

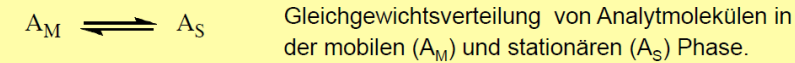
Analytischer Prozess

- 1) Probenahme
- 2) Probenaufarbeitung
- 3) Messung (Anwendung analytischer Techniken)
- 4) Auswertung & Statistik
- 5) Berichterstattung & Beurteilung der Ergebnisse
- 6) Bei eigener Analyseverfahren berücksichtigen

Chromatographie-Check

- Trenntechnik
- Zwei nicht mischbare Phasen
- Eine mobile und eine stationäre Phase
- Trennung beruht auf der Verteilung von Substanzen zwischen den Phasen
- Kontinuierliche Abfolge von Gleichgewichtseinstellungen

Verteilungskonstante (Verteilungskoeffizient) K_C :



Nernstsches Verteilungsgesetz

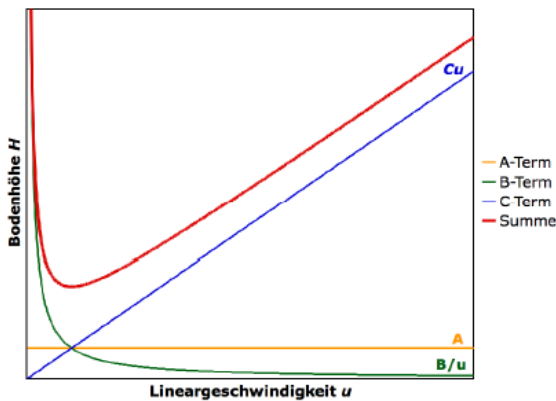
$$K_C = \frac{c_S}{c_M} = \frac{\text{Analytkonzentration in der stationären Phase}}{\text{Analytkonzentration in der mobilen Phase}}$$

Bei gegebener stationärer und mobiler Phase ist K_C für einen Analyten bei konstanter Temperatur eine Konstante.

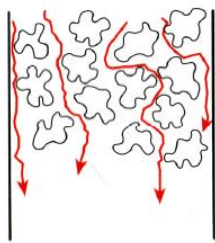
Phasenverhältnis β :

$$\beta = \frac{V_M}{V_S} = \frac{\text{Volumen der mobilen Phase}}{\text{Volumen der stationären Phase}}$$

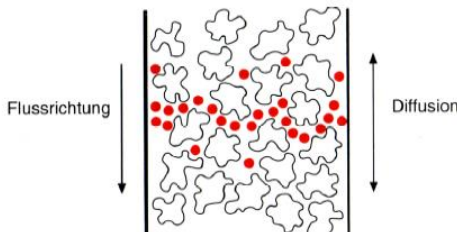
Van-Deemter-Gleichung



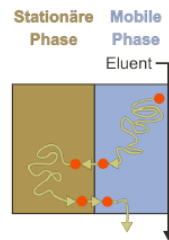
$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$



A: Eddy-Diffusion



B: Longitudinal-Diffusion

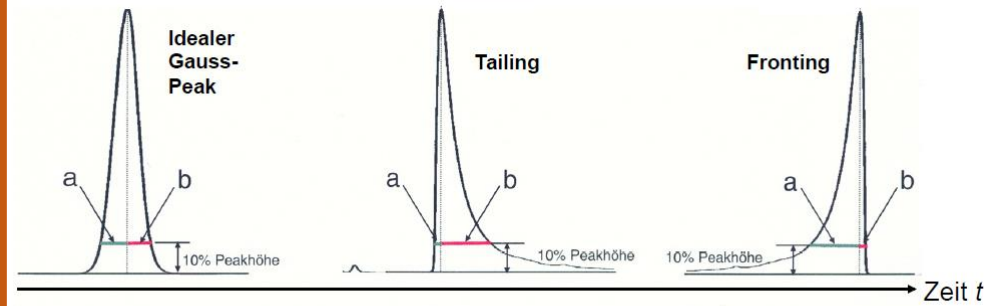


C: Massentransport-Effekte

Je kleiner H , umso mehr theoretische Böden und umso **effizienter** die Trennung (\rightarrow schmalere Peaks)

