und entsprechend unbeachtet ist die Tatsache, dass Teilchen der Korngröße $5\ \mu\text{m}$ und kleiner, wie sie in der HPLC verwendet werden, lungengängig sind (sie werden in den Bronchien nicht zurückgehalten und geraten in die Lunge). Wie groß ein eventuelles langfristiges Gesundheitsrisiko durch diese Art Fremdkörper ist, ist noch kaum bekannt. Vorsichtshalber sind alle Arbeiten, bei denen stationäre Phasen als Staub entweichen können (Öffnen von Vorratsfläschchen, Abwägen etc.) im Abzug durchzuführen.

Das Risiko durch den Betrieb von Hochdruckpumpen ist nicht sehr groß. Im Gegensatz zu Gasen sind Flüssigkeiten nur wenig kompressibel: ca. 1 Volumenprozent pro 100 bar. Auch unter hohem Druck haben daher Flüssigkeiten kaum Energie gespeichert. Bei einem Leck an einem Apparateteil tritt ein scharfer Flüssigkeitsstrahl aus, aber eine Explosion ist nicht zu befürchten. Immerhin kann dieser Flüssigkeitsstrahl Personen ernsthaft gefährden. In einer zum Entleeren geöffneten Säule, welche unter Druck steht, darf nicht gestochert werden! Die Beschreibung eines so provozierten Unfalls ist zur Lektüre dringend empfohlen.

G. Guiochon, J. Chromatogr. 189 (1980) 108.

1.6

Vergleich von Hochleistungs-Flüssigchromatographie und Gaschromatographie

GC ist ebenso wie HPLC eine Hochleistungs-Chromatographie. Der wichtigste Unterschied besteht jedoch darin, dass für die GC nur Stoffe infrage kommen, die flüchtig sind oder sich bei höheren Temperaturen unzersetzt verdampfen lassen oder von denen man flüchtige Derivate reproduzierbar herstellen kann. Nur etwa 20% der be-

kannten organischen Verbindungen lassen sich ohne Vorbehandlung gaschromatographisch analysieren.

Für die Flüssigchromatographie ist Bedingung, dass sich die Probe in irgend einem Lösungsmittel löst. Außer bei vernetzten hochmolekularen Stoffen trifft dies für alle organischen und die ionischen anorganischen Stoffe zu.

Anforderung	GC	HPLC
schwierige Trennungen	möglich	möglich
Raschheit	ja	ja
Automatisierung	möglich	möglich
Anpassung des Systems an das Trennproblem	durch Änderung der stationären Phase	durch Änderung von stationärer <i>und</i> mobiler Phase
Anwendung begrenzt durch	fehlende Flüchtigkeit thermische Zersetzung	Unlöslichkeit

Typische Trennstufenzahlen:	pro Säule	pro Meter
– GC mit gepackten Säulen	2000	1000
– GC mit Kapillarsäulen	50000	3000
– klassische Flüssigchromatographie	100	200
– HPLC	5000	50000

In Theorie und Praxis sind zur Gaschromatographie drei wichtige Unterschiede festzustellen:

1. Der Diffusionskoeffizient der Probe in der mobilen Phase ist in der HPLC bedeutend kleiner als in der GC. Dies ist ein Nachteil, weil der Diffusionskoeffizient der wichtigste Faktor ist, welcher die Analysengeschwindigkeit bestimmt.
2. Die Viskosität der mobilen Phase ist in der HPLC größer als in der GC. Dies ist ein Nachteil, weil hohe Viskosität kleine Diffusionskoeffizienten und hohen Strömungswiderstand der fließenden mobilen Phase zur Folge hat.
3. Die Kompressibilität der mobilen Phase unter Druck ist in der HPLC im Gegensatz zur GC vernachlässigbar gering. Dies ist ein Vorteil, weil dadurch die Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase über die ganze Länge der Säule konstant ist, sodass bei geeigneter Geschwindigkeit überall optimale chromatographische Verhältnisse vorliegen.

