

## Maßanalyse

Titrimetrie, volumetrische oder titrimetrische Analyse

Ermittelt wird die Masse des zu bestimmenden Stoffes (=Titrand, Probe) durch eine Volumenmessung.

Man misst die Lösungsmenge einer Lösung mit bekanntem Gehalt (=Maßlösung, Titrator) bis zu vollständigen Gleichgewichtseinstellung. Diese Einstellung wird meist durch einen Indikator angezeigt.

Der Vorgang heißt TITRATION

Die Operation - TITRIEREN

## 4 Grundlagen der Maßanalyse

Bei der *Maßanalyse* (Titrimetrie, volumetrische oder titrimetrische Analyse) ermittelt man die Masse des zu bestimmenden Stoffes (= *Titrand*, *Probe*) durch eine Volumenmessung. Man mißt nämlich die Lösungsmenge eines geeigneten Reaktionspartners (= *Titrator*, *Titrant*), die bis zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung einer eindeutig ablaufenden Reaktion verbraucht wird.

Der Vorgang heißt *Titration*, die Operation *Titrieren*.

Das Ende der Titration ist am sog. *Äquivalenzpunkt* erreicht.

*Definition: Äquivalenzpunkt („stöchiometrischer Punkt“, theoretischer Endpunkt) heißt derjenige Punkt bei einer Titration, an dem sich äquivalente Mengen von Titrant und Probe miteinander umgesetzt haben.*

Der Äquivalenzpunkt muß entweder direkt sichtbar sein oder auf irgendeine Weise eindeutig angezeigt (indiziert) werden können.

Oft gibt man anstelle des Äquivalenzpunktes den sog. *Endpunkt* der Titration an. Der Endpunkt soll dabei möglichst mit dem Äquivalenzpunkt zusammenfallen.

*Definition: Endpunkt einer Titration heißt derjenige Punkt, bei dem sich eine bestimmte ausgewählte Eigenschaft der Lösung (z.B. Farbe, pH-Wert usw.) deutlich ändert.*

*Beachte:* Für maßanalytische Bestimmungen eignen sich nur Reaktionen, die sehr schnell, praktisch vollständig und ohne Nebenreaktionen ablaufen.



Je nach Ausführung der Titration unterscheidet man

- Direkte Titration:** Probe vorlegen, Maßlösung zugeben.
- Inverse Titration:** eine bestimmte Menge Maßlösung wird vorgelegt und die Probelösung bis zur Äquivalenz zugegeben.
- Rücktitration:** die Maßlösung wird im Überschuß zugegeben und die nicht verbrauchte Menge zurücktitriert.
- Substitutionstitration:** der zu bestimmende Stoff wird nicht unmittelbar mit der Maßlösung, sondern mit einer bekannten Verbindung des Titranten umgesetzt und die dabei freiwerdende, der Probe äquivalente, Menge zurücktitriert.
- Indirekte Titration:** komplementär zu d wird eine bekannte Verbindung der Probe bestimmt und aus dem Verbrauch auf die darin enthaltene Probenmenge geschlossen.

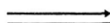
Die indirekten Verfahren (im weiteren Sinne) b–e werden angewendet, wenn die Titration zu langsam verläuft oder die Probe nicht selbst bestimmt werden kann.

#### ALLGEMEINE METHODEN DER MASSANALYSE



##### 1. Direkte Titration:

Titratort wird zu Titrand bis zum Äquivalenzpunkt zugesetzt

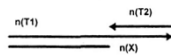


$$n(X) = c(T) \cdot V(T)$$

##### 1a. Inverse Titration:

##### 2. Rücktitration:

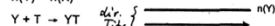
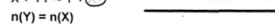
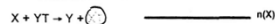
Titratort 1 wird im abgemessenen Überschuss zugesetzt  
mit Titratort 2 wird bis zum Äquivalenzpunkt „zurücktitriert“



$$n(X) = n(T1) - n(T2)$$

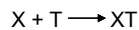
##### 3. Substitutionstitration:

X wird mit YT versetzt  
Y wird von X aus verdrängt  
Y wird mit T titriert //

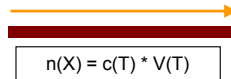


$$n(Y) = n(X) = c(T) \cdot V(T)$$

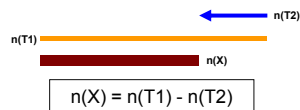
## ALLGEMEINE METHODEN DER MASSANALYSE

**1. Direkte Titration:**

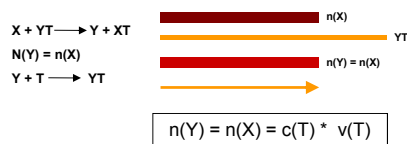
Titrator wird zu Titrand bis zum Äquivalenzpunkt zugesetzt

**2. Rücktitration:**

Titrator 1 wird in abgemessenen Überschuss zugesetzt  
mit Titrator 2 wird bis zum Äquivalenzpunkt „zurücktitriert“

**2. Substitutions titration:**

X wird mit YT versetzt  
Y wird von X aus YT verdrängt  
Y wird mit T titriert

HERSTELLUNG UND GEHALTSBESTIMMUNG  
DER MASSLÖSUNGEN

## Ursubstanz.

- genau bekannte Zusammensetzung
- nicht flüchtig
- nicht hygroskopisch
- nicht luftempfindlich ( $O_2$ ,  $CO_2$ )

## Herstellung von Masslösungen

## 1. Lösen des Titrators in Lösungsmittel (Wasser)

- gewünschtes Volumen festlegen:  $V(G) =$
- gewünschte Konzentration festlegen:  $c(T) =$
- erforderliche Menge Titrator berechnen:  $n(T) = c(T) \cdot V(G)$   
 $m(T) = n(T) \cdot M(T)$

## 2. Verdünnen einer konzentrierten Lösung des

## Titratoren

- gewünschtes Volumen festlegen:  $V(G) =$
- gewünschte Konzentration festlegen:  $c(T) =$
- erforderliche Menge Titrator berechnen:  $n(T) = c(T) \cdot V(G)$   
 $m(T) = n(T) \cdot M(T)$
- Masse oder Volumen der konzentrierten Lösung berechnen:  
 $m(G) = \frac{m(T)}{w(T)}$

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} \quad V_2 = V(G) \quad c_1 = c(T)$$

Ist der Titrator keine Ursubstanz, erhält man zunächst eine Lösung ungefähre Konzentration. Die Bestimmung des genauen Gehalts erfolgt dann durch Titerstellung

## Säure – Base Gleichgewichte

## Säure- Base Theorien

Geschichte: Alte Definition 17./18. Jhd.

- Säuren enthalten Sauerstoff (Lavoisier)
- Säuren enthalten Wasserstoff (Davy)
- Säuren enthalten Wasserstoff, der durch Metalle ersetzbar ist (Liebig)

Vor ca. 100 Jahren ... Arrhenius und Ostwald

Theorie	Säuren	Basen	Autoren
1. Klass. Theorie von Arrhenius/Ostwald	geben in Wasser Protonen (H <sup>+</sup> ) ab	geben in Wasser Hydratidionen (OH <sup>-</sup> ) ab	Arrhenius/Ostwald, 1884
2. Brönsted-Theorie	geben Protonen ab	nehmen Protonen auf	Brönsted/Lowry, 1923
3. Lewis-Theorie	besitzen Elektronenlücke, die ein Elektronenpaar unter Bildung einer koordinativen Bindung aufnehmen kann	besitzen ein freies Elektronenpaar, das zur Bildung einer koordinativen Bindung dienen kann	Lewis, 1923
4. Theorie von Bjerrum (Spez. Formulierung)	Anionen (z. Säuren) nehmen in Schmelzen Oxidionen (O <sup>2-</sup> ) auf	geben in Schmelzen Oxidionen ab	Bjerrum, 1951
5. Solvens-Theorie	erhöhen die Konz. der Lösungsmittel-Kationen (Lyoniumionen) oder verringern die Konz. der Anionen (Lyationen)	erhöhen die Konz. der Lyationen oder verringern die Konz. der Lyoniumionen	Cady/Eisey, 1928 Ebert/Konopik, 1949
6. Usanowitsch-Theorie	spalten Kationen bzw. Protonen ab oder nehmen Anionen bzw. Elektronen auf (Redoxvorgänge eingeschlossen)	spalten Anionen bzw. Elektronen ab oder nehmen Kationen bzw. Protonen auf	Usanowitsch, 1939

<sup>a</sup> Bereits R. Boyle (17. Jhd.) vermutete die Existenz von zwei Stoffklassen mit komplementären Eigenschaften, die sich bei der Wechselseitigung („Neutralisation“) aufheben.

## Säure-Base-Theorien von Arrhenius und Brönsted [7]

	Arrhenius-Theorie	Brönsted-Theorie
Allg. Konzept	mehr nach stofflichen Kriterien	nach funktionellen Kriterien
Solvens	nur Wasser	alle prototropen Systeme
Säure	dissoziiert unter H <sup>+</sup> -Abgabe, z.B. HCl, HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCOOH	gibt Protonen ab, z.B. HCl, HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , [M(OH) <sub>3</sub> ] <sup>3+</sup> , HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Base	dissoziiert unter OH <sup>-</sup> -Abgabe, z.B. NaOH, KOH, Ca(OH) <sub>2</sub> , (NH <sub>3</sub> , PH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> N) <sup>b</sup>	nimmt Protonen auf, z.B. NH <sub>3</sub> , PH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> N; [M(OH) <sub>3</sub> OH] <sup>2+</sup> ; OH <sup>-</sup> , NH <sub>2</sub> <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Salz – neutral <sup>b</sup> – sauer <sup>b</sup> – basisch <sup>b</sup>	NaCl, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> NaHSO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaHCO <sub>3</sub> M(OH)X, z.B. CuCO <sub>3</sub> ·Cu(OH) <sub>2</sub>	(jede anorg. Verbindung, also auch Na <sup>+</sup> OH <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> OH <sup>-</sup> usw.) <sup>c</sup>
Neutralisation	Säure + Base → Salz + Wasser	spezielle Säure-Base-Reaktion, z.B. H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> + OH <sup>-</sup> → 2 H <sub>2</sub> O NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + NH <sub>2</sub> <sup>-</sup> → 2 NH <sub>3</sub>
Hydrolyse	Umkehrung der Neutralisation	(Spaltung von homoopolaren Bindungen) <sup>d</sup>
Amphoterie	—	Substanz kann Protonen abgeben oder aufnehmen, z.B. H <sub>2</sub> O, NH <sub>3</sub> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>

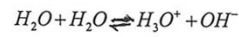
<sup>a</sup> als „NH<sub>4</sub>OH“ etc.

<sup>b</sup> unabhängig vom pH-Wert der Lösung

<sup>c</sup> keine analytischen Definitionen

### Protolyse des Wassers

---



$H^+$  wegen der hohen Ladung im Verhältnis zur Größe in wässriger Lösung nicht existent

$$K = \frac{[H_3O^+][OH^-]}{[H_2O]^2}$$

Messung elektrischer Leitfähigkeit

In verdünnten Lösungen ist die Konzentration undissoziierten Wassers praktisch konstant

$$[H_2O] = 55,55 \text{ mol/l}$$

$$c = \frac{\rho_{25^\circ C}(H_2O) \cdot 1000}{M(H_2O)}$$

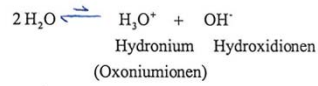
$$\rho_{25^\circ C}(H_2O) = 0,997043 \text{ g/ml}$$

$$M(H_2O) = 18,0152 \text{ g/mol}$$

Umrechnungsfaktor: 1000 ml/l

$$c(H_2O) = 55,34 \text{ mol/l}$$

## Autoprotolyse des Wassers



spez. Elektr. Leitfähigkeit  $\kappa = 4,3 \cdot 10^{-6} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$  bei  $18^\circ\text{C}$

$$\frac{a[\text{H}_3\text{O}^+] \cdot a[\text{OH}^-]}{a^2[\text{H}_2\text{O}]} = K$$

$\alpha \dots$  Diss. grad klein  $\rightarrow a[\text{H}_2\text{O}] = 1$

$$a[\text{H}_3\text{O}^+] \cdot a[\text{OH}^-] = K_w = 10^{-14} \quad / \log / -1$$

Ionenprodukt                      bei  $25^\circ\text{C}$   
in  $\text{mol}^2/\text{l}^2$

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14$$

$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$$

bei  $100^\circ\text{C} : K_w = 10^{-12}$  (Leitfähigkeitsmessung)

Säurekonstanten<sup>a</sup>  
 $\text{p}K_1 + \text{p}K_2 = 14$ 

s = H <sup>+</sup> + b	pK <sub>1</sub>	s = H <sup>+</sup> + b	pK <sub>2</sub>
Al [Al(OH) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup>	4,85	O H <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	0 (-1,74) <sup>b</sup>
As H <sub>3</sub> AsO <sub>4</sub>	2,32	H <sub>2</sub> O	14 (15,74) <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	7	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11,62
HAsO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	13	P PH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	= 0
B H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	9,24	H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	1,80
Br HBr	—	H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,16
C HCOOH	3,70	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,96
CH <sub>3</sub> COOH	4,75	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	7,12
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O)	6,52	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	12,32
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10,40	S H <sub>2</sub> S	6,9
H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1,42	HS <sup>-</sup>	12,9
HC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	4,21	H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (SO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O)	1,96
HCN	9,40	HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	7,0
Cl HCl	—	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—
HClO <sub>4</sub>	—	HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,92
F H <sub>2</sub> F <sup>+</sup>	—	Se H <sub>2</sub> Se	3,77
HF	3,14	HSe <sup>-</sup>	10,0
Fe [Fe(OH) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup>	2,22	H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	2,54
I HI	—	HSeO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	8,02
HIO <sub>3</sub>	0	H <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	—
H <sub>2</sub> IO <sub>4</sub>	1,64	HSeO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	= 2
N NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	9,25	Si H <sub>4</sub> SiO <sub>4</sub>	= 10
HNO <sub>2</sub>	3,35		
HNO <sub>3</sub>	—		

<sup>a</sup> nach [1]; starke Säuren ohne Angabe.  
<sup>b</sup> je nach Definition (s. S. 51).

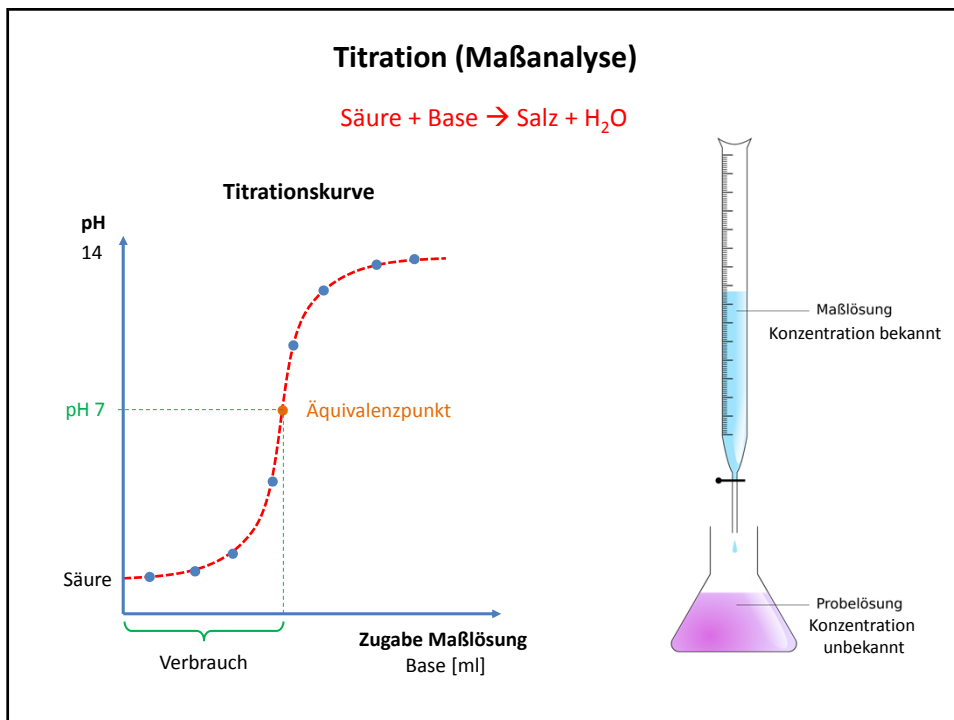
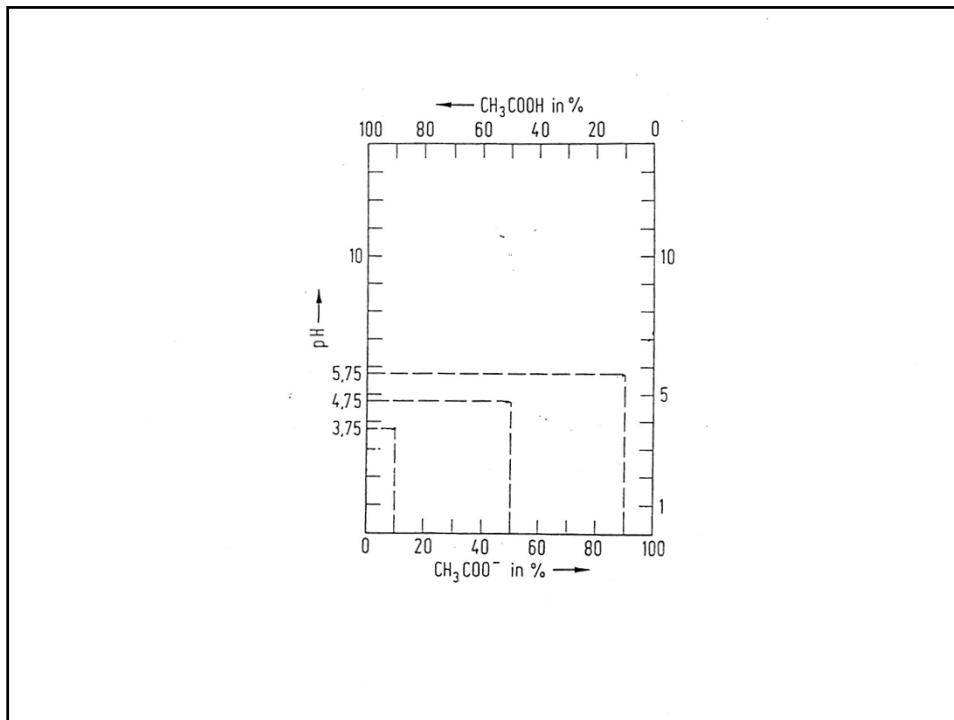
## Dissoziation von Säuren und Basen

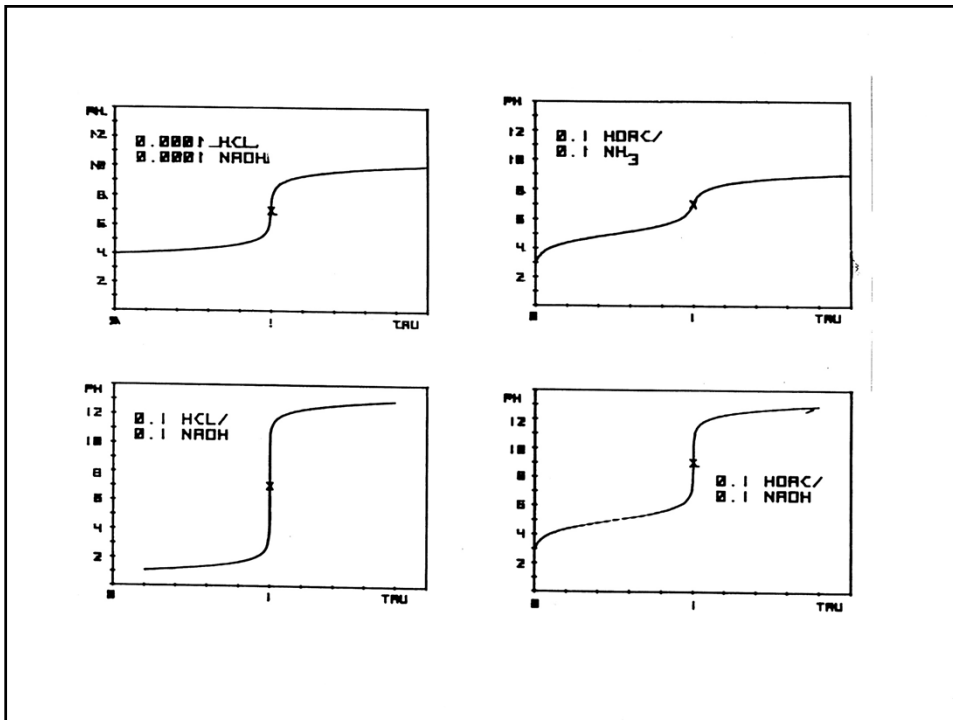
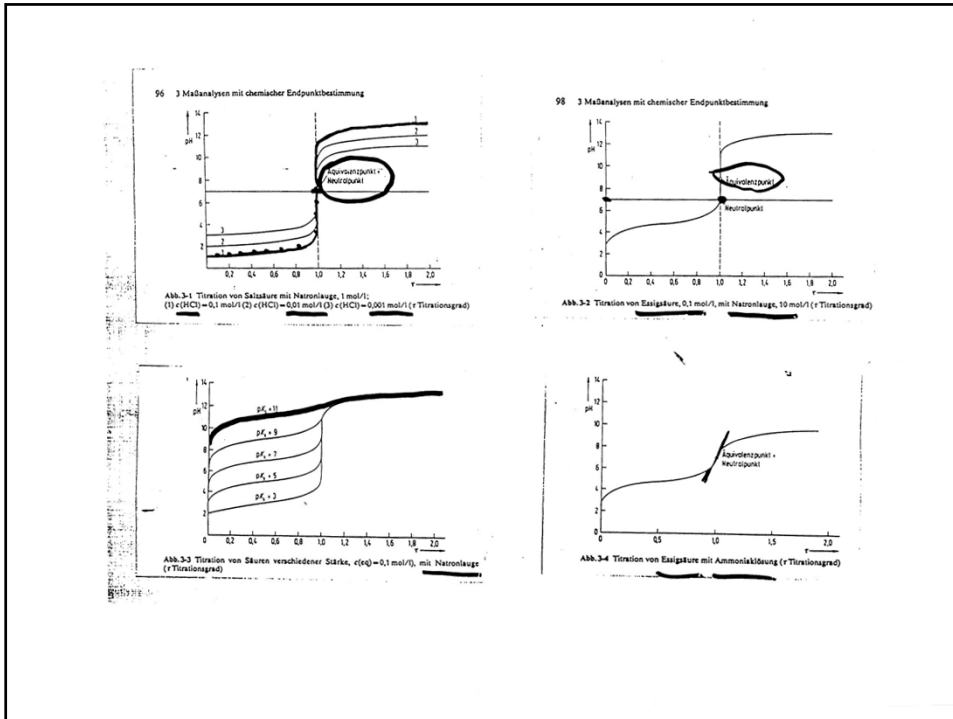
Säure <sub>1</sub> + Base <sub>2</sub>	⇌	Säure <sub>2</sub>	+	Base <sub>1</sub>	
HA + SH	⇌	SH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	+	A <sup>-</sup>	allgemeiner Fall, Lösungsmittel SH in Wasser in Methanol in Eisessig
HA + H <sub>2</sub> O	⇌	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	+	A <sup>-</sup>	
HA + CH <sub>3</sub> OH	⇌	CH <sub>3</sub> OH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	+	A <sup>-</sup>	
HA + CH <sub>3</sub> COOH	⇌	CH <sub>3</sub> COOH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	+	A <sup>-</sup>	

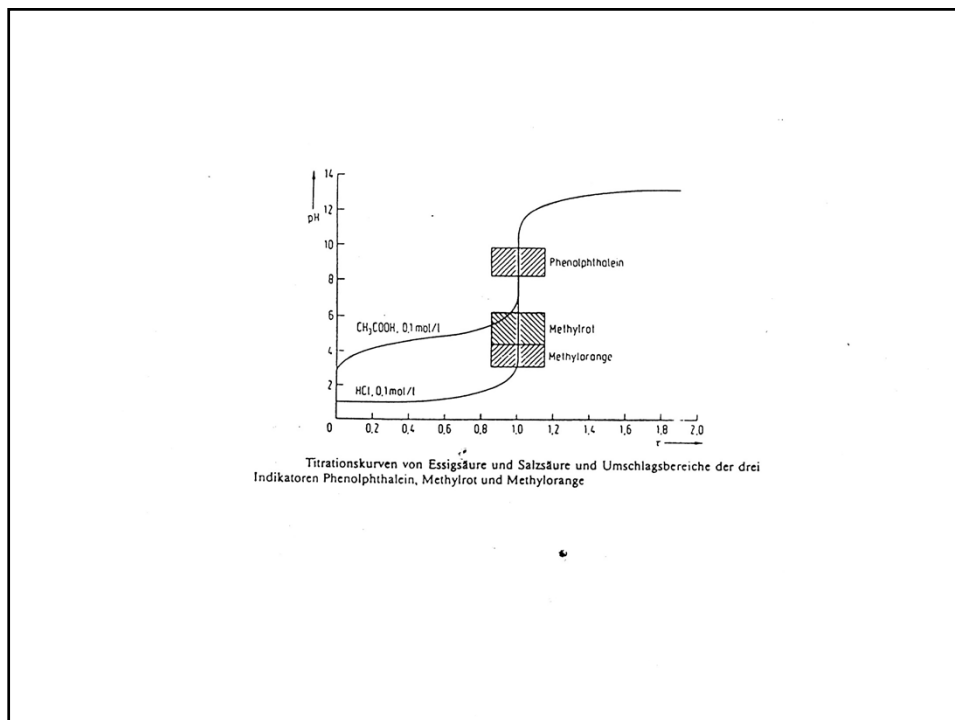
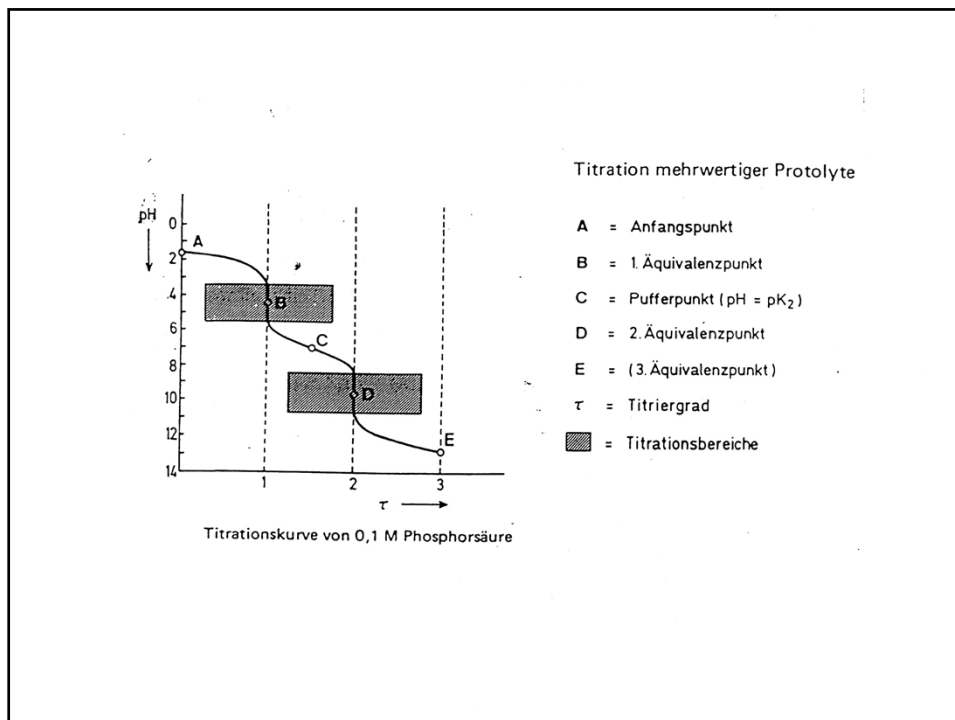
Base <sub>1</sub> + Säure <sub>2</sub>	⇌	Säure <sub>1</sub>	+	Base <sub>2</sub>	
B + SH	⇌	BH <sup>+</sup>	+	S <sup>-</sup>	allgemeiner Fall, Lösungsmittel SH in Wasser in Methanol in Eisessig
B + H <sub>2</sub> O	⇌	BH <sup>+</sup>	+	OH <sup>-</sup>	
B + CH <sub>3</sub> OH	⇌	BH <sup>+</sup>	+	CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup>	
B + CH <sub>3</sub> COOH	⇌	BH <sup>+</sup>	+	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	

Säure	⇌	Ampholyt	⇌	Base
H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	⇌	H <sub>2</sub> O	⇌	OH <sup>-</sup>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		NH <sub>3</sub>		NH <sub>2</sub> <sup>-</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>		HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>		HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>









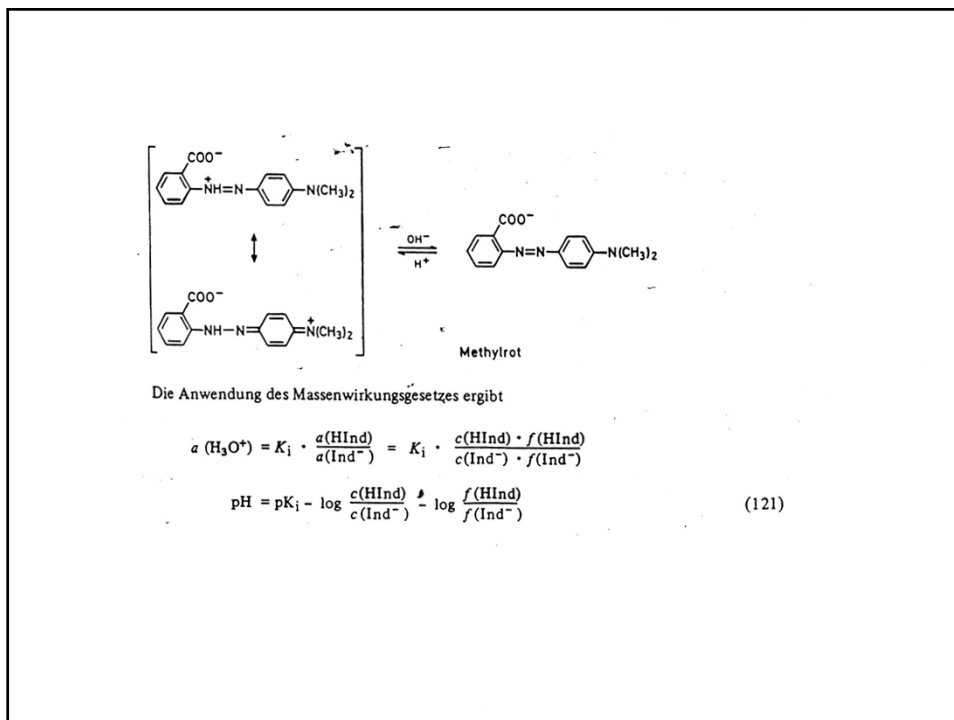
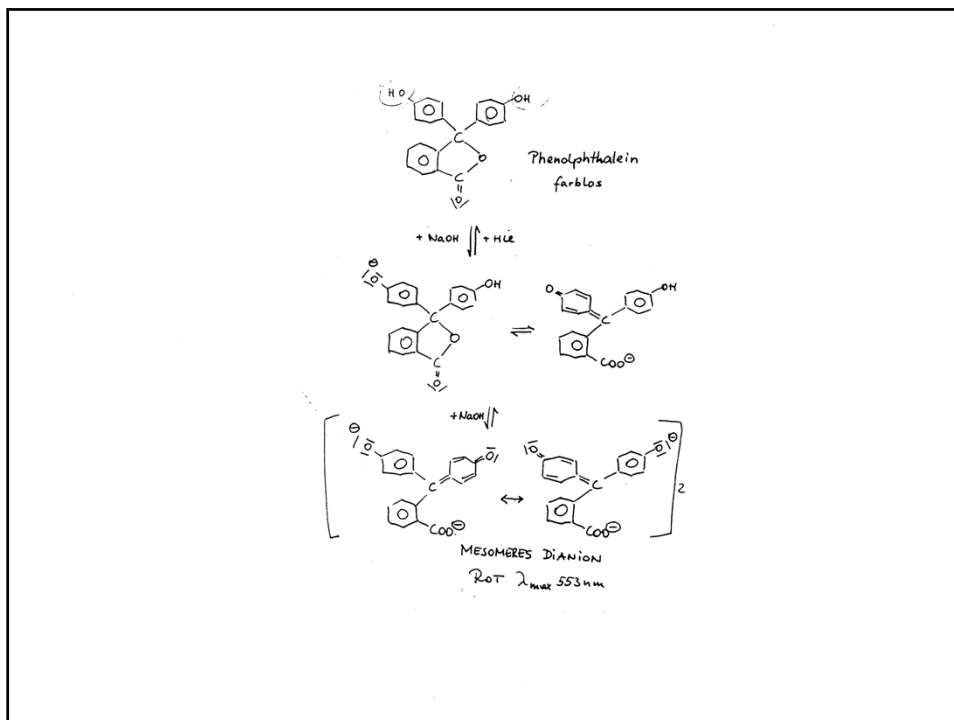
## Methoden zur Endpunktsanzeige

Chemische Indikation (visuell)	Physikalische Indikation (instrumentell)
1. Organische Farbstoffe a. Neutralisation b. Fällungstiteration (Adsorptionsindikatoren nach <i>Fajans</i> ) c. Komplextometrie d. Redoxititeration  2. Anorganische farbige und/oder schwerlösliche Verbindungen a. Fällungsanalyse Chlorid nach <i>Mohr</i> Silber nach <i>Volhard</i> Cyanid nach <i>Liebigs</i> <sup>a</sup>  b. Redoxanalyse Manganometrie <sup>a</sup> (Iodometrie <sup>a</sup> )	1. Elektrochemische Indikation a. Potentiometrie b. Konduktometrie c. Voltametrie (Polarisations- oder Grenzstromtitration)  2. Optische Indikation Kolorimetrie und Photometrie (Extinktionsänderung)  3. Thermische Indikation Thermometrie Dilatometrie

<sup>a</sup> selbstindizierend

## Merkmale einiger Säuren-Basen-Indikatoren

Indikator	pH- Bereich des Um- schlags- intervalls	pH des Um- schlags- punktes	Farbe im		Farbe beim Um- schlags- punkt	Konzentration der Indikatorlösung
			sauren	alkali- schen Gebiet		
Methylorange	3,1- 4,4	4,0	rot	orange- gelb	orange	0,1%ig in Wasser
Methylrot	4,2- 6,3	5,8	rot	gelb	orange	0,2%ig in 60%- igem Alkohol
Bromthymol- blau	6,0- 7,6	7,1	gelb	blau	grün	0,1%ig in 20%- igem Alkohol
Lackmus	5,0- 8,0	6,8	rot	blau	blaurot	0,5% in 90%- igem Alkohol
Phenol- phthalein	8,2-10,0	8,4	farblos	rot	schwach rosa	0,1%ig in 70%- igem Alkohol
Thymol- phthalein	9,3-10,6	10,0	farblos	blau	schwach bläulich	0,1%ig in 90%- igem Alkohol
Tashiro	4,2- 6,3	5,8	violett- rot	grün	grau	60 mg Methylrot in 200ml Äthanol + 30mg Methyl- lenblau in 30 ml Wasser



## Redoxtitration

Tab. 13 gibt eine Übersicht über die wichtigsten analytischen Redoxverfahren. Die Reaktionsgleichungen der Titranten sind im nachfolgenden Text angeführt und werden fortlaufend mit großen Buchstaben bezeichnet.

Tab. 13 Redoxtitrationen

Verfahren	Titrant	(Äquivalente)	Indikator	zur Bestimmung von
<b>Oxidimetrische Bestimmungen</b>				
Manganometrie	KMnO <sub>4</sub>	sauer (z = 5)	—	Fe, Ca (C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , U
		neutral (z = 3)	—	Mn (Volhard-Wolff)
Dichromatometrie	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	(z = 6)	Diphenylamin	Fe (technisch)
Brom(at)ometrie	KBrO <sub>3</sub>	(z = 6)	Methylorange	As, Sb, Sn, Cu (Bi), TI, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ; Metalloxinate
Iodometrie	I <sub>2</sub> (KIO <sub>3</sub> +KI) oxidimetrisch KI (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) reduktometrisch	(z = 1)	Iod/Stärke	As, Sb, Sn, Hg, H <sub>2</sub> O; S <sup>2-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
				Cu, Cr, Co, V, MnO <sub>2</sub> , PbO <sub>2</sub> , SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , BrO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , CN <sup>-</sup> , SCN <sup>-</sup> ; CO
Cerimetrie	Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> <sup>a</sup>	(z = 1)	Feroin	As, Fe, Sn, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Reduktometrische Bestimmungen</b>				
Ferrometrie	FeSO <sub>4</sub>	(z = 1)	Diphenylamin	Cr, V (H <sub>2</sub> O) <sup>b</sup>
Titanometrie	TiCl <sub>3</sub>	(z = 1)	Rhodanid	Fe, ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

<sup>a</sup>eigentlich (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>[Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]

<sup>b</sup>durch Hydrolyse organischer Vanadinsäureester, R<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

## REDOX

### 1. OXIDATION und REDUKTION

Oxidation: Aufnahme von O

Reduktion: Abgabe von O; Aufnahme von H

Oxidation: ELEKTRONENABGABE

Reduktion: ELEKTRONENAUFNAHME

Substanz die e<sup>-</sup> abgeben kann  
Elektronendonator - Reduktions-  
mittel



Substanz die e<sup>-</sup> aufnehmen kann



Elektronenakzeptor - Oxidations-  
mittel



### Oxidationszahl:

(Oxidationsstufe, elektrochemische Wertigkeit)

Zahl der Ladungen, die das Atom im Molekül oder Ion hätte, wenn man die bindenden Elektronenpaare kovalenter Bindungen dem elektronegativeren Bindungspartner zuordnen würde.

1. Atome im elementaren Zustand  $OZ = 0$
2.  $\sum OZ$  aller Atome eines Moleküls  $= 0$   
Ion ... entspricht der Ladung des Ions
3.  $OZ$  von H  $= +1$  (Ausnahme: Metallhydride)
4.  $OZ$  von O  $= -2$  (Ausnahme: in Peroxiden  $-1$ )

Schema zur Aufstellung von Redoxgleichungen am Beispiel der Oxidation von Arsen (III) mit Permanganat

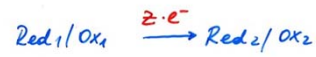
Vorgang	Reduktion	Oxidation
1. Oxidationsstufe	$\text{MnO}_4^- \xrightarrow{(+7)} \text{Mn}^{2+} \xrightarrow{(+2)}$	$\text{As}^{3+} \xrightarrow{(+3)} \text{AsO}_4^{3-} \xrightarrow{(+5)}$
2. Elektronenausgleich	$\text{MnO}_4^- + 5 e^- \rightarrow \text{Mn}^{2+}$	$\text{As}^{3+} \rightarrow \text{AsO}_4^{3-} + 2 e^-$
3. Ladungsbilanz	$\begin{array}{r} -8 \\ +2 \\ \hline -6 \end{array}$	$\begin{array}{r} +3 \\ -5 \\ \hline -2 \end{array}$
4. Ladungsausgleich und Stoffbilanz	a. $\text{MnO}_4^- + 5 e^- + 8 \text{H}^+ \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 4 \text{H}_2\text{O}$ b. $(\text{MnO}_4^- + 5 e^- + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 8 \text{OH}^-)^b$	b. $\text{As}^{3+} + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AsO}_4^{3-} + 2 e^- + 8 \text{H}^+$ a. $\text{As}^{3+} + 8 \text{OH}^- \rightarrow \text{AsO}_4^{3-} + 2 e^- + 4 \text{H}_2\text{O}$
5. Gesamtgleichung für a.	$\text{MnO}_4^- + 5 e^- + 8 \text{H}^+ \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 4 \text{H}_2\text{O} \quad   \cdot 2$	$\text{As}^{3+} + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AsO}_4^{3-} + 2 e^- + 8 \text{H}^+ \quad   \cdot 5$
Ionengleichung	$2 \text{MnO}_4^- + 5 \text{As}^{3+} + 12 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{Mn}^{2+} + 5 \text{AsO}_4^{3-} + 24 \text{H}^+$	
Stoffgleichung	$2 \text{KMnO}_4 + 5 \text{AsCl}_3 + 12 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{MnCl}_2 + 5 \text{H}_3\text{AsO}_4 + 9 \text{HCl} + 2 \text{KCl}$	

<sup>a</sup> Im stark sauren Medium umgekehrte Reaktion.

<sup>b</sup> Rein theoretische Formulierung, da  $\text{MnO}_4^-$  im alkalischen Medium zu  $\text{MnO}_2$  reduziert wird.

## ELEKTROCHEMISCHE SPANNUNGSREIHE

Die Tendenz eines Redoxpaares zur  
Elektronenabgabe  $\rightarrow$  POTENTIAL  
DES REDOXPAARES



höheres Potential niedrigeres Potential

Vereinbarungsgemäß gibt man dem Redoxpaar,  
das  $e^-$  abgibt, ein POTENTIAL, das weiter  
im negativem Bereich liegt.

### POTENTIALDIFFERENZ

= Spannung oder  
elektromotorische Kraft (EMK)

$$\Delta E$$



Um den Elektronenfluß von Zn zum Cu  
zu ermöglichen - Verbindung über Spannungs-  
meßgerät und die Lösungen mit dem Strom-  
schlüssel.

Jedes Redoxpaar bildet eine Halbzelle.  
Die Kombination zweier solcher Halbzellen  
heißt galvanisches Element.

Vereinigt man unterschiedliche  
Redoxpaare  $\rightarrow$  so kann man  
die Potentialdifferenz messen  
und den Ablauf vieler Redoxreaktionen  
vorhersagen.

Nullpunkt

Die gemessenen Potentialdifferenzen gegen  
die Normalwasserstoffelektrode

nennt man NORMALSPANNUNGEN oder  
NORMALPOTENTIALE



Redoxpaare, die an die Normalwasserstoff-  
elektrode ELEKTRONEN abgeben  $\ominus$   
 $\oplus$

↓ ↓  
Spannungsreihe  
oder Redoxreihe

Oben in der Spannungsreihe stehen die  
Redoxpaare mit der größten Tendenz  
 $e^-$  abzugeben.

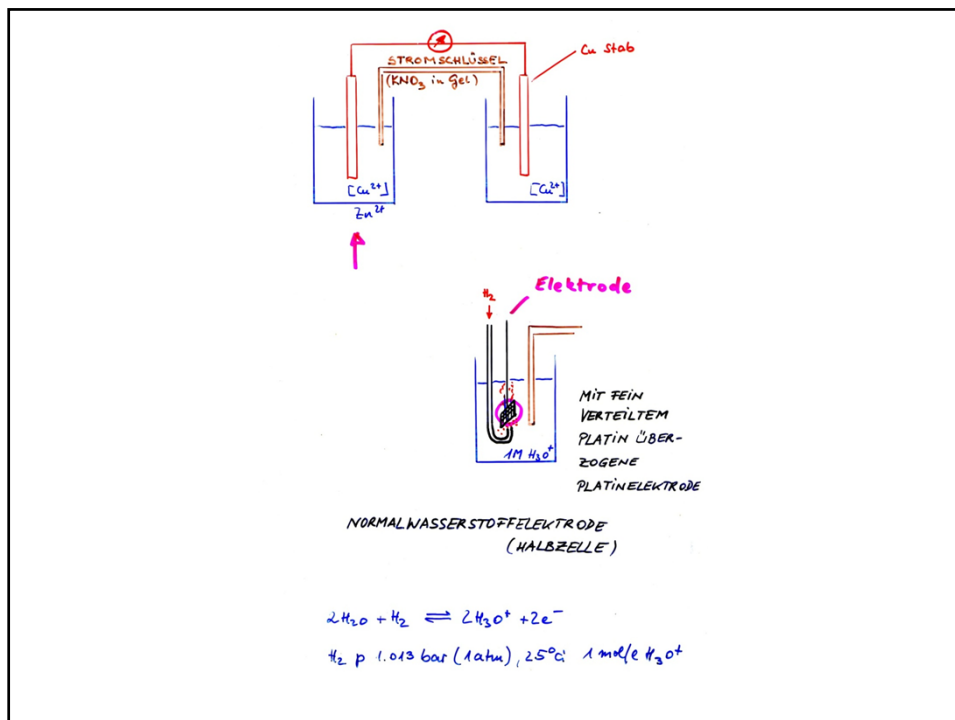
$\text{Sn}/\text{Sn}^{2+}$  reduziert  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$

$\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  oxidiert  $\text{I}_2/\text{I}^-$

Spannungsreihe der Metalle:			Spannungsreihe der Nichtmetalle:		
Metall	n-fach positives Metallion	Normalpotential [V] bei 25 °C	Nichtmetall	n-fach negatives Nichtmetallion	Normalpotential [V] bei 25 °C
Li	$\text{Li}^+$	-3,01	$\text{S}_{(\text{fest})}$	$\text{S}^{2-}$	-0,51
K	$\text{K}^+$	-2,92	$\frac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}^+ + 2e^-$	$2\text{OH}^-$	+0,40
Ca	$\text{Ca}^{2+}$	-2,84	$\text{J}_2_{(\text{fest})}$	$2\text{J}^-$	+0,54
Mg	$\text{Mg}^{2+}$	-2,38	$\text{Cl}_2_{(\text{gas})}$	$2\text{Cl}^-$	+1,36
Al	$\text{Al}^{3+}$	-2,34	$\text{F}_2_{(\text{gas})}$	$2\text{F}^-$	+2,85
Mn	$\text{Mn}^{2+}$	-1,05			
Zn	$\text{Zn}^{2+}$	-0,76			
Fe	$\text{Fe}^{2+}$	-0,44			
Cd	$\text{Cd}^{2+}$	-0,40			
Co	$\text{Co}^{2+}$	-0,28			
Ni	$\text{Ni}^{2+}$	-0,23			
Sn	$\text{Sn}^{2+}$	-0,14			
Pb	$\text{Pb}^{2+}$	-0,13			
$\text{H}_2$	$2\text{H}^+$	0,000			
Cu	$\text{Cu}^{2+}$	+0,34			
Ag	$\text{Ag}^+$	+0,80			
Hg	$\text{Hg}^{2+}$	+0,80			
Au	$\text{Au}^{2+}$	+1,36			
Pt	$\text{Pt}^{2+}$	+1,60			

Sekundärzellen:		
Elektrodenreaktion		Normalpotential [V] bei 25 °C
$\text{PbO}_2 + \text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{PbSO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$		+1,69
$\text{Pb} + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{PbSO}_4 + 2e^-$		-0,36
$\text{NiOOH} + \text{H}_2\text{O} + e^- \rightleftharpoons \text{Ni(OH)}_2 + \text{OH}^-$		+0,45
$\text{Cd} + 2\text{OH}^- \rightleftharpoons \text{Cd(OH)}_2 + 2e^-$		-0,81
$2\text{Ag}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} + e^- \rightleftharpoons 2\text{Ag} + 2\text{OH}^-$		+0,35
$\text{Zn} + 2\text{OH}^- \rightleftharpoons \text{Zn(OH)}_2 + 2e^-$		-1,25



### KONZENTRATIONABHÄNGIGKEIT DES POTENTIALS

Redoxpotentiale = f( Lösungsdruck der Metalle, osmotischen Druck der Salzlösung)

Halbzellen gleicher Redoxpaare unterschiedlicher Konzentration  
→ unterschiedliche Potentiale  
 $\Delta E^\circ$  sollte mögl. groß sein

### NERNST'sche GLEICHUNG

$$E = E^\circ + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$

E ... Potential d. Redoxpaares gegen Normalmet.  
E<sup>°</sup> ... Normalpotential  
R ... Gaskonst (8,31 J · K<sup>-1</sup> · mol<sup>-1</sup>)  
F ... Faradaykonst. (96487 C · mol<sup>-1</sup>)  
z ... Zahl d. übergehenden e<sup>-</sup>

$T$ ... absolute Temperatur  
 $[Ox]$ ... Konzentration der oxidierten  
 $[Red]$ ... Konzentration der reduzierten Form  
 des Redox paares

298K, R, F und Umwandlungsfaktor  
 $\ln \rightarrow \lg$

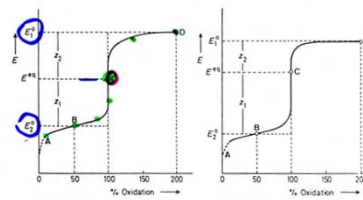
$$E = E^{\circ} + \frac{0,059}{z} \log \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Die Nernst'sche Gleichung beschreibt die  
 Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit  
 der Redoxpotentiale.

Hier soll nur der einfache Fall einer *oxidimetrischen Titration*,



bei der alle vier Komponenten gelöst vorliegen, näher betrachtet werden (Abb. 41a).



- a.  $z_1 = z_2$
- b.  $z_1 = 2z_2$
- $Ox_1 = \text{Titrant } (E_1^{\circ})$
- $Red_2 = \text{Probe } (E_2^{\circ})$
- A = Anfangspunkt
- B = 50% Umsetzung
- C = Äquivalenzpunkt
- D = 200% Umsetzung

Abb. 41 Diagramm einer Redox-titration (Oxidation)  
 a. Zahl der ausgetauschten Elektronen im Titrant- und Proben-system gleich  
 b. Zahl der ausgetauschten Elektronen verschieden

**Berechnung der charakteristischen Punkte**

A 0% Oxidation (*Anfangspunkt*)

$$E_A = E_1^{\circ} + \frac{0,059}{z} \log \frac{c_{Ox1}}{c_{Red1}}$$

Für  $c_{Ox2} = 0$  würde  $E_A$  gegen  $-\infty$  streben; da aber immer eine geringe Gleichgewichtskonzentration an  $Ox_2$  vorhanden ist, nimmt  $E_A$  einen endlichen Wert an.

B 50% Oxidation (Analogon zum *Pufferpunkt*)

$$E_B = E_1^{\circ} + \frac{0,059}{z} \log \frac{c_{Ox1}}{c_{Red1}} = E_1^{\circ} \quad c_{Ox1} = c_{Red1}$$

C 100% Oxidation (*Äquivalenzpunkt*)

$$E_C = E^{\circ} = \frac{1}{z} (z_1 E_1^{\circ} + z_2 E_2^{\circ}) \quad c_{Ox1} = c_{Red1} \cdot c_{Red2} = c_{Ox2}$$

D „200%“ Oxidation (doppelte stöchiometrische Menge Titrant)

$$E_D = E_1^{\circ} + \frac{0,059}{z} \log \frac{c_{Ox1}}{c_{Red1}} = E_1^{\circ} \quad c_{Ox1} = c_{Red1}$$

Die eigentlichen *Redoxindikatoren* stellen reversible Redoxsysteme dar, deren reduzierte und oxidierte Form verschiedenfarbig sind.

$$I_{ox} + z e^- \rightleftharpoons I_{red} \quad \text{ohne Protonenaustausch}$$

$$I_{ox} + m H^+ + z e^- \rightleftharpoons I_{red} \quad \text{mit Protonenaustausch}$$

**9.1 Zweifarbige Indikatoren**

$$E = E_1^0 + \frac{0,059}{z} \log \frac{a_{I_{ox}} \cdot a_{H^+}^m}{a_{I_{red}}} =$$

$$= E_1^0 + \frac{0,059}{z} \left( \log \frac{c_{I_{ox}}}{c_{I_{red}}} + \log \frac{f_{I_{ox}}}{f_{I_{red}}} - m \text{ pH} \right) \quad (211)$$

Unter den üblichen Bedingungen (s. Säure-Base-Indikatoren, S. 68) erhält man ein theoretisches *Umschlagspotential* von

$$E_u = E_1^0 - \frac{0,059}{z} \cdot m \text{ pH} \quad c_{I_{ox}} = c_{I_{red}} \quad (212)$$

**Beispiel:**  
**Ferroin** = Tris(o-phenanthrolin)eisen(II)

c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2 o-Phenanthrolin (phen)

$$[Fe(phen)_3]^{3+} + e^- \rightleftharpoons [Fe(phen)_3]^{2+} \quad \dots E_1^0 = 1,14 \text{ V}$$

Ferroin  
 schwach blau      tief rot

Bei einer Oxidationstiteration liegt  $E_u$  um 0,06 V höher als  $E_1^0$ , weil infolge der schwachen Eigenfarbe des Eisen(III)-Komplexes etwa 90% in der oxidierten Form vorliegen müssen, damit der Umschlag zu erkennen ist.

**9.2 Einfarbige Indikatoren**

Wenn  $I_{red}$  farblos und  $I_{ox}$  farbig ist, ergibt sich das Umschlagspotential (vgl. S. 69) aus (211) zu

$$E_u = E_1^0 + \frac{0,059}{z} \left( \log \frac{c_{ox}}{c_o - c_{ox}} + \log \frac{f_{ox}}{f_{red}} - m \text{ pH} \right) \quad (213)$$

$c_o$  = Totkonzentration des Indikatoren  
 $c_{ox}$  = Grenzkonzentration an  $I_{ox}$

**Beispiel: Diphenylamin**

$$I_{ox} + 4 H^+ + 4 e^- \rightleftharpoons 2 I_{red} \quad \dots E_1^0 = 0,76 \text{ V (pH 7)}$$

violett      farblos

Nc1ccc(Nc2ccccc2)cc1  $I_{ox}$  N,N'-Diphenyl-1,4-phenylenediamin  
Nc1ccccc1  $I_{red}$  Diphenylamin

Diphenylamin ist eigentlich kein reversibler Indikator, da die Oxidation über mehrere Zwischenstufen verläuft und ein Schritt *irreversibel* ist (Benzidinumlagerung des primär gebildeten Tetraphenylhydrazins) [1]. Die Reduktion des Chinons gelingt daher nur bis zum N,N'-Diphenylbenzidin (Aufnahme von zwei Elektronen). An Stelle des Diphenylamins wird häufig das besser lösliche N-Methyldiphenylamin-p-sulfonat verwendet [17].

**TITRATIONSKURVEN**

Konstruktion indem man für jeden Punkt der Titration das Potential aus der vorliegenden Konzentration berechnet und E gegen den Titrant aufträgt.

**REDOXINDIKATOREN:**  
 bei  $MnO_4^-$  kein Indikator nötig!

**zweifarbige Indikatoren:**

**FERROIN** (Tris(o-phenanthrolin)eisen(II))

c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2 o-Phenanthrolin (phen)

$$[Fe(phen)_3]^{3+} + e^- \rightleftharpoons [Fe(phen)_3]^{2+}$$

Ferroin  $E_1^0 = 1,14 \text{ V}$   
 schwach blau      tief rot

**Einfarbige Indikatoren:**

**Diphenylamin**

Nc1ccccc1  $E^0 = 0,76 \text{ V}$

Redox-Indikatoren 137

Die eigentlichen *Redoxindikatoren* stellen reversible Redoxsysteme dar, deren reduzierte und oxidierte Form verschiedenfarbig sind.

$$I_{ox} + z e^- \rightleftharpoons I_{red} \quad \text{ohne Protonenaustausch}$$

$$I_{ox} + m H^+ + z e^- \rightleftharpoons I_{red} \quad \text{mit Protonenaustausch}$$

**9.1 Zweifarbige Indikatoren**

$$E = E_1^0 + \frac{0,059}{z} \log \frac{a_{I_{ox}} \cdot a_{H^+}^m}{a_{I_{red}}} = E_1^0 + \frac{0,059}{z} \left( \log \frac{c_{I_{ox}}}{c_{I_{red}}} + \log \frac{f_{I_{ox}}}{f_{I_{red}}} - m \text{ pH} \right) \quad (211)$$

Unter den üblichen Bedingungen (s. Säure-Base-Indikatoren, S. 68) erhält man ein theoretisches *Umschlagspotential* von

$$E_u = E_1^0 - \frac{0,059 \cdot m}{z} \text{ pH} \quad c_{I_{ox}} = c_{I_{red}} \quad (212)$$

Beispiel:  
**Ferroin** = Tris(o-phenanthrolin)isen(II)

c1ccc2c(c1)nc3ccccc3n2 o-Phenanthrolin (phen)

$[Fe(phen)_3]^{2+} + e^- \rightleftharpoons [Fe(phen)_3]^{+2} \quad \dots E_1^0 = 1,14 \text{ V}$

→ „Ferroin“ schwach blau → „Ferroin“ tiefrot

Bei einer Oxidationstiteration liegt  $E_u$  um 0,06 V höher als  $E_1^0$ , weil infolge der schwachen Eigenfarbe des Eisen(III)-Komplexes etwa 90% in der oxidierten Form vorliegen müssen, damit der Umschlag zu erkennen ist.

