

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 XI

Vorwort zur neunten Auflage XI

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	Lösungsmitelegenschaften	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:

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

Lineare Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase:

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

Porosität der Säulenpackung:

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

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

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

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

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

Reduzierte Trennstufenhöhe:

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

Reduzierte Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase:

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

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 $\epsilon = 0,8$:

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

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 $\epsilon = 0,65$:

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

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 $\epsilon = 0,65$:

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

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. Synge, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358.

Schon die „Erfinder“ der modernen Chromatographie, *Martin* und *Synge*, 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

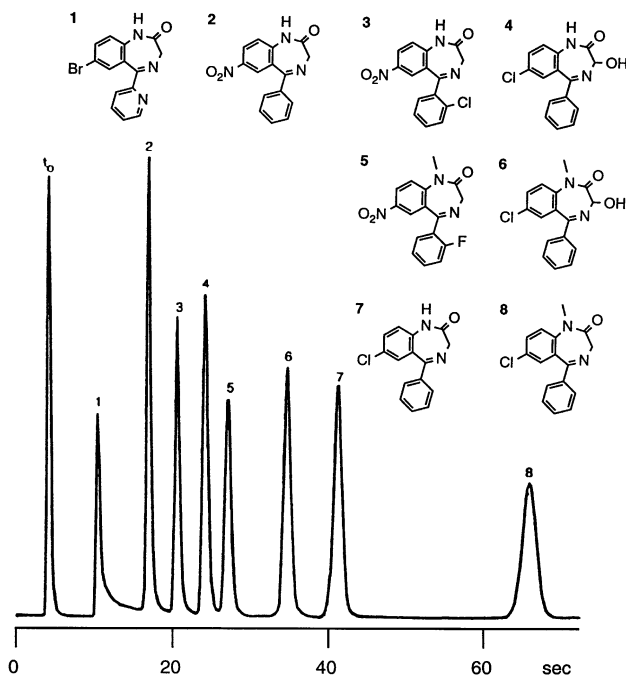


Abb. 1.1 HPLC-Trennung von Benzodiazepinen (nach T. Welsch, G. Mayr und N. Lammers, InCom-Sonderband Chromatography, Düsseldorf 1997, S. 357)

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 benutzt 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

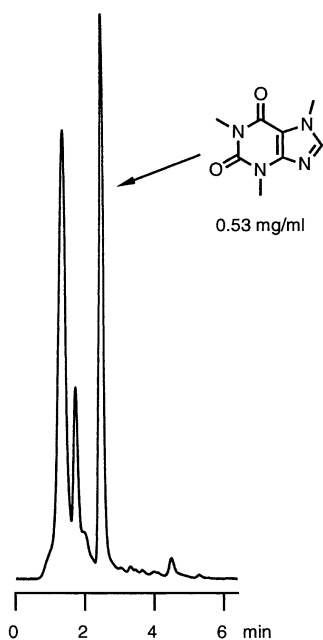


Abb. 1.2 HPLC-Trennung von Kaffee

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 sparender 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 mehr als einem Lösungsmittel, sodass noch Mischung und Steuerung notwendig sind. Geschieht die Datenerfassung mit einem Computer, so kann dieser auch die Kontrolle der ganzen Apparatur übernehmen.

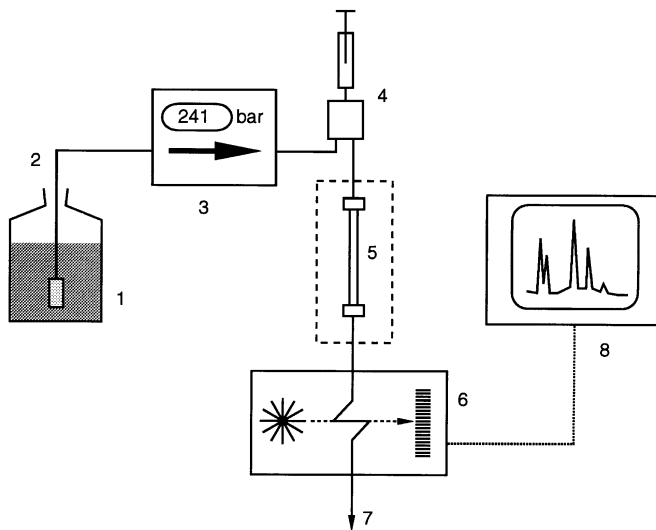


Abb. 1.3 Schema einer HPLC-Apparatur

- 1) Lösungsmittelevorrat, 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 Plastikkappen. 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 µm 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

$$1 \text{ bar} = 0,987 \text{ atm} = 1,02 \text{ at} = 10^5 \text{ Pa (Pascal)} = 14,5 \text{ psi}$$

$$1 \text{ MPa} = 10 \text{ bar (Mega-Pascal, SI-Einheit)}$$

$$1 \text{ atm} = 1,013 \text{ bar (physikalische Atmosphäre)}$$

$$1 \text{ at} = 0,981 \text{ bar (technische Atmosphäre, 1 kp/cm}^2\text{)}$$

$$1 \text{ psi} = 0,0689 \text{ bar (pound per square inch)}$$

$$\text{Faustregel: } 1000 \text{ psi} \approx 70 \text{ bar} \quad 100 \text{ bar} = 1450 \text{ psi}$$

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 Rohren 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 Probengemisch 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, Muttenez/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“.