1.7**Druckeinheiten**

1 bar = 0,987 atm = 1,02 at = 10^5 Pa (Pascal) = 14,5 psi

1 MPa = 10 bar (Mega-Pascal, SI-Einheit)

1 atm = 1,013 bar (physikalische Atmosphäre)

1 at = 0,981 bar (technische Atmosphäre, 1 kp/cm²)

1 psi = 0,0689 bar (pound per square inch)

Faustregel: **1000 psi** \approx **70 bar** 100 bar = 1450 psi

Man beachte den Unterschied zwischen psia = psi absolut und psig = psi gauge (Manometer), womit psi Überdruck gemeint ist.

1.8**Längeneinheiten**

In der HPLC ist man oft mit englischen Einheiten konfrontiert, wenn es um Durchmesser von Röhren oder Kapillaren geht. Einheit ist der Zoll oder inch (Mehrzahl inches), abgekürzt " oder i geschrieben. Kleinere Einheiten sind nicht Zehntelzoll, sondern $\frac{1}{2}$ ", $\frac{1}{4}$ ", $\frac{1}{8}$ ", $\frac{1}{16}$ " oder Vielfache davon.

$$1'' = 25,40 \text{ mm} \quad \frac{3}{8}'' = 9,525 \text{ mm} \quad \frac{3}{16}'' = 4,76 \text{ mm}$$

$$\frac{1}{2}'' = 12,70 \text{ mm} \quad \frac{1}{4}'' = 6,35 \text{ mm} \quad \frac{1}{8}'' = 3,175 \text{ mm}$$

$$\frac{1}{16}'' = 1,59 \text{ mm}$$

1.9**Wissenschaftliche Zeitschriften**

Journal of Chromatography A (alle Gebiete der Chromatographie)

ISSN 0021-9673

Journal of Chromatography B (Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences)

ISSN 1570-0232

Bis zu Band 651 (1993) war dies eine einzige Zeitschrift, von welcher einzelne Bände den biomedizinischen Anwendungen gewidmet waren. Nachher wurde die Zeitschrift geteilt, sodass nun getrennte Bände mit gleicher Nummer, aber nicht gleichem Buchstaben erscheinen (beispielsweise 652 A und 652 B).

- Elsevier Science, P.O. Box 211, NL-1000 AE Amsterdam, Niederlande
 Journal of Chromatographic Science
 ISSN 0021-9665
 Preston Publications, 6600 W Touhy Avenue, Niles, IL 60714-4588, USA
- Chromatographia
 ISSN 0009-5893
 Vieweg Publishing, Postfach 5829, D-65048 Wiesbaden, Deutschland
- Journal of Separation Science (früher Journal of High Resolution Chromatography)
 ISSN 1615-9306
 Wiley-VCH, Postfach 101161, D-69451 Weinheim, Deutschland
- Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies
 ISSN 1082-6076
 Marcel Dekker, 270 Madison Avenue, New York, NY 10016-0602, USA
- LC GC Europe (in Europa gratis, früher LC GC International)
 ISSN 1471-6577
 Advanstar Communications, Advanstar House, Park West, Sealand Road, Chester CH1 4RN, England
- LC GC North America (in den USA gratis, früher LC GC Magazine)
 ISSN 0888-9090
 Advanstar Communications, 859 Willamette Street, Eugene, OR 97401, USA
- LC GC Asia Pacific (im asiatischen und pazifischen Raum gratis)
 Advanstar Communications, 101 Pacific Plaza, 1/F, 410 Des Voeux Road West, Hong Kong, People's Republic of China
- Das Journal of Microcolumn Separations (Wiley, ISSN 1040-7685) erschien bis zur Ausgabe 8/13 (2001).
- Biomedical Chromatography
 ISSN 0269-3879
 John Wiley & Sons, 1 Oldlands Way, Bognor Regis, West Sussex PO22 9SA, England
- International Journal of Bio-Chromatography
 ISSN 1068-0659
 Gordon and Breach, P.O. Box 32160, Newark, NJ 07102, USA
- Separation Science and Technology
 ISSN 0149-6395
 Marcel Dekker, 270 Madison Avenue, New York, NY 10016-0602, USA
- Chromatography Abstracts
 ISSN 0268-6287
 Elsevier Science, P.O. Box 211, NL-1000 AE Amsterdam, Niederlande

