

# 6. Chromatographie

## (LC: Flüssigchromatographie)

## 6. Chromatographie - Gliederung

- 6.1 Einführung
- 6.2 Definition
- 6.3 Prinzip der Chromatographie
- 6.4 Systematik der Chromatographie
- 6.5 Das Chromatogramm und seine Aussagen
- 6.6 Das Chromatogramm - quantitativ
- 6.7 Das Chromatogramm - Parameter
- 6.8 Das Chromatogramm – Formeln
- 6.9 Bandenverbreiterung innerhalb der Säule
- 6.10 Partikelgröße vs. Trennstufenhöhe  $H$  [ $\mu\text{m}$ ]
- 6.11 Partikelgrößenverteilung von 3  $\mu\text{m}$ -Material
- 6.12 Chemische Modifizierung von Trennphasen

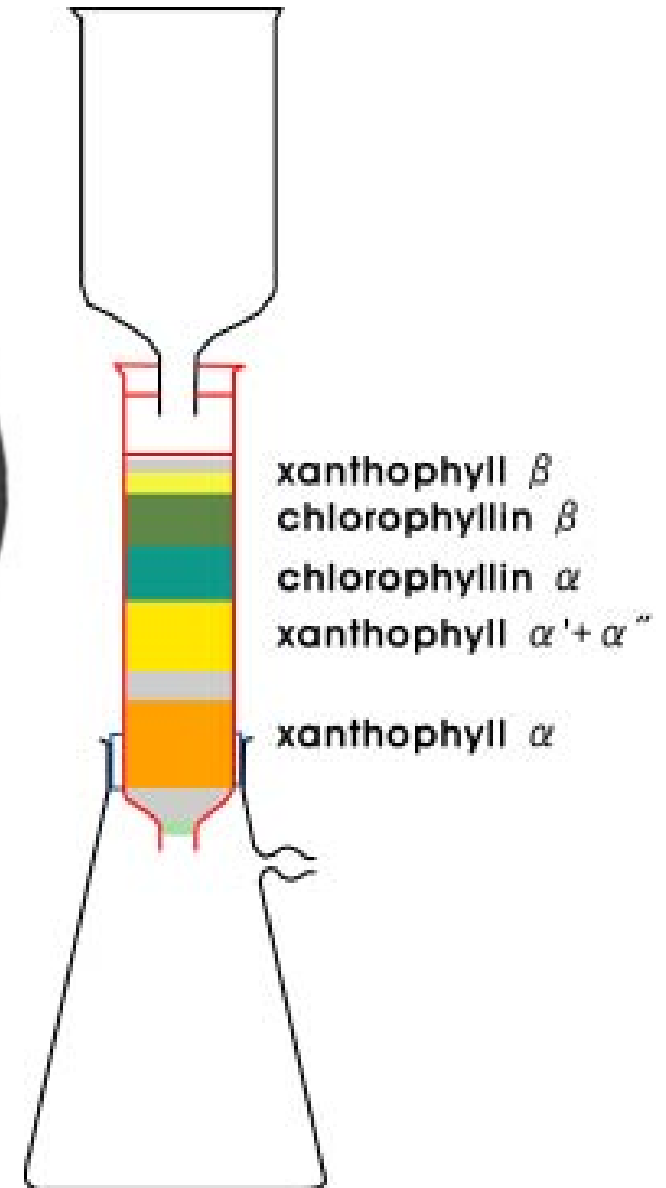
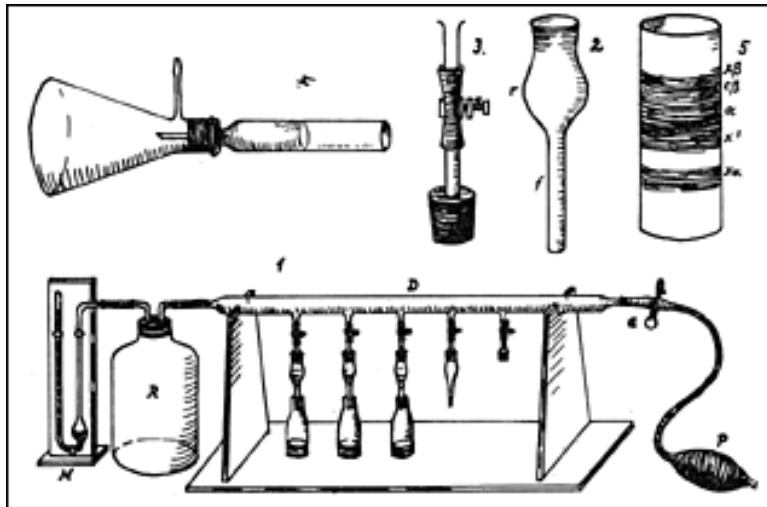
## 6. Chromatographie

### 6.1. Einführung

- Cvet, Farbenlehre,
- Synonym,
- Kryptonim, Krypta
- Farbe, chroma,
- "Boot-Rennen"

# 1906 Chromatographie

- ◇ Cbet (Tswett):
- ◇ russ. Botaniker;



## 6. Chromatographie

### 6.1. Einführung

- "Boot-Rennen" der Chromatographie

# 6. Chromatographie

## 6.1. Einführung

$$K = \frac{C_{\text{stationär}}}{C_{\text{mobil}}}$$

K: Verteilungskoeffizient

$C_{\text{stationär}}$  : Konzentration einer Substanz  
in der stationären Phase

$C_{\text{mobil}}$  : Konzentration einer Substanz  
in der mobilen Phase

## 6.1 Einführung

M. S. Tswett, Ber. Deut. Botan. Ges. 24 (1906) 319

“Wird eine petrolätherische Chlorophylllösung durch eine Säule eines Adsorptionsmittels durchfiltriert (ich verwende hauptsächlich Calciumcarbonat, welches in engen Glasröhren dicht gestampft wird), so werden die Farbstoffe gemäß der Adsorptionsreihe von oben nach unten in verschieden gefärbten Zonen auseinandergelegt, indem die stärker adsorbierten Farbstoffe die schwächer zurückgehaltenen weiter nach unten verdrängen. Diese Trennung wird praktisch vollständig, wenn man nach dem Durchgange der Farbstofflösung durch die adsorbierende Säule einen **Strom des reinen Lösungsmittels** herstellt. **Wie die Lichtstrahlen im Spektrum**, so werden in der Calciumcarbonatsäule die verschiedenen Komponenten eines Farbstoffgemisches gesetzmäßig auseinandergelegt, und lassen sich darin qualitativ und auch quantitativ bestimmen. Ein solches Präparat nenne ich ein **Chromatogramm** und die entsprechende Methode **chromatographische Methode**”.

...

“Selbstverständlich sind die beschriebenen Adsorptionseigenschaften nicht nur den Chlorophyllfarbstoffen eigen, und es ist anzunehmen, daß allerlei gefärbte oder farblose chemische Verbindungen desselben Gesetzmäßigkeiten unterworfen sind.”