**9.2 Einfarbige Indikatoren**

Wenn  $I_{red}$  farblos und  $I_{ox}$  farbig ist, ergibt sich das Umschlagspotential (vgl. S. 69) aus (211) zu

$$E_u = E_1^0 + \frac{0,059}{z} \left( \log \frac{c_{I_{ox}}}{c_0 - c_{I_{ox}}} + \log \frac{f_{I_{ox}}}{f_{I_{red}}} - m \text{ pH} \right) \quad (213)$$

$c_0$  = Totkonzentration des Indikatoren  
 $c_{I_{ox}}$  = Grenzkonzentration an  $I_{ox}$

Beispiel: Diphenylamin

$$I_{ox} + 4 H^+ + 4 e^- \rightleftharpoons 2 I_{red} \quad \dots E_1^0 = 0,76 \text{ V (pH 7)}$$

violett farblos

c1ccc(cc1)/N=C/c2ccccc2  $I_{ox}$  c1ccc(cc1)N  $I_{red}$

$I_{ox}$  =  $N,N'$ -Diphenyl-diphenochinon-dimin  $I_{red}$  = Diphenylamin

Diphenylamin ist eigentlich kein reversibler Indikator, da die Oxidation über mehrere Zwischenstufen verläuft und ein Schritt *irreversibel* ist (Benzildimulagerung des primär gebildeten Tetraphenylthiazins) [1]. Die Reduktion des Chinons gelingt daher nur bis zum  $N,N'$ -Diphenylbenzidin (Aufnahme von zwei Elektronen). An Stelle des Diphenylamins wird häufig das besser lösliche  $N$ -Methyldiphenylamin-p-sulfonat verwendet [17].

**Charakteristische Punkte der Redox-Titrationskurve**

NERNST'sche Gleichung:

$$E = E^0 + \frac{0,059}{z} \log \frac{[Ox]}{[Red]} = E^{ox} + \frac{0,059}{z^*} \log \frac{[Ox^*]}{[Red^*]}$$

$\tau = 0 \quad [Ox] = 0 \quad E = -\infty$

$\tau = 0,5 \quad [Ox] = [Red] \quad E = E^0$

$\tau = 1 \quad \frac{10^{-6}}{1+10^{-6}} = \frac{10^6}{1+10^6} \quad E = \frac{z \cdot E^0 + z^* \cdot E^{ox}}{z + z^*}$   
 Redox exponent

$\tau = 2 \quad [Ox^*] = [Red^*] \quad E = E^{ox}$

**Titration von  $Fe^{2+}$  mit  $MnO_4^-$**

The graph shows the potential E (V) on the y-axis (ranging from 0.3 to 1.5) versus the titration fraction  $\tau$  on the x-axis (ranging from 0 to 2). The curve starts at a low potential for  $\tau < 0.5$ , rises sharply at  $\tau = 1$ , and levels off at a higher potential for  $\tau > 1$ . Key points are labeled:  $E'(Fe^{3+}/Fe^{2+})$  at  $\tau = 0.5$  and  $E'(MnO_4^-/Mn^{2+})$  at  $\tau = 1$ . The redox exponent is indicated as 1.

**MANGANOMETRIE**

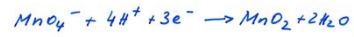
Grundgleichungen

- Saures Medium



$$E^\circ = 1,52\text{V}$$

- Neutral - schwach alkalisches Medium



$$E^\circ = 1,68\text{V}$$

- Stark alkalisches Medium

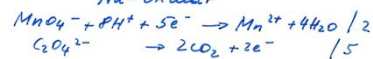


$$E^\circ = 0,54\text{V}$$

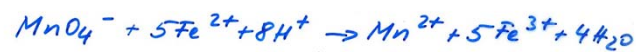
KMnO<sub>4</sub> Lösungen sind leicht zersetzlich!

gehalt überprüfen!

Na-oxalat

**BEISPIEL :****Manganometrische Eisenbestimmung:**

Fe II in schwefelsaurer Lösung



Endpunkt: Orangefärbung  
(Mischfarbe violett/gelb)

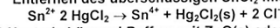
Titrations mit  $\text{KMnO}_4$ 

Titrand	Reaktionsgleichung	Anmerkung
Sn(II)	$\text{Sn}^{2+} \rightarrow \text{Sn}^{4+} + 2\text{e}^-$	Vorreduktion mit Zn JONES-Reduktor <sup>1)</sup>
$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2(\text{g}) + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	
Fe(II)	$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$	Vorreduktion mit JONES-Reduktor
Fe(II)	$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$	Vorreduktion mit $\text{SnCl}_2$ <sup>2)</sup> (Reinhardt-Zimmermann)
$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , Oxalate	$\text{C}_2\text{O}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{e}^-$	Indirekte Bestimmung von Ca, Zn, Co, Pb
$\text{HNO}_2$ , Nitrite	$\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	Inverse Titration
V	$\text{VO}^{2+} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{VO}_2^+ + 2\text{H}_3\text{O}^+ + \text{e}^-$	Vorreduktion mit $\text{SO}_2$
$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MnO}_2(\text{s}) + 4\text{H}^+$	„Volhard-Wolff“ <sup>3)</sup>

1) Zn-Amalgam! Amalgamiertes Zn in Säule!

2) Reduktion mit  $\text{SnCl}_2$  in stark salzsaurer Lösung bis zur Entfärbung in der Siedehitze

Entfernen des überschüssigen  $\text{SnCl}_2$  mit  $\text{HgCl}_2$ :



3) Neutrale Lösung! Puffern mit  $\text{ZnO}(\text{s})$  oder  $\text{HOAc}/\text{NaOAc}$

## Dichromatometrie

## Grundgleichung



Anwendung: zur technischen Eisenbestimmung

Vorteil:  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  stabile Kristallsubstanz

Nachteil: rel. schwierige Erkennbarkeit des Umschlagspunktes

## Bromatometrie

## Grundgleichung



Endpunktsanzeige: durch elementares Brom das sich bei Bromatüberschuss bildet:



Eigenfarbe von Brom ist meist zu gering

→ man benutzt die Oxidationswirkung des Broms auf organische Farbstoffe wie Methylorange (Entfärbung)

## IODOMETRIE

VIELSEITIGSTE REDOX-TITRATIONSMETHODE  
pharmazeutischen und organischen  
Analytik

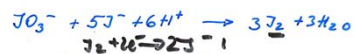


Reduzierende Stoffe werden direkt mit Iodlösung titriert (Erhöhung der Löslichkeit des Jods wird KJ ( $\text{KJ}_3$ ) zugesetzt).

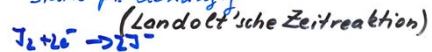
Maßlösung ist rel. unbeständig



KJ/ $\text{KJ}_3$  Gemisch 5:1  
ansäuern



Reaktionsgeschwindigkeit ist  
stark pH-abhängig



Oxidierende Verbindungen  
werden mit überschüssigem  
KJ reduziert und das ausgeschiedene  
Jod mit Thio-sulfat zurücktitriert



Thio-sulfat ist sehr instabil

Indikation:

Stärke





Stärke:

für freies Jod  
(Grenzkonzentration:  
 $\sim 10^{-5}$  mol/l)

Stärkelösung: Bakterienbefall  
Schutz  $\text{HgI}_2$

→ blaue Einschlußverbindung  
von ~~atomarem~~ Jod + Stärke  
Amylase (unverzweigte  
Kette)  
helixartige Struktur

→ es bilden sich lineare Ketten mit  
etwa 15 Atomen  
J-J Abstand von  $3,06 \text{ \AA}$  ( $306 \text{ pm}$ )

#### OXIDIMETRISCHE BESTIMMUNGEN

+ J<sub>2</sub> Lösung (Bzw. KJ<sub>2</sub>O<sub>8</sub> / KJ Gemisch)

kann man bestimmen:

As(III); Sb(III); Sn(II); S<sup>2-</sup> (→ S);  
S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> (→ S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>); SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (→ SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>);  
Hg und H<sub>2</sub>O

Wasserbestimmung:



J<sub>2</sub> in methanolischer Lösung

SO<sub>2</sub> in Pyridin (basisch - Neutralisation  
der entstehenden Säure)

LÖSUNG aus Gemisch der beiden Bestand-  
teile ... Karl Fischer Lösung

→ WASSERBESTIMMUNG NACH K. F.

Endpunkt: braune Farbe des Jods  
(Verstärkung mit Methylblau)

faktächlich reagiert auch CH<sub>3</sub>OH

## Ausgewählte Redoxfarbindikatoren

Indikator	oxidierte Form	reduzierte Form	Umschlagspotential	Medium
5-Nitro-1,10-Phenanthrolin Fe(II)-Komplex	schwach blau	rot-violett	+1,25 V	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1-molar
2,3'-Diphenylamin-dicarbon-säure	blau-violett	farblos	+1,12 V	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7 - 10-molar
1,10-Phenanthrolin-Fe(II)-Komplex	schwach blau	rot	+1,11 V	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Diphenylamin-sulfonsäure	rot-violett	farblos	+0,85 V	verd.Säure
Diphenylamin	violett	farblos	+0,76 V	verd.Säure
Methylenblau	blau	farblos	+0,53 V	Säure 1-molar

## FÄLLUNGSANALYSE

### FÄLLUNGSTITRATION

#### ● LÖSLICHKEIT - LÖSLICHKEITSPRODUKT

#### Lösegleichgewicht

Fällung - GLEICHGEWICHT ZWISCHEN  
NIEDERSCHLAG und FLÜSSIGKEIT

↑  
ist gesättigte  
Lösung

↑  
enthält den  
ausgefällten Stoff in der  
höchsten möglichen  
Konzentration  
Sättigungskonzentration

LÖSLICHKEITSPRODUKT  $K_L$

### LÖSLICHKEIT



$$K_L = [\text{Ag}^+] \cdot [\text{Cl}^-]$$



Fällung bis Löslichkeitsprodukt erreicht ist  $\frac{K_L}{100}$

$$[\text{AgCl}] = [\text{Ag}^+] = [\text{Cl}^-]$$

$$[\text{AgCl}]^2 = K_L$$

$$[\text{AgCl}] = \sqrt{K_L}$$

L

DIE SÄTTIGUNGSKONZENTRATION IN REINEM WASSER WIRD AUCH ALS

LÖSLICHKEIT (L,  $L_c$ ) bezeichnet.



$$[A^{n+}]^m \cdot [B^{m-}]^n = K_L$$

$$K_L = (mL)^m \cdot (nL)^n$$

$$K_L = m^m \cdot n^n \cdot L^{m+n}$$

$$K_L = m^m \cdot n^n \cdot L^{m+n}$$

$$L = \sqrt[m+n]{\frac{K_L}{m^m \cdot n^n}}$$

$m=1, n=1$

$$L = \sqrt{K_L}$$

- ABSCHIEDUNG EINES NIEDERSCHLAGES BEGINNT IMMER, WENN DAS LÖSLICHKEITSPRODUKT DER BETEILIGTEN IONENARTEN ÜBERSCHRITTEN WIRD.
- DIE LÖSLICHKEIT EINER SCHWERLÖSLICHEN VERBINDUNG LÄSST SICH DURCH EINEN ÜBERSCHUSS AN FÄLLUNGSMITTEL WEITER HERABDRÜCKEN.

DAS ERGEBNIS EINER TITRIMETRISCHEN FÄLLUNGSANALYSE IST UMSO GENAUER, WENN FOLGENDE BEDINGUNGEN ERFÜLLT SIND:

- Löslichkeitsprodukt der ausgefällten Verbindung soll möglichst klein sein
- die Anfangskonzentration der zu titrierenden Ionensorte muß groß genug sein
- der erkennbare Endpunkt der Titration soll möglichst nahe beim Wendepunkt der Titrationskurve liegen

### Fällungstitration

Titration von  $\text{Cl}^-$  mit  $\text{Ag}^+$

Beginn der Titration



Reagenzüberschuß



Äquivalenzbereich  $[\text{Ag}^+] = [\text{Cl}^-]$   $\leftarrow$  End.

### FÄLLUNG und KOMPLEXBILDUNG

Löslichkeit von Silberhalogeniden in  $\text{NH}_3$



KOMPLEXBILDUNGSKONST.

Durch die Komplexbildung wird die Konzentration an  $\text{Ag}^+$  Ionen ständig verringert, da jedoch das  $K_L$  konstant bleibt, muß die Konzentration an  $\text{Ag}^+$  Ionen zunehmen; d. h.  $\text{Ag}^+$  löst sich auf.

### Fällungstiteration - Fehlerquellen

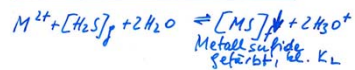
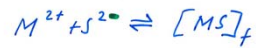
absolut unlösliche Verbindungen gibt es nicht

am Äquivalenzpunkt ist die Löslichkeit des Niederschlags am größten

### Fällungstiterationskurven

pIon gegen das Volumen an zugesetzter Maßlösung

## SULFIDFÄLLUNG



## HYDROXIDFÄLLUNG



$$K_L = [M^{3+}] \cdot [OH^-]^3$$

$$L = [M^{3+}] = \frac{K_L}{[OH^-]^3} = \frac{K_L \cdot [H_3O^+]^3}{K_W^3}$$

$$L = [M^{n+}] = \frac{K_L \cdot [H_3O^+]^n}{K_W^n}$$

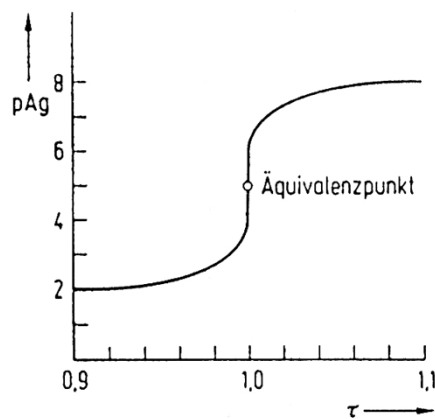
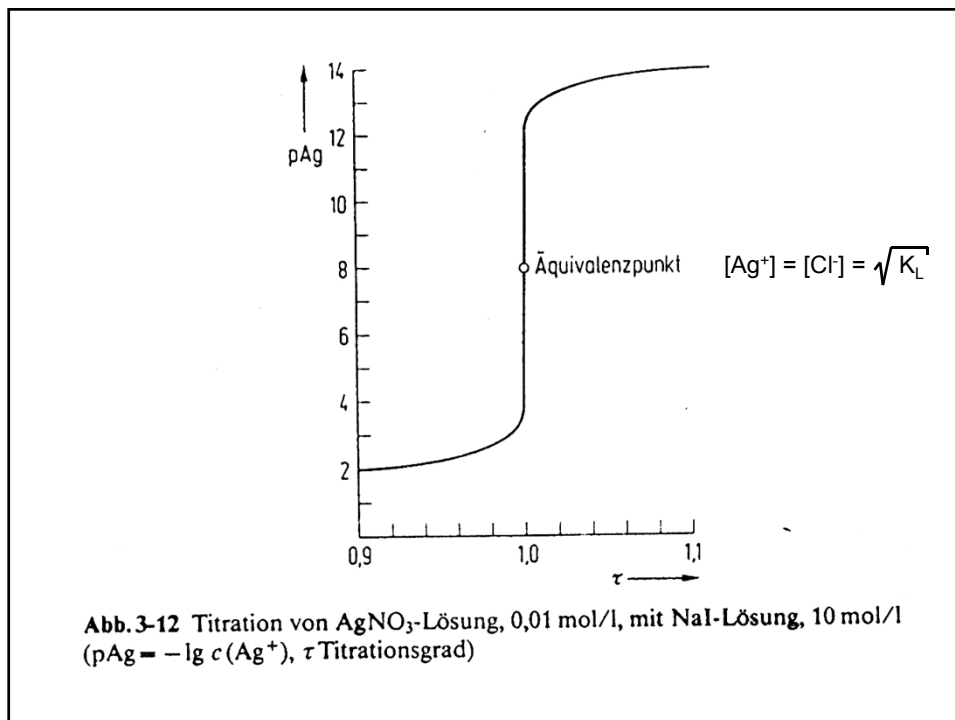
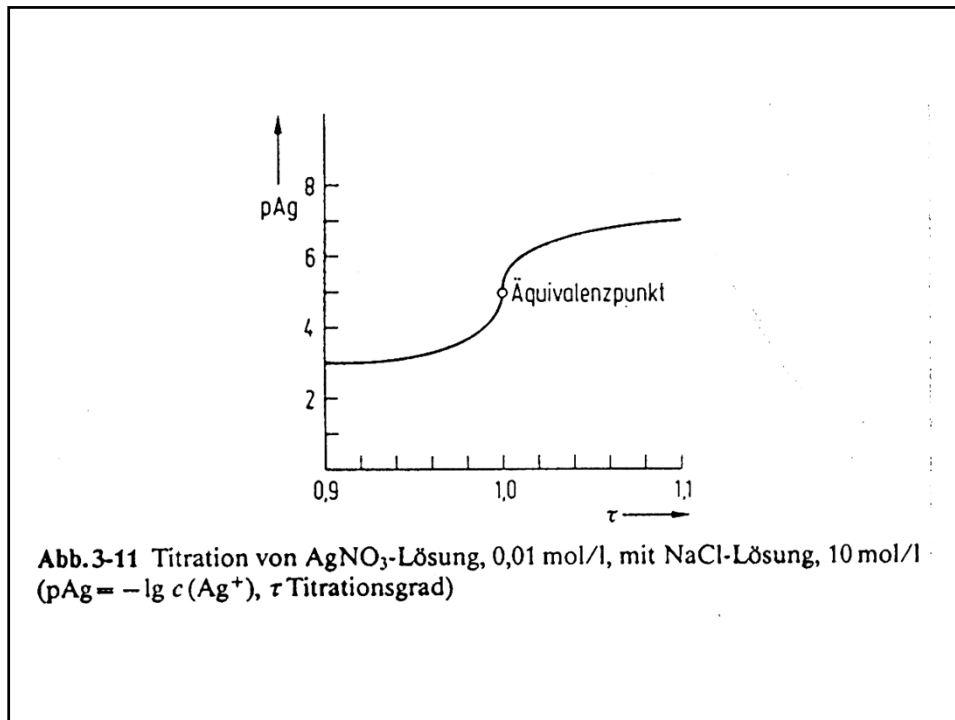


Abb. 3-10 Titration von  $AgNO_3$ -Lösung, 0,1 mol/l, mit  $NaCl$ -Lösung, 10 mol/l  
( $pAg = -\lg c(Ag^+)$ ,  $\tau$  Titrationsgrad)

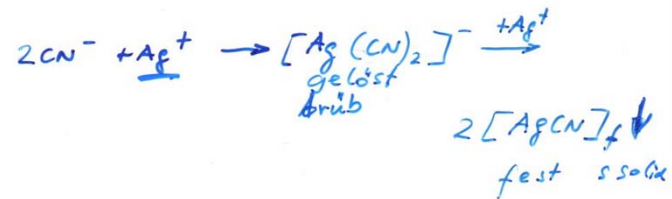




## FÄLLUNGSINDIKATION

### TITRATION OHNE INDIKATOR

Cyanid nach Liebig

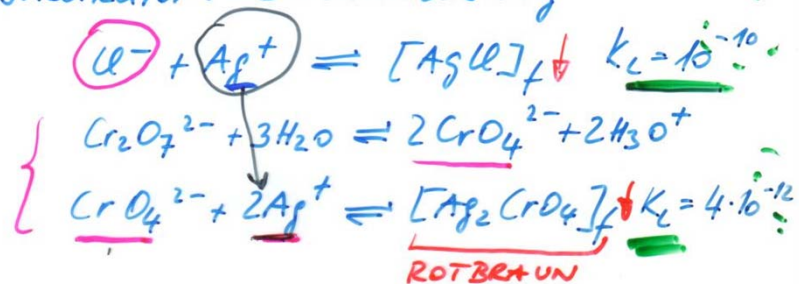


Spontanes Ausflocken beim Äquivalenzpunkt

## INDIKATION DURCH FARBIGEN NIEDERSCHLAG

Chlorid nach Mohr

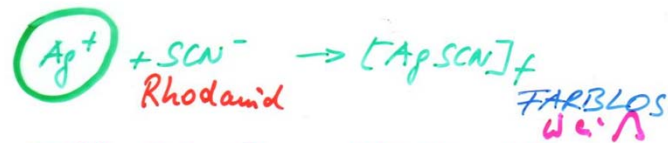
Indikator: Chromatlösung



INDIKATION DURCH **FARBIGE LÖSUNG**

Silber nach VOLHARD

Indikator:  $\text{NH}_4 \text{Fe}^{\text{III}} (\text{SO}_4)_2$



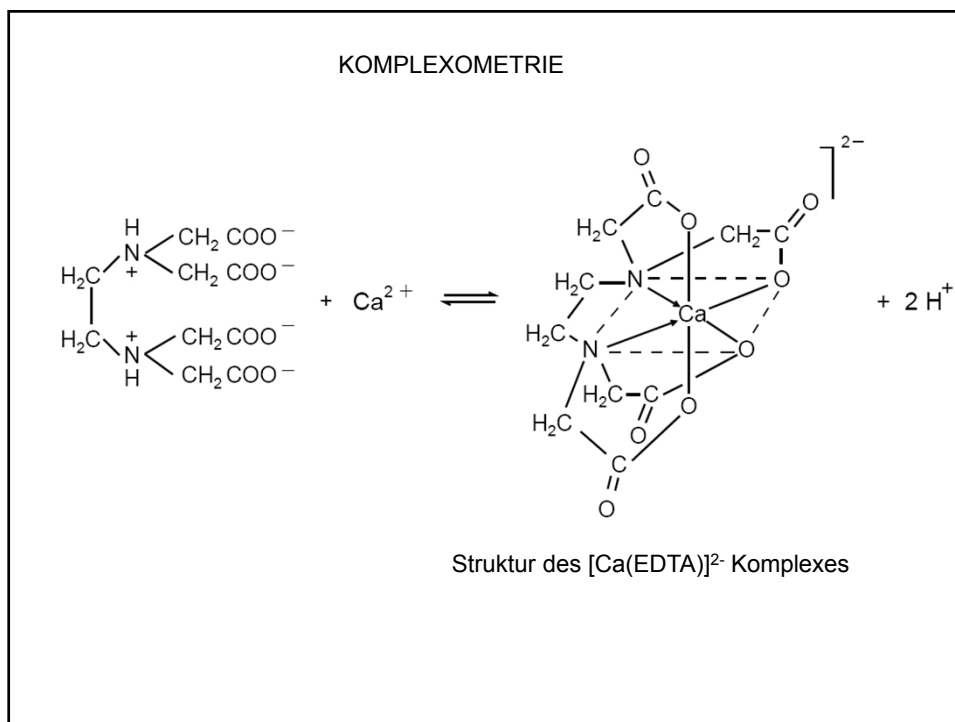
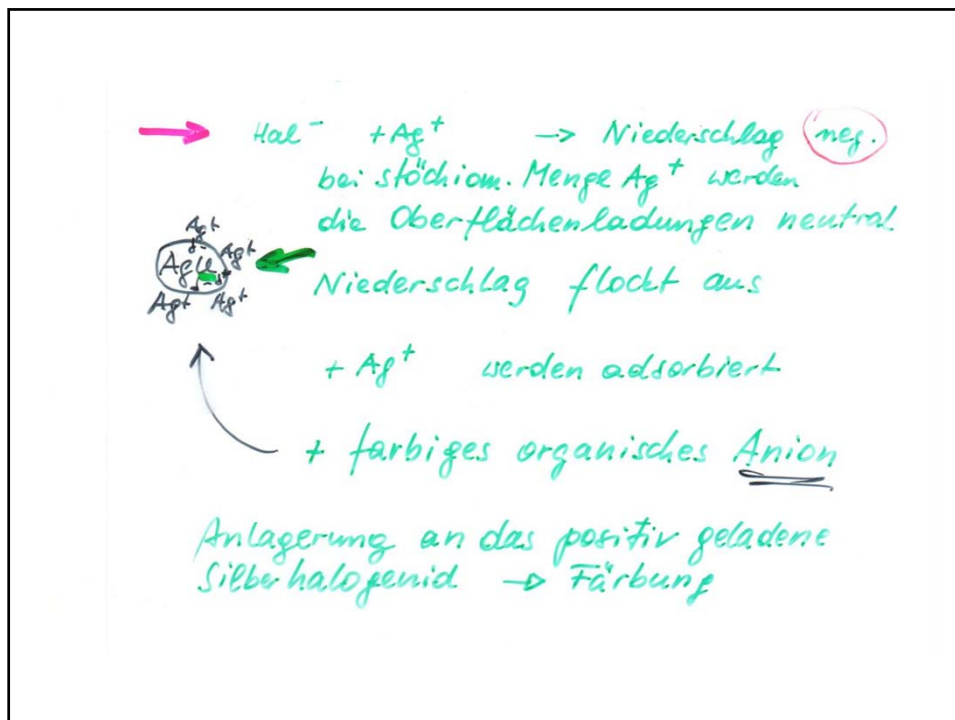
TIEFROT  
LÖSLICH

INDIKATION DURCH ANFÄRBE  
DES FÄLLUNGSPRODUKTES

Indikatoren: Eosin ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ )  
FLUORESC EIN ( $\text{Cl}^-$ )

(Adsorptionsindikatoren) FAJANS

Schwerlösliche / kolloidale Stoffe wie  
 $\text{Ag}$ -halogenide besitzen die Eigen-  
schaft überschüssige Ionen aus der  
Lösung zu adsorbieren.



**Nomenklatur**

In Formeln und Namen zuerst KATION dann ANION

In Formeln von Komplexen zuerst ZENTRALATOM dann die Liganden in der Reihenfolge

- anionische
- neutrale
- kationische Liganden.

Im Namen von Komplexen ist die Reihenfolge

- a. Anzahl der Liganden
- b. Art der Liganden (alphabetisch) – o
- c. Zentralatom
- d. Oxidationszahl des ZA in Klammern

$[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+ \text{Cl}^-$  Diamminsilber (I) chlorid

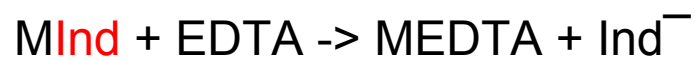
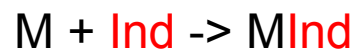
$[\text{CoCl}_2(\text{NH}_3)_4]^+ \text{Cl}^-$  Tetraammindichloro-cobalt (III) chlorid

$\text{H}_2\text{O}$ .....aqua

$\text{NH}_3$ .....ammin

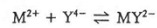
$\text{CO}$ .....carbonyl

$\text{NO}$ .....nitrosyl

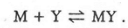


### Der Einfluß des pH auf die Titrationskurve

Die Stabilität von Komplexen mit EDTA ist je nach Metallion unterschiedlich. Die Bildungskonstante (oft Stabilitätskonstante genannt) ist ein Maß für die Stabilität des Komplexes. Ein Metallion reagiert mit EDTA nach dem folgenden Schema:



Läßt man die Ladungen weg, so vereinfacht sich die Gleichung zu



Der Ausdruck für die Bildungskonstante ist dann

$$K = \frac{[MY]}{[M][Y]} \quad (12-1)$$

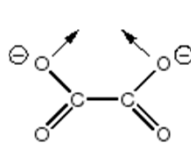
Man beachte, daß beim Schreiben der Bildungskonstante  $Y^{4-}$  (einfach als Y wiedergegeben) und nicht  $H_2Y^{2-}$  als die reaktive Spezies des EDTA betrachtet wird. Die Bildungskonstanten für einige Metall-EDTA-Komplexe sind in Tabelle 12-3 angegeben.

Titrationen tragen zum Verständnis der Titration mit EDTA bei. In einigen Fällen kann man sie experimentell bestimmen, indem man das Potential einer

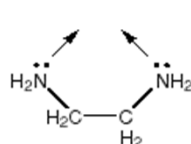
Tabelle 12-3 Bildungskonstanten einiger EDTA-Metall-Komplexe

Metallion	$\log K_{MY}$	Metallion	$\log K_{MY}$	Metallion	$\log K_{MY}$
Fe <sup>3+</sup>	25,1	Ni <sup>2+</sup>	18,6	Ce <sup>3+</sup>	16,0
Th <sup>4+</sup>	23,2	Pb <sup>2+</sup>	18,0	La <sup>3+</sup>	15,4
Cr <sup>3+</sup>	23	Cd <sup>2+</sup>	16,5	Mn <sup>2+</sup>	14,0
Bi <sup>3+</sup>	22,8	Zn <sup>2+</sup>	16,5	Ca <sup>2+</sup>	10,7
VO <sup>2+</sup>	18,8	Co <sup>2+</sup>	16,3	Mg <sup>2+</sup>	8,7
Cu <sup>2+</sup>	18,8	Al <sup>3+</sup>	16,1	Sr <sup>2+</sup>	8,6
				Ba <sup>2+</sup>	7,8

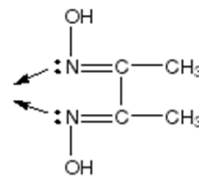
### Zweizählige Liganden



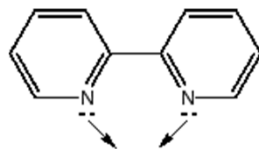
Oxalat



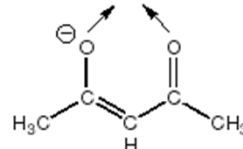
Ethylendiamin (en)



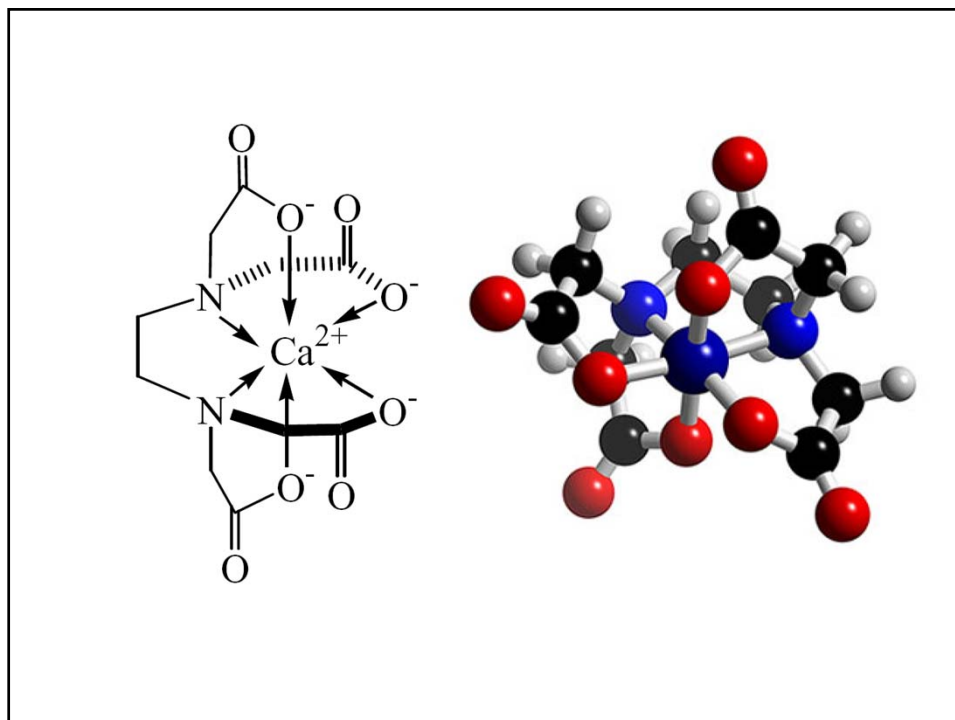
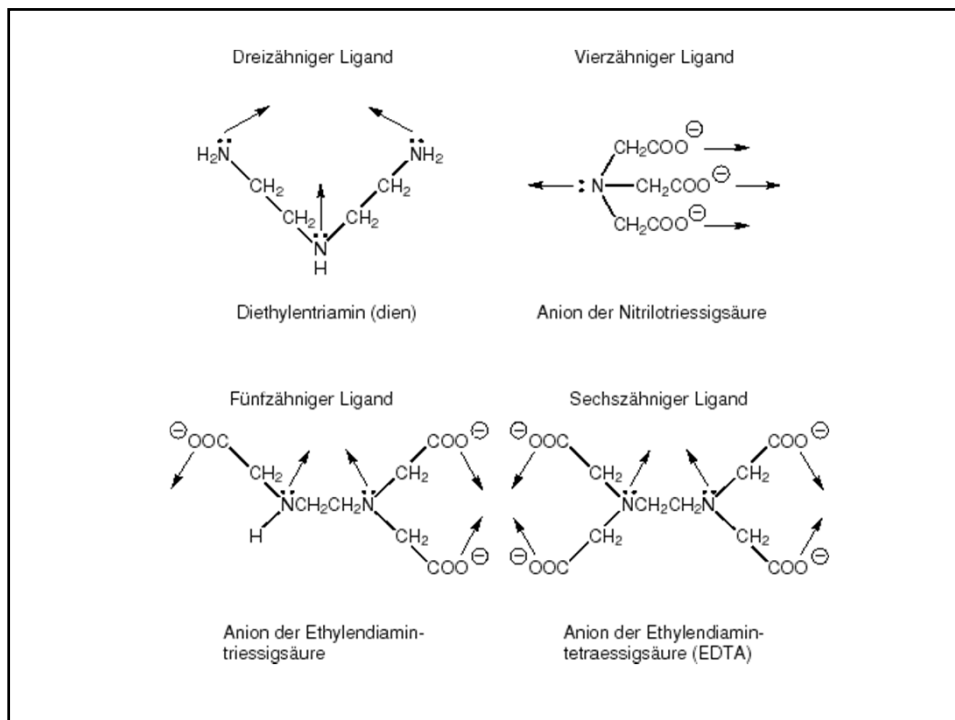
Diacetyldioxim



2,2'-Dipyridyl (dipy)



Acetylacetonat (acac)

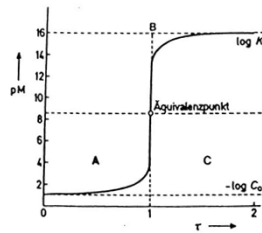
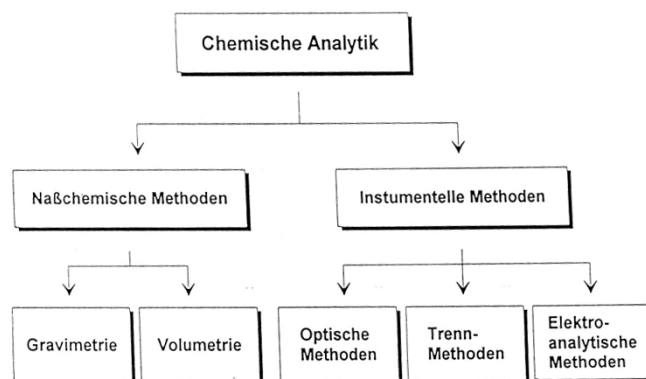


## 114 Komplexometrie

Tab. 12 Bildungskonstanten einiger EDTA-Komplexe (aus [5])

Kation	log K	Kation	log K	Kation	log K
Fe <sup>3+</sup>	25,1	Pb <sup>2+</sup>	18,0	La <sup>3+</sup>	15,4
Th <sup>4+</sup>	23,2	Cd <sup>2+</sup>	16,5	Mn <sup>2+</sup>	14,0
Ce <sup>3+</sup>	23,0	Zn <sup>2+</sup>	16,5	Ca <sup>2+</sup>	10,7
Bi <sup>3+</sup>	22,8	Co <sup>2+</sup>	16,3	Mg <sup>2+</sup>	8,7
Cu <sup>2+</sup>	18,8	Al <sup>3+</sup>	16,1	Sr <sup>2+</sup>	8,6
Ni <sup>2+</sup>	18,6	Ce <sup>3+</sup>	16,0	Ba <sup>2+</sup>	7,8

Analytische Anwendung 115

Abb. 38 Konstruktion der komplexometrischen Titrationskurve für eine 0,1 molare Lösung des Metallions M ( $K = 10^{16}$ )

## PHOTOMETRIE

**Prinzip:** Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie.

**Strahlung:**

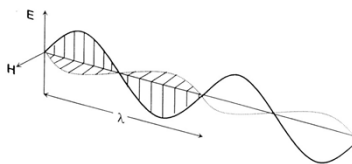
Freier, gerichteter Energietransport durch den Raum.

**Elektromagnetische Strahlung:**

Teilchenmodell (Partikeltheorie)

Wellenmodell:

zeitlich periodisch sich änderndes elektrisches Feld E und ein damit gekoppeltes magnetisches Feld H

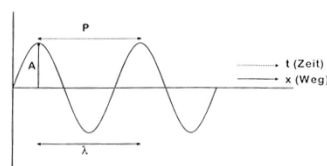


**Wellentheorie:** Streuung, Brechung, Beugung, Interferenz

**Partikeltheorie:** Absorption und Emission von Strahlung

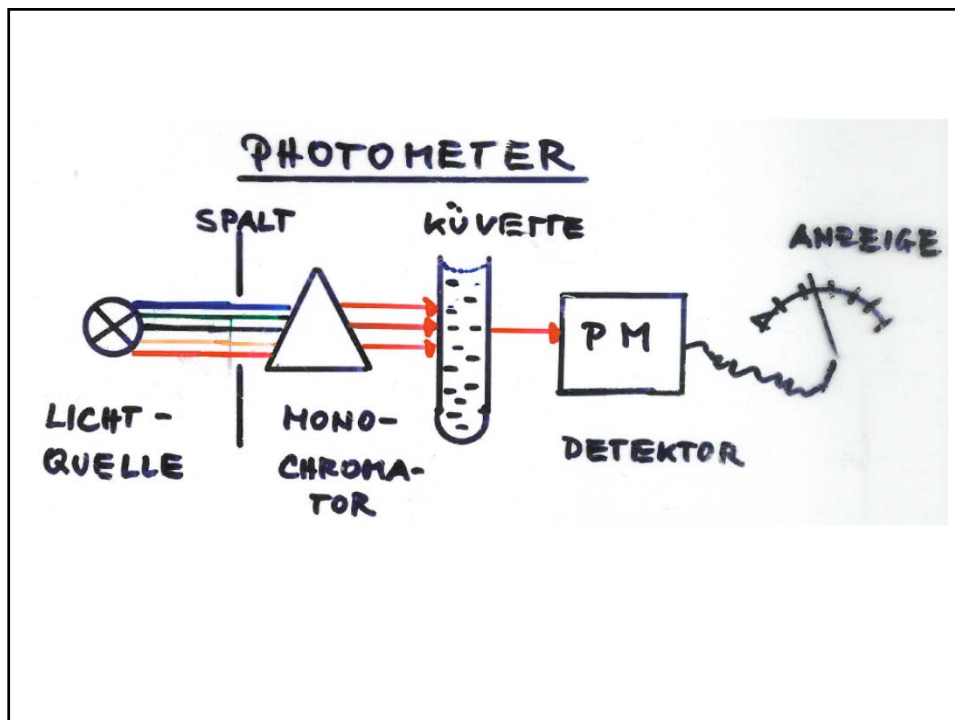
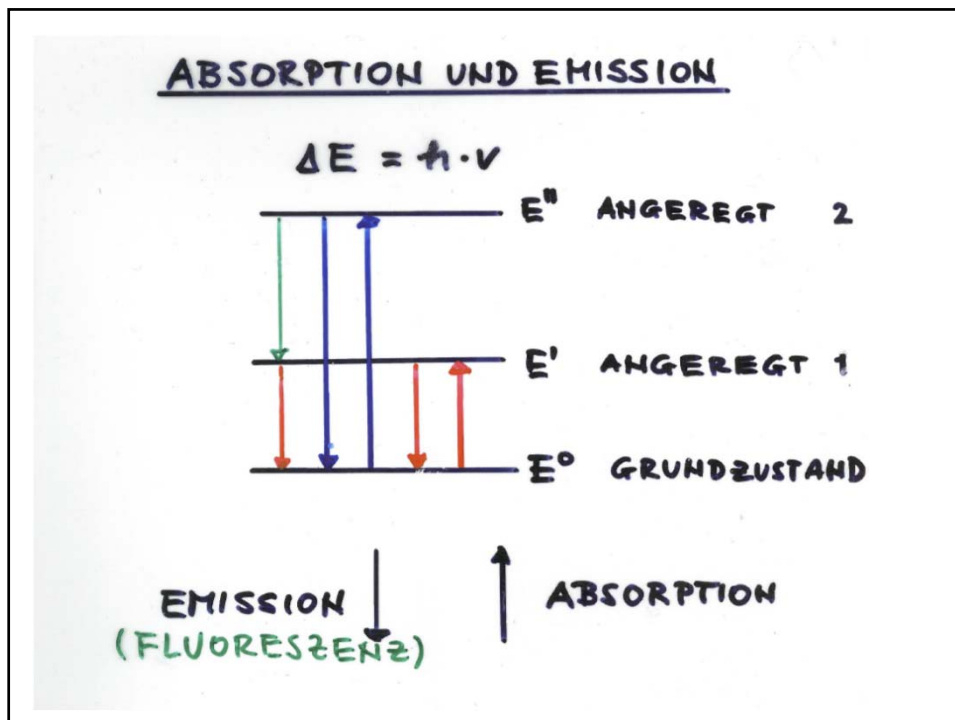
### Beschreibung einer (elektromagnetischen) Welle:

Periode	P	Zeit, die bis zum Erreichen desselben Schwingungszustands vergeht
Amplitude	A	grösster Betrag des elektrischen Feldvektors (vgl. Abbildung)
Wellenlänge	$\lambda$	Weg, den eine Welle während einer Periode zurücklegt
Frequenz	$\nu$	Zahl der Schwingungen pro Sekunde
Geschwindigkeit	v	Weg, den eine Welle in einem Medium in einer Sekunde zurücklegt
Vakuumgeschwindigkeit	c	Weg, den eine Welle im Vakuum in einer Sekunde zurücklegt (die Ausbreitungsgeschwindigkeit in Luft ist praktisch identisch mit der Vakuumgeschwindigkeit)



$$v = \frac{c}{\lambda} \quad [\text{s}^{-1}]$$





## Quantitative Aspects of MIR and NIR Spectroscopy

### LAMBERT-BEER

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a \cdot b \cdot c$$

**A = absorbance**

**a = absorptivity (cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>)**

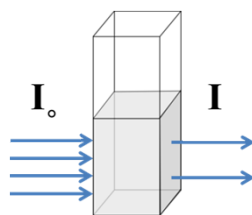
**b = sample thickness (cm)**

**c = sample concentration (mol cm<sup>-3</sup>)**

Generally it is recommended to use peak areas instead of peak maxima  
!!!

83

## Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz



- Bei Durchtritt von elektromagnetischer Strahlung durch eine Lösung wird dessen Intensität durch Absorption verringert.
- Bouguer (1698-1758) und Lambert (1728-1777): Absorption ist proportional zur Schichtdicke  $d$  der Meßküvette. ( $A = K_1 \cdot d$ )
- Beer (1825-1863): Absorption ist proportional zur molaren Konzentration eines Lichtabsorbierenden Stoffes (molarer Absorptionskoeffizient). ( $A = K_2 \cdot c$ )
- Nach DIN 1349 werden die früher üblichen Begriff Extinktion  $E$  durch Absorption  $A$  ersetzt.

$$E = \log I_0/I = \epsilon (\lambda) \cdot c \cdot d$$

*E* : Extinktion

*I*<sub>0</sub> : Anfangsintensität

*I* : Durchgelassene Intensität

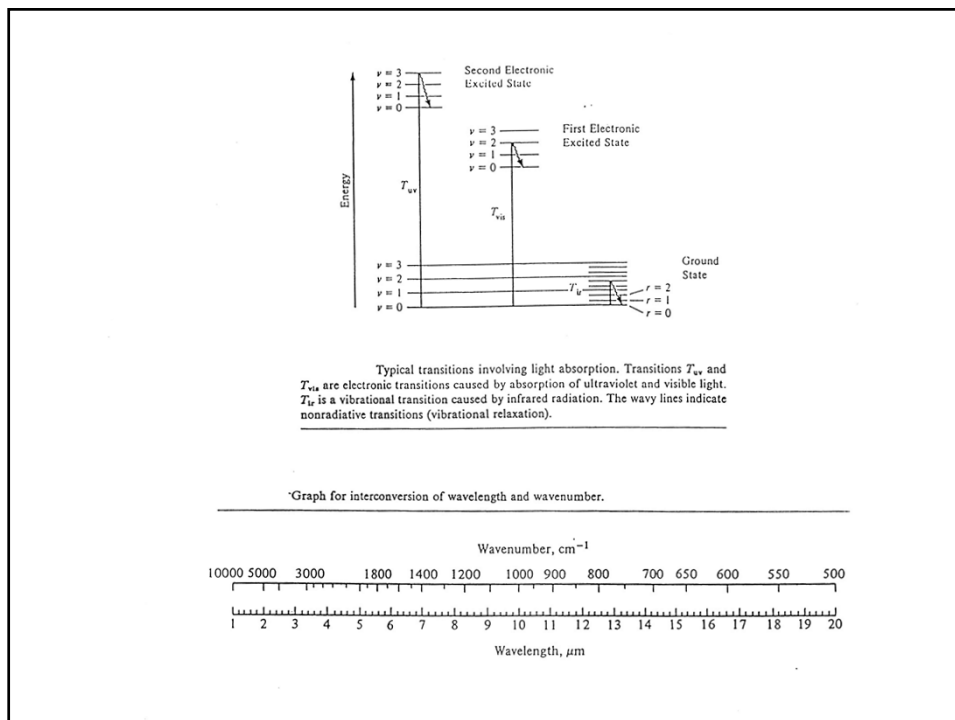
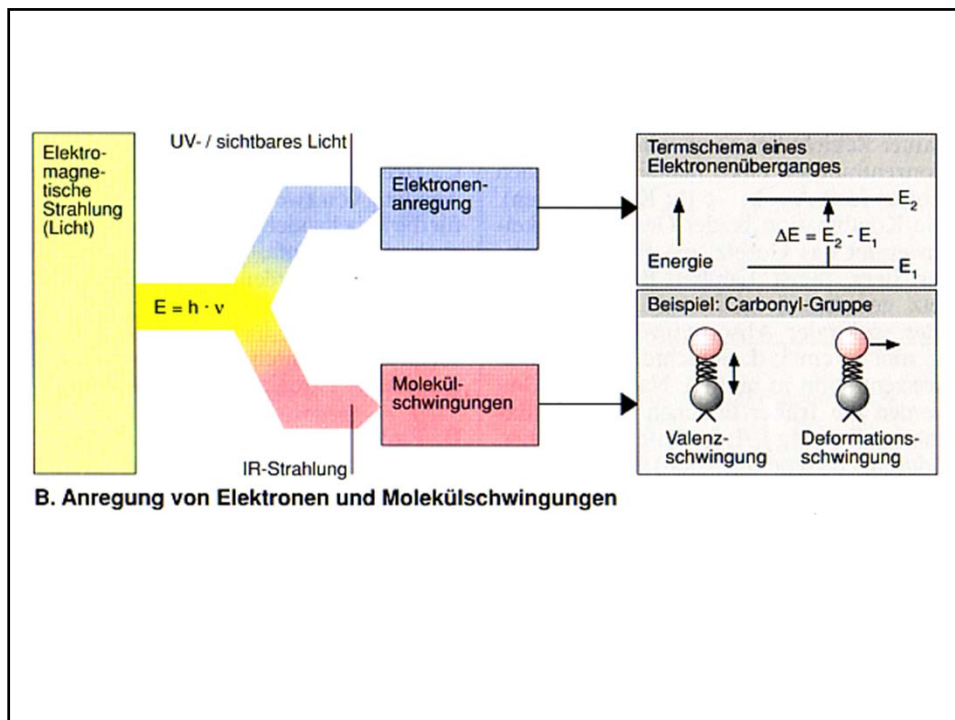
$\epsilon$  : Molare Extinktionskoeffizient

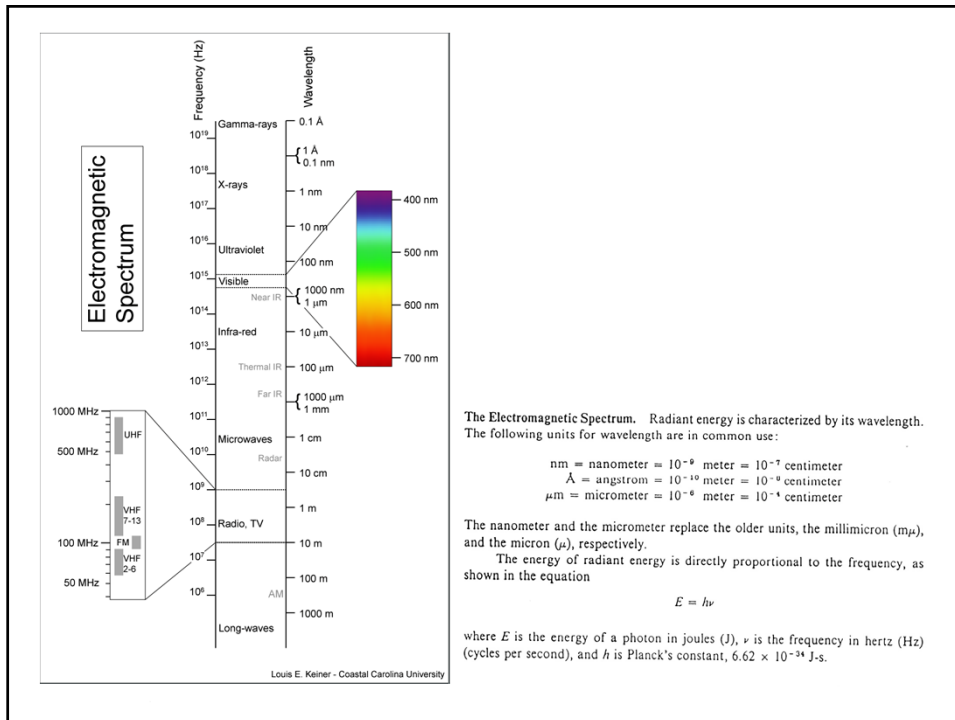
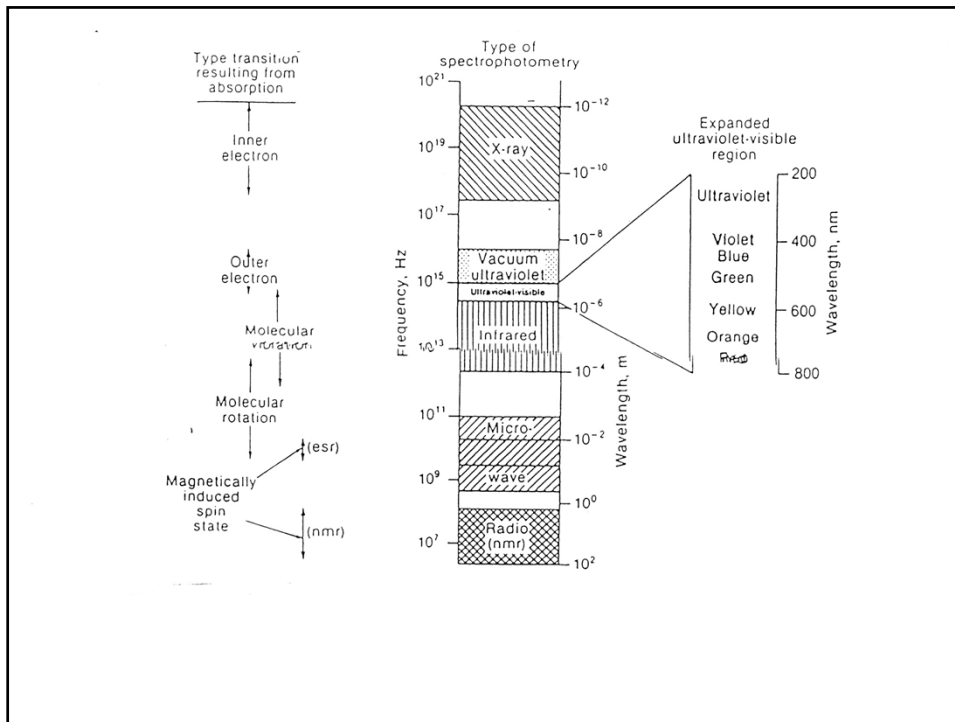
*c* : Stoffmengenkonzentration der

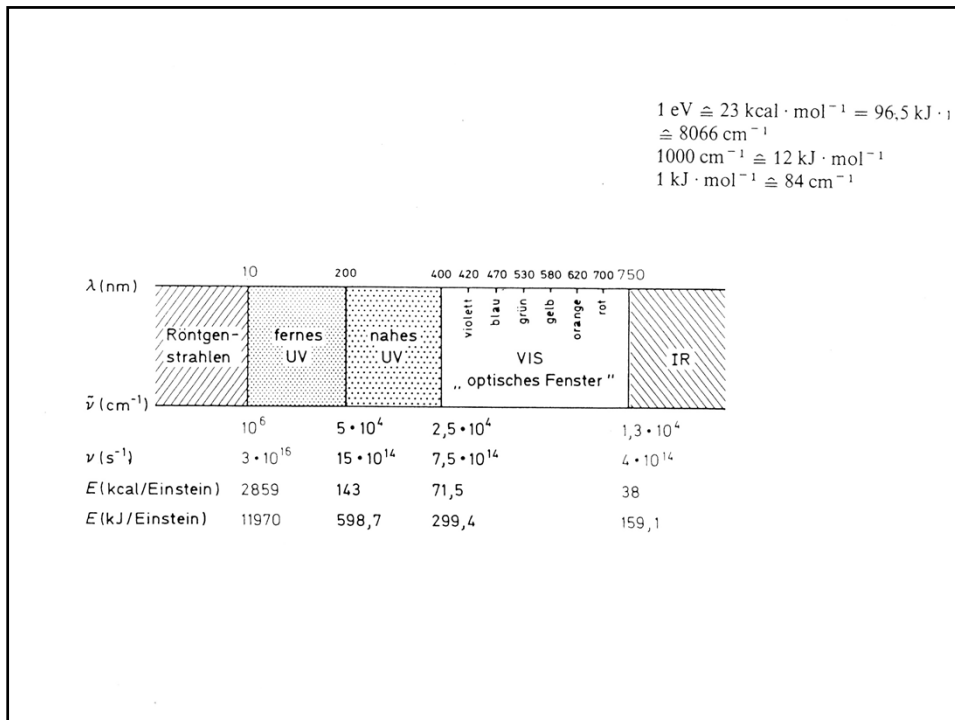
Lösung in der Meßküvette

*d* : Schichtdicke der Meßküvette

84







Messung der Absorption von Strahlung

Bezeichnungen in der Spektralphotometrie

Symbol	deutscher Name	englischer/amerikanischer Name
$I_0$	einfallende Lichtintensität	incident intensity
$I$	Intensität des austretenden Lichts	transmitted intensity
$T = \frac{I}{I_0}$	Transparenz, Transmissionsgrad, Durchlässigkeit	transmission (engl.) transmittance (amerik.) transmittancy [bezeichnet den um die Absorption im Lösungsmittel korrigierten Wert]
$\% T = 100 \cdot \frac{I}{I_0}$	prozentuale Durchlässigkeit, % Durchlässigkeit	% transmission
$1 - \frac{I}{I_0}$	Absorption	absorption optical density } (engl.) absorbancy [bezeichnet den um die Absorption im Lösungsmittel korrigierten Wert]
$100 \cdot \left(1 - \frac{I}{I_0}\right)$	prozentuale Absorption	% absorption
$\log \frac{I}{I_0}$	Extinktion	extinction, absorbance
$l$	Zelldurchmesser, Länge des Lichtweges in der Probenlösung	internal cell length
$\epsilon = \frac{1}{c \cdot l} \log \frac{I_0}{I}$	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient	molar extinction coefficient specific absorbance absorbance } (amerik.)

