


Hochleistungs- flüssigkeits- chromatographie Theoretische Grundlagen

FÜR EINE
BESSERE WISSENSCHAFT

AGILENT AND YOU





Agilent Technologies engagiert sich für Ausbildung und Lehre und möchte den Zugang zu firmeneigenem Material ermöglichen.

Diese Präsentation wurde von Agilent Technologies erstellt. Die Verwendung der Präsentation ist nur für Lehrzwecke bestimmt.

Sollen Bilder, Schaubilder oder Zeichnungen für andere Zwecke verwendet werden, nehmen Sie bitte vorher Kontakt mit Agilent Technologies auf.

Einführung

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC für „high-performance liquid chromatography“, früher auch für „high-pressure liquid chromatography“, Hochdruckflüssigchromatographie) ist eine Technik der analytischen Chemie, die zur Trennung von Komponenten in einer Mischung, zur Identifizierung der jeweiligen Komponenten und zur Quantifizierung der Komponenten verwendet wird.

Bei der HPLC wird mithilfe von Pumpen ein unter Druck stehendes flüssiges Lösemittel, das die Probenmischung enthält, durch eine Säule gedrückt, die mit einem festem Adsorbens gefüllt ist. Jede Komponente in der Probe tritt auf etwas andere Weise als die anderen Komponenten in Wechselwirkung mit dem Adsorbens. Dies führt für zu unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten für die unterschiedlichen Komponenten und dazu, dass die Komponenten getrennt sind, wenn sie aus der Säule austreten.

Quelle: Wikipedia

Inhaltsverzeichnis (Inhalt)

Einführung

- [Was passiert in der Säule?](#)

Wichtige Parameter

- [Retentionszeit und Peakbreite](#)
- [Auflösung – Basislinientrennung](#)
- [Auflösung – Grundgleichung](#)
- [Effizienz oder Anzahl der theoretischen Trennstufen](#)
- [Retentionsfaktor](#)
- [Selektivität oder Trennfaktor](#)

Was beeinflusst die Selektivität?

- [Selektivität – Beispiel 1](#)
- [Selektivität – Beispiel 2](#)
- [Selektivität – Beispiel 3](#)
- [Trennstufenzahl](#)

Van-Deemter-Gleichung

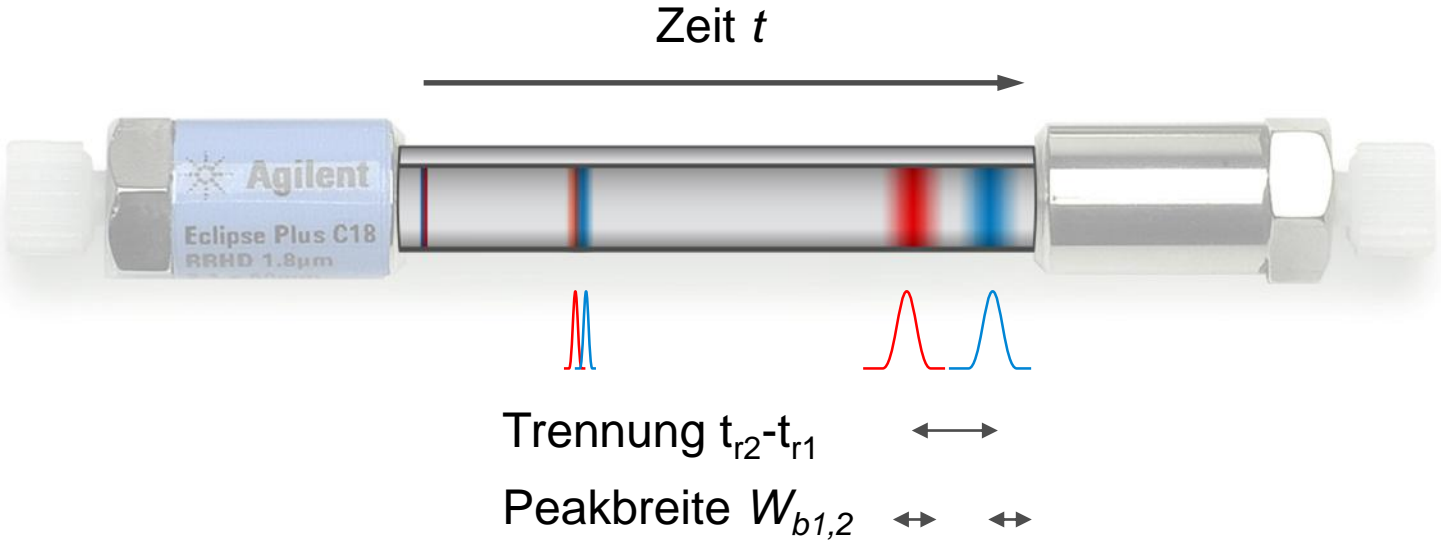
- [Eddy-Diffusion](#)
- [Axiale Diffusion](#)
- [Stofftransportwiderstand](#)
- [Mehr über Van Deemter](#)

Peakkapazität

- [Gradientenanalyse](#)
- [Definition](#)
- [Berechnung der Peakkapazität](#)
- [Peakbreite](#)
- [Beispiel](#)

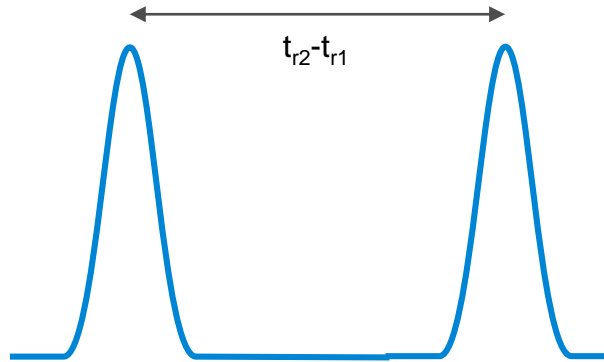
Einführung

Was passiert in der Säule?