Je höher A , B und C , umso **ineffizienter** die Trennung

Asymmetrische Peaks



Asymmetriefaktor oder Tailingfaktor nach IUPAC (bei 10% Peakhöhe): $T = \frac{b}{a}$

Unsymmetrische Peaks meist wegen **Überladungseffekten** bei hohen Analytkonzentrationen

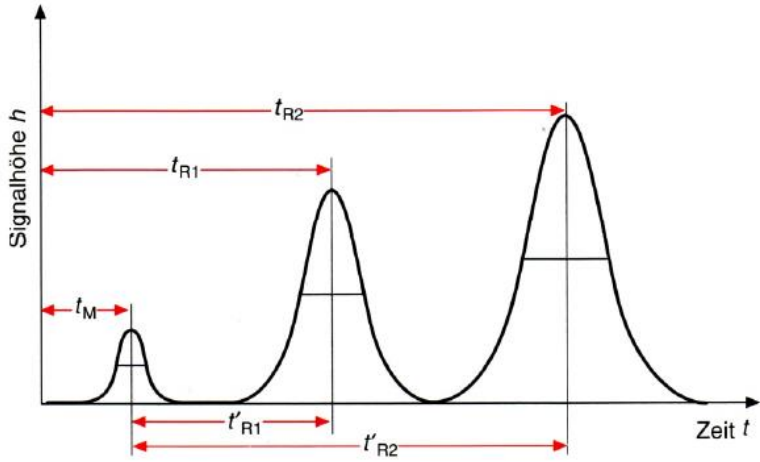
Überladung mobiler Phase (Fronting):

Analyt in stationärer Phase kondensiert und erst später abtransportiert \rightarrow längere Retentionszeit

Überladung stationärer Phase (Tailing):

Alle Bindungsstellen der stat. Phase belegt und Analyt kann so nicht mehr retendiert werden \rightarrow kürzere Retentionszeit

Berechnungen: Chromatogramm & Peakbreiten



• **Durchflusszeit (Totzeit) t_M :**
Retentionszeit einer Inertsubstanz

Retentionszeit t_R

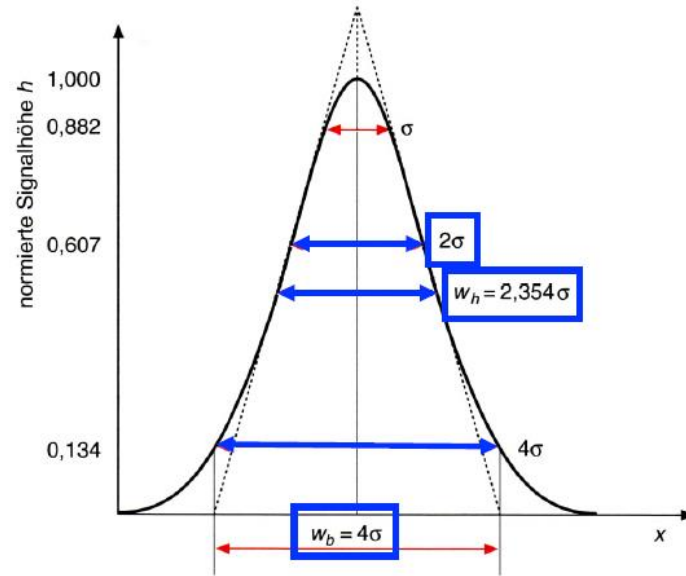
Reduzierte Retentionszeit t'_R :
 $t'_R = t_R - t_M$

Lineargeschwindigkeit u :
 $u = \frac{L}{t_M} = \frac{\text{Säulenlänge}}{\text{Durchflusszeit}}$

Trennfaktor ("Selektivität") α :
$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{C2}}{K_{C1}}$$

per Definition: $\alpha \geq 1$

Retentionsfaktor (Kapazitätsfaktor) k :
$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} = K_C \frac{V_S}{V_M} = \frac{K_C}{\beta}$$



Peakbreite zwischen den Wendepunkten w_i :
 $w_i = 2\sigma$
Breite bei $e^{-1/2} = 0.607$ bzw. 60.7% der Peakhöhe.

