

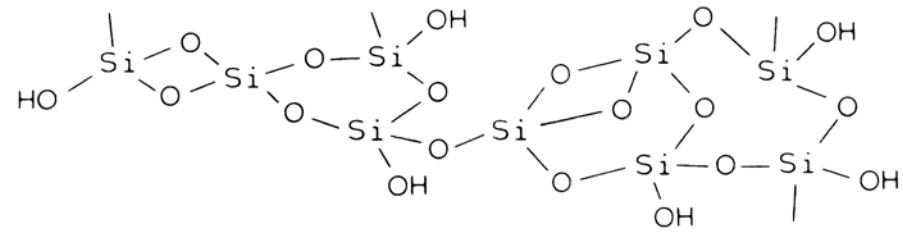
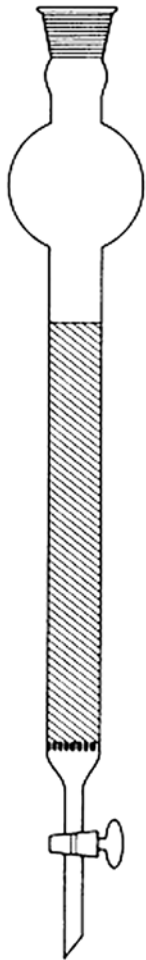
Chromatographie:

Bei der Reinigung von Stoffen durch chromatographische Verfahren werden die Komponenten eines Gemisches nach bestimmten Gesetzmäßigkeiten zwischen einer stationären Phase und einer mobilen Phase verteilt und in die Einzelkomponenten getrennt.

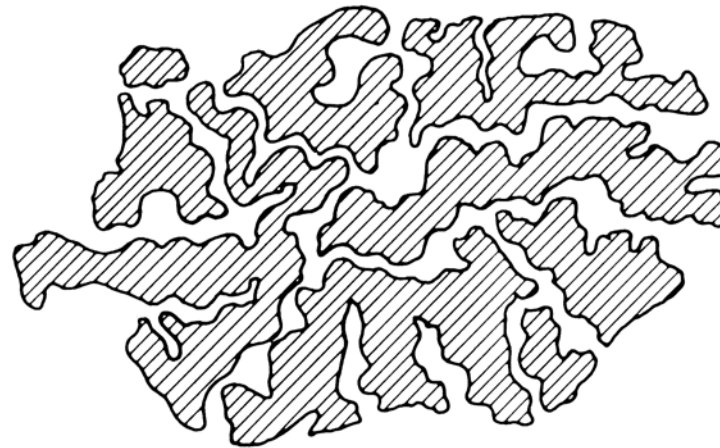
Die Adsorption beruht auf folgenden Wechselwirkungen:

- Dipol-Dipol-Wechselwirkung
- Wasserstoffbrücken-Bindung
- π -Komplex-Bildung
- Charge-Transfer-Wechselwirkung
- Sterische Wechselwirkung

Durch schrittweise oder kontinuierliche Aufhebung der Bindungskräfte wird schließlich eine Auftrennung der Komponenten erreicht.



Chemischer Aufbau von Silicagel



Poren der stationären Phase

Als "normale" Adsorptionschromatographie bezeichnet man Systeme, bei denen die stationäre Phase polarer ist als das Elutionsmittel.

Kieselgel:

Für die präparative Chromatographie werden Kieselgele mit einer Porengröße von 40, 60 und 100 Å (Si-40, Si-60, Si-100) angeboten.

Kieselgel ist schwach sauer und etwa im Bereich von pH 1-9 beständig.

Das Schüttgewicht liegt etwa bei 0,4-0,6 g/ml, die Dichte bei ca 2.2 g/ml.

Für die präparative Chromatographie werden Kieselgele mit einer Korngröße von 15-25 µm, 25-40 µm oder 40-63 µm angeboten.

Aluminiumoxid:

Aluminiumoxid ist von Natur aus basisch, kann aber durch Modifikation auch neutral oder sauer erhalten werden.

Für die Adsorptionschromatographie wird meist neutrale Aluminiumoxid verwendet.

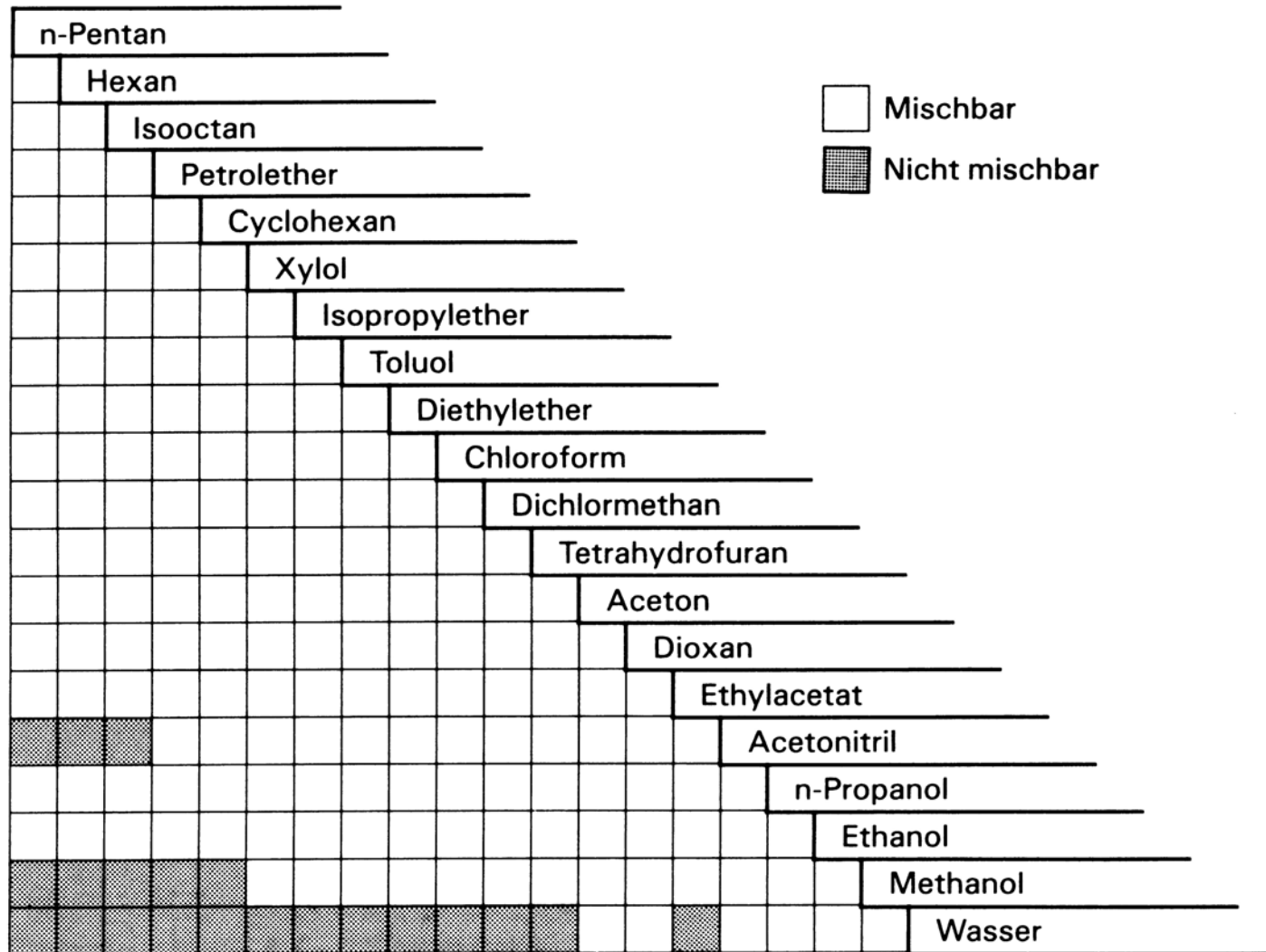
Da jedoch die Gefahr der irreversiblen Bindung der Substanzen (Chemsorption) größer ist als bei Kieselgel, wird Aluminiumoxid heute nur noch für Spezialfälle eingesetzt.

Das Schüttgewicht liegt etwa bei 0,9 g/ml, die Dichte bei ca 4.0 g/ml.