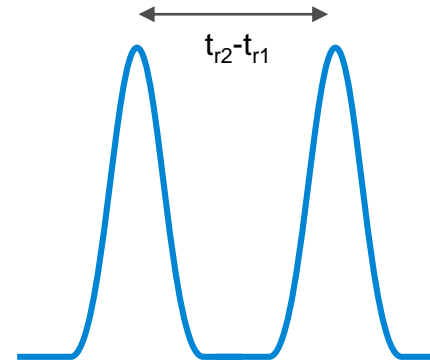


Einführung

Was passiert in der Säule?

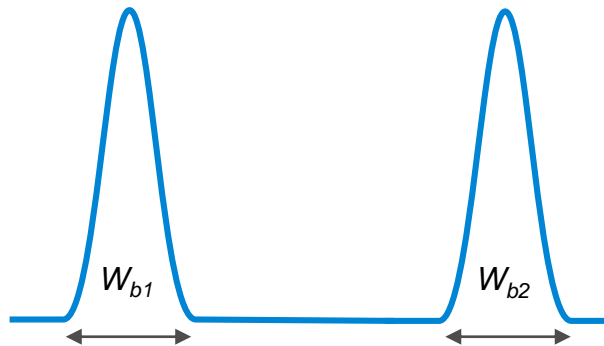


Bessere Trennung

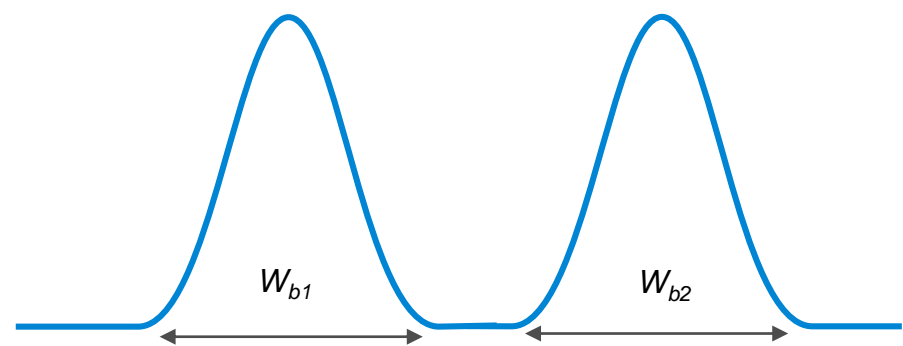


Schlechtere Trennung

vs.



Bessere Trennung



Schlechtere Trennung

vs.

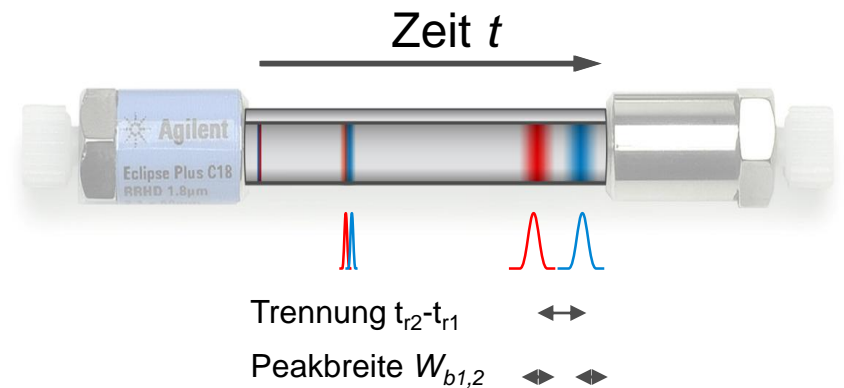
Einführung

Was passiert in der Säule?

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2 \cdot (W_{b2} + W_{b1})}$$

