

# Chromatographische Verfahren

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einteilung nach der Separationsfunktion.....	2
1.1 Adsorptionschromatographie.....	2
1.1.1 Allgemein.....	2
1.1.2 Chromatographische Trennbedingungen.....	2
1.2 Verteilungschromatographie.....	3
1.2.1 Allgemein.....	3
1.3. Umkehrphasenchromatographie (RP-Phasen).....	3
1.3.1 Allgemein.....	3
2. Einteilung nach Ausführungstechniken.....	3
2.1 Dünnschichtchromatographie (DC).....	3
2.1.1 Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC).....	5
2.2 Papierchromatographie (PC).....	5
2.3 Säulenchromatographie (SC/LC).....	5
2.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	6
2.3.2 Ionenaustauschchromatographie.....	6
2.3.3 Größenausschlusschromatographie.....	7
2.4 Gaschromatographie (GC).....	7
2.4.1 Allgemein.....	7
2.4.2 Aparativer Aufbau.....	8
2.5 Molekularsiebe.....	9

# 1. Einteilung nach der Separationsfunktion

## 1.1 Adsorptionschromatographie

### 1.1.1 Allgemein

- Adsorption = Grenzflächenreaktion zwischen einer gasförmigen oder flüssigen Phase und einem festen Stoff  $\Rightarrow$  Anreicherung des Adsorbats an der Phasengrenzfläche
- Bindung polarer Gruppen an der Oberfläche des Sorbens Kieselgel beruht auf
  - der Ausbildung von Wasserstoffbrücken; die mobile Phase sorgt dafür, dass die Wasserstoffbrückenbindungen wieder gelöst werden
  - Dipol-Dipol-Wechselwirkungen
  - der Bildung von  $\pi$ -Komplexen
- es stellt sich ein temperaturabhängiges Gleichgewicht ein; bei hohen Temperaturen kann weniger Substanz adsorbiert werden als bei niedrigeren Temperaturen
- Substratmoleküle konkurrieren mit den Molekülen der mobilen Phase um die adsorptionsaktiven Zentren des Sorbens
- je größer die Oberfläche des Sorbens, desto mehr Substanz kann adsorbiert werden

### 1.1.2 Chromatographische Trennbedingungen

- wichtige Parameter:
  - die Zusammensetzung der Probe (in der Regel nicht veränderbar)
  - die stationäre Phase (Adsorbens)
  - die mobile Phase (Fließmittel)
- *Stationäre Phase:*
  - muss polar sein
  - feinkörnige Materialien mit einer sehr großen (inneren und äußeren) Oberfläche, z. B. Kieselgel
  - Aktivität [*Stärke, mit der ein Sorbens einen Stoff bindet*] sehr wichtig; bleiben die übrigen Parameter konstant, so führt eine Aktivitätserhöhung zur stärkeren, eine Aktivitätserniedrigung zur schwächeren Retention
  - Aktivitätsverringern wird durch Belegung eines Teils der aktiven Gruppen mit Wasser oder anderen polaren Verbindungen erzielt  $\Rightarrow$  in der DC [*Dünnschichtchromatographie*] und der HPTLC [*Hochleistungs-dünnschichtchromatographie*] hängt die Aktivität des Sorbens stark von der relativen Luftfeuchtigkeit ab, der die Schicht ausgesetzt ist
  - stationäre Phasen mit kleinen Partikeln bei möglichst einheitlicher Korngröße führen zu sehr guten Trennleistungen
  - durch sehr kleine Zwischenkornvolumina wird der Fleckvergrößerung entgegengewirkt
- *Mobile Phase:*
  - Flüssigkeit **in** der Schicht im lokalen Gleichgewicht mit der stationären Phase
  - je stärker die Elutionskraft eines Fließmittels ist, desto schwächer wird eine hierin gelöste Substanz adsorbiert, d. h. um so geringer ist die Retention