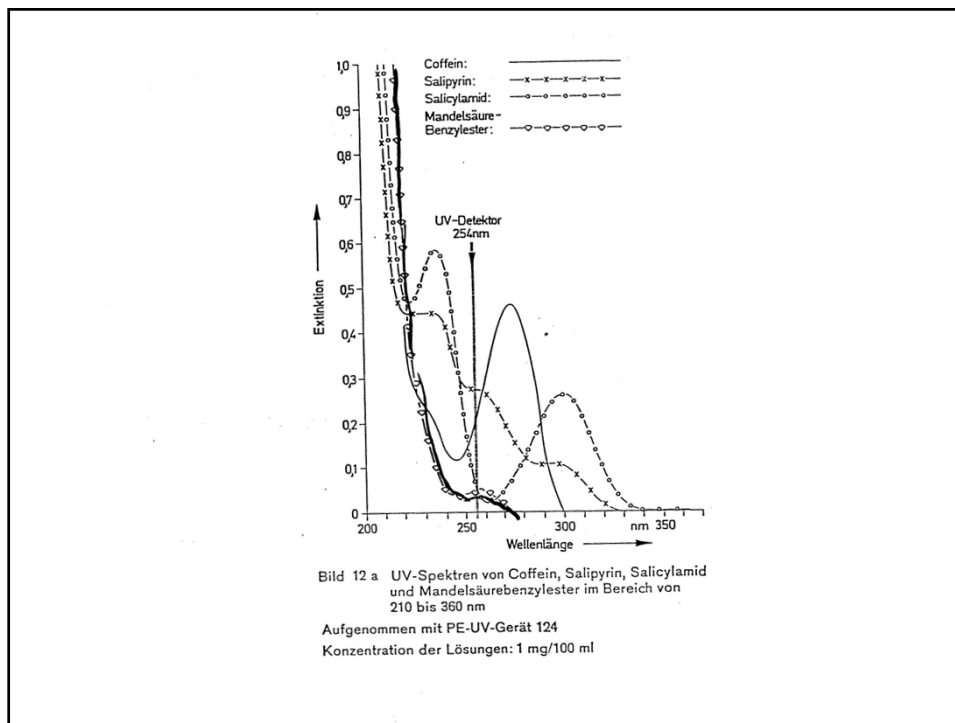
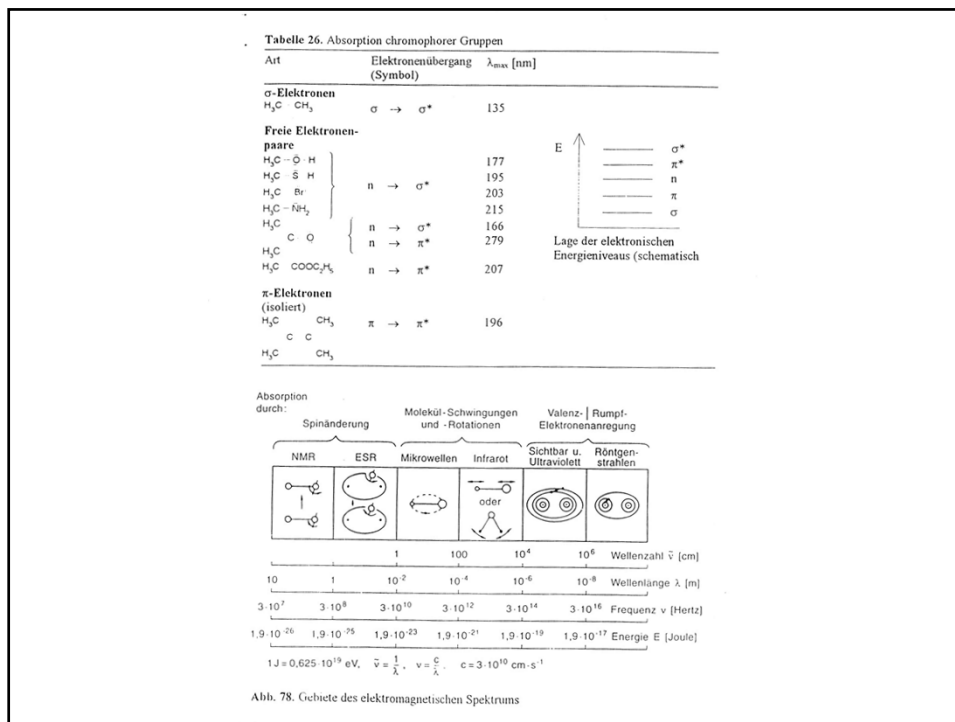
Strahlungsquellen im ultravioletten und sichtbaren Bereich

Quelle	Wellenlängenbereich	Intensität
Wolframbandlampe	320–2500 nm	schwach unterhalb 400 nm, stark oberhalb 750 nm
Wolfram-Halogen-Lampe (Quarzmantel)	250–2500 nm	hohe Intensität zwischen 220 und 2500 nm
Wasserstofflampe	180–375 nm	schwach im gesamten Bereich, am besten verwendbar zwischen 200 und 325 nm
Deuteriumlampe	180–400 nm	unterschiedlich

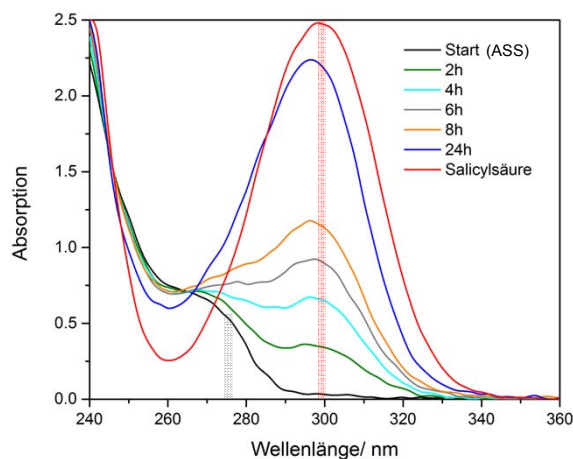
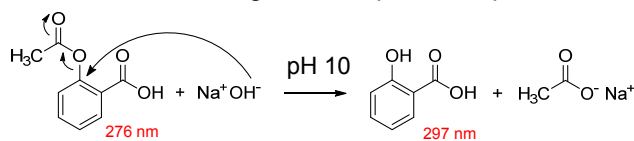
  

Detektoren für ultraviolette und sichtbare Strahlung

Detektor	empfindlicher Bereich
menschliches Auge	380–750 nm
<b>Vakuumphotodioden:</b>	
blau-empfindliche Photozelle	330–625 nm
rot-empfindliche Photozelle	600–975 nm
Weißberichts-Photozelle	400–1000 nm
<b>Halbleiterphotodioden:</b>	
Photoelement	350–1170 nm
UV-empfindliches Photoelement	200–1170 nm
Sekundärelektronenvervielfacher	z.B. 300–700 nm



## Hydrolyse von Acetylsalicylsäure (ASS) zur Salicylsäure (SA) Bestimmung mit UV Spektroskopie



### Literatur

#### UV/VIS-Spektroskopie

##### Bibliographie

- Barrow, G. R. (1962). *Introduction to Molecular Spectroscopy*. McGraw-Hill, New York.
- Dyer, J. R. (1965). *Applications of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Ewing, G. W. (1975). *Instrumental Methods of Chemical Analysis*. McGraw-Hill Book Comp., New York.
- Fabian, J., Hartmann, H. (1980). *Light Absorption of Organic Colorants*. Springer Verlag, Berlin.
- Först, W. (1966). *Optische Anregung organischer Systeme*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Gauggitz, G. (1983). *Praxis der UV/VIS-Spektroskopie*. Attempto Verlag, Föhlingen.
- Gillam, A. E., Stern, E. S. (1957). *Electronic Absorption Spectroscopy*. Arnold, London.

- Parker, C. A. (1968). *Photoluminescence of Solutions*, Elsevier, Amsterdam.
- Perkampus, H.-H. (1986). *UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen*. Springer Verlag, Berlin.
- Rao, C. N. R. (1961). *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*. Butterworth, London.
- Sandorfy, C. (1964). *Electronic Spectra and Quantum Chemistry*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Scott, A. I. (1964). *Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products*. Pergamon Press, New York.
- Szatka, G. (1971). *Elektronen-Spektroskopie*. in *Methodicum Chemicum (Korte. F.)*, Bd. 1/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Staab, H. A. (1970). *Einführung in die theoretische organische Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Thompson, C. C. (1974). *Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy*. Willard Grant Press, Boston.

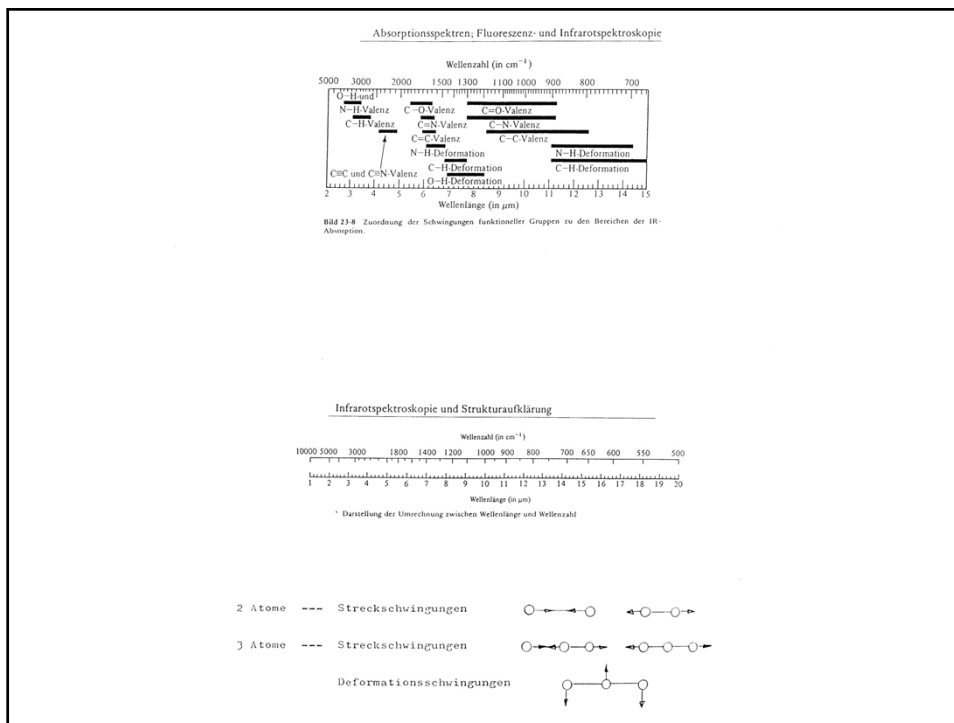
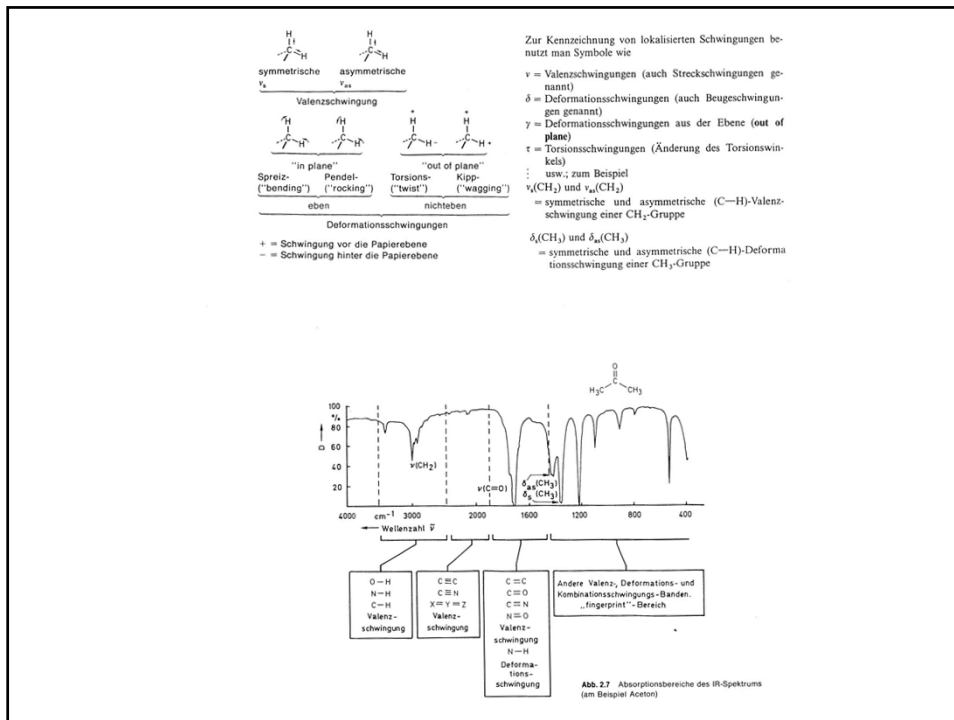
#### Datensammlungen/Spektrenkataloge

- Hershenson, H. M. *Ultraviolet and Visible Absorption Spectra*. Academic Press, New York.
- A. P. I. Research Project 44: *Ultraviolet Spectral Data*, Carnegie Institute and U. S. Bureau of Standards.
- Phillips, J. P., Frost, H., Thyagarajan, B. S. (u. a.). *Organic Electronic Spectral Data*. Wiley, New York.
- Pestemer, M. *Correlation Tables for the Structural Determination of Organic Compounds by Ultraviolet Light Absorptiometry*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Lang, L. *Absorption Spectra in the Ultraviolet and Visible Region*. Academic Press, New York.
- UV-Atlas organischer Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim.
- Sadtler Standard Spectra (Ultraviolet), Heyden, London.

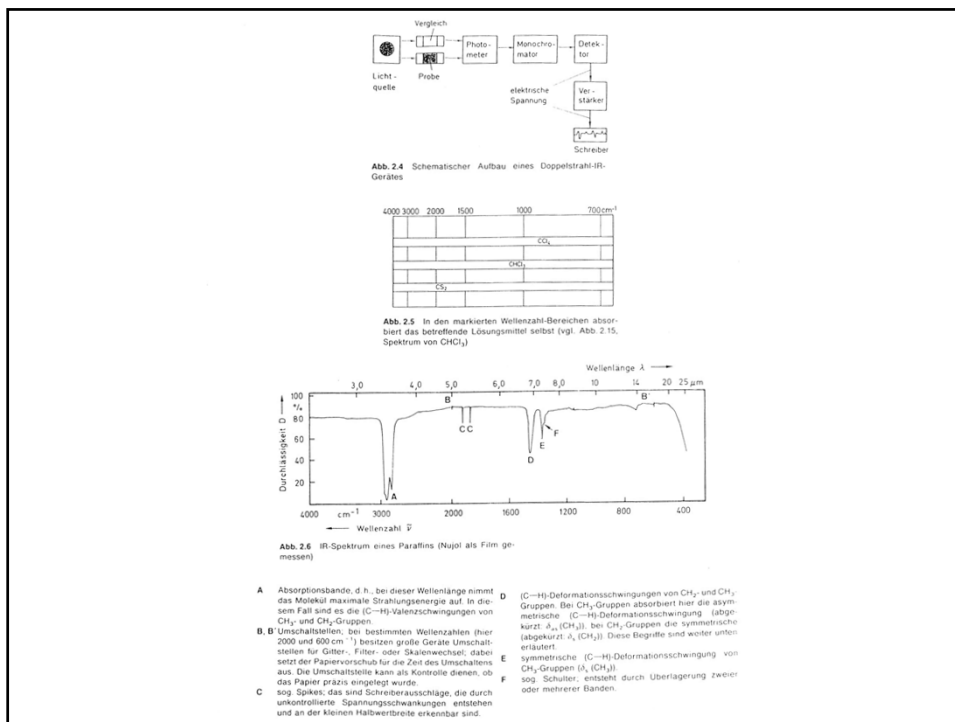
- Griffiths, J. (1976). *Colour and Constitution of Organic Molecules*. Academic Press, New York, London.
- Hampel, B. (1962). *Absorptionsspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich*. Vieweg Verlag, Braunschweig.
- Jaffe, H. H., Orchin, M. (1962). *Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy*. Wiley, New York.
- Klessinger, M., Michl, J. (1989). *Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Maas, D. H. (1973). *An Introduction to Ultraviolet Spectroscopy with Problems, in An Introduction to Spectroscopic Methods for the Identification of Organic Compounds* (Scheinmann, F., Herausg.), Bd. 2, Pergamon Press, New York.
- Murrell, J. N. (1967). *Elektronenspektren organischer Moleküle*. Biographisches Institut 250/250\*, Mannheim.
- Olsen, E. D. (1975). *Modern Optical Methods of Analysis*. McGraw-Hill, Book Comp., New York.
- Parikh, V. M. (1974). *Absorption Spectroscopy of Organic Molecules*. Addison-Wesley, Reading.

#### Monographien

- Djerassi, C. (1964). *Optical Rotary Dispersion*. McGraw-Hill, Book Comp., New York.
- Velluz, L., Legrand, M., Grosjean, M. (1965). *Optical Circular Dichroism*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Szatka, G. (1967). *Optical Rotary Dispersion and Circular Dichroism*. Sponer, Mexico City.
- Crabbe, P. (1971). *An Introduction to the Chiroptical Methods in Chemistry*. Sponer, Mexico City.
- Crabbe, P. (1972). *ORD and CD in Chemistry and Biochemistry - An Introduction*. Academic Press, New York, London.
- Olsen, E. D. (1975). *Modern Optical Methods of Analysis*. McGraw-Hill Book Comp., New York.
- Thulstrup, E. W. (1980). *Aspects of Linear and Magnetic Circular Dichroism of Planar Organic Molecules*. Lecture Notes in Chemistry 14, Springer Verlag, Berlin.
- Mason, S. F. (1982). *Molecular Optical Activity and the Chiral Discriminations*. University Press, Cambridge.
- Harada, N., Nakanishi, K. (1983). *Circular Dichroic Spectroscopy*. University Science Books, New York.
- Michl, J., Thulstrup, E. W. (1986). *Spectroscopy with Polarized Light*. VCH, Weinheim.







Charakteristische Gruppen- und Geräterequenzen im IR-Gebiet		
Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ )	Schwingungstyp	Verbindungen
3700 - 3000	„Freie“ und „gekennzeichnete“ NH- und OH-Valenzschwingungen (s. Text)	Alkohole, Phenole, Säuren, primäre und sekundäre Amine und Amide
3300	OH-Valenzschwingung	Monosubst. Acetylene
3100 - 3000	C-H-Valenzschwingung	Aromaten, Olefine
3000 - 2700	C-H-Valenzschwingung	Paraffine, Cycloparaffine, Methyl- und Methylen-Gruppen
2600 - 2550	S-H-Valenzschwingung	Thioester, Thioglykolate
2300 - 2100	C-X-Valenzschwingung (X=C, N, O)	Acetylene, Nitrile, Kohlenmonoxyd
1850 - 1600	C=O-Valenzschwingung	Carbonylverbindungen (Ester, Aldehyde, Ester, Lactone, Säuren, Amide, Oxime, Anhydride u. a. Sauerstoffe)
1600 - 1500	C=C-Valenzschwingung	Aromaten, Olefine
1600 - 1450	C=N-Valenzschwingung	Aromathine etc.
1548	NO <sub>2</sub> -Valenzschwingung	Arom. Nitroverbindungen
1470 - 1370	C-H-Deform.-Schw. u. C-H-Deform.-Schw.	Aromaten, Olefine, Paraffine etc.
1350 - 1030	C-N-Valenzschwingung	Amide und Amine
1290 - 1050	C-O-Valenzschwingung	Ester, Lactone, Äther, Alkohole
1135 - 1110	SO <sub>2</sub> -Valenzschwingung	Organische Sulfonverbindungen
1200 - 600	C-C-Valenzschwingung	Gerüstschwingungen (Paraffine, Cycloparaffine, Olefine, Aromaten mit Seitenketten)
780 - 500	C-Hal-Valenzschwingung	Aromatische und aliphatische Halogenverbindungen
785 - 570	C-S-Valenzschwingung	Organische Schwefelverbindungen (Mercaptane, Thioäther, Disulfide etc.)

Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ )	Wellenlänge ( $\mu\text{m}$ )
4000	2.5
3000	3.3
2000	5.0
1500	6.7
1000	10.0
700	14.3

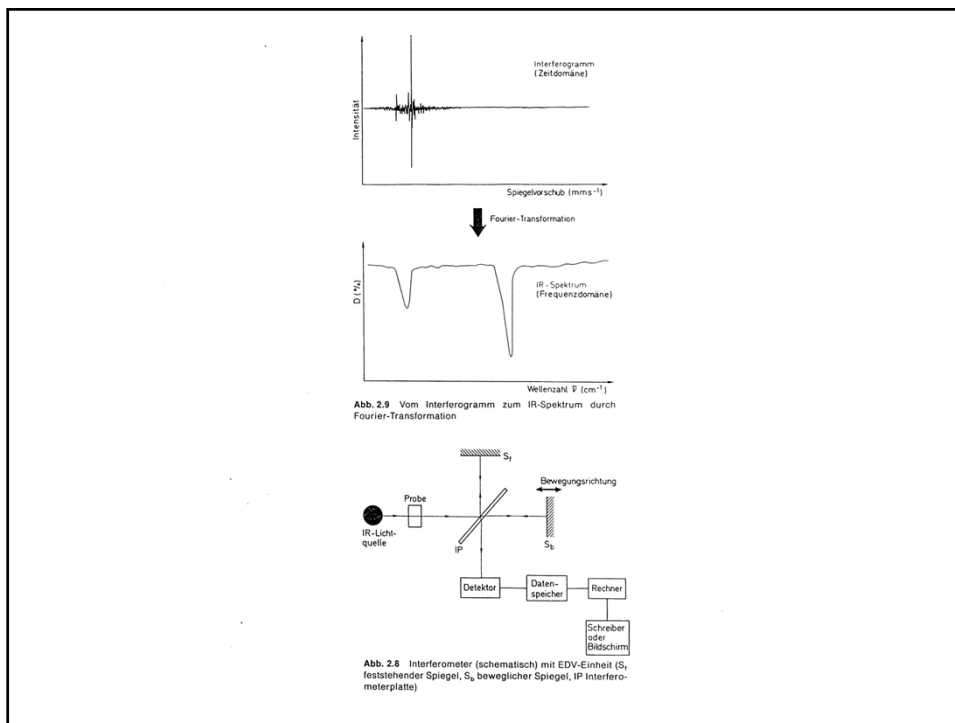
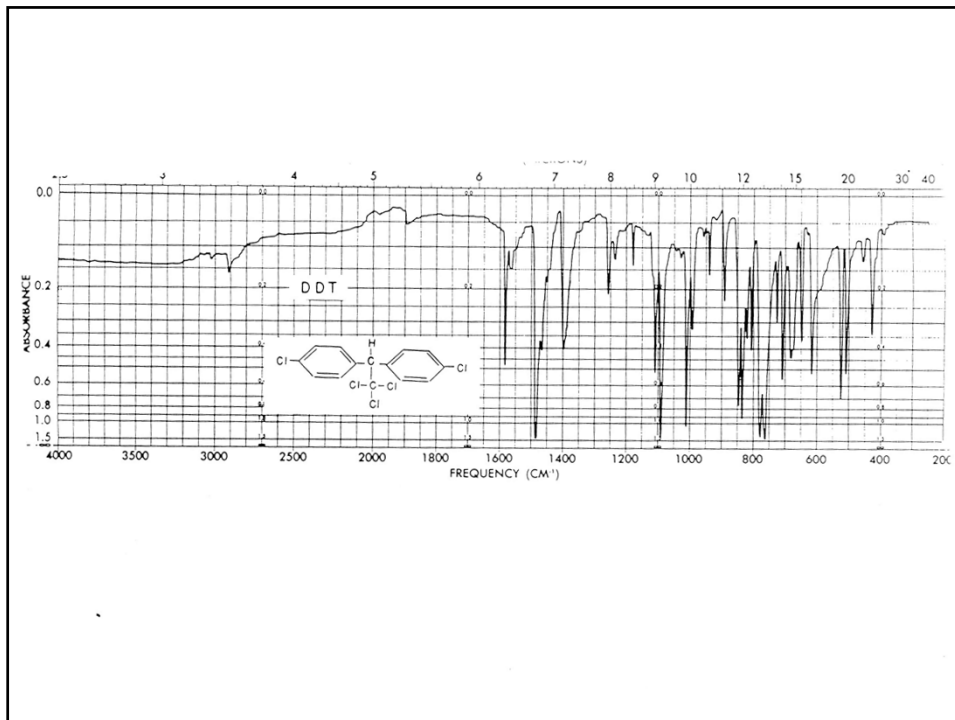
  

Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ )	Wellenlänge ( $\mu\text{m}$ )
4000	2.5
3000	3.3
2000	5.0
1500	6.7
1000	10.0
700	14.3

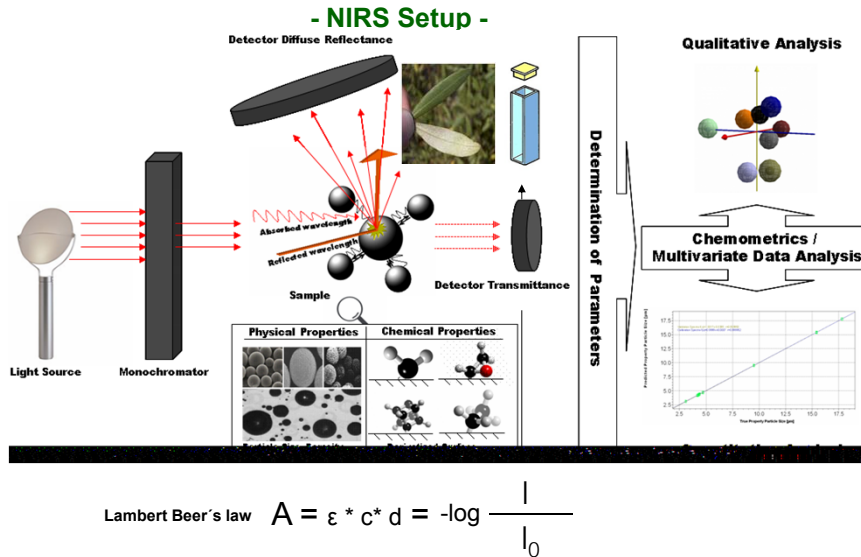
  

Wellenlänge ( $\mu\text{m}$ ) =  $\lambda$   
 Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ ) =  $\tilde{\nu}$   

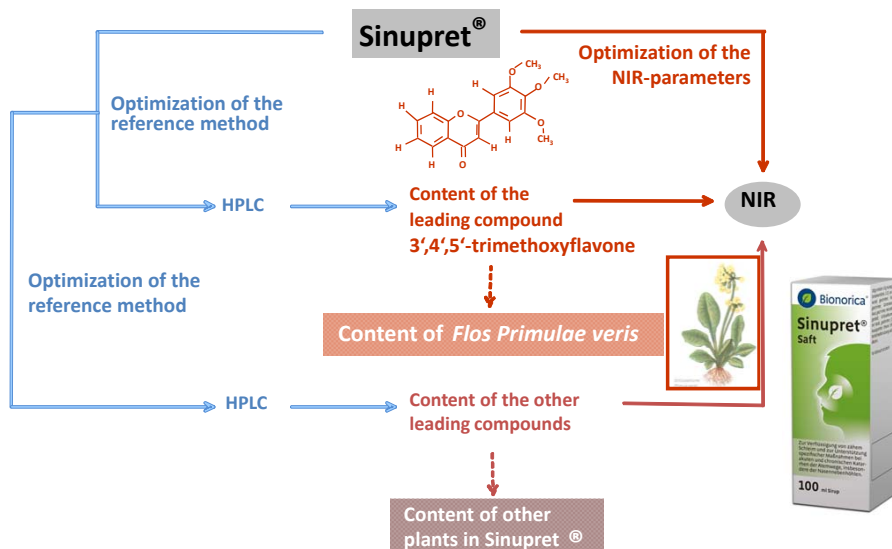
$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$



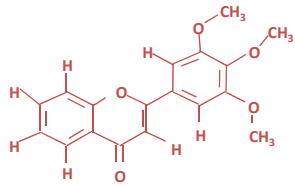
## Basics of Near-infrared Spectroscopy (NIRS)



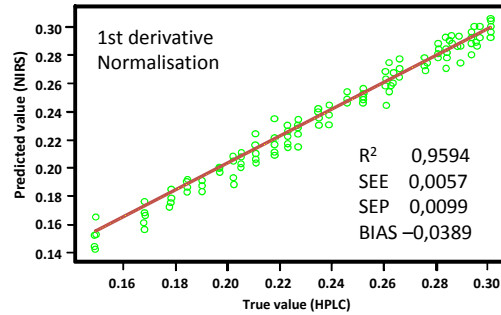
## NIR Strategy of Analysis



## NIR Strategy of Analysis



**3',4',5'- Trimethoxyflavone**  
Leading Compound

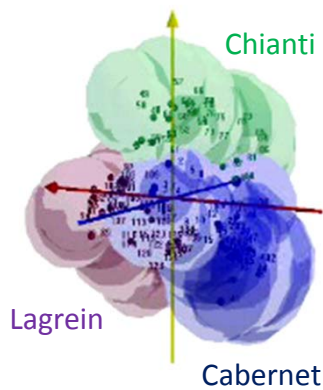


Charge	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )	Primula (g/100g)	Conc. LC (ng/ $\mu\text{l}$ )	NIR-MW (ng/ $\mu\text{l}$ )	Water (%)	EtOH (%)
91102064	28.10.91	70490	0,493	0,219	80,38	15,7
91112182	05.11.91	71740	0,500	0,222	80,83	15,2
91112191	08.11.91	61346	0,442	0,197	80,25	15,7
91112302	22.11.91	66799	0,472	0,210	81,33	14,5
91112311	28.11.91	81551	0,555	0,245	79,69	15,7

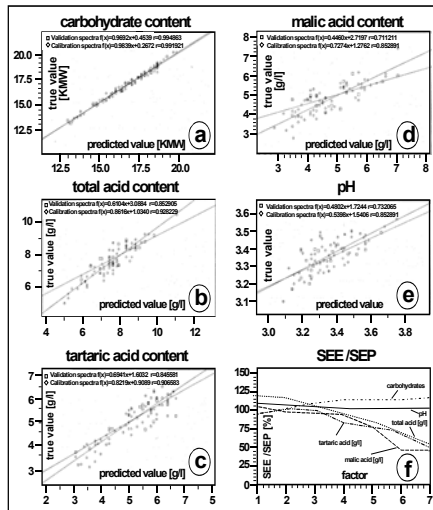
## Wine Analysis using NIRS



## Wine Analysis using NIRS



Factor plot of 141 spectra of different wines (Lagrein, Chianti, Cabernet Sauvignon). Conditions: Normalisation, 1st derivative; wavenumber range, 4500 - 10000  $\text{cm}^{-1}$ ; thickness, 3 mm; scans, 10; temperature, 23°C.

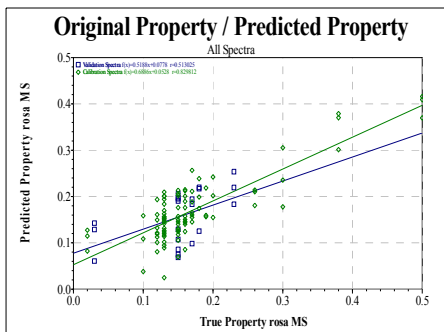
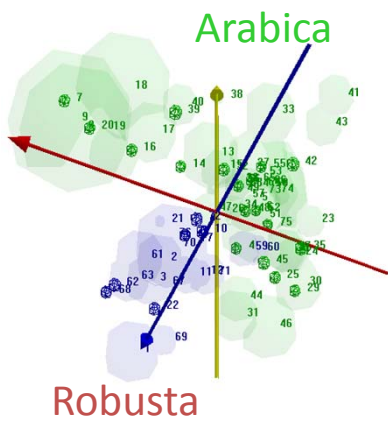


Michael A. Popp, Guenther Bonn, Christian Huck, Wolfgang Guggenbichler, **Method for classifying wine and coffee**. Patent No. WO 2002097431, Application Number WO 2002-EP4988

## Coffee Analysis using NIRS



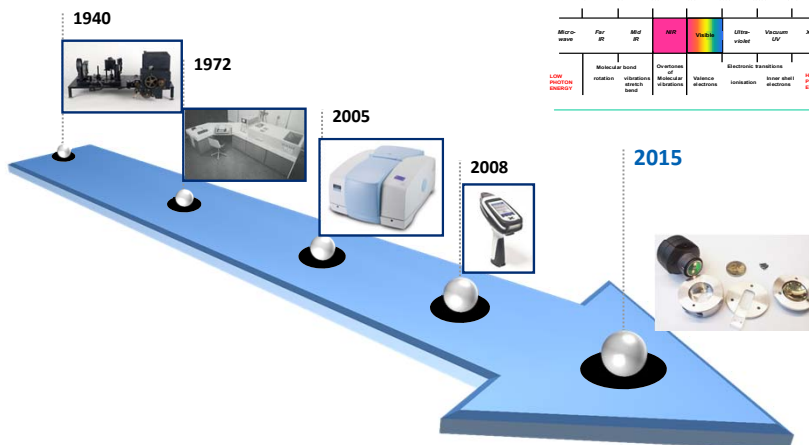
## Quality Control of Coffee via NIRS



Quantitative analysis of caffeine and theophylline

C.W. Huck, W. Guggenbichler, G.K. Bonn, Analysis of Caffeine, Theobromine and Theophylline in Coffee by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) Compared to High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Coupled to Mass Spectrometry. Anal. Chim. Acta, 538 (2005) 195

## Evolution of infrared spectroscopy



The Electromagnetic Spectrum							
10 <sup>14</sup>	10 <sup>13</sup>	10 <sup>12</sup>	10 <sup>11</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>
10 <sup>14</sup>	10 <sup>13</sup>	10 <sup>12</sup>	10 <sup>11</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>
Micro-wave	Far IR	Mid IR	NIR	Visible	Ultra-violet	Vacuum UV	X-Ray
LOW PHOTON ENERGY	Molecular band rotation vibrations stretch band	Overtone of vibrations stretch band	Overtones of Molecular vibrations	Valence electrons	Electronic transitions ionization	Inner shell electrons	HIGH PHOTON ENERGY

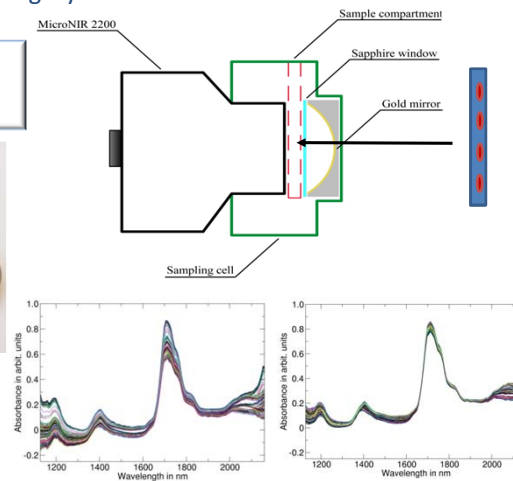
## Miniaturization and Enrichment

Implementation of a highly efficient reflectron material

- Low USB power lamp (< 500 mA)
- Gold reflector – signal (SNR) improvement!



Lutz *et al.* Anal. Chim. Acta in press

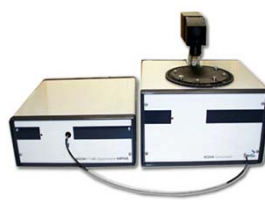


NIR – Near Infra Red

Büchi NIRFlex

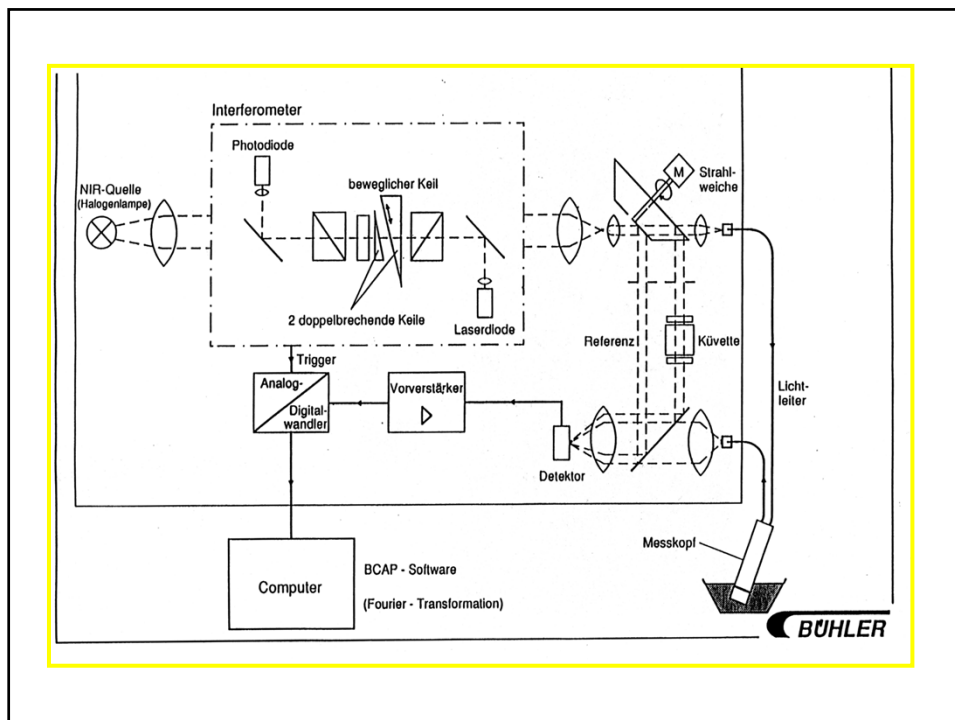


Büchi NIRTab  
Tablet Analyser



Büchi NIRLab





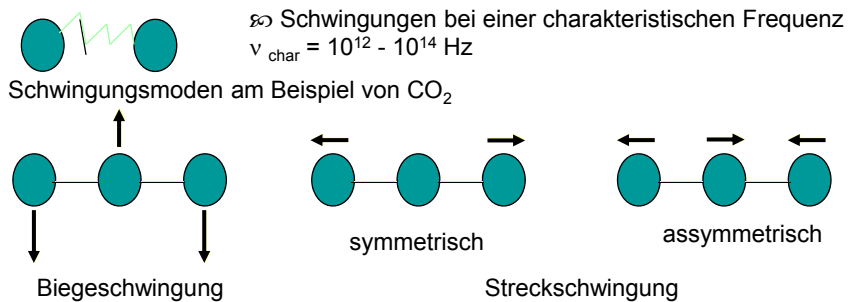
Ein Molekül von N Atomen besitzt  $3N$  Freiheitsgrade davon:

**3 Translationsfreiheitsgrade**

**3 Rotationsfreiheitsgrade**

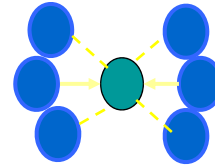
**$3N-6$  Vibrationsfreiheitsgrade**

**$3N-5$  Vibrationsfreiheitsgrade für lineare Moleküle**





Schwingendes Molekül der Frequenz  $\nu_{\text{char}}$



- ↪ periodische Änderungen des elektrischen Dipolmoments mit der Frequenz  $\nu_{\text{char}}$
- ↪ tritt in Wechselwirkung mit dem elektrischen Feld des Lichts

$$\nu_{\text{char}} = \nu_{\text{Licht}} \quad 10^{12} - 10^{14} \text{ Hz} \quad \text{↪ Infrarot}$$

Das elektrische Dipolmoment schwingt mit dem Licht

- ↪ Energietransfer vom Licht auf das schwingende Molekül
- ↪ Resonante Absorption im Infrarot

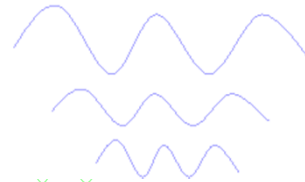
Grundschiwingung

$\nu_{\text{char}}$

Oberschwingungen  $2 \times \nu_{\text{char}}$

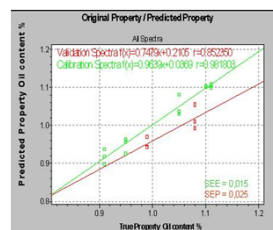
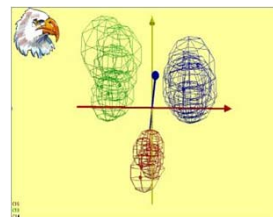
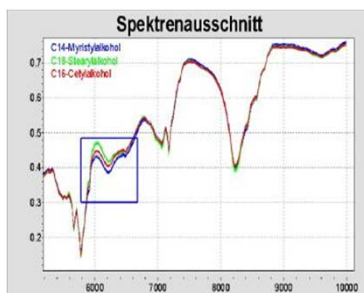
↪ im Nahinfrarot

$3 \times \nu_{\text{char}}$



## Chemometrie

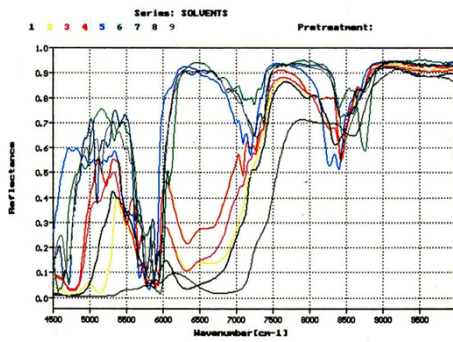
Qualitatives Modell



Quantitatives Modell

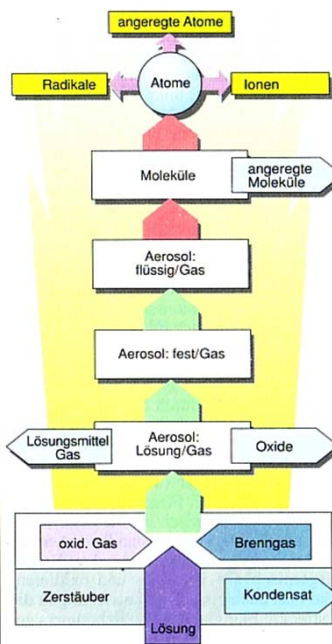
## NIR in der Wareneingangskontrolle

Bsp.  
Lösungsmittel

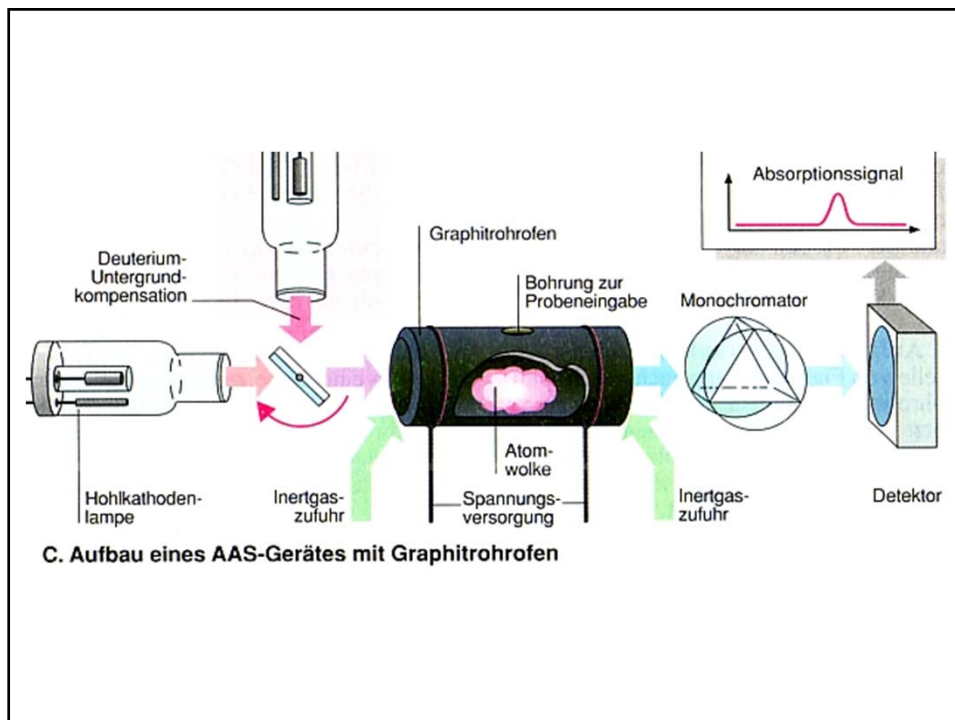
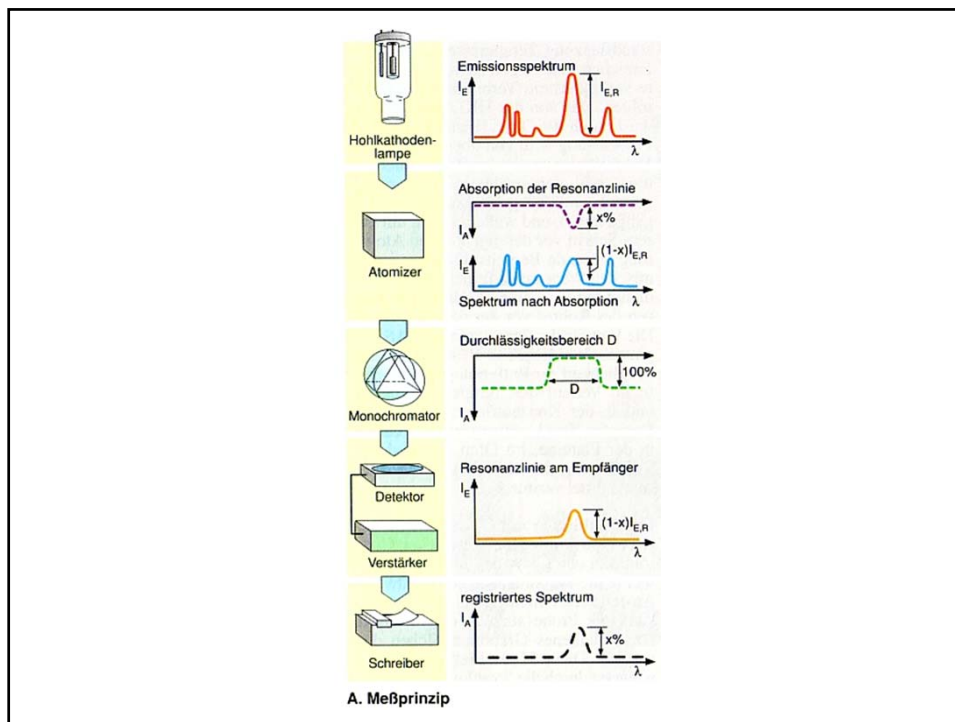


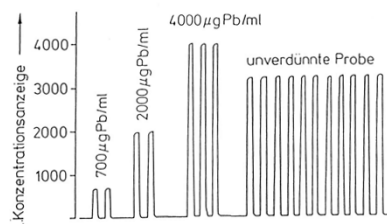
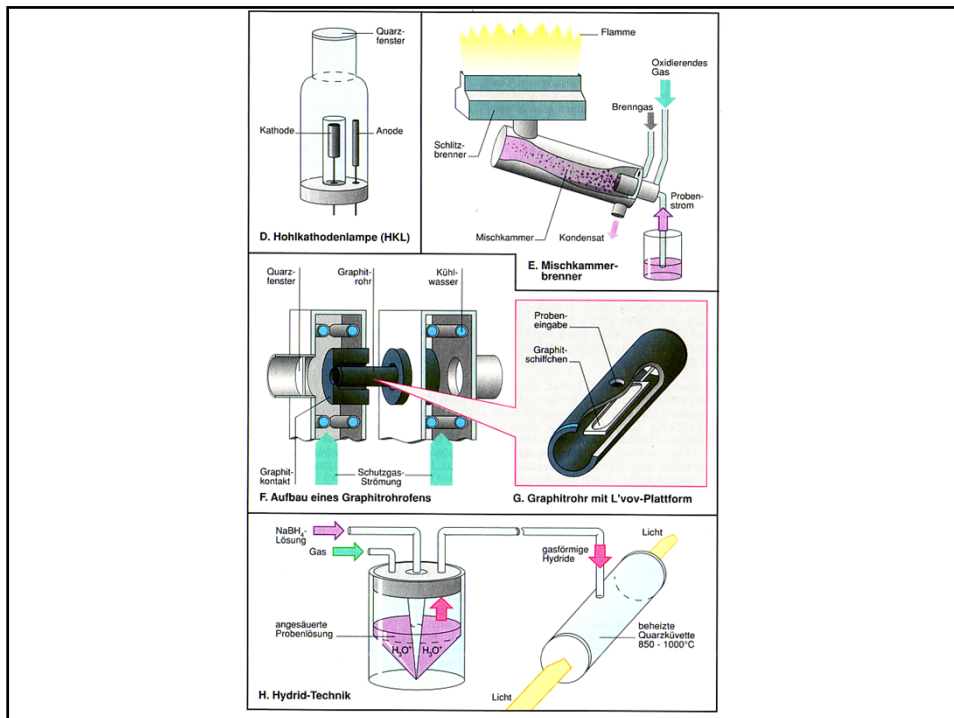
No

- | No | Comment             |
|----|---------------------|
| 1  | Methanol            |
| 2  | Denaturated Ethanol |
| 3  | Ethanol p.a.        |
| 4  | 2-Propanol          |
| 5  | n-Hexane            |
| 6  | Toluene             |
| 7  | Acetone             |
| 8  | Acetic Acid         |
| 9  | Ethyl Acetate       |

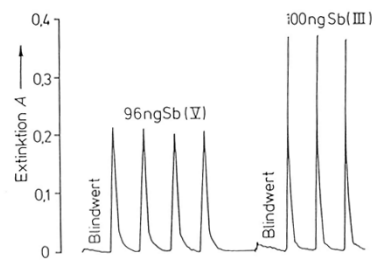


B. Chemisch-physikalische Vorgänge bei der Flammentechnik

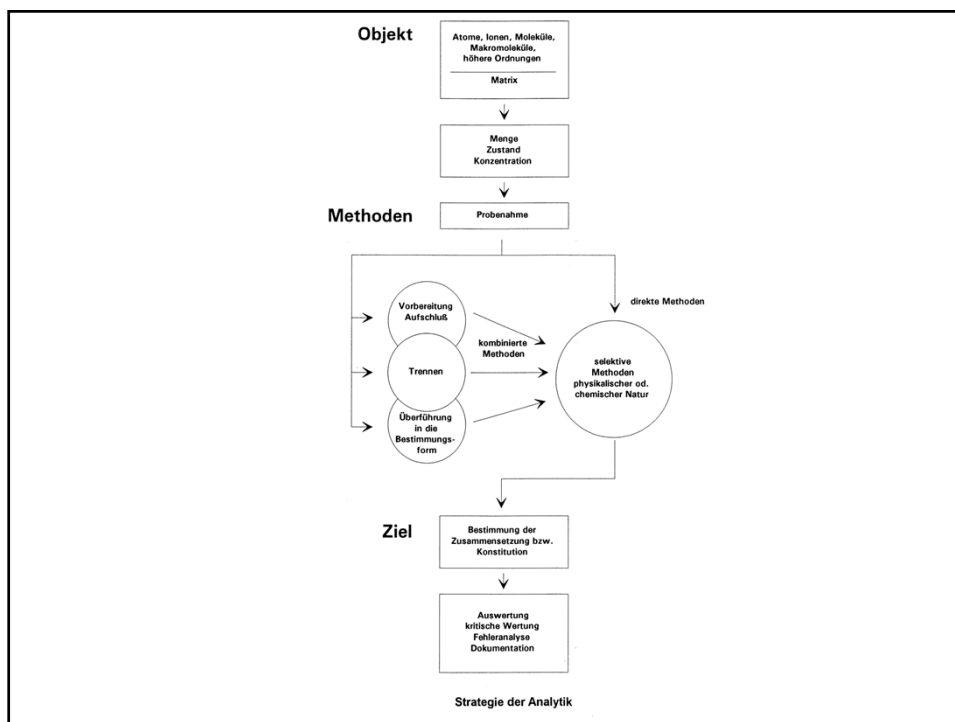
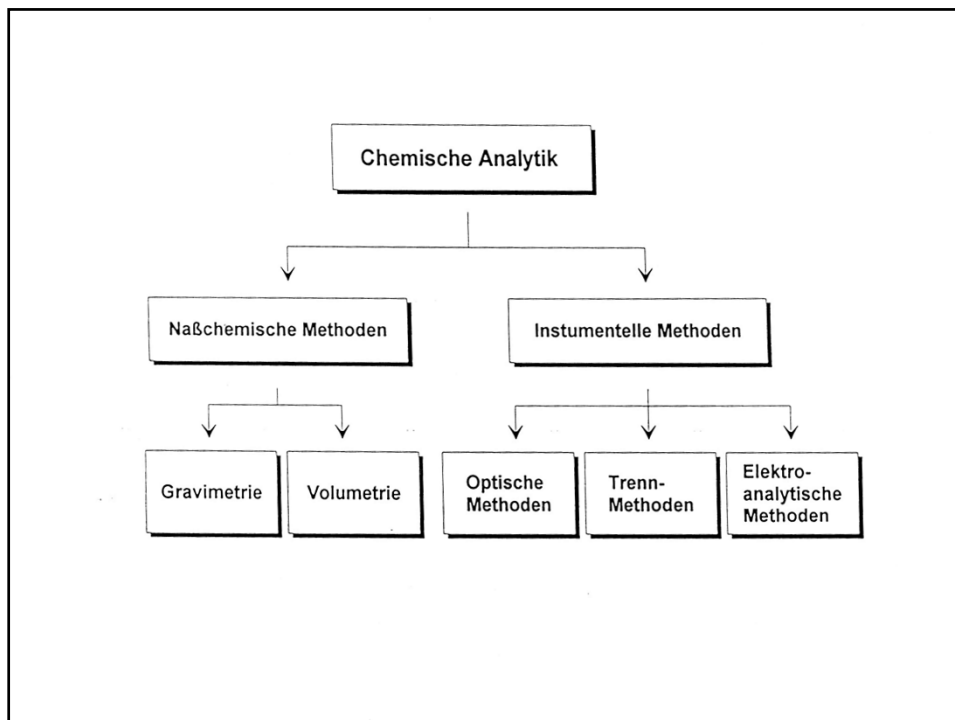


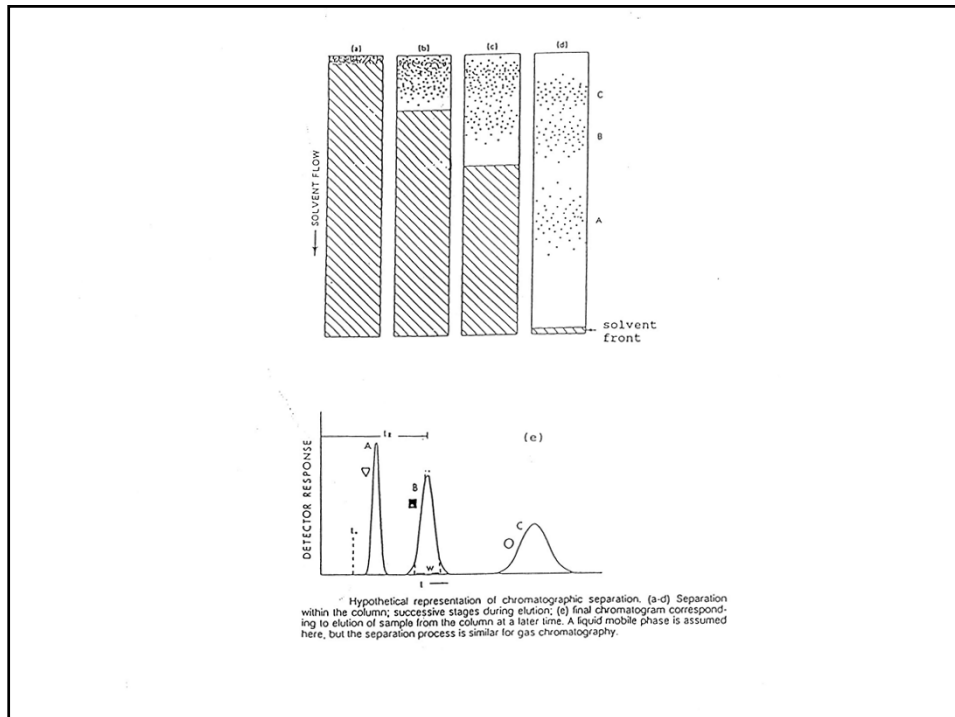
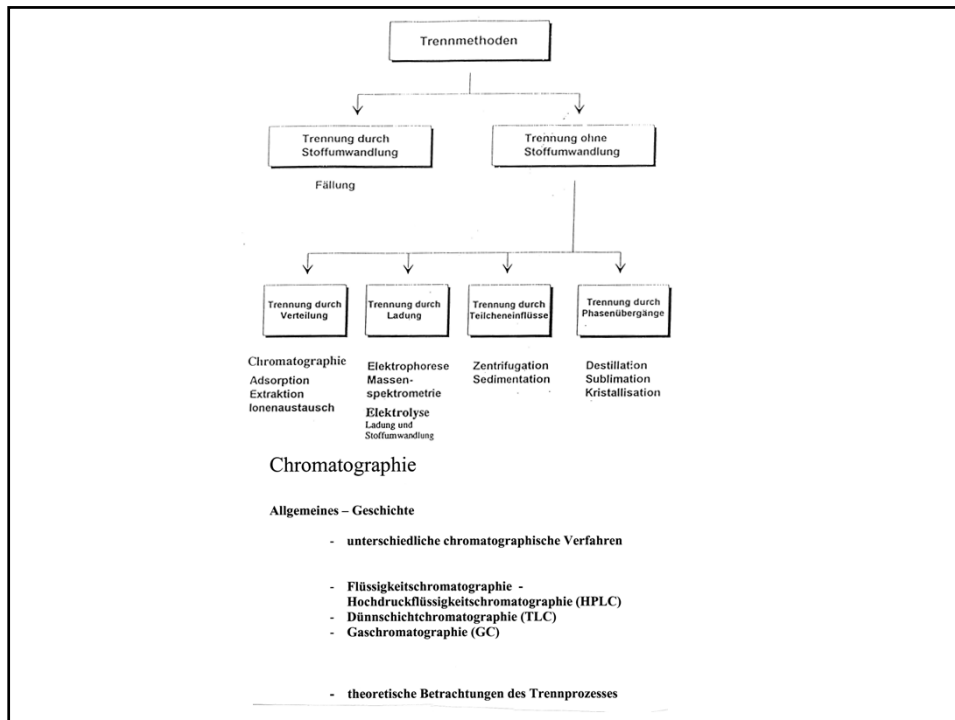


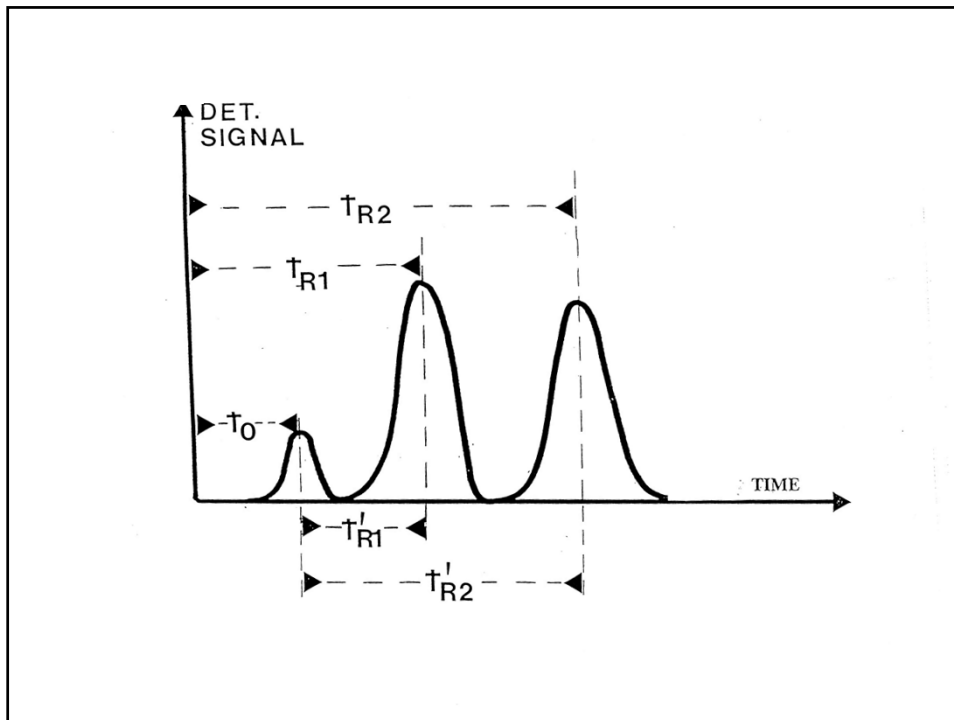
**Abb. 15.14** Bestimmung von Blei in einem Weichlot (59,05% Pb) auf der Resonanzlinie bei 368,4 nm



**Abb. 15.17** Signale für dreiwertiges und fünfwertiges Antimon mit der Hydrid-AAS-Technik







### 1.2. Analytische Bedeutung der Chromatographie

Die Chromatographie ist eine Methode zur Trennung komplexer Stoffsysteme mit anschließender mengen- oder konzentrationsabhängiger Erfassung der getrennten Stoffe.