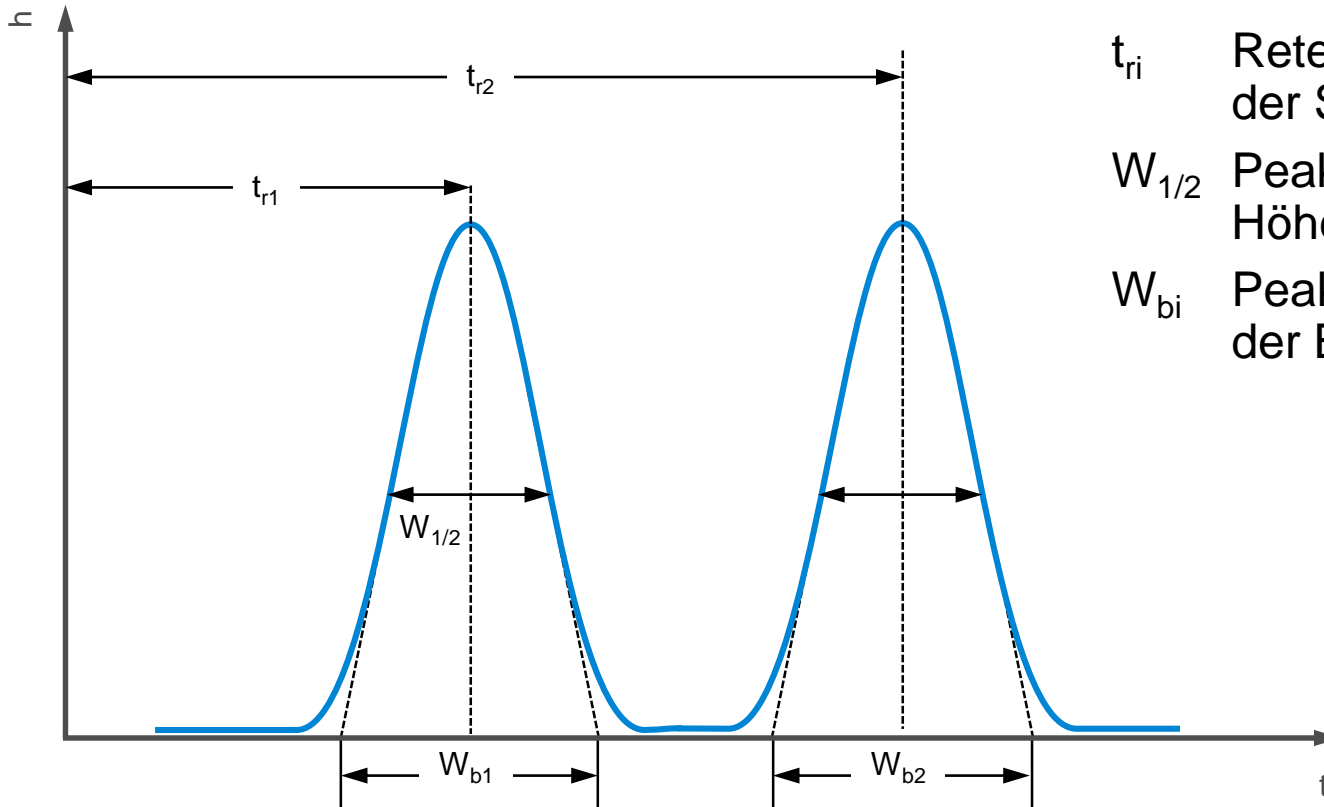
Die Auflösung beschreibt die Fähigkeit einer Säule, die Peaks, die uns interessieren, zu trennen.

Die Auflösung beschreibt, ob wir eine Basislinientrennung erreicht haben oder nicht.



Wichtige Parameter

Retentionszeit und Peakbreite



t_{ri} Retentionszeit
der Substanz i

$W_{1/2}$ Peakbreite in halber
Höhe

W_{bi} Peakbreite an
der Basislinie

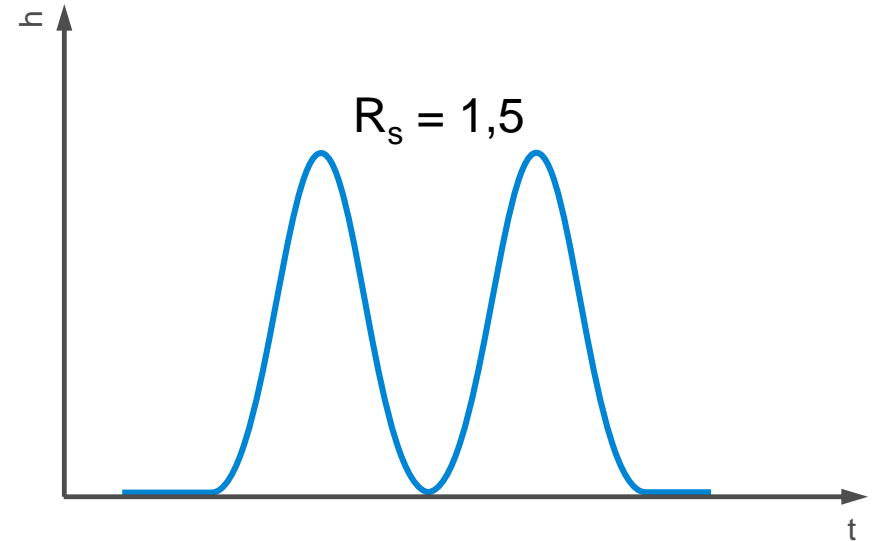
Wichtige Parameter

Auflösung – Basislinientrennung

Die Auflösung beschreibt die Fähigkeit einer Säule, die Peaks, die uns interessieren, zu trennen.

Die Auflösung berücksichtigt die Effizienz (N), die Selektivität (α) und die Retention (k).

- Ein Wert von 1 ist der Mindestwert für das Auftreten einer messbaren Trennung, die auch eine angemessene Quantifizierung ermöglicht.
- Ein Wert von 0,6 ist erforderlich, um ein Tal zwischen zwei gleich hohen Peaks zu erkennen.
- Ein Wert von 1,7 oder höher ist im Allgemeinen für robuste Methoden wünschenswert.
- Ein Wert von 1,6 stellt eine Basislinientrennung dar und stellt genaue quantitative Ergebnisse sicher.