## **1.2 Verteilungschromatographie**

### **1.2.1 Allgemein**

- das System besteht aus zwei nicht oder nur begrenzt miteinander mischbaren Flüssigkeiten und einem dritten in beiden Phasen löslichen Stoff
- Grundlage ist der NERNST'sche Verteilungssatz [„Wenn ein Stoff A die Möglichkeit hat, sich zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen (z. B. einer gasförmigen und einer flüssigen Phase oder zwei flüssigen Phasen) physikalisch zu verteilen, so führt diese Verteilung wie bei einer chemischen Reaktion zu einem Gleichgewicht“]
- Trennung der Stoffe auf Grund von unterschiedlichen Löslichkeitsprodukten
- die stationäre Phase ist grundsätzlich eine Flüssigkeit, die auf dem Trägermaterial physikalisch adsorbiert ist
- Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase ist nur im Idealfall konzentrationsunabhängig, in der Praxis (besonders bei höheren Konzentrationen) konzentrationsabhängig; für korrekte, reproduzierbare chromatographische Trennungen sollte man daher mit möglichst geringen Probemengen im konzentrationsunabhängigen Bereich von K arbeiten
- der Verteilungskoeffizient  $K = \frac{c_s}{c_m}$  [ $c_s$  = Konz. in der stationären Phase;  $c_m$  = Konz. in der mobilen Phase] ist abhängig von der Art der Phasen, der Temperatur und dem Druck
- befriedigende Stofftrennungen gibt es nur, wenn die zu trennenden Substanzen hinreichend unterschiedliche Werte für K aufweisen

## **1.3. Umkehrphasenchromatographie (RP-Phasen)**

### **1.3.1 Allgemein**

- durch eine chemische Veränderung von Kieselgel wird die stationäre Phase unpolar (Ersatz der polaren OH-Gruppe gegen unpolare, langkettige Kohlenstoffreste)
- Trennprinzip entspricht überwiegend dem der Verteilungschromatographie
- Stofftrennung erfolgt hauptsächlich auf Grund von Löslichkeitsunterschieden in der stationären Phase
- in Abhängigkeit vom Elutionsmittel können sowohl unpolare, als auch mittelpolare und mäßig polare Substanzen analysiert werden
- meist nicht bei pH > 8 anwendbar
- Elutionsstärke der Lösemittel in der eluotropen Reihe [Auflistung der in der Chromatographie verwendeten Fließmittel entsprechend ihrem Elutionsvermögen (Polarität)] kehrt sich um

## **2. Einteilung nach Ausführungstechniken**

### **2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)**

- das pulverig-körnige Adsorptionsmittel wird in gleichmäßiger, dünner Schicht auf geeignete Träger (Glasplatten, Metall- und Kunststofffolien) aufgebracht
- als Fließmittel dienen organische Lösemittel(gemische)
- Kieselgel als stationäre Phase
- in der Mitte des Substanzflecks ist die Konzentration am höchsten; der Fleck wandert mit der mobilen Phase nicht nur nach oben sondern diffundiert auch in die Umgebung  $\Rightarrow$  Fleckvergrößerung
- *Selektivität:*
  - gibt an, ob ein chromatographisches System in der Lage ist, zwei oder mehr Substanzen einer Probe zu trennen
  - großer Fleckabstand = hohe Selektivität

- kleiner Fleckabstand = geringe Selektivität
- **Trennleistung:**
  - ist an der Fleckvergrößerung erkennbar
  - $N = 5,54 \cdot \left(\frac{x}{w}\right)^2$  [*x: zurückgelegte Strecke der Substanz vom Startpunkt; w: Fleckdurchmesser*]
  - großes N: gute Trennleistung (kleiner Fleck)
  - kleines N: schlechte Trennleistung (großer Fleck)
- **Auflösung:**
  - $R_s = \frac{2d}{(w_1 + w_2)}$  [*d: Abstand der Fleckmittelpunkte zweier benachbarter Flecke*]
- **R<sub>f</sub>-Wert:**
  - $R_f = \frac{\text{Verbindungsstrecke Substanz}}{\text{Verbindungsstrecke Laufmittel}} \leq 1$  [*R<sub>f</sub>: Retentionsfaktor*]
- **R<sub>st</sub>-Wert:**
  - $R_{st} = \frac{\text{Verbindungsstrecke Substanz}}{\text{Verbindungsstrecke Standard}}$   $1 < R_{st} \leq 1$
  -