1.10**Empfehlenswerte Bücher**

John W. Dolan und Lloyd R. Snyder

Troubleshooting LC Systems
Aster, Chester 1989

Norman Dyson

Chromatographic Integration Methods
Royal Society of Chemistry, London, 2nd. ed. 1998

Werner Funk, Vera Dammann und Gerhild Donnevert

Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie
VCH, Weinheim 1992

Stavros Kromidas

HPLC-Tips, Die schnelle Hilfe für jeden Anwender
Hoppenstedt, Darmstadt 1997

Veronika R. Meyer

Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern
Wiley-VCH, Weinheim, 2. Auflage 1999

Uwe D. Neue

HPLC Columns – Theory, Technology, and Practice
Wiley-VCH, New York 1997

Paul C. Sadek

Troubleshooting HPLC Systems
Wiley, New York 2000

Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland und Joseph L. Glajch

Practical HPLC Method Development
Wiley-Interscience, New York, 2nd edition 1997

Chromatographie allgemein:

Colin F. Poole

The Essence of Chromatography
Elsevier, Amsterdam 2002

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Der chromatographische Prozess

Definition:

Chromatographie ist ein Trennprozess, bei welchem das Probegemisch zwischen zwei Phasen im chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird. Eine Hilfsphase ruht, die andere Hilfsphase strömt daran im chromatographischen Bett vorbei.

Ruhende Hilfsphase = *stationäre Phase*: zur „Adsorption“ (im weitesten Sinn) fähiges Material in der Form von festen Teilchen, behandelten Oberflächen oder flüssigkeitsbelegten Trägern. Strömende Hilfsphase = *mobile Phase*: Gas oder Flüssigkeit.

Verwendet man ein Gas, so spricht man von Gaschromatographie; bei allen Arten von Flüssigchromatographie (inkl. Dünnschicht-Chromatographie) ist die mobile Phase flüssig.

Experiment:

Trennung von Testfarbstoffen

Man fülle eine „klassische“ Chromatographiesäule mit Hahn (oder ein unten verjüngtes Glasrohr von ca. 2 cm Durchmesser mit Schlauchquetschhahn) etwa 20 cm hoch mit einer Suspension von Silicagel in Toluol. Nach dem Absetzen der Füllung bringe man mit einer Mikroliterspritze 50 bis 100 µl Farbstofflösung (z. B. Testfarbstoff-Gemisch II N der Firma Camag, Muttenz/Schweiz) auf das Bett und eluiere mit Toluol.

Beobachtung:

Die verschiedenen Farbstoffe wandern verschieden schnell durch die Säule. Das Auftrennen in sechs Zonen ist die Folge: Fettrot 7B, Sudan gelb, Sudanschwarz (2 Komponenten), Fettorange und Artisilblau 2 RP. Stoffe, die sich bevorzugt in der mobilen Phase aufhalten, wandern rascher als Stoffe, die sich bevorzugt in der stationären Phase aufhalten.

Als Maß für die Tendenz, sich bevorzugt in der einen oder der anderen Phase aufzuhalten, dient der *Verteilungskoeffizient* K :

$$K_X = \frac{c_{\text{stat}}}{c_{\text{mob}}}$$

c_{stat} : Konzentration (eigentlich Aktivität) des Stoffes X in der stationären Phase

c_{mob} : Konzentration des Stoffes X in der mobilen Phase

oder der *Retentionsfaktor* k (früher *Kapazitätsfaktor* k'):

$$k_X = \frac{n_{\text{stat}}}{n_{\text{mob}}}$$

n_{stat} : Anzahl Mole des Stoffes X in der stationären Phase bei Gleichgewicht

n_{mob} : Anzahl Mole des Stoffes X in der mobilen Phase bei Gleichgewicht

Stationäre und mobile Phase müssen natürlich in innigem Kontakt miteinander stehen, damit sich ein Verteilungsgleichgewicht einstellen kann.

Damit sich ein Stoffgemisch trennt, müssen die verschiedenen Komponenten im betreffenden chromatographischen System verschiedene Verteilungskoeffizienten und daher auch verschiedene Retentionsfaktoren haben.