Wichtige Parameter

Auflösung – Grundgleichung der (U)HPLC

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4} \sqrt{N}}_{\text{Effizienz}} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)}_{\text{Selektivität}} \cdot \underbrace{\left(\frac{k}{1 + k} \right)}_{\text{Retention}}$$

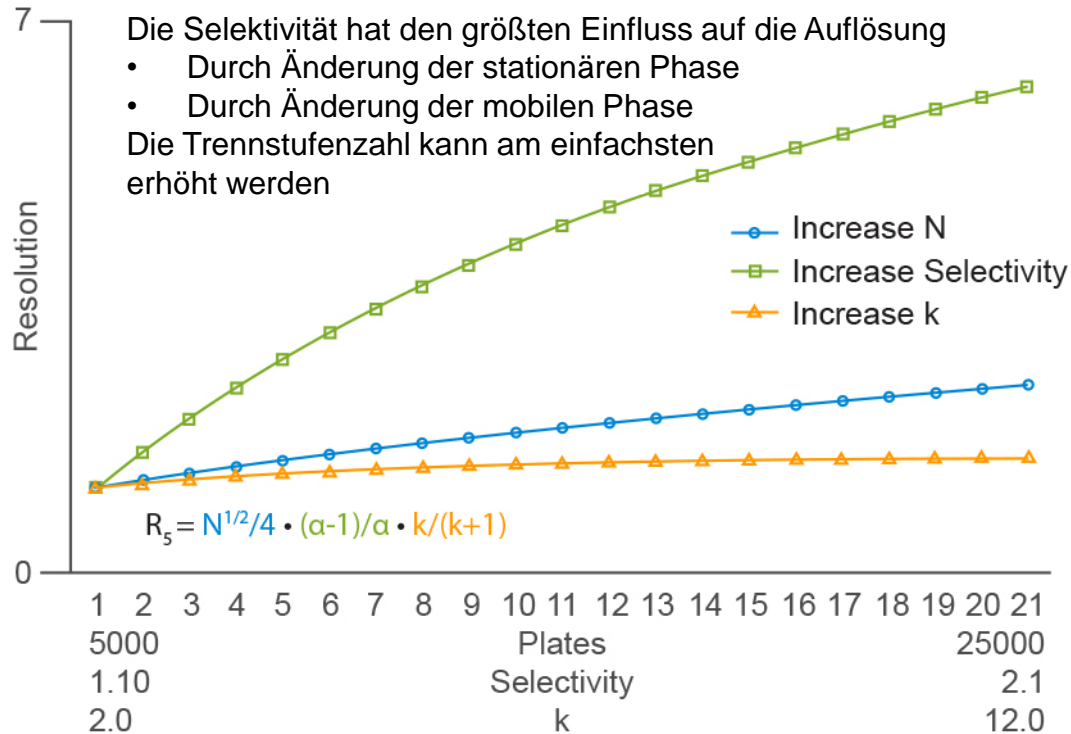
Effizienz **Selektivität** **Retention**

Durch die Verbesserung eines dieser Parameter wird auch die Auflösung verbessert.

- Die Selektivität hat dabei den größten Einfluss auf die Auflösung. Kleine Änderungen der Selektivität führen zu großen Veränderungen bei der Auflösung.
- Die Retention hat nur einen bedeutenden Einfluss, wenn die k-Werte klein sind.
- Die Effizienz beschreibt die Trennleistung einer Säule.

Wichtige Parameter

Auflösung – Grundgleichung der (U)HPLC



Die Abbildung stellt die Auflösung als Funktion der Selektivität, Trennleistung der Säule oder Retention dar.

Wichtige Parameter

Effizienz oder Anzahl der theoretischen Trennstufen (N)

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 \qquad N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

Die Trennleistung der Säule wird verwendet, um die Leistung verschiedener Säulen zu vergleichen. Sie wird in der Anzahl der theoretischen Trennstufen (oder auch Böden genannt) (N) ausgedrückt.

Säulen mit hohen Trennstufenzahlen sind effizienter. Eine Säule mit hohem N liefert für eine gegebene Retentionszeit schmalere Peaks als eine Säule mit niedrigem N.

Parameter, welche die Trennleistung der Säule beeinflussen:

- Säulenlänge (größere Säulenlänge steigert die Trennleistung)
- Partikelgröße (kleinere Partikelgröße steigert die Trennleistung)

Wichtige Parameter

Retentionsfaktor (k)

$$k = \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right)$$

Der Retentionsfaktor ist ein Maß für die Zeit, die eine Probenkomponente in einer stationären Phase verweilt, im Verhältnis zu der Zeit, die sie in der mobilen Phase verweilt. Er wird berechnet, indem die Retentionszeit durch die Zeit für einen nicht retardierten Peak (t_0) dividiert wird.

Parameter, die den Retentionsfaktor beeinflussen:

- Stationäre Phase
- Mobile Phase
- Gradientensteilheit*
- Totvolumen des Systems*

*nur bei Gradientenelution

Wichtige Parameter

Retentionsfaktor (k) – Gradientenelution

$$k' = \frac{t_G \cdot F}{S \cdot \Delta\Phi \cdot V_m}$$

Die Gleichung zeigt, wie der Retentionsfaktor von der Flussrate (F), der Gradientendauer (t_G), dem Gradientenbereich ($\Delta\Phi$) und dem Säulenvolumen (V_m) beeinflusst wird.

Zur Erinnerung: Um den Retentionsfaktor konstant zu halten, müssen Änderungen im Nenner durch proportionale Änderungen im Zähler ausgeglichen werden, und umgekehrt.

Wichtige Parameter

Selektivität oder Trennfaktor (α)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

α	Selektivität
k_1	Retentionsfaktor des 1. Peaks
k_{2i}	Retentionsfaktor des 2. Peaks

Die Selektivität ist ein Maß für die Zeit oder den Abstand zwischen den Maximalwerten zweier Peaks. Ist $\alpha = 1$, haben die zwei Peaks die gleiche Retentionszeit und koeluiieren. Die Selektivität ist definiert als Verhältnis der Kapazitätsfaktoren.