<b>Probe</b>	<b>Fließmittel</b>	<b>Teilchen</b>
polar	unpolar	wandern nicht
polar	polar	wandern
unpolar	polar	wandern, aber keine Trennung, da keine WW mit Kieselgel
unpolar	unpolar	Trennung möglich
- **Detektion:**
  - ◆ ohne chemische Reaktion
  - ◆ Farbreaktionen auf der Schicht
    - unspezifische Nachweise organischer Verbindungen
    - Nachweis funktioneller Gruppen
    - Nachweis von Substanzklassen
- **quantitative Bestimmung:**
  - ◆ Methode:
    - man kratzt den Fleck, der auf der selben Höhe wie die Referenzsubstanz liegt ab, löst die Substanz in Methanol, zentrifugiert, überführt in eine Küvette und bestimmt spektrometrisch
  - ◆ Methode:
    - direkte Auswertung durch Aufstrahlung von monochromatischem Licht
    - Kieselgel absorbiert kein Licht, die Substanz jedoch schon ⇒ schwarze Flecke
    - Absorption in der Mitte des Flecks am größten
    - Auswertung der erhaltenen Konzentrationskurve durch Berechnung der Fläche unter der Kurve
- **Mehrfachentwicklung:**
  - bei nicht ausreichend getrennten Substanzen trocknet man die DC-Platte und entwickelt sie nochmal, gegebenenfalls mit einem anderen Fließmittel

### 2.1.1 Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)

- besonders kleine und gleichmäßige Korngrößenverteilung
- *Vorteile gegenüber der DC:*
  - relativ größere Oberfläche ⇒ häufigere WW ⇒ bessere Trennleistung ⇒ geringere Fleckvergrößerung
  - horizontale Fließrichtung ⇒ höhere Kapillarkräfte ⇒ verkürzte Entwicklungszeit ⇒ geringere Diffusion ⇒ kleinere Flecken, da kleinere Zwischenkornvolumina ⇒ bessere Nachweisgrenze, da konzentrierte Flecke besser zu erkennen sind
  - geringerer Fließmittelverbrauch ⇒ geringere Kosten ⇒ geringere Umweltbelastung
  - geringere Substanzmengen
- *Nachteile:*
  - Plattenmaterial teuer
  - exaktes Auftragen der sehr kleinen Volumina erfordert etwas Übung

### 2.2 Papierchromatographie (PC)

- als Träger dient saugfähiges Papier (möglichst einheitlicher Struktur), das mit Wasser des Fließmittels die stationäre Phase bildet
- *Nachteile:*
  - stationäre Phase ungleichmäßig, da es sich um ein Naturprodukt handelt
  - Laufstrecke ist unbegrenzt
  - geringe Trennleistung
  - schlechte Reproduzierbarkeit, da es sich um ein unregelmäßiges Naturprodukt handelt
  - hoher Zeitaufwand
  - da keine Fluoreszenzindikatoren benutzt werden können, ist die Detektion schwierig
- *Vorteil:*
  - geringe Kosten
  - auch extrem polare Stoffe können getrennt werden
  - Trennung stark hydrophober Stoffe
- *Techniken:*
  - Fließmittel aufsteigend oder absteigend
- *Anwendung:*
  - Trennung hydrophiler Substanzen, z. B. Zucker, Aminosäuren, Glycoside, Carbon-säuren, anorganische Salze
  - Identitäts- und Reinheitsprüfung einiger radioaktiver Arzneimittel (Prüfung auf radiochemische Reinheit); überprüft wird, welcher Stoffe radioaktiv ist, nicht welche Ordnungszahl er hat
  - zur Trennung von hydrophoben Stoffen wird das Papier modifiziert