## 6.1 Einführung

- **Terminologie**  
Mit dem Begriff **Chromatographie** wird sowohl ein Trennprinzip als auch eine Trenn- und Analysenmethode für Substanzgemische (Verbundmethode aus Trennung, Detektion und Signalverarbeitung) bezeichnet
- **Definition nach IUPAC**  
physikalische Trennmethode, bei der die zu trennenden Komponenten zwischen zwei Phasen verteilt werden, von denen eine stationär angeordnet ist und die andere sich in einer definierten Richtung bewegt
- **Prinzip**  
multiplikative Verteilung der Komponenten zwischen 2 nicht miteinander mischbaren Phasen (stofflicher Aggregatzustand) in dynamischer Arbeitsweise
- **Stationäre Phase**
  - bewirkt Verzögerung (**Retention**) der Komponenten
  - Feststoff oder Flüssigkeit (mit großer Oberfläche)
- **Mobile Phase**
  - bewirkt Stofftransport
  - Gas (GC), Flüssigkeit (LC) oder überkritisches Fluid (SFC)
  - Transport durch Druck, Schwerkraft oder Kapillarkräfte
- **Trennanordnung**
  - Säule
    - gepackte Säule (gefüllt mit Partikeln) oder Kapillarsäule
  - Schicht auf ebener Unterlage
- **Trennung**  
durch unterschiedliche Verzögerung der Komponenten in der stationären Phase

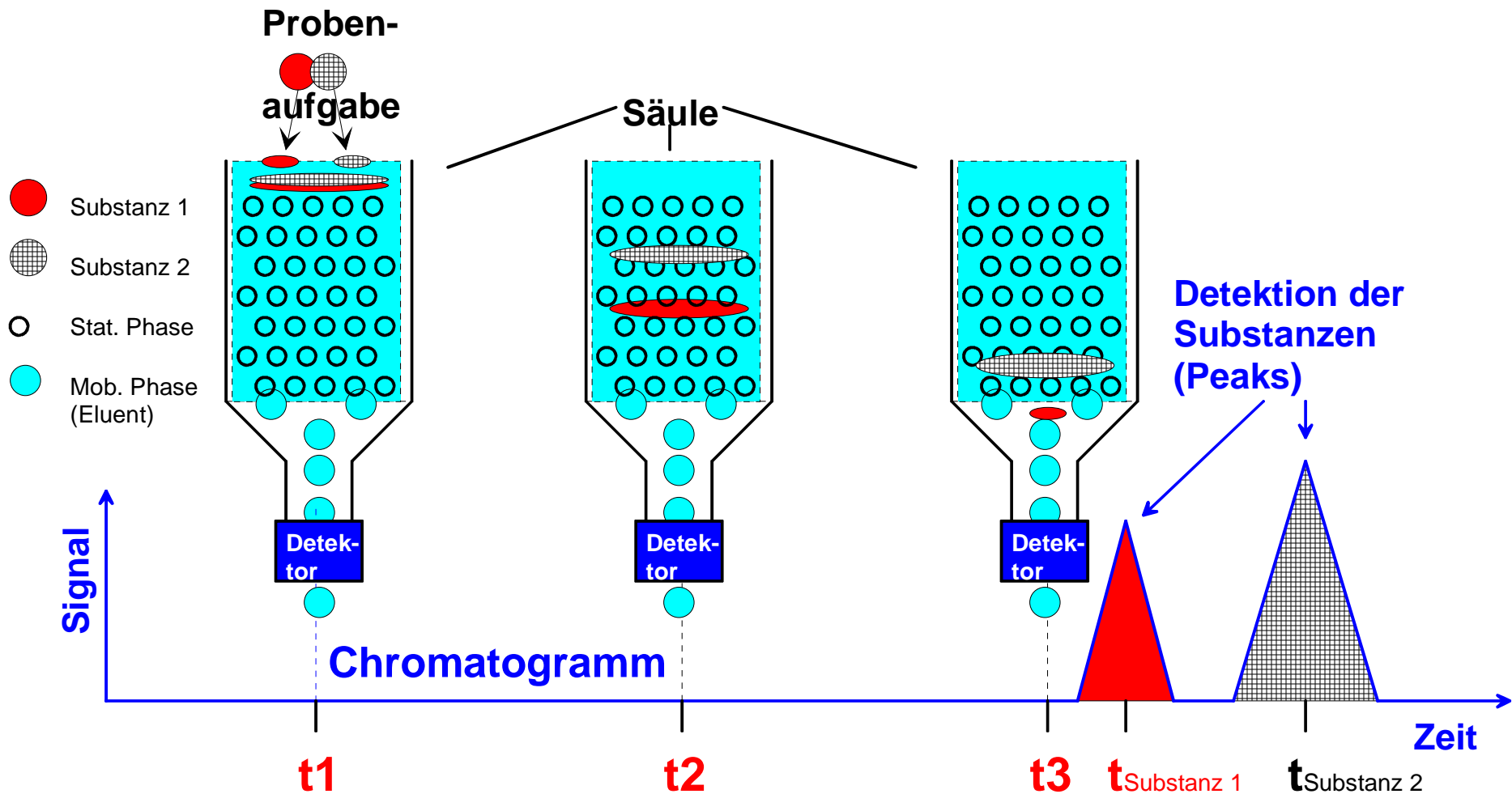


## 6. Chromatographie

### 6.2. Definition

- Ist ein Trennprozeß, bei dem das Probengemisch zwischen 2 Phasen im chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird.
- Die eine Hilfsphase - **die stationäre Phase** - ruht.
- Die andere Hilfsphase - **die mobile Phase** - strömt daran im chromatographischen Bett vorbei.

