

Chromatographie: Grundlagen der Trennung

- **konventionelle Analysenmethoden:**

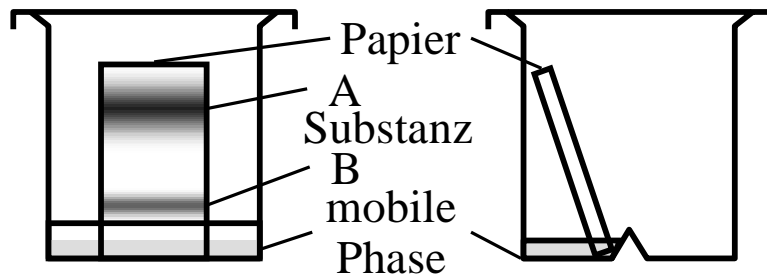
- komplexe Mischungen vieler Analyten
- Signal-Überlagerung
- **effiziente Trennverfahren!**

- **Prinzip:**

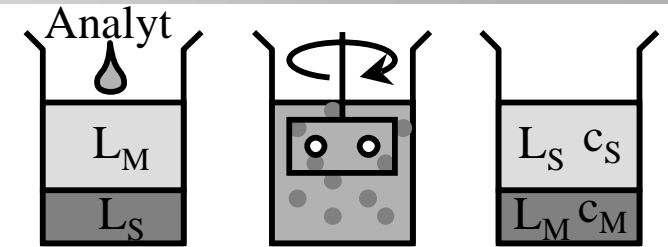
- Verteilung zwischen stat. und mobiler Phase
- verschiedene Analyten → verschiedene Verteilungskoeffizienten (vielfacher Übergang)
- **Trennung**

- **Verfahren:**

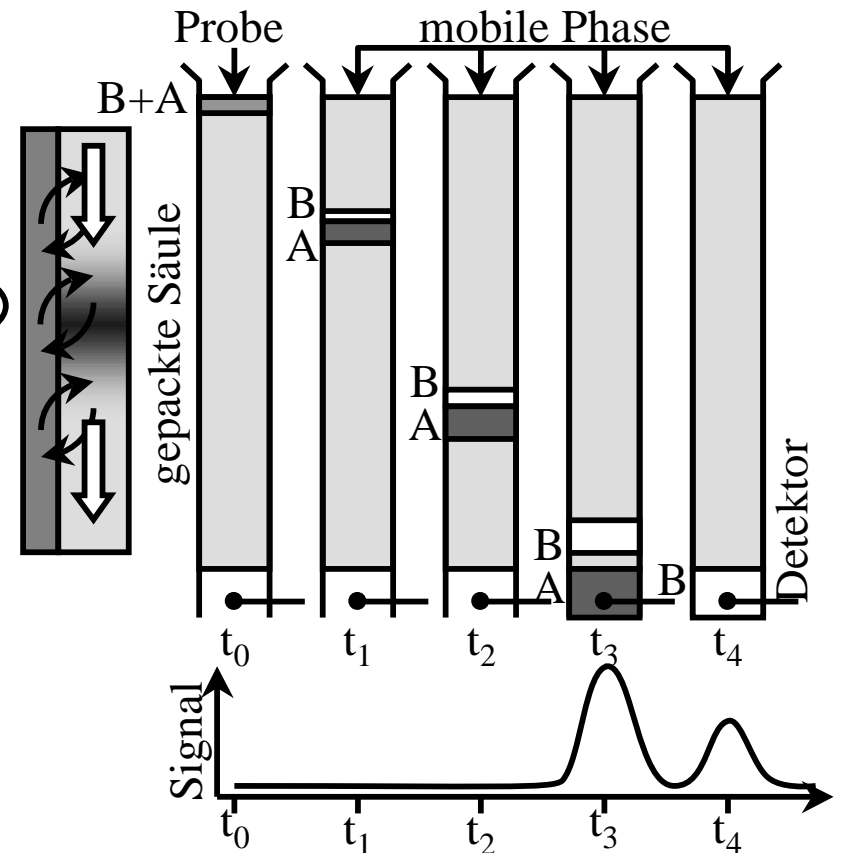
- planar: Papier-, Dünnschichtchromatographie



- **Säulen-Chromatographie: flüssige bzw. gasförmige mobile Phase**



Verteilungskoeffizient $K = \frac{c_S}{c_M}$



Chromatographie: Theorie der Trennung

- **Kenngrößen:**

- Wanderungsgeschwindigkeit

der mobilen Phase: $u = \frac{L}{t_M}$, des Analyten: $v = \frac{L}{t_R}$

Verteilungskoeffizient: $K = \frac{c_S}{c_M}$, Kapazitätsfaktor: $k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$

Selektivitätsfaktor: $\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{t_R(B) - t_M}{t_R(A) - t_M} (>1)$

Auflösung: $R_S = \frac{2\Delta z}{W_A + W_B} = \frac{2\{t_R(B) - t_R(A)\}}{W_A + W_B}$