### 2.3 Säulenchromatographie (SC/LC)

- das Sorptionsmittel wird in eine senkrecht stehende Säule eingefüllt
- die Analysesubstanzen werden als Lösung auf das Sorptionsmittel gegeben und mit dem Fließmittel durch die Säule transportiert
- die Substanzen verweilen unterschiedlich lange in der Säule und können so selektiert werden

### 2.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

- Form der SC bei der das Fließmittel mit Hilfe von Pumpen durch die Trennsäule gedrückt wird
- kleine und gleichmäßig geformte Teilchen der stationären Phase  $\Rightarrow$  hohe Trennleistung
- kleine Teilchen  $\Rightarrow$  hohe Packungsdichte  $\Rightarrow$  Widerstand; Lösung: man arbeitet mit Druck
- Trennung von nahezu allen löslichen organischen und anorganischen Arzneistoffen
- isokratische Elution:
  - während einer Trennung wird die Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches (mobile Phase) nicht kontinuierlich verändert
- Elutionsmittelgradient:
  - zur besseren Trennung mancher Substanzgemische verändert man während der Trennung kontinuierlich die Zusammensetzung der mobilen Phase  $\Rightarrow$  polarer Anteil in der mobilen Phase erhöht sich  $\Rightarrow$  die Substanzen treten weniger stark in Wechselwirkungen mit der mobilen Phase  $\Rightarrow t_r \downarrow \Rightarrow$  Signale werden deutlicher
- Elutionsmittel:
  - muss sehr rein sein  $\Rightarrow$  Verhindern von Störsignalen
  - muss gasfrei sein
  - gängige Elutionsmittel:
    - ◆ (halogenierte) Kohlenwasserstoffe, Tetrahydrofuran, Dioxan  $\Rightarrow$  unpolar
    - ◆ Wasser, Acetonitril, Methanol, Propanol, THF, Dioxan  $\Rightarrow$  polar
- Säulenfüllung: Kieselgel (polar)
- Verwendung kleinerer Säulen als bei der klassischen SC
  - $\Rightarrow$  geringerer Lösungsmittelverbrauch
  - $\Rightarrow$  kürzere Analysendauer
- Detektoren:
  - UV/Vis-Detektoren
  - Dioden-Array-Detektoren
  - Fluoreszenz-Detektoren
  - Brechzahl-Detektoren
  - Polarimeter-Detektoren
  - Leitfähigkeitsdetektoren
  - elektrochemische Detektoren
- Arbeit im ng –  $\mu$ g-Bereich

### 2.3.2 Ionenaustauschchromatographie

- Ionenaustauscher = Stoffe, die aus Lösungen Kationen oder Anionen aufnehmen und dafür im Austausch eine äquivalente Menge anderer Ionen gleichen Vorzeichens an die Lösung abgeben
- Matrix besteht aus einem Polykationengerüst (oder Polyanionengerüst), das meist als funktionelle Gruppen Sulfonsäure- (Kationenaustauscher) oder Ammoniumgruppen (Anionenaustauscher) trägt; die Gruppen können fest an die Matrix gebunden oder als flüssiger Ionenaustauscher auf die Matrix aufgebracht sein
- wichtigste Gruppe von Ionenaustauschern ist die der Polymerisations- oder Polykondensationsharze (Kunstharze)
- nach den funktionellen Gruppen unterscheidet man stark- bis schwachsaure Kationen- sowie stark- bis schwachbasische Anionenaustauscher
- schwer bestimmbare Kationen (Anionen) lassen sich nach der Durchführung der Ionenaustauschchromatographie an Hand der äquivalenten Menge freigesetzter  $H^+$ -Ionen ( $OH^-$ -Ionen) acidimetrisch bestimmen; Nachteil: Methode ist nicht sehr selektiv, da praktisch alle Kationen (Anionen) ausgetauscht werden und der bestimmte Gehalt folglich auch von