## 6.3 Prinzip der Chromatographie



## 6.4 Systematik in der Chromatographie

**Trennmethoden: Elektrophorese  
Chromatographie**

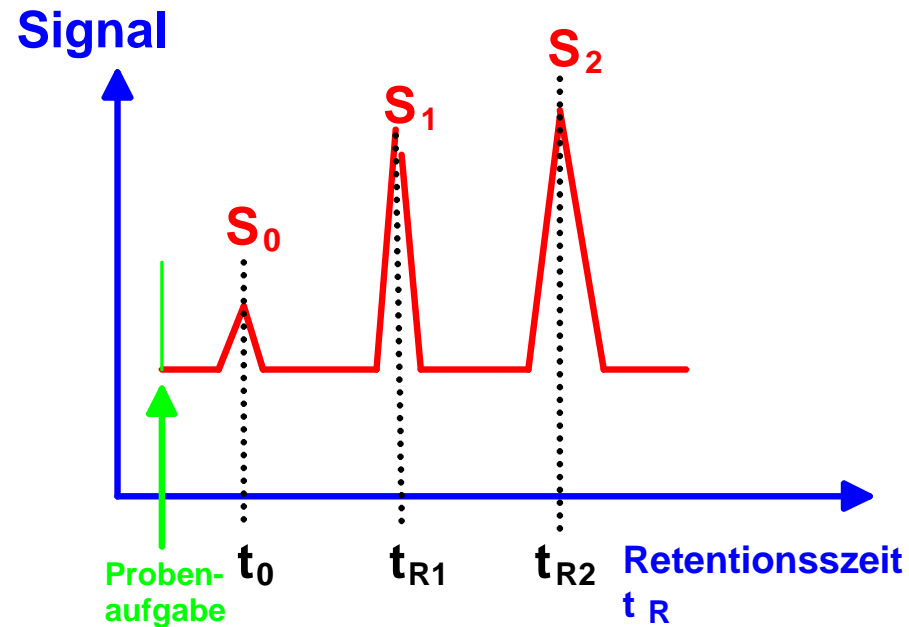
**Chromatographie: LC - SFC - GC**

**LC: Säulenchromatograph.: HPLC, BioLC**

**Planarchromatographie: PC, DC, TLC**

## 6.5 Das Chromatogramm und seine Aussagen

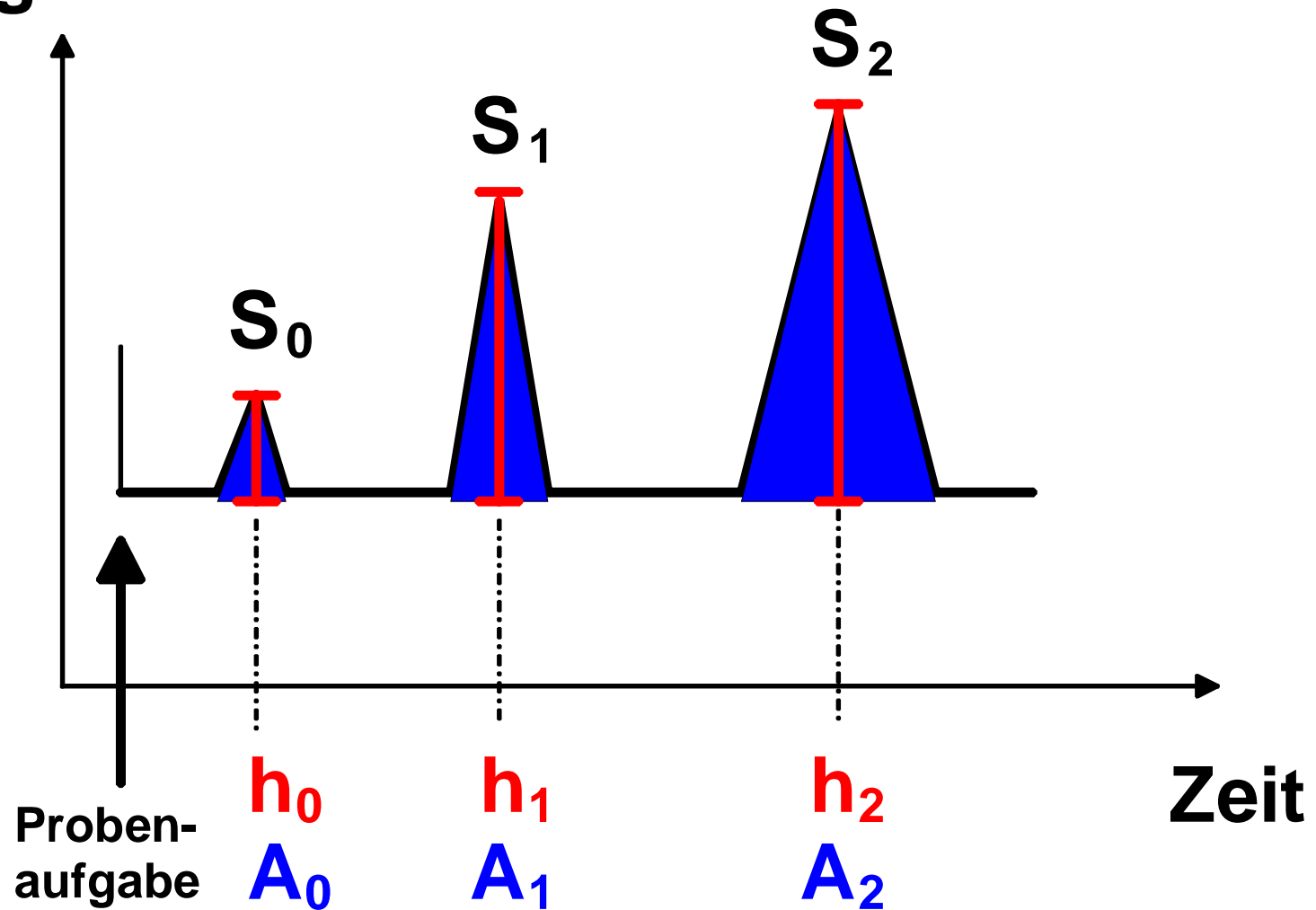
### Chromatogramm ( qualitativ )



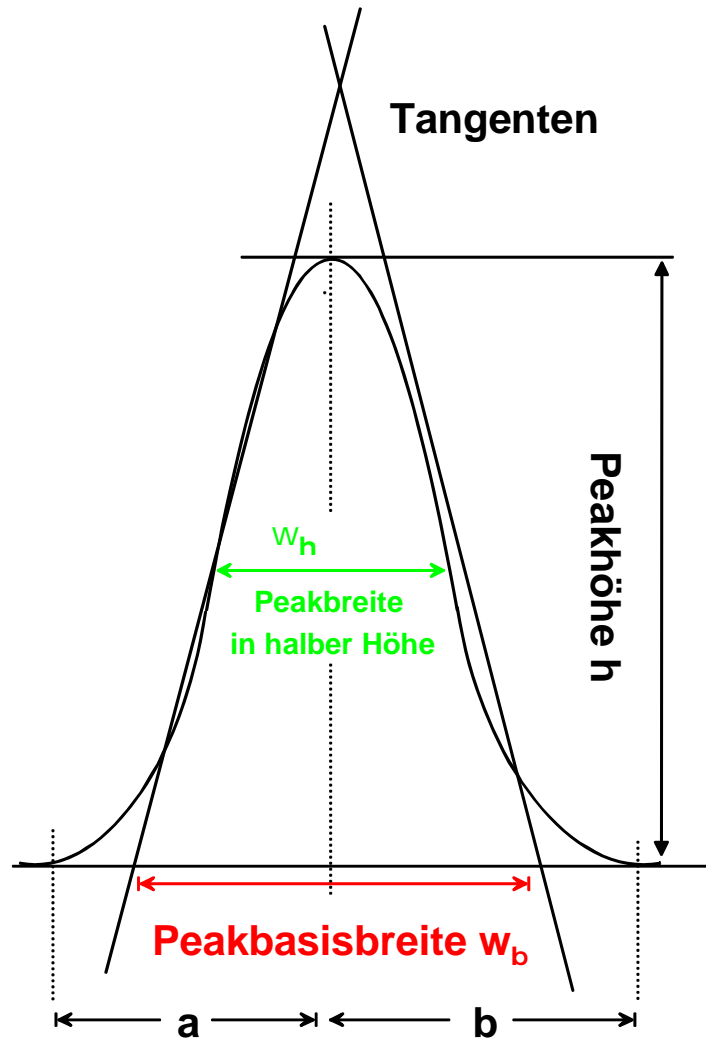
- $t_0$  Totzeit einer nicht retardierten Substanz  $S_0$
- $t_{R1}$  Retentionszeit der Substanz  $S_1$
- $t_{R2}$  Retentionszeit der Substanz  $S_2$

## 6.6 Das Chromatogramm - quantitativ

Signal



## 6.7 Das Chromatogramm - Parameter



## 6.8 Das Chromatogramm: Formeln

$$R = \frac{1}{4} (\alpha - 1) \sqrt{N} \frac{k'}{1 + k'}$$

R : Chromatographische Auflösung

$\alpha$  : Selektivität

N : Trennstufenzahl

$k'$  : Kapazitätsfaktor

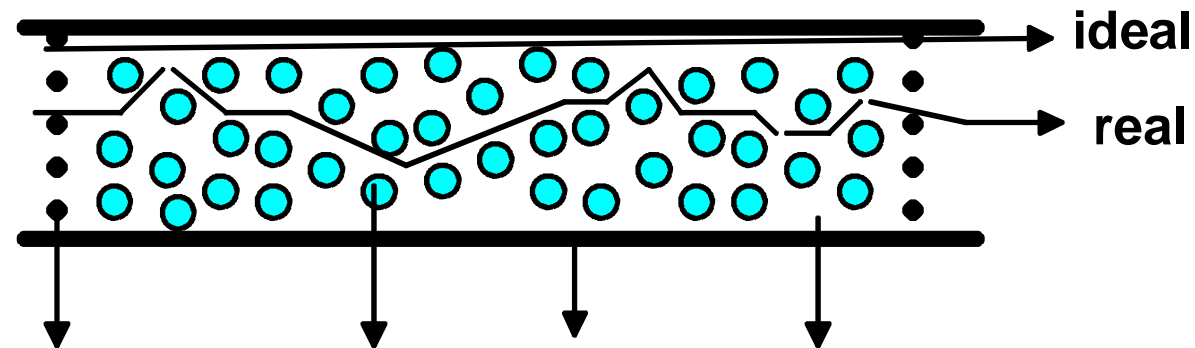
$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} = \frac{L}{H}$$

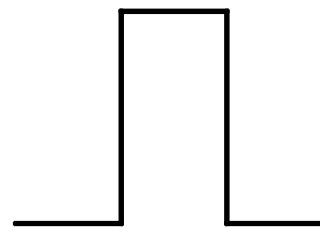
$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

## 6.9 Bandenverbreiterung innerhalb der Säule

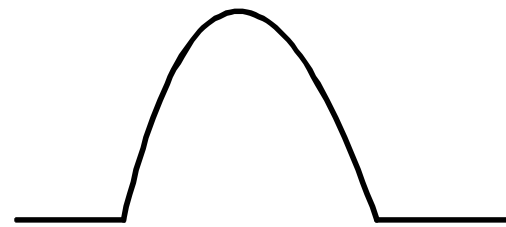
### 1. Ursache : Eddy-Diffusion (Streudiffusion)