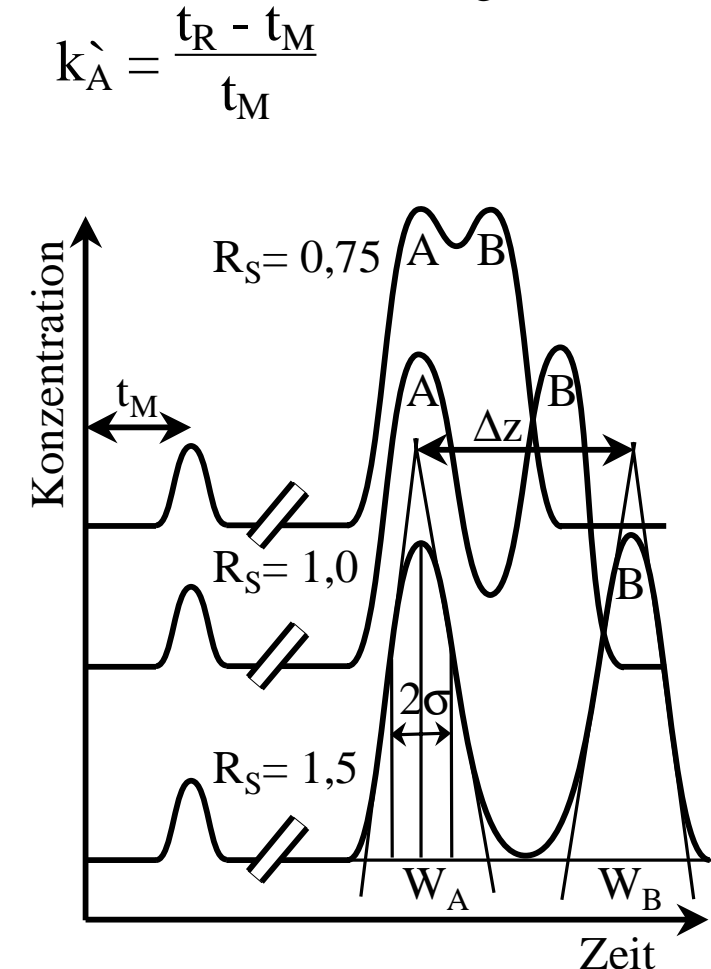
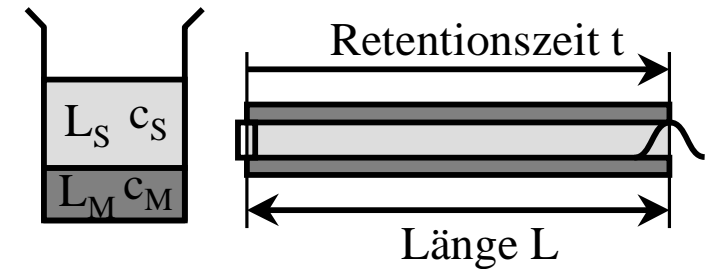
- **Effizienz der Säule:**

- **Bodenhöhe:** (aus Standardabweichung der Gausskurve): $H = \frac{\sigma^2}{L}$

- **Anzahl theoretischer Böden:** $N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$

- **Optimierung:**

- Auflösung(Trennung)/Zeitaufwand



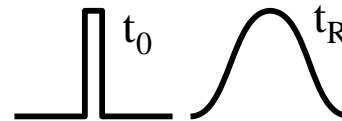
Chromatographie: Effizienz der Trennung

- **Optimum:**

- minimale Bodenhöhe H bzw. maximale Bodenzahl
- Fließgeschwindigkeit
- Korngröße \downarrow der festen Phase

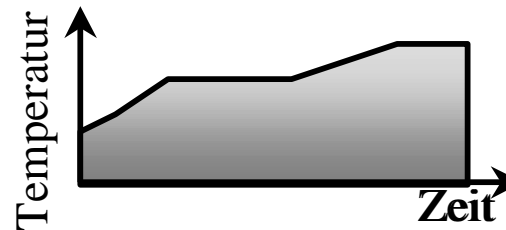
- **Peakverbreiterung:**

- longitudinale **Diffusion** (GC \gg HPLC)



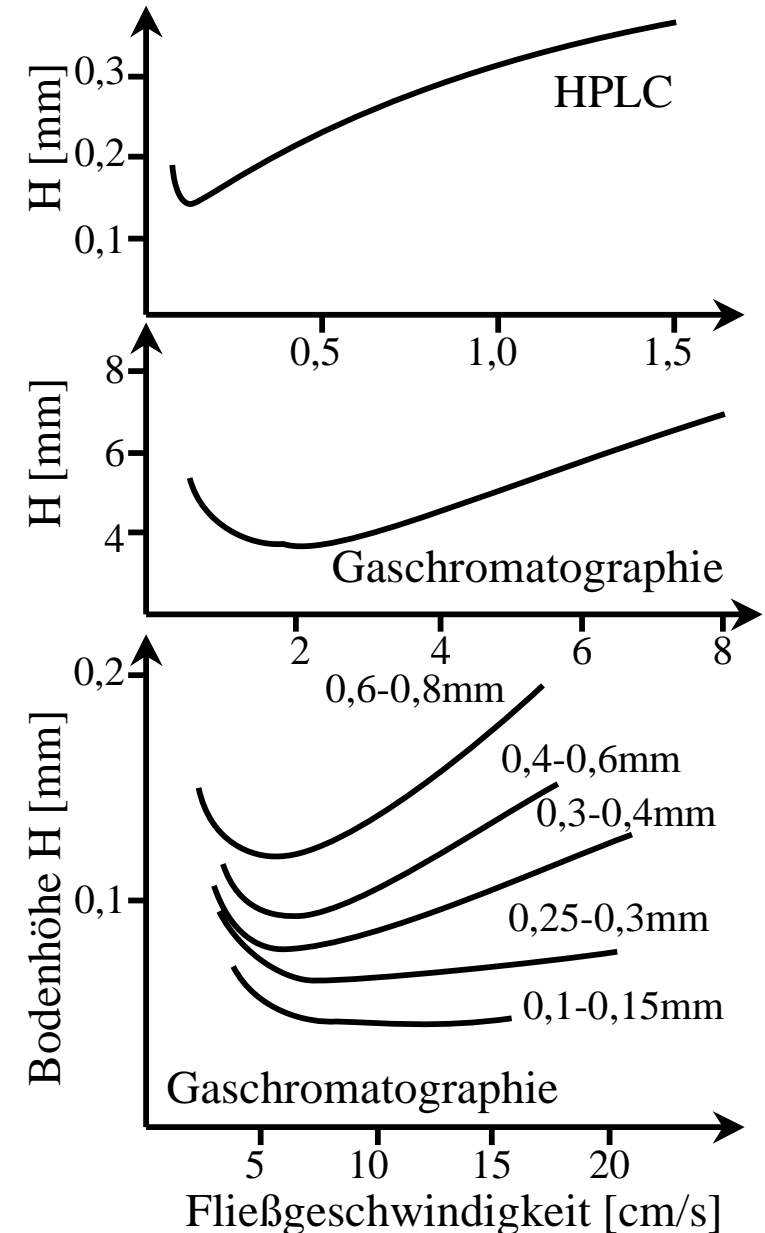
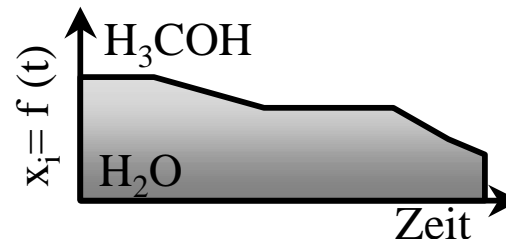
- **GC:**