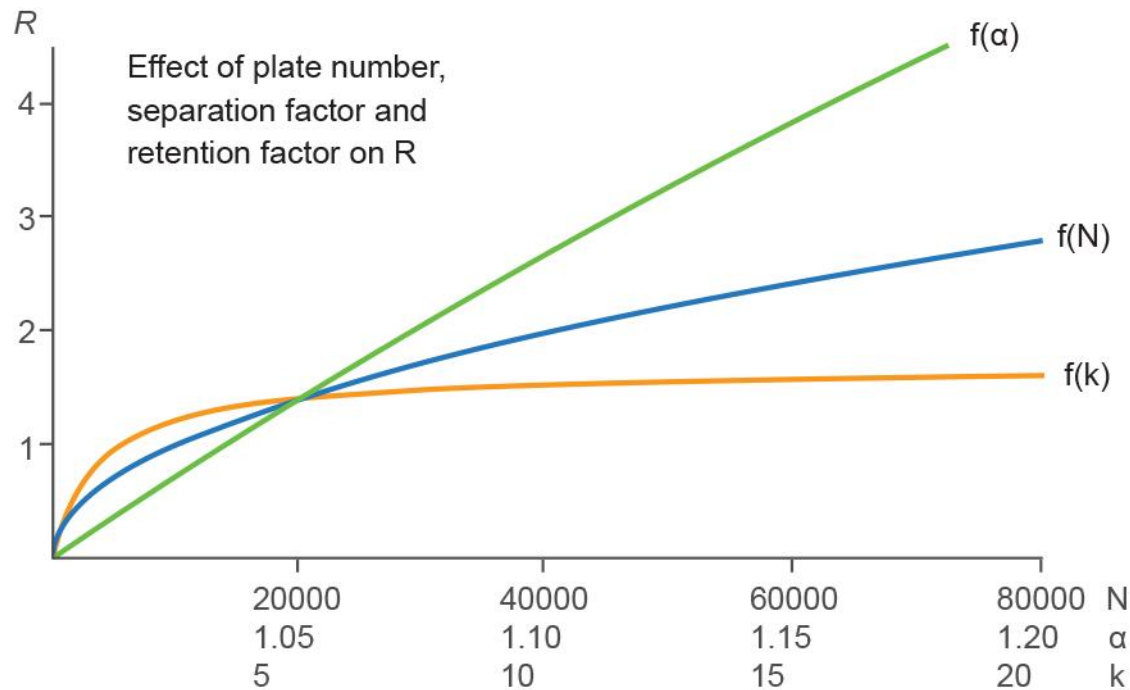
Parameter, die den Retentionsfaktor beeinflussen:

- Stationäre Phase
- Mobile Phase
- Temperatur

Wichtige Parameter

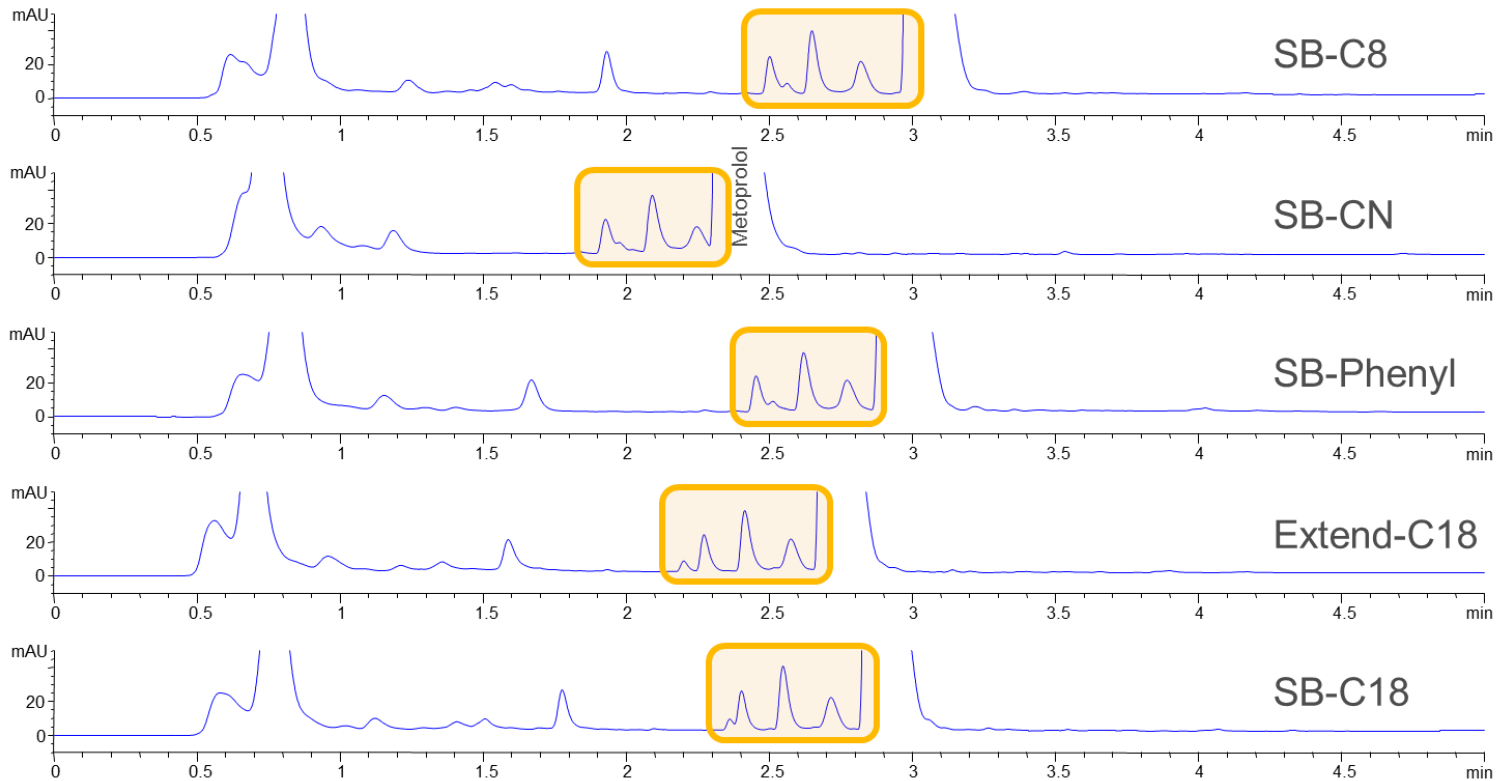
Einfluss von N, α und k auf die Auflösung