Sieb      Partikel      Säule      Mobile Phase  
stationäre Phase



Peakprofil zu Beginn  
der Trennung

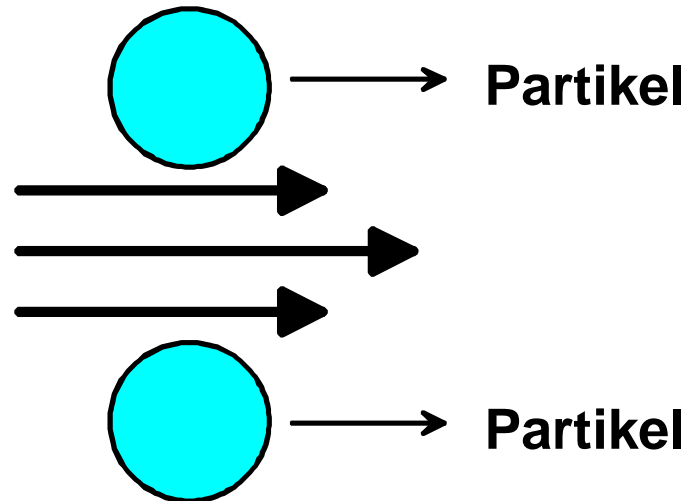


Peakprofil nach  
der Trennung



## 6.9 Bandenverbreiterung innerhalb der Säule

### 2. Ursache : Strömungsverteilung



### 3. Ursache : Diffusion der Probemoleküle in der mobilen Phase

### 4. Ursache : Stoffaustausch zwischen mobiler " stagnierender mobiler " und " stationärer " Phase

## 6.9 Bandenverbreiterung innerhalb der Säule

### Van-Deemter-Gleichung

$$H_{(\text{HETP})} = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

**H** : Bodenhöhe ( "high equivalent to a theoretical plate", HETP )

**u** : lineare Strömungsgeschwindigkeit

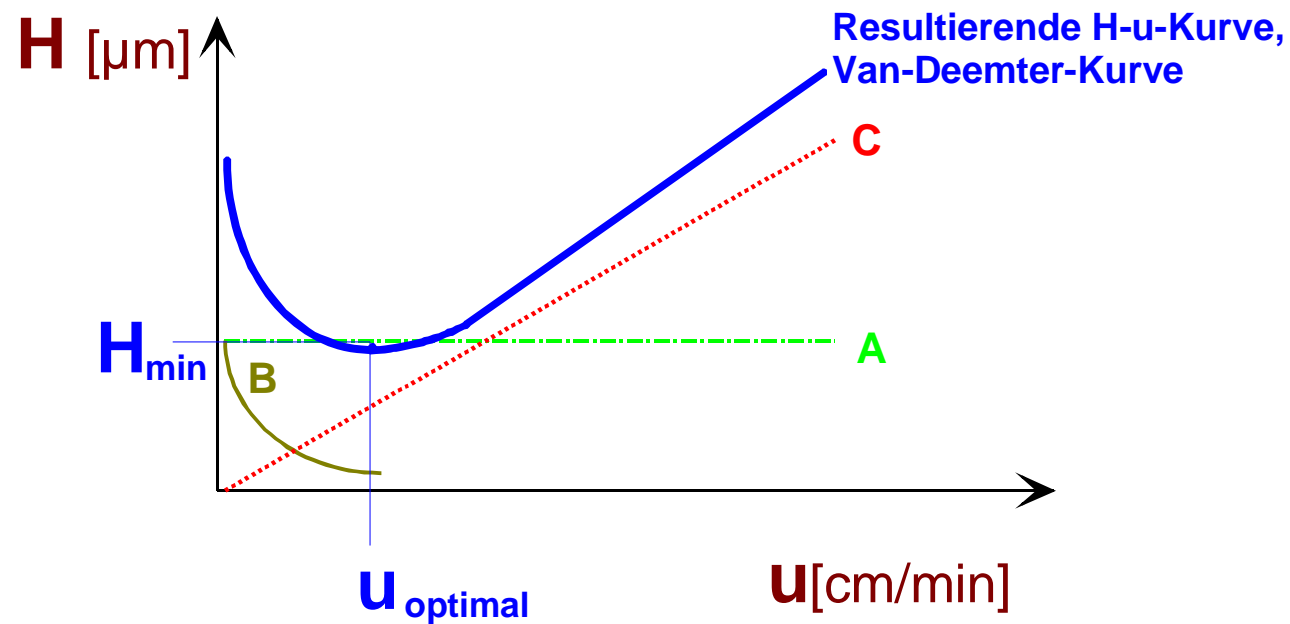
**A** : Eddy-Diffusion (Streudiffusion) + Strömungsverteilung

**B** : Längsdiffusion

**C** : Stoffaustauschphänomene

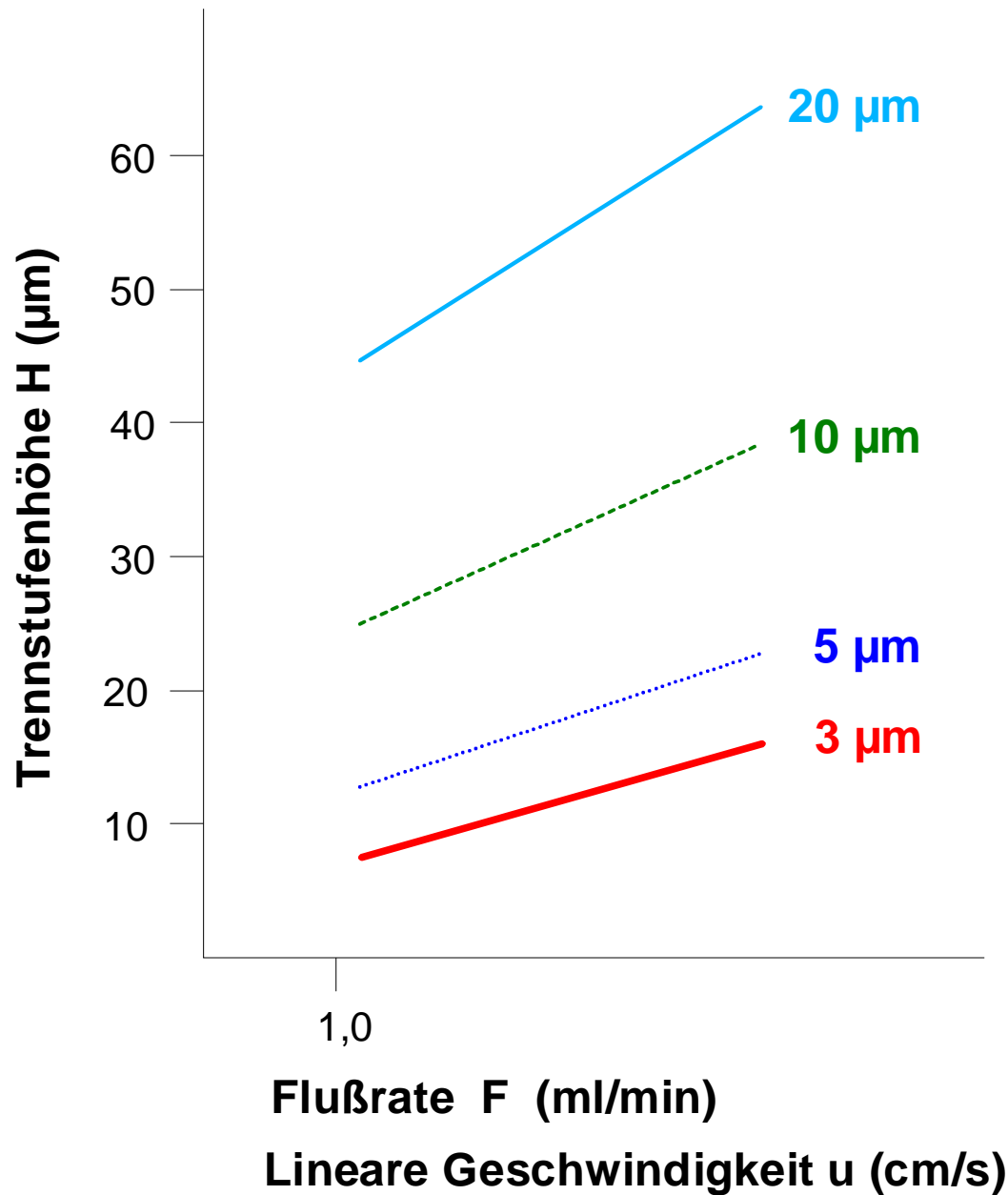
## 6.9 Bandenverbreiterung innerhalb der Säule