Bildliche Darstellung der Trennung:

- a) Eine Mischung aus zwei Komponenten \blacktriangle und \bullet wird auf das chromatographische Bett aufgegeben.
- b) Die \blacktriangle halten sich bevorzugt in der stationären Phase auf, die \bullet bevorzugt in der mobilen Phase. Hier ist

$$k_{\blacktriangle} = \frac{5}{2} = 2,5 \text{ und } k_{\bullet} = \frac{2}{5} = 0,4.$$

- c) Wenn frisches Fließmittel nachströmt, so stellt sich ein neues Gleichgewicht ein: Probemoleküle, die sich in der mobilen Phase befanden, werden von der „nackten“ Oberfläche der stationären Phase gemäß ihrem Verteilungskoeffizienten zum Teil adsorbiert, während vorher adsorbierte Moleküle wieder in die mobile Phase übertreten.
- d) Nach oftmaliger Wiederholung dieses Vorgangs sind die beiden Komponenten getrennt. Die \bullet bevorzugen die mobile Phase und wandern schneller als die \blacktriangle , welche mehr an der stationären Phase „kleben“.

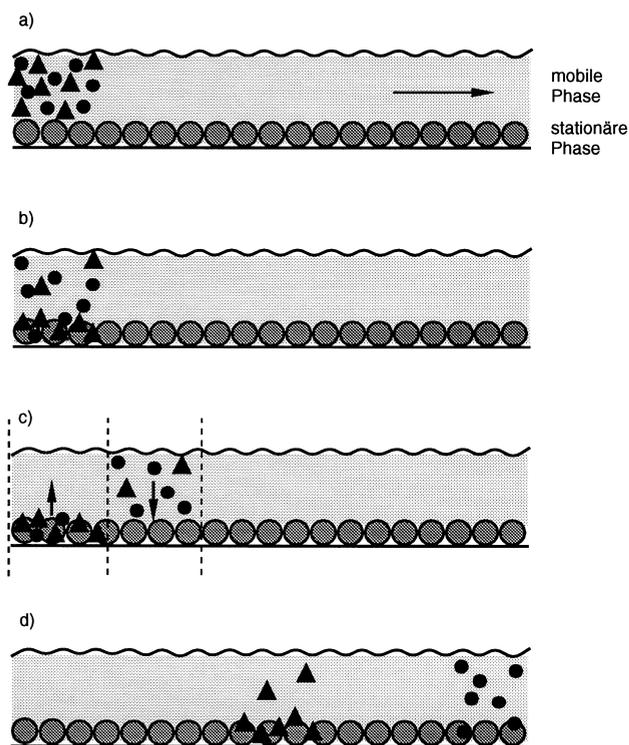


Abb. 2.1 Verlauf einer chromatographischen Trennung

Wie wir aus den Zeichnungen erkennen, stellt sich das Gleichgewicht in diesem Fall auf einer Strecke, die etwa $3\frac{1}{2}$ Körnerdurchmessern der stationären Phase entspricht, neu ein. Diese Distanz stellt also eine *theoretische Trennstufe*, einen „Boden“ dar. Je länger das chromatographische Bett ist, desto mehr Trennstufen sind darin enthalten und desto besser wird die Trennung eines Gemisches.

Dieser Effekt wird durch die *Bandenverbreiterung* zum Teil kompensiert. Wie wir im Experiment sehen, werden die Substanzzonen immer breiter, je größer die zurückgelegte Strecke in der Säule und je länger die Verweilzeit darin ist.