- Temperatur:
 $R_s, K, \alpha, D = f(T)$



- **HPLC:**

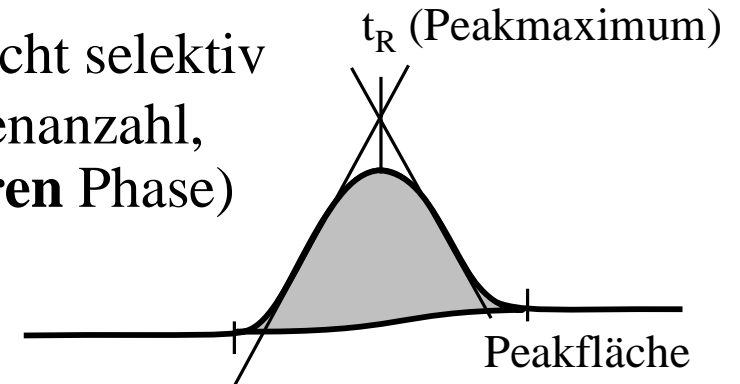
- Lösungsmittel $\rightarrow R_s, K, \alpha = f(\text{Lsgm.})$
polare/unpolare Lsgm.
- **Gradientenelution:**



Chromatographie: Identifizierung/Quantifizierung

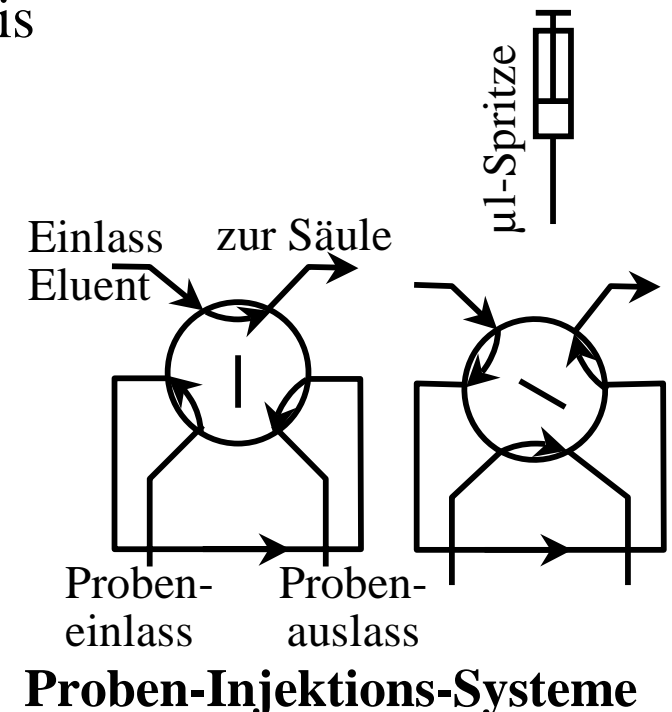
- **Identifizierung:**

- **Retentionszeit** (Peakmaximum): **unspezifisch**, nicht selektiv
- Abhängigkeit von Messbedingungen (Säule, Bodenanzahl, Fließgeschwindigkeit, **Art der mobilen/stationären Phase**)
- Zugabe bekannte **Kalibriersubstanzen**
- Peakerrhöhung bei identischer Substanz
- eindeutige Zuordnung, **Identifikation**
- standardfrei: **Kopplungsmethoden: MS, IR, UV-Vis**



- **Quantifizierung:**

- **reproduzierbare Probendosierung (nl - μ l)**
- Peakhöhe = $f(c_{\text{Analyt}})$, Einfluss der Peakbreite
- besser: **Peakfläche = $f(c_{\text{Analyt}})$**
- **Kalibrier-Reihe:** Zugabe bekannter Kalibriersubstanzen
- interner **Peakflächenstandard**
- **Flächen-Normierung** (vollständige Elution aller Bestandteile! - Normierung auf Gesamtfläche)



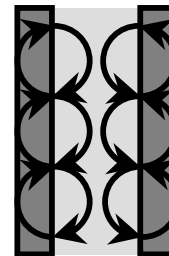
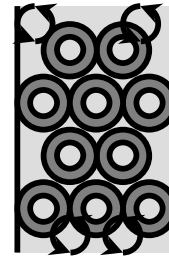
Chromatographie: Säulen für die Trennung