### Van-Deemter-Kurve

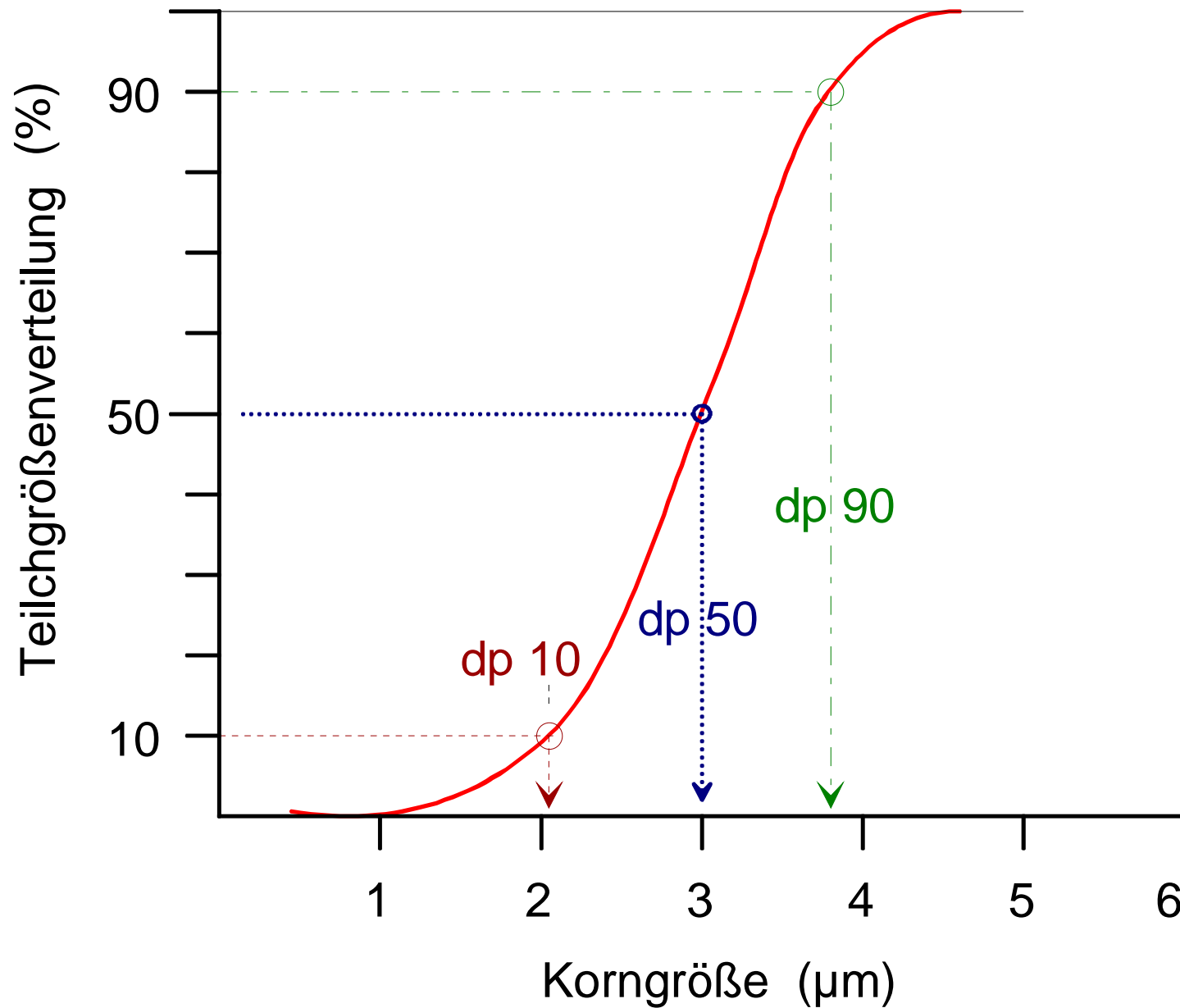


- A** Bandenverbreiterung durch Eddy-Diffusion und Strömungsverteilung
- B** Bandenverbreiterung durch Längsdiffusion
- C** Bandenverbreiterung durch Stoffaustauschphänomene

## 6.10 Partikelgröße vs. Trennstufenhöhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]

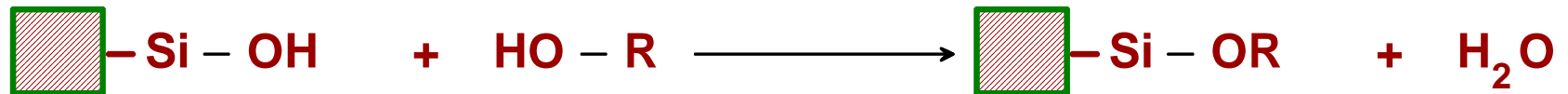


## 6.11 Partikelgrößenverteilung von 3 $\mu\text{m}$ -Material

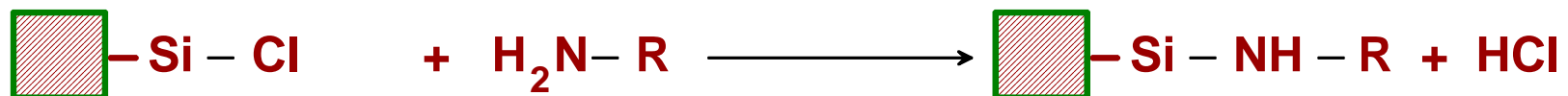
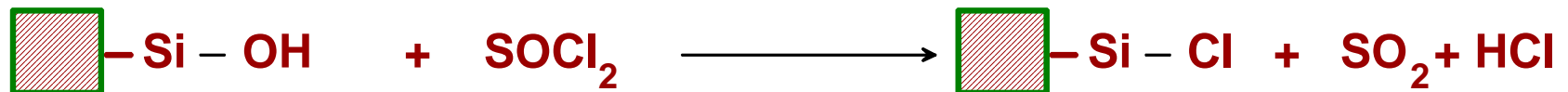