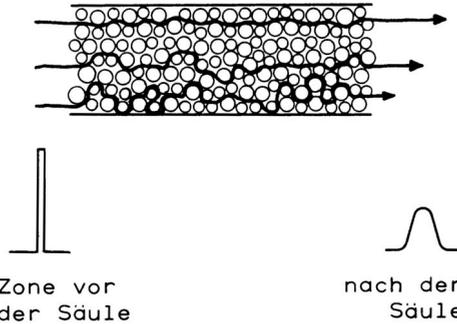
2.2

Bandenverbreiterung

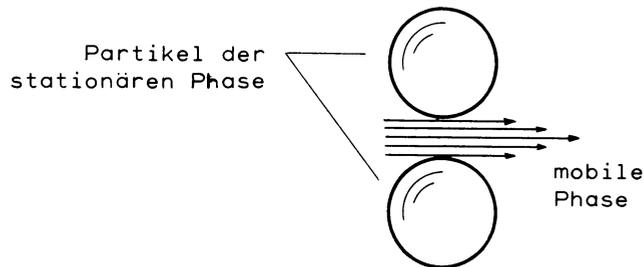
Die Bandenverbreiterung hat mehrere Ursachen, die man kennen muss, um eine Säule mit möglichst geringer Bandenverbreiterung, d.h. mit hoher Trennstufenzahl herstellen zu können.

1. Ursache: Eddy-Diffusion

(Streudiffusion, Wirbeldiffusion)

**Abb. 2.2** Eddy-Diffusion in der Chromatographiesäule

Die Trennsäule ist mit kleinen Teilchen der stationären Phase gefüllt. Die mobile Phase strömt daran vorbei und transportiert die Probemoleküle. Gewisse Moleküle haben „Glück“ und kommen vor den meisten anderen wieder aus der Säule, weil sie im chromatographischen Bett zufälligerweise einen ziemlich gradlinigen Weg zurücklegten. Andere Probemoleküle geraten auf mehr oder weniger großen Umwegen an das Säulenende und werden etwas später eluiert.

2. Ursache: Strömungsverteilung**Abb. 2.3** Strömungsverteilung im chromatographischen Bett

Die mobile Phase fließt laminar zwischen den Körnern der stationären Phase durch. In der Mitte eines „Kanals“ ist die Strömung schneller als in der Nähe eines Kornes. Die Pfeile in der Abbildung 2.3 bedeuten Geschwindigkeitsvektoren der mobilen Phase (je länger ein Pfeil, desto größer die lokale Strömungsgeschwindigkeit). Eddy-Diffusion und Strömungsverteilung können verringert werden, indem man die Säule mit Teilchen von einheitlicher Größe füllt.

1. Regel für gute Säulen: Das Füllmaterial soll eine möglichst enge Korngrößenverteilung aufweisen.

Das Verhältnis des größten vorkommenden Korns zum kleinsten soll nicht größer als 2 sein, besser ist 1,5 (Beispiel: Kleinstes Korn 5 μm , größtes Korn 7,5 μm .)

Die Bandenverbreiterung, welche durch Eddy-Diffusion und Strömungsverteilung bewirkt wird, ist von der Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase wenig abhängig.

3. Ursache: Diffusion der Probemoleküle in der mobilen Phase

Die Probemoleküle breiten sich im Lösungsmittel ohne äußeres Zutun aus (so wie sich ein Stück Zucker in Wasser langsam auflöst, auch wenn man nicht rührt). Diese Längsdiffusion (Abbildung 2.4) wirkt sich nur dann nachteilig auf die Trennstufenhöhe aus, wenn:

- kleine Teilchen der stationären Phase,
- darauf bezogen eine zu kleine Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase
- und ein relativ großer Diffusionskoeffizient der Probe

gleichzeitig in unserem chromatographischen System auftreten.

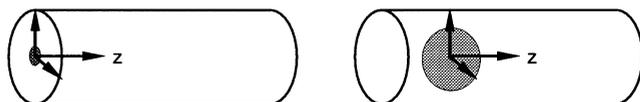


Abb. 2.4 Bandenverbreiterung durch Längsdiffusion

Links: Probenzone unmittelbar nach Injektion. Sie wird sich in alle Raumachsen (Pfeilrichtungen) ausbreiten. Rechts: Probenzone zu einem späteren Zeitpunkt. Sie hat sich durch Diffusion vergrößert und ist zugleich von der strömenden mobilen Phase transportiert worden.

2. Regel: Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase so groß wählen, dass die Längsdiffusion nicht störend wirkt.