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{1+k} \right)$$



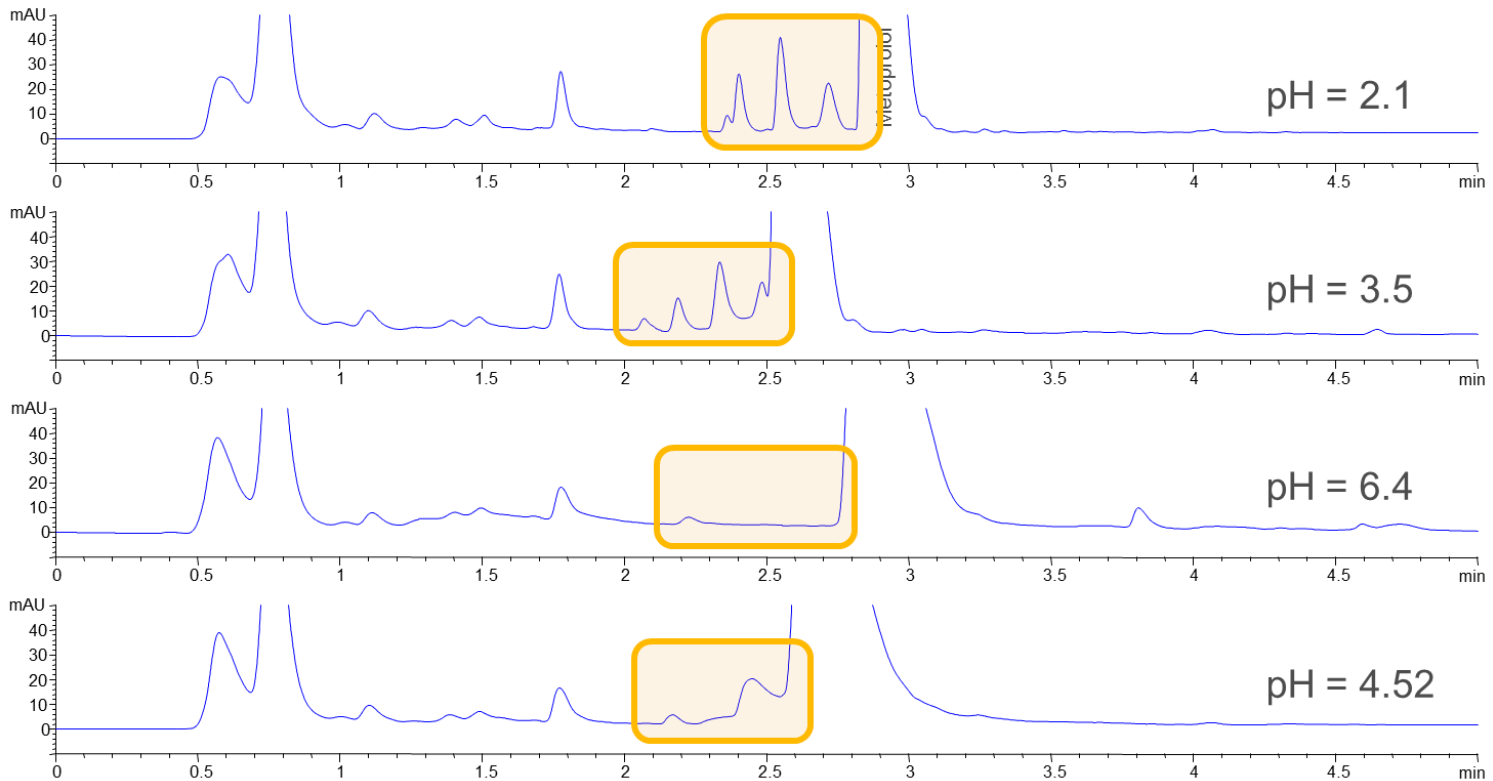
Was beeinflusst die Trennung?

Die gleiche Probe wurde mit unterschiedlichen stationären Phasen, aber immer bei gleicher Temperatur und mit gleicher mobiler Phase und gleichem Gradienten untersucht.