## 6.12 Chemische Modifizierung von Trennphasen

### 1. Veresterung mit Alkohol



### 2. Umsetzung mit Thionylchlorid / Aminen



## 6.12 Chemische Modifizierung von Trennphasen

### 3. Umsetzung mit Chlorsilanen



## Funktionelle Gruppen am Silicagel

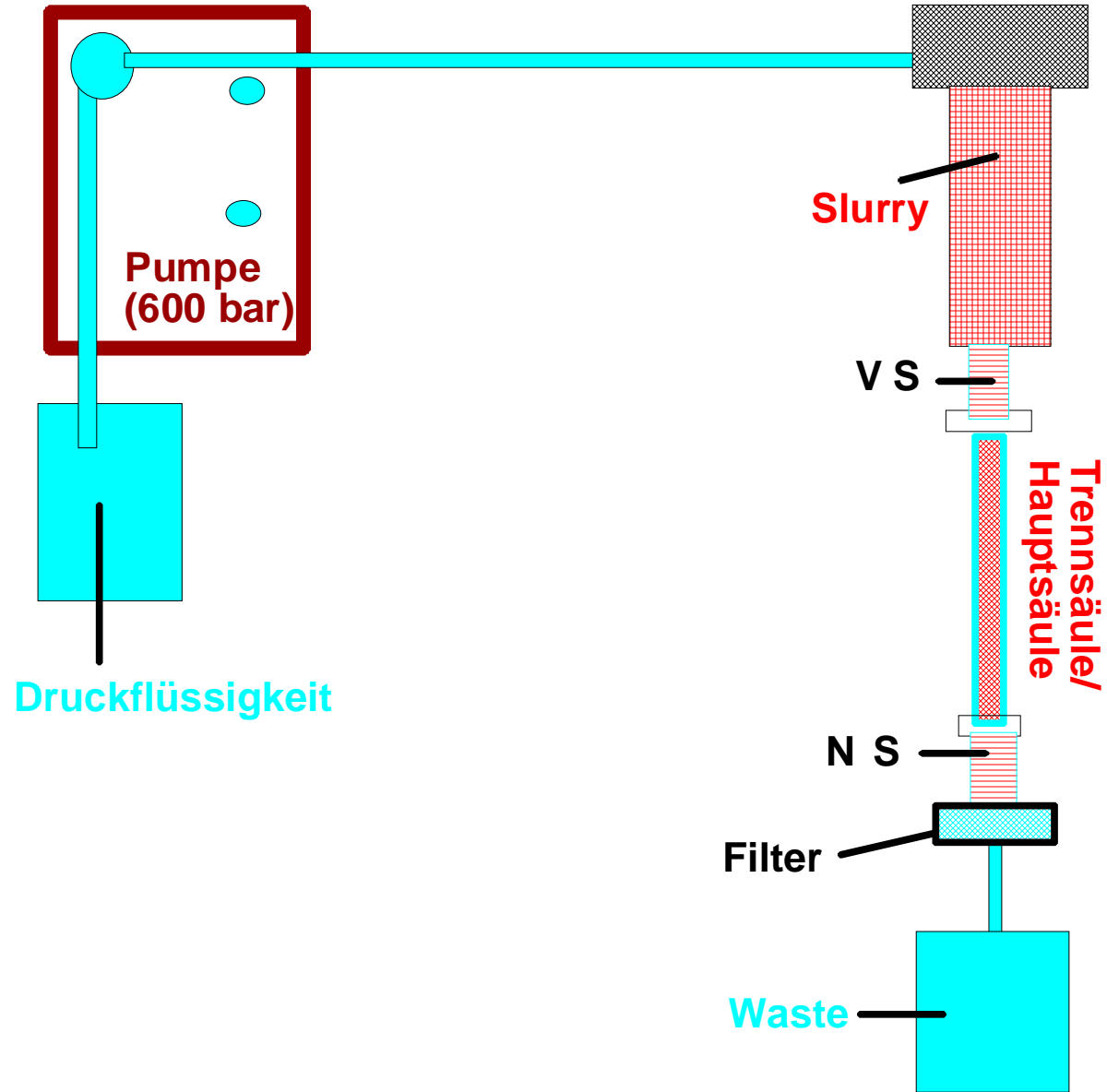
Octadecyl (ODS, C18)	- $(\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$
Octyl	- $(\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$
Hexyl	
Trimethyl	- $\text{Si} (\text{CH}_3)_3$
Phenyl	- $\text{C}_6\text{H}_5$
Dimethylamino	- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Aminopropyl	- $(\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$
Nitro	- $\text{NO}_2$
Nitril	- $\text{CN}$
Alkylnitril	- $(\text{CH}_2)_n - \text{CN}$
Hydroxyl (Diol)	- $\begin{array}{cc} \text{CH} & - & \text{CH}_2 \\   & &   \\ \text{OH} & & \text{OH} \end{array}$