Peakbreite in halber Höhe $w_{1/2}$:
 $w_{1/2} = 2\sigma\sqrt{2 \ln 2} \approx 2.354\sigma$
Breite bei 50% der Peakhöhe.

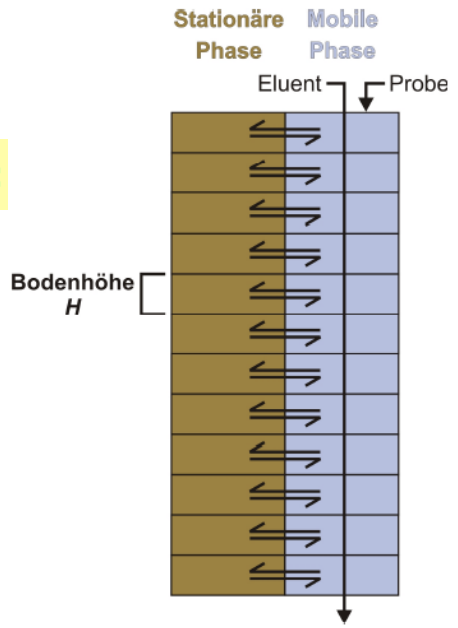
Basisbreite w_b :
 $w_b = 4\sigma$
Breite zwischen den Schnittpunkten der Wendetangenten mit der x-Achse (Zeitachse).

Theoretische Böden & Trenneffizienz

Anzahl der theoretischen Böden N :

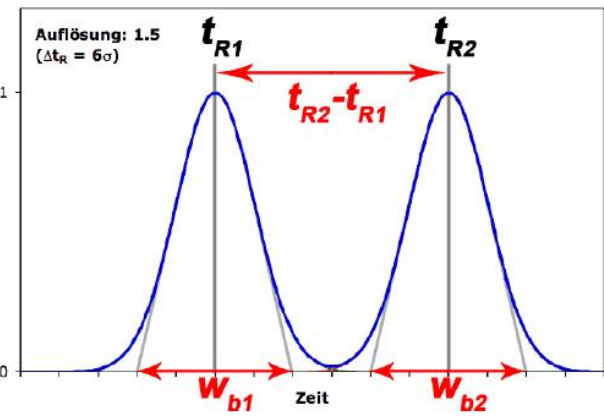
$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2$$

Bodenhöhe H :
$$H = \frac{L}{N}$$



Je mehr theoretische Böden, umso höher die Effizienz der Trennung
Je grösser N bzw. je kleiner H , umso **effizienter** die Trennung

Auflösung und Optimierung



Auflösung R_S zweier benachbarter Peaks:

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left(\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}\right)} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} = \frac{\text{Differenz der Retentionszeiten}}{\text{Mittelwert der Basisbreiten}}$$

$$R_S = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2}\right) \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right)$$

$\alpha = f(k, K_C)$
 $k = f(\beta, K_C)$
 $N = f(L, H)$

Koelution:
 $R_S < 0.75$

2 Peaks erkennbar:
 $R_S > 0.75$

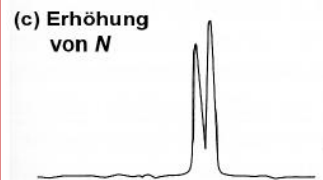
Basisliniengetrennte Peaks:
 $R_S > 1.5$



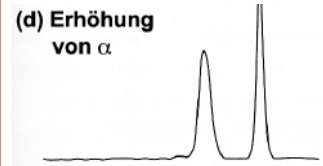
$$k \propto t_R$$

Je höher α , k und N ,
 umso besser die
 Auflösung

(Aber: Je höher k und L ,
 umso länger die
 Analysendauer)