Elutionsmittel:

Lösungsmittel	Polarität E°	Dipol- parameter	Protonen- akzeptor- parameter	Protonen- donator- parameter	Brechungs- index	UV-Grenze nm
n-Pentan	0,00	0	0	0	1,358	210
Hexan	0,00	0	0	0	1,357	210
Isooctan	0,01	0	0	0	1,404	210
Petrolether	0,01	0	0	0		210
Cyclohexan	0,04	0	0	0	1,427	210
Xylol	0,26	0	0,5	0	1,5	290
Diisopropylether	0,28	0,5	0,5	0	1,368	220
Toluol	0,29	0	0,5	0	1,496	285
Diethylether	0,38	2	2	0	1,353	220
Chloroform	0,40	3	0,5	3	1,443	245
Dichlormethan	0,42	5,5	0,5	0	1,424	245
Tetrahydrofuran	0,45	4	3	0	1,408	220
Aceton	0,56	5	2,5	0	1,359	330
Dioxan	0,56	4	3	0	1,422	220
Ethylacetat	0,58	3	2	0	1,370	260
Acetonitril	0,65	8	2,5	0	1,344	200
Iso + n-Propanol	0,82	2,5	4	4	1,38	210
Ethanol	0,88	4	5	5	1,361	210
Methanol	0,95	5	7,5	7,5	1,329	210
Wasser	gross	gross	gross	gross	1,333	190

Mischbarkeit der Elutionsmittel:



Desaktivatoren:

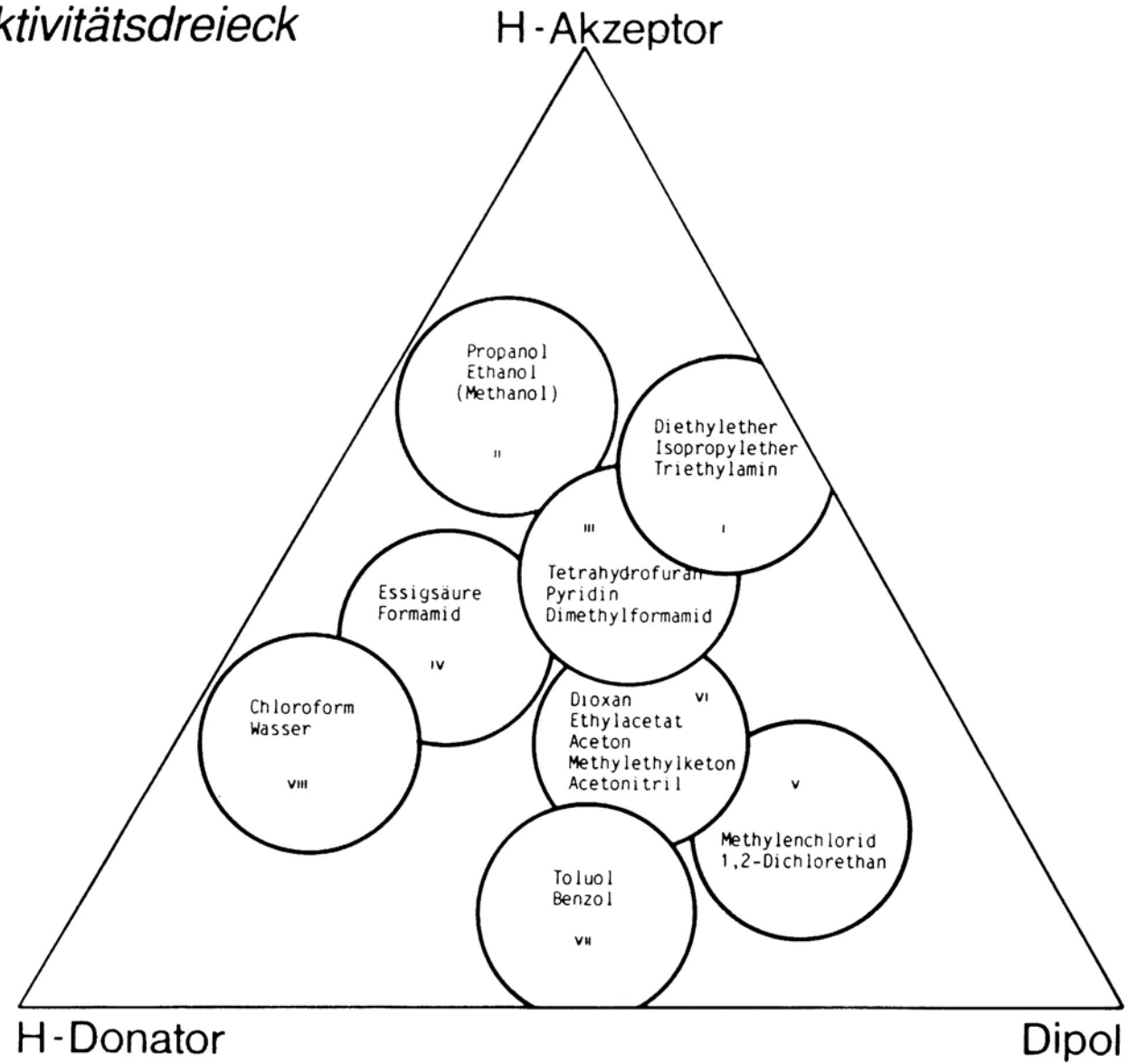
Bei Kieselgel und Aluminiumoxid sind nicht alle aktiven Bindungsstellen gleich stark. Dadurch kann eine Substanz auf der Säule verschieden stark zurückgehalten werden und ein mehr oder weniger ausgeprägtes Tailing resultiert.

Diese störende Erscheinung kann durch Zugabe eines Deaktivators zur mobilen Phase aufgehoben werden.

Desaktivatoren sind also Substanzen, die durch das Absättigen der aktivsten Bindungsstellen zu einer Säule mit gleichmäßiger Aktivität führen.

Wasser ist ein sehr potenter Desaktivator für Kieselgel und Aluminiumoxid. Werden bei Trennungen Laufmittel mit unterschiedlichen Wassergehalt verwendet, kann es zu Veränderungen der Retentionszeit kommen.