Dies ist dann der Fall, wenn $u > \frac{2 D_m}{d_p}$

u : Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase

D_m : Diffusionskoeffizient der Probe in der mobilen Phase

d_p : Partikeldurchmesser

Für eine weitere Diskussion siehe Abschnitt 8.5.

4. Ursache: Stoffaustausch zwischen mobiler, „stagnierender mobiler“ und stationärer Phase.

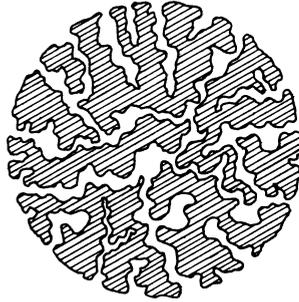


Abb. 2.5 Poren der stationären Phase

Abbildung 2.5 zeigt die Porenstruktur eines Teilchens der stationären Phase: es hat enge und weite Kanäle, einige gehen durch das ganze Teilchen hindurch und andere sind geschlossen. Die Poren sind mit mobiler Phase gefüllt, die sich nicht bewegt (sie stagniert). Ein Probemolekül, welches in eine Pore gerät, wird nicht mehr durch strömendes Lösungsmittel weitertransportiert, sondern verändert seine Position nur noch durch Diffusion. Es hat jetzt zwei Möglichkeiten:

- Das Molekül diffundiert zurück zur strömenden mobilen Phase. Dieser Vorgang braucht Zeit; währenddessen sind Moleküle, die nicht in einer Pore stecken bleiben, ein Stück weiter geschwemmt worden.

Die resultierende Bandenverbreiterung ist umso geringer, je kürzer die Poren sind, d. h. je kleiner das Partikel der stationären Phase ist. Zudem ist die Diffusionsgeschwindigkeit der Probemoleküle in einem Lösungsmittel mit kleiner Viskosität größer (d. h. sie diffundieren schneller in die Pore hinein und wieder heraus) als in einem höher viskosen Lösungsmittel.

- Das Molekül tritt mit der eigentlichen stationären Phase (Adsorbens oder Flüssigkeitsfilm) in Wechselwirkung (Adsorption). Es bleibt eine Zeitlang an der stationären Phase „kleben“ und verlässt sie dann wieder. Auch dieser Stoffaustausch braucht eine gewisse Zeit (Abbildung 2.6).

In beiden Fällen nimmt die Bandenverbreiterung mit steigender Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase zu: Die Probemoleküle, welche sich im strömenden Lösungsmittel aufhalten, wandern den stagnierenden (in den Poren befindlichen) Molekülen umso weiter davon, je schneller das Lösungsmittel fließt. (Dafür werden die Proben schneller eluiert!)

3. Regel: Für die stationäre Phase kleine Teilchen verwenden.

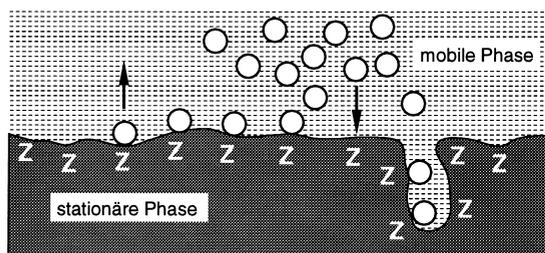


Abb. 2.6 Stofftransport zwischen mobiler und stationärer Phase
Die stationäre Phase hat „adsorptive“ Zentren Z (in einem breiten Sinn), welche die in der Nähe befindlichen Moleküle anziehen. Die Moleküle adsorbieren an die Zentren (mitte) und desorbieren wieder (links). Zentren, welche sich in Poren befinden, sind nicht so gut zugänglich und der Stofftransport ist dort langsamer (rechts).

4. Regel: Lösungsmittel mit kleiner Viskosität verwenden.

5. Regel: Hohe Analysengeschwindigkeit geht auf Kosten der Auflösung und umgekehrt! Allerdings ist dieser Effekt bei kleinen Teilchen viel weniger stark als bei großen.