- **Säulenmaterial:**

- Teflon, Edelstahl, Glas, **Quarz**

- **Säulentypen:**

- gepackt (gefüllt mit kugelförmigen Teilchen - Kieselgel, Korund, Polymere)
- + höhere Kapazität (Probenmenge)
- Kapillarsäulen (beschichtete Wandung)
- + höhere Effizienz (Bodenhöhe)



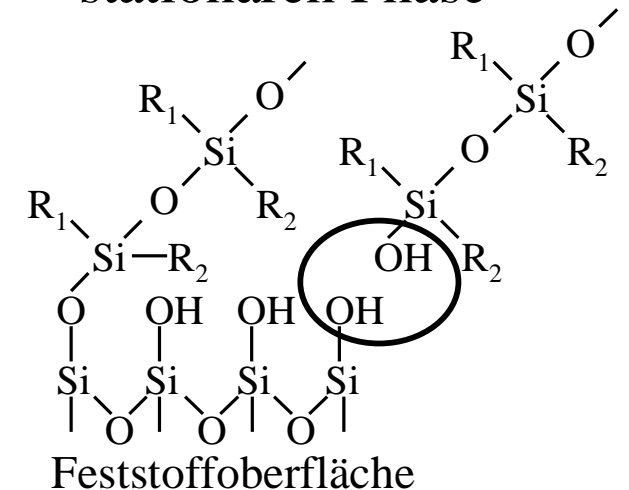
- **mobile Phase:**

- (g) H₂, He, Ar, N₂, Luft, überkritisch: CO₂
- flüssig: polare/unpolare Lösungsmittel, H₂O

- **stationäre Phasen:**

- **flüssig/gebunden/fest**
- Wasser, hochsiedende Lösungsmittel, niederpolymeren Flüssigkeiten
- chemische Bindung am Feststoff
- + kein „**Ausbluten**“ der stationären Phase

Verfahren	stationär	mobil	Gleichgewicht
GC	(l), ads., gebund.	(g)	Verteilung (g/l)
	fest (s)	(g)	Adsorption (g/s)
HPLC	(l), ads., gebund.	(l)	Verteilung (l/l)
	fest (s)	(l)	Adsorption (l/s)
SFC	(l), gebunden	(l)	Verteilung (l _{skr.} /l)