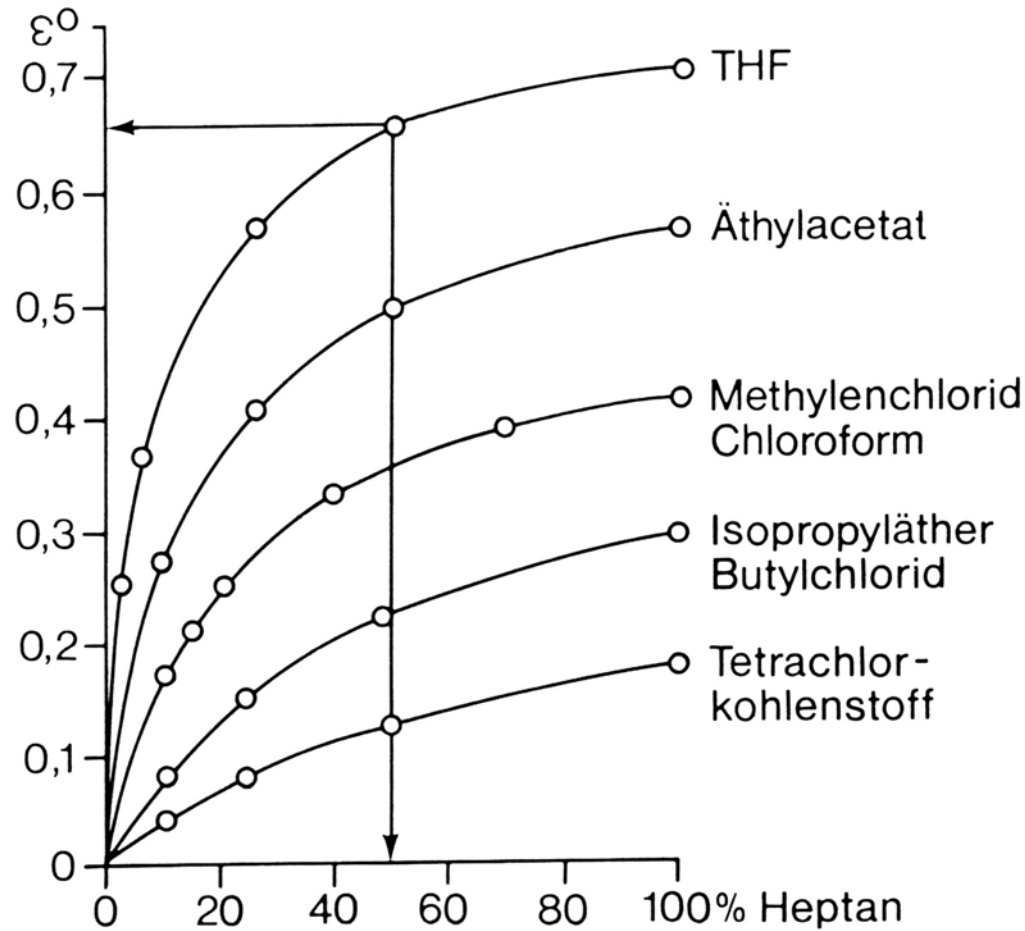
Selektivitätsdreieck



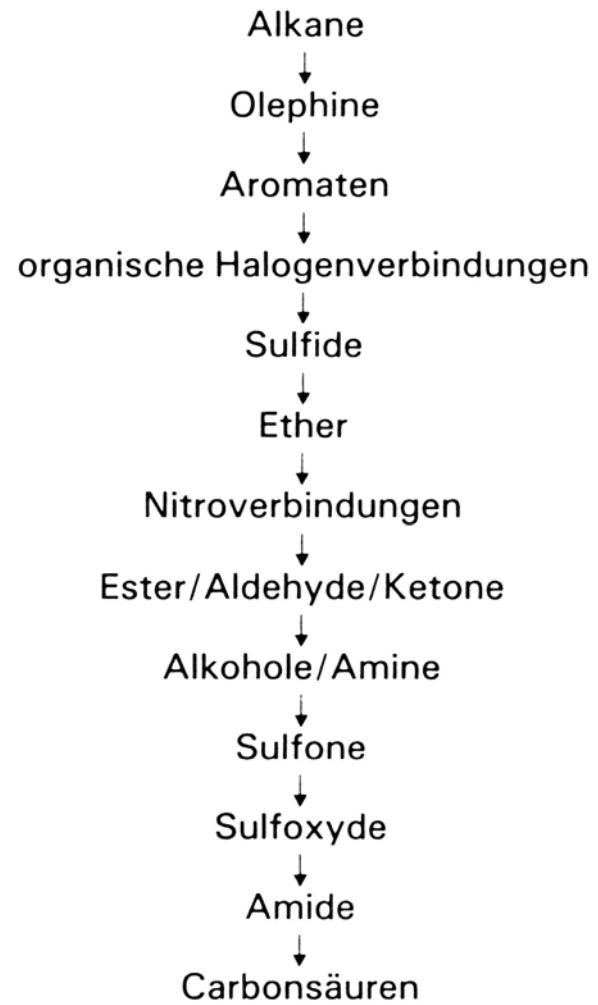
Lösungsmittel	Lösungsmittel- stärke (S_j)	Selektivitäts- gruppe
Pentan	0.0	-
Hexan	0.1	-
Petrolether	0.2	-
Cyclohexan	-0.2	-
Tetrachlorkohlenstoff	1.6	-
Butylchlorid	-0.2	VI
Xylol	2.5	VII
Isopropylether	2.4	II
Isopropylchlorid	1.2	VI
Toluol	2.4	VII
Benzol	2.7	VII
Diethylether	2.8	I
Chloroform	4.1	VIII
Dichlormethan	3.1	V
Tetrahydrofuran	4.0	III
1,2-Dichlorethan	3.5	V
Methyl-Ethylketon	4.7	VI
Aceton	5.1	VI
Dioxan	4.8	VI
Ethylacetat	4.4	VI
Triethylamin	1.9	I
Nitromethan	6.0	VII
Acetonitril	5.8	VI
Pyridin	5.3	III
Propanol	3.9	II
Ethanol	4.3	II
Methanol	5.1	II
Wasser	10.2	VIII

*Lösungsmittelstärke und Selektivitätsgruppe
einiger gebräuchlicher Lösungsmittel*

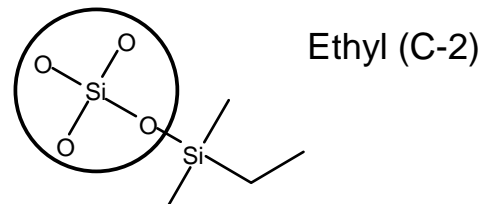
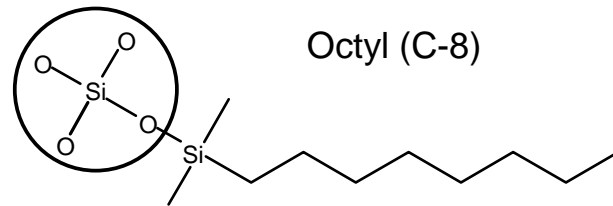
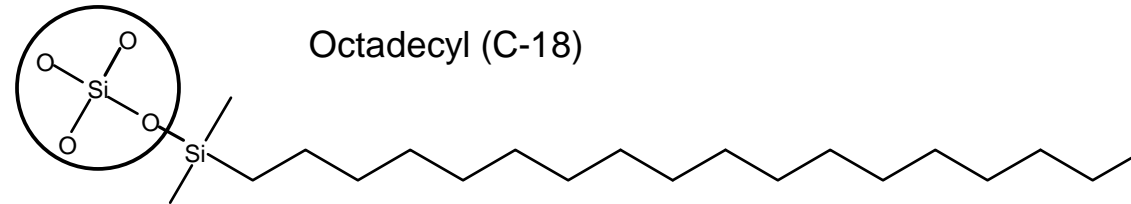
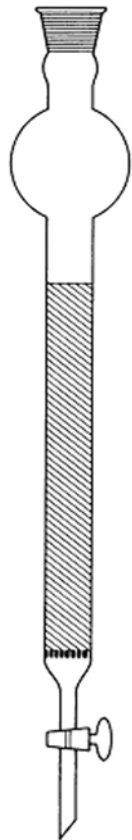
Polarität von Lösungsmittelgemischen:



Elutionsreihenfolge auf Kieselgel:



Reversed-Phase-Chromatographie: klassisches Material



Bei der Reversed-Phase-Chromatographie ist die stationäre Phase im Gegensatz zur "normalen" Adsorptionschromatographie weniger polar als das Elutionsmittel.

Die Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und den zu trennenden Substanzen kommen zwischen den hydrophoben Teilen der Moleküle und den apolaren Teilen der stationären Phase zustande.

Daher werden gut wasserlösliche Substanzen rascher eluiert als hydrophobe.

Vorteile der Reversed-Phase-Chromatographie sind:

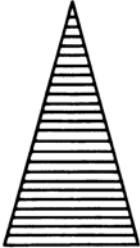
- keine Desaktivatoren im Lösungsmittel nötig
- rasche Gleichgewichtseinstellung
- wässrige Lösungen können direkt eingesetzt werden
- gute Trennung von polaren Komponenten

Nachteile der Reversed-Phase-Chromatographie sind:

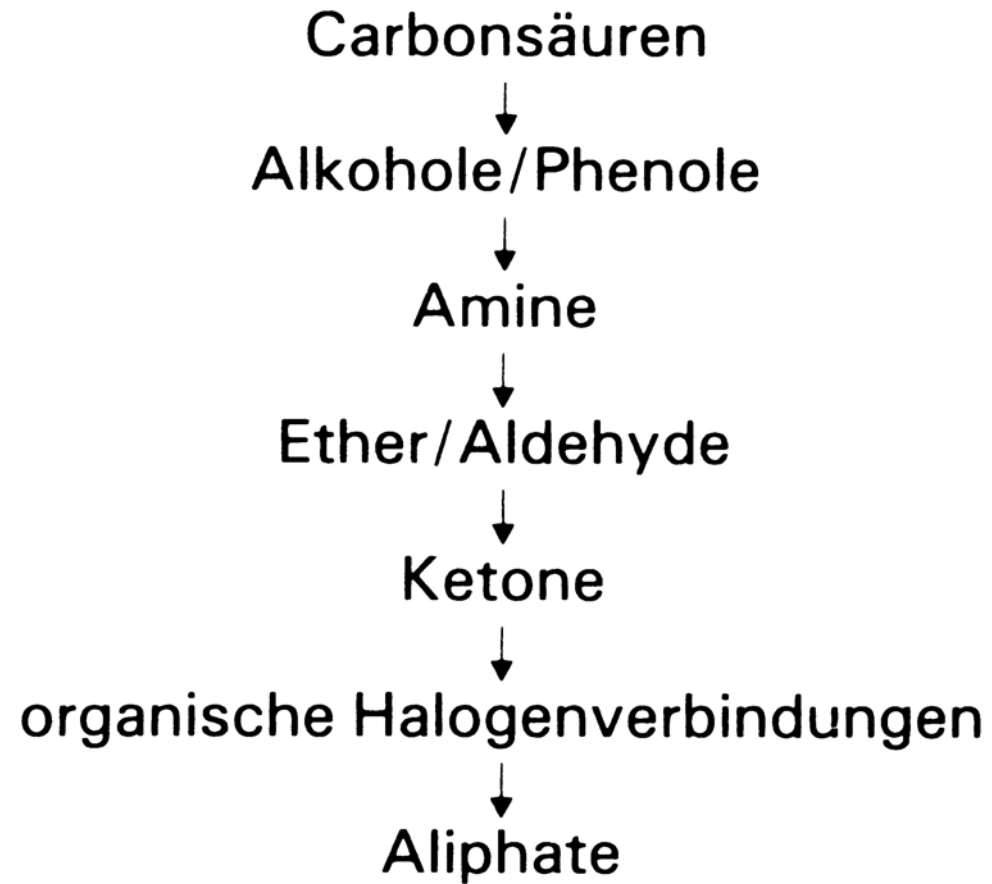
- hoher Preis der stationären Phasen
- schlechte Trennbarkeit von isomeren und diastereomeren Verbindungen