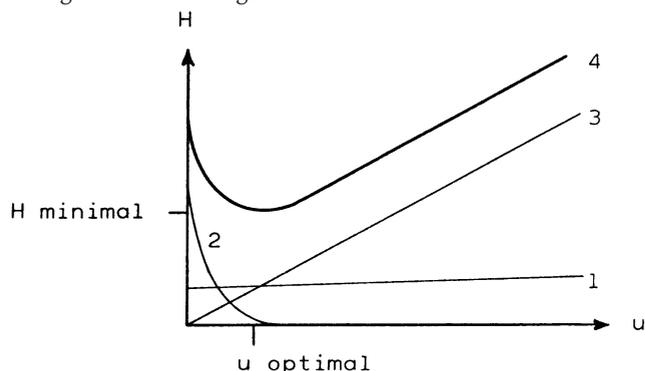


Abb. 2.7 Die van Deemter-Kurve

1) ist der Anteil von Eddy-Diffusion und Strömungsverteilung an der Bandenverbreiterung; 2) ist der Anteil der Längsdiffusion. Man sollte mit Fließgeschwindigkeiten arbeiten, wo diese Diffusion keine Rolle spielt; 3) ist der Anteil der Stoffaustauschphänomene. Die Steigung dieser Linie ist bei $50\ \mu\text{m}$ -Teilchen größer als bei $5\ \mu\text{m}$ -Teilchen; 4) ist die resultierende Kurve $H(u)$, van Deemter-Kurve genannt.

Die Trennstufenhöhe H lässt sich in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit u der mobilen Phase graphisch darstellen (Abbildung 2.7). Es existiert eine optimale Fließgeschwindigkeit u_{opt} , bei der die Trennstufenhöhe minimal ist. u_{opt} ist probenabhängig. Die $H(u)$ -Kurve heißt auch van Deemter-Kurve.

J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg und A. Klinkenberg, *Chem. Engng. Sci.* 5 (1956) 271.

2.3

Das Chromatogramm und seine Aussage

Die eluierten Substanzen werden von der mobilen Phase in den Detektor transportiert und vom Schreiber als *Gaußkurven* (Glockenkurven) registriert. Die Signale nennt man Peaks (Abbildung 2.8), ihre Gesamtheit Chromatogramm.

Die Peaks liefern *qualitative* und *quantitative Information* über die untersuchte Mischung:

Qualitativ: Die Retentionszeit einer Komponente ist bei gleichen chromatographischen Bedingungen stets gleich groß.

Retentionszeit ist die Zeit, welche vom Einspritzen der Probe bis zum Erscheinen des Signalmaximums im Detektor verstreicht. Die chromatographischen Bedingungen sind: Trennsäule, Zusammensetzung der mobilen Phase, Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, ev. Probengröße und Temperatur.

Zur Identifikation eines Peaks können wir daher die infrage kommende Substanz rein einspritzen und die Retentionszeiten vergleichen.

Quantitativ: Sowohl die Fläche wie auch die Höhe des Peaks sind der eingespritzten Stoffmenge proportional. Wenn wir verschiedene Lösungen genau bekannter Konzentration einspritzen, die zugehörigen Flächen oder Höhen bestimmen und eine Kalibrierkurve zeichnen, können wir aus der dem Signal einer unbekannt Probe deren Konzentration bestimmen.

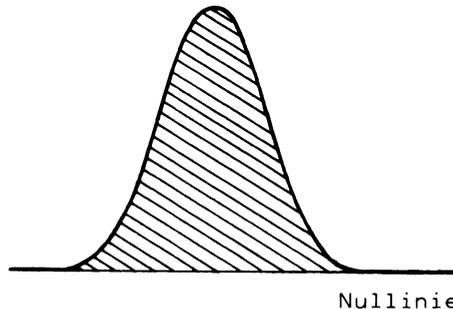


Abb. 2.8 Peak

Mit dem Chromatogramm können wir verschiedene Angaben über die Güte der Trennung und der Säule machen, siehe Abbildung 2.9.

w : *Basisbreite* eines Peaks

t_0 : *Totzeit* (Durchbruchzeit) der Trennsäule; die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule zu wandern. Die lineare Geschwindigkeit u des Lösungsmittels berechnet sich demnach zu

Es gilt: $w = 4\sigma$

σ : *Standardabweichung* des Gauß-Peaks.