Anbindung niederpolymerer Flüssigkeiten

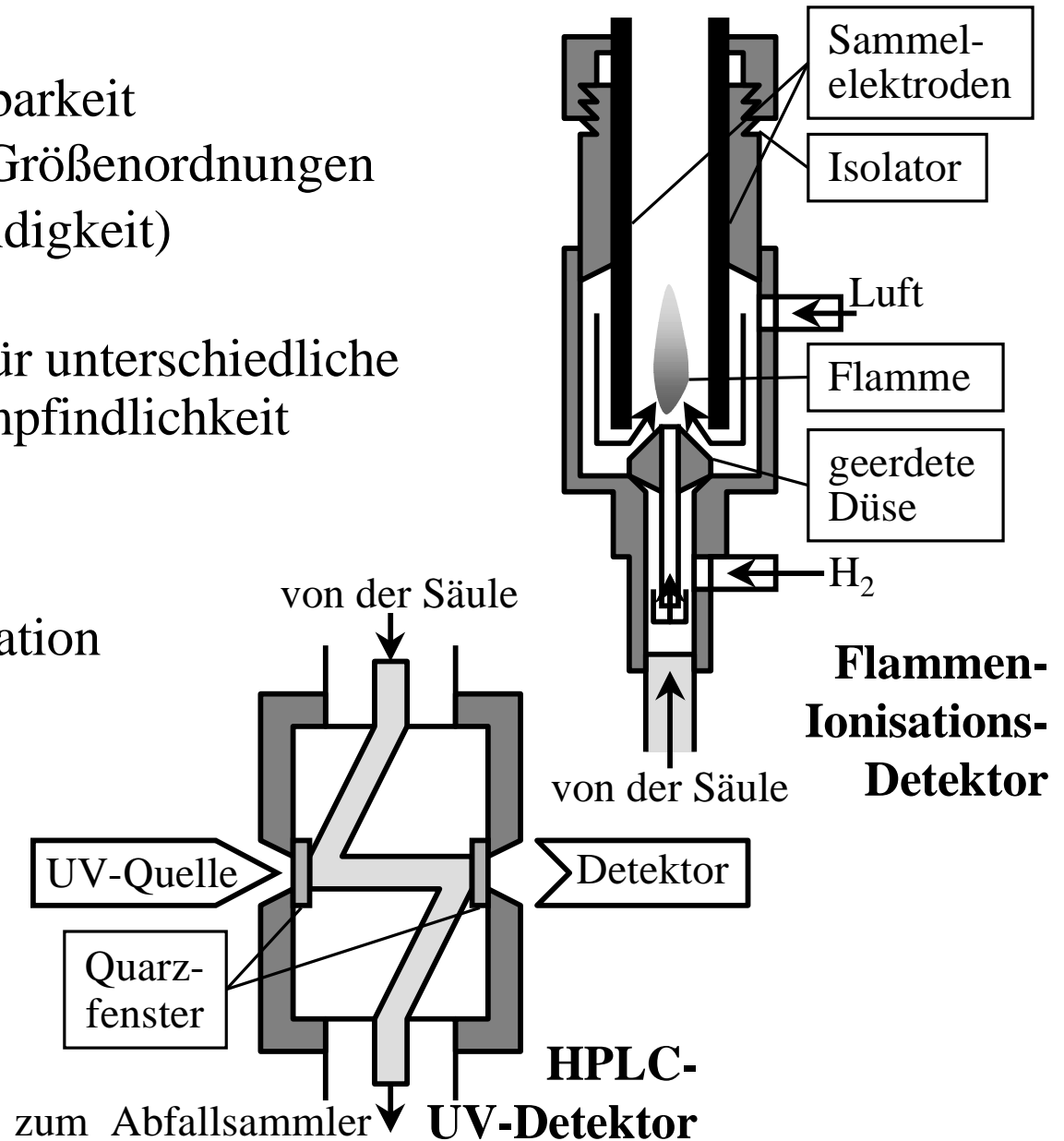
Chromatographie: Detektoren

- **Anforderungen:**

- hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit
- linear dynamisch über mehrere Größenordnungen
- Ansprechzeit \neq f (Fließgeschwindigkeit)
- $20 \leq T \leq 400 \text{ }^\circ\text{C}$
- vergleichbare Empfindlichkeit für unterschiedliche Analyten oder vorhersagbare Empfindlichkeit
- zerstörungsfrei

- **Detektoren:**

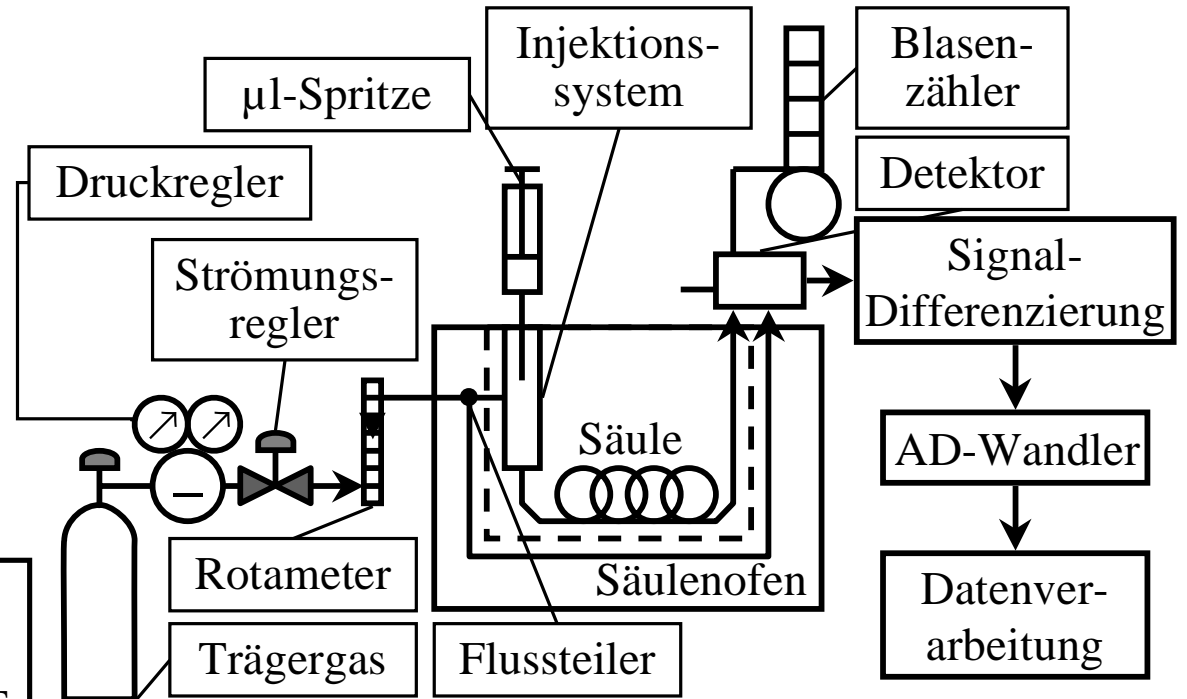
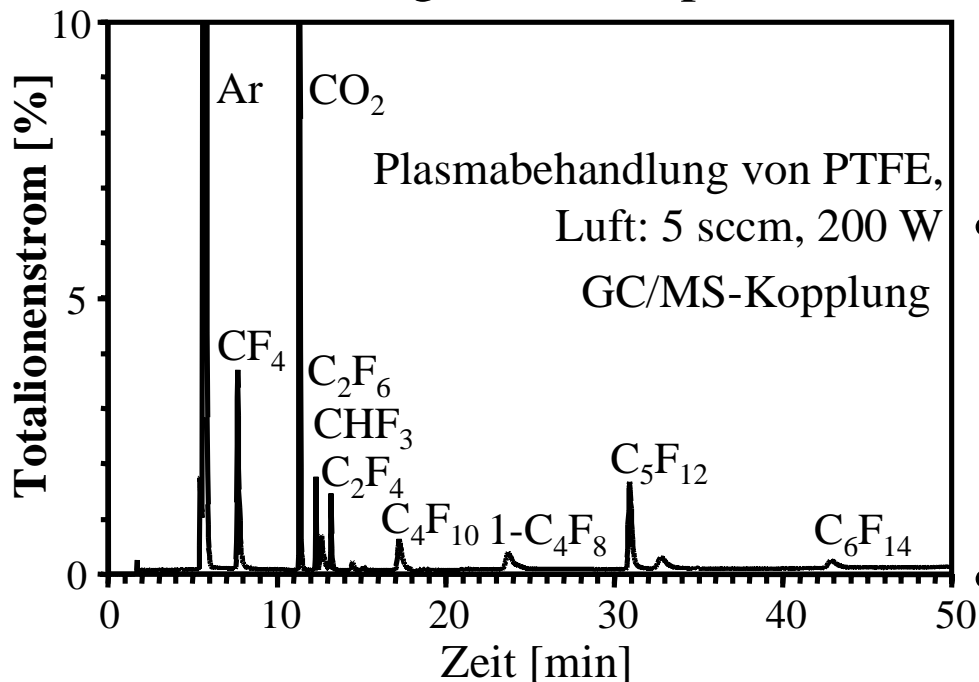
- FID: Verbrennung mit H_2 - Ionisation
- Wärmeleitfähigkeit:
Heizdraht/Thermoelement
- ECD: β -Strahler, Elektroneneinfang an Halogen-KWST
- AES: UV-Vis-Diodenarray-Spektrometer