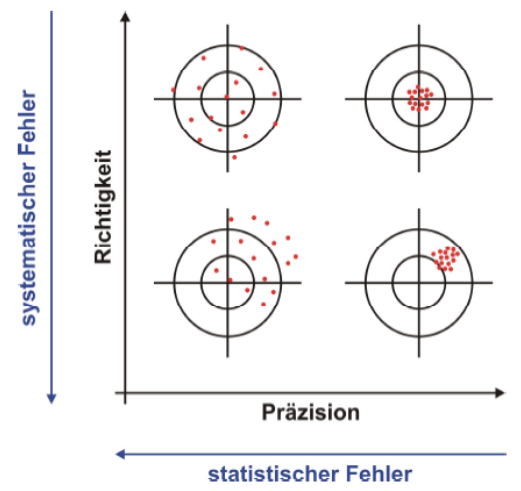
$$N \propto \frac{1}{\sigma^2}$$



$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

Ziel der Optimierung:
 effektive Peakauflösung ($R_S > 1.5$)
 in möglichst kurzer Analysenzeit zu erreichen.

Statistik

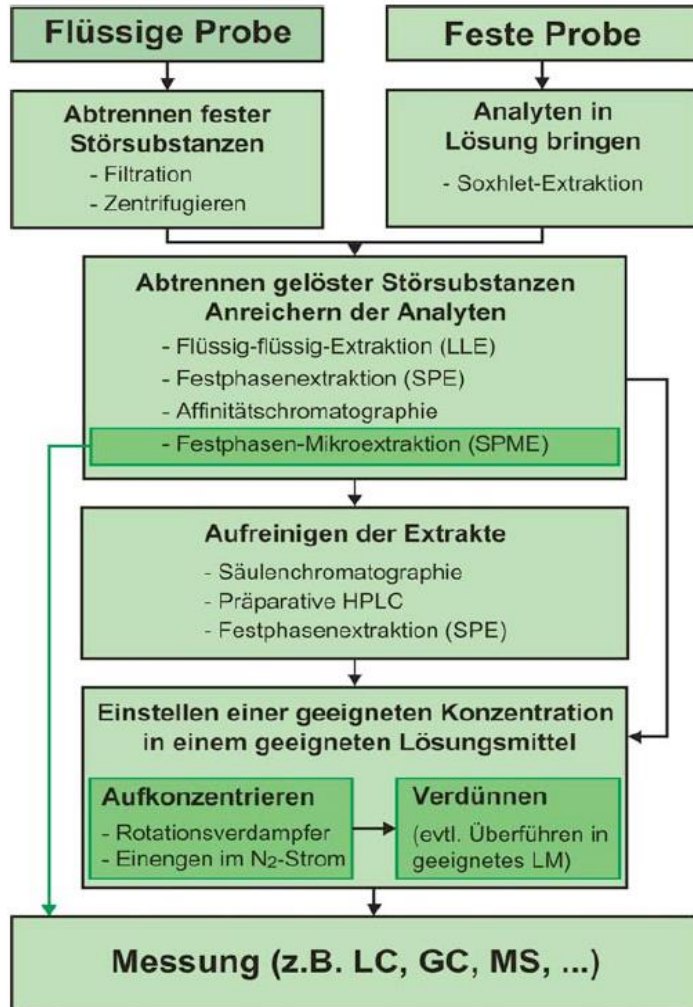


Genauigkeit = Präzision + Richtigkeit

Mittelwert \bar{x}: $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$	Standard- abweichung σ: $\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	rel. Standard- abweichung: $\sigma_{rel,x} = \frac{\sigma_x}{\bar{x}}$
-------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------

Probenvorbereitung

- Analyten in Lösung bringen
- Abtrennen von festen oder gelösten Substanzen
- Aufreinigen und Anreichern der Analyten
- Einstellen einer für Messung geeignete Konzentration in geeignetem LöMi



Kalibrierung

• Kalibrierung mit externem Standard:

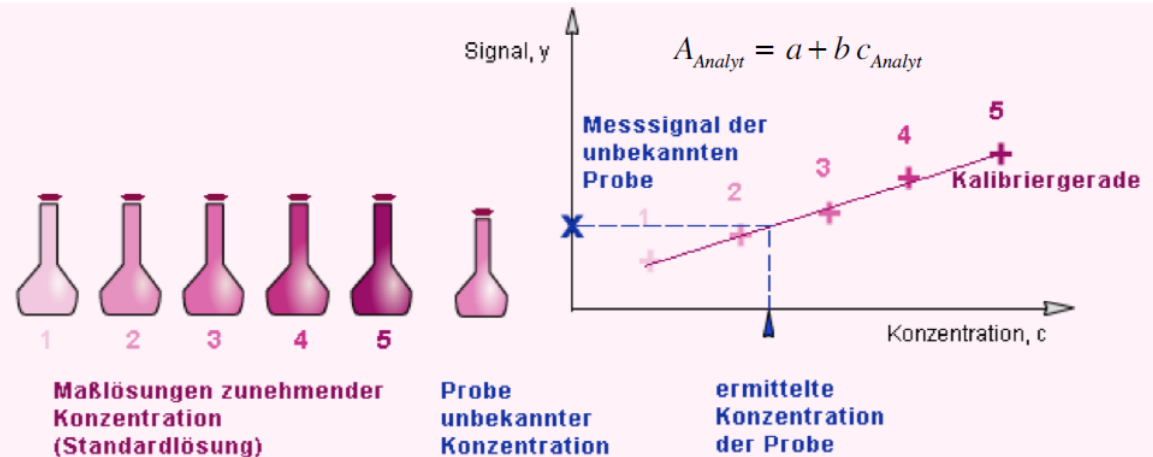
- einfachstes Kalibrierverfahren

• Kalibrierung mit internem Standard:

- Kompensation systematischer Fehler
- Interner Standard kann z.B. vor der Probenaufarbeitung oder bei der Probenahme zugegeben werden
- Einschränkung: Interner Standard hat nicht exakt die gleichen Eigenschaften wie der Analyt
- Matrixeffekte werden nicht kompensiert

• Kalibrierung mittels Standardaddition

- Kalibrierung in der Probe mit dem Analyten als Standard
- Matrixeffekte können kompensiert werden



Empfindlichkeit b
(Steigung der Kalibriergeraden):

$$b = \frac{A_{Analyt} - a}{c_{Analyt}}$$

Nachweisgrenze NG:
(limit of detection = LOD):

$$NG = \frac{(A_0 + 3\sigma_{A_0}) - a}{b}$$

Bestimmungsgrenze BG:
(limit of quantification = LOQ):

$$BG = \frac{(A_0 + 6\sigma_{A_0}) - a}{b}$$

LC-Essentials

Einschränkung:

Analyt muss ausreichend in mobiler Phase löslich sein.

Auch geeignet für grosse und thermolabile Moleküle

- kleine ungeladene (polare und unpolare) Moleküle
- anorganische und organische Ionen
- Polymere
- Grosse (Bio-)Moleküle

Optimierung der Trennung

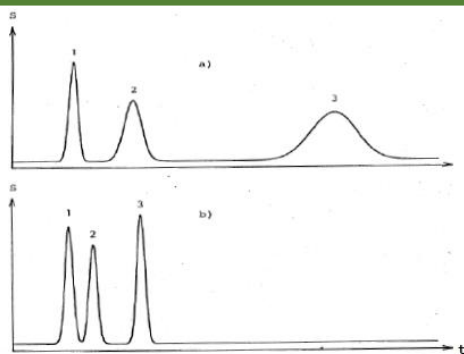
Mobile Phase: anderes Lösungsmittel(-gemisch), Gradientenelution

Stationäre Phase: Wechsel der Säule (z.B. Änderung der Polarität)

Lineargeschwindigkeit, Temperatur, Säulenlänge (selten, da Analysenzeit $\propto L$)