Mit Hilfe der Chromatographie kann man:

- Gemische trennen (submikroanalytisch bis präparativ)
- Komponenten identifizieren (qualitative Analyse)
- Komponenten bestimmen (quantitative Analyse)

Die Steigerung der Trennleistung und der Detektorempfindlichkeit, sowie die Erweiterung der Trennmöglichkeiten durch neue Trennmateriale bzw. Trennsysteme stehen in der Weiterentwicklung der chromatographischen Analytik im Vordergrund.

### 1.3. Definition und Systematik

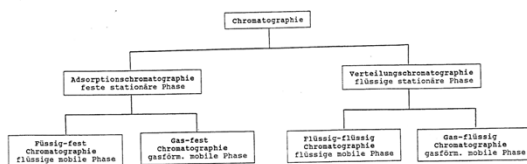
**Definition:** Unter dem Begriff *Chromatographie* werden physikalische Methoden zusammengefaßt, bei denen eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer ruhenden (= stationären) und einer sich bewegenden (= mobilen) Phase erfolgt. Allen chromatographischen Verfahren gemeinsam ist die vielfach wiederholte (multiplikative) Verteilung der Probenkomponenten zwischen der stationären und der mobilen Phase. Die unterschiedliche Verteilung der Probenkomponenten führt zu abweichenden Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Verbindungen mit der mobilen Phase und damit zu einer Auftrennung der Probenmischung.

**Einteilung der chromatographischen Methoden:**

a) nach den die Trennung bestimmenden physikalisch-chemischen Vorgängen

1. Adsorption (Verteilung an der Oberfläche eines Feststoffes als stationärer Phase)
2. Verteilung (Lösevorgang zwischen zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen)

b) nach dem Phasenaufbau der Trennstrecke



c) nach der Ausführungstechnik

1. Säulenchromatographie (SC, LC)
2. Gaschromatographie (GC)
3. Dünnschichtchromatographie (DC, TLC)
4. Papierchromatographie (PC)

#### 1.4. Historische Entwicklung

Lit.: U. Wintermeyer, *Die Wurzeln der Chromatographie*, GIT Verlag

ca. 1855: Runge (1795 - 1867)

Kapillarbilder von Farbstoffen auf Löschpapier.

Die Gestaltung der Farbkombinationen führt Runge auf die Wahlanziehung- und Abstoßung der reagierenden Stoffe zurück (Bildungstrieb der Stoffe).



Table I (1512 - 1903)

Year	Name	Living in	Method	Carrier	Detection
1512	BRUNSWICK pharmacist	Strassburg	Preparative frontalanalyse	no	no /1/
1822	RUNGE chemist	Berlin	Displacement chr. of dyes on paper	mostly no	yes /2/
1859	RUNGE	Oranienburg	-"	-"	yes /3/
1861	SCHOENBEIN und GOPPELSROEDER	Basel	"Capillaranalyse" Separation of dyes and org. compounds	yes	yes /4/
1898	GOPPELSROEDER David T. DAY	Lakewood/Ohio	-" Preparative Displacement chromatogr.	yes no	yes /5/ no /6/
1903	TSWETT Russian botanist	Italy Switzerland Russia	"Tswettography" Separation of Components of Chlorophyll	yes	yes /7/



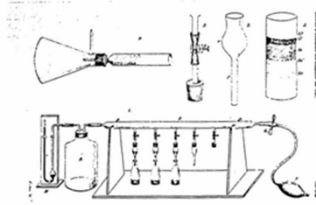
um 1900: **Wislicenus** (1867 - 1951)

Regt bei Merck die erste industrielle Produktion eines Aluminiumoxid-Adsorbens nach einer von ihm entwickelten Methode an. Anwendung der sogenannten Adsorptionsanalyse zur Bestimmung der für die Lederfabrikation wichtigen "Gesamtmenge der gerbenden Substanzen" in pflanzlichen Gerbmaterien.

um 1900: **M. Tswett** (1872 - 1919)

"Erfinder" der Chromatographie, Untersuchung der Eigenschaften und der Zusammensetzung von Chlorophyllen.

Beobachtet, daß verschiedene pulverförmige Substanzen unterschiedliches Adsorptionsverhalten gegenüber Chlorophylllösungen zeigen, und baut eine Chromatographie-Apparatur zur Trennung von Blattfarbstoffen durch Säulenchromatographie.

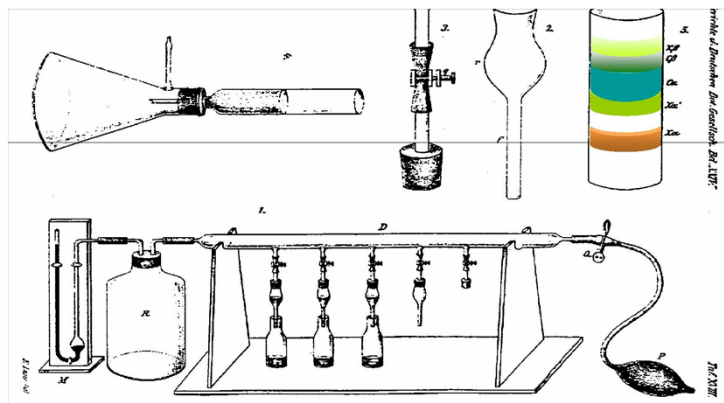


Äußere Umstände (russische Sprache, Publikation in botanischen Zeitschriften) verhinderten die wissenschaftliche Anerkennung der Tswetschen Arbeiten.

## Tswett's Chromatographic System



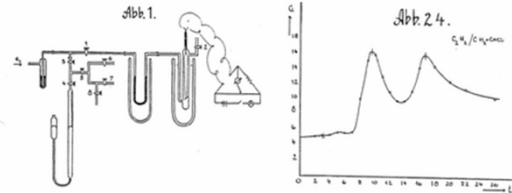
Tswett  
1903



um 1945: **E. Cremer** (geb. 1900), Institut f. Physikalische Chemie, Innsbruck

Entwicklung der Gasadsorptionschromatographie als schnelle Analysenmethode für kleinste Gasmengen (Ethylen/Acetylen) aufgrund unterschiedlicher Adsorptionsenergien.

Praktische Untersuchungen: Dissertation von F. Prior (1945/46)



Äußere Umstände (Kriegsende, Umzug des Verlages) verhindern die wissenschaftliche Anerkennung.

ca. 1940: **A. Martin, R. Synge**

Entwicklung der Verteilungschromatographie an wasserbeladenem Kieselgel für Aminosäuren, wichtige theoretische Grundlagen, Nobelpreis 1952.

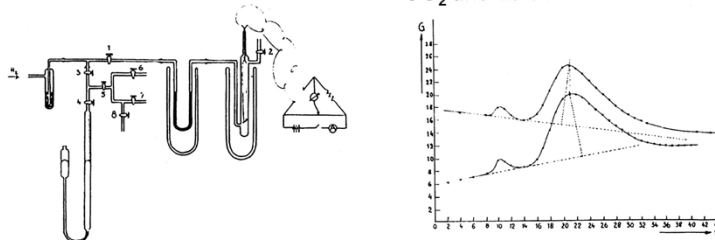
weitere Entwicklungen von A. Martin:  
Gasverteilungschromatographie, Papierchromatographie

ab 1970: Entwicklung der HPLC

Übergang zu kleinen Korngrößen, schnelle Trennungen, neue stationäre Phasen

## Beginn der Gas-Adsorptionchromatographie

- **Prof. Erika Cremer, Universität Innsbruck 1943/44:**  
Betrachtungen zur Trennung von Gasen mittels selektiver Adsorption/Desorption unter Verwendung eines inerten Gases als mobile Phase (Trägergas)
  - **Dissertation von Fritz Prior (1946/47):** Realisierung der Theorie erster Gaschromatograph
- erstes Chromatogramm: Trennung von  $\text{CO}_2$  und Luft an Aktivkohle



„Anwendung der chromatographischen Methode zur Trennung von Gasen und zur Bestimmung von Adsorptionsenergien“; E. Cremer, F. Prior, Z. Elektrochem. 55 (1951), 66-70

### Die Arbeiten von E. Cremer



Erika Cremer  
(1900 - 1996)  
Professorin an der  
Universität Innsbruck

1941 ff: Untersuchungen zur Adsorption und katalytischen Hydrierung von Acetylen

#### 1. Theoretische Überlegungen zur Trennung von Ethylen und Acetylen mittels selektiver Adsorption / Desorption (1943/44)

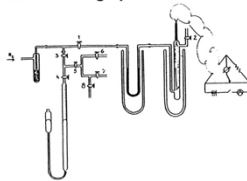
- Modell: **Fluss mit Booten**, die ab und zu am Ufer festsetzen
  - ➔ Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeiten der Zonen von Gasfluß und Verweilzeit der Moleküle an den Adsorptionszentren
  - ➔ Zusammenhang zwischen Adsorptionswärmen und Verweilzeit an Adsorptionsoberfläche
  - ➔ Trennung der Gase sollte möglich sein bei Verwendung eines inerten Trägergases anstelle einer Flüssigkeit (mobile Phase)
- Publikation in „Naturwissenschaften“ 1944 eingereicht  
„Über die Wanderungsgeschwindigkeit der Zonen bei der chromatographischen Analyse“  
in Kriegswirren nicht mehr erschienen

E. Cremer: Chromatographia 9 (1976) 364

#### 2. Realisierung der Theorie: Promotion von E. Prior, Mai 1947, Universität Innsbruck

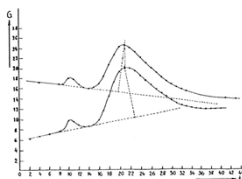
„Über die Bestimmung der Adsorptionswärmen von Gasen und Dämpfen unter Anwendung der chromatographischen Methode auf die Gasphase“  
E. Cremer u. F. Prior, Z. Elektrochem. 55 (1951) 66

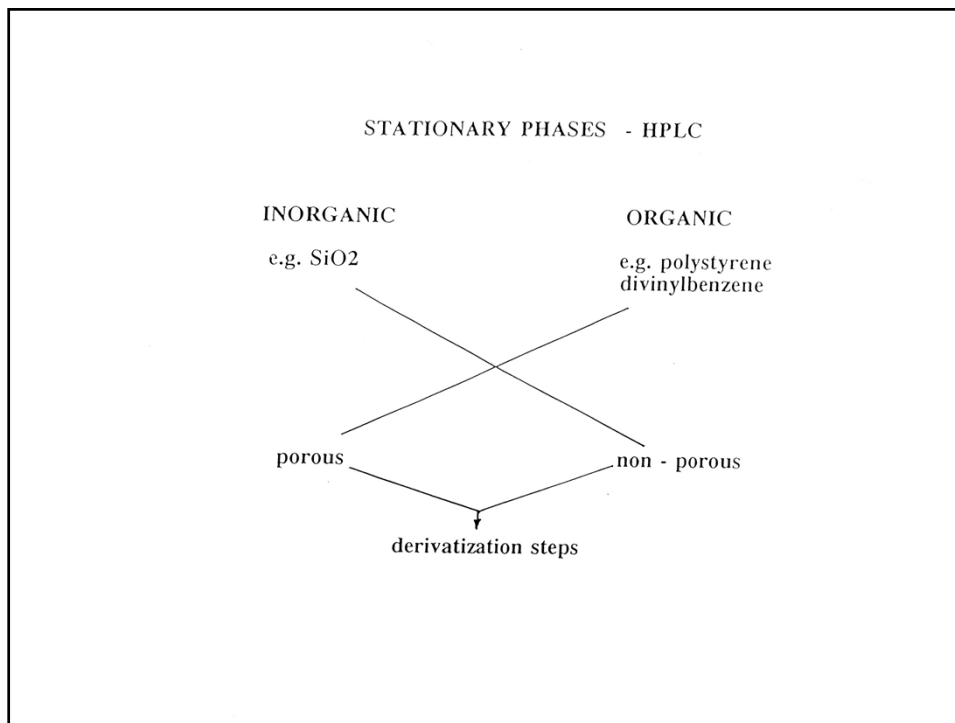
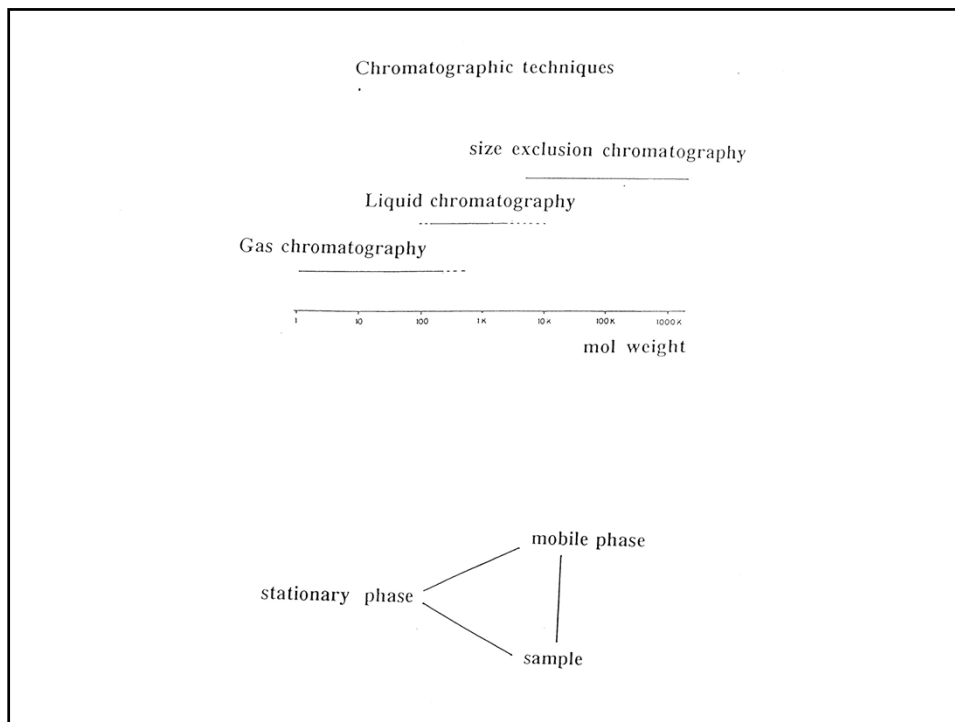
Der erste Gaschromatograph:



Säule: 20 cm x 1 cm  
stat. Phase: Aktivkohle oder Kieselgel (Blaugel)  
Korngröße 1,5 - 3 mm  
mob. Phase: Wasserstoff (durch Elektrolyse erzeugt)  
Detektor: Wärmelitzelle (Hitzdraht in Glasrohr eingeschmolzen) mit Spiegelgalvanometer  
manuelle Signalaufzeichnung (kein Schreiber)  
Probe: 5 - 10 ml Gasmischung

Das erste Chromatogramm:  
Trennung von CO<sub>2</sub> und Luft an Aktivkohle





### 3. Techniken der Chromatographie

#### 3.1. Klassische Säulenchromatographie

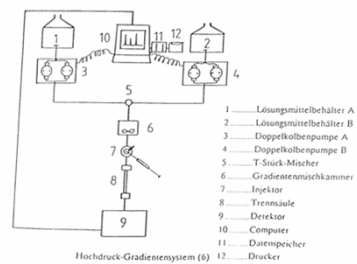
Säulendurchmesser: > 1cm  
 Säulenrohr: meist aus Glas  
 Teilchendurchmesser: 100 - 200  $\mu\text{m}$   
 Druck: bis 5 bar  
 Anwendungen: präparative Trennungen, Probenvorbereitung (geringe Trennstufenzahlen)

#### 3.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Säulendurchmesser: 100  $\mu\text{m}$  bis 7.8 mm  
 Säulenrohr: Edelstahl, Titan  
 Teilchendurchmesser: 2 - 50  $\mu\text{m}$   
 Druck: bis 400 bar

##### 3.2.1. Die HPLC-Apparatur

grundsätzlicher Aufbau

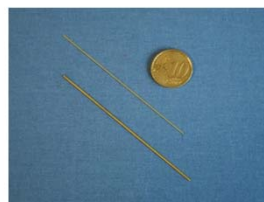


## Stationary Phases – Formats – Strategies

### HPLC - column



### $\mu$ -LC - capillary

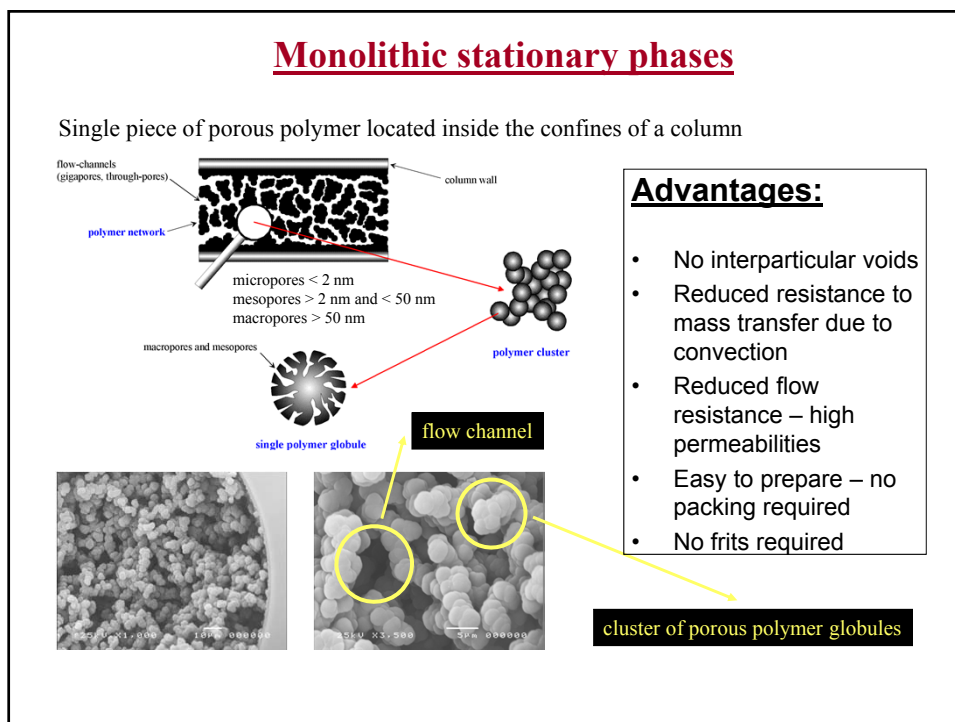
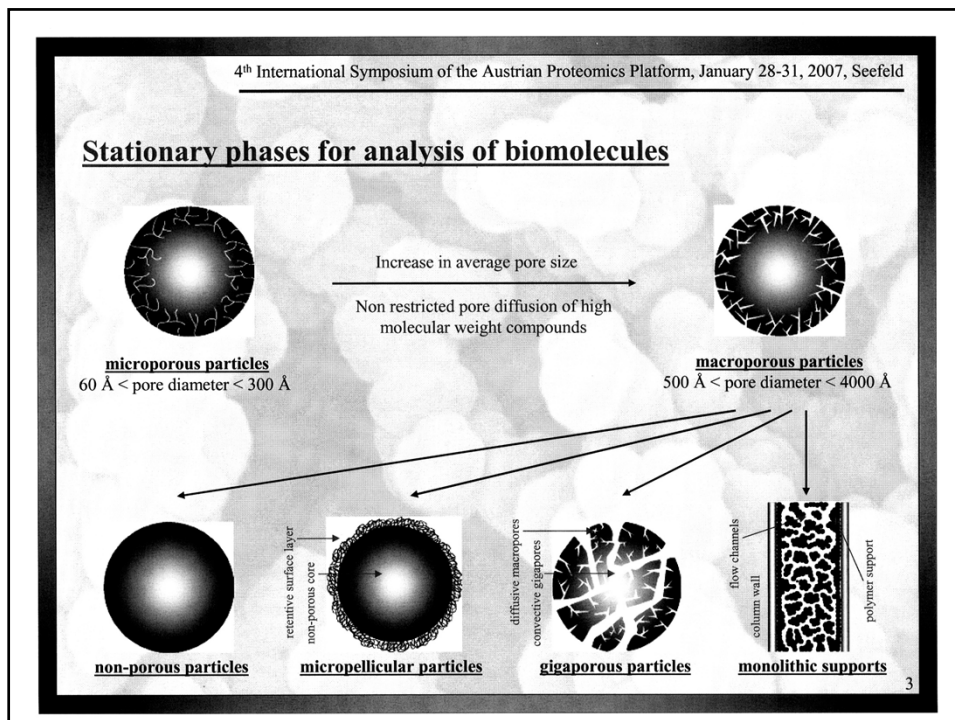


### Chip - LC

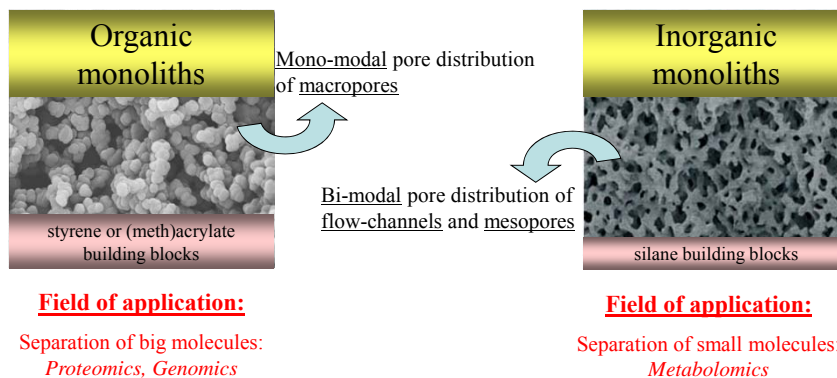


### Disc - technology



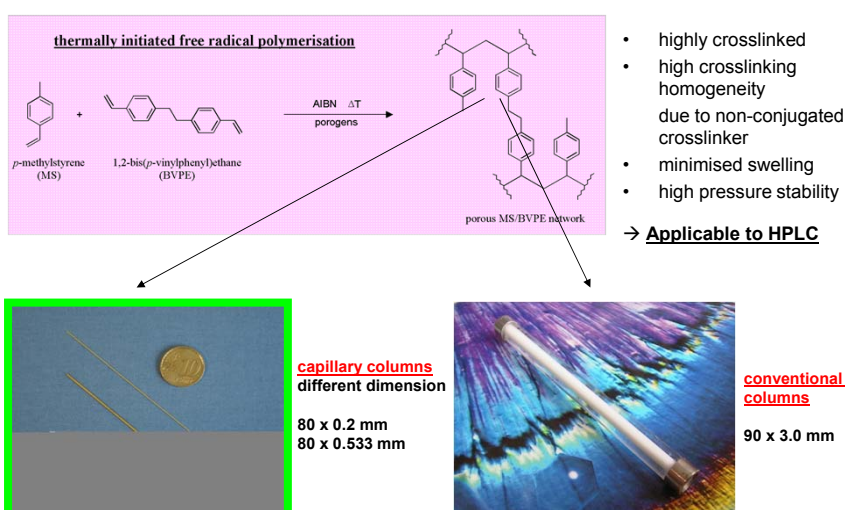


## Types of monolithic stationary phases



→ Organic and inorganic monoliths complement one another regarding applicability

## MONOLITHIC MS/BVPE CAPILLARIES

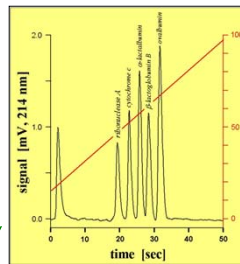
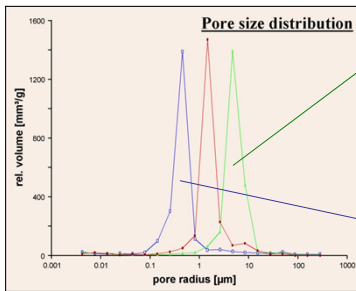


G.K. Bonn, S.H. Lubbad, L. Trojer, *Monolithic organic copolymer for biopolymer chromatography*, 2006, US Appl. Number: 11/419,461

## Optimisation of monolithic MS/BVPE capillary columns

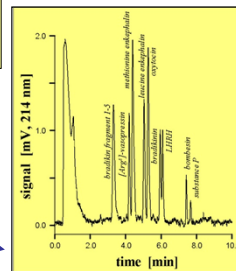
Control the porous properties by:

- Polymerisation temperature
- Monomer to porogen content
- Micro- to macroporogen content
- Initiator content



Swift protein separations

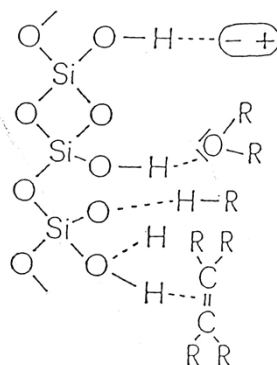
Efficiency towards small biomolecules e.g. peptides, oligonucleotides



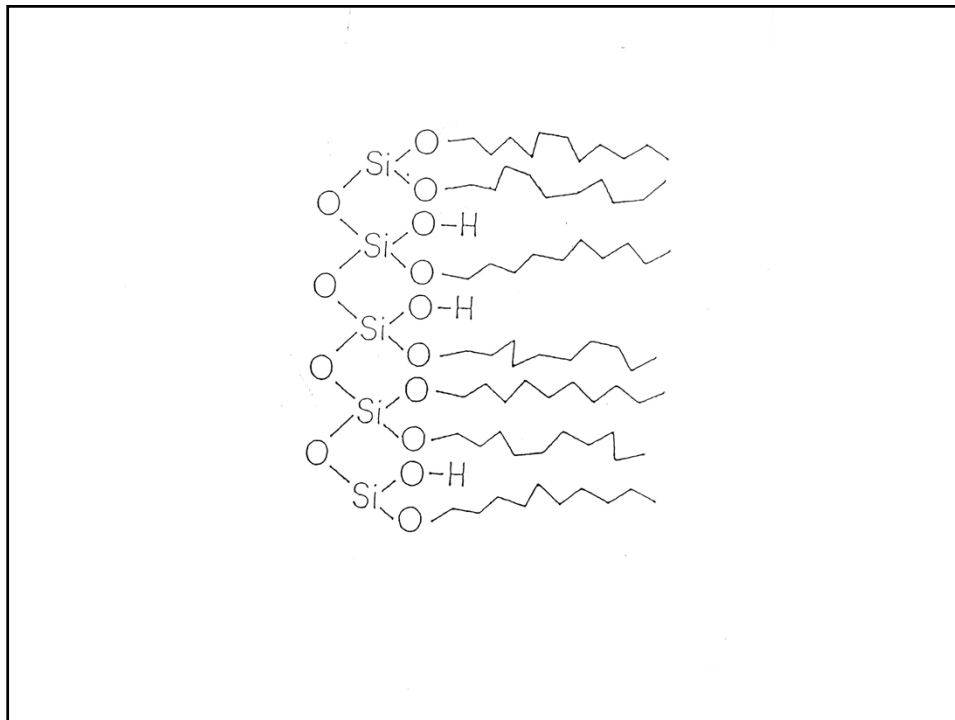
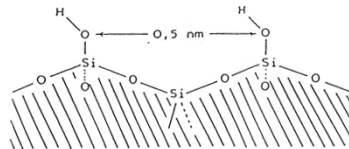
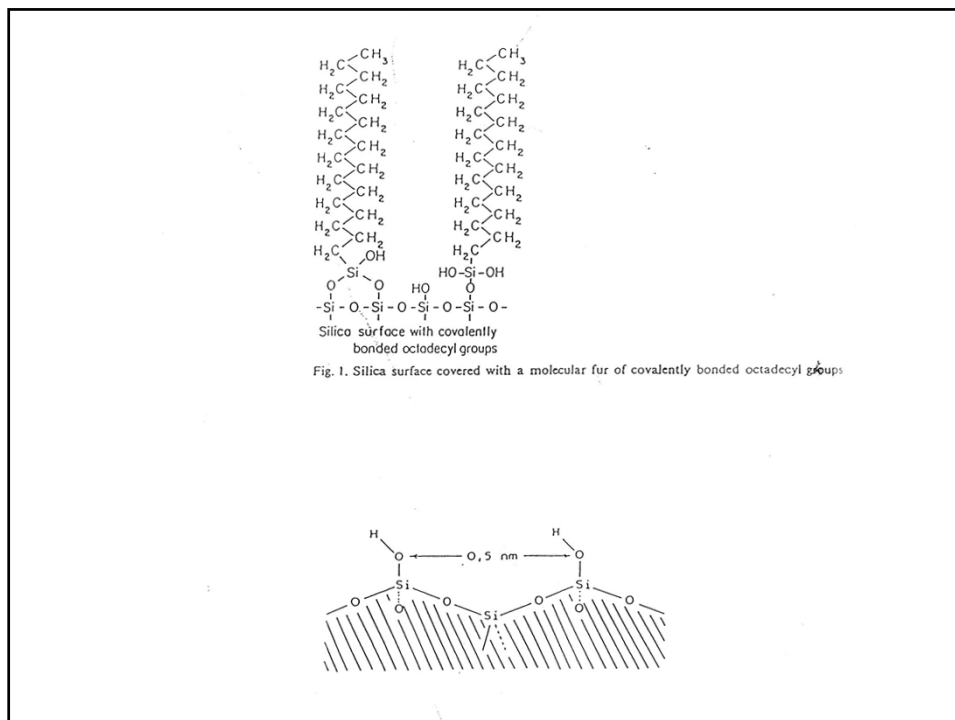
→AIM: Combination of **high flow characteristics** with **separation efficiency**

L. Trojer, S.H. Lubbad, C.P. Bisjak, *J. Chromatogr. A*, 1117 (2006) 56-66  
L. Trojer, S.H. Lubbad, C.P. Bisjak, W. Wieder, *J. Chromatogr. A*, 1146 (2007) 216-224

Adsorption mechanism







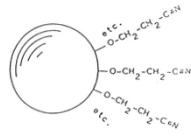


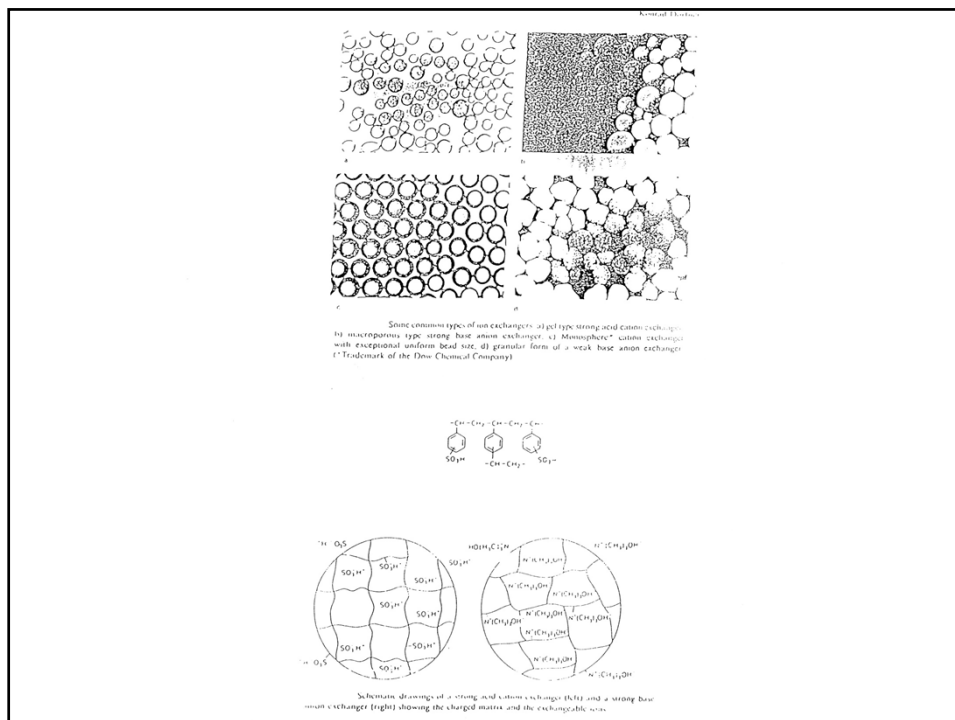


- OH	- Diol (benachbarte Hydroxylgruppen am Ende einer Kohlenwasserstoffkette)
- NH <sub>2</sub>	- Aminogruppen
- SO <sub>2</sub> OH	- Sulfonsäuregruppen
- NH - CO -	- Polyamid
- CN	- Nitril
- NO <sub>2</sub>	- Nitro

line 2068 00  
Made in Austria

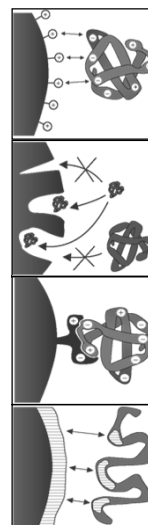
Octadecyl <sub>2</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -CH <sub>3</sub>
Octyl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>
Dimethyl	-CH $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
Cyclohexyl	-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> 
Phenyl	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> 
Diphenyl	(-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> 
Allylphenyl	 -CH <sub>2</sub> -CH=CH <sub>2</sub>
Süloxanäther	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -O-CR <sub>3</sub>
Fluoräther	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -O-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> F
Dimethylsmino	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Amino	-NH <sub>2</sub>
Aminopropyl	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
Alkylamino	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -NH <sub>2</sub>
Nitro	-NO <sub>2</sub>
Nitril	-C≡N
Alkylnitril	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -C≡N
Propionitril	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -C≡N
Oxypropionitril	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -C≡N
vic. Hydroxyl (Diol)	$\begin{matrix} \text{CH-OH} \\   \\ \text{CH-OH} \end{matrix}$
Polycaprolactam	-[NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -C=O] <sub>n</sub> -
Carbowax = Polyäthylenglykol	-[O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -] <sub>n</sub>



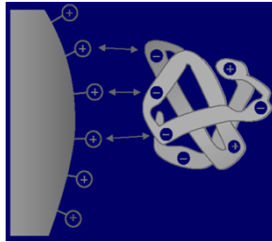


## Important chromatography methods in proteomics

- Ion Exchange Chromatography (IEC)
- Size Exclusion Chromatography (SEC)
- Affinity Chromatography (AC)
- Reversed Phase Chromatography (RPC)

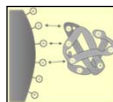


## Ion Exchange Chromatography



		Operating
Type of Exchanger	Functional group	Type
Strong anion	$\text{—N}^+\text{—CH}_3$	Quaternary Amine
Weak anion	$\text{—NH}_2$	Primary amine
	$\text{—NH}$	Secondary amine
	$\text{—N}$	Tertiary amine
Strong cation	$\text{—SO}_3^-$	Sulfonic acid
Weak cation	$\text{—COO}^-$	Carboxylic acid

## Ion Exchange Chromatography



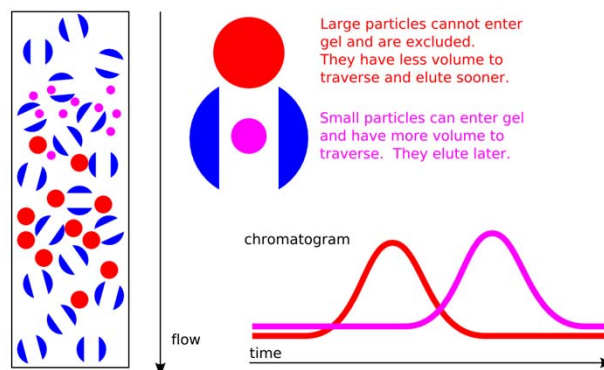
- Separation is based on charge differences
- Reversible interaction between oppositely charged solute and chromatographic medium
- Elution: increasing salt concentration or pH change
- Solute molecules are eluted in a concentrated form
- Ion exchange types:
  - Anion Exchange Chromatography: negatively charged solute molecules compete with negatively charged mobile phase ions for the positively charged sites of the stationary phase
  - Cation Exchange Chromatography: positively charged solute molecules compete with positively charged mobile phase ions for the negatively charged sites of the stationary phase.

## Size Exclusion Chromatography

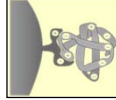


- Solute molecules are separated by their size
- Stationary phase has pores of well defined size
- Retention is a function of solute penetration into the pores that is proportional to the hydrodynamic volume of the solute
- No selective interaction with the stationary phase
- Particularly useful for buffer exchange

## Size Exclusion Chromatography

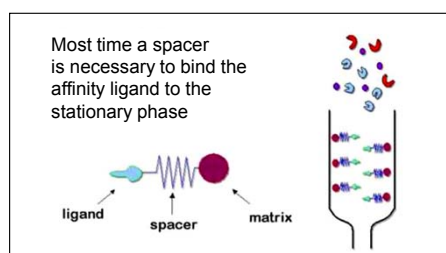
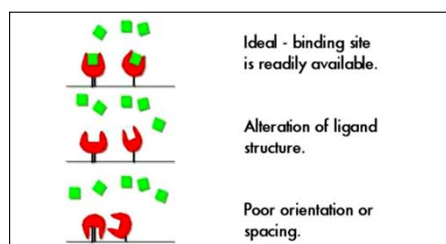


## Affinity Chromatography



- Solute molecules are separated on the basis of specific reversible binding to an affinity ligand attached to the stationary phase.
- Utilizes very specific stationary phases such as antibodies, lectins, etc.
- Desorption is performed by adding a competitive ligand to the elution buffer system, or changing ionic strength, pH or polarity.
- The availability of the affinity ligand defines its applicability.
- Very specific for the solute molecule.

## Affinity Chromatography



## Affinity ligands and applications

### LIGAND



### APPLICATIONS

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Avidin</li> <li>• Aprotinin</li> <li>• Biotin</li> <li>• Concanavalin A</li> <li>• Gelatin</li> <li>• Glutathione</li> <li>• Heparin</li> <li>• Iminoacetic acid</li> <li>• Lysine</li> <li>• Protein A</li> <li>• Phophorylethanolamine</li> <li>• Protein G</li> <li>• Protamine</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biotin derivatives</li> <li>• Serine proteases</li> <li>• Avidin</li> <li>• Glycoproteins, Oligosaccharides</li> <li>• Fibornectine enzymes</li> <li>• Enzymes related to glutathione</li> <li>• Blood coagulation factors</li> <li>• Interferon, serum proteins</li> <li>• Plasminogen, polysaccharides</li> <li>• Human IgG</li> <li>• C-reactive protein</li> <li>• IgG immune complex</li> <li>• IgM</li> </ul> |
|--|--|

Courtesy of Dr. R. Bishoff

## Grundlagen der chromatographischen Trennung

### Beschreibung der Trennleistung einer Säule

#### Ermittlung von $N$ und $H$ aus einem Chromatogramm:

H...theoretische Bodenhöhe

$$\Rightarrow H = \frac{L}{N}$$

Umformung für die Trennstufenzahl:

$$\Rightarrow N = 16 \left[ \frac{t_R}{W} \right]^2$$

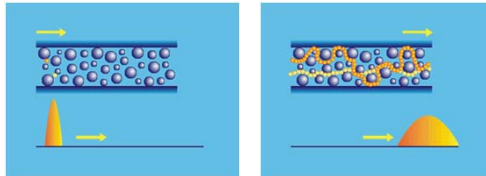
oder, ausgedrückt durch die Halbwertsbreite des Peaks:

$$\Rightarrow N = 5.54 \left[ \frac{t_R}{b_{1/2}} \right]^2$$

58

## Peakverbreiterung - Einflüsse

A...Eddy-Diffusion



B...Longitudinaldiffusion



C...Massentransfer

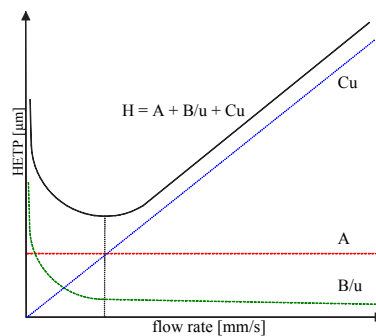
Gleichgewichtseinstellung an der Phasengrenze  
stationäre/mobile Phase benötigt Zeit  $\Rightarrow$  da die mobile Phase  
aber in Bewegung ist, kann sich der Gleichgewichtszustand nicht  
vollständig einstellen  $\Rightarrow$  Zunahme der Höhe eines theoretischen  
Bodens (HETP)

## Chromatographische Parameter

- Van Deemter Gleichung:

beschreibt Zusammenhang zwischen Bodenhöhe und Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

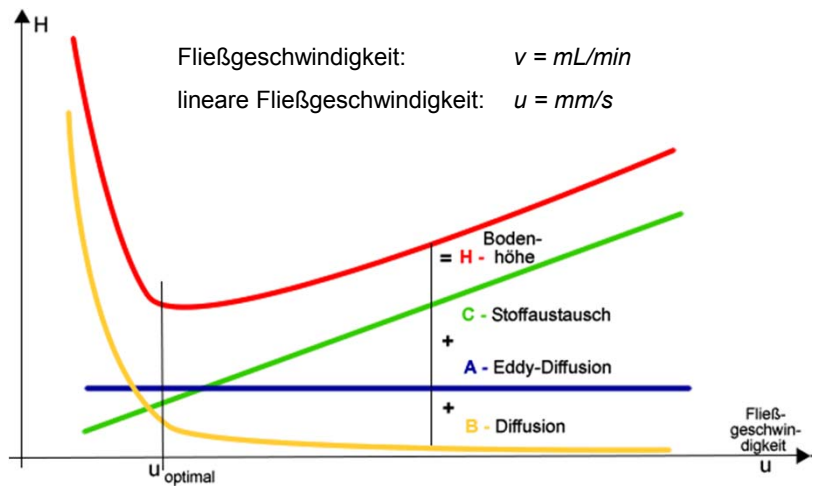


Van Deemter Gleichung



## Grundlagen der chromatographischen Trennung

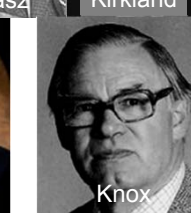
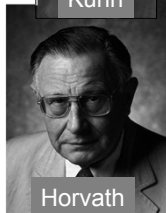
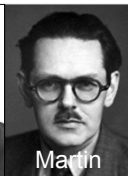
### Van Deemter Theorie



161

## Chromatography goes a long way back

1903 Tswett  
 1930 Kuhn  
 1940 Martin  
 1967 Horvath  
 Huber  
 Halász  
 Scott



...and has many faces



### First Publications found with SciFinder for High Pressure Liquid Chromatography HPLC

Horvath, Csaba G.; Lipsky, Seymour R. Column design in high - pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* (1969), 7(2), 109-16.

Scott C D; Johnson W F; Walker V E. A sample injection valve for use in high - pressure liquid chromatography. *Analytical biochemistry* (1969), 32(1), 182-4.

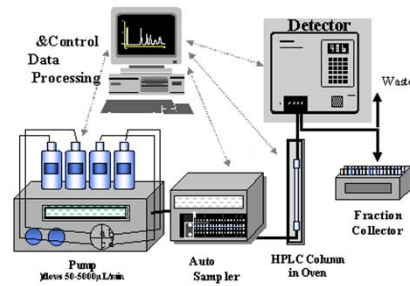
Felton, Herman. Performance of components of a high - pressure liquid chromatography system. *Journal of Chromatographic Science* (1969), 7(1), 13-16.

## Different Aspects of Chromatography

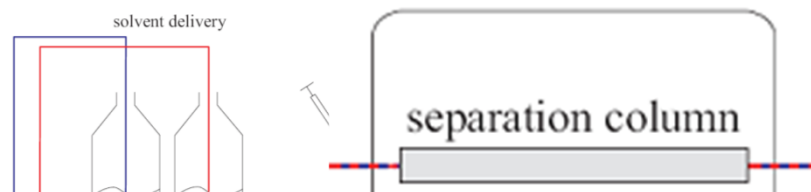
Chromatography - Yesterday



Chromatography - Today



## HPLC-Instrumentation

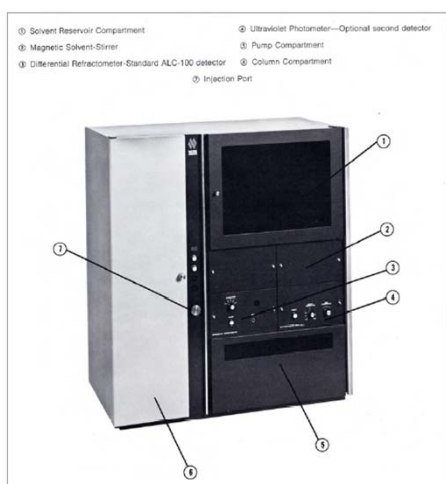


**Stationary Phase:** One of the two phases forming a chromatographic system. It may be a solid, a gel or a liquid. If a liquid, it may be distributed on a solid. This solid may or may not contribute to the separation process. The liquid may also be chemically bonded to the solid (bonded phase) or immobilized onto it (immobilized phase). The expression chromatographic bed or sorbent may be used as a general term to denote any of the different forms in which the stationary phase is used. *PAC 1993,65, 819 (Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993))*

## Column Sizes

Description	Dimensions	Approx. Flow rate (velocity 1–10 mm/s)
Open tubular liq chromatography	< 25 $\mu\text{m}$ i.d.	< 25 nL/min 25 nL/min
Nanobore column HPLC	25 $\mu\text{m}$ < i.d. < 100 $\mu\text{m}$	25–4000 nL/min
Capillary column HPLC	100 $\mu\text{m}$ < i.d. < 1 mm	0.4–200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Microbore column HPLC	1 mm < i.d. < 2.1 mm	50–1000 $\mu\text{L}/\text{min}$
Narrow(small)-bore column HPLC	2.1 mm < i.d. < 4 mm	0.3–3.0 mL/min
Normal-bore column HPLC	4 mm < i.d. < 5 mm	1.0–10.0 mL/min
Semipreparative column HPLC	5 mm < i.d. < 10 mm	5.0–40 mL/min

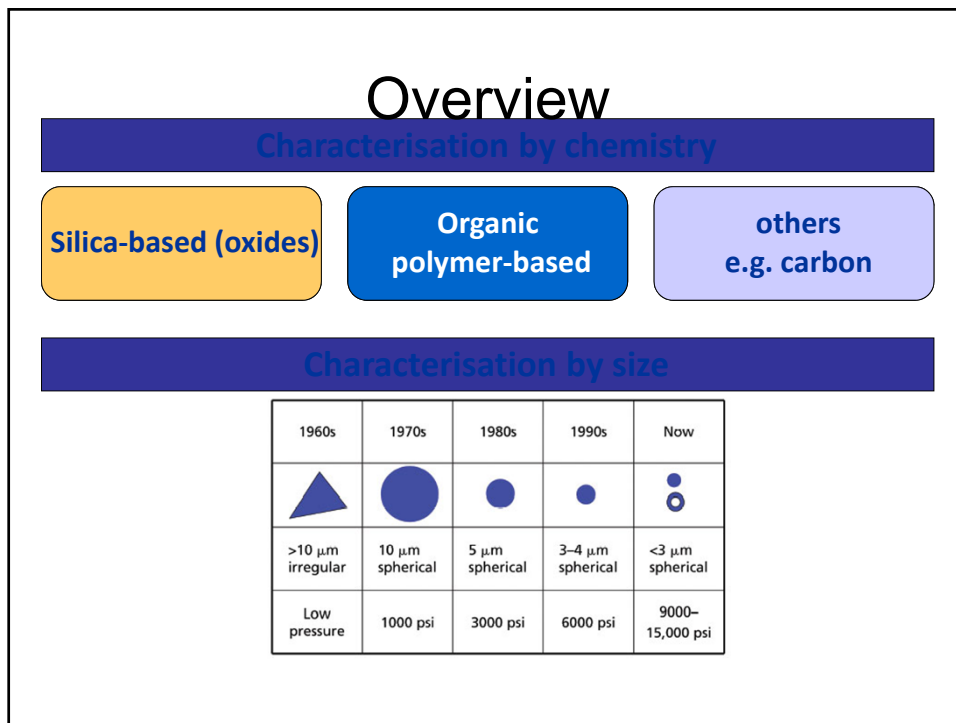
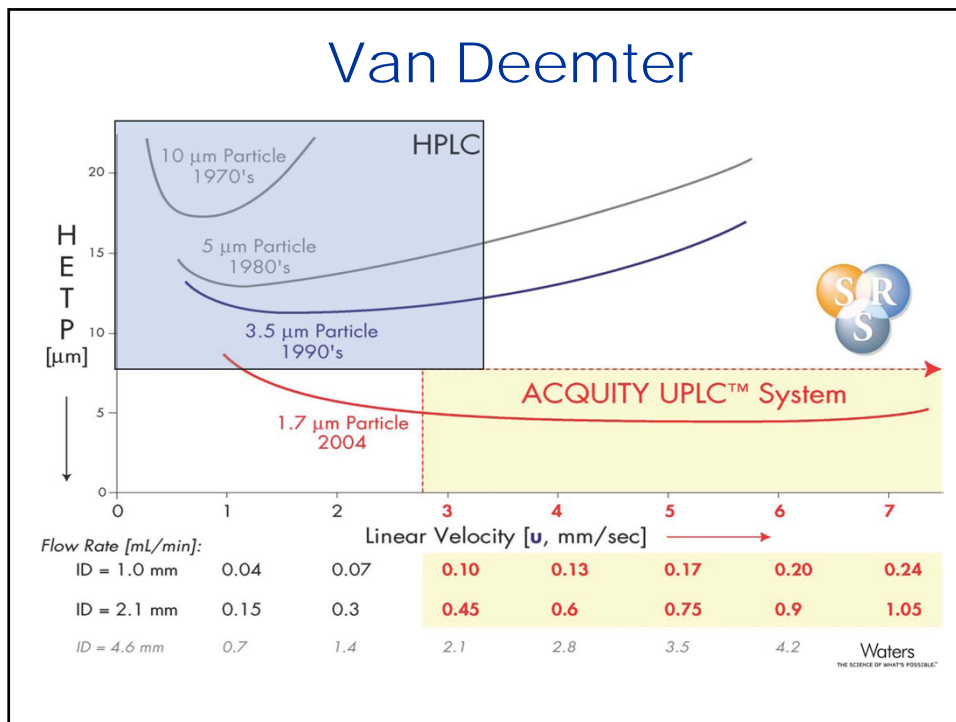
## Design changed

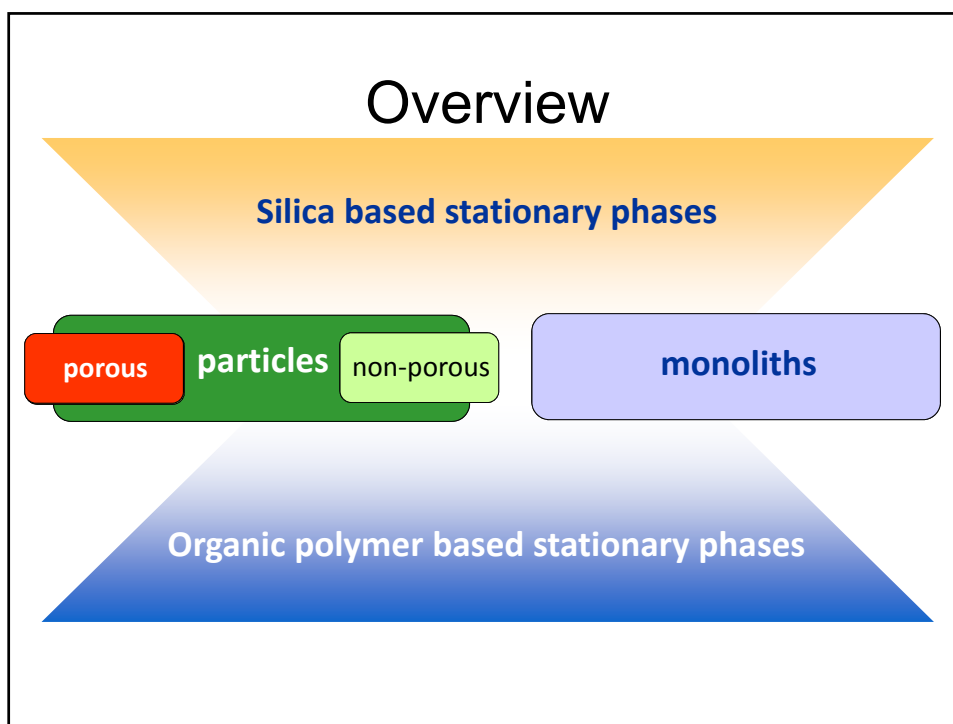


*Waters ALC 1976*



*Waters ACQUITY UPLC 2004*





## Silica Stationary Phases Changed in Surface Modification

### First Ion Exchange Chromatography Papers: 1966

Horvath, C. G.; Lipsky, S. R. **Use of liquid ion exchange chromatography for the separation of organic compounds.** Nature (London, United Kingdom) (1966), 211(5050), 748-9. CODEN: NATUAS ISSN:0028-0836. CAN 65:75208 AN 1966:475208 CAPLUS

### First RP HPLC Papers: 1976

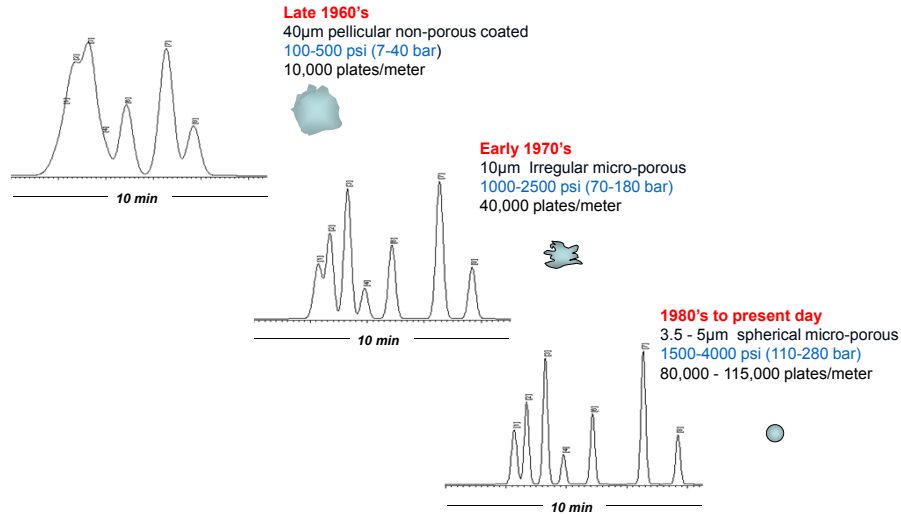
Chan, Henry W. S.; Levett, Gordon. **High performance liquid chromatography of oxygenated derivatives of unsaturated fatty acid esters.** Actes Congr. Mond. - Soc. Int. Etude Corps Gras, 13th (1976), Sect. D 73-9. CODEN: 36NUA6 CAN 87:163602 AN 1977:563602 CAPLUS

McCluer, Robert H.; Jungalwala, Firoze B. **High-performance liquid chromatographic analysis of glycosphingolipids and phospholipids.** Advances in Experimental Medicine and Biology (1976), 68(Curr. Trends Sphingolipidoses Allied Disord.), 533-54. CODEN: AEMBAP ISSN:0065-2598. CAN 86:135752 AN 1977:135752 CAPLUS

Koshy, K. T.; Vanderslik, A. L. **High-pressure liquid chromatographic method for the determination of 25-hydroxycholecalciferol in cow plasma.** Analytical Biochemistry (1976), 74(2), 282-91. CODEN: ANBCA2 ISSN:0003-2697. CAN 85:74432 AN 1976:474432 CAPLUS

Riedmann, M. **Elution strength and selectivity of the mobile phase in reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC).** Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie (1976), 279(2), 154-5. CODEN: ZACFAU ISSN:0016-1152. CAN 84:147086 AN 1976:147086 CAPLUS

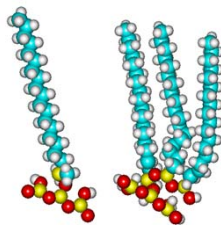
## Silica Stationary Phases Changed in Shape



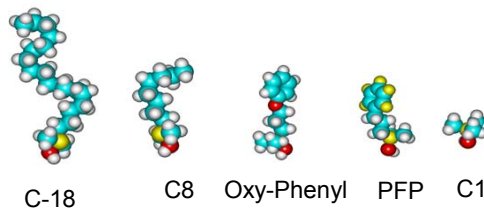
## Surface Modified Silica

- Bonded phase shields polar silica surface, making it inaccessible for analyte molecules.
- Suppressing strong polar interactions with silica surface and substituting them with weak dispersive forces is a key factor of reversed-phase HPLC.
- Bonded phase types - C18, C8, C5, C1, Phenyl, CN, NH<sub>2</sub>, etc.