Gaschromatographie (GC)

• Besonderheiten:

- geringer Einfluss der Art der mobilen Phase (Gasart)
- Art der stationären Phase entscheidend
- große Säulenlängen (bis 50m)
- Optimierung der Effizienz der Trennung über Temperatur



• Identifizierung:

- **Retentionsindex:** unverzweigte Alkane - unveränderliche Abfolge entsprechend der Kettenlänge
→ Einordnung unbekannter Substanzen

• Quantifizierung:

- minimale **Reproduzierbarkeit** ≈ 1 %

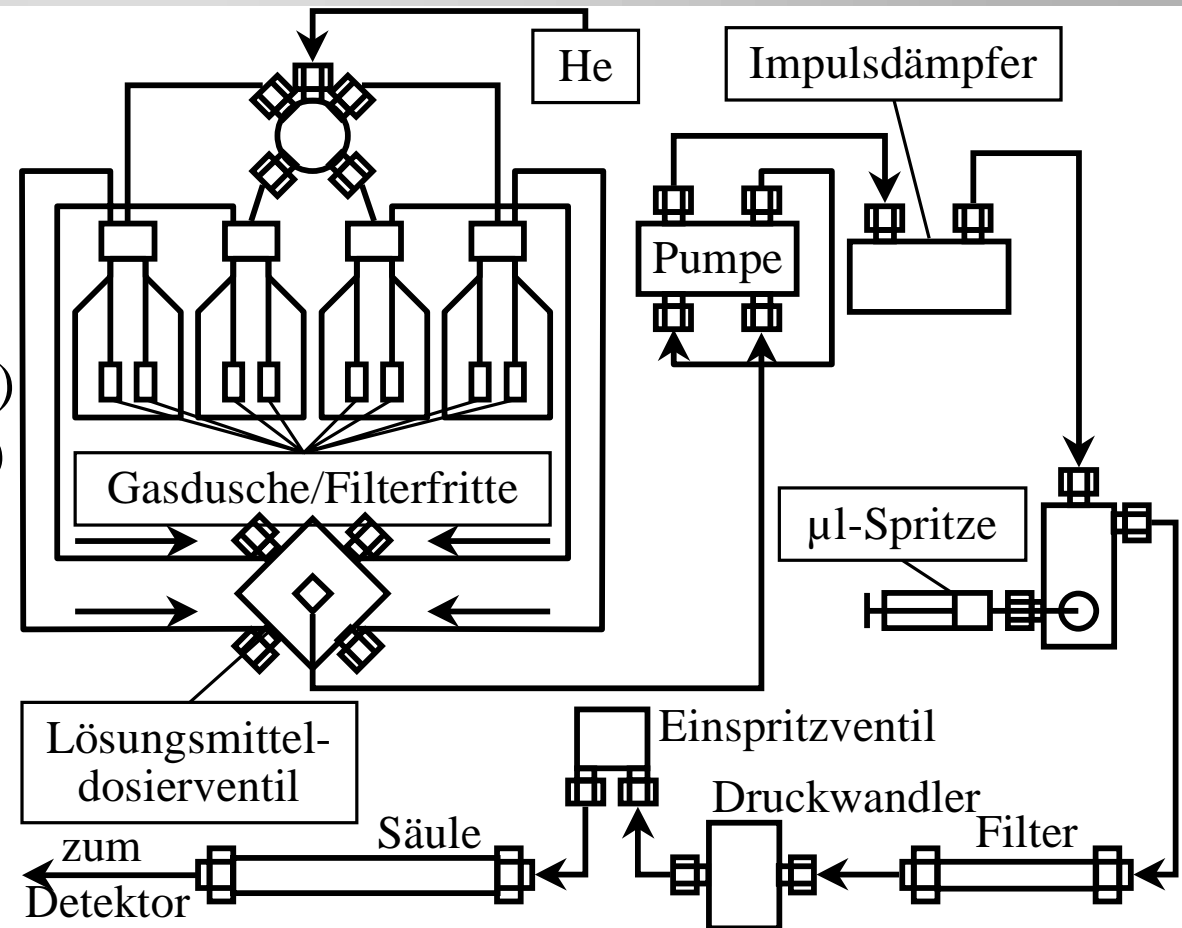
High Performance liquid chromatography (HPLC)

- **Besonderheiten:**

- starker Einfluss der Art der mobilen/stationären Phase
- beeinflusst entscheidend Verteilungskoeffizienten, Selektivität, Effizienz der Trennung
- kurze Säulenlängen (10-50cm)
- hohe Bodenanzahl
- Optimierung der Effizienz der Trennung über Gradienten der Zusammensetzung

- **Verteilungs-HPLC:**

- mobil(1)/stationär(1, gebunden)
- **Normalphasen-HPLC:**
mobil - unpolar; stationär - polar
- **Umkehrphasen-HPLC:**
stationär - unpolar; mobil - polar