Mobile Phasen für die Reversed-Phase-Chromatographie

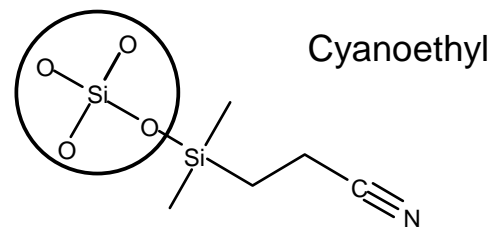
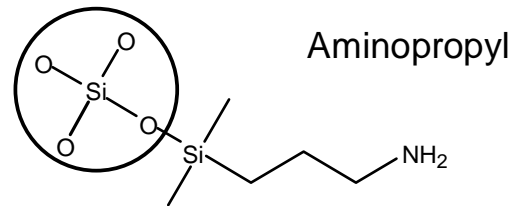
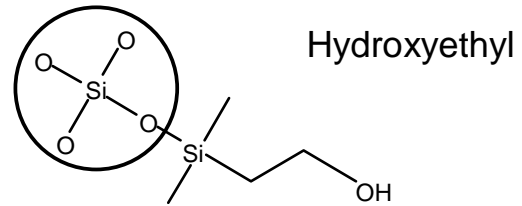
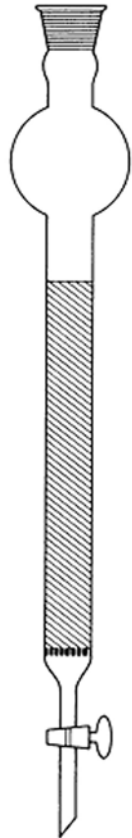
Tabelle 3

Lösungsmittel	Elutionskraft	Dipolparameter	Protonenakzeptorparameter	Protonendonatorparameter	Brechungsindex n	UV-Grenze nm
Wasser		gross	gross	gross	1,333	190
Methanol		5	7,5	7,5	1,329	210
Acetonitril		8	2,5	0	1,344	200
Ethanol		4	5	5	1,361	210
Isopropanol		2,5	4	4	1,38	210
Dioxan		4	3	0	1,422	220

Elutionsreihenfolge auf RP-Material:



Reversed-Phase-Chromatographie: modifiziertes Material mit funktionellen Gruppen



Ionenaustauscher:

Zur Isolierung von hydrophilen Produkten, die nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden können, kommen Ionenaustauscher oder Polymerharze mit speziellen Adsorptionseigenschaften in Betracht.

Ionenaustauscher oder Polymerharze können aber auch zur Abtrennung unerwünschter Ionen, die eine weitere Reinigung behindern würden eingesetzt werden.

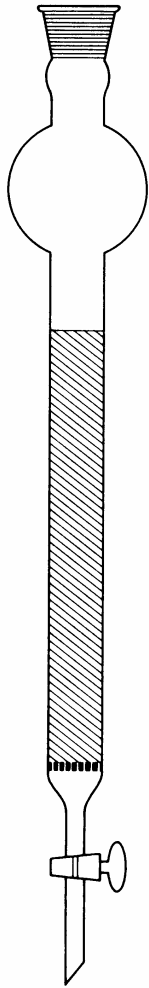
Die Eigenschaften von Ionenaustauschern werden durch strukturelle Faktoren bestimmt:

- Charakter des polymeren Rückgrats
- Grad der Vernetzung
- Art der funktionellen Gruppen

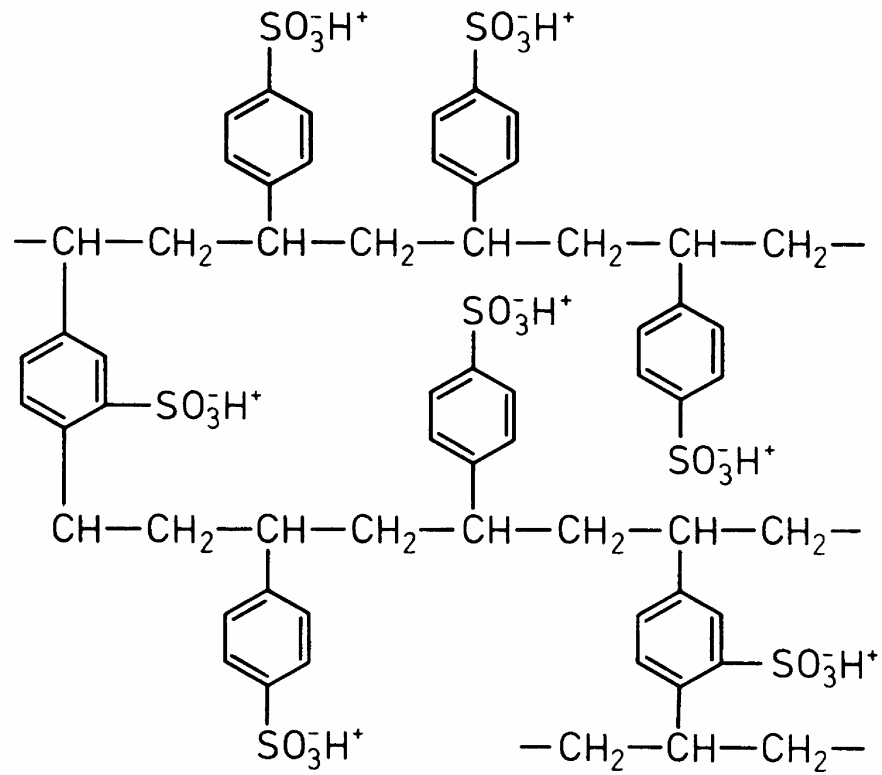
Wichtige physikalische Kenngrößen für Ionenaustausche sind:

- Porenvolumen
- spezifische Oberfläche
- mittlerer Porendurchmesser

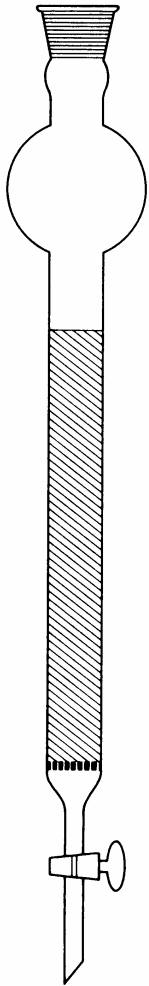
Erfolgt ein Kationenaustausch mit Protonen und ein Anionenaustausch mit Hydroxylionen unmittelbar aufeinander, resultiert eine "Entsalzung".



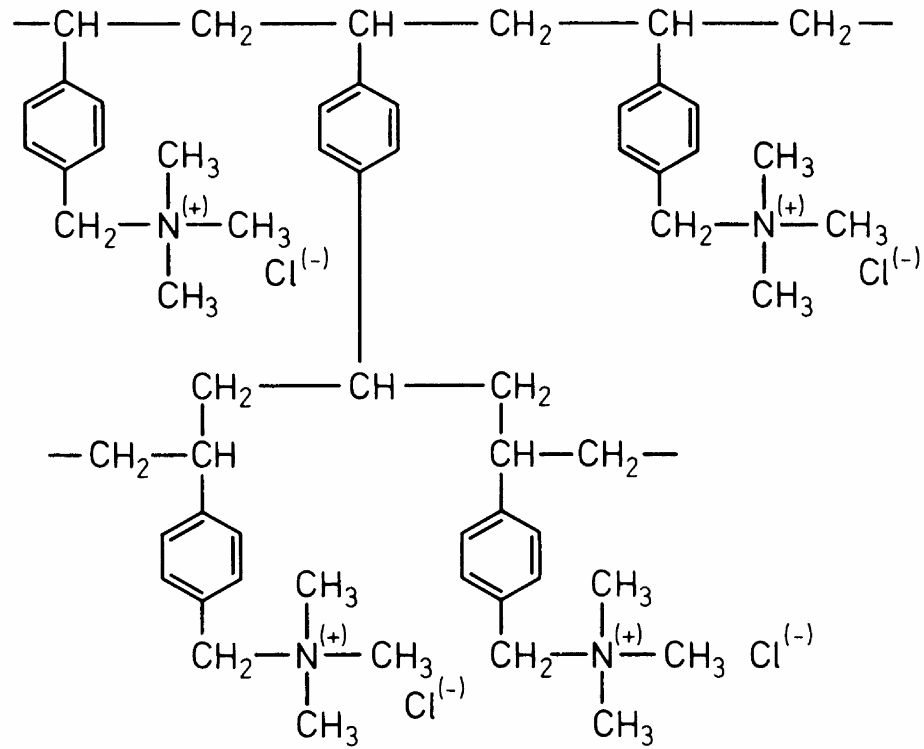
Ionenaustauschersäule



Kationenaustauscher (H⁺-Form)



Ionenaustauschersäule



Anionenaustauscher (Cl⁻-Form)

Absorberharze:

Ausgehend von Ionenaustauschern wurde eine ganze Reihe von Polymerharzen ohne funktionelle Gruppen entwickelt, die auf Grund ihrer selektiven Adsorptionsfähigkeit zur Abtrennung und Konzentrierung von Naturstoffen eingesetzt werden.