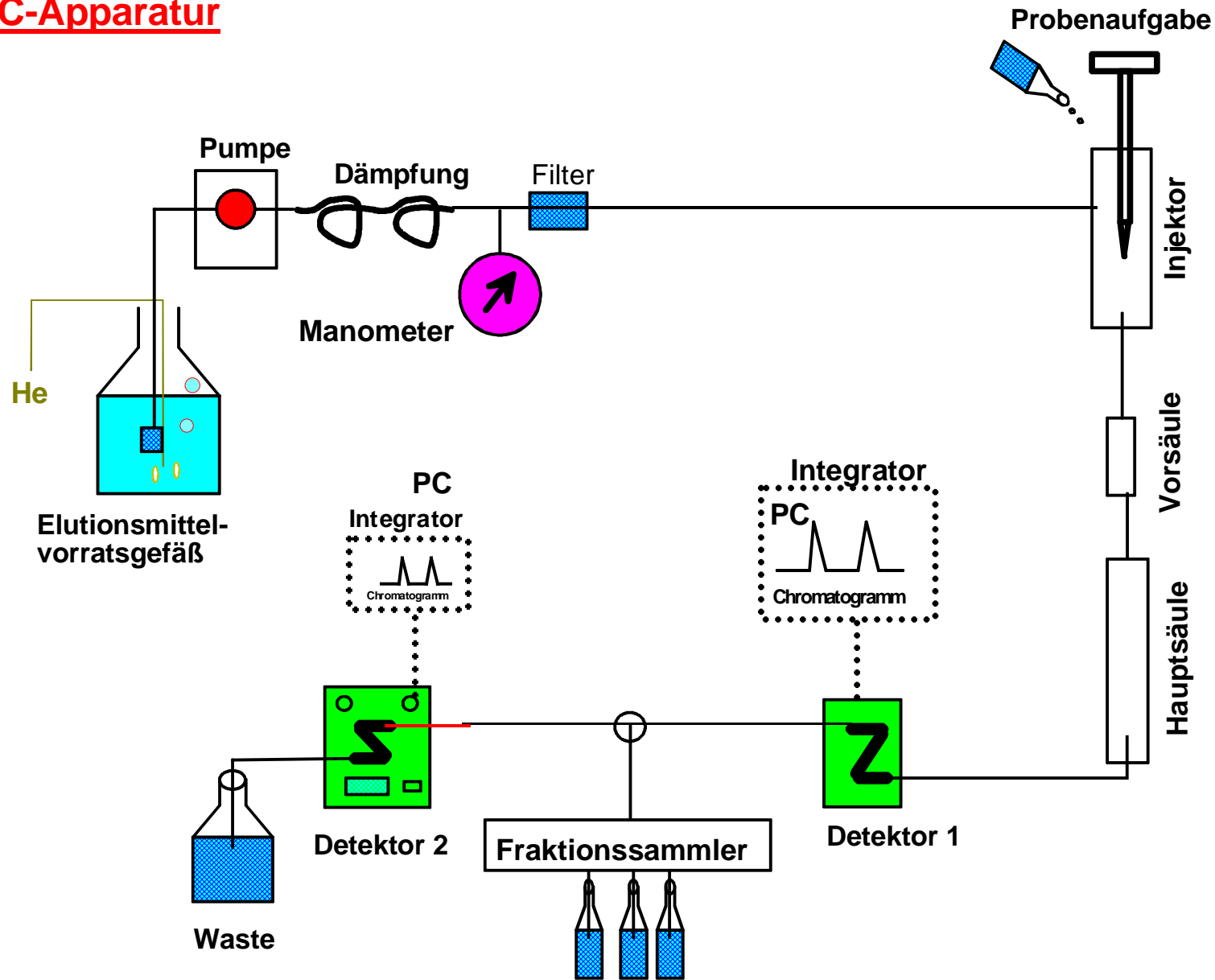
### 6.A

# Säulenfüll-Apparatur, HPLC-Apparatur

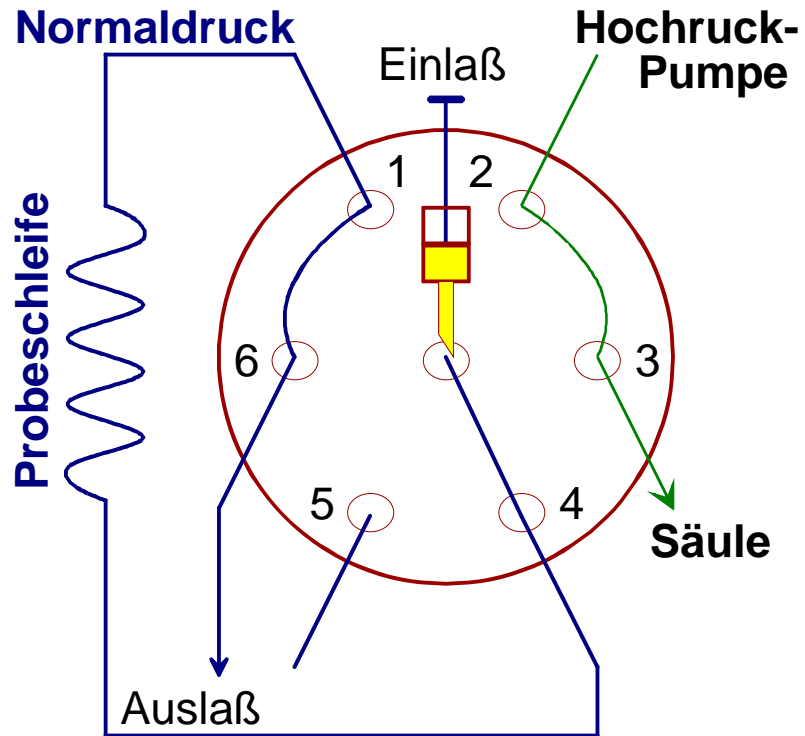
# Säulenfüllapparatur



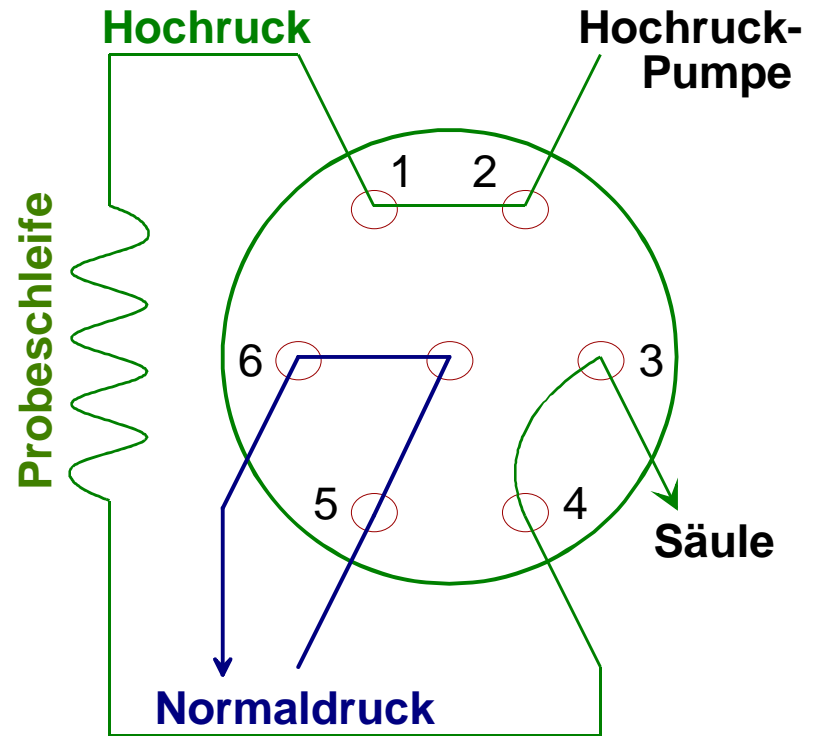
# HPLC-Apparatur



# HPLC-Injektionsventil

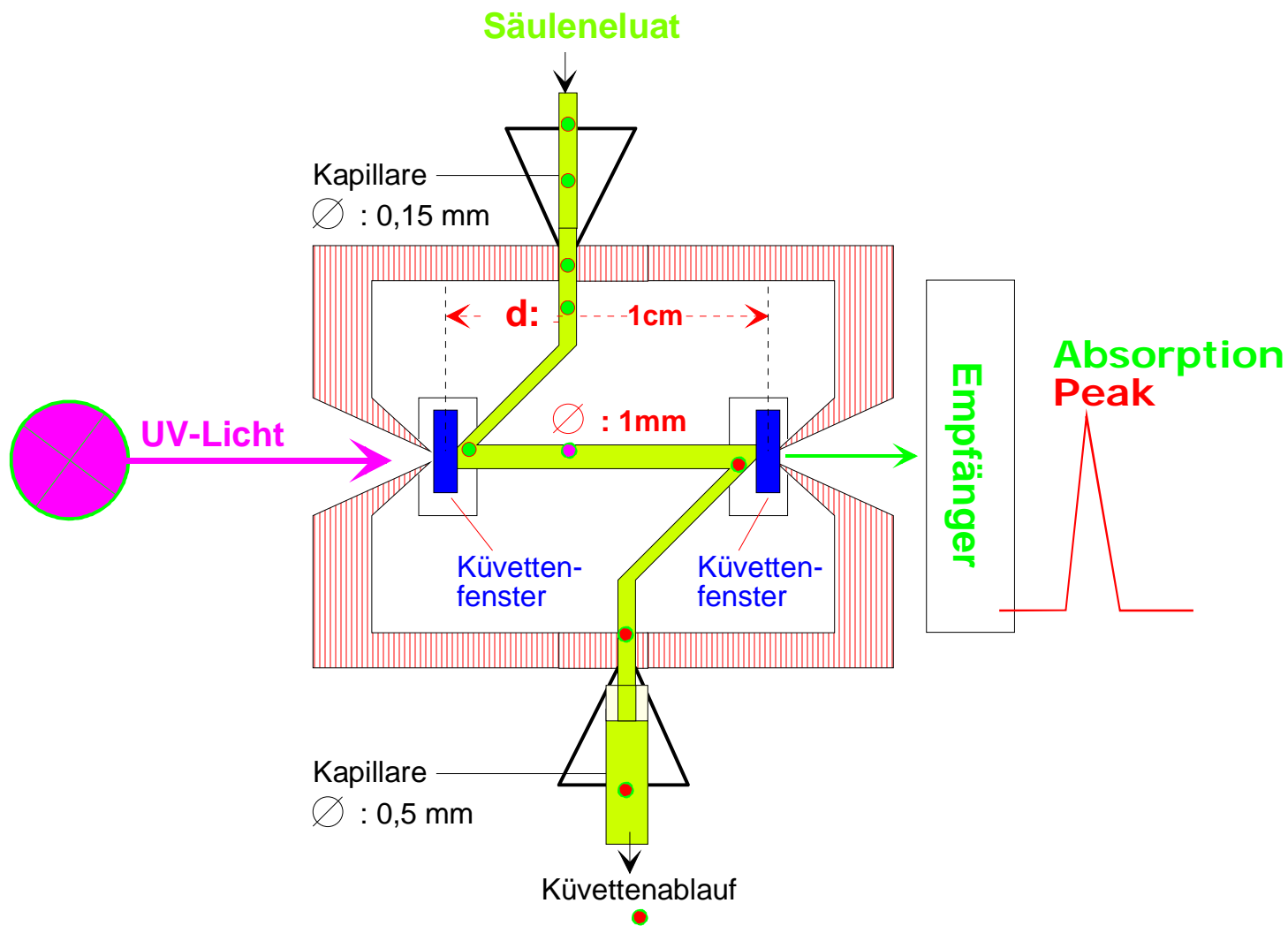


**A : Füllen der Probeschleife bei Normaldruck**

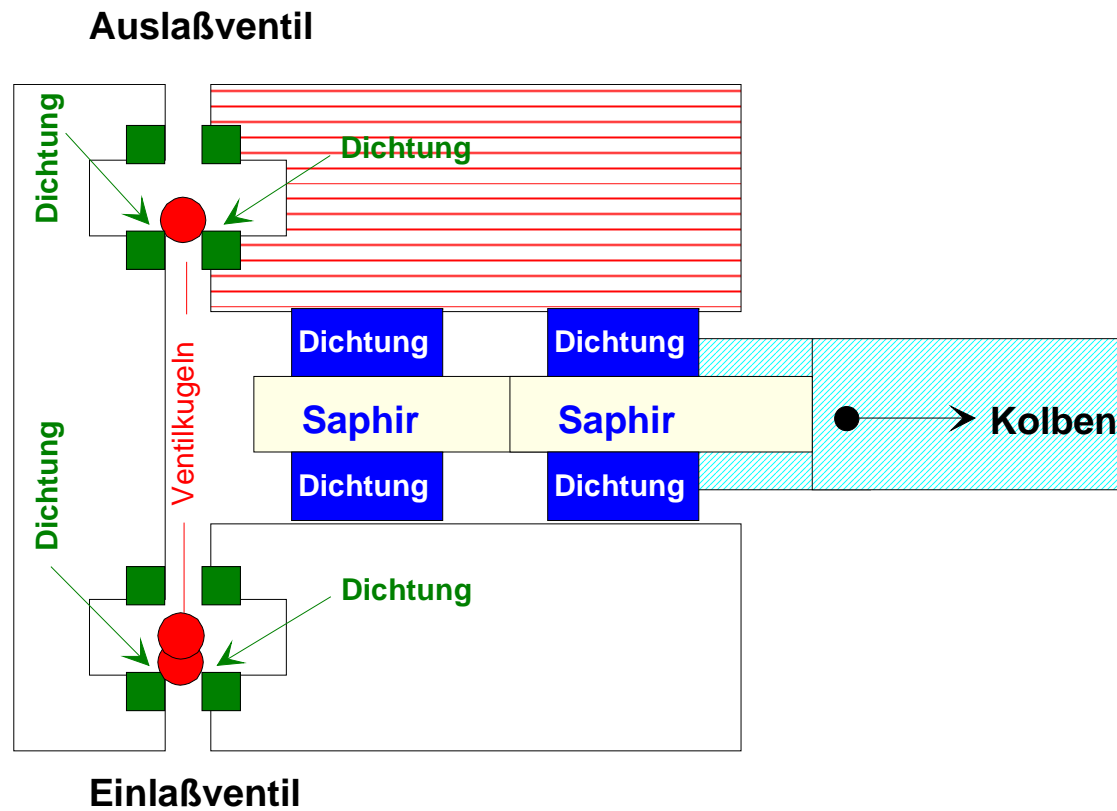


**B : Injektion der Probe auf die Säule unter Hochdruck**

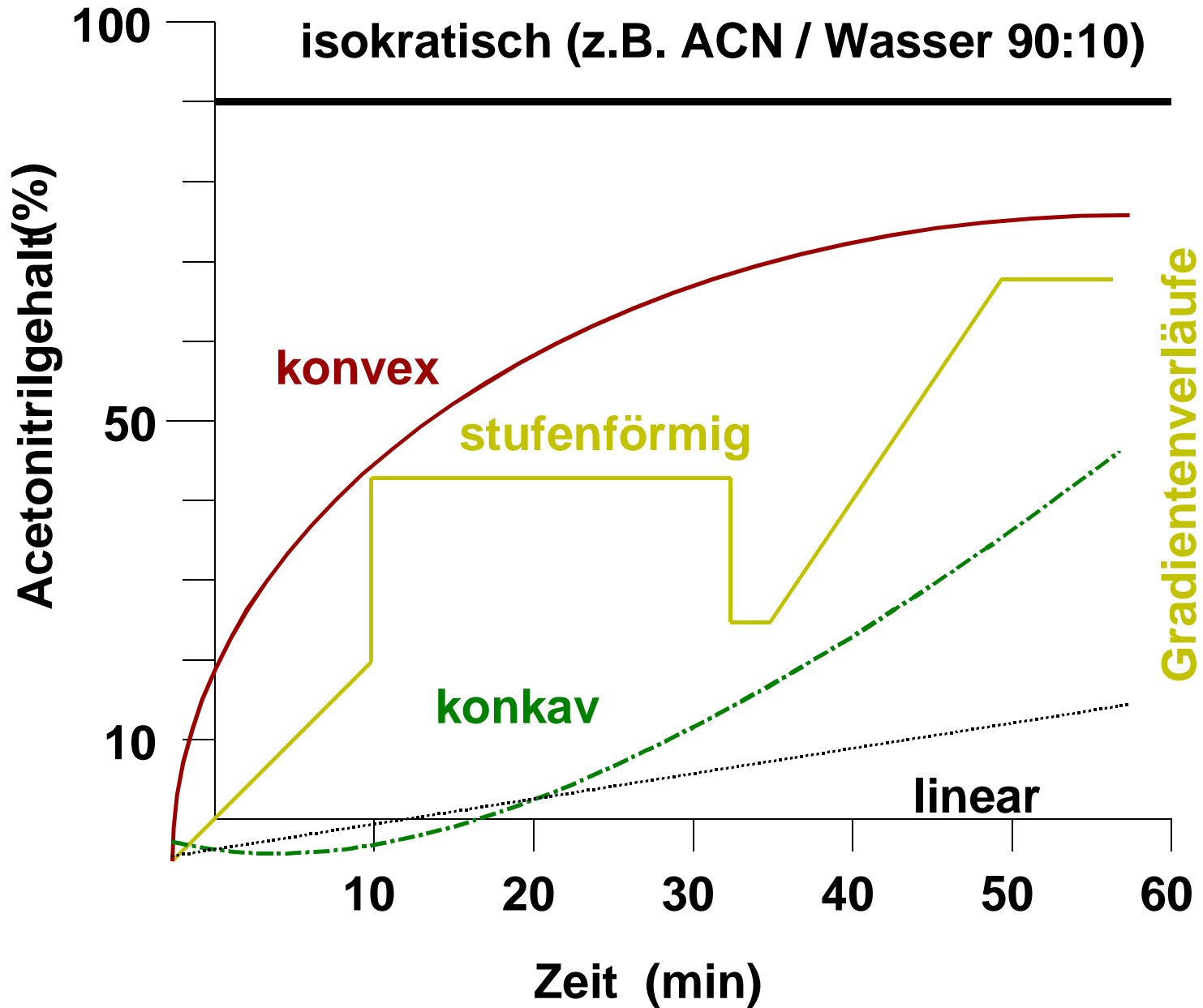
## Mikrodurchflußküvette eines HPLC-Detektors



## Funktion einer Doppelkolbenpumpe in der HPLC



# Isokratische Elution und binäre Gradienten



# Flüssig-Chromatographie

	Klassische Säulenflüssig- Flüssigchromatographie LC	Hochleistungsflüssig- chromatographie HPLC
	<b>Tswett 1906, Trennung von Pflanzenfarbstoffen</b>	<b>1965 / 68, HPLC</b>