- anwesenden Verunreinigungen abhängig ist
- das Gleichgewicht zwischen den Ionen der Analyse und den Ionen des Austauschers kann über den pH-Wert und die Ionenstärke der mobilen Phase beeinflusst werden
- **Ionenchromatographie (IC):**
  - „echtes“ chromatographisches Verfahren, Hochleistungsvariante der Ionenaustauschchromatographie
  - durch die verschiedenen hohe Selektivität der Ionen zu dem Ionenaustauscher entstehen an den aktiven Gruppen des Austauschers unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten, wodurch die zu analysierenden Ionen in einer bestimmten zeitlichen Abfolge die Trennsäule verlassen; detektiert werden diese Ionen (meist) konduktometrisch

### 2.3.3. Größenausschlusschromatographie

- Auftrennung von (Makro)Molekülen allein auf Grund der Molekülgröße mit Hilfe eines gequollenen Polymers (Gelnetzwerk)
- die zu trennenden Moleküle diffundieren in alle Poren des Polymers, die ihnen wegen ihrer Größe nicht versperrt bleiben (eigentlich kein richtiges chromatographisches Verfahren, da keine stationäre Phase vorhanden)
- die kleineren Moleküle können tiefer eindringen und werden deshalb länger im Gel festgehalten, zu große Teilchen wandern an der Gelstruktur vorbei und verlassen als erste die Säule
- die Substanzen erscheinen im Eluat der Säule in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße (oben kleine Teilchen, unten große Teilchen)
- häufig benutzte Materialien: Dextrane, Agarose, Polyacrylamide und Polystyrole
- Anwendung:
  - Bestimmung der Molekülmassen von synthetischen Polymeren und von Proteinen
  - Reinheitsprüfung von Proteinen; z. B. Unterscheidung von Insulin und Proinsulin, die nur auf diese Weise getrennt werden können, da sie für andere Verfahren zu groß sind
  - Isolierung und/oder präparative Gewinnung von Proteinen

## 2.4 Gaschromatographie (GC)

### 2.4.1. Allgemein

- Trennverfahren bei dem Substanzen in gas- oder dampfförmigem Zustand durch Adsorptions- oder Verteilungschromatographie untersucht werden
- **Adsorptionschromatographie:** Adsorption der gasförmigen Substanzen an der Oberfläche von festen Sorbentien (stationäre Phase)
- **Verteilungschromatographie:** Verteilung der gasförmigen Substanzen zwischen einer Flüssigkeit (Trennflüssigkeit) als stationäre Phase und einem Trägergas als mobile Phase (H, He, N, Ar...)
- geeignet sind nur Substanzen, die gasförmig vorliegen oder sich unzersetzt in die Gasphase überführen lassen (Probe muss schlagartig verdampfen)
- qualitative und quantitative Analyse von Stoffgemischen
- geringer Substanzbedarf ng – µg-Bereich