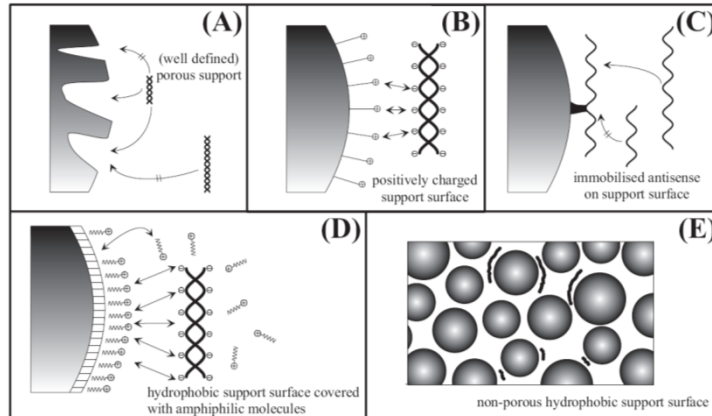
### Monomeric and Polymeric Bonding C18-Silica



### Selected Types of Bonded Ligands



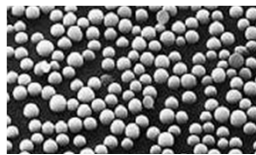
## Other Separation Mechanisms



**(A)** Size Exclusion Chromatography (SEC), **(B)** Ion Exchange Chromatography (IEC), **(C)** Affinity Chromatography (AC), **(D)** Ion-Pair Reversed-Phase Chromatography (IP-RPC), **(E)** Slalom Chromatography (SC)

## Silica vs Polymers

Silica

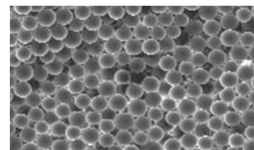


SEM photograph of NUCLEOSIL

- + high pressure stable
- + easy surface modification
- + high surface areas possible

- instable > pH 8.5
- tailing of basic analytes due to non functionalised silanolic groups possible

Polymers



SEM photograph of PS

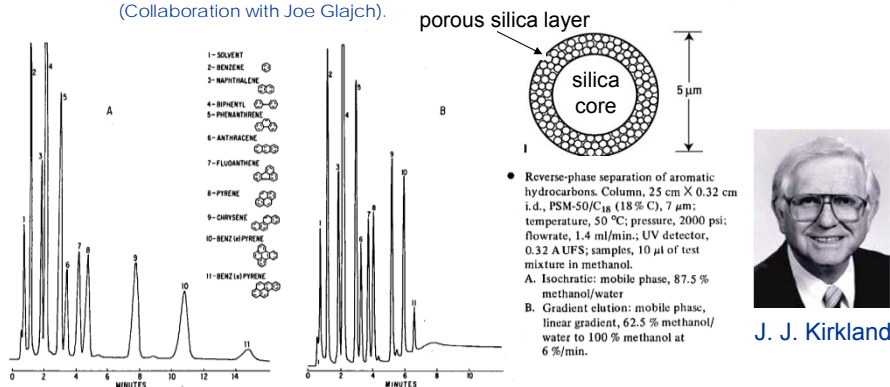
- + high pH stability, both acidic and alkaline environment
- + easy surface modification
- + high surface areas possible
- + no free silanolic groups

- lower pressure stability in comparison to silica



## Porous Layer Beads

- 1955–1969** Synthesis of permanently bonded phases for gas chromatography (GC), preparative GC.
- 1965–1973** Synthesis of porous layer beads (Zipax), manufacture of microparticulate silica beads in collaboration with R.K. Iler (**Zorbax technology**) development of monolayer bonded phases based on Zorbax
- 1984–1992** Development of improved silica (Zorbax Rx, Type B silica) with improved chemical properties for chromatography of basic compounds). Development of steric-protected and bidentate silanes for improved bonded-phase stability at low and high pH (Collaboration with Joe Glajch).



J. J. Kirkland

J. J. Kirkland. *Chromatographia*, Vol. 8, No. 12, December 1975

## Macro- and Meso-Porous Silica

Klaus Unger developed macroporous, controlled porosity, 10 μm silica particles

Unger K K.; Kern R; Ninou, M C.; Krebs K F. **High performance gel permeation chromatography with a new type of silica packing material.** *Journal of Chromatography* (1974), 99 435-43.

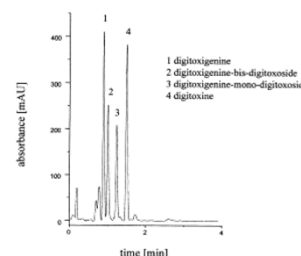
Synthesis of tailored porous oxides, in particular of silica, and aluminosilicates with controlled pore structure and morphology

Unger, K.; Schick-Kalb, J.; Straube, B. **Porous silicon dioxide with variable and reproducible pore space structure from poly(ethoxysiloxane).** *Colloid and Polymer Science* (1975), 253(8), 658-64.

Synthesis of ordered mesostructured silicas as nanoparticles and agglomeration to hierarchically ordered beads of controlled size and pore structure

Lefevre, B.; Galameau, A.; Iapichella, J.; Petitto, C.; Renzo, F. Di; Fajula, F.; Bayram-Hahn, Z.; Skudas, R.; Unger, K. **Synthesis of Large-Pore Mesostructured Micelle-Templated Silicas as Discrete Spheres.** *Chemistry of Materials* (2005), 17(3), 601-607.

Klaus Unger



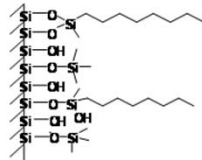
spherical porous silicas in the micron and submicron size range

## Chemically Modified Stationary Phases

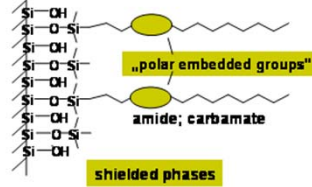


H. Engelhardt

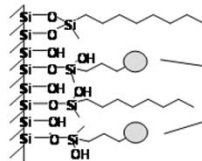
### Types of RP Columns



"brush" type; classical endcapping

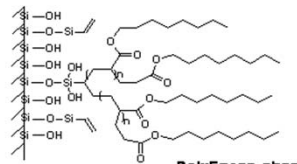


shielded phases



"brush" type; "hydrophilic" endcapping

polar groups

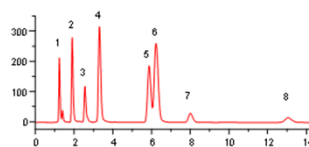
-OH; -NH<sub>2</sub>

PolyEncap-phase

## Chemically Modified Stationary Phases

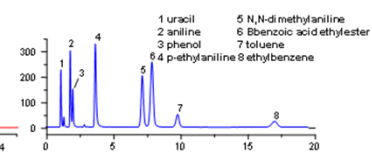
### Shielded

#### Prontosil C18 ACE ece

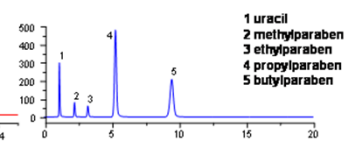
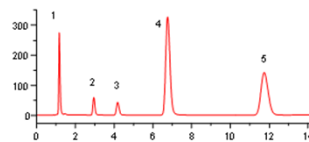


### Classical C18

#### Prontosil C18 SH



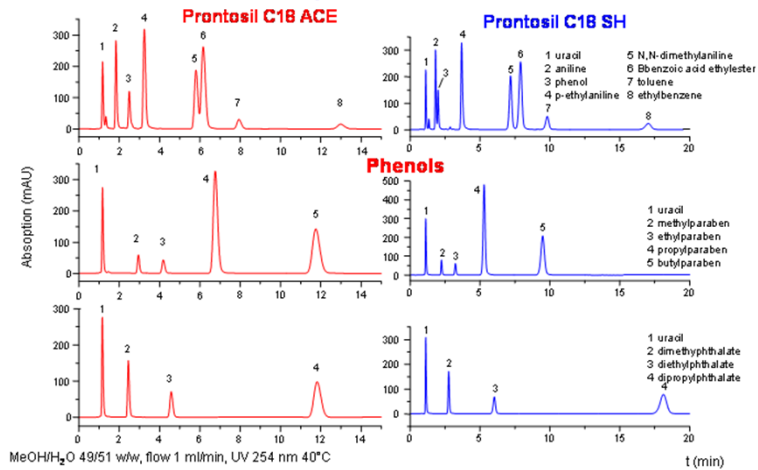
### Phenols

MeOH/H<sub>2</sub>O 49/51 w/w, flow 1 ml/min, UV 254 nm 40°C

M. Scherer

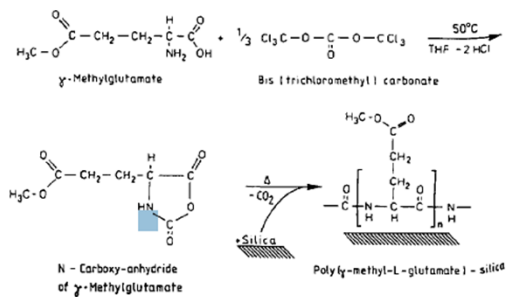
## Chemically Modified Stationary Phases

### Polar and Nonpolar C18 Reversed Phases

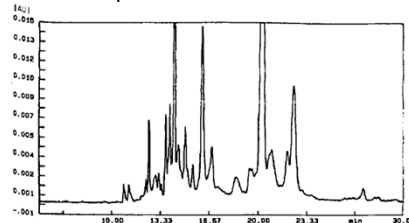


## Surface Modification of Silica

### Polymethylglutamate coated Silica

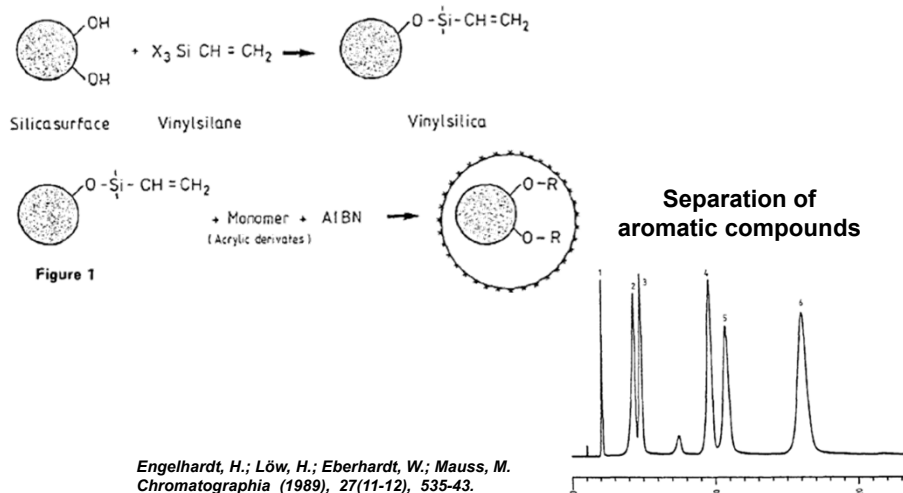


### Separation of cellulase



Bentrop, D.; Kohr, J.; Engelhardt, H. *Chromatographia* (1991), 32(3-4), 171-8.

## Polymer Encapsulated Stationary Phases



## Problems with $\text{TiO}_2$ and $\text{ZrO}_2$

**Different optimization strategies required compared to silica based phases**

**Amphoteric surface properties**

**High packing densities but small surface area**

**Knowledge of classical RP chromatography not transferable**

**It's a different world**

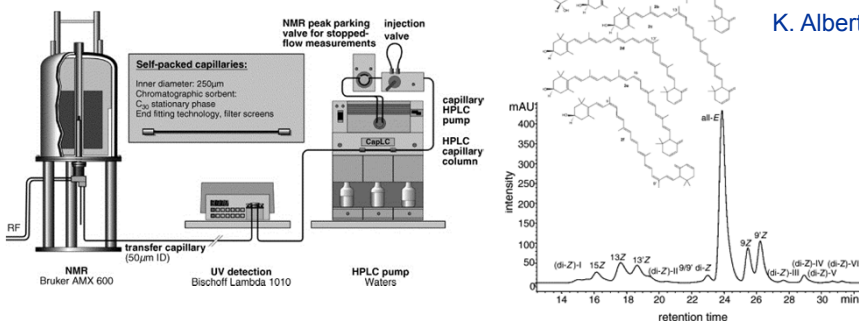
## Silica Modification and Hyphenation Techniques

Development of new stationary phases for HPLC  
with special focus on carotenoids e.g. C-30  
Characterisation of stationary phases by Solid State NMR  
Hyphenation of HPLC and GC to NMR



K. Albert

Set-up of the capHPLC–NMR (600 MHz) system



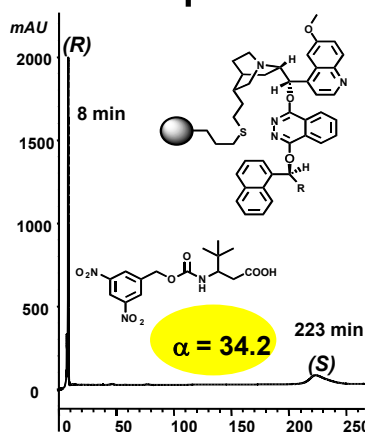
P. Hentschel et al., *Journal of Chromatography A*, Vol. 1112, 1-2 (2006), 285-292

## Enantiomers Separation



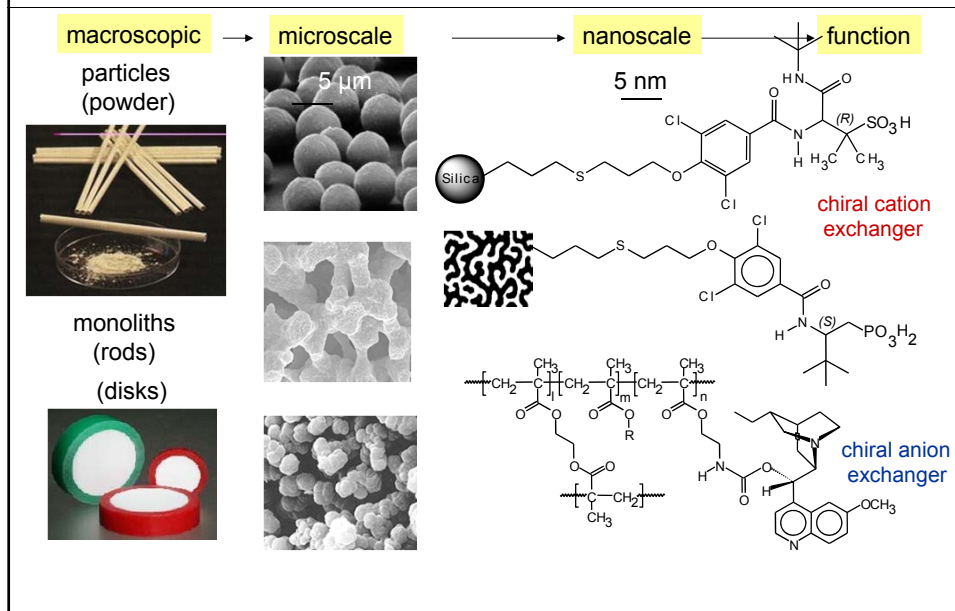
W Lindner

The development of novel synthetic selectors (receptors) useful for enantioselective separation techniques lies at the interface of organic, analytical and biological chemistry



Chromatographic conditions: Dim.: 100 x 4 mm ID  
MeOH / H<sub>2</sub>O = 80 / 20 (v/v), 1 M NH<sub>4</sub>OAc total,  
pH<sub>a</sub> = 6.0; 0.7 ml / min, 254 nm; 25°C.

## Materials for Highly Selective Molecular Recognition

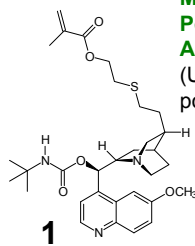


## Capillary Separation Technologies

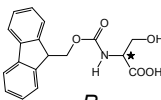
poly(1-co-HEMA-co-EDMA)

Monomers: 40 wt%  
Porogens: 60 wt%  
AIBN

(UV or thermal polymerization)



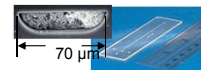
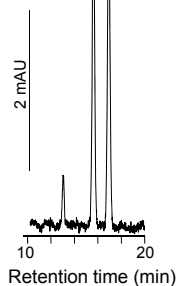
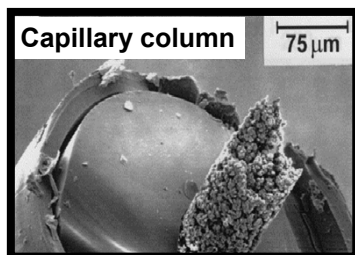
M. Lämmerhofer et al.



### Trends in Anal. Chem.:

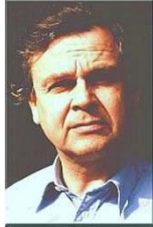
- Miniaturization
- Nano-flow
- Minimal sample consumption
- MS compatibility

- In-situ prepared organic polym.
- monolithic capillary columns
- single-step preparation
- macroporous, no frits
- flexible tailoring of
  - chemistry
  - morphology
  - porosity



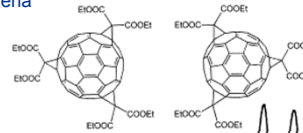
$\mu$ -Chip

# Chiral Separation

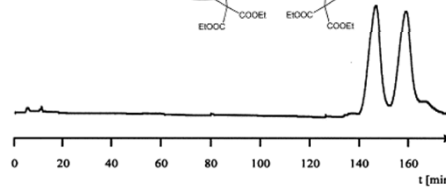


V. Schurig

- Gas-chromatographic Enantiomer Separation
- Analysis of Chiral Insect Pheromones and Flavours
- Chiral Electrochromatography
- Monoliths in Electrochromatography
- Unified Enantioselective Chromatography
- Enantiomerization
- Stopped Flow Gas Chromatography
- Enantioselective Coalescence Phenomena
- Chiral Environmental Organochlorines
- Enantioselective Antibodies
- Enantioselective Sensors
- Chiral Immunosensor
- Exochirality



B. Gross, *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 65–69, *Enantiomer separation of [60]fullerene derivatives by micro-column high-performance liquid chromatography using (R)-(-)-2-(2,4,5,7-tetranitro-9-fluorenylideneaminoxy) propionic acid as chiral stationary phase.*

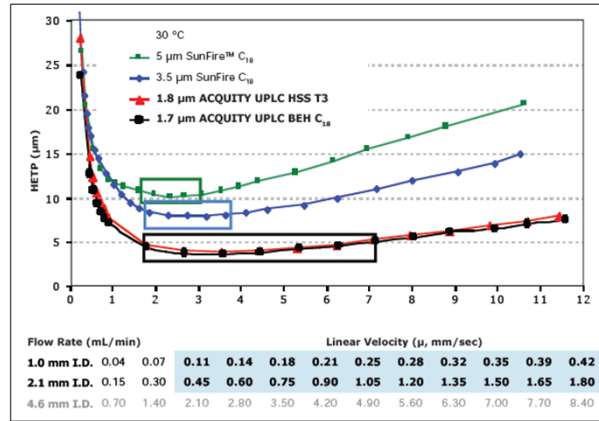


Enantiomer separation conditions: acetonitrile–water (75:25, v/v); flow-rate 0.4  $\mu$ l/min.

# UHPLC

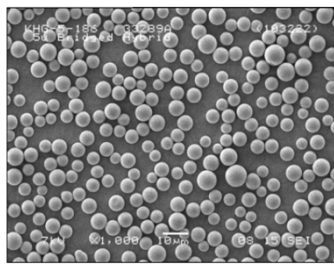
# Ultra High Performance Liquid Chromatography

## Van Deemter Plott

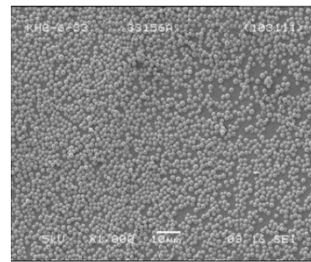


Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE™

## Particle Sizes



Conventional HPLC material, 5 µm  
*Silica particles*

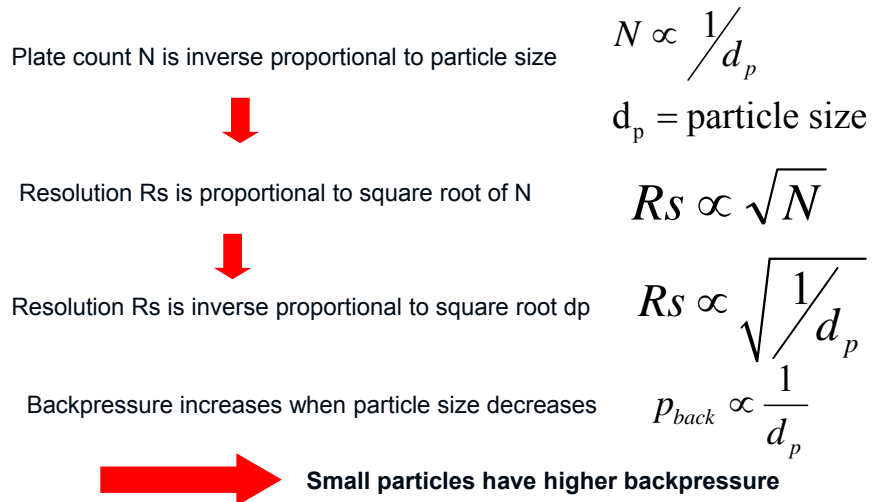


UHPLC material, 1.7 µm  
*Bridged Ethyl Hybrid Particles (BEH)*

Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE™



## Why Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)?



UHPLC Systems and columns have to be robust to withstand pressure between 800 and 1200 bar

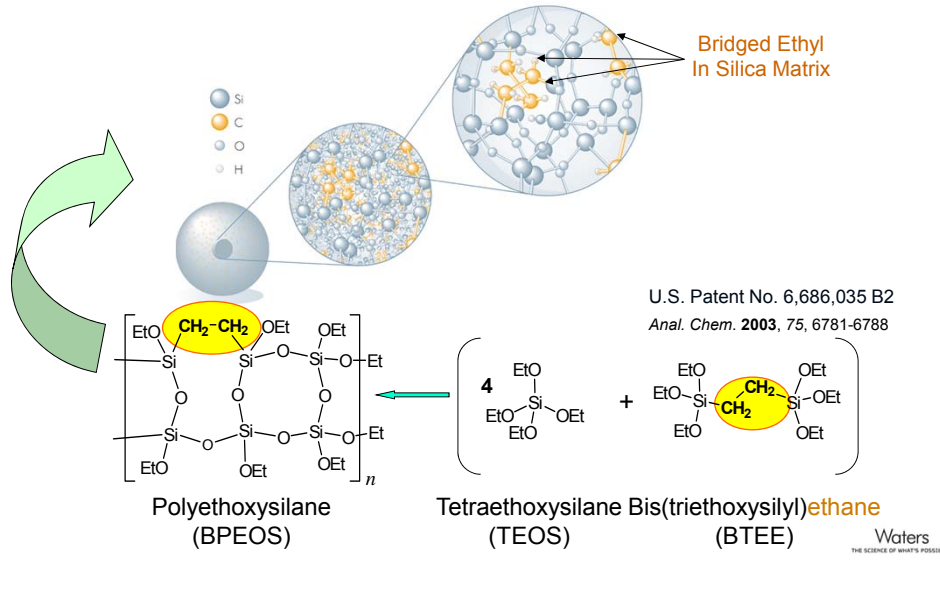


Acquity UPLC (Waters)®

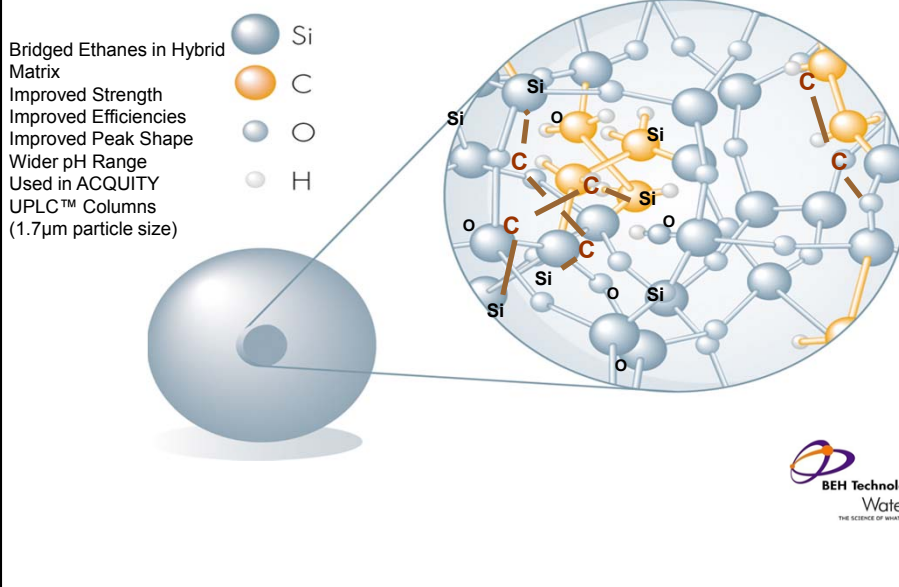


Agilent® 1290

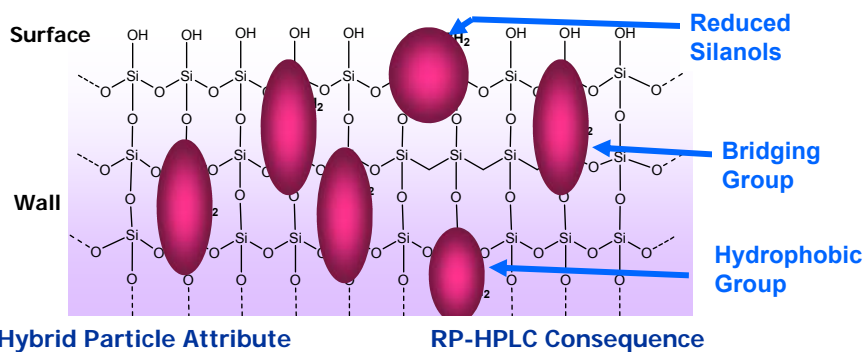
## Bridged Ethyl Hybrid Particles



## Bridged Ethyl Hybrid Particles (BEH)



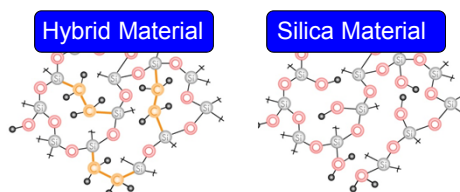
## BEH Technology™ Particle Attributes



Hybrid Particle Attribute	RP-HPLC Consequence
Surface hybrid groups reduce surface silanol concentration	Reduced USP peak tailing factors for bases
Internal bridging groups provide high interconnectivity	Increased chemical & mechanical stability
Internal hybrid groups provide hydrophobicity	Increased high pH stability of column

Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE

## Silica and Hybrid Materials



	ACQUITY UPLC BEH Columns	ACQUITY UPLC HSS Columns
Particle Type	Ethylene Bridged Hybrid (BEH)	High Strength Silica (HSS)
Particle Size	1.7 $\mu\text{m}$	1.8 $\mu\text{m}$
Maximum Rated Pressure	15000 psi (~1000 bar)	15000 psi (~1000 bar)
Pore Diameter/Volume	130Å / 0.7 mL/g	100Å / 0.7 mL/g
Surface Area	185 m <sup>2</sup> /g	230 m <sup>2</sup> /g
Available Chemistries	C <sub>18</sub> , C <sub>8</sub> , Shield RP18, Phenyl, HILIC	C <sub>18</sub> , C <sub>18</sub> SB, T3
pH Range	1-12; (RP18: 2-11); (HILIC: 1-8)	C <sub>18</sub> : 1-8; C <sub>18</sub> SB, T3: 2-8

Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE

## Available Column materials

Chemistry	BEH Particle					HSS Particle		
	C <sub>18</sub>	C <sub>8</sub>	Shield RP18	Phenyl	HILIC	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub> SB	T3
Ligand Type	Trifunctional C <sub>18</sub>	Trifunctional C <sub>18</sub>	Monofunctional Embedded Polar Group	Trifunctional Phenyl	-	Trifunctional C <sub>18</sub>	Trifunctional C <sub>18</sub>	Trifunctional C <sub>18</sub>
Ligand Density*	3.1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	3.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	3.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	3.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	-	3.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	1.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	1.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$
Carbon Load*	18%	13%	17%	15%	-	15%	8%	11%
Endcap Style	Proprietary	Proprietary	TMS	Proprietary	-	Proprietary	None	Proprietary
pH Range	1-12	1-12	2-11	1-12	1-8	1-8	2-8	2-8

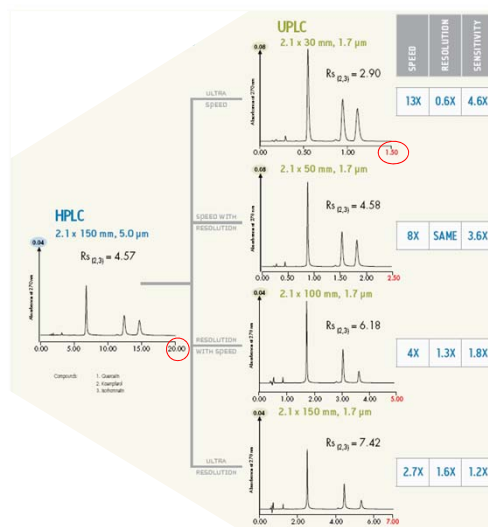
Hybrid Material

Silica Material

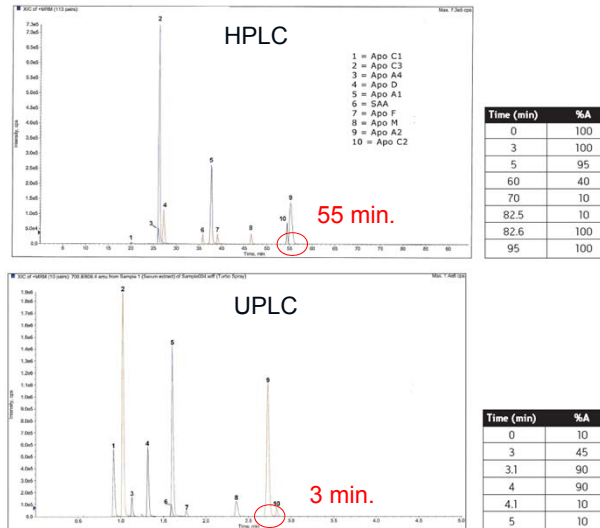
Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE

## Separations of Small Molecules

1. Quercetin
2. Kaempferol
3. Isorhamnetin

Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE

## Application in Proteomics - Apolipoproteins



Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE

## Overview

Silica based stationary phases

porous

particles

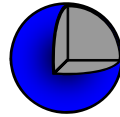
non-porous

## Micropellicular Stationary Phases

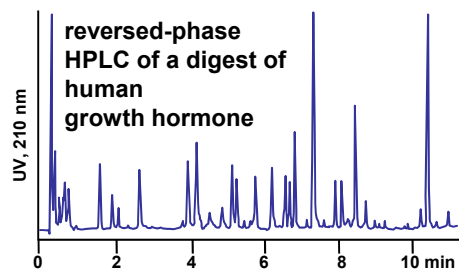


Cs. Horváth  
1930-2004

"The significance of rapid HPLC is expected to have great potential in obtaining quick analytical information"  
Cs. Horváth, 1988

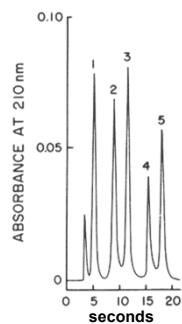


Micropellicular particle

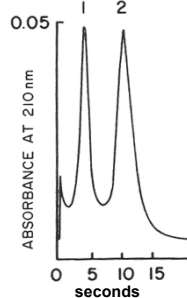


Unger, Jilge, Kinkel, Hearn, J. Chromatogr. 359 (1986) 61  
Kalghatgi and Horváth, J. Chromatogr. 443 (1988) 343

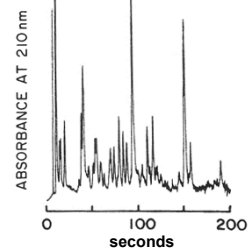
## Micropellicular Sorbents for Rapid Reversed-Phase Chromatography of Proteins and Peptides.



Separation of protein mixture



Separation of  $\beta$ -Lactoglobulin B and A



Separation of tryptic digest of methionyl human growth hormone

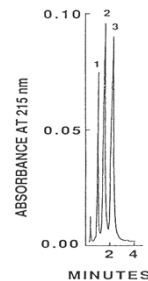
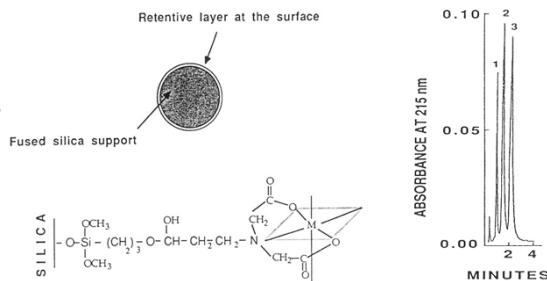
Kalghatgi, Krishna; Horvath, Csaba. **Rapid peptide mapping by high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography (1988), 443 343-54.

Molnar I; Horvath C, **Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phases by high-performance liquid chromatography.** Journal of chromatography (1977), 142 623-40.

El Rassi, Z; Horvath, C, **Hydrophobic interaction chromatography of t-RNA's and proteins.** Journal of Liquid Chromatography (1986), 9(15), 3245-68.

## Affinity Chromatography Based on Micropellicular Silica

Rapid metal interaction chromatography of proteins on  $\text{Co}^{+2}$ /IDA columns



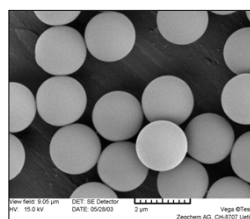
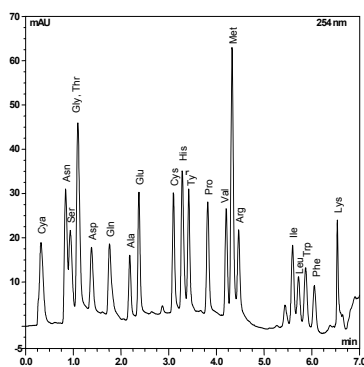
Bonn, G. K.; Kalghatgi, K.; Horne, W. C.; Horvath, C. **Rapid metal-interaction chromatography of proteins and peptides on micropellicular sorbents.** *Chromatographia* (1990), 30(9-10), 484-8.

El Rassi, Ziad; Truei, Yunghuoy; Maa, Yih Fen; Horvath, Csaba. **High-performance liquid chromatography with concanavalin A immobilized by metal interactions on the stationary phase.** *Analytical Biochemistry* (1988), 169(1), 172-80.

Corradini, D; El Rassi, Z; Horvath, C; Guerra, G; Horne, W. **Combined lectin- affinity and metal-interaction chromatography for the separation of glycoproteins by high-performance liquid chromatography.** *J. Chromatography* (1988), 458 1-11.

## Non-Porous Silica

separation of amino acids



KOVASIL MS 1.5 µm  
Transmission  
Electron Microscopy

### Separation of PTH-amino acids

Column: 33 x 4.6 mm; **Kovasil MS-C14**

Eluents: A: Water + 0.1% HFBA

B: 90% acetonitrile-10% water + 0.8% HFBA

Gradient: 0-3.55 min to 12% B; 3.55-6.55 min to 20% B; 6.55-6.65 min to 100% B; 6.65-7.00 min 100% B.

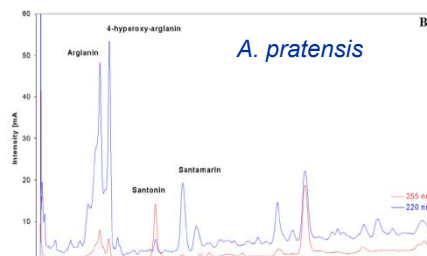
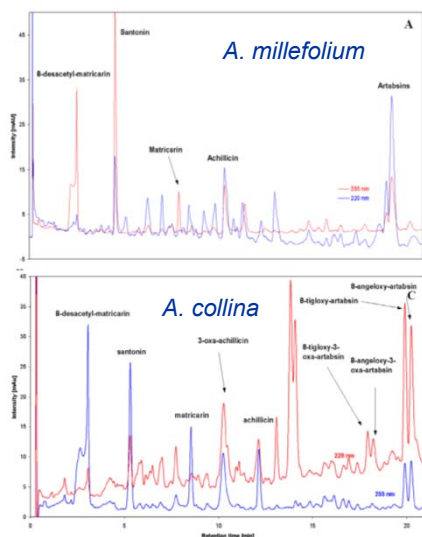
Flow rate: 1.0 ml/min

Detection: 254 nm

Temperature: 25°C

B. Boros, K. Kovacs and R. Ohmacht. **Fast separation of amino acid phenylthiohydantoin derivatives by HPLC on a non-porous stationary phase.** *J. Chromatography* 51, 2000, S202-204.

## Non-porous Silica



**Column:**

**Kovasil MS C18, 33x4.6 mm I.D.**

**Eluent:**

A: 2% CH<sub>3</sub>CN + 98% H<sub>2</sub>O

B: 95% CH<sub>3</sub>CN + 5% H<sub>2</sub>O

**Flow rate:** 1.0 ml/min

**Temperature:** ambient

**ESI-MS**

**Probe temp:** 250°C, **Probe:** 3.5kV

**AQA max:** 100V, +ve 10V, +ve 70V, +ve 100V

Robert Ohmacht, Pecs University

## Overview

Silica based stationary phases

porous

particles

non-porous

monoliths



## Monolithic Silica Columns



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Journal of Chromatography A, 1191 (2008) 231–252

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

[www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

Review

### Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography

Oscar Núñez<sup>a,b,\*</sup>, Kazuki Nakanishi<sup>c</sup>, Nobuo Tanaka<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Goisho-Kaido-cho, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Available online 13 February 2008

Development of monolithic silica columns consisting of continuous silica skeletons and throughpores of  $\mu\text{m}$  size.

Particle packed columns and monolithic columns in high performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal, K. K. Unger et al., J. Chromatogr. A. 1184 (2008), 393-415

## Monolithic Silica Columns

### Merck Chromolith HPLC Columns, Merck KGaA (Darmstadt, Germany)

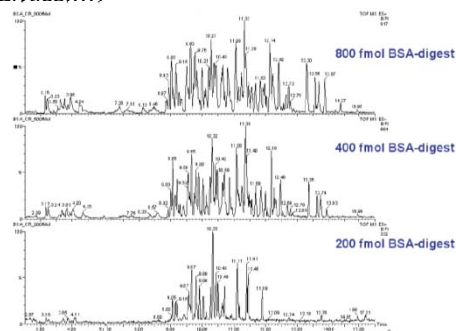
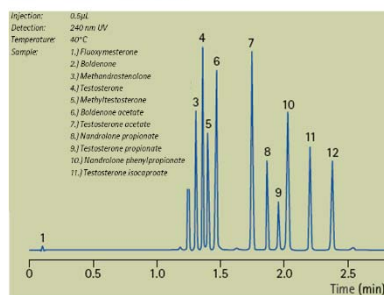


#### SILICA MONOLITHS

Different chemistries (C-18, C-8, NP,...)

Different dimensions (0.05, 0.1, 0.2, 2, 3, 4.6 mm)

Different applications (bioanalytics, pharma-, food-environmental analytics,...)



# Overview

porous

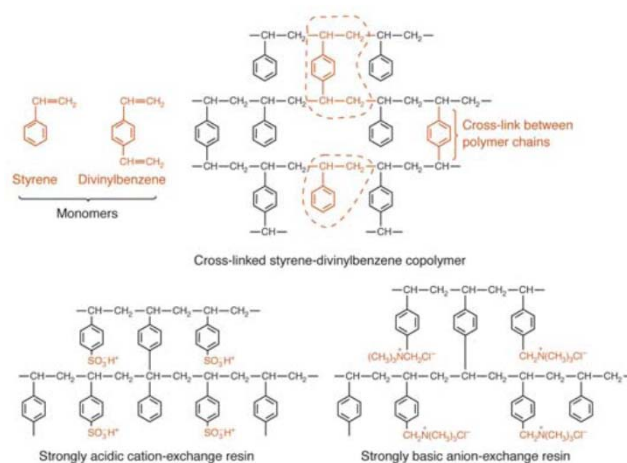
particles

non-porous

monoliths

Organic polymer based stationary phases

## PS/DVB Particles

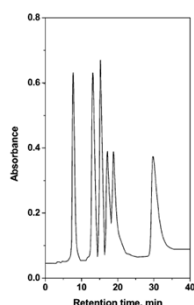


## Porous polymer

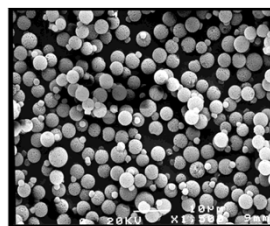
C. M. Cheng, F. J. Micalte, J. W. Vanderhoff, M. S. El-Aasser, Synthesis and characterization of monodisperse porous polymer particles. *Journal of polymer science Part A* 30, 235-244, 1992.

Marina Galia, Frantisek Svec, Jean M. J. Frechet, Monodisperse polymer beads as packing material for high-performance liquid chromatography: effect of divinylbenzene content on the porous and chromatographic properties of poly(styrene-co-divinylbenzene) beads prepared in presence of linear polystyrene as a porogen. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 32, (11), 2169-75 1994

Xu, Mingcheng; Peterson, Dominic S.; Rohr, Thomas; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Polar polymeric stationary phases for normal-phase HPLC based on monodisperse macroporous poly(2,3-dihydroxypropyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) beads. *Analytical Chemistry* (2003), 75(4), 1011-1021.



Separation of aniline derivatives using column packed with 3- $\mu$ m 70% diol stationary phase obtained from poly(glycidylmethacrylate-co-ethylene dimethacrylate) beads. Chromatographic conditions: column 150  $\times$  4.6 mm; mobile phase, linear gradient of 15-40% THF in hexane in 40 min; flowrate 1 mL/min; UV detection at 254 nm.



## Perfusion Chromatography

© 1990 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturebiotechnology>



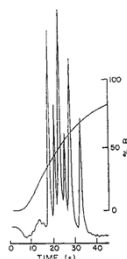
F. Regnier

### PERFUSION CHROMATOGRAPHY AN APPROACH TO PURIFYING BIOMOLECULES

Liquid chromatography (LC) remains the preeminent technique for isolating and recovering proteins and peptides. Highly selective, extremely flexible, and very gentle, it provides



Perfusion chromatography is a technique based on fluid dynamics for reducing stagnant mobile phase mass transfer in liquid chromatography. This is achieved by using supports with large pores that allow mobile phase to flow through particles.



A rapid separation of standard proteins on Poros Packing material

## Overview

porous

particles

non-porous

monoliths

Organic polymer based stationary phases

## PS/DVB Particles

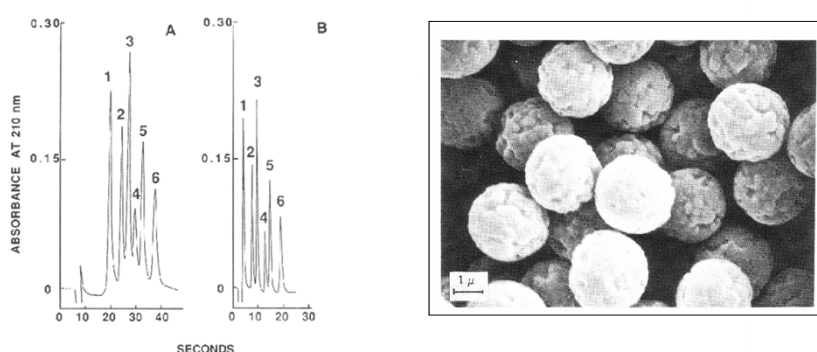
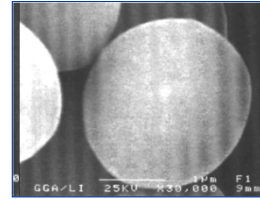
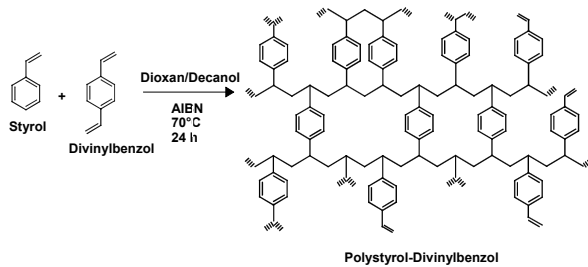


Fig. 4. Chromatograms of a protein mixture obtained on a  $30 \times 4.6$  mm I.D. column under two different conditions. Flow-rate and temperature: (A) 3 ml/min,  $25^{\circ}\text{C}$ ; (B) 7 ml/min,  $80^{\circ}\text{C}$ . Linear gradient in 1 min from 10 to 100% acetonitrile in water containing 0.2% TFA. Samples: 1, 100 ng of ribonuclease A; 2, 50 ng of cytochrome c; 3, 10 ng of lysozyme; 4, 100 ng of L-asparaginase; 5, 100 ng of  $\beta$ -lactoglobulin A; 6, 100 ng of ovalbumin.

Maa, Yih Fen; Horvath, Csaba. **Rapid analysis of proteins and peptides by reversed-phase chromatography and polymeric micropellicular sorbents.** *Journal of Chromatography* (1988), 445(1), 71-86.

## Synthesis of Polystyrol-Divinylbenzol Particles

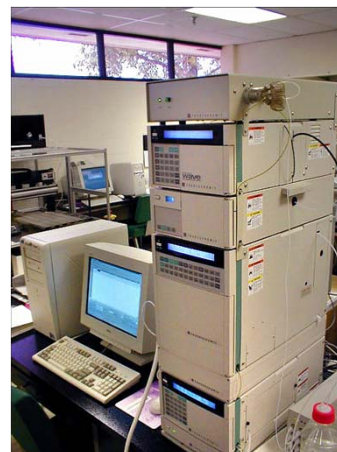
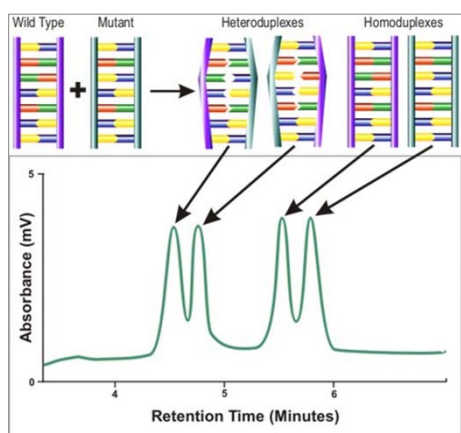


In situ polymerization of PS/DVB

Non porous PS/DVB

G. Bonn, C. Huber, P. Oefner, *Nucleic Acid Separation on alkylated non porous polymer beads*, U.S. Patent No. 5,585,236

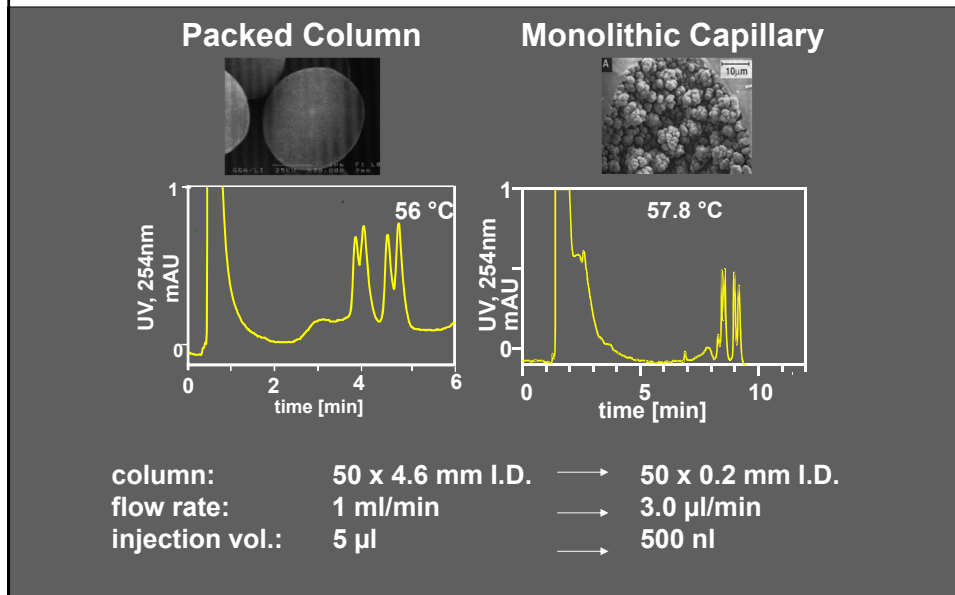
## Transgenomic Wave-System - Mutation Analysis



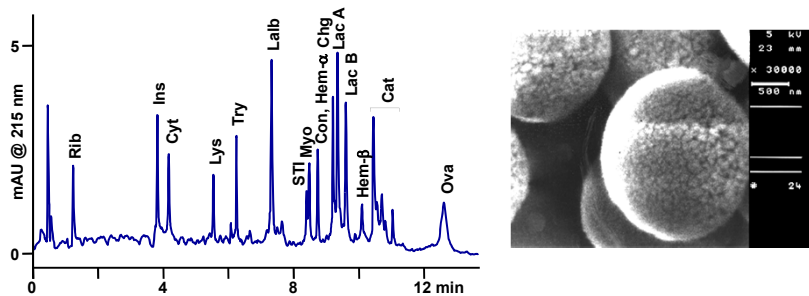
Transgenomic Wave HPLC-System

Bonn, Gunther; Huber, Christian; Oefner, Peter. *Separation of nucleic acid fragments with alkylated nonporous polymer beads*. PCT Int. Appl. (1994), 30 pp.

## Mutation Detection by Denaturing HPLC using Packed Columns and Monolithic Capillaries



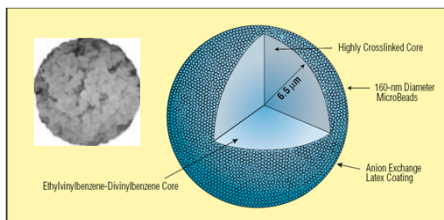
## High-Efficiency Intact Protein Separation with C18-PS/DVB Particles



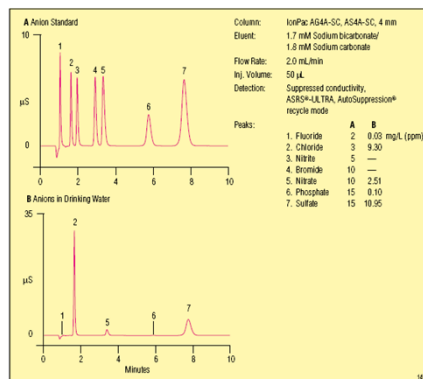
53 x 4 mm I.D., 2.3 µm PS-DVB-C18 particles, 38-54% acetonitrile in 0.2 % trifluoroacetic acid in 15 min, 560 µl/min, 80 °C.

Huber, Kleindienst, Bonn, Chromatographia 44 (1997) 438

## Anion-Exchange Polymer



The IonPac AS4A-SC<sup>®</sup> packing is a structure composed of a highly crosslinked core and a MicroBead<sup>™</sup> anion-exchange layer attached to the surface. The substrate for the IonPac AS4A-SC column is a 13- $\mu$ m diameter microporous resin bead, consisting of ethylvinylbenzene crosslinked with 55% divinylbenzene. The anion exchange layer is functionalized with very hydrophilic quaternary ammonium groups.



Determination of inorganic anions in drinking water sample on an IonPac AS4A-SC column



## Overview

porous

particles

non-porous

monoliths

Organic polymer based stationary phases

## Historical Abstract

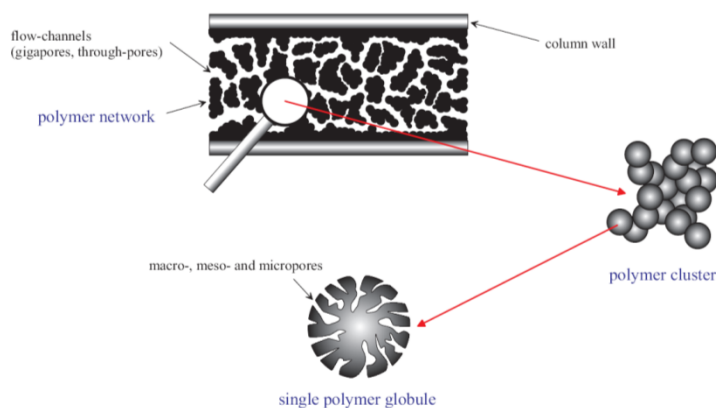
- **1950s, Robert Synge** was the first to postulate polymer structures, which were similar to what is defined as monolith today
- **1967, Kubin et al.**, polymerization in a glass column, poly(2-hydroxy-ethyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate)  
→ low permeability and poor efficiency
- **1970**, foam filled columns for GC and HPLC (open pore polyurethane)  
→ insufficient mechanical stability, strong swelling
- **1980, Hjerten et al.**, introduced the concept of compressed gels (*continuous beds*) - copolymerisation of acrylic acid and N,N'-methylene bisacrylamide (efficient separation of proteins) "*stationary phases with reduced discontinuity*" (for single piece polymer)
- **mid-1980, Tennikova et al.**, short monolithic separation beds (copolymerisation of glycidyl methacrylate as monomer and high amounts of ethylene dimethacrylate as crosslinker) - arranged in a pile or sliced into disks

## Historical Abstract

- **Svec et al.**, extended the process to conventional HPLC column housings (8 mm I.D.), rigid macroporous polymers with cylindrical shape "*continuous polymer rods*"
- Since **1992**, a vast variety of rigid organic monolithic stationary phases with different chemistry, functionality and column geometry has been reported for HPLC
- **1993**, Kennedy et al. **The term monolith**, which probably is the most common expression for the new class of macro-porous polymers, **was first introduced** to describe a single piece of derivatised cellulose sponge for the fractionation of proteins, but rapidly found general acceptance.