Säulen	1m x 3 cm, Meter / cm-Bereich	25 cm x 4,6 mm (cm / mm-Bereich)
Säulen- material	Glas	Stahl, gehärtetes Glas
Stationäre Phasen	Silikagel, Aluminium- oxid	Silikagel, Polymere
Korngröße d. Füllung	100- 200 $\mu\text{m}$ oberer $\mu\text{m}$ -Bereich	3-10 $\mu\text{m}$ unterer $\mu\text{m}$ -Bereich
Eluentför- derung	Hydrostatisch, Schlauchpumpe bis max 0,5 MPa (5 bar)	Hochdruckpumpen, 1- max. 20 MPa



# Flüssig-Chromatographie

	Klassische Säulenflüssig- Flüssigchromatographie LC	Hochleistungsflüssig- chromatographie HPLC
Säulenfüll- druck	Hydrostatisch, wenige bar	40 - 80 MPa: Silikagel 10-120 bar : Polymere
Säulenvor- druck	ca. 1 bar	20 - max. 200 bar
Flußrate	mehrere ml / Stunde	ml / min
Analysenzeit	Stundenbereich	Minuten-(Sekunden) Bereich
Probemenge	Gramm-Bereich	Mikrogamm-Bereich
Bodenzahl	1-100	5000 -100 000
Anzahl der Peaks	2-10	5-50