## 2.4.2 Aparativer Aufbau

- Bauteile: Gasversorgung, Probengeber, Trennsäule und Detektor
- Probengeber und Trennsäule müssen beheizt werden da
  - $T \sim$  Dampfdruck der Probe,  $T \uparrow \Rightarrow$  Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit  $\Rightarrow t_r \downarrow$
  - $1/T \sim$  Löslichkeit der Probe in der stationären Phase  $\Rightarrow$  wenn  $T \uparrow \Rightarrow L \downarrow \Rightarrow$  Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit (s. o.)
  - $T \sim 1/t_r \Rightarrow T \uparrow t_r \downarrow$
  - bei höheren Temperaturen werden die Signale der Stoffe, die länger in der Säule bleiben deutlicher, aber die Signale am Anfang sind nicht mehr klar zu erkennen; Lösung: Verwendung eines Temperaturprogramms, man steigert T erst nach einer bestimmten Zeit  $\Rightarrow t_r \downarrow$ ; z. B. bis 5 min  $35^\circ\text{C}$ ,  $5^\circ\text{C}/\text{min} \Rightarrow$  nach 3 weiteren Minuten (also 8 min insgesamt) hat man  $50^\circ\text{C}$
- 2 Arten von Trennsäulen:
  - „gepackte“ Säule
    - ◆  $\varnothing 2 - 4 \text{ mm}$
    - ◆ stationäre Phase: Kieselgel, Aluminiumoxid, Kieselgur
  - Kapillarsäule
    - ◆  $\varnothing 0,1 - 0,75 \text{ mm}$
    - ◆ nicht gefüllt
    - ◆ stationäre Phase: Flüssigkeitsfilm
  - Zusatz von Trennflüssigkeit  $\Rightarrow$  Verteilungschromatographie (LGC)
  - ohne Zusatz von Trennflüssigkeit  $\Rightarrow$  Adsorptionschromatographie (SGC)
- Trennflüssigkeit:
  - chemisch inert, thermostabil, mechanisch stabil
  - Alkane/Paraffine (unpolar)
  - Silikonöle (unpolar bis polar)
  - PEG (polar)
  - Siloxan
- Trägergas:
  - chemisch inert
  - gute Trenneigenschaften
  - geeignet für Detektor
  - nicht brennbar
  - preiswert
- Detektoren:
  - **Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)**
    - ◆ Trägergas: H, He
    - ◆ der von der Säule kommende Gasstrom wird an einem Heizdraht vorbei geführt  $\Rightarrow$  Abkühlung des Drahtes
    - ◆ die Analysesubstanz kühlt den Draht weniger ab
    - ◆ die Temperaturerhöhung wird als Änderung des elektrischen Widerstandes gegenüber einem Referenzelement gemessen
    - ◆ detektiert  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  u. ä.
    - ◆ um mehrere Zehnerpotenzen unempfindlicher als FID
  - **Flammenionisationsdetektor (FID)**
    - ◆ Trägergas: He, N
    - ◆ Anwendung nur bei organischen Substanzen, bevorzugt Kohlenwasserstoffen
    - ◆ die aus der Säule heraustretenden Substanzen werden in der Bunsenbrennerflamme vollständig verbrannt  $\Rightarrow$  Entstehung von Ionen
    - ◆ durch Einbringen in ein elektrisches Feld kann jedes entstandene Ion, das an der Anode ankommt, detektiert werden

- ◆ Stoffe, die nicht oxidierbar sind, können nicht detektiert werden, z. B. H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> u. ä.
- **Elektroneneinfangdetektor (ECD)**
  - ◆ Trägergas: N, Ar
  - ◆ Einsatz von β-Strahlung (e<sup>-</sup>)
  - ◆ Eluat wird in eine Ionisationskammer geleitet ⇒ nimmt e<sup>-</sup> auf ⇒ Wanderung zur Anode ⇒ Messung eines geringeren Ladungsstroms
- Anwendungsgebiete:
  - ätherische Öle (Identität, Reinheit, Gehalt einzelner Komponenten)
  - Fette Öle (nach Derivatisierung, Identität, Reinheit)
  - Lösemittel (Identität, Reinheit)
  - Arzneistoffe (Identität, Reinheit)
  - Bestimmung von Stoffwechselprodukten (Metabolismusuntersuchungen, Blutspiegelmessungen)
  - Identifizierung von Arzneistoffen oder Giften bei Vergiftungen (GC-MS-Kopplung)

## 2.5 Molekularsiebe

- synthetische Zeolithe (Aluminiumsilikate), deren Kristallgitter unendlich viele innere Hohlräume enthält, die untereinander durch Poren mit genau definiertem und jeweils absolut gleichem Durchmesser verbunden sind
- zeolithische Adsorbentien zeichnen sich aus durch
  - extrem große Adsorptionsflächen
  - sehr hohe Adsorptionskräfte
  - Zuführungsporen (3 bis 10 Å je nach Molekularsieb) zu den Adsorptionshohlräumen
- nur Moleküle mit kleinerem Durchmesser als der Porendurchmesser erreichen die Adsorptionshohlräume, wo sie in der Reihenfolge zunehmender Polarität adsorbiert werden
- Einsatz:
  - Trocknungsprozesse (Adsorption von Wasser)
  - Reinigungsprozesse
  - Trennprozesse
- Zeolithe können wieder regeneriert werden, z. B. durch:
  - Temperaturerhöhung (ca. 150°C)
  - Druckerniedrigung
  - Verdrängung mit einem Spülmedium (z. B. Stickstoff)