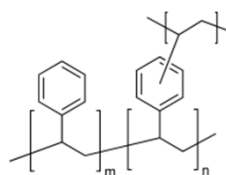
## Monolithic Structure



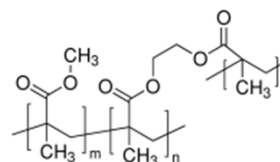
*Schematic representation of the structure and the morphology of a typical monolithic polymer, prepared in a column housing as an unstirred mold.*

## Organic Monoliths

**Styrene monoliths** have been prepared by thermally (AIBN or benzoyl peroxide) initiated copolymerisation of styrene and divinylbenzene to result mechanically stable, hydrophobic column supports for RPC as well as IP-RP-HPLC and CEC application

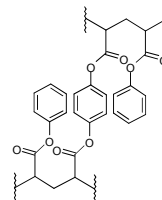


**Methacrylate monoliths** have been fabricated by free radical polymerisation of a number of methacrylate monomers and crosslinkers, whose combination allowed the creation of monolithic columns with different chemical properties (RP, HIC, HILIC) and functionalities (ion-exchange, IMAC, bioreactors).

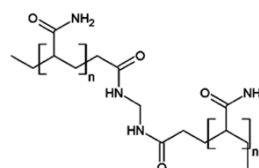


## Organic Monoliths

**Acrylate monoliths** have been prepared by free radical polymerisation of various acrylate monomers and crosslinkers. The application of acrylate polymer columns, seem to be more focussed on CEC than HPLC.



**Acrylamide monoliths** as well as methacrylamide monoliths have been introduced as hydrophilic column support materials for CEC of small molecules, NPC supports for the analysis of low-molecular-weight compounds and as HIC supports for proteins.



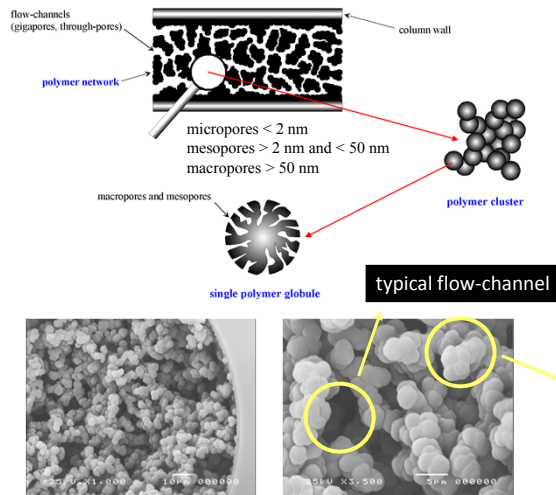
## Porosity

**The overall porosity of the monolithic polymer can be influenced and controlled by the nature and composition of the porogenic solvent as well as the amount of crosslinker.**

- Free space inside the polymer microglobules that precipitate at early stages of polymerisation as (monomer) swollen globules.
- Free space inside the polymer clusters, arising after chemical linkage of microglobules in solution.
- Space between the polymer clusters that build the scaffold by chemical linkage at late stages of polymerisation.

## Organic Monolithic Materials

Single piece of porous polymer located inside the confines of a column

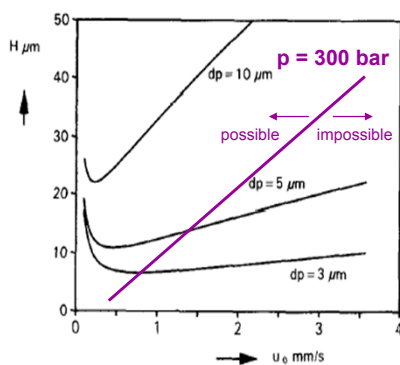


### Advantages

- Reduced resistance to mass transfer due to convection
- Reduced flow resistance – high permeabilities
- Easy to prepare – no packing required
- High reproducibility, high pH stability
- No frits required
- No interparticular voids

cluster of porous polymer globules

Consequence: Possible Solution:

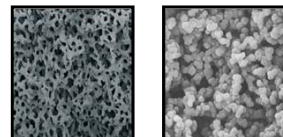


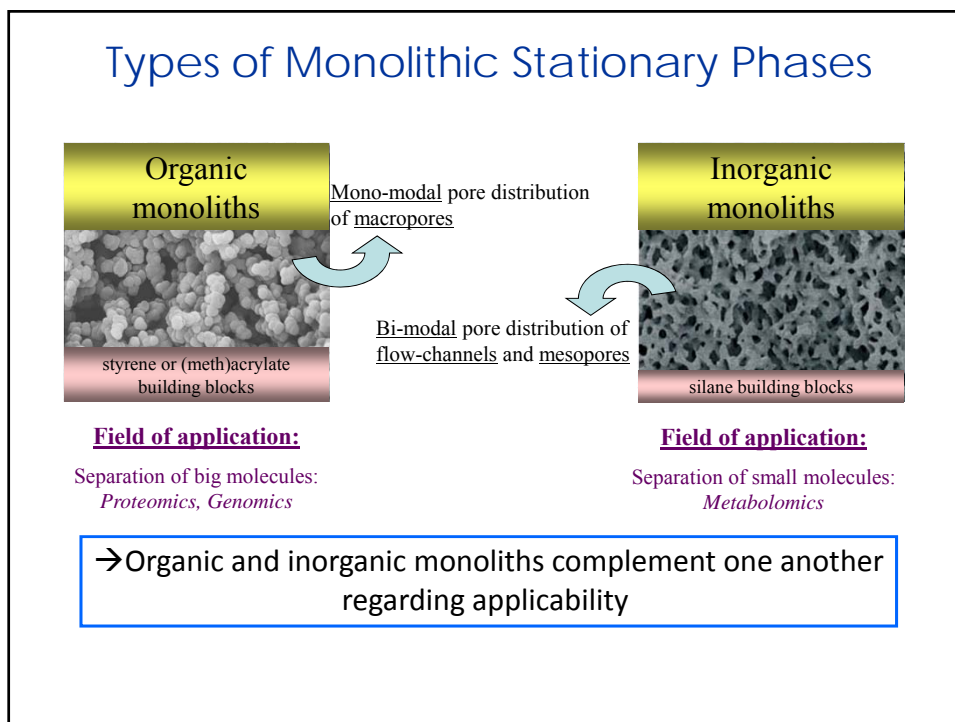
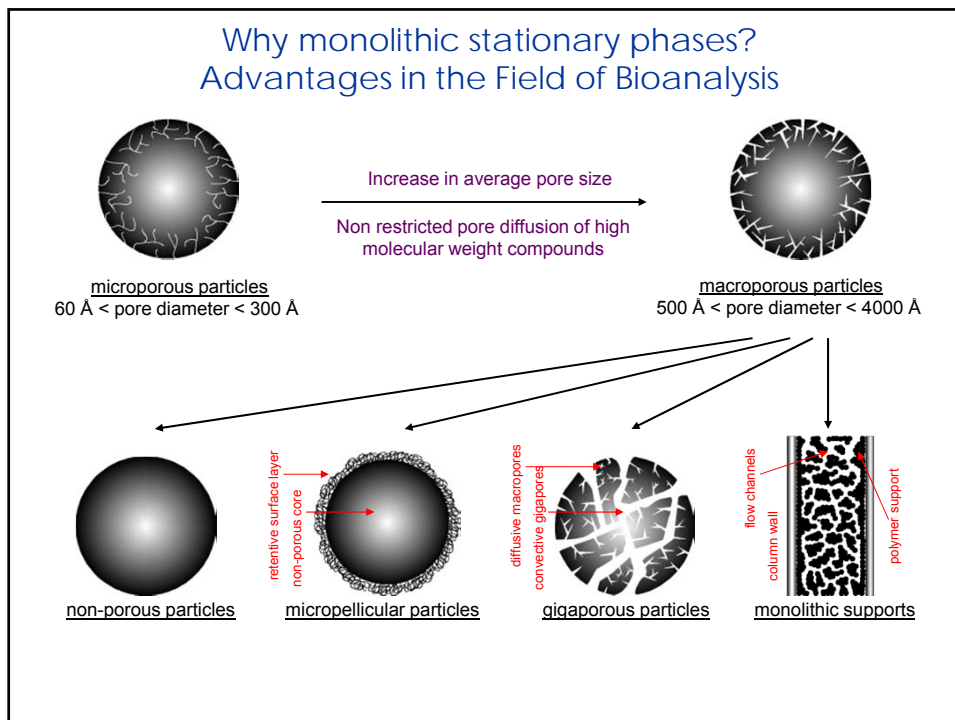
→ Pressure as the practical limit of the performance of HPLC

Improvement of the HPLC hardware in terms of pressure upper limits

Increase the permeability by decreasing the solvent viscosity (e.g. high temperature)

Development of novel HPLC stationary phase designs (e.g. monoliths)





## Compressed Gels – Continuous Beds

Stellan Hjertén



- Hjertén introduced the concept of **compressed gels** in the late **1980s**, which have also been referred to as **continuous beds**
- made significant contributions to a variety of areas in separation science such as electrophoresis, LC, and CEC.
- Co-polymerisation of acrylic acid and N,N'-methylene bisacrylamide resulted in highly swollen gels. Despite the high degree of compression, the gels exhibited good permeability and enabled efficient separation of proteins.

## Acrylate-Based Monoliths

- a pioneer in the discovery and development of porous polymeric materials and monoliths in particular.
- design of monolithic materials that are structurally and chemically optimized for various applications: LC, LC-MS, CEC, CE, microfluidic chip technology
- polymerization techniques: thermally and photochemically initiated free radical co-polymerizations,  $\gamma$ -radiation initiated polymerizations of different organic precursors (methacrylates, styrenes,...)
- thin layers of porous polymer for thin layer separation followed by MALDI TOF MS analysis

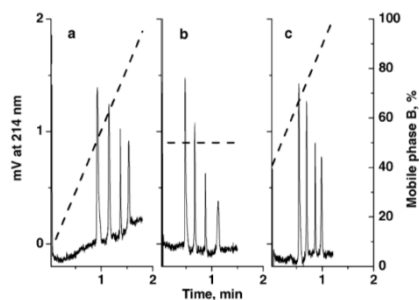
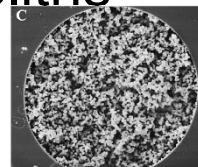
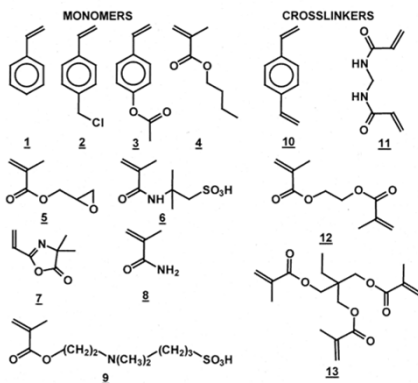


Frantisek Svec

*Svec, F. and Fréchet, J.M.J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. Anal. Chem. 54, 820-822, 1992.*

*Sáfrány A., Beiler B., László K., Svec F., Control of pore formation in macroporous polymers synthesized by single-step  $\gamma$ -radiation-initiated polymerization and cross-linking. Polymer 46, 2862-2871, 2005.*

## Macroporous Monoliths

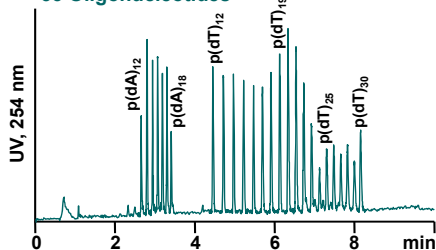


Effect of gradient on separation of a protein mixture using monolithic column at 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

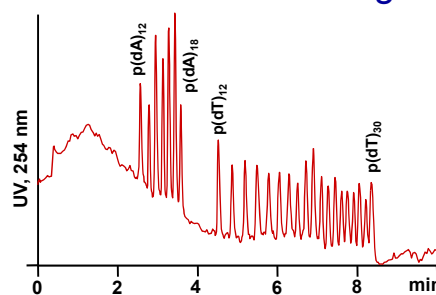
Examples of monomers used for the preparation of rigid porous polymer monolithic columns

## Comparison of Monolithic and Granular Packings

IP-RP-HPLC of 35 Oligonucleotides



Monolithic column



Microparticulate column

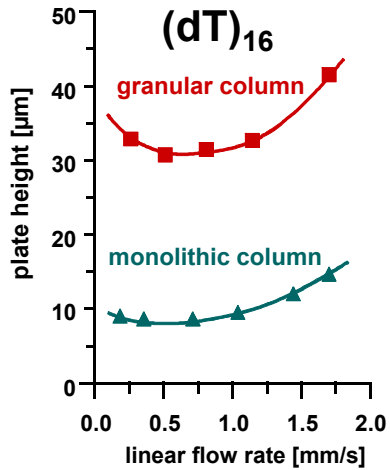
approx. 40% improvement in column efficiency

PS-DVB monolith, 60  $\times$  0.20 mm i.d. or PS-DVB-C18, 2.1  $\mu\text{m}$ , 70  $\times$  0.20 mm i.d.; 3-9% acetonitrile in 3.5 min, 9-11% in 3.5 min, 11-11.8% (13%) in 4 min in 0.1 M triethylammonium acetate; 3.3  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; 50  $^{\circ}\text{C}$ ; p(dA)<sub>12-18</sub>, p(dT)<sub>12-30</sub>, 40-100 fmol each.

Huber et al., Anal. Chem. 71 (1999) 3730

Premstaller et al., Anal. Chem. 72 (2000) 4386.

## Efficiency with Granular and Monolithic Columns



simplified van Deemter equation:

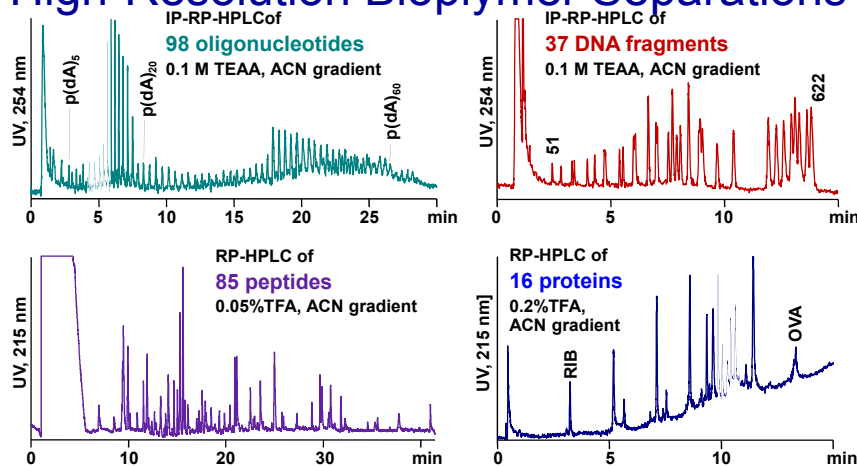
$$H = A + B/u + Cu$$

	A	B	C
granular	15.7	3.6	13.5
monolithic	3.0	0.9	6.1

60 x 0.2 mm, isocratic elution with 7.6% / 9% acetonitrile in 0.1 M triethylamminium acetate, pH 7, 50 °C, sample,  $(\text{dT})_{16}$ .

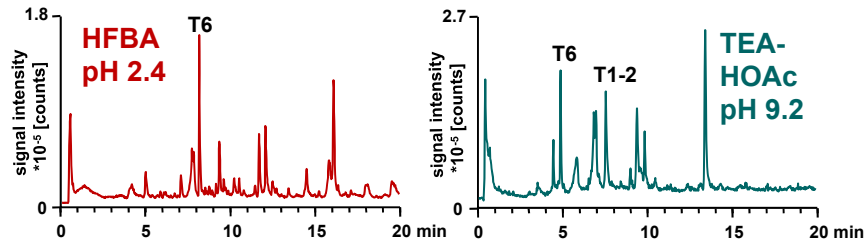
Oberacher et al.,  
J. Chromatogr. A 1030 (2004) 201

## High-Resolution Biopolymer Separations



Premstaller et al., Anal. Chem. 72 (2000) 4386  
Premstaller et al., Anal. Chem. 73 (2001) 2390

## LC-MS Analysis of $\beta$ -Casein Phosphopeptides at High and Low pH



T1-2: RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR, T6: FQSEEQQTDELQDK

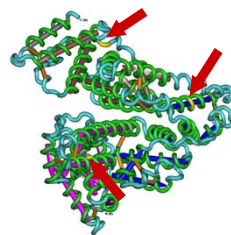
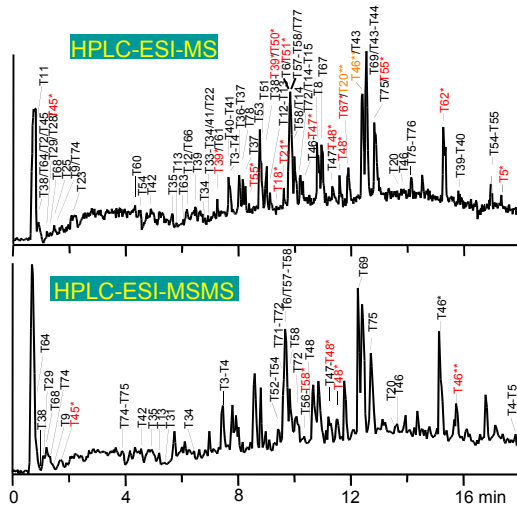
T6: detectable in positive and negative mode ESI-MS

T1-2: 100 fmol undetectable in positive-, 10 fmol detectable in negative ESI-MS

60 x 0.2 mm PS-DVB monolith, 25-min gradient of 0-37.5% acetonitrile in 0.05% heptafluorobutyric acid or 1% triethylamine-acetic acid, pH 9.2, 2  $\mu$ L/min; positive or negative ESI-MS, 100 fmol  $\beta$ -Casein digest.

Tholey, et al., Anal. Chem., 77 (2005) 4618-4625

## Detection of Nitrated Peptides by LC-MS(MS)



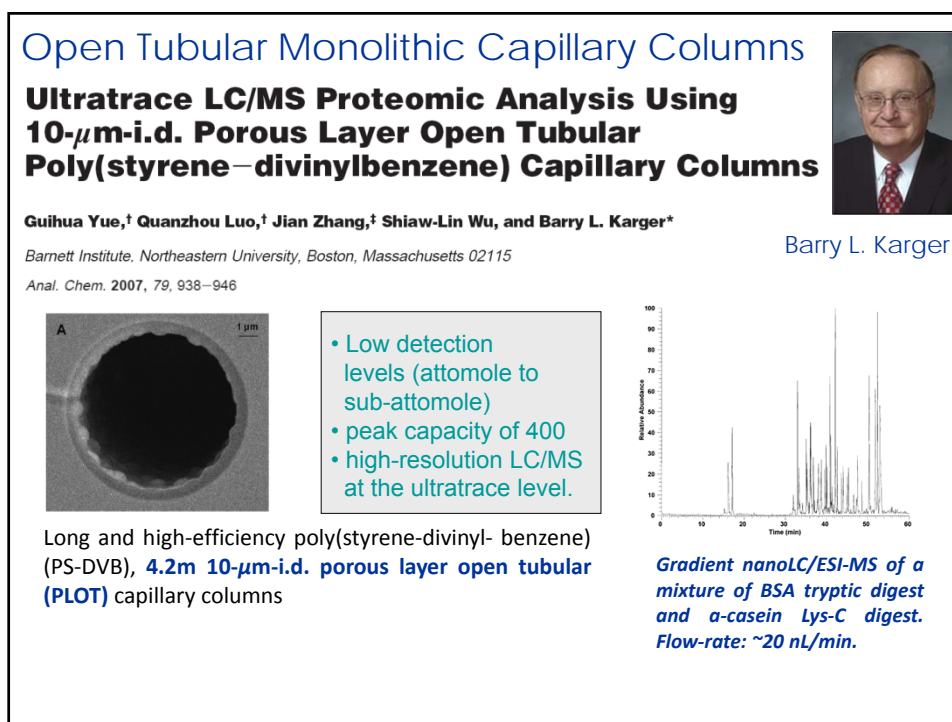
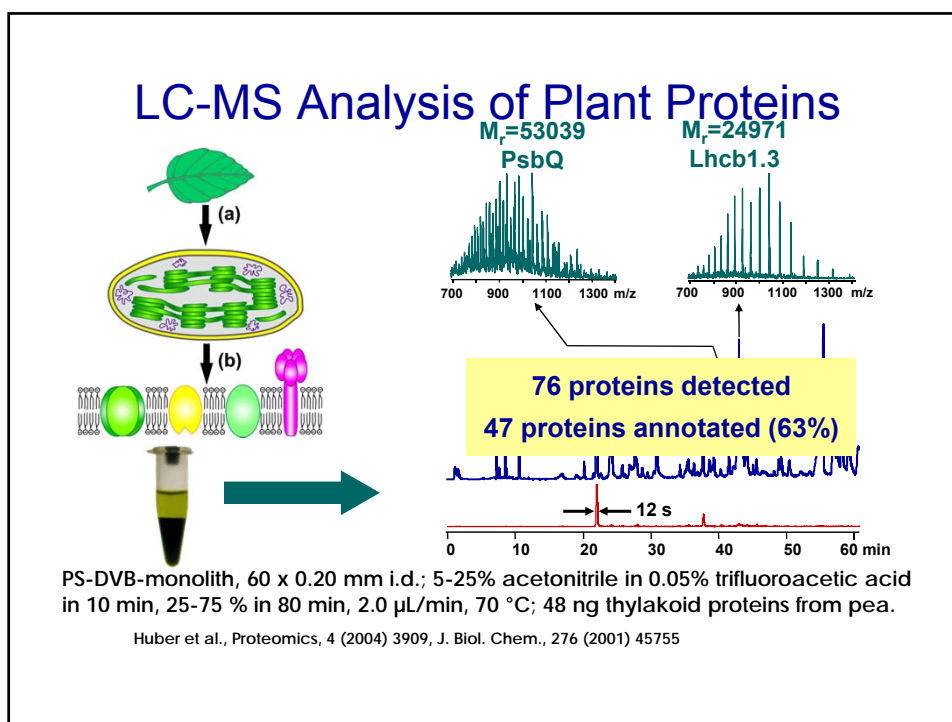
Nitration sites in serum albumin

(a) Full scan MS, 500-2000 m/z  
 (b) Data dependent scan with dynamic exclusion, 1. full scan, 2. product ion scan of most intense precursor ion.

PS/DVB monolith, 60 x 0.20 mm i.d.; gradient, 0-40 %B acetonitrile in 0.05% aqueous trifluoroacetic acid in 20 min, 2  $\mu$ L/min; 50  $^{\circ}$ C;; sample: tryptic digest of nitrated bovine serum albumin, 7.5 pmol.

Walcher et al., J. Proteome Res. 2 (2003) 534

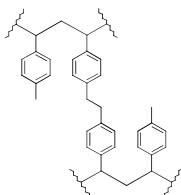




## Novel Monolithic Materials

### COPOLYMERISATION OF

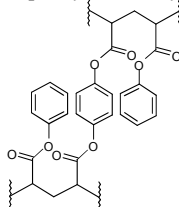
*p*-methylstyrene  
1,2-bis(*p*-vinylbenzylchloride)



MS/BVPE

STYRENE RELATED  
STRUCTURE

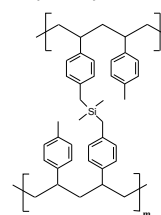
phenyl acrylate  
1,4-phenylene diacrylate



PA/PDA

AROMATIC ACRY-  
LATE SYSTEM

*p*-methylstyrene  
bis(*p*-vinylbenzyl)dimethylsilane

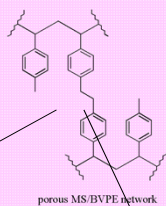
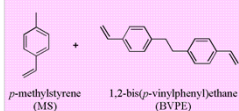


MS/BVBDMS

INCLUDE SILANE  
CHEMISTRY

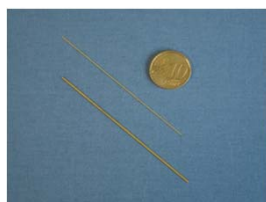
## MONOLITHIC MS/BVPE

### thermally initiated free radical polymerisation



- highly crosslinked
- high crosslinking homogeneity due to non-conjugated crosslinker
- minimised swelling
- high pressure stability

→ **Applicable to HPLC**



capillary columns  
different dimension

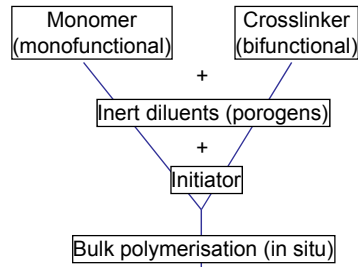
80 x 0.2 mm  
80 x 0.533 mm



conventional HPLC  
columns

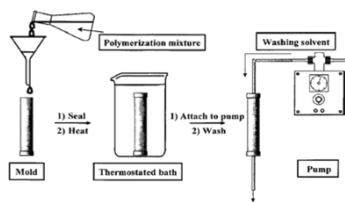
90 x 3.0 mm

## General Manufacturing Process of Monoliths

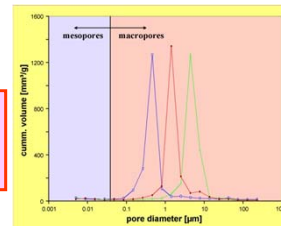


Polymerisation parameters

- ◆ Monomer to crosslinker ratio
- ◆ Total monomers to porogen ratio
- ◆ Nature of porogens
- ◆ Nature of initiator
- ◆ Amount of initiator
- ◆ Polymerisation temperature



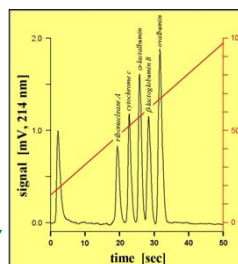
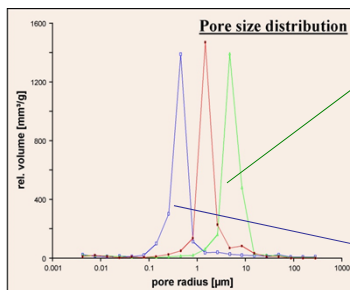
Control of the porous properties



## Optimisation of Monolithic MS/BVPE Capillary Columns

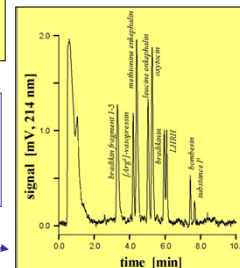
Control the porous properties by:

- Polymerisation temperature
- Monomer to porogen content
- Micro- to macroporogen content
- Initiator content

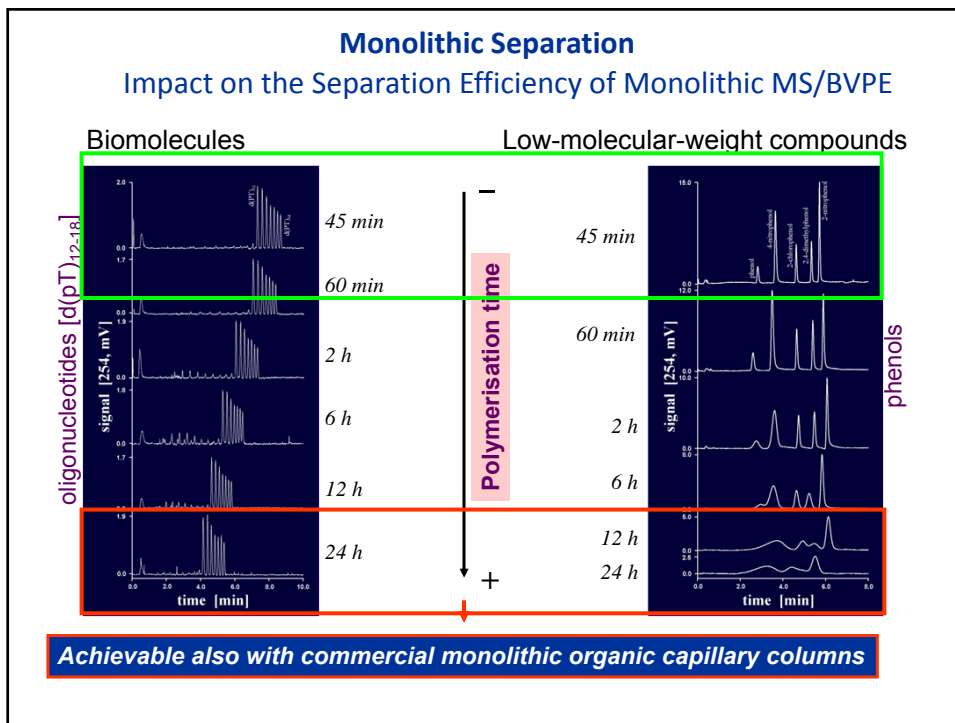
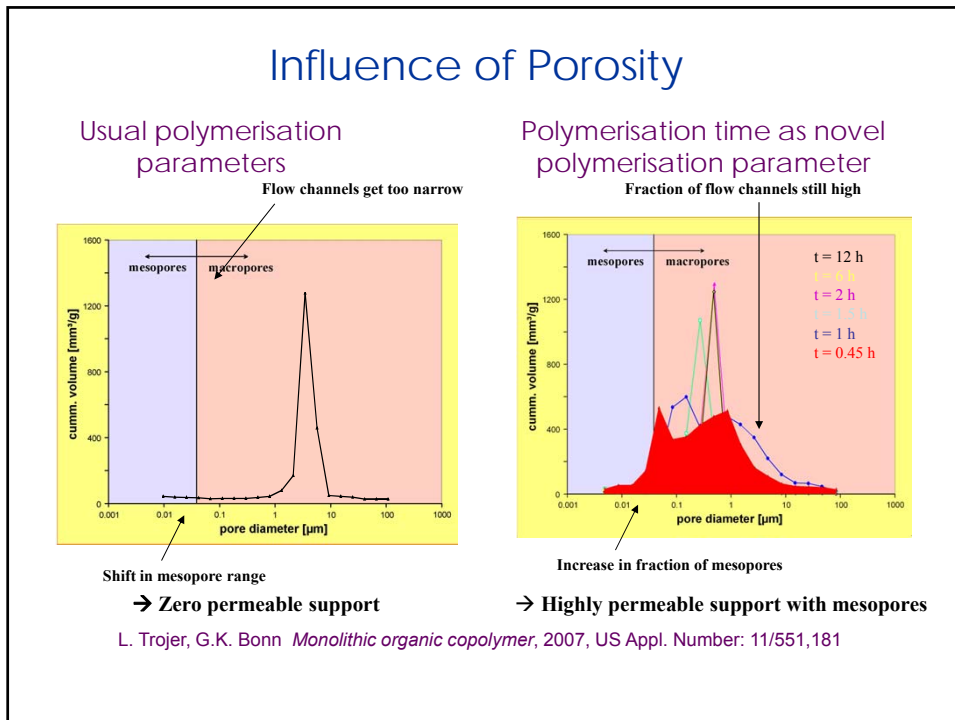


Swift protein separations

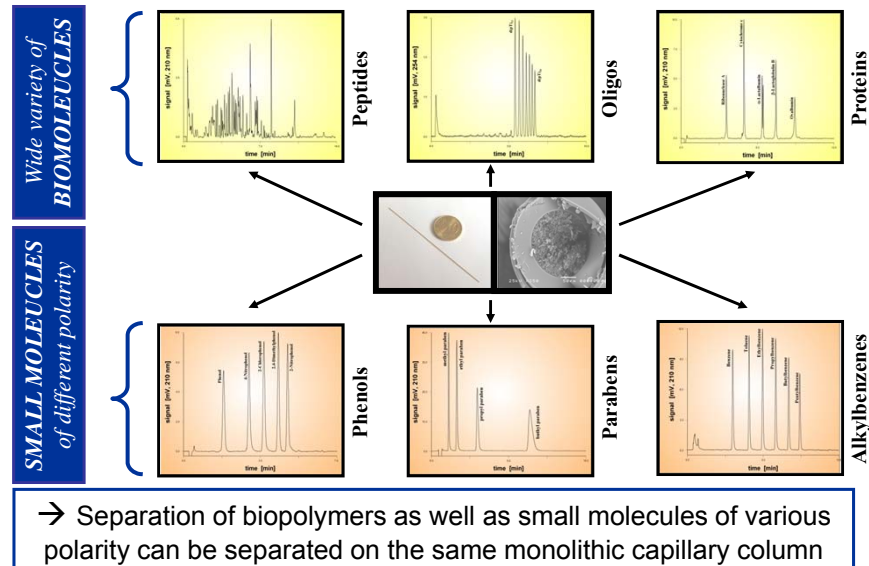
Efficiency towards small biomolecules e.g. peptides, oligonucleotides



→AIM: Combination of high flow characteristics with separation efficiency

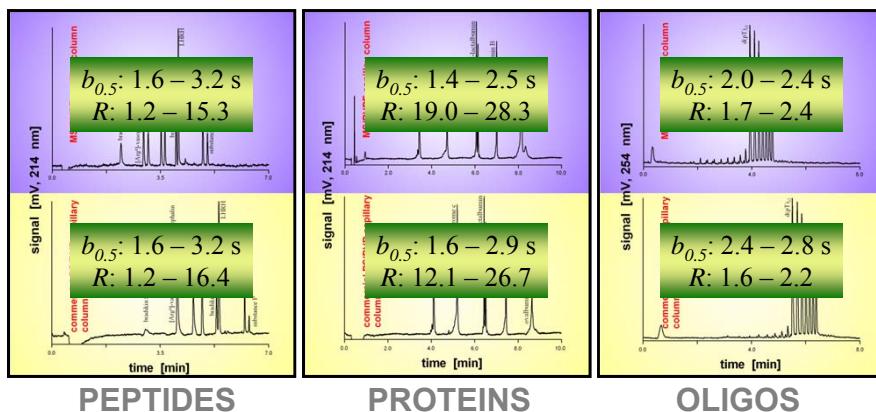


## Extended Applicability of the shortly Polymerised Monoliths



## Comparison to a Commercial Monolithic Styrene Support

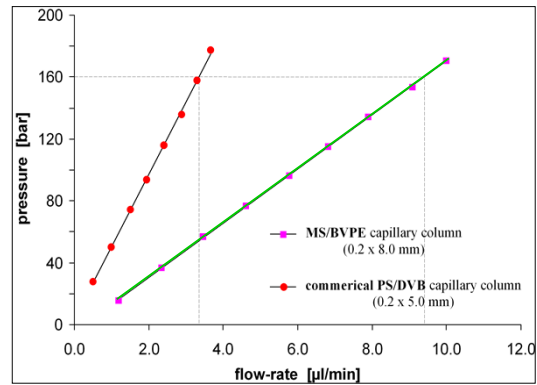
### 1) Separation efficiency in comparison



→ Chromatographic performance comparable to commercial „state of the art“ styrene monoliths

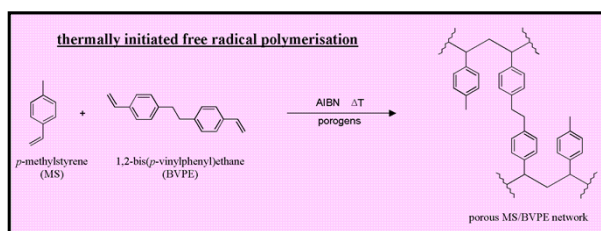
## Comparison to a Commercial Monolithic Styrene Support

### 2) Permeability in comparison

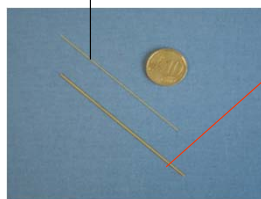


→ Separation efficiency comparable to commercially available supports, but high permeability enables high speed separations

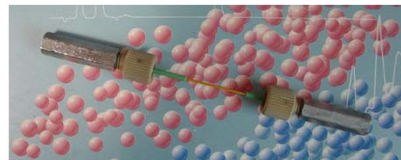
## Monolithic MS/BVPE Capillary Column with Extended Dimension: FABRICATION OF 0.533 mm I.D. COLUMNS



200  $\mu\text{m}$  I.D.



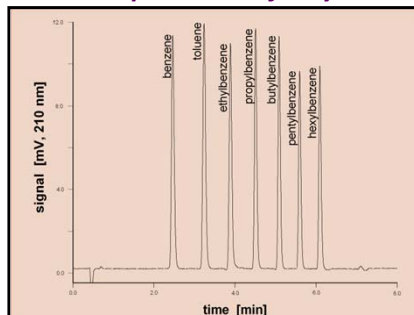
533  $\mu\text{m}$  I.D.



Downscale factor of ~ 7 by reducing  
from 533 to 200  $\mu\text{m}$  I.D.  
→ flow-rate of 533 capillary in  
the range of 50-100  $\mu\text{l}/\text{min}$

## Examples of Separation Efficiency of 0.533 mm I.D. Columns

### Gradient separations of alkylbenzenes



analyte	t <sub>R</sub> [min]	b <sub>0,s</sub> [min]	b <sub>0,s</sub> [sec]	R
benzene	2,472	0,07867	4,600	5,752
toluene	3,253	0,07500	4,500	4,932
ethylbenzene	3,908	0,07333	4,400	5,003
propylbenzene	4,535	0,06867	4,000	4,980
butylbenzene	5,122	0,06500	3,900	4,382
pentylbenzene	5,632	0,06500	3,900	4,322
hexylbenzene	6,135	0,06500	3,900	

#### Chromatographic conditions:

Column: MS/BVPE, 75 x 0.533 mm I.D.,  
 Solvents: A: water, B: ACN,  
 Gradient: 40 % -100 % B in 5 min and  
 100 % B for 1 min,  
 Flow rate: 50 µl/min,  
 Pressure: 120 bar (@ 40 % B),  
 Temperature: RT,  
 Detection: UV 210 nm,  
 Injection: 500 nl, 12.5 ng each alkylbenzene

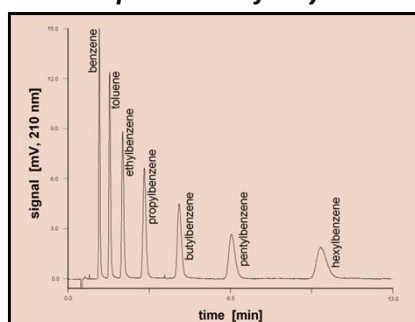
Alkylbenzene sample dissolved  
 in 60 % ACN

Column prepared by a total  
 Polymerisation time of  
 90 min at 65 °C

253

## Examples of Separation Efficiency of 0.533 mm I.D. Columns

### Isocratic separations of alkylbenzenes



analyte	t <sub>R</sub> [min]	b <sub>0,s</sub> [min]	b <sub>0,s</sub> [sec]	N/meter	H [µm]
benzene	1,245	0,05333	3,200	37741	26,50
toluene	1,660	0,07167	4,300	37150	26,92
ethylbenzene	2,182	0,09167	5,500	39235	25,49
propylbenzene	3,048	0,12833	7,700	39065	25,60
butylbenzene	4,448	0,17867	10,600	43896	22,78
pentylbenzene	6,548	0,27500	16,500	39262	25,47
hexylbenzene	10,120	0,44167	26,500	36357	27,51

#### Chromatographic conditions:

Column: MS/BVPE, 75 x 0.533 mm I.D.,  
 Solvents: A: water, B: ACN,  
 Conditions: isocratic at 65 % B,  
 Flow rate: 50 µl/min,  
 Pressure: 95 bar (@ 65 % B),  
 Temperature: RT,  
 Detection: UV 210 nm,  
 Injection: 500 nl, 12.5 ng each alkylbenzene

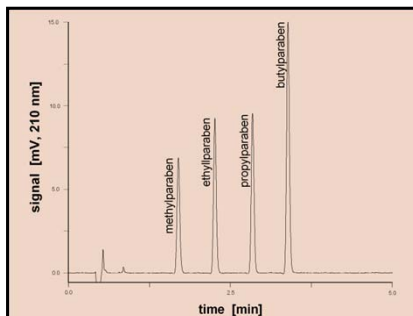
Alkylbenzene sample dissolved  
 in 60 % ACN

Column prepared by a  
 total  
 polymerisation  
 time of  
 90 min at 65 °C

254

## Examples of Separation Efficiency of 0.533 mm I.D. Columns

### Gradient separations of parabens



#### Chromatographic conditions:

Column: MS/BVPE, 75 x 0.533 mm I.D.,  
 Solvents: A: 0.1 % TFA, B: ACN/0.1 % TFA,  
 Gradient: 20 % -90 % B in 5 min and  
 90 % B for 1 min,  
 Flow rate: 50 µl/min,  
 Pressure: 130 bar (@ 20 % B),  
 Temperature: RT,  
 Detection: UV 210 nm,  
 Injection.: 500 nl, 7.5 - 18 ng each paraben

Paraben sample dissolved  
 in 60 % MeOH

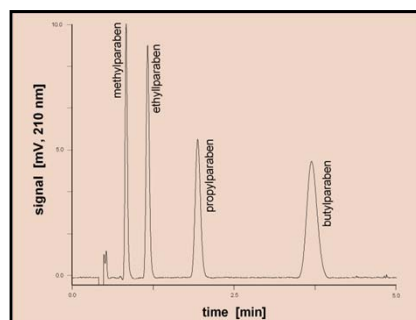
analyte	t <sub>R</sub> [min]	b <sub>0.5</sub> [min]	b <sub>0.5</sub> [sec]	R
methylparaben	1.697	0.05000	3,000	6,396
ethylparaben	2.260	0.04833	2,900	6,726
propylparaben	2.842	0.04833	2,900	6,202
butylparaben	3.388	0.05000	3,000	

Column prepared by a total  
 Polymerisation time of  
 90 min at 65 °C

255

## Examples of Separation Efficiency of 0.533 mm I.D. Columns

### Isocratic separations of parabens



#### Chromatographic conditions:

Column: MS/BVPE, 75 x 0.533 mm I.D.,  
 Solvents: A: 0.1 % TFA, B: ACN/0.1 % TFA,  
 Conditions: isocratic at 35 % B,  
 Flow rate: 50 µl/min,  
 Pressure: 130 bar (@ 35 % B),  
 Temperature: RT,  
 Detection: UV 210 nm,  
 Injection.: 500 nl, 7.5 - 18 ng each paraben

Paraben sample dissolved  
 in 60 % MeOH

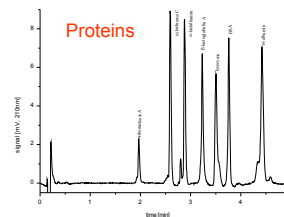
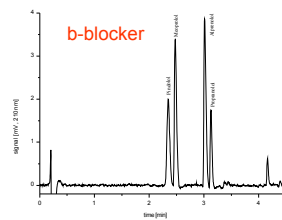
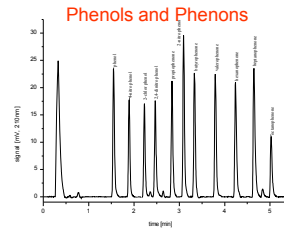
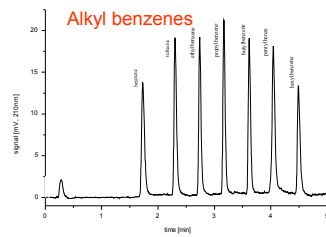
analyte	t <sub>R</sub> [min]	b <sub>0.5</sub> [min]	b <sub>0.5</sub> [sec]	N/meter	H [µm]
methylparaben	0.837	0.04012	2,407	30140	33,18
ethylparaben	1.168	0.05167	3,100	35386	28,26
propylparaben	1.942	0.09110	5,466	31469	31,78
butylparaben	3.703	0.17880	10,728	29702	33,67

Column prepared by a  
 total  
 polymerisation  
 time of  
 90 min at 65 °C

256



## Separation – BVPE - Monoliths



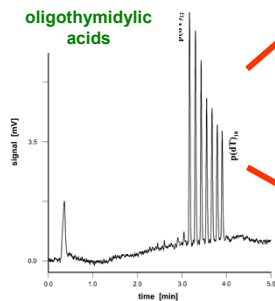
## High-Resolution Separation of dsDNA Fragments

peak width at half peak height:

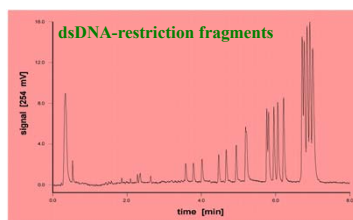
**1.6 – 1.8 sec.**

while still having  
high resolution:

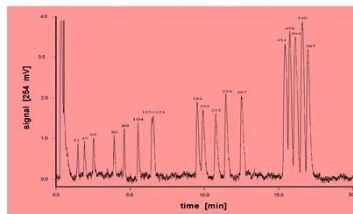
**2.6-2.1**



solvent A: 0.1 M TEAA, pH 7, solvent B: 0.1 M TEAA in 40 % ACN, pH 7, 0-20 % B in 1 min and 20-40 % B in 7, 80x0.2 mm I.D., 8  $\mu$ l/min, 60  $^{\circ}$ C, UV 254, sample: p(dT)<sub>12-18</sub>, ~ 18 fmol each



solvent A: 0.1 M TEAA, pH 7, solvent B: 0.1 M TEAA in 40 % ACN, pH 7, 0-20 % B in 1 min and 20-60 % B in 10 min, 80x0.2 mm I.D., 7  $\mu$ l/min, 50  $^{\circ}$ C, UV 254, sample: pBR322 /HaeIII, ~25 ng total

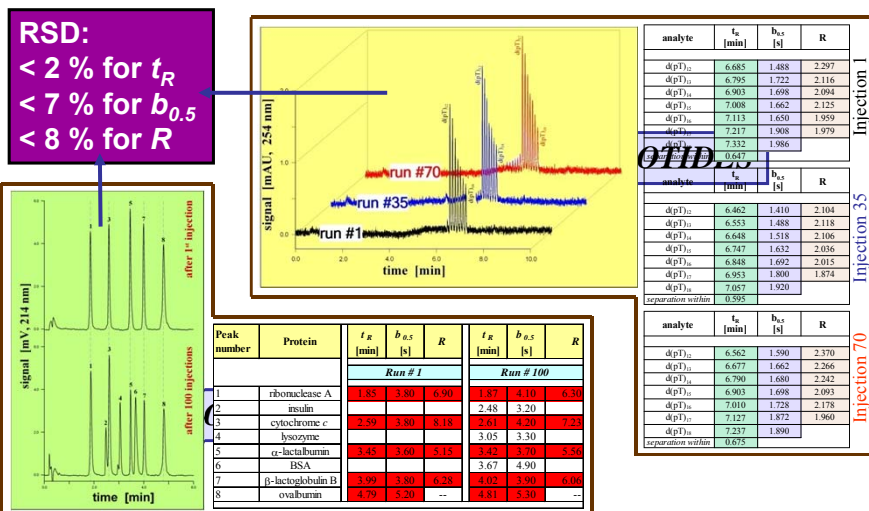


solvent A: 0.1 M TEAA, pH 7, solvent B: 0.1 M TEAA in 40 % ACN, pH 7, 17-25 % B in 5 min and 25-35 % B in 11 min, 80x0.2 mm I.D., 7.5  $\mu$ l/min, 50  $^{\circ}$ C, UV 254, sample: pBR322 /HaeIII, ~25 ng total

## Novel Monolithic Capillary Columns

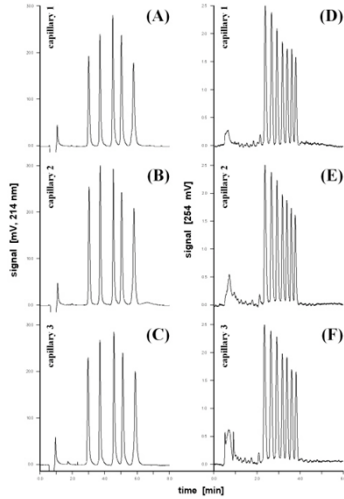
# REPRODUCIBILITY STUDIES

## Run-to-Run and Long-term Stability



→ Stable for at least 100 injections, high run-to-run reproducibility

## Batch-to-Batch Reproducibility

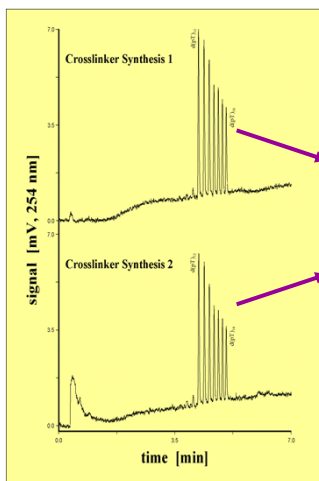


Analyte	Capillary 1			Capillary 2			Capillary 3			Standard deviation [%]		
	$t_R$ [min]	$b_{0.5}$ [s]	$R$	$t_R$ [min]	$b_{0.5}$ [s]	$R$	$t_R$ [min]	$b_{0.5}$ [s]	$R$	$t_R$	$b_{0.5}$	$R$
<b>Proteins</b>												
ribonuclease A	2.99	5.73	4.37	3.02	5.53	4.61	2.96	5.83	4.65	1.14	2.68	3.38
cytochrome c	3.67	5.30	5.53	3.72	5.07	5.78	3.69	5.30	5.78	0.60	2.58	2.68
$\alpha$ -lactalbumin	4.48	5.07	3.36	4.52	4.80	3.52	4.54	5.07	3.42	0.64	3.09	2.27
$\beta$ -lactoglobulin B	5.01	5.90	4.14	5.04	5.57	4.34	5.07	5.97	4.08	0.67	3.69	3.23
ovalbumin	5.77	7.13	--	5.81	7.03	--	5.83	7.17	--	0.55	0.98	--
<b>Oligonucleotides</b>												
d(pT) <sub>2</sub>	2.35	5.11	2.01	2.30	5.30	1.90	2.33	5.60	1.92	1.05	4.72	2.94
d(pT) <sub>3</sub>	2.64	5.13	1.82	2.59	5.50	1.83	2.63	5.50	1.88	0.98	3.94	1.81
d(pT) <sub>4</sub>	2.90	5.07	1.82	2.87	5.00	1.84	2.92	5.33	1.83	0.96	3.44	0.65
d(pT) <sub>5</sub>	3.16	4.83	1.69	3.12	4.67	1.62	3.17	5.00	1.63	1.10	3.45	2.32
d(pT) <sub>6</sub>	3.39	4.67	1.67	3.33	4.60	1.62	3.41	4.87	1.59	1.26	2.95	2.60
d(pT) <sub>7</sub>	3.61	4.53	1.49	3.54	4.50	1.47	3.63	4.87	1.48	1.36	4.38	1.05
d(pT) <sub>8</sub>	3.80	4.53	--	3.72	4.40	--	3.83	4.70	--	1.44	3.31	--

**RSD:**  
 $< 2\%$  for  $t_R$   
 $< 5\%$  for  $b_{0.5}$   
 $< 4\%$  for  $R$

→ High reproducibility of monolith fabrication is given

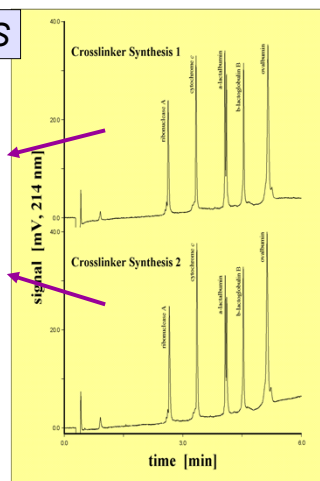
## Reproducibility of the Crosslinker Synthesis

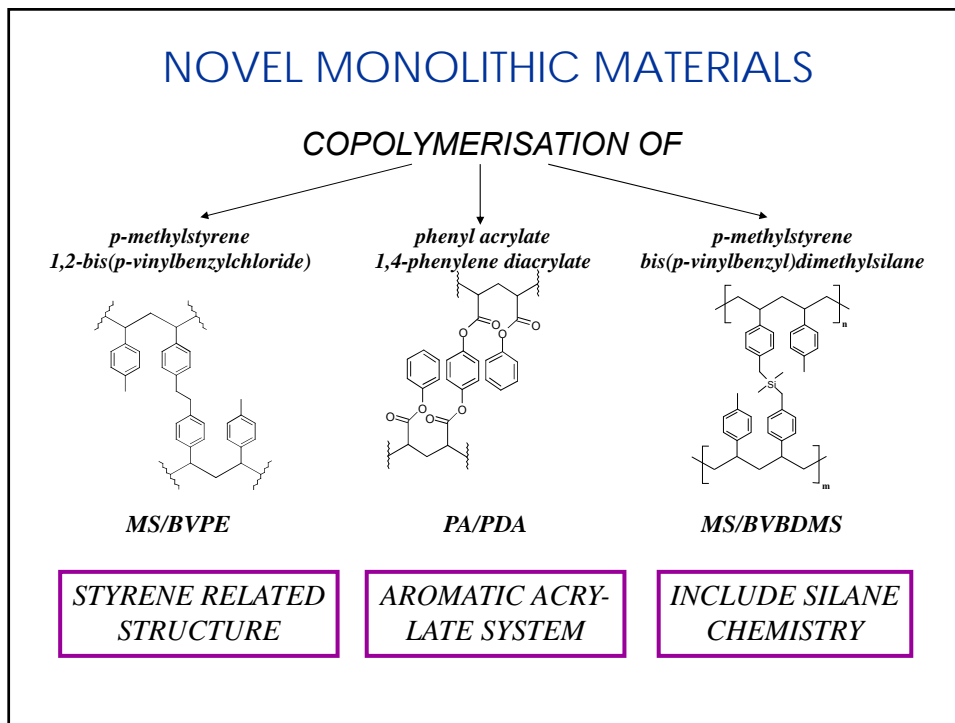
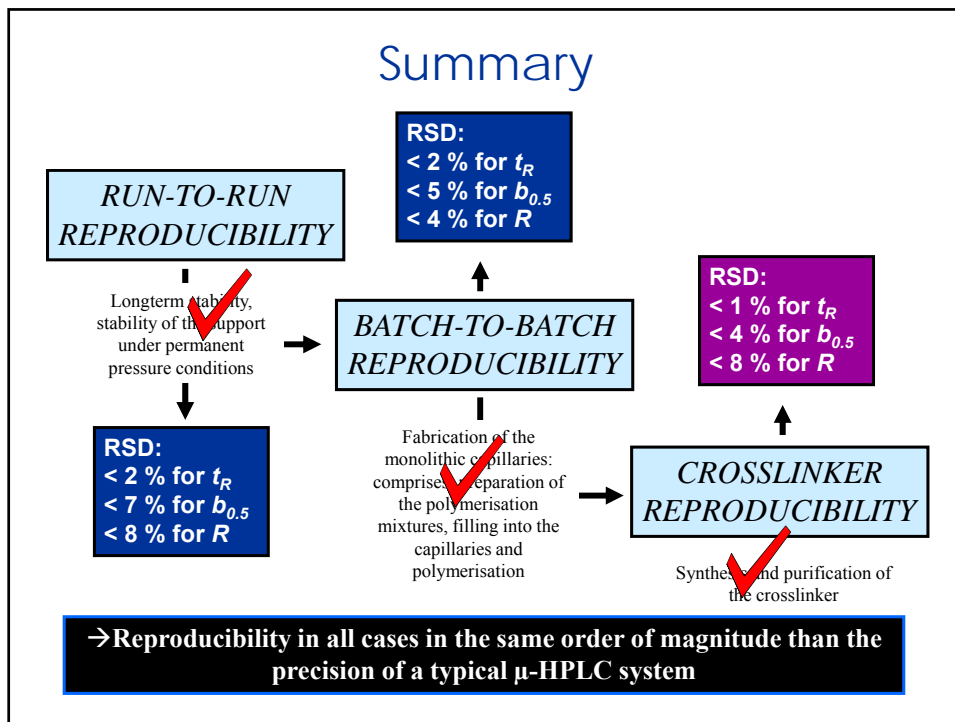


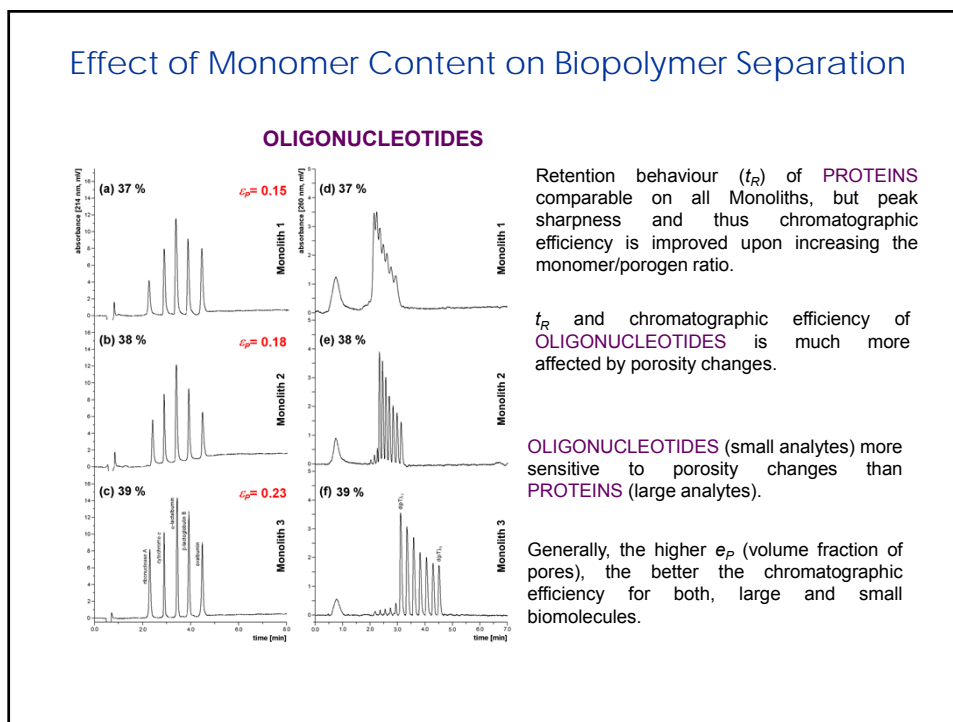
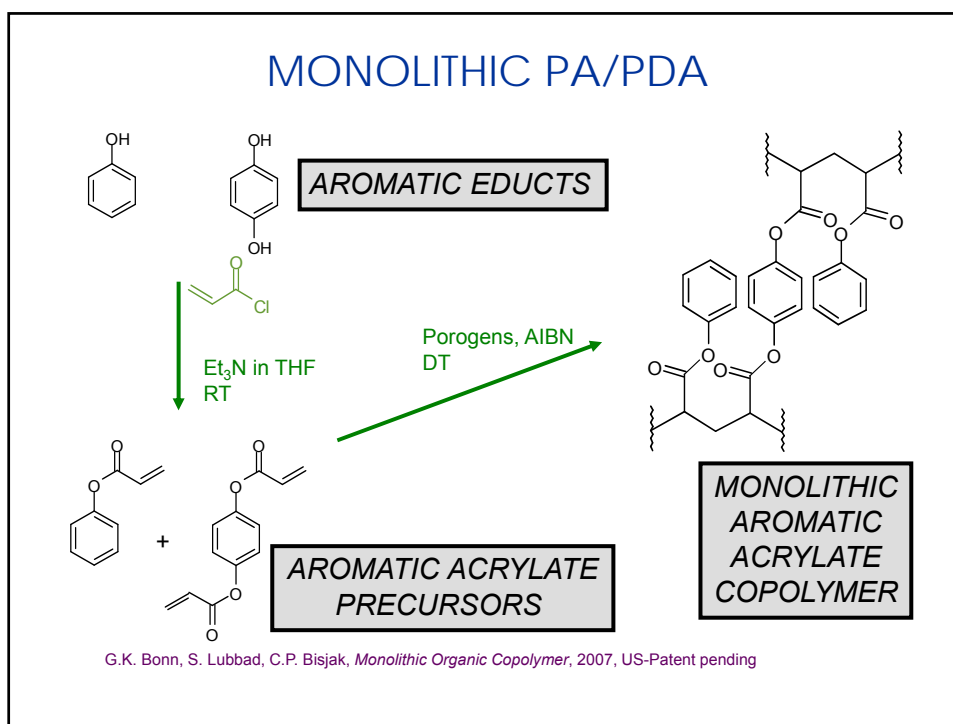
**PROTEINS**

**RSD:**  
 $< 1\%$  for  $t_R$   
 $< 4\%$  for  $b_{0.5}$   
 $< 8\%$  for  $R$

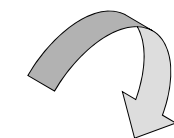
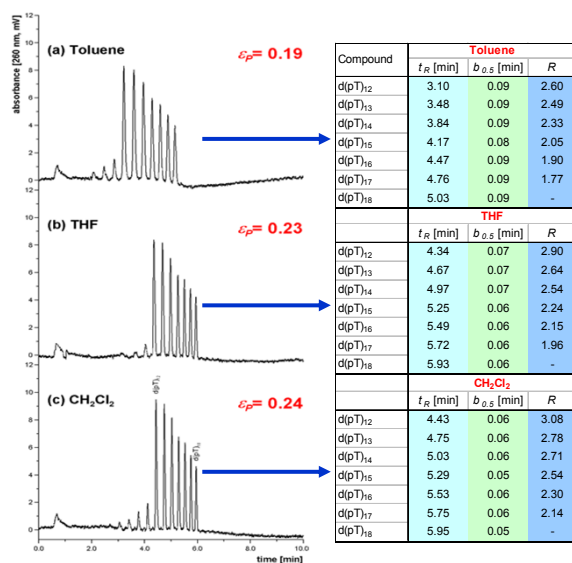
**OLIGOS**







## Effect of Microporogen Nature on Biopolymer Separation



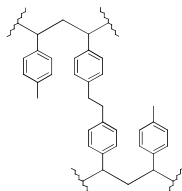
Changing the **MICROPOROGEN NATURE** enables the fabrication of monoliths possessing different porous properties without changing the composition of the polymerisation mixture.