- **Adsorptions-HPLC:**

- mobil(1)/stationär(s): Kieselgel, Al_2O_3

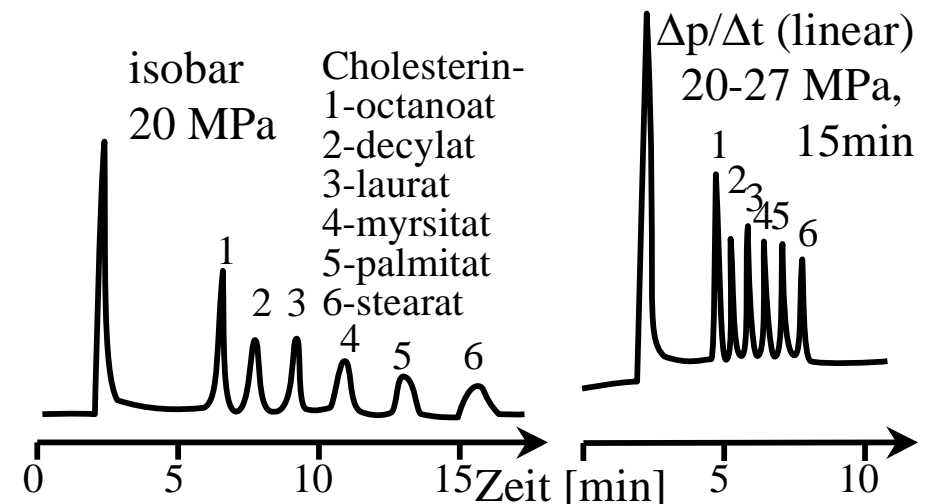
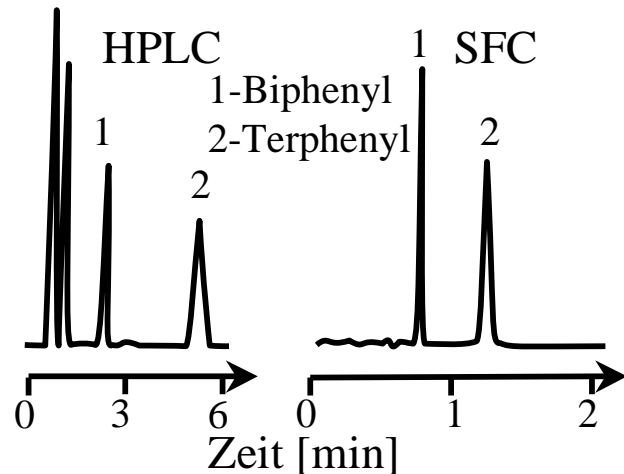
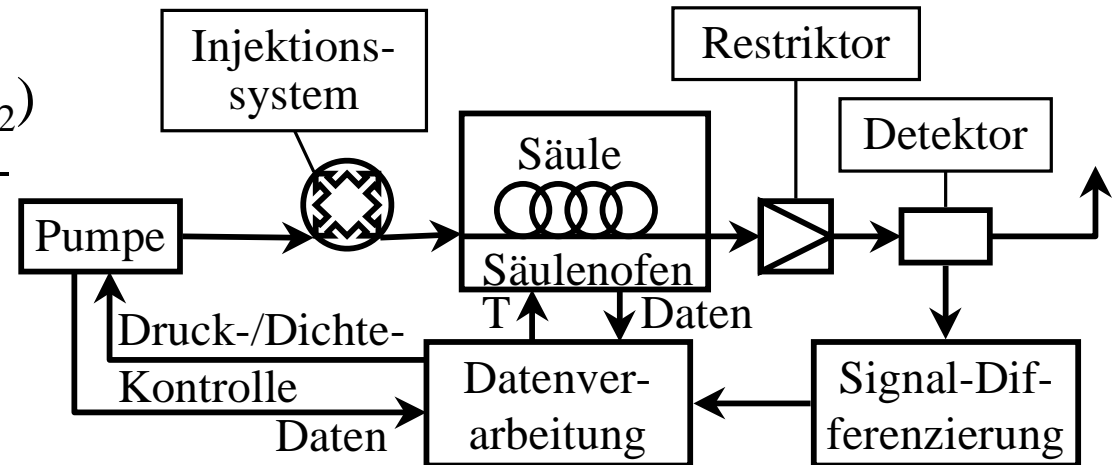
- **Ausschluss-HPLC:**

- stationär(s): nanoporös, $t_R = f(\text{Größe})$

Supercritical fluid chromatographie (SFC)

Besonderheiten:

- überkritische mobile Phase (CO_2)
- sehr gute Löslichkeit für Makromoleküle (ohne Aufspaltung)
- kurze Säulenlängen, hohe Bodenzahl
- Optimierung der Effizienz über Druck, Druckgradienten