HPLC:

- Verbesserung der Effizienz durch Einsatz kleiner Partikel (μm -Bereich).
→ Dadurch hohe Drücke erforderlich (300-400 bar)
- Verbesserung der Auflösung durch Verwendung kleiner Partikel (μm -Bereich)
→ Verbesserung der Trenneffizienz (H) und Erniedrigung des Phasenverhältnisses $\beta = V_M/V_S$



Isokratische Trennung:

Lösungsmittelzusammensetzung konstant während der Trennung

Gradiententrennung:

Änderung des Eluenten während der Trennung (z.B. Acetonitril-Wasser-Gemisch in verschiedenen Konzentrationen)

Oft **Erhöhung der Elutionskraft** im Lauf der Trennung

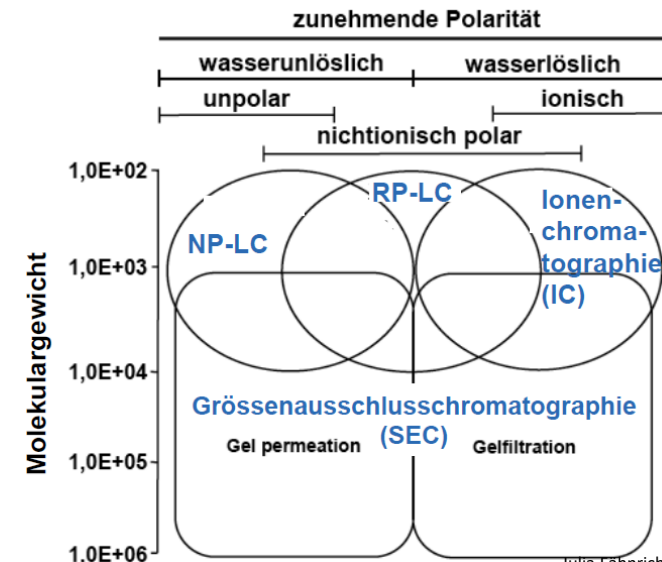
→ Kürzere Analysenzeiten, schmalere Peaks bei hoher Retention

Detektor	Empfindlichkeit	Linearebereich	Analyten
UV/VIS	+	+++	UV/VIS-Absorber
RID	--	+	universell
ELSD	O	++	Universell
Fluoreszenz	+++	+++	Fluorophore
Elektrochemisch	++/+++	++	Reduzier- und oxidierbare Analyten
MS	+/+++	+/++	Universell +massenselektiv +Spektren zur Strukturaufklärung
+Leitfähigkeitsdetektor (mit Supressor) in Ionenchromatographie			

Weitere Kriterien:

- Kompatibel mit der Gradientenelution?
- Preis, einfache oder komplizierte Bedienung, Aufwand für Justage, Wartung etc.

Trennmethode	Trennung nach...
Normalphasen-HPLC Polarität	(t_R : polare > apolare Analyten)
Umkehrphasen-HPLC Polarität	(t_R : apolare > polare Analyten)
Grössenausschlusschromatographie	Molekülgrösse
Ionenchromatographie	Ladung und Grösse von Ionen
Affinitätschromatographie	spezifische biochemische Bindungsaffinität (z.B. Antikörper-Antigen)
Chirale Chromatographie	Chiralität (R- und S-Form)



GC-Essentials

nur Analyten untersuchbar, welche **unzerstört verdampfbar**

(ca. 10–20% der bekannten org. Moleküle)

- v.a. **kleine, unpolare, flüchtige Moleküle**

- **Derivatisierung:** Überführung der Analyten in flüchtige Derivate

Die Betriebstemperatur muss nicht über dem Siedepunkt der Analyten liegen.