Jede Substanz, die aus wässriger Lösung mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden kann, läßt sich prinzipiell auch an ein geeignetes Absorberharz binden und durch ein organisches Lösungsmittel wieder von diesem lösen.

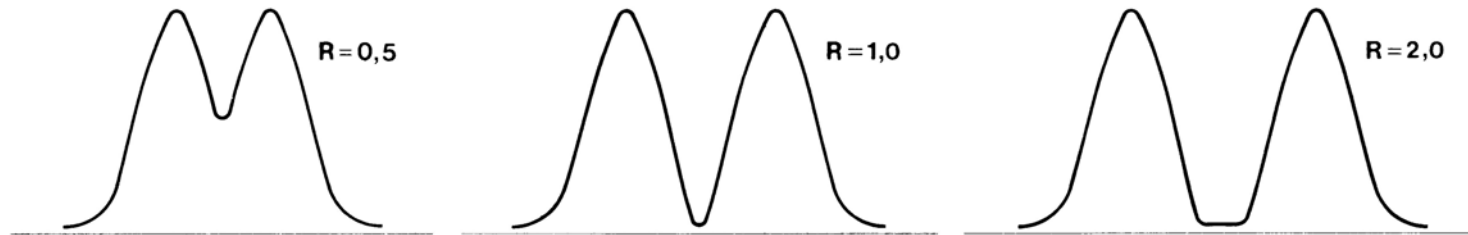
Wichtige physikalische Kenngrößen sind:

- Porenvolumen
- spezifische Oberfläche
- mittlerer Porendurchmesser

Man unterscheidet in Hinblick auf die Polarität folgende Absorberharze:

- unpolare Polystyrole
- mittelpolare Polyacrylester
- polare Polysulfoxide und Polyamide

Häufige Begriffe in der Chromatographie

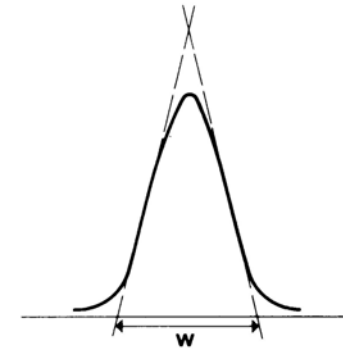


Auflösung R

Die Auflösung ist ein Mass für das Trennvermögen einer Säule ($R = \text{Resolution}$)

Basisbreite w

Die Basisbreite eines Peaks ist die durch die Wendetangenten begrenzte Strecke der Nulllinie



Bodenzahl N

Anzahl theoretischer Gleichgewichtseinstellungen einer Substanz zwischen stationärer und mobiler Phase während des Durchgangs durch die Säule

Chromatogramm

Aufzeichnung aller Detektorsignale einer chromatographischen Trennung

Eluent

Mobile Phase, Lösungsmittel

Eluieren

Herauslösen der Substanz aus der Säule

Elutrope Reihe	Aufreihung von Lösungsmitteln nach steigender Elutionskraft
Extinktion E	Abschwächung eines Lichtstrahls beim Durchtritt durch eine Lösung
Fließgeschwindigkeit u	Durchflussgeschwindigkeit der mobilen Phase durch die Säule in mm/sec

Fronting Formabweichung der vorderen Peakflanke (Vorderseite flacher als Rückseite)



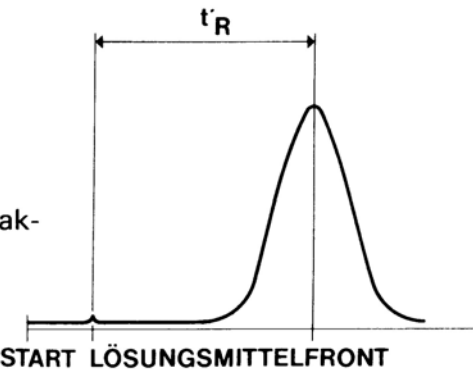
HETP Höhe eines theoretischen Bodens (HETP = Height Equivalent to a Theoretical Plate)

Isokratisch Durchführung der chromatographischen Trennung ohne Veränderung der mobilen Phase

Mobile Phase Lösungsmittel, Eluent

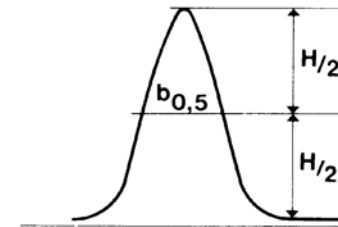
Netto-Retentionszeit t'_R Zeit vom Durchbruch der mobilen Phase bis zum Peakmaximum

Peak Aufzeichnung eines Detektorsignals in Form einer Glockenkurve



Peakbreite $b_{0,5}$

Peakbreite auf halber Höhe



Peaksymmetrie T (S.I.)

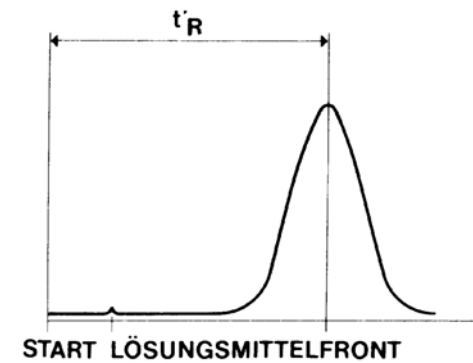
Masszahl zur Beurteilung der geometrischen Regelmässigkeit eines Peaks

Polarität E°

Empirisch ermittelte Zahl für die Elutionskraft (= Stärke) eines Lösungsmittels

Retentionszeit t_R

Zeit vom Substanzauftrag bis zum Peakmaximum



Reversed Phase

Chemisch modifizierte Kieselgele, wobei die stationäre Phase eine geringere Polarität aufweist als die mobile Phase (= umgekehrte Phase)

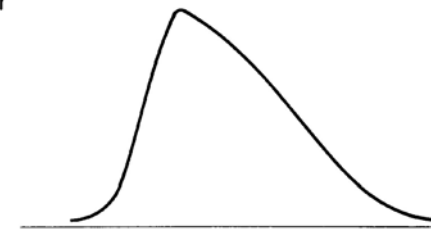
Stationäre Phase

Säulenfüllmaterial

Scaling up Vergrößerung des Durchführungsmaßstabes
 Sedimentieren Absetzen lassen aufgeschlämmter Teilchen
 Selektivität Maß für die trennspezifischen Eigenschaften eines chromatographischen Systems
 Slurry Aufschlämmung der stationären Phase in einer Flüssigkeit

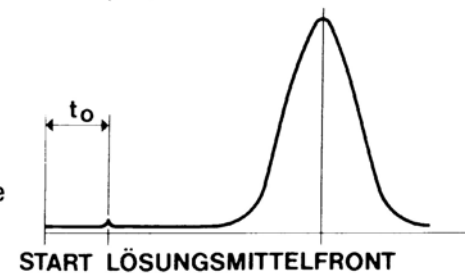
Stufengradient Schrittweise Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase

Tailing Formabweichung der hinteren Peakflanke (Rückseite flacher als Vorderseite)



Totvolumen v_0 ‹Leerraum› im gesamten chromatographischen System oder dem zur Diskussion stehenden Teil davon

Totzeit t_0 Zeit, die vom Lösungsmittel benötigt wird, um die Säule zu durchwandern



Trennstufe Theoretische Gleichgewichtseinstellung zwischen der Substanz und den beiden Phasen in der Säule

Gebäuchlichste Formeln

Bodenzahl

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2$$

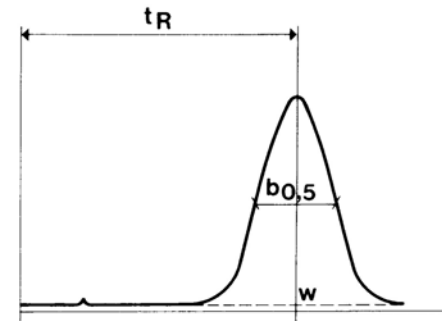
$$N = 5,55 \left(\frac{t_R}{b_{0,5}} \right)^2$$

t_R = Retentionszeit

ω = Basisbreite

$b_{0,5}$ = Peakbreite auf halber Höhe

Alle Werte in mm, min oder sec (immer gleiche Einheit!)