Regarding the separation of **OLIGONUCLEOTIDES**,  $t_R$ ,  $b_{0.5}$  and hence  $R$  are strongly influenced by the nature of the microporogen that is used for monolith synthesis.

## NOVEL MONOLITHIC MATERIALS

### COPOLYMERISATION OF

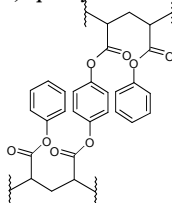
*p*-methylstyrene  
1,2-bis(*p*-vinylbenzylchloride)



MS/BVPE

STYRENE RELATED  
STRUCTURE

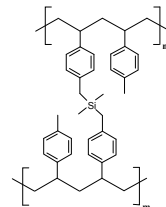
phenyl acrylate  
1,4-phenylene diacrylate



PA/PDA

AROMATIC ACRY-  
LATE SYSTEM

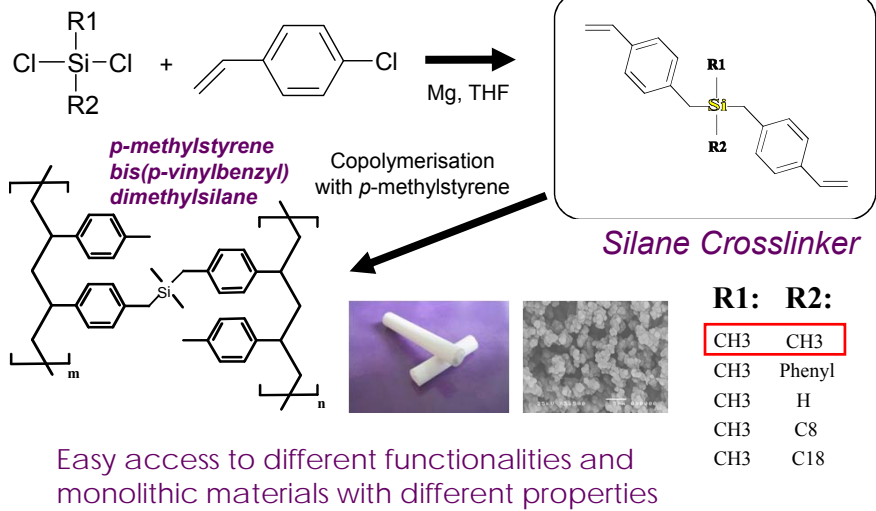
*p*-methylstyrene  
bis(*p*-vinylbenzyl)dimethylsilane



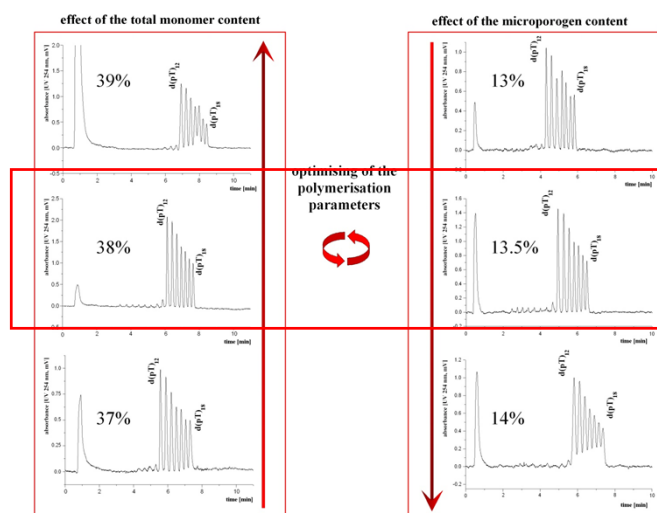
MS/BVBDMS

INCLUDE SILANE  
CHEMISTRY

## MONOLITHIC MS/BVBDMS

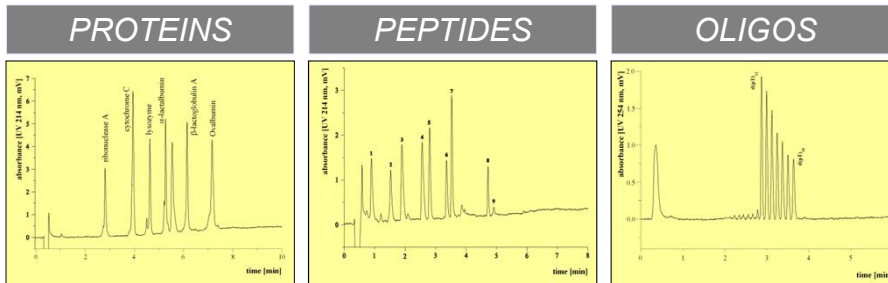


## Effect Regarding Chromatographic Performance



Optimised mixture: 38% (w/w) total monomer content; 13.5% (w/w) microporogen content

## Separation Examples on Optimised MS/BVBDMS



Chromatographic parameters:

$$3.2 \text{ s} < b_{0.5} < 5.2 \text{ s}$$

$$2.3 < R < 10.0$$

$$2.8 \text{ s} < b_{0.5} < 4.8 \text{ s}$$

$$1.8 < R < 14.0$$

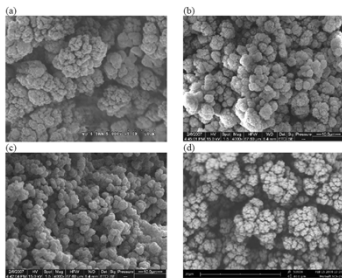
$$2.3 \text{ s} < b_{0.5} < 3.8 \text{ s}$$

$$1.7 < R < 1.8$$

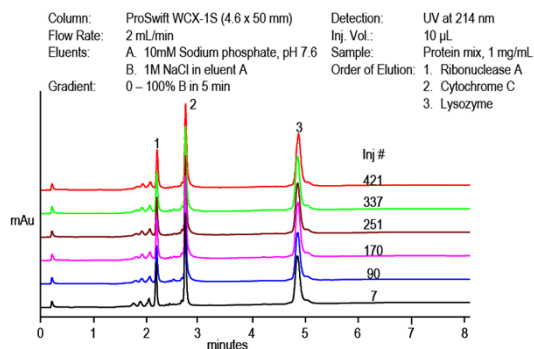
→ High efficiency towards a wide variety of biomolecules

## Ion Exchange Monolithic Columns from Dionex for Biomolecule Analysis

### SEM Pictures



- (a) ProSwift WAX-1S (5000x),  
 (b) ProSwift SAX-1S (4000x),  
 (c) ProSwift WCX-1S (4000x),  
 (d) ProSwift SCX-1S (5000x)

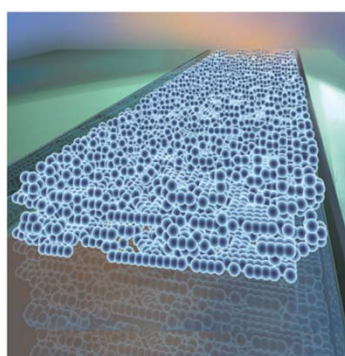




## Ion Exchange Monolithic Columns from Dionex for Biomolecule Analysis

Parameter	ProSwift WAX-1S		ProSwift WCX-1S		ProSwift SAX-1S		ProSwift SCX-1S
Column dimension	4.6x50 mm	1x50 mm	4.6x50 mm	1x50 mm	4.6x50 mm	1x50 mm	4.6x50 mm
Base Matrix Material	Polymethacrylate						
Surface chemistry	Tertiary amine		Carboxylic acid		Quaternary amine		Sulfonic acid
Protein binding capacity per mL of polymer	18 mg/mL BSA	18 mg/mL BSA	23 mg/mL Lysozyme	23 mg/mL Lysozyme	18 mg/mL BSA	18 mg/mL BSA	30 mg/mL Lysozyme
Protein binding capacity per column	13 mg BSA	0.7 mg BSA	16 mg Lysozyme	0.9 mg Lysozyme	13 mg BSA	0.7 mg BSA	21 mg Lysozyme
Bed Height	44 mm	50 mm	42 mm	50 mm	45 mm	50 mm	42 mm
Bed volume	0.73 mL	0.039 mL	0.70 mL	0.039 mL	0.75 mL	0.039 mL	0.70 mL
pH Range	2 - 12						
Recommended Flow rate	0.5 - 1.5 mL/min	0.05 - 0.25 mL/min	0.5 - 1.5 mL/min	0.05 - 0.20 mL/min	0.5 - 1.5 mL/min	0.05 - 0.25 mL/min	0.5 - 1.5 mL/min
Maximum Flow rate	2 mL/min	0.30 mL/min	2 mL/min	0.25 mL/min	2 mL/min	0.3 mL/min	2 mL/min
Operating pressure	< 500 psi 3.4 MPa	< 1500 psi 10.4 MPa	< 500 psi 3.4 MPa	< 1000 psi 6.9 MPa	< 500 psi 3.4 MPa	< 1500 psi 10.4 MPa	< 500 psi 3.4 MPa
Maximum Pressure	1000 psi 6.9 MPa	2000 psi 13.8 MPa	1000 psi 6.9 MPa	2000 psi 13.8 MPa	1000 psi 6.9 MPa	2000 psi 13.8 MPa	1000 psi 6.9 MPa
Temperature	60 °C				70 °C		60 °C
Solvent Compatibility	Most common organic solvents						

## Microchip with Particular Column Bed

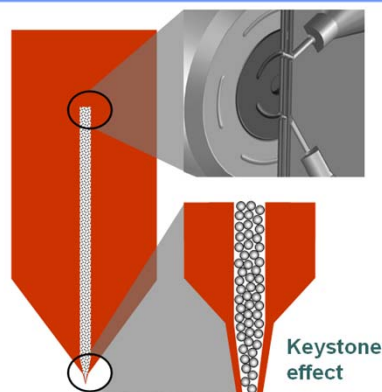


Microchannel slurry packed with spherical particles



Wirth, Anal. Chem. 79 (2007) 801

Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, University of Innsbruck



35 µm o.d. electro spray tip

Three-layer, laminated polyimide microchip, channel 50 µm depth, 75 µm width, 50-150 mm length

Yin, J. Sep. Sci. 30 (2007) 1427



P-2701-W  
HPLC'08

## Monolithic Separation Media in Agilent's HPLC-Chips

Karla M. Robotti<sup>1</sup>, Hongfeng Yin<sup>1</sup>, Reid Brennen<sup>1</sup>, Kevin Killeen<sup>1</sup>, Lukas Trojer<sup>2</sup>, Günther Bonn<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA; <sup>2</sup> Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Germany;  
<sup>3</sup> Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, Leopold-Franzens University, Innsbruck, Austria

Agilent Technologies

The standard HPLC chip and HPLC chip cube with mass spectrometer

### Monolithic MS/BVPE Chip Columns

Chip wall + Methyl styrene (MS) + 1,2-bis(vinylphenyl)ethane Crosslinker (BVPE) monomers

Free Radical Polymerization

AIBN Porogens (decanol/toluene)  $\Delta T$

### Agilent HPLC-MS Chip System: TOF MS - proteins

Separation Column – 75  $\mu\text{m}$ , 43 mm L, monolith L1  
 Enrichment Column – 40 nl, monolith L1

Proteins: ~30 – 150 fmol/ $\mu\text{l}$

Chromatographic Conditions:  
 Solvent A: 0.1% FA; Solvent B: 0.1% FA in ACN; Cap pump: 4  $\mu\text{l}/\text{min}$  @ 98% solvent A  
 Injection Volume: 1  $\mu\text{l}$ ; Loading Flush-volume: 3  $\mu\text{l}$ ; Nano pump: 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; Gradient: 2-70% B in 12 min

# Thermodynamics and Kinetics of LC

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ELSEVIER

ScienceDirect

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

Journal of Chromatography A, 1168 (2007) 101–168

www.elsevier.com/locate/chroma

Review

## Monolithic columns in high-performance liquid chromatography

Georges Guiochon<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996-1600, USA  
<sup>b</sup> Division of Chemical Sciences, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN 37831-6120, USA

Available online 3 June 2007

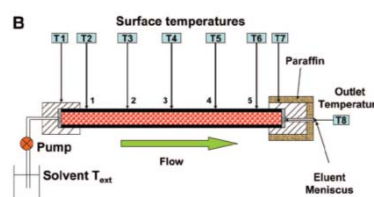
Experimental and theoretical studies of chromatographic processes.

Georges Guiochon

## Thermodynamics and Kinetics of LC

### Studying the different aspects of thermodynamics and kinetics of LC:

- measure single-component and competitive equilibrium isotherms
- study of the surface heterogeneity of adsorbents
- analysis of different parameters of the mass transfer kinetics and investigate the mechanisms involved, e.g., pore and surface diffusion
- study of elution band profiles of compounds from their equilibrium isotherms and mass transfer kinetics
- Measurement of the axial and radial temperature profiles of a chromatographic column; influence of thermal insulation on column efficiency



## Conclusion - Monoliths

- Novel monolithic materials present reliable separation platforms for HPLC, since they offer high mechanical stability and minimised swelling properties.
- Careful development of the support porosity results capillary columns with enhanced hydrodynamic properties and separation efficiency
- Introduction of polymerisation time as novel polymerisation parameter offers a simple and effective tool to control mesoporosity of organic monoliths
- Adjusting meso- and macroporosity among each other widens up the field of applicability of organic monoliths
- Organic monoliths are excellent for SPE and bioreactor material

→ **Proteomic, Genomic as well as Metabolomic studies on one monolithic HPLC column!**

# Overview

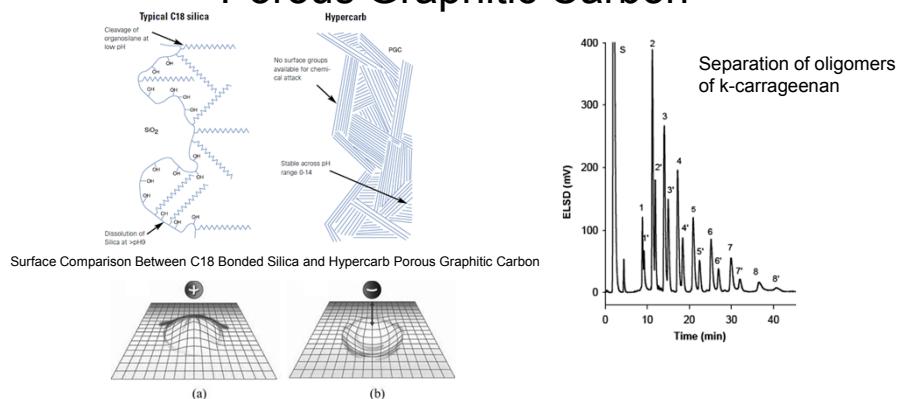
## Characterisation by chemistry

Silica-based (oxides)

Organic  
polymer-based

others  
e.g. carbon

## Porous Graphitic Carbon



Surface Comparison Between C18 Bonded Silica and Hypercarb Porous Graphitic Carbon

Schematic representation of polar analyte retention in which (a) positive charge and (b) negative charges approach the graphite surface, resulting in a charge-induced dipole at the graphite surface

M.T. Gilbert, J.H. Knox and B. Kaur. **Porous glassy carbon, a new columns packing material for gas chromatography and high-performance liquid chromatography**, *Chromatographia* 16(1982), 138-146  
 Pereira L, **Porous Graphitic Carbon as a Stationary Phase in HPLC: Theory and Applications** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31 (2008) 1687-1731.

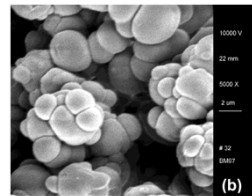
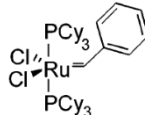
## Special Polymerization Techniques

Ring opening metathesis polymerisation (ROMP) of norborn-2-ene and 1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-1,4,5,8-exo,endo-dimethanonaphtalene initiated by a Grubbs type catalyst.

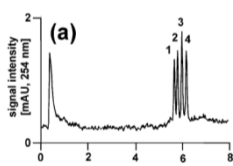
### Monomers



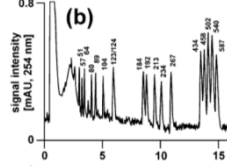
### Initiator



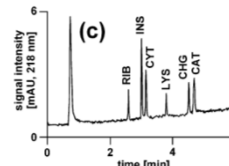
### oligodeoxynucleotides



### double-stranded DNA fragments



### proteins

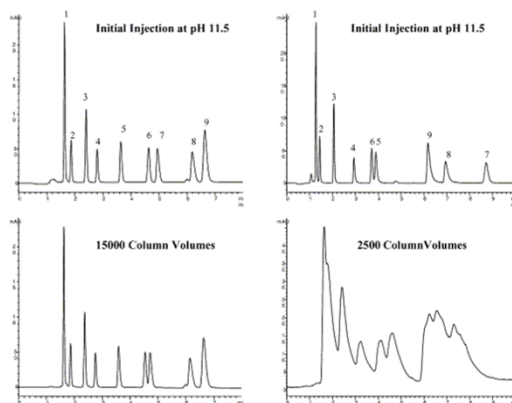


B. Mayr, G. Holzl, K. Eder, M.R. Buchmeiser, C.G. Huber. *Anal. Chem.* (2002), 74, 6080–6087.

## Metal-Oxides

### Titania, Zirconia, Alumina

#### Column Life Comparison for B-Blockers



J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick and P. W. Carrd,  
*Journal of Chromatography A* Vol. 1028, Issue 1 (2004), 1-30

### Advantages

- Extremely high thermal stability
- High stability at all pHs

- Reversed phases commercially available (with different to siliceous supports chemistry)
- Well understood chemistry of zirconia's surface (surface chemistry of alumina and titania seems to be similar)
- Similar (PBD-modified oxides vs. ODS silica) selectivity for non-electrolytes
- Allow for a development of high temperature, organoclass mobile phase, fast HPLC
- Selectivity tunable by choice of buffer type

- Very different selectivity compared to silica for basic and acidic compounds

### Disadvantages

- Available in limited selection of surface areas and pore sizes
- Very different surface chemistry than that of silica especially Lewis acid interactions
- Alumina and titania—relatively unexplored for HPLC

- Lack of commercially available reversed phase for titania

- Must have hard Lewis in eluent to separate carboxylic acids or else get no elution or extreme tailing
- Few manufacturers

- Effective use requires "unlearning" much knowledge based on silica chemistry

M. Fischnaller, O. Lutz

## 1. Umkehrphasen-HPLC von Phenolen

### 1. Theoretische Grundlagen

Von Umkehrphasen-Chromatographie spricht man immer dann, wenn die stationäre Phase weniger polar ist als die mobile Phase. Die am häufigsten verwendete stationäre Phase sind chemisch gebundene Octadecylketten auf Kieselgel (C18-Säule). Im Praktikumsbeispiel werden Octylketten an Kieselgelketten gebunden (C8-Säule) verwendet.

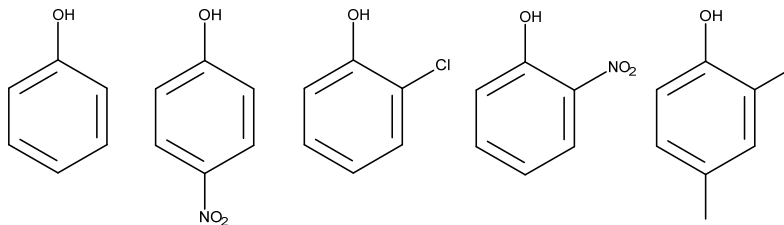


Mit Octadecylketten bzw. mit Octylketten derivatisiertes Kieselgel als stationäre Phasen in HPLC Säulen.

M. Fischnaller, O. Lutz

## 1. Umkehrphasen-HPLC von Phenolen

Chlor- und Nitrophenole entstehen als Neben- oder Endprodukte bei der Synthese von organischen Verbindungen als Schadstoffe und müssen insbesondere in Wässern bestimmt werden. Als analytische Trennmethode eignen sich die Gaschromatographie oder die Flüssigkeitschromatographie an Umkehrphasen mit UV-Detektion.

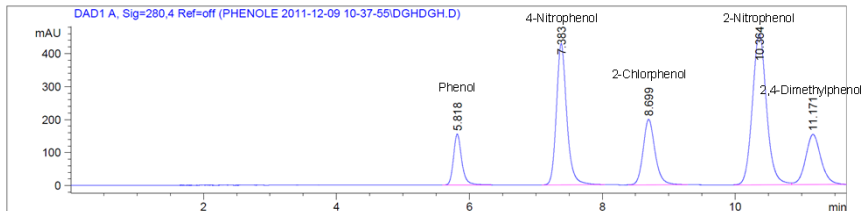


Phenol, 4-Nitrophenol, 2-Chlorphenol, 2-Nitrophenol, 2,4-Dimethylphenol

M. Fischnaller, O. Lutz

### 1. Umkehrphasen-HPLC von Phenolen

Das folgende Chromatogramm zeigt die Trennung phenolischer Verbindungen mittels Umkehrphasenchromatographie.



#### Lernziele

Ermittlung der Trennleistung einer HPLC-Säule anhand einer Standardmischung, Berechnung chromatographischer Kenngrößen aus dem Chromatogramm, Identifizierung chromatographisch getrennter Peaks anhand der Kapazitätsfaktoren. Herstellung von Kalibrierstandards, Erstellung einer Kalibriergrade, quantitative Analyse der Probelösung nach der Methode des externen Standards, Auswertung und Statistik.

M. Fischnaller, O. Lutz

### 1. Umkehrphasen-HPLC von Phenolen

#### Aufgaben und Arbeitsvorschrift

Messung bzw. Berechnung der **Retentionszeiten**  $t_r$ , der **Retentionsfaktoren (Kapazitätsfaktoren)**  $k'$ , der Halbwertsbreiten  $b_{1/2}$  und der Zahl der **theoretischen Böden**  $N$  der einzelnen Substanzen aus dem Chromatogramm (isokratisch!). Die Säulentotzeit wird durch Injektion von Thioharnstoff bei einer Laufmittelzusammensetzung von 90% B bei einem Fluss von 1 mL/min gemessen (drei Injektionen (Detektion bei 250 nm). In drei Versuchen wird eine Laufmittelzusammensetzung ermittelt, sodass die fünf Standardsubstanzen mit  $k$ -Werten zwischen 1 und 5 eluieren. 2  $\mu$ l des Standardgemisches werden injiziert. Die Retentionszeiten bzw. Retentionsfaktoren werden in einer Tabelle zusammengefasst. Bei optimierter Laufmittelzusammensetzung wird das Gemisch dreimal unter gleichen Bedingungen getrennt und analysiert.

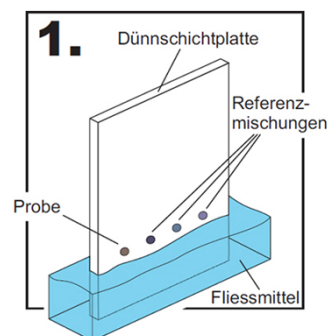
Zur **qualitativen Analyse** werden die Einzelsubstanzen analysiert und deren Kapazitätsfaktoren berechnet. In gleicher Weise wird die zu analysierende Probe untersucht und die enthaltenen Phenole anhand ihrer Retentionsfaktoren ( $k$ ) identifiziert. Zur **quantitativen Analyse** werden aus den Stammlösungen Kalibrierlösungen hergestellt, die alle fünf Phenole enthalten (mit Eluent auffüllen). Die Kalibriergerade wird aus jeweils drei Injektionen ermittelt und es wird eine Regressionsgerade berechnet. Aus drei Injektionen der Probelösung wird die Konzentration der Phenole ermittelt

# Dünnschichtchromatographie

## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

### Motivation:

- geringer apparativer Aufwand (billig)
- geringer Zeitaufwand
- hohe Trennleistung
- niedrige Nachweisgrenzen
- hohe Selektivität des Nachweises



### Charakteristische Merkmale:

Trennstrecke besteht aus dünner Schicht stationärer Phase, die sich auf einer geeigneten inerten Unterlage (Glas, Alu-, Plastikfolie) befindet. Die Trennung erfolgt näherungsweise in zweiter Dimension.



## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

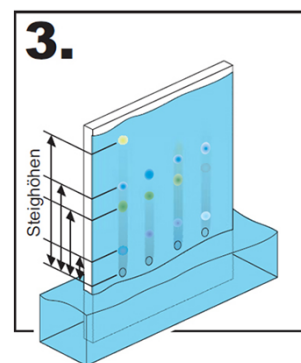
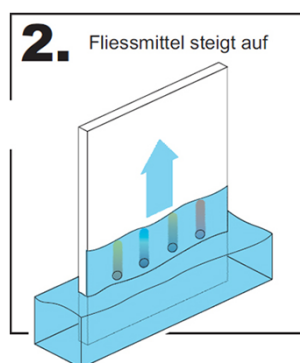
### Chromatographisches Arbeiten erfordert folgende Schritte:

- Aufbringen der Probe
- Entwickeln des Chromatogramms (mobile Phase wandert)
- Nachweis der getrennten Substanzen (Detektion)

### Jedes chromatographisches System besteht aus:

- der mobilen Phase
- der stationären Phase
- dem zu trennenden Substanzgemisch

## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)



- Bezüglich **Trennmechanismen:** am häufigsten Adsorption, Verteilung (ev. auch Ionenaustausch)
- **Anwendungsmöglichkeiten:** analytisch, mikropräparativ (100 mg Maßstab)
- für Trennung größerer Stoffmengen nur wenig geeignet

## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

**Vorteile der DC gegenüber klassischen Methoden zur Stofftrennung** (Fällen, Kristallisieren, Destillieren, Sublimieren, Extrahieren):

- höhere Trennschärfe
- größere Empfindlichkeit
- geringerer Zeitaufwand
- manchmal einfachere Durchführbarkeit

Verhalten von Substanzen in einem gegebenen chromatographischen System → **spezifische Substanzeigenschaft** (Wechselwirkung Analyt-stationäre- und mobile Phase); geeignet zur Charakterisierung und Identifizierung von Substanzen (bzw. Identitätsprüfung)

## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

### Sorbentien in der Dünnschichtchromatographie

- Kieselgel
- Aluminiumoxid (basisch, neutral, sauer)
- Kieselgur
- Polyamid (Nylon, Perlon)
- Cellulose
- Acetylierte Cellulose
- Dextrangele
- Stärke

### Bezeichnung

- G: mit  $\text{CaSO}_4$  (~13%)
- H: ohne Bindemittel
- F: mit Fluoreszenzindikator
- P: für präparative Chromatographie
- R: besonders gereinigt (z.B. für quant. *in situ*

Auswertung)

Zahlenangaben: mittlerer Porendurchmesser in Å  
(z.B. Typ 60 ..... 60 Å)



## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

### Sorbentien in der Dünnschichtchromatographie

Adsorptionskraft des Sorbensmaterials → **Aktivität**

hängt ab von:

- Teilchengröße (kleine Teilchen → große spezifische Oberfläche (z.B. Kieselgel 60: 500 m<sup>2</sup>/g); in DC ca. 0.5-25 µm
- Zahl und Durchmesser der Kanäle (Poren), die bei der Herstellung entstehen
- Wassergehalt des Sorbens
- Herstellung der Schichten: heute prakt. nur mehr industriell

## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

### Mobile Phase (Fließmittel oder Laufmittel)

#### Fließmittel-Auswahl

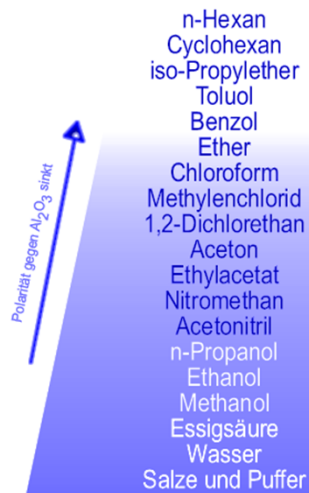
Lösungsmittel mit definierter Reinheit und definiertem Wassergehalt verwenden (p.A.-Qualität)

#### Methodenentwicklung

- Struktur der Probenmoleküle bekannt → Abschätzung der Polarität  
→ Abschätzung der erforderlichen Elutionskraft
- Reihung der Lösungsmittel nach steigender Elutionskraft in Verbindung  
mit einem bestimmten Sorbens, → **elutrope Reihe**
- unbekannte Eigenschaften der Analysensubstanz → Auswahl des Fließmittels durch „Versuch und Irrtum“

## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

### Elutrope Reihe



## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

### Auftragen der Substanzen

Etwa 5 - 20  $\mu\text{g}$  Substanz in einem Lösungsmittel, das die Substanz gut löst: z.B. Aceton, Methanol, Ethanol, Dichlormethan  
0.1 - 5%ige Lösungen, 2 - 20  $\mu\text{l}$  mit Mikropipetten, Mikroliterspritzen  
Belastbarkeit: 10-5 g/g Sorbens

- Entwicklung des Chromatogramms erst nach völligem Abdunsten des zum Auftragen verwendeten Lösungsmittels
- punktförmiges Auftragen: v.a. in analytischer DC
- strichförmiges (bandförmiges) Auftragen: v.a. in präparativer DC
- Fleckenform und -größe beeinflussen Ergebnis der Trennung

## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

### Detektion

Detektion durch:

- Fluoreszenzmarker
- UV-Licht (setzt voraus, dass Verbindungen UV-aktiv sind d.h. konjugierte Doppelbindungen C=C, Aromaten,...)
- Derivatisierung (wenn Substanzen nicht UV-aktiv oder färbig sind) z.B. Ninhydrin
- Anfärbereagenzien (Aufsprühen, Bedampfen, Eintauchen,...)



## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

### Charakterisierung des Migrationsverhaltens

- $R_F$ -Wert
- $R_{St}$ -Wert ( $R_{St}$ -Wert)

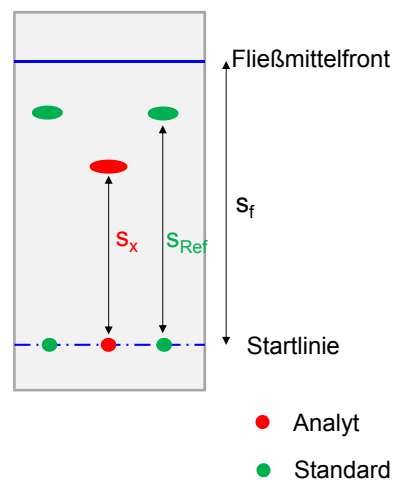
$$R_F = \frac{s_x}{s_f}$$

$$R_{St} = \frac{s_x}{s_{Ref}}$$

$R_F$ -Wert immer zwischen 0 und 1

$R_X$ -Wert auch > 1 möglich

$hR_F$ -Wert =  $R_F$ -Wert x 100



## Dünnschichtchromatographie (DC) Thin-Layer Chromatography (TLC)

### Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

Schichtdicke	0,19 mm
Fleckdurchmesser	0,3 - 0.5 mm
Teilchen	5 $\mu\text{m}$
Trennstufenzahl	ca. 3 x DC
Trennstrecke	1 – 3 cm
Entwicklungszeit	2 – 3 min
Nachweisgrenze	0,5 – 5 ng (DC: 5 – 50)



→ kleinere Korngröße, engere Korngrößenverteilung, homogenere Schichtdicke, Automatisierbarkeit!

**A. Adsorptions-Dünnschicht-Chromatographie**

Fließrichtung der mobilen Phase

mobile Phase  
stationäre Phase

Start chromatographische Trennstrecke Ziel

**B. Elutionswirkung verschiedener Laufmittel**

Hexan  
Tetrachlorkohlenstoff  
Benzol  
Dichlormethan  
Trichlormethan (+ 1% Ethanol)

Zunehmende Elutionswirkung der Laufmittel

**C. Elutionsstärke in einem Laufmittelgemisch**

Diethylether in Hexan

**D. Dreieck-Schema zur Auswahl des Adsorptionsmilieus**

stationäre Phase: hoch I, polar, Aktivität, niedrig V, unpolar  
mobile Phase: unpolar, polar, Laufmittel, Substanzgemisch

**E. Durchführung einer DC-Trennung**

Deckel  
Glasplatte  
Schicht  
Kammer  
Startlinie  
Probeflecken  
Fließmittel

**F. Entwicklungskammern**

1. Flachboden-Kammer  
2. Doppeltrog-Kammer  
3. Sandwich-Kammer  
4. Linearkammer

Glasplatte  
HPTLC-Platte  
Glasplatte  
Laufmittel

**G. Rf-, R<sub>st</sub> und R<sub>m</sub>-Werte**

$R_m = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right)$

$x = C_n$

**I. Fleckeneindringtiefen in Abhängigkeit vom Rf-Wert**

**H. Entwicklungstechniken**

Zirkuläre Entwicklung      Antizirkuläre Entwicklung

**J. Automatisches Probenauftragen**

**K. Tauchkammer zum Einsatz von Reagenzien**

**Kamillenblüten, Rathauspothek, Versuch 1, 08.03.2006**

Droge: Charnomillae recutita  
 Platte: Kieselgel 60  
 Fließmittel: 95VT Toluol + 5VT Ethylacetat  
 Laufstrecke: 11,7cm  
 Tauchreagenz: Anisaldehyd  
 Detektion: Tageslicht

— Chamomillen (Standard) RF: 0,70  
 — Farnesol RF: 0,70  
 — Bornylacetat (Standard) RF: 0,31 und 0,26  
 — Epi-Isoborneol (trans-is) RF: 0,22  
 — Bisabolol (Standard und Probe) RF: 0,15  
 — Terpenalkohol RF: 0,10  
 — Bisabololendiol A/B RF: 0,10

**Modifikation der Auftragemenge; Flavonoide; Versuch 9; 10.03.2006**

Droge: Charnomillae recutita  
 Platte: HPTLC Kieselgel 60  
 Fließmittel: 67VT Ethylacetat, 18VT Wasser, 7,5VT Ameisensäure 98-100%, 7,5VT wasserfreie Essigsäure  
 Laufstrecke: 7cm  
 Tauchreagenz: 1) Naturstoffreagenz  
 2) Macrogol 400-Lsg.  
 Detektion: 366nm

— Kaffeesäure + Ferulasäure  
 — Apigenin  
 — Apigenin-7-O-glucosid  
 — Hyperosid  
 — Chlorogenin  
 — Rutosid

## SPE

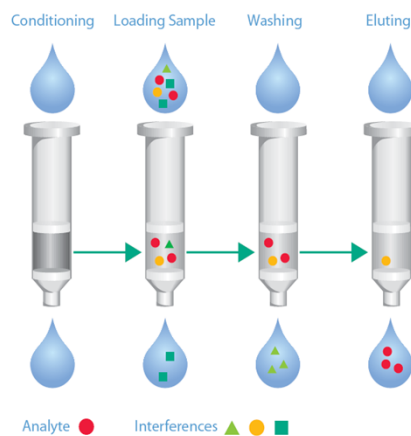
- Nonequilibrium, exhaustive removal of chemical constituents from a flowing liquid sample via retention on a contained solid sorbent and subsequent recovery of selected constituents by elution from the sorbent

M.J.M. Wells, Essential guides to method development in solid-phase extraction, in I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, and C.F. Poole, eds., *Encyclopedia of Separation Science*, Vol. 10, Academic Press, London, 2000, pp. 4636-4643.

### Optimization

- Condition
  - Solvent
  - Volume
- Load
  - Volume
  - Break-through
- Wash
  - Volume
  - Wash solvent selection
  - Break-through
- Elute
  - Volume
  - Elution solvent selection
  - Percent recovery

#### SPE Process







Nernst distribution coefficient

## Sorbents

- Strong affinity = large  $K_D$

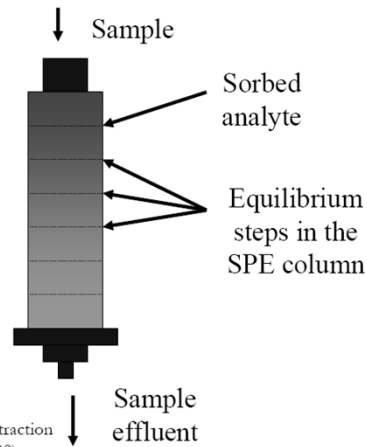
$$K_D = \frac{[A]_{\text{solid phase/ solid supported liquid}}}{[A]_{\text{aq}}}$$

← Konzentration des Analyten in der stationären Phase  
← Konzentration des Analyten in der mobilen Phase

- Digital chromatography: all-or-nothing
- LC mechanism to extremes
  - Infinity  $K_D$  during retention
  - Zero  $K_D$  during elution

## Plate Theory and RP-SPE

- Series of equilibrations occur (batches),  $K_d$  is very large
- Typical SPE contains only 20 plates or less (10,000 plates for HPLC)
- Not for separation, but for simple isolation of analytes in an on/off mode



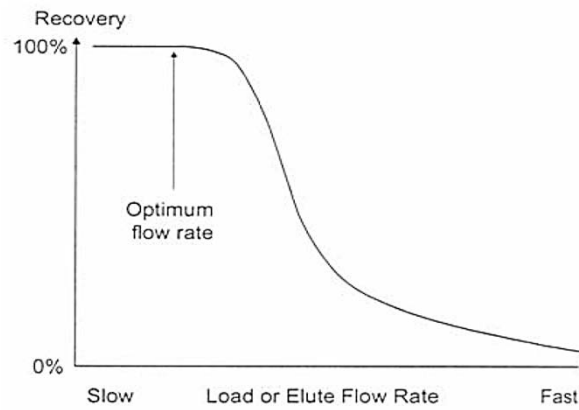
Ref.: E.M. Thurman, and M.S. Mills, "Solid-Phase Extraction Principles and Practice," John Wiley & Sons, Inc. (1998)

4

## Parameters Affecting N

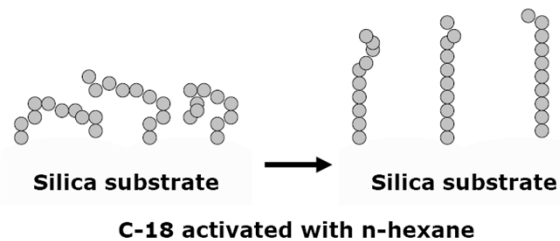
- Flow rate
- Particle size and plate number
- Column length
- Temperature

### Relationship Between Sample Recovery and Flow Rate in SPE



## Conditioning

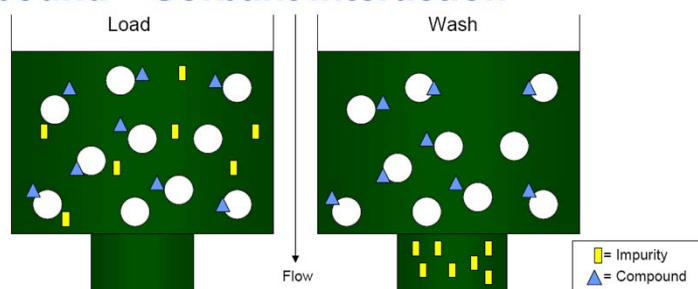
- Make the sorbent compatible with sample solution for close contact in small channels
- The sorbent should not be dry at any stage



## Loading/Adsorption

- Gentle vacuum, or pump
- At reasonable rate, depend on column dimension, particle size
  - Small particles, more efficient, permit faster flow rate
- The sorbent should not be allow to go dry at any point
  - Air in the column prevent efficient interfacial contact between liquid and solid phase

## Compound – Sorbant Interaction



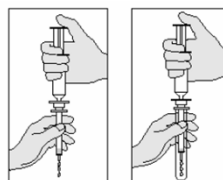
**Diagram 1:** The compound-sorbant interaction is what makes solid phase extraction work. The solid phase interacts with the sample based on chemical structure (polarity, functionalities, size). Reverse phase methodology allows the sample to grip the sorbant due to hydrophobicity. The compounds, therefore, are attracted to the sorbant until washed away by an organic solvent. If the solvent is strong enough the sorbant lets go of the compound and elutes. The trick is to be able to wash away the impurities that are soluble in water and low organic solvents without eluting the compounds of interest.

## Washing

- Remove interferences coadsorbed from the SPE column
- The wash solution must not be too strong to partially eluted the analyte of interest
- For RP-SPE, when the eluting solvent is immiscible with water the sorbent must be dried so that the eluting solvent can interact with all area of the sorbent
  - Gentle vacuum for a few minutes
  - Compressed air or N<sub>2</sub>
  - Centrifugation

## Elution

- Eluting solvent should be strong enough to completely removed adsorbed analytes from the sorbent as small a volume as possible (small  $k$ )
- Compatible with the analytical method (i.e., Low BP – GC)
- Free from impurity
- Low cost and non toxic



## Kapazitätsfaktor

Je länger ein Stoff in der stationären Phase verbleibt, desto größer wird der Kapazitätsfaktor und damit auch die Retentionszeit des Analyten. Der Kapazitätsfaktor gibt an, um wieviel länger sich Moleküle an der stationären Phase im Vergleich zur mobilen aufhalten. Mit Bruttoretentionszeit ( $t_R$ ) und Totzeit ( $t_0$ ) gilt:

$$k = \frac{t_s}{t_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Ein hoher Kapazitätsfaktor beschreibt ein hohes Retentionsverhalten!

## Choice of Eluting Solvent

- Reversed Phase SPE
  - Nonpolar solvent
  - Methanol
  - Acetonitrile
  - Ethyl acetate
  - Acetone
  - Methylene chloride
- Normal Phase SPE
  - A function of the eluotropic strength

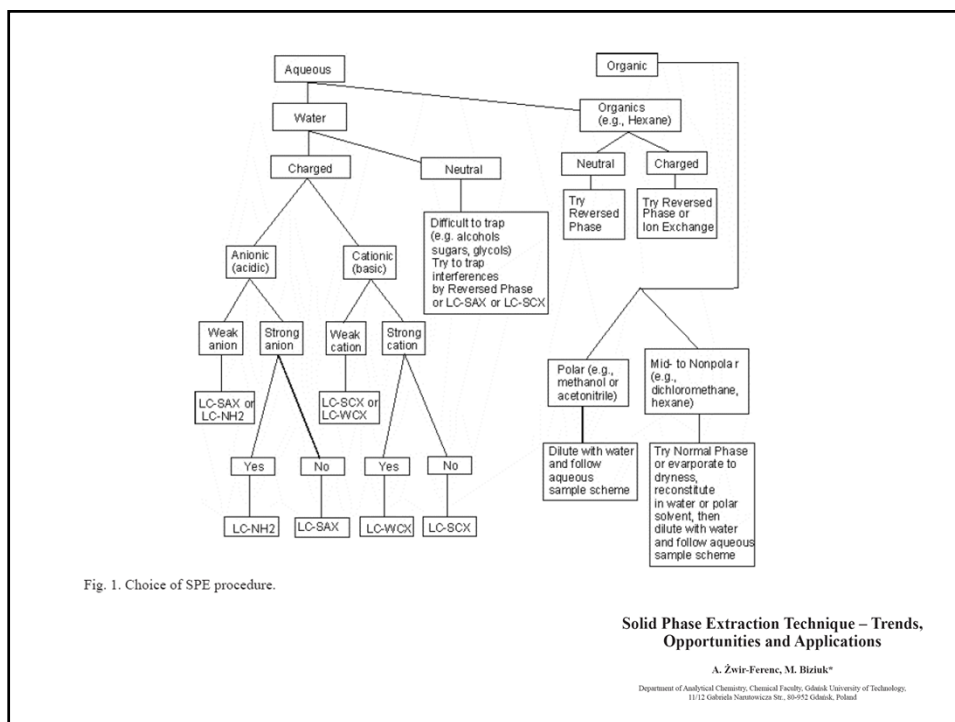
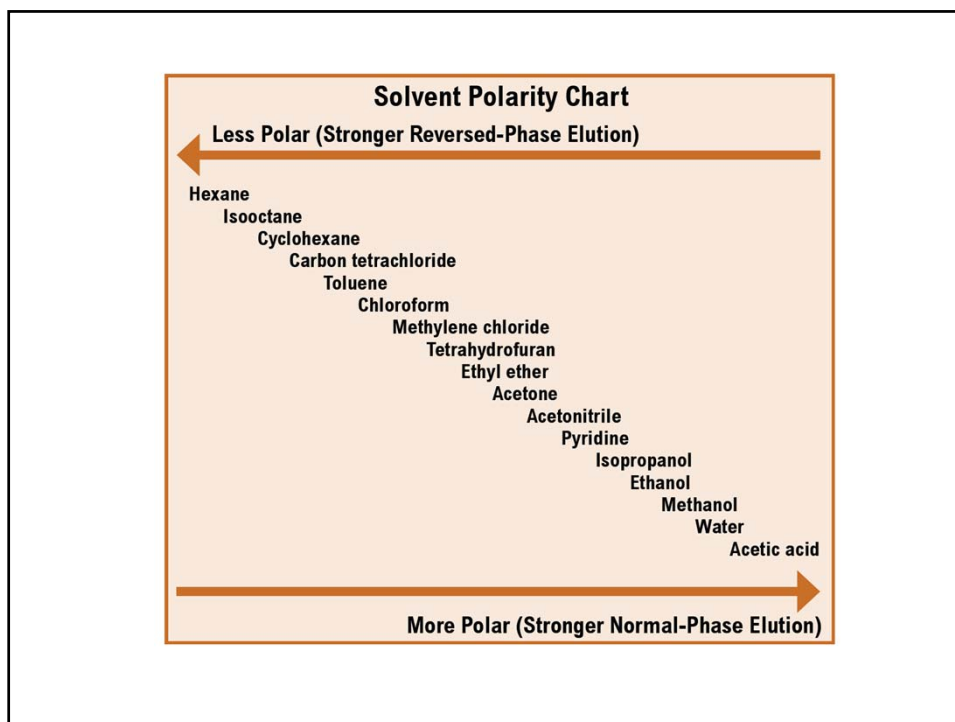


Table 1. Sorbents for solid phase extraction and separation mechanisms for solid phase separations.

Sorbent	Structure	Analyte type	Dissolving solvents	Elution solvents
Reversed Phase				
Octadecyl (C <sub>18</sub> ) Octyl (C <sub>8</sub> ) Ethyl (C <sub>2</sub> ) Cyclohexyl Phenyl	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> - CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> - CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> - CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Nonpolar	methanol/water, acetonitrile/water	For nonpolar analytes: hexane, chloroform For polar analytes: methanol
Normal Phase (bonded)				
Cyano (CN) Amino (NH <sub>2</sub> ) Diol (COHCOH)	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CN - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH	Slightly - moderately polar - strongly polar	hexane, chloroform	methanol
Normal Phase (adsorption)				
Kieselguhr (Diatomaceous Earth) Silica gel Florisil Alumina (neutral)	- SiOH - SiOH Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Slightly - moderately polar - strongly polar	hexane, chloroform	methanol (dependent on type of analyte)
Ion Exchangers (anion and cation Exchange)				
Amino (NH <sub>2</sub> ) 1°, 2° Amino (NH/NH <sub>2</sub> ) Quaternary Amine (N <sup>+</sup> ) Carboxylic acid (COOH) Propyl Sulfonic Acid (SO <sub>3</sub> H) Aromatic Sulfonic Acid (ArSO <sub>3</sub> H)	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NH <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> COO <sup>-</sup> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Anion exchange - Ionic Acid  Cation exchange - Ionic Base	Water or buffer (pH=pKa + 2)  Water or buffer (pH=pKa-2)	1) Buffer (pH=pKa ± 2) 2) pH where sorbent or analyte is neutral 3) Solvent with high ionic strength  1) Buffer (pH=pKa-2) 2) pH where sorbent or analyte is neutral 3) Solvent with high ionic strength

**Solid Phase Extraction Technique – Trends,  
Opportunities and Applications**

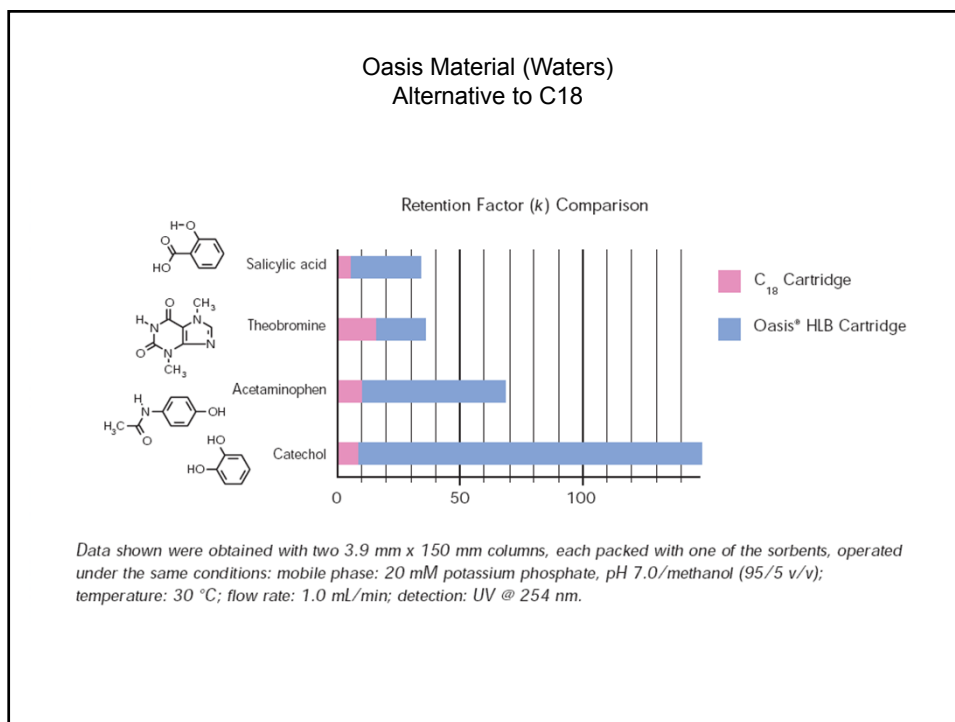
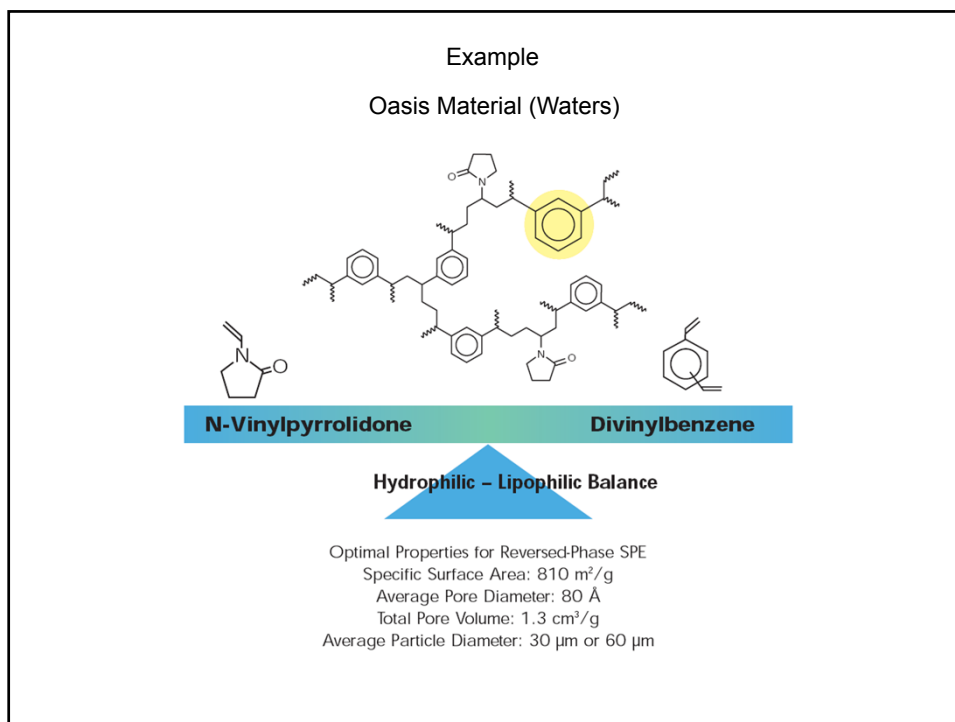
A. Żwir-Ferenc, M. Bizuk\*

Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology,  
11/12 Gabriela Narutowicza Str., 80-952 Gdańsk, Poland

## Troubleshooting

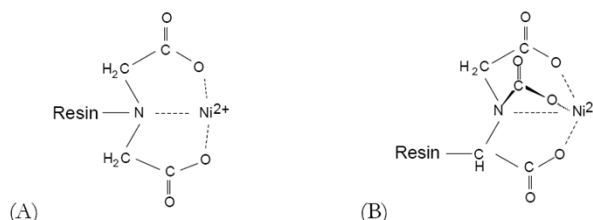
- Incomplete elution
  - Increase eluting solvent, change solvent, pH adjustment, back elution
- Breakthrough of analyte
  - Increase the amount of sorbent, change the sorbent, reduce flow rate
- Interfering substances
  - Wash with solvent selectively elute the interferences, clean up the eluent with another sorbent
  - SPE bleed, wash the sorbent, change the solvent





Example

**IMAC**  
Immobilized metal-ion chromatography



**Figure 3-1:**  $\text{Ni}^{2+}$ -IMAC based on iminodiacetic acid (IDA), forming a tri-dentate complex (A) and nitrilotriacetic acid (NTA), showing a tetra-dentate metal ion complex (B).

for specific binding of phosphopeptides!