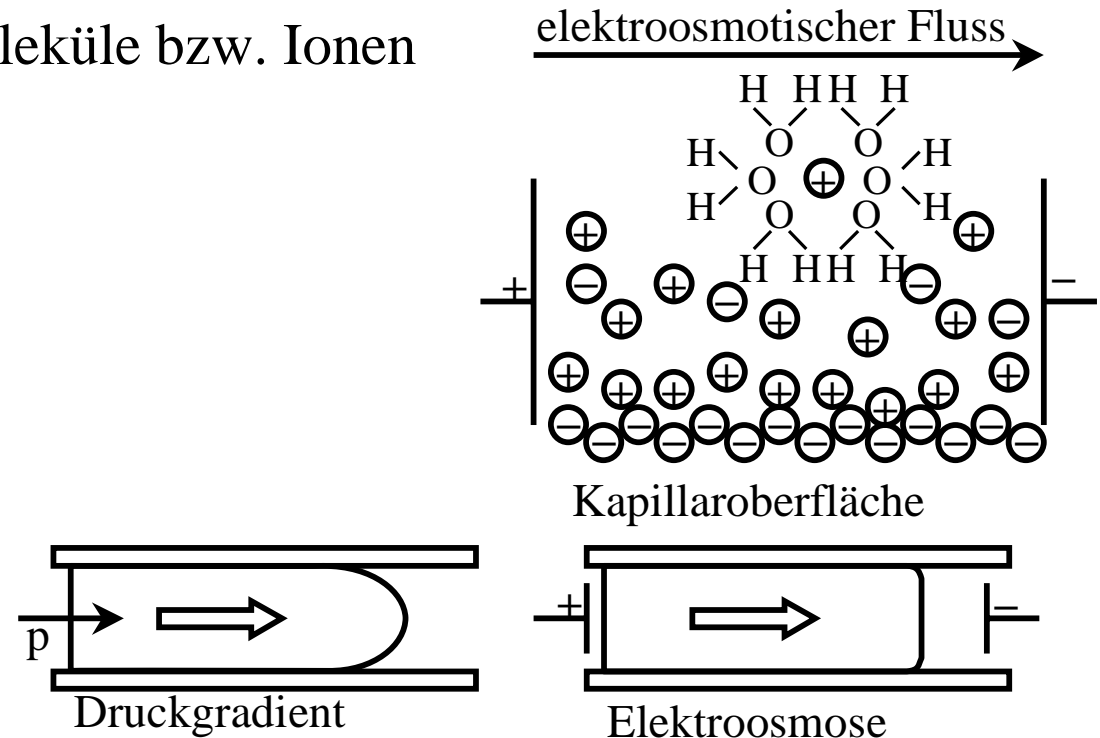
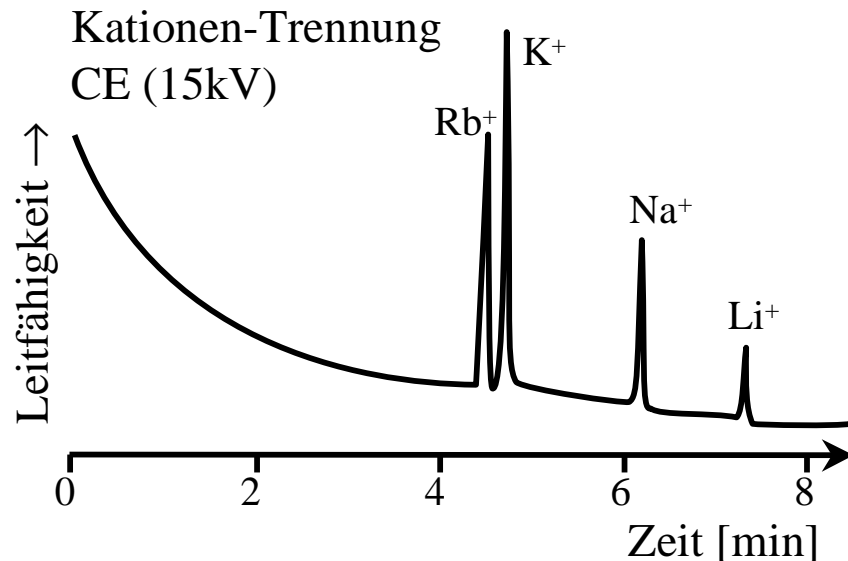
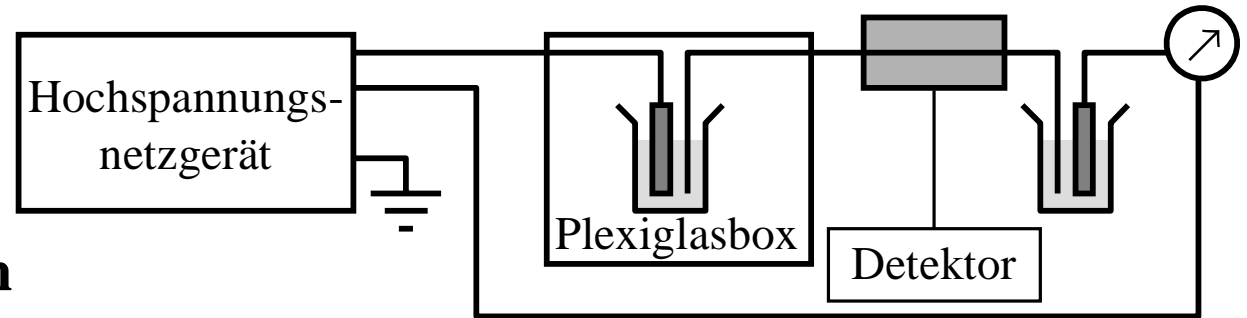
Vorteile SFC (zu HPLC) :

- stark veränderte Verteilungskoeffizienten
- hohe Selektivitäten, hohe Effizienz der Trennung (auch Makromoleküle)

Capillary electrophoresis (CE)

- **Besonderheiten der Kapillarelektrophorese:**

- Transport durch **Elektro-osmose** (bis 30 kV)
- **Selektion** aufgrund unterschiedlicher **elektrischer Eigenschaften**
- kurze, **isolierende Säulen** (Quarz)
- effiziente Trennung geladener Moleküle bzw. Ionen



Kapillarelektrophorese: Anwendungen

Abb. 27.12

Elektropherogramm einer Mischung aus vier Kationen, Rb^+ , K^+ , Na^+ und Li^+ , mit einer Konzentration von je $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; Kapillareinnendurchmesser, $75 \mu\text{m}$, Länge 60 cm ; Puffer 20 mM MES/His , $\text{pH } 6$; Injektion durch Elektromigration, 5 s bei 5 kV ; angelegte Spannung 15 kV . (Nachdruck mit Erlaubnis aus X. Huang, T. J. Pang, M. J. Gordon und R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 1987, 59, 2749. Copyright 1987 by American Chemical Society.)