Auflösung

$$R = \frac{2(t'_{R2} - t'_{R1})}{W_1 + W_2}$$

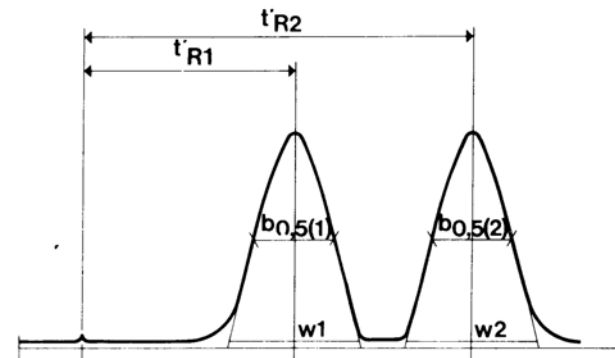
$$R = \frac{1,177(t'_{R2} - t'_{R1})}{b_{0,5(1)} + b_{0,5(2)}}$$

t'_R = Nettoretentionszeit

ω = Basisbreite

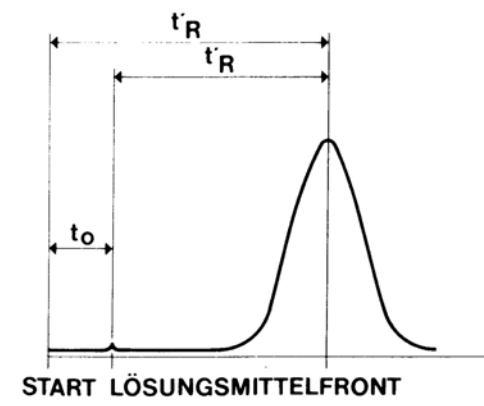
$b_{0,5}$ = Peakbreite auf halber Höhe

Alle Werte in mm, min oder sec (immer gleiche Einheit!)



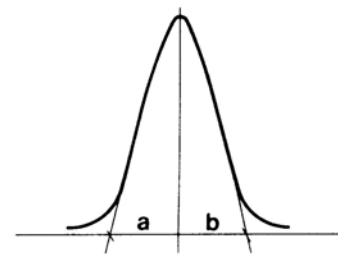
Netto-Retentionszeit

$t'_R = t_R - t_0$
 $t_R = \text{Gesamtretentionszeit}$
 $t_0 = \text{Totzeit}$



Peaksymmetrie T (S.I.)

$$T = \frac{a}{b}; \quad a \geq b$$



Für präparative Zwecke werden dafür Säulen unterschiedlicher Dimension verwendet, die das jeweilige Trennmittel enthalten. Apparativ unterscheidet man:

Vakuum-Flash-Chromatographie:

Als Säule dient eine Nutsche mit Glassinter-Frittenboden.

Durchmesser:Füllhöhe ~ 1:1; Stationärer Phase:Substanzmenge ~ 1:10 bis 1:20.

Zur Beschleunigung des Lösungsmittelflusses wird am Säulenende Vakuum angelegt.

Das Elutionsmittel wird portionsweise durch die stationäre Phase gesaugt, in einem evakuierbaren Gefäß gesammelt und dannach in einen Kolben abgelassen.

Gut geeignet: bei großem Retentionszeitunterschied, für große Substanzmengen

Flash-Chromatographie:

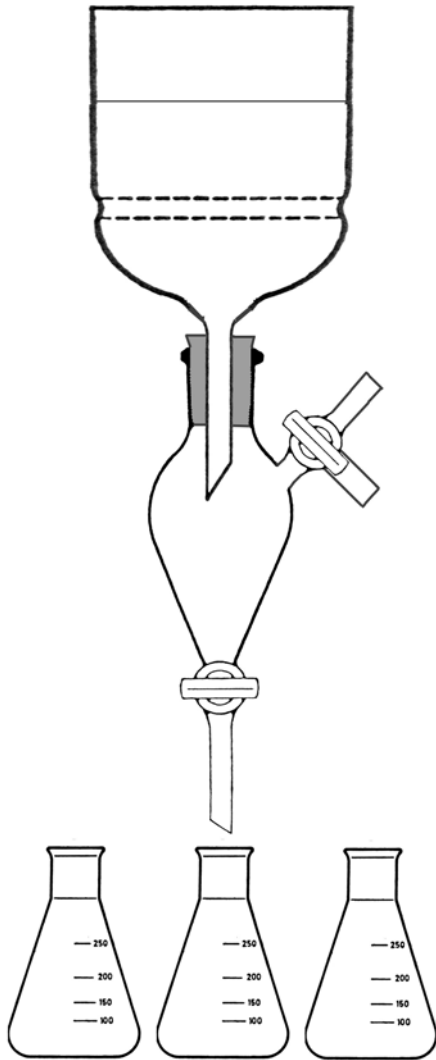
Die Trennsäule ist mit Hahn, Glassinter-Fritte und Schliff am Ende versehen.

Durchmesser:Füllhöhe ~ 1:5 bis 1:10; Stationärer Phase:Substanzmenge ~ 1:50 bis 1:100.

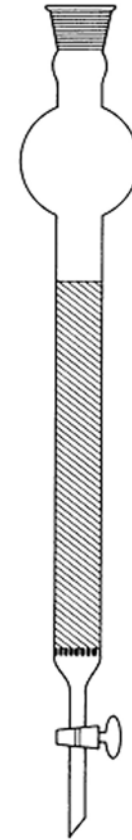
Zur Beschleunigung des Lösungsmittelflusses wird Druck (max. 1 bar) angelegt.

Das Elutionsmittel wird kontinuierlich durch die stationäre Phase gepreßt, mithilfe des Hahns zu Fraktionen portioniert und dannach in Gefäßen gesammelt.

Gut geeignet: bei geringem Retentionszeitunterschied, für kleine Substanzmengen



Vacuum-Flash-Chromatographie



Flash-Chromatographie

MPLC und präparative HPLC:

Als Säulen werden kunststoffverstärkte Glaszylinder (MPLC, Druck max. etwa 20 bar) oder Metallzylinder (HPLC) verwendet.

Ein kontinuierlicher Lösungsmittelfluß wird mit einer Pumpe bewerkstelligt.

Eine definierte Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung (= Gradient) kann durch zwei oder mehrer Pumpen und eine Mischkammer erreicht werden.

Die Aubringung der Substanz erfolgt mithilfe einer Probenschleife.

Als stationäre Phasen dienen Kieselgel oder RP-Material geringer Korngröße.

- MPLC: 15-25 μm , 25-40 μm oder 40-63 μm

- präparative HPLC: 5 μm , 10 μm

Auch die geometrische Form der Partikel spielt eine Rolle; sphärische Partikel lassen sich gleichmäßiger und damit dichter packen als irreguläre.

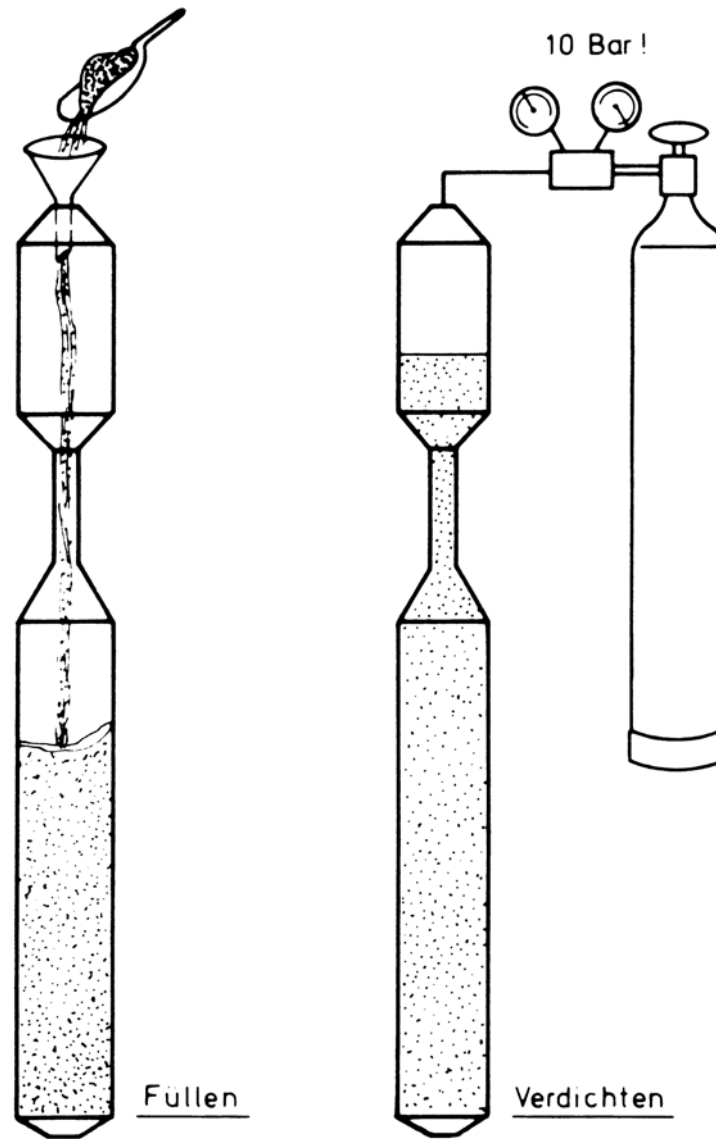
Zum Monitoring der Fraktionen dient ein UV oder Brechungsindexdetektor.