Immobilized metal ion/Metal Chelate affinity chromatography is separation technique that is based on coordinate covalent binding between proteins and metal ions. Proteins have a wide variety of amino acids composition which, in effect, generates a range of different affinities towards metal ions. However, not many naturally occurring proteins have affinity for metal ions, so the technique is mainly used to purify recombinant proteins. For example proteins can be engineered to contain a poly-histidine tail (histidine can generally act as a ligand towards divalent metal cations). If the stationary phase is immobilized with divalent metal cations, a mixture of proteins can be separated based on their ability to interact with the metal ions. Those proteins containing a higher number of histidine residues would be able to bind to the column more tightly than those with fewer histidine residues.

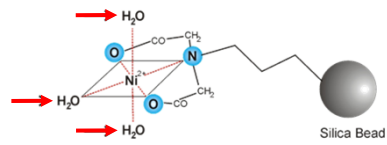
Several different types of immobilized metal ion column have been developed to separate various proteins (e.g. Fe, Co, Cd, Ni, or Zn). Protein separation in IMAC generally depends on the strength of the metal ion-protein bond. Thus, choosing the type of immobilized ion is crucial to the success protein separation. By far the most widely-used technique is to use an immobilized nickel column, and to engineer poly-histidine tags of six or more residues onto the recombinant proteins of interest. One thing to keep in mind is that the binding between metal ion and protein must be reversible, allowing elution of bounded protein at later steps. Three different elution strategies can be applied to IMAC competitive elution, stripping elution and pH Adjustment.

## Protino Ni-IDA/TED

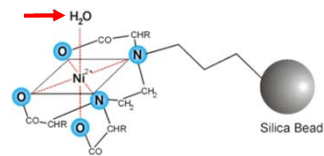
Protino Ni-IDA/TED – purification of His-tag proteins

MACHEREY-NAGEL's concept

### Protino Ni-IDA



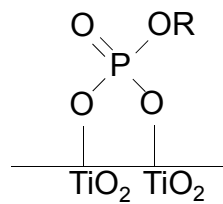
### Protino Ni-TED



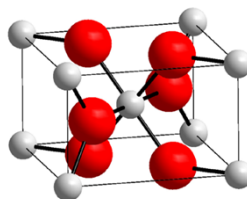
Example

### MOAC

Metal Oxide Affinity Chromatography  
for specific binding of phosphopeptides!



Mechanism: Bridging Bidentate



**Rutil**, Anatas, Brookit

## Titania Tips



### Glygen

Bare titanium dioxide formed to 10  $\mu\text{m}$  spheres.

### GL-Science

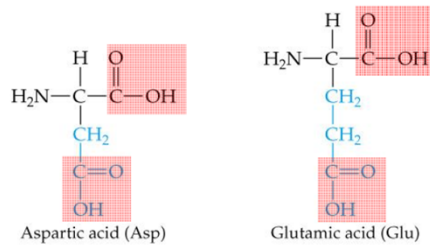
Monolithic solid phase, coated with titanium dioxide.

## Sample treatment

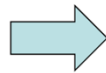
- Conditioning
- Loading
- Washing
- Eluting
- Acidification

## TiO<sub>2</sub> loading solvent - pH

Usual loading buffer has a pH of 2.7 – 2.9 (acetic acid)



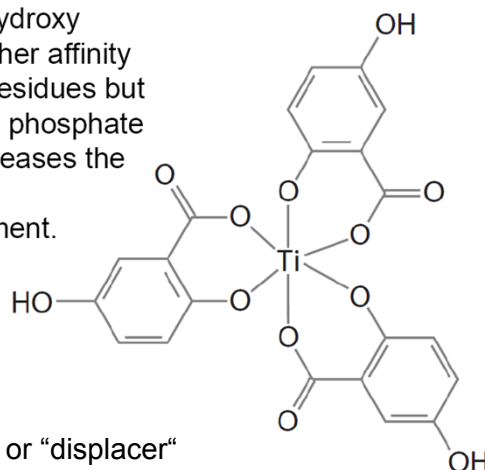
$\text{pK}_{a1}(\text{CH}_3\text{OPO}(\text{OH}_2)) = 1.1$



Loading buffer with very low pH (TFA, HFBA)

## Loading solvent containing DHB

TiO<sub>2</sub> adsorbs DHB (Dihydroxy Benzoic Acid) with a higher affinity than acidic amino acid residues but with a lower affinity than phosphate groups, hence DHB increases the specificity of TiO<sub>2</sub> in phosphopeptide enrichment.



DHB as “excluder“ or “displacer“

*Proposed by Mann and Olsen*

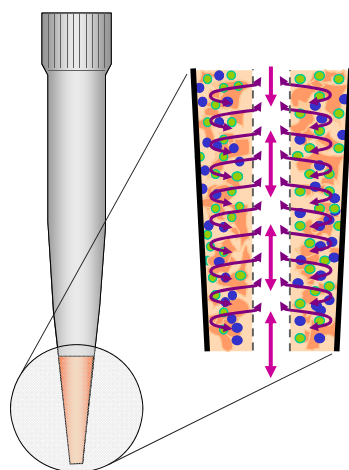
## Sample treatment

- **Conditioning**
  - 1 x 40 $\mu$ L AcN 80%; 1 x 40 $\mu$ L loading solvent
- **Load**
  - Loading solvent: 420mM OSA, 50 mg/mL DHB, 0.1% HFBA, 20% HAc
- **Wash**
  - 1 x 40 $\mu$ L loading solvent; 2 x 40  $\mu$ L AcN 80%/TFA 0.1%
- **Elute**
  - 1 x 40 $\mu$ L Ammonium dihydrogene phosphate (50 mM) adjusted to pH 10.5 with ammonium hydroxide.

*Karl Mechtler et. al*

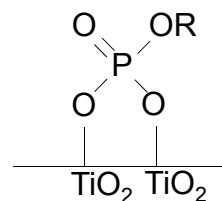
Example

### Preparation of - Hollow Monolith™

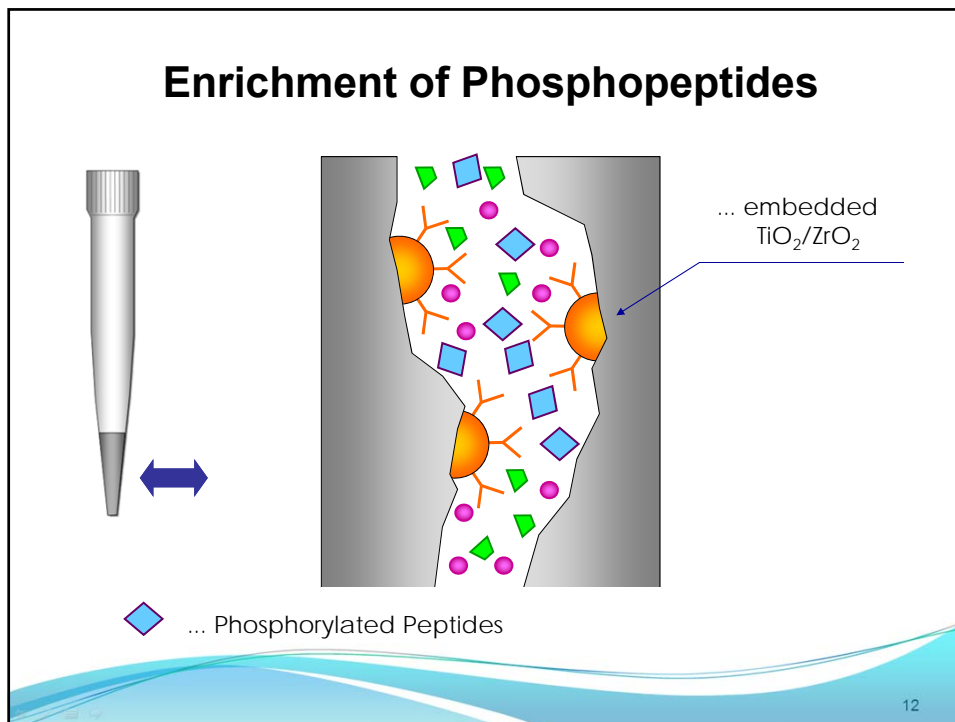


Hollow Monolith™

- $\text{ZrO}_2 < 100 \text{ nm}$
- $\text{TiO}_2 < 100 \text{ nm}$
- poly(divinylbenzene)



Mechanism: Bridging Bidentate



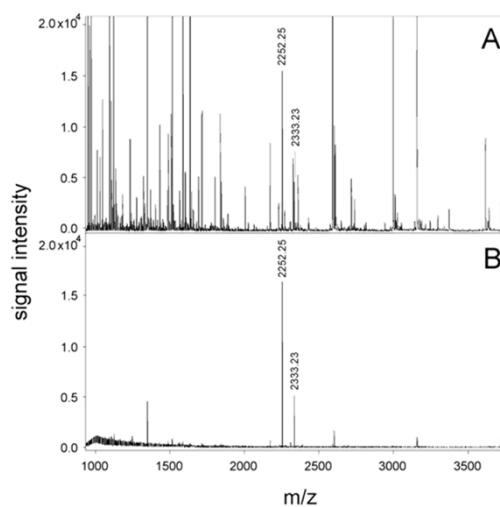
## Enrichment of *in vitro* phosphorylated ERK1 digest

MALDI MS spectra:

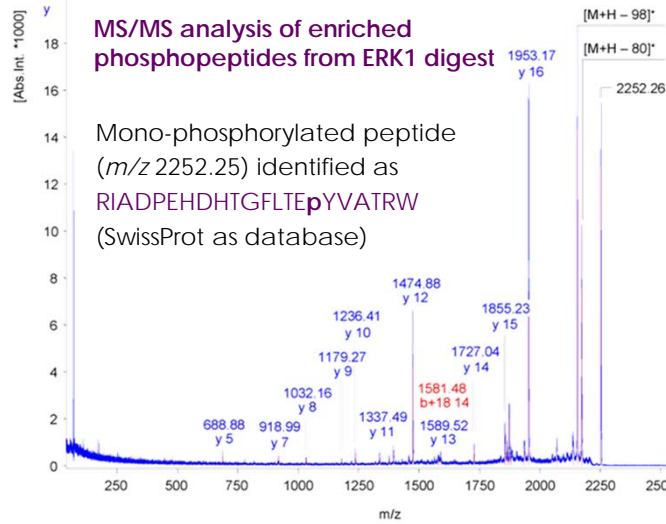
- 1.) before enrichment (A)
- 2.) after enrichment with poly(DVB)- $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2$  tips (B)

Signals at  $m/z$  2252.25 and  $m/z$  2332.23 correspond to phosphorylated peptides

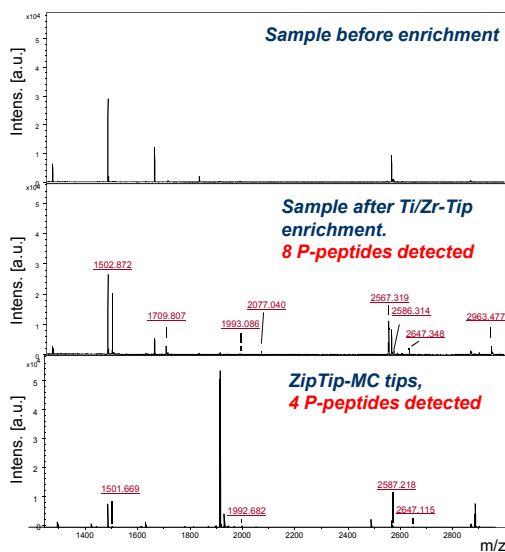
*Collaboration with Prof. Lukas Huber, Biocenter - Innsbruck*



## Identification of *in vitro* phosphorylated ERK1 MS/MS Analysis



## 8 phosphopeptides in p57 protein could be detected after Ti/Zr-Tip enrichment, only 4 with ZipTip MC IMAC



Activating: ACN/0.1% TFA twice

Equilibrating: 1) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA two times. 2) 50% ACN/0.1% TFA containing DHB (20 mg/mL)

Loading: 50% ACN/0.1% TFA containing DHB (20 mg/mL)

Washing: 50% ACN/0.1% TFA containing DHB (20 mg/mL) x5  
Additionally, two washing steps with 80% ACN/0.1% TFA and one washing step with deionized water were performed.

Eluting: 20% ACN/ 50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ca 1% NH<sub>4</sub>OH (pH 10.5)

matrix composition:  
10 mg/ml DHB  
80% ACN  
0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
1 % TFA



## P57 peptides detected after phosphopeptides enrichment

#1\_2183\_XXXXXX\_HAp57wt +src\_TiZr

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
32 - 44	1485.7451	1484.7378	1484.7260	0.0119	0	R.SLFGVVDHEELSR.E
50 - 60	1272.6811	1271.6738	1271.6106	0.0633	0	R.LAELNAEDQNR.W
50 - 72	2883.3306	2882.3234	2882.2929	0.0304	1	R.LAELNAEDQNRWDYDFQQDMPLR.G Oxidation (M)
50 - 72	2983.3517	2982.3444	2982.2593	0.0852	1	R.LAELNAEDQNRWDYDFQQDMPLR.G Oxidation (M); Phospho (Y)
61 - 72	1709.6695	1708.6622	1708.6593	0.0029	0	R.WDYDFQQDMPLR.G Oxidation (M); Phospho (Y)
61 - 76	2076.8559	2075.8486	2075.8561	-0.0075	1	R.WDYDFQQDMPLRGPGR.L Oxidation (M); Phospho (Y)
77 - 92	1912.9939	1911.9867	1911.9003	0.0864	0	R.LQWTEVSDSDVPAFYR.E
77 - 92	1992.9086	1991.9013	1991.8666	0.0347	0	R.LQWTEVSDSDVPAFYR.E Phospho (Y)
266 - 278	1502.7793	1501.7721	1501.7582	0.0139	1	K.KLSGPLISDFFAK.R Phospho (ST)
287 - 312	2587.1004	2586.0931	2586.1422	-0.0490	0	K.SSGDVPAPCFPSAAPGVGSVEQTFR.K Phospho (ST)

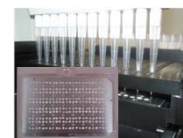
1-21 2567 GSYPYDVPDYASLEFTVLRPR phosphorylated  
 1-21 2646 GSYPYDVPDYASLEFTVLRPR 2xphosphorylated

*Collaboration with Biocenter Innsbruck*

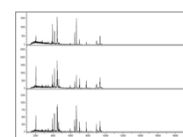
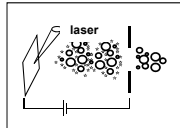
## Automation of Sample Preparation



1. sample loading 2. sample spotting



3. sample analysis 4. data processing



- Specific enrichment
- Purification
- Desalting

A collaboration with PhyNexus Inc., San Jose, CA, USA



## Comparative study with commercial products

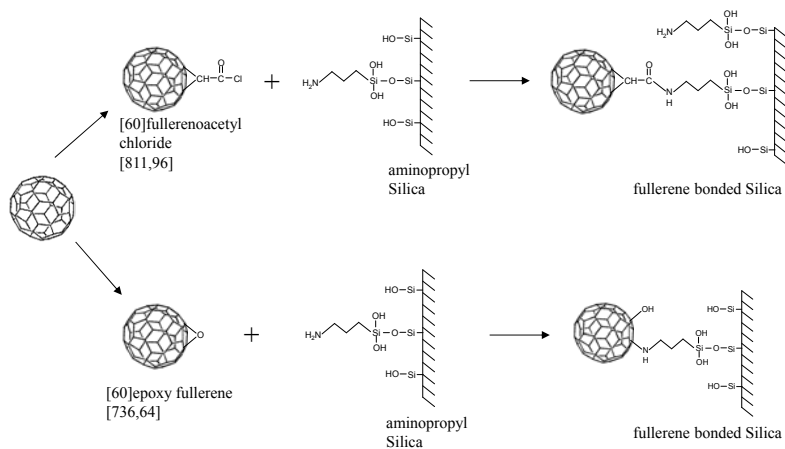
$\beta$ -casein	Phospho TiZr TiO <sub>2</sub> /ZrO <sub>2</sub> PhyNexus	ZipTip MC-Fe <sup>3+</sup> Millipore	MonoTip TiO <sub>2</sub> GL Sciences	TopTip TiO <sub>2</sub> Glygen	TopTip ZrO <sub>2</sub> Glygen
total number of phosphopeptides	5	4	5	2	1

$\alpha$ -casein	Phospho TiZr TiO <sub>2</sub> /ZrO <sub>2</sub> PhyNexus	ZipTip MC-Fe <sup>3+</sup> Millipore	MonoTip TiO <sub>2</sub> GL Sciences	TopTip TiO <sub>2</sub> Glygen	TopTip ZrO <sub>2</sub> Glygen
total number of phosphopeptides	20	7	11	11	9

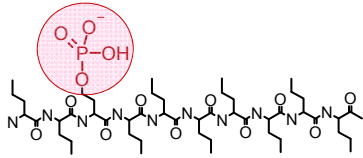
Example

## Fullerene C60-amino silica

Synthesis of C60-Silica

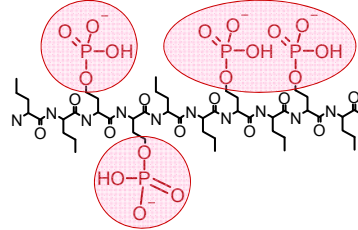


## peptides with multiple phosphorylations – MS



monophosphorylated peptides

- Single negatively charged group
- higher charge states in positive ionization mode
- Single loss of phosphoric acid



peptides with multiple phosphorylated amino acids

- multiple negatively charged moieties
- low charge states preferred
- multiple losses of phosphoric acid occur

## Enrichment and Separation of Mono- from Multi-phosphorylated Peptides Utilizing C60-fullerene silica

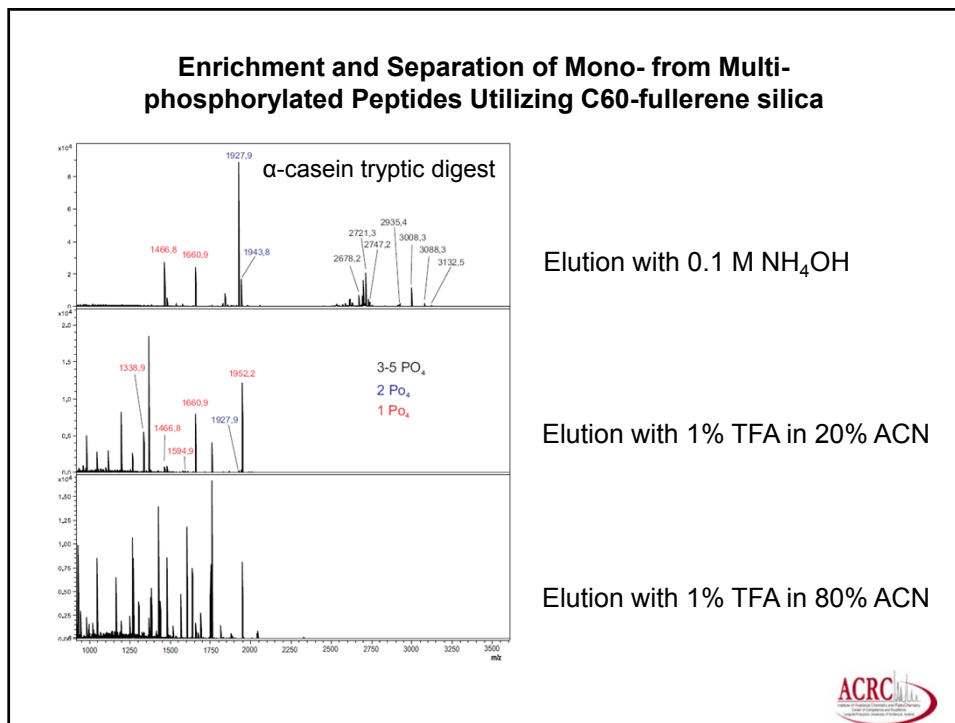
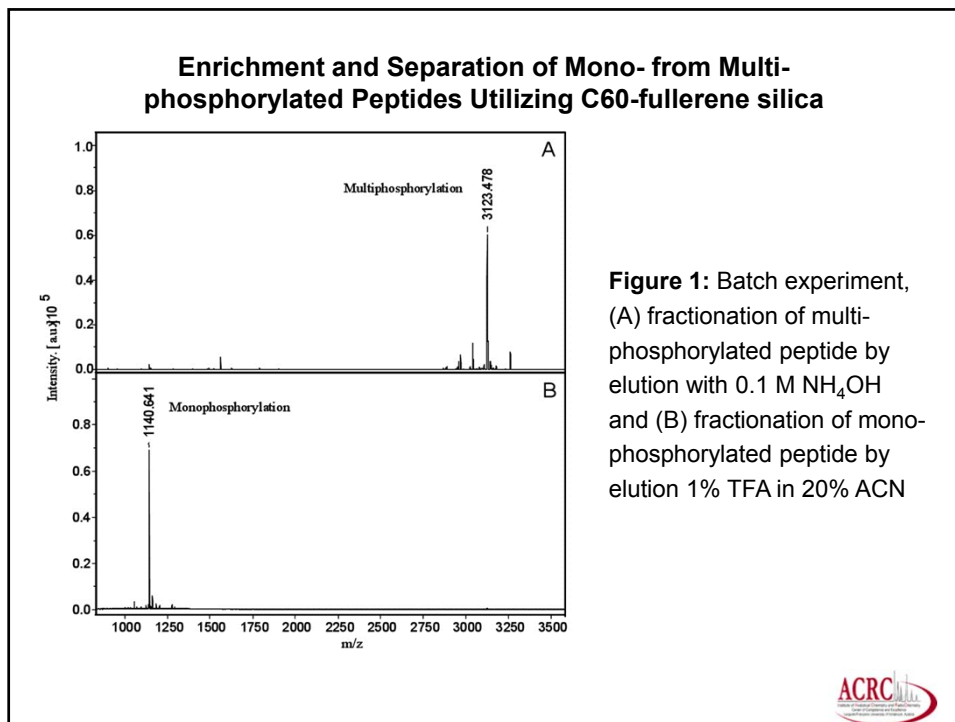
Elution of mono-phosphorylated peptides with 20% ACN and 1% TFA

Elution of multi-phosphorylated peptides with 0.1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$

Elution of non-phosphorylated peptides with 80% ACN and 1% TFA

peptides bind to C60-fullerene silica

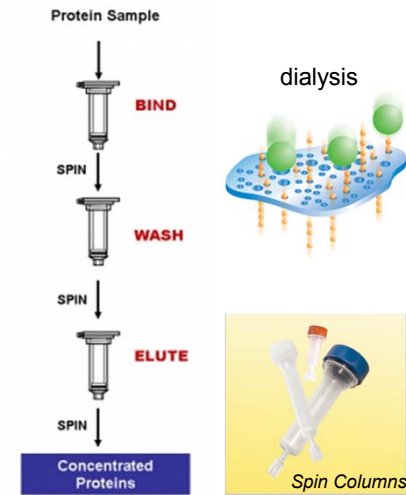




## Desalting of Proteins – Why?

### Spin Columns

C18-reversed phase



### Extraction Tips

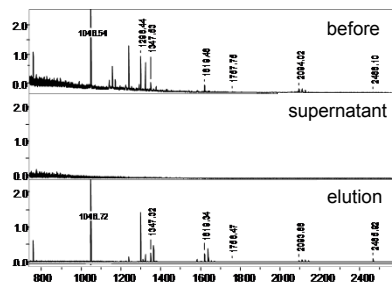


ZipTips (Millipore)

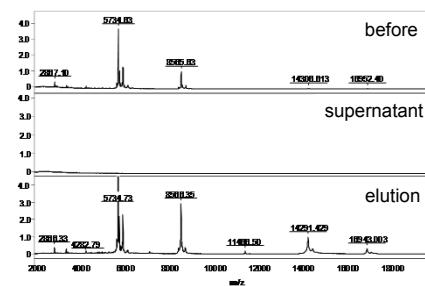


## Fullerene C60-Silica for Desalting Biological Samples

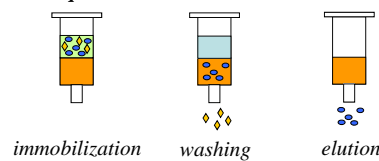
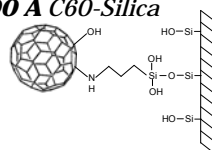
### Peptides



### Proteines



MALDI-MS spectra of the peptides and proteins which were eluted from Kovalasil 300 Å C60-Silica



## Fullerene C60-amino silica for Desalting

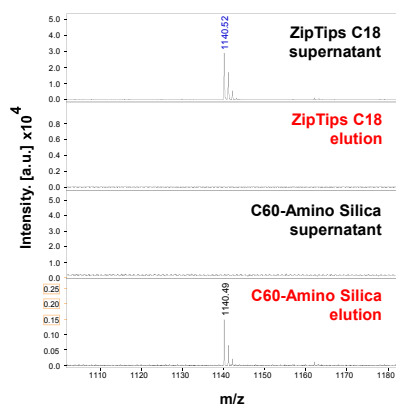
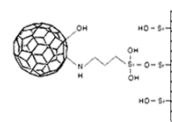
**Table 3. Comparison of Recovery Values Measured on C60-Aminosilica versus Sep-Pak and Oasis for Insulin and Bradykinin**

substance name	concn ( $\mu\text{g/mL}$ ) loaded	recovery (%)		
		C60-amino-silica	Sep-Pak C18	Oasis
insulin	10	72.3	79.6	72.6
	30	95.5	87.4	92.8
	50	97.2	91.8	91.7
bradykinin	30	85.0	—	84.0
	50	88.4	—	88.6

Vallant Rainer M; Szabo Zoltan; Bachmann Stefan; Bakry Rania; Najam-ul-Haq Muhammad; Rainer Matthias; Heigl Nico; Petter Christine; Huck Christian W; Bonn Gunther K. *Analytical chemistry* (2007), 79(21), 8144-53.

## Desalting of hydrophilic Phosphopeptides

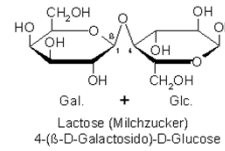
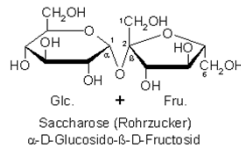
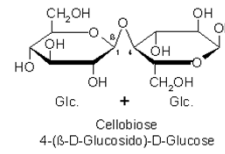
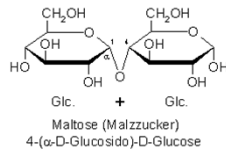
### C60-Amino Silica vs. ZipTip® C18 (Millipore)



- Phosphopeptide in supernatant  
No immobilization on commercial ZipTip® (Millipore)
- Phosphopeptide removed after washing  
No immobilization of phosphopeptide
- No Phosphopeptide in supernatant  
Quantitative binding of phosphopeptide on C60-Amino Silica
- Phosphopeptide eluted from C60-Amino Silica

### Aufgabe 1

Analyt: Disaccharide



Welche Festphase? Warum?

### Aufgabe 2

Analyt: Proteine

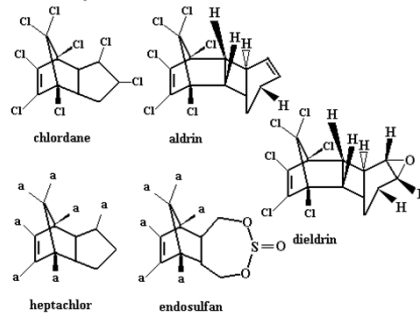


Welche Festphase? Warum?

## Aufgabe 3

Analyt: Pestizide

## 16.13.3.4 Cyclodienes



Welche Festphase? Warum?

Table 1. Sorbents for solid phase extraction and separation mechanisms for solid phase separations.

Sorbent	Structure	Analyte type	Dissolving solvents	Elution solvents
Reversed Phase				
Octadecyl (C <sub>18</sub> ) Octyl (C <sub>8</sub> ) Ethyl (C <sub>2</sub> ) Cyclohexyl Phenyl	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> - CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> - CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> - CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Nonpolar	methanol/water, acetonitrile/water	For nonpolar analytes: hexane, chloroform For polar analytes: methanol
Normal Phase (bonded)				
Cyano (CN) Amino (NH <sub>2</sub> ) Diol (COHCOH)	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CN - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH	Slightly- moderately polar - strongly polar	hexane, chloroform	methanol
Normal Phase (adsorption)				
Kieselguhr (Diatomaceous Earth) Silica gel Florisil Alumina (neutral)	-SiOH -SiOH Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Slightly- moderately polar - strongly polar	hexane, chloroform	methanol (dependent on type of analyte)
Ion Exchangers (anion and cation Exchange)				
Amino (NH <sub>2</sub> ) 1°, 2° Amino (NH/NH <sub>2</sub> ) Quaternary Amine (N <sup>+</sup> ) Carboxylic acid (COOH) Propyl Sulfonic Acid (SO <sub>3</sub> H) Aromatic Sulfonic Acid (ArSO <sub>3</sub> H)	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NH <sub>2</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> COO <sup>-</sup> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Anion exchange - Ionic Acid  Cation exchange - Ionic Base	Water or buffer (pH=pKa +2)  Water or buffer (pH=pKa-2)	1) Buffer (pH=pKa ±2) 2) pH where sorbent or analyte is neutral 3) Solvent with high ionic strength  1) Buffer (pH=pKa-2) 2) pH where sorbent or analyte is neutral 3) Solvent with high ionic strength

## Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications

A. Żwir-Ferenc, M. Biziak\*

Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology,  
11-12 Gabriela Niemieńca Str., 80-952 Gdańsk, Poland

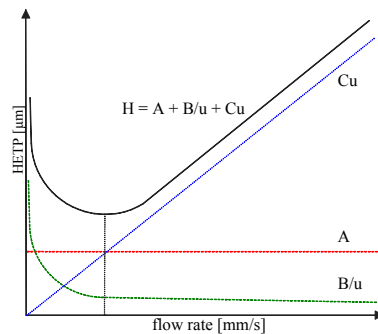


# Chromatographische Parameter

- Van Deemter Gleichung:

beschreibt Zusammenhang zwischen Bodenhöhe und Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase

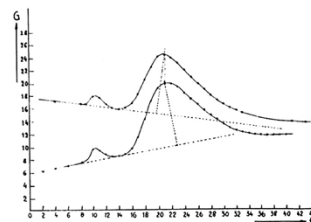
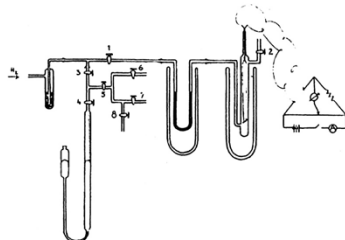
$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$



Van Deemter Gleichung

## Beginn der Gas-Adsorptionchromatographie

- **Prof. Erika Cremer, Universität Innsbruck 1943/44:**  
Betrachtungen zur Trennung von Gasen mittels selektiver Adsorption/Desorption unter Verwendung eines inerten Gases als mobile Phase (Trägergas)
- **Dissertation von Fritz Prior (1946/47):** Realisierung der Theorie erster Gaschromatograph  
erstes Chromatogramm: Trennung von  $\text{CO}_2$  und Luft an Aktivkohle



„Anwendung der chromatographischen Methode zur Trennung von Gasen und zur Bestimmung von Adsorptionsenergien“; E. Cremer, F. Prior, Z. Elektrochem. 55 (1951), 66-70

### Die Arbeiten von E. Cremer



Erika Cremer  
(1900 - 1996)  
Professorin an der  
Universität Innsbruck

1941 ff: Untersuchungen zur Adsorption und katalytischen Hydrierung von Acetylen

#### 1. Theoretische Überlegungen zur Trennung von Ethylen und Acetylen mittels selektiver Adsorption / Desorption (1943/44)

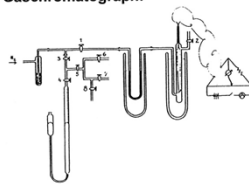
- Modell: **Fluss mit Booten**, die ab und zu am Ufer festsetzen
  - ➔ Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeiten der Zonen von Gasfluß und Verweilzeit der Moleküle an den Adsorptionszentren
  - ➔ Zusammenhang zwischen Adsorptionswärmen und Verweilzeit an Adsorptionsoberfläche
  - ➔ Trennung der Gase sollte möglich sein bei Verwendung eines inerten Trägergases anstelle einer Flüssigkeit (mobile Phase)
- Publikation in „Naturwissenschaften“ 1944 eingereicht  
„Über die Wanderungsgeschwindigkeit der Zonen bei der chromatographischen Analyse“  
in Kriegswirren nicht mehr erschienen

E. Cremer: Chromatographia 9 (1976) 364

#### 2. Realisierung der Theorie: Promotion von E. Prior, Mai 1947, Universität Innsbruck

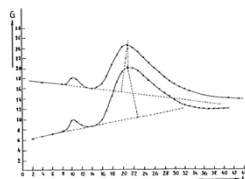
„Über die Bestimmung der Adsorptionswärmen von Gasen und Dämpfen unter Anwendung der chromatographischen Methode auf die Gasphase“  
E. Cremer u. F. Prior, Z. Elektrochem. 55 (1951) 66

Der erste Gaschromatograph:



Säule: 20 cm x 1 cm  
stat. Phase: Aktivkohle oder Kieselgel (Blaugel)  
Korngröße 1,5 - 3 mm  
mob. Phase: Wasserstoff (durch Elektrolyse erzeugt)  
Detektor: Wärmeleitzelle (Hitzdraht in Glasrohr eingeschmolzen) mit Spiegelgalvanometer  
manuelle Signalaufzeichnung (kein Schreiber)  
Probe: 5 - 10 ml Gasmischung

Das erste Chromatogramm:  
Trennung von CO<sub>2</sub> und Luft an Aktivkohle



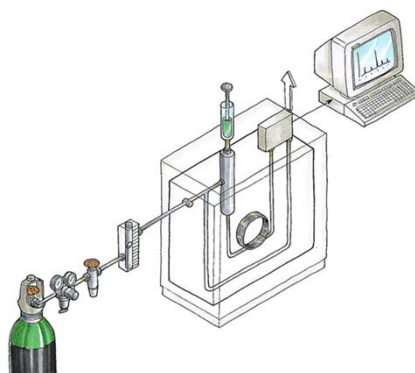
### Daten für typische Gaschromatographiesäulen

(Quelle Wortmann und De Giacomo – ETH Zürich)

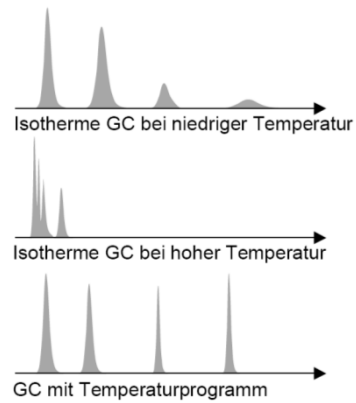
	Gepackte Säule	Dünnschicht Kapillarsäule	Dünnschicht Kapillarsäule
<b>Säulenlänge</b>	2m	30m	50m
<b>Innendurchmesser</b>	4mm	0.5mm	0.25mm
<b>Träger</b>	Diatomeenerde, Partikeldurchmesser: 0.1mm	Dünne Schicht Trägermaterial auf Kapillarwand	Kapillarwandung
<b>Flüssige Phase</b>	Belegung von ca. 20 Gew% des Trägers	Belegung mit dünnem Film	Film von ca. 1µm Dicke auf Kapillarwandung
<b>Phasenverhältnis <math>b = V_M/V_S</math></b>	Ca. 10	Ca. 20-50	Ca. 100-1000
<b>Belastung mit Probe</b>	Gross (1mg)	Mittel	Klein (<mg)
<b>Trägergasgeschwindigkeit</b>	60ml/min	5ml/min	1ml/min
<b>Anzahl theoretischer Böden</b>	3000	50'000	150'000
<b>Bodenhöhe</b>	0.7mm	0.6mm	0.3mm

### Aufbau eines Gaschromatographen

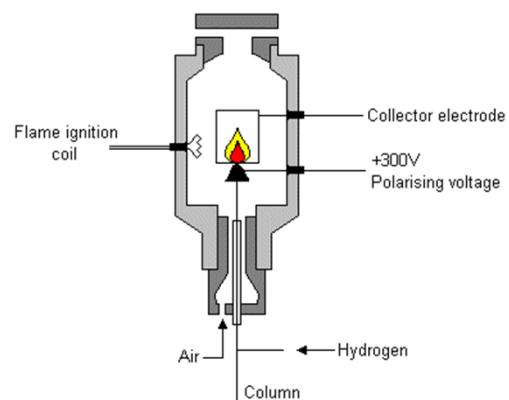
(Quelle: [hiq.linde-gas.com](http://hiq.linde-gas.com))



Einfluss der Temperatur auf die GCGC mit Temperaturprogramm  
Trennung von Gemischen mit großem Siedepunktsbereich  
(Quelle Wortmann und De Giacomo – ETH Zürich)



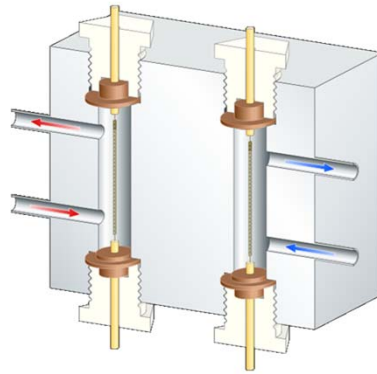
The Flame Ionisation Detector



Quelle: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrom.htm>

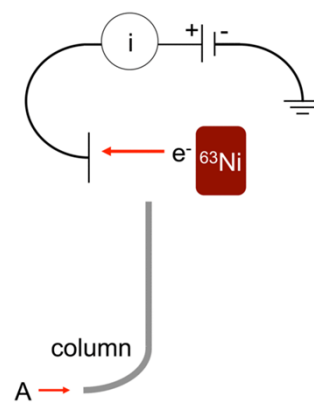
### Wärmeleitfähigkeitsdetektor

(Quelle Wikipedia)



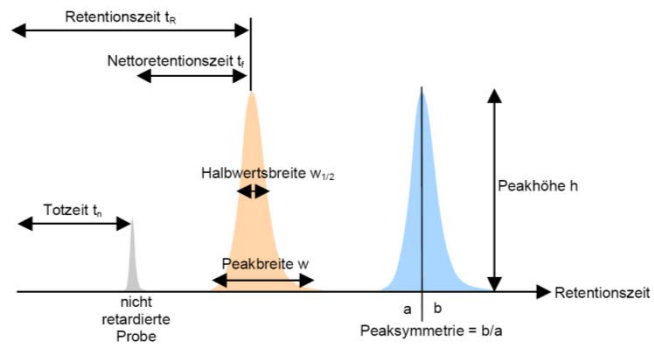
### Elektroneneinfangdetektor

(Quelle Wikipedia)

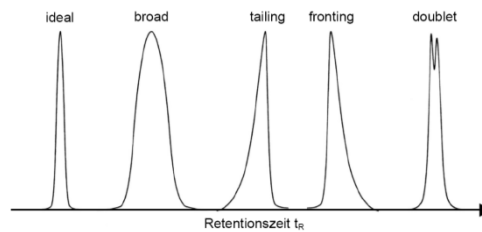


### Charakteristische Kenngrößen in einem Chromatogramm

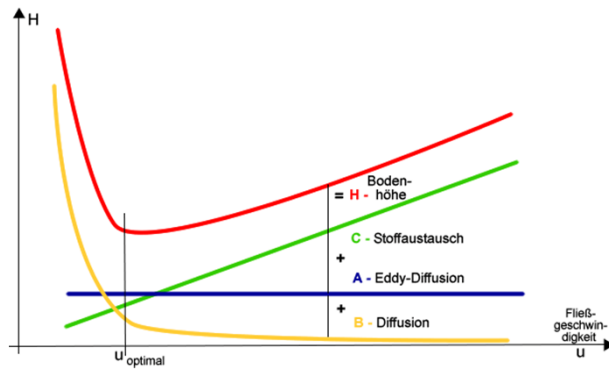
(Quelle Wortmann, De Quiacomo ETH Zürich)



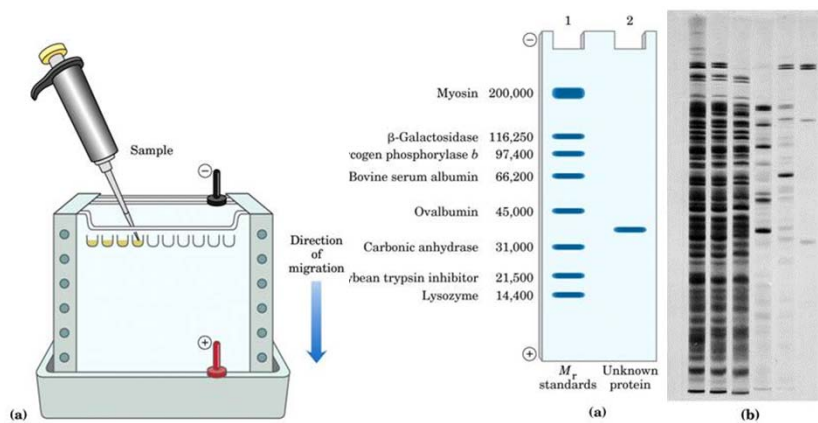
### Typische Peakformen in der Chromatographie, Quelle Wortmann, De Quiacomo ETH Zürich



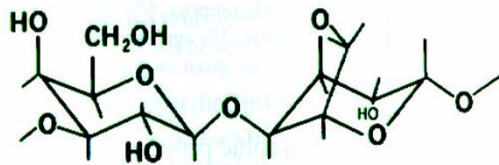
### Typischer Verlauf der Van-Deemter-Kurve für eine Kapillarsäule (Quelle <http://www.chemgapedia.de>)



### Gelelektrophorese



### Structure of the Repeating Unit of Agarose, 3,6-anhydro-L-galactose

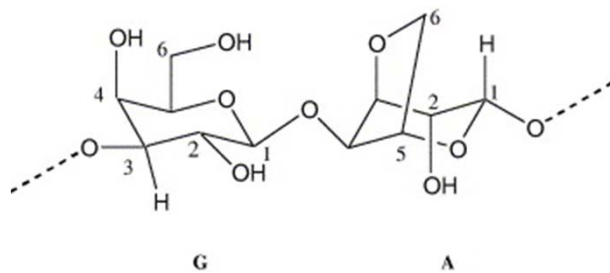


Basic disaccharide  
repeating units of  
agarose,

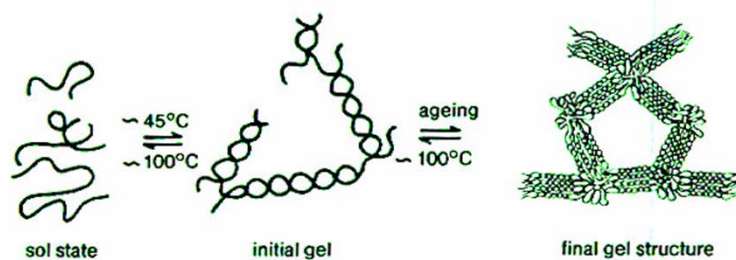
G: 1,3- $\beta$ -D-galactose

and

A: 1,4- $\alpha$ -L-3,6-  
anhydrogalactose

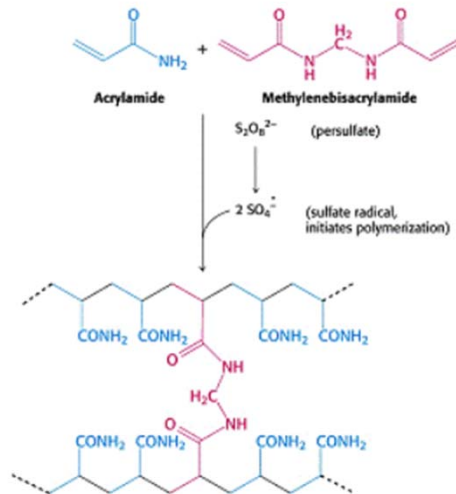


### Gel Structure of Agarose

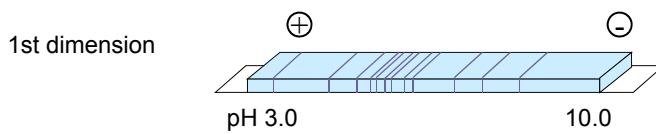




## Crosslinking Acrylamide Chains



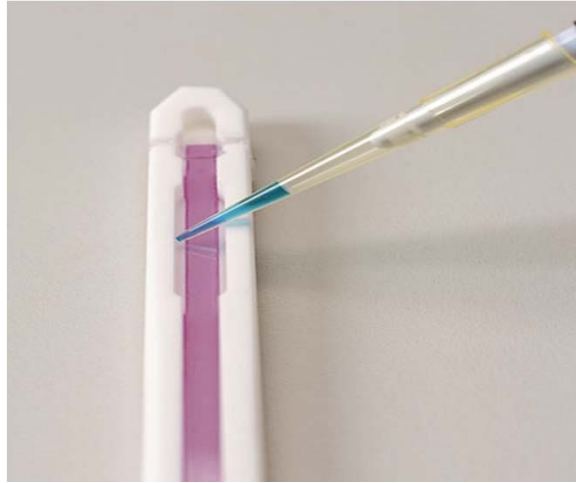
## Improvements in 2D-PAGE



- **IPG (Immobilised Ph Gradient)** strips for the first dimension  
*pH-forming chemical groups are grafted onto the polyacrylamide matrix, creating a mechanically stable pH gradient*



- ++ mechanical stability
- ++ reproducibility
- ++ loadable amounts
- ++ „zoom“ pI ranges

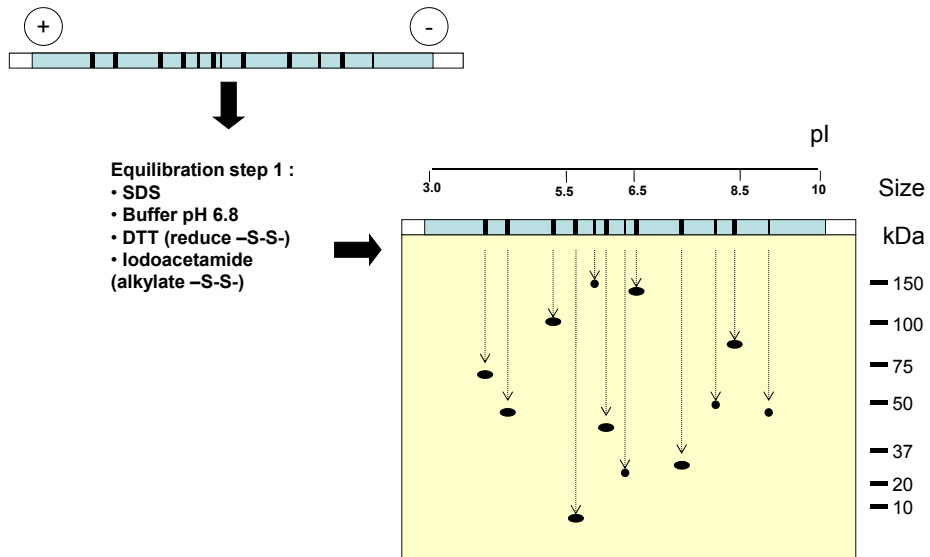


Protein sample can be applied at sample application well following the rehydration step if the protein sample was not included in the rehydration solution.

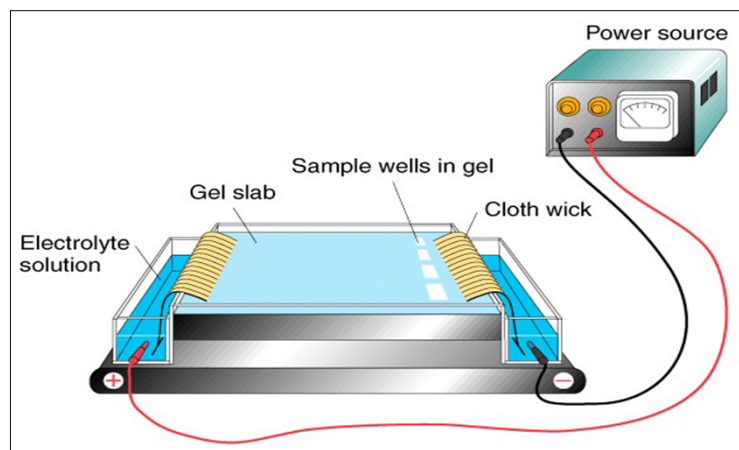


Place assembled strip holder on electrophoresis platform

## After IEF : equilibration and 2<sup>nd</sup> dimension

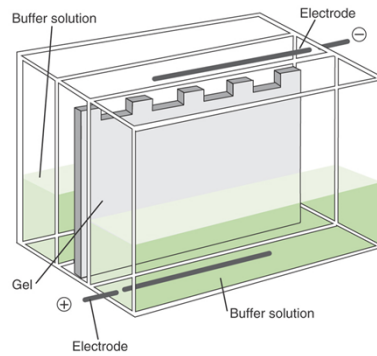


## horizontal gel electrophoresis



## Electrophoresis Equipment

### Vertical gel

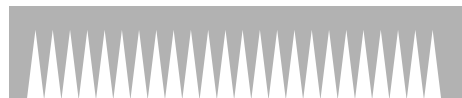


## Electrophoresis Equipment

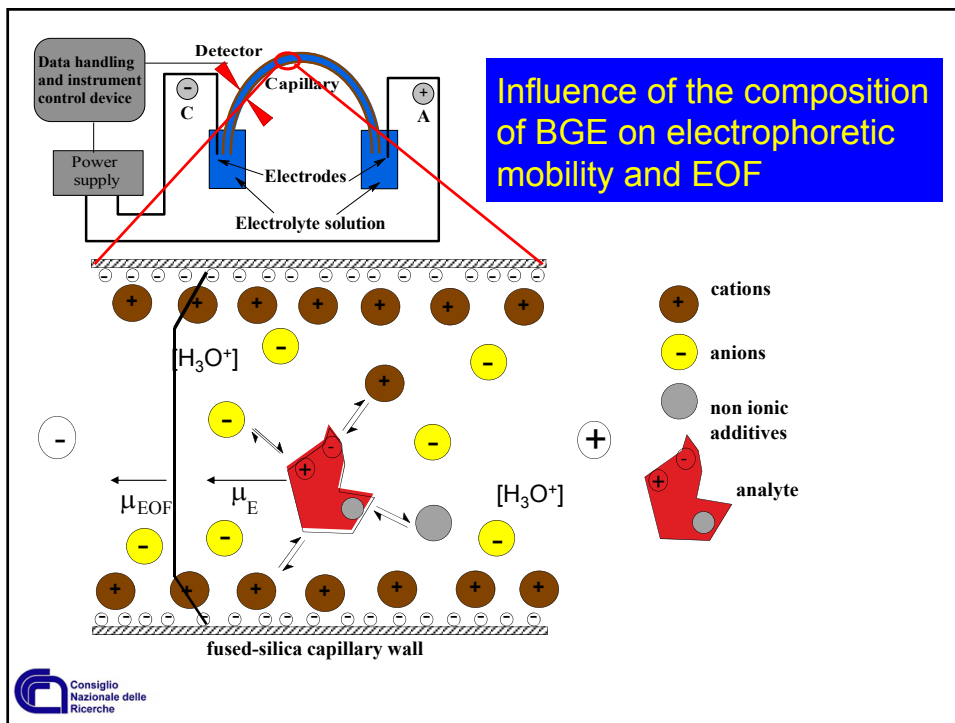
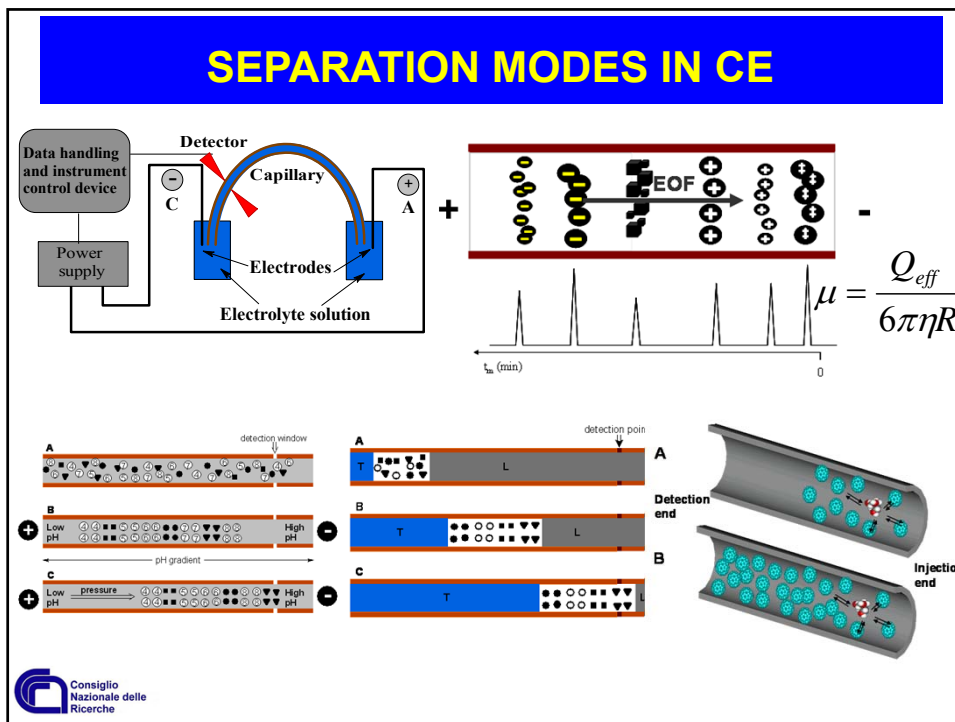
Combs are used to put wells in the cast gel for sample loading.



– Regular comb: wells separated by an “ear” of gel

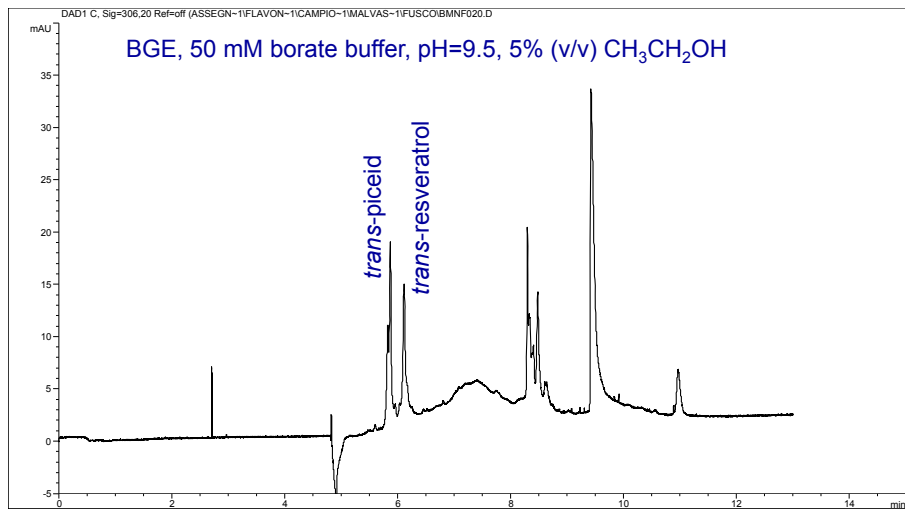


– Houndstooth comb: wells immediately adjacent





## CZE stilbenes in sample of skin berries of grape Malvasia



IMC – Chromatography & Capillary Electrophoresis Unit  
URL: [www.imc.enr.it/ChromatographyCorradiniUnit.html](http://www.imc.enr.it/ChromatographyCorradiniUnit.html)

## influence of trifluoroethanol on the migration behaviour of phenolic compounds