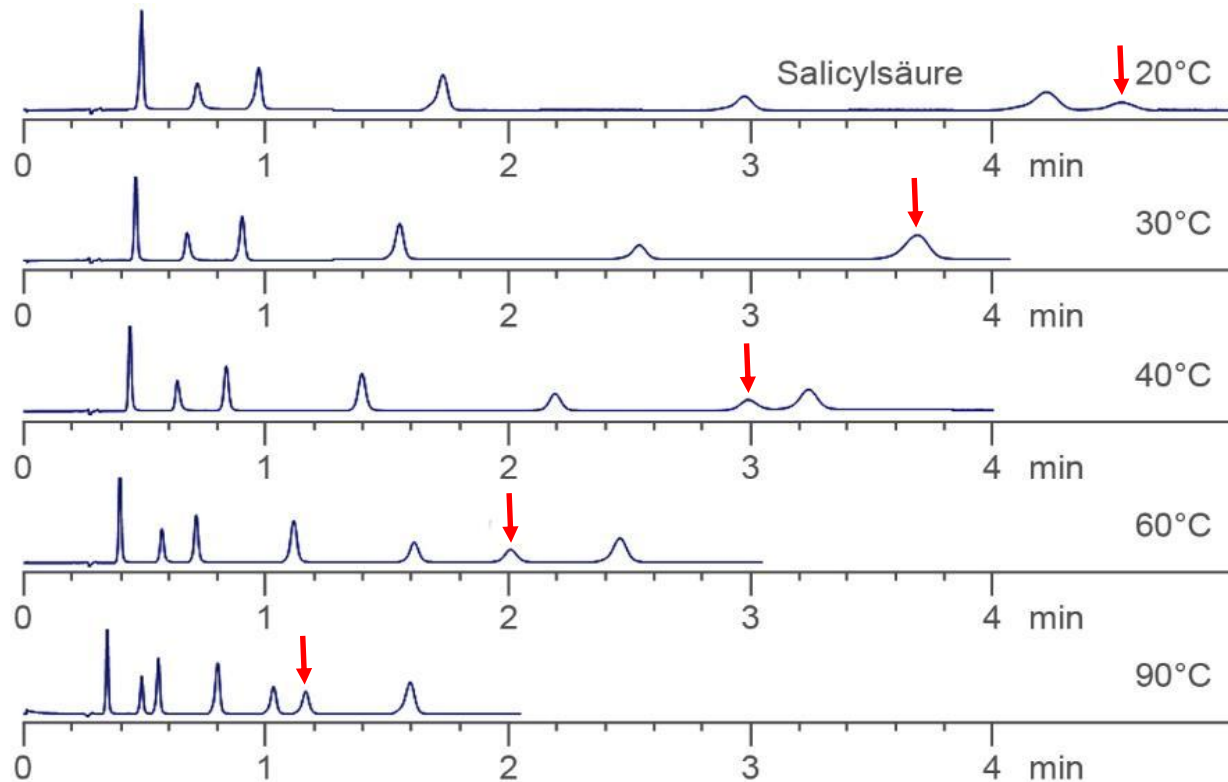
Was beeinflusst die Trennung?

Die gleiche Probe wurde mit gleicher stationärer Phase und bei gleicher Temperatur, aber mit mobilen Phasen mit unterschiedlichen pH-Werten (mit gleichem Gradienten) untersucht.



Was beeinflusst die Trennung?

Die gleiche Probe wurde mit den gleichen stationären und mobilen Phasen, dem gleichen Gradienten, aber bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht.



Was beeinflusst die Trennungen?

Was ist ein „Boden“ (eine Trennstufe) in der HPLC?

$$R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{N} \quad R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{H}} \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{h \cdot d_p}}$$

L_c Säulenlänge

d_p Partikelgröße

h Reduzierte Höhe einer theoretischen Trennstufe

Eine theoretische Trennstufe ist der hypothetische Zustand, in welchem sich zwei Phasen einer Substanz (flüssige Phase und Dampfphase) im Gleichgewicht befinden.

Was beeinflusst die Trennungen?

Eine hohe Trennstufenzahl oder Bodenzahl (N) bietet:

- Scharfe und schmale Peaks
- Bessere Detektion durch schmale und hohe Peaks
- Peakkapazität zur Trennung komplexer Proben

Allerdings steigt die Auflösung nur mit der Quadratwurzel der Trennstufenzahl.

- $R_S \sim \sqrt{N}$

Die Erhöhung der Trennstufenzahl ist durch die Testbedingungen begrenzt

- Analysendauer, Druck

Was beeinflusst die Trennungen?

Zusammenführung – Peakbreite und reduzierte Höhe einer theoretischen Trennstufe

$$R_s = \frac{t_{r1} - t_{r2}}{1/2 \cdot (W_{b2} + W_{b1})} \qquad R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{h \cdot d_p}}$$

Diagram showing arrows from the two equations above pointing to a central equation:

$$h = f(w)$$

Diagram showing an arrow pointing down from the central equation to a more detailed equation:

$$h = f(w_{eddy} + w_{ax} + w_C)$$

h: reduzierte Höhe einer theoretischen Trennstufe

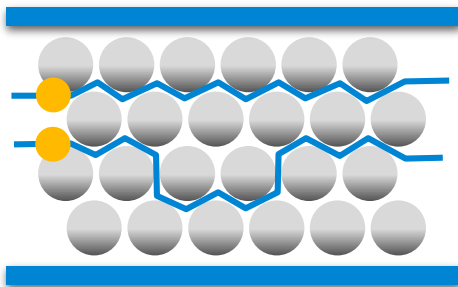
Van-Deemter-Gleichung

Eddy-Diffusion

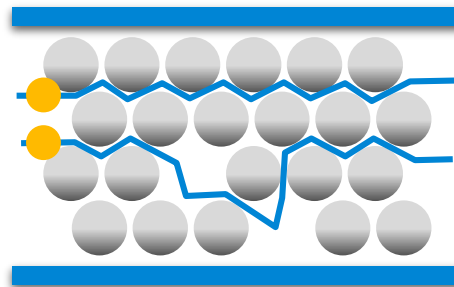
$$W_{Eddy} \sim \lambda d_p$$

λ : Qualität der Säulenpackung

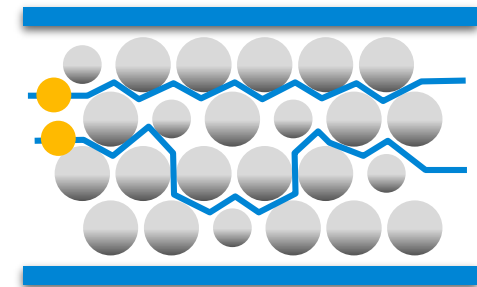
Unterschiede bei den Diffusionswegen aufgrund von:



Unterschiedlichen Wegen



Schlechter Säulenpackung



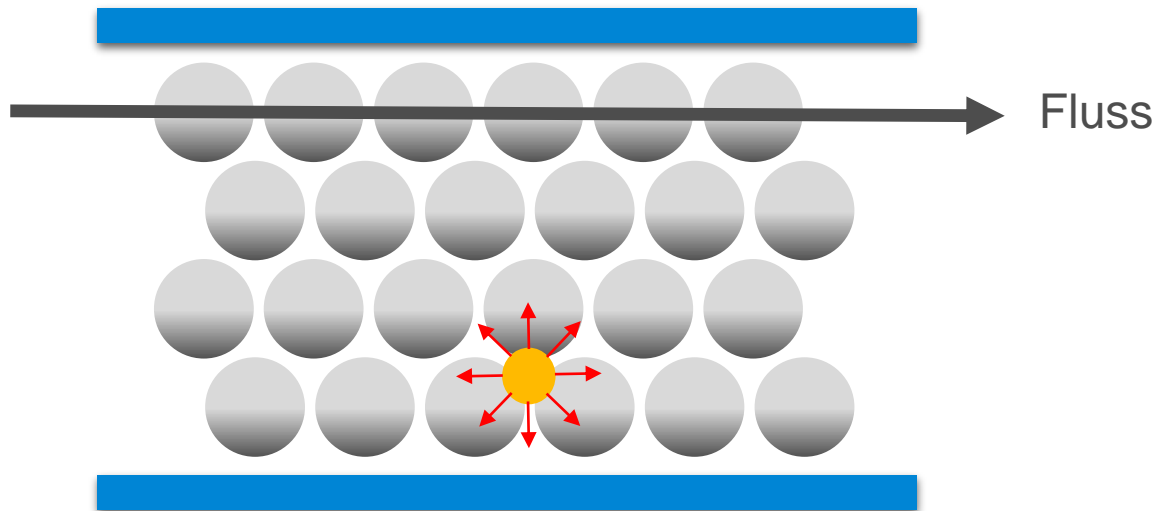
Weiter
Partikelgrößenverteilung

Van-Deemter-Gleichung

Axiale oder longitudinale Diffusion

Vergrößerung der Peakbreite aufgrund der Eigendiffusion des Analyten
Bei langsamem Fluss verbleibt der Analyt lange in der mobilen Phase

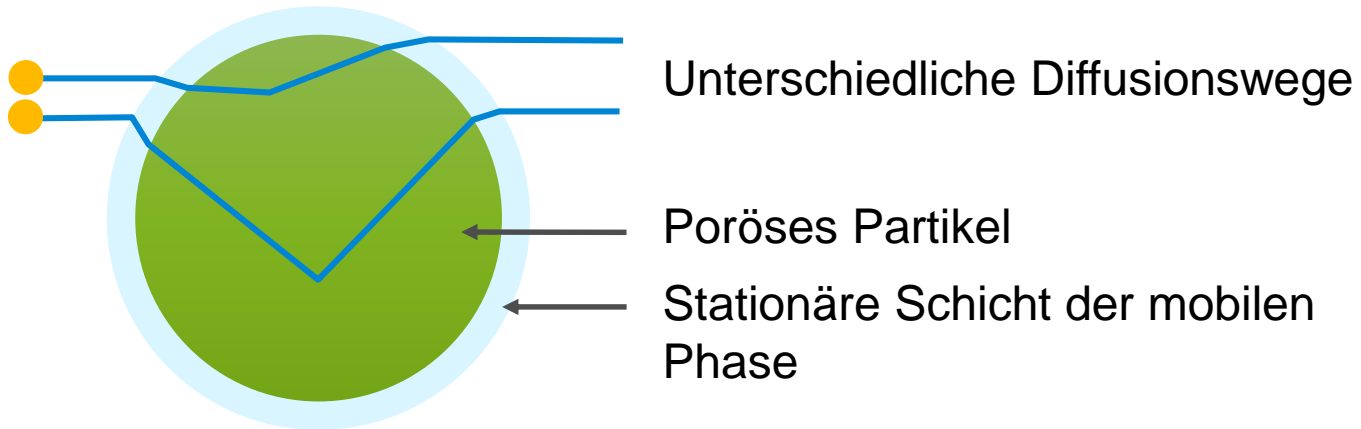
- Starke Peakverbreiterung
- Größere Höhe einer theoretischen Trennstufe



Van-Deemter-Gleichung

„Stofftransportwiderstand“

$$w_C \sim d_p^2$$



Van-Deemter-Gleichung

Die Van-Deemter-Gleichung setzt die Varianz pro Längeneinheit einer Trennsäule in Beziehung mit der linearen Geschwindigkeit der mobilen Phase, indem sie die physikalischen, kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften einer Trennung betrachtet (Wikipedia).