Die Sammlung der Fraktionen erfolgt mit einem Fraktionskollektor.

Steuerung und Dokumentation kann durch einen PC bewerkstelligt werden.

Gut geeignet: bei sehr geringem Retentionszeitunterschied, für kleine Substanzmengen bei Trennungen, die immer wieder durchzuführen sind

Befüllen einer MPLC-Säule:



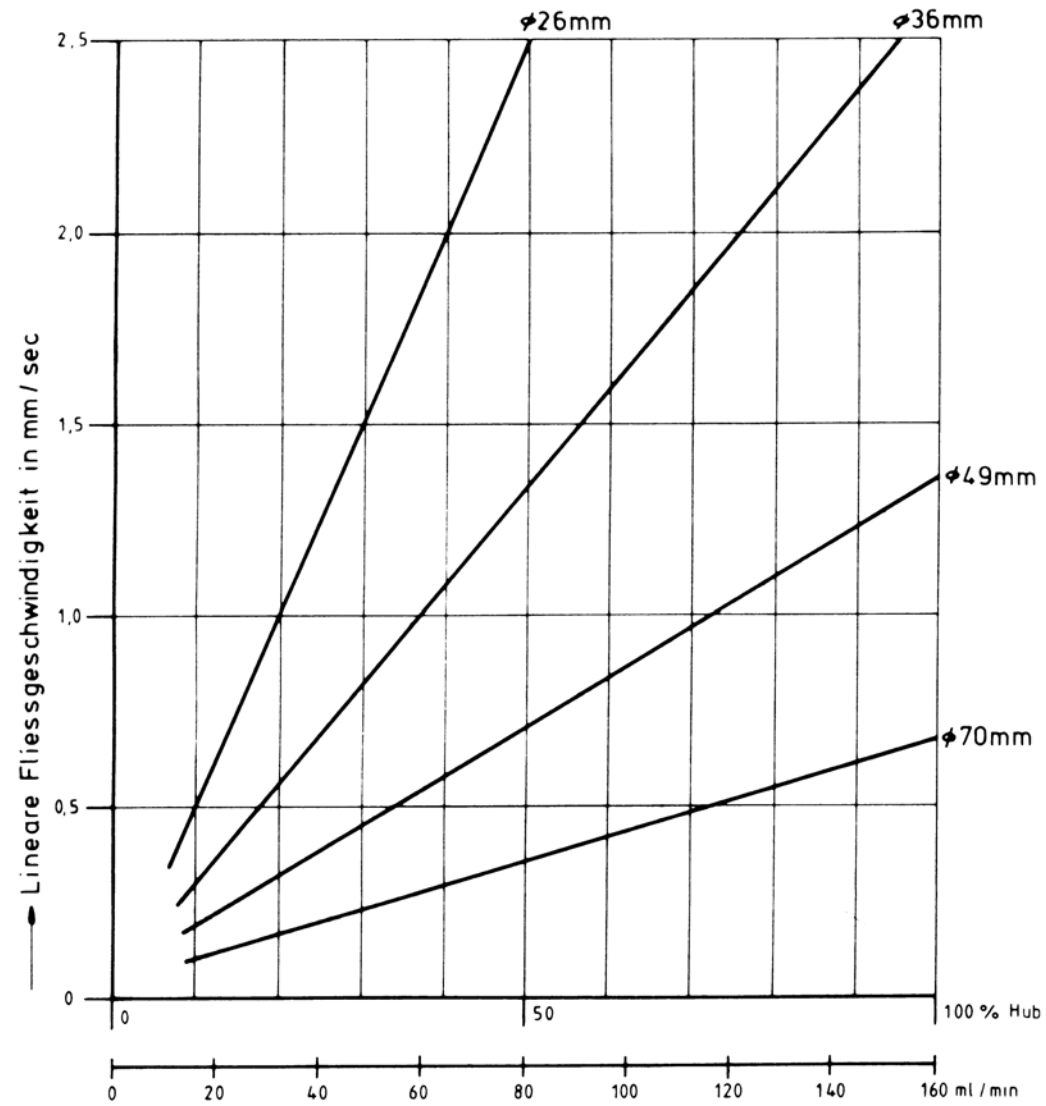


Tabelle 4: Abhängigkeit der linearen Fließgeschwindigkeit von der Fördermenge

Optimieren der Laufmittelzusammensetzung:

Die optimale Laufmittelzusammensetzung für eine präparative Trennung ermittelt man am besten durch dünnschichtchromatographische Vorversuche.

Es gibt viele Gründe, warum die Dünnschichtchromatographie (= DC) hervorragend zur Vorabklärung für Säulenchromatographie geeignet ist:

- Die DC ist schnell; viele Lösungsmittel können problemlos parallel auf ihre Eignung als mobile Phase geprüft werden.
- Die DC ist einfach durchführbar, preiswert und nicht zeitintensiv
- Die DC erlaubt eine einfache Detektion der Substanzen, sei es durch UV-Licht oder selektive Sprühreagentien
- Die DC liefert Informationen über Kapazitätsfaktor k' und Trennfaktor α

Eine gute DC-Vorabklärung erspart unnötige Versuche auf der Säule !

Voraussetzung ist allerdings, daß der Sorptionsmitteltyp auf der DC-Platte oder Folie und der Säule identisch ist.

Das Dünnschicht-Chromatogramm

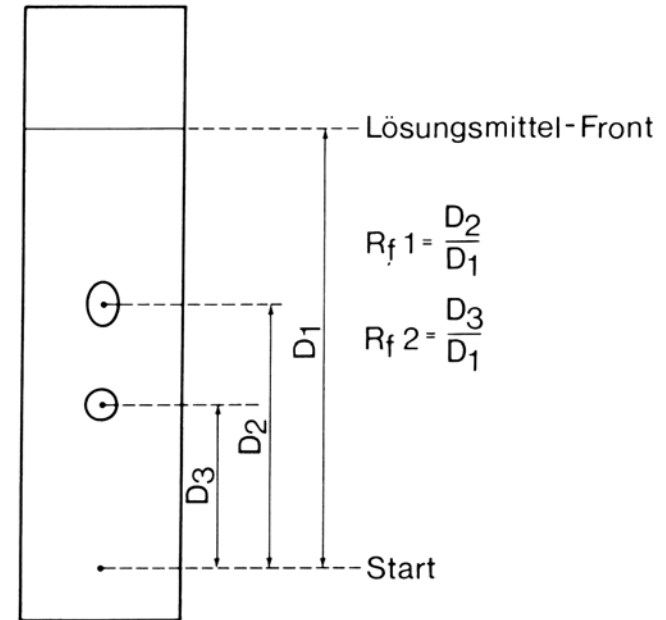
Das Dünnschicht-Chromatogramm liefert primär R_f -Werte.

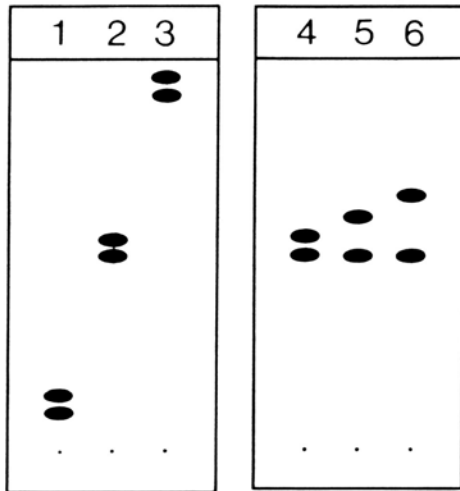
$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke der Substanz}}{\text{Laufstrecke der Lösungsmittel-Front}}$$

In beiden Fällen wird die Laufstrecke ab Startpunkt der Substanz gemessen. Als Laufstrecke der Substanz gilt die Strecke bis zum Mittelpunkt des Substanz-Flecks.

Kapazitätsfaktor: $k' = \frac{1}{R_f} - 1$

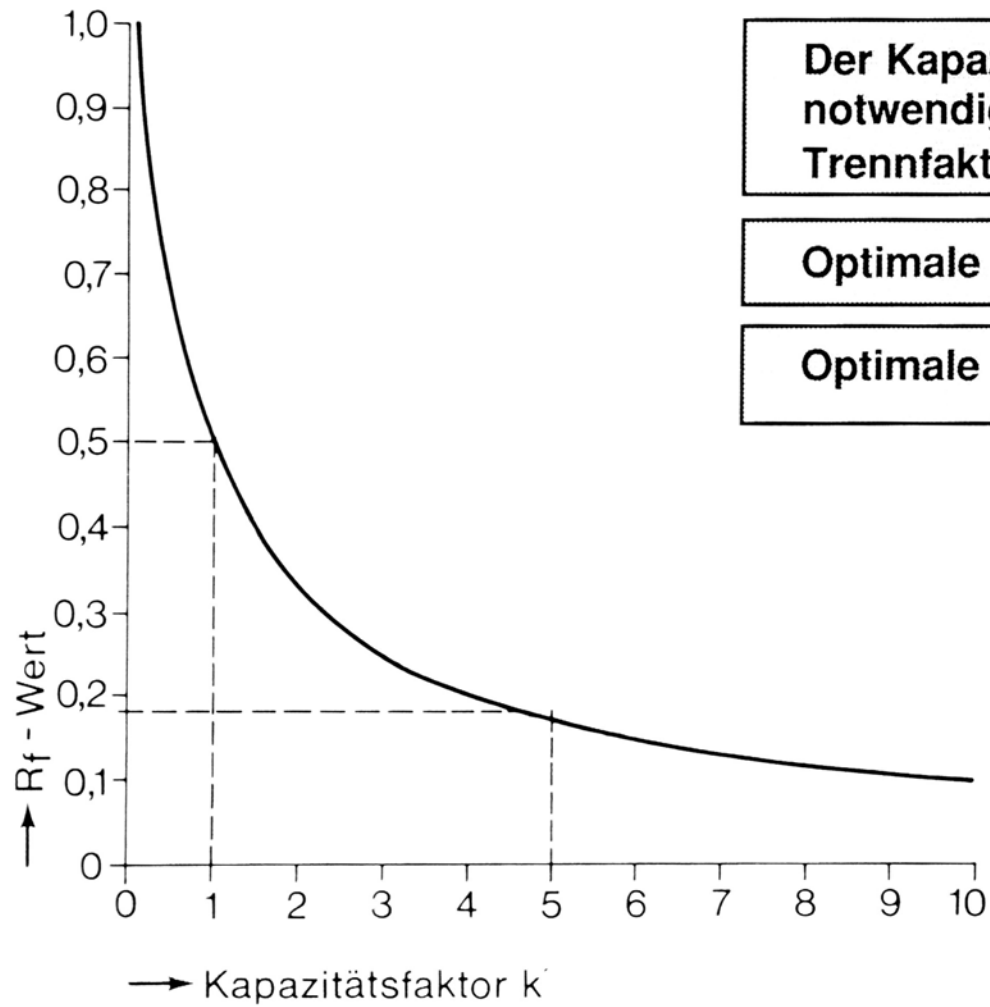
Trennfaktor: $\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$





Beispiel	R_{f1}	R_{f2}	ΔR_f	k'_1	k'_2	α	N für $R = 1,0$
1	0,15	0,10	0,05	5,67	9,00	1,59	144
2	0,55	0,50	0,05	0,82	1,00	1,22	1932
3	0,95	0,90	0,05	0,05	0,11	2,11	5776

Beispiel	R_{f1}	R_{f2}	ΔR_f	k'_1	k'_2	α	N für $R = 1,0$
4	0,55	0,50	0,05	0,82	1,00	1,22	1932
5	0,60	0,50	0,10	0,67	1,00	1,50	576
6	0,65	0,50	0,15	0,54	1,00	1,86	300



Der Kapazitätsfaktor k'_2 beeinflusst die notwendige Trennleistung stärker als der Trennfaktor α

Optimale k'_2 -Werte liegen im Bereich 1-5

Optimale α -Werte sind $\geq 1,15$

Beispiel einer Lösungsmittlevaluation:

1. Schritt:

Je ein DC mit einem Lösungsmittel der Selektivitätsgruppe I, II, V, VI und VIII

2. Schritt:

DC mit Rf-Werten $>0,8$ wiederholen;

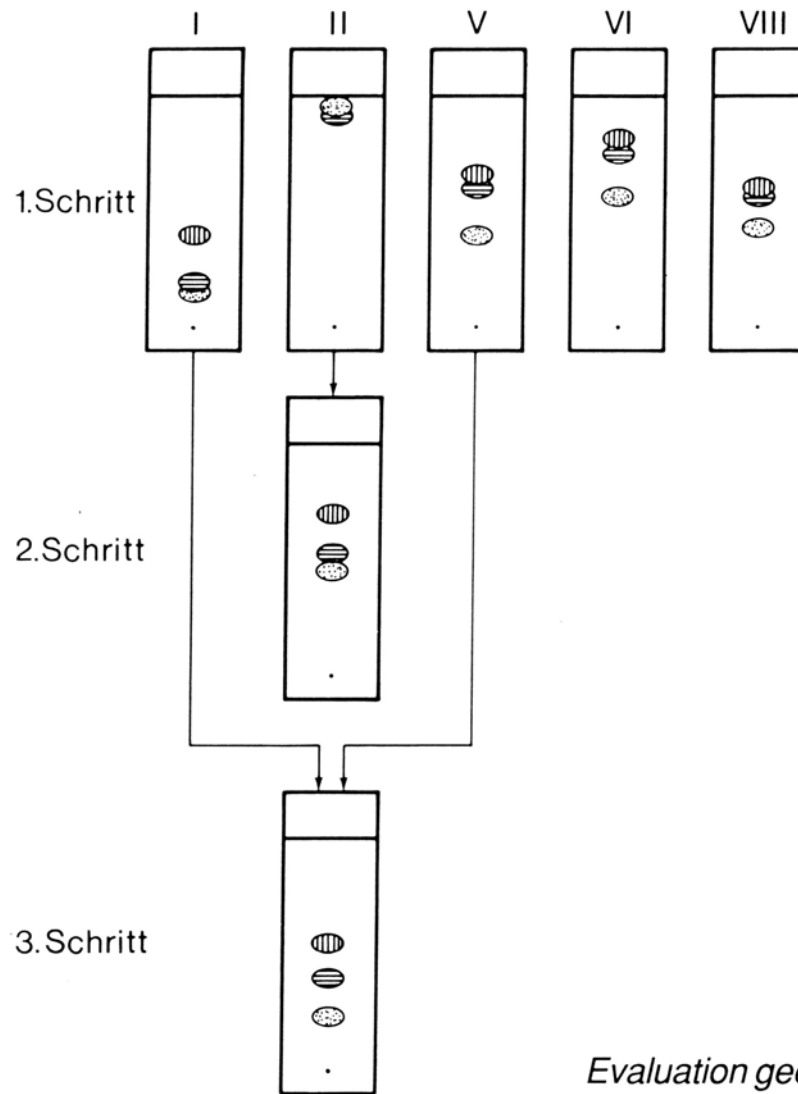
Polarität des Lösungsmittels durch Mischen mit Hexan reduzieren

3. Schritt:

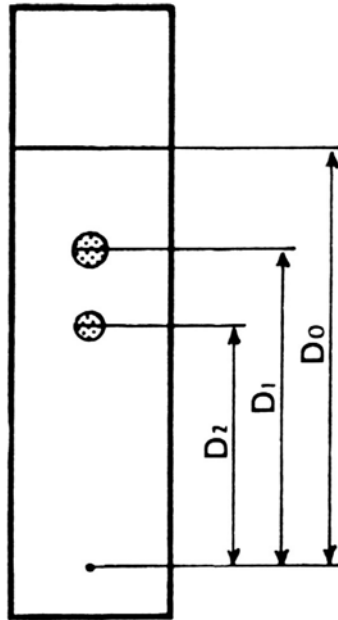
Das beste oder die besten Lösungsmittel auswählen

Bei 2 oder 3 Lösungsmittel mit jeweils spezifischen Vorteilen

diese zu gleiche Volumsteilen mischen und DC wiederholen



Evaluation geeigneter mobiler Phasen

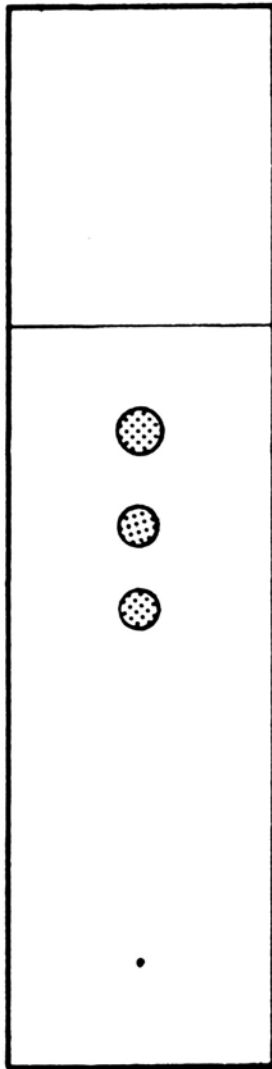


$$R_f = \frac{D_1}{D_0}$$

$$k' = \frac{1}{R_f} - 1$$

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

$$N_{R=1.0} = \left\{ \frac{1}{\frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right)} \right\}^2$$



$$Rf_1 = 0,83; k'_1 = 0,20$$

$$Rf_2 = 0,69; k'_2 = 0,45$$

$$Rf_3 = 0,55; k'_3 = 0,80$$

$$\alpha_1 = 2,25; N_{R=1,0} = 538$$

$$\alpha_2 = 1,78; N_{R=1,0} = 422$$