Vorteile gegenüber der LC:

- Kapillarsäulen haben sehr hohe Bodenzahlen (bis ca. 200 000)
 - schmale Peaks
 - hohe Peakkapazität (viele basisliniengetrennte Peaks in einem)
 - **Untersuchung komplexer Proben**
- GC-Detektoren sind sehr empfindlich
 - Quantifizierung im Bereich sehr kleiner Konzentrationen möglich
 - **Spurenanalytik**

Typisches Problem: Kapillarsäulen werden leicht überladen

- **Überladungseffekte**, asymmetrische Peaks
- Abhilfe: Verdünnung der Proben oder **Split-Injektion**

GC: Mobile Phasen

- Häufigste Trägergase:
N₂, He, H₂

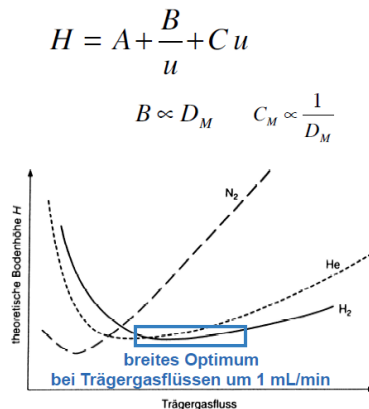
- Mobile Phase dient nur zum **Transport der Analyten durch die Säule**

- Das Trägergas beeinflusst die **Trenneffizienz bzw. die Bodenhöhe**

- Viskosität:
H₂ < He < N₂

- Diffusionskoeffizienten der Analyten in der mobilen Phase:
N₂ < He < H₂

- Beste Trenneffizienz um ca. $u = 1$ mL/min mit H₂ und He. N₂ ist kostengünstiger.



Detektor	Selektivität	Nachweisgrenze	Linearität
Flammenionisationsdetektor (FID)	C-haltige Moleküle ⇒ fast universell	1 pg C/s	> 10 ⁶
Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD bzw. TCD)	universell	400 pg/mL	10 ⁴
Elektroneneinfangdetektor (ECD)	selektiv (z.B. –Cl, –Br, –NO ₂)	stark verbindungsabhängig	10 ⁶
Flammenphotometrischer Detektor (FPD)	selektiv (S, P, Sn)	20 pg S/s 1 pg P/s	10 ³ (S) 10 ⁴ (P / Sn)
Atomemissionsdetektor (AED)	universell / elementselektiv	stark elementabhängig	10 ² –10 ⁵
Massenselektiver Detektor (MSD)	universell / massenselektiv → Spektren, TIC, SIM	verbindungsabhängig 10 pg–10 ng	10 ⁵

Optimierung:

- Polarität der stationären Phase → k , α
- Säulenlänge L → N (und Analysenzeit)
- Säulennennendurchmesser → β → k
- Filmdicke → β → k
- Säulentemperatur T → K_C → k
- Gradientenelution (Temperaturprogramm)

GC: Stationäre Phasen (Kapillarsäulen)

Apolare Phasen: Trennung apolarer Analyten gemäss ihrem **Siedepunkt**

Struktur	Name	Kürzel	Polarität
	Poly(dimethylsiloxan)	X-1	apolar
	Poly(5%-diphenyl-95%-dimethylsiloxan)	X-5	Zunahme der Polarität ↓
	Poly(14%-cyanopropylphenyl-86%-dimethylsiloxan)	X-1701	
	Polyethylenglykol	X-Wax	

Polare Phasen: Neben dem **Siedepunkt** ist auch die **Polarität** der Moleküle ein Trennkriterium

Elektrophorese

• Gel-Elektrophorese

• Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), Agarose-Gelelektrophorese

- Trennung **geladener Makromoleküle** (z.B. DNA-Fragmente)
- Trennung aufgrund von Ladung und Grösse (Faltungszustand)

• Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE)

- Trennung von **Proteinen** (als SDS-Protein-Komplex)
- Trennung nur aufgrund des Molekulargewichts

• Kapillarelektrophorese (CE)

• Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

- Trennung **geladener, kleiner Moleküle** (z.B. Aminosäuren, Ionen)
- Trennung von Kationen und Anionen (wegen EOF)

• Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

- Trennung **ungeladener, kleiner Moleküle**
- Trennung aufgrund der Polarität (Elutionsreihenfolge analog RP-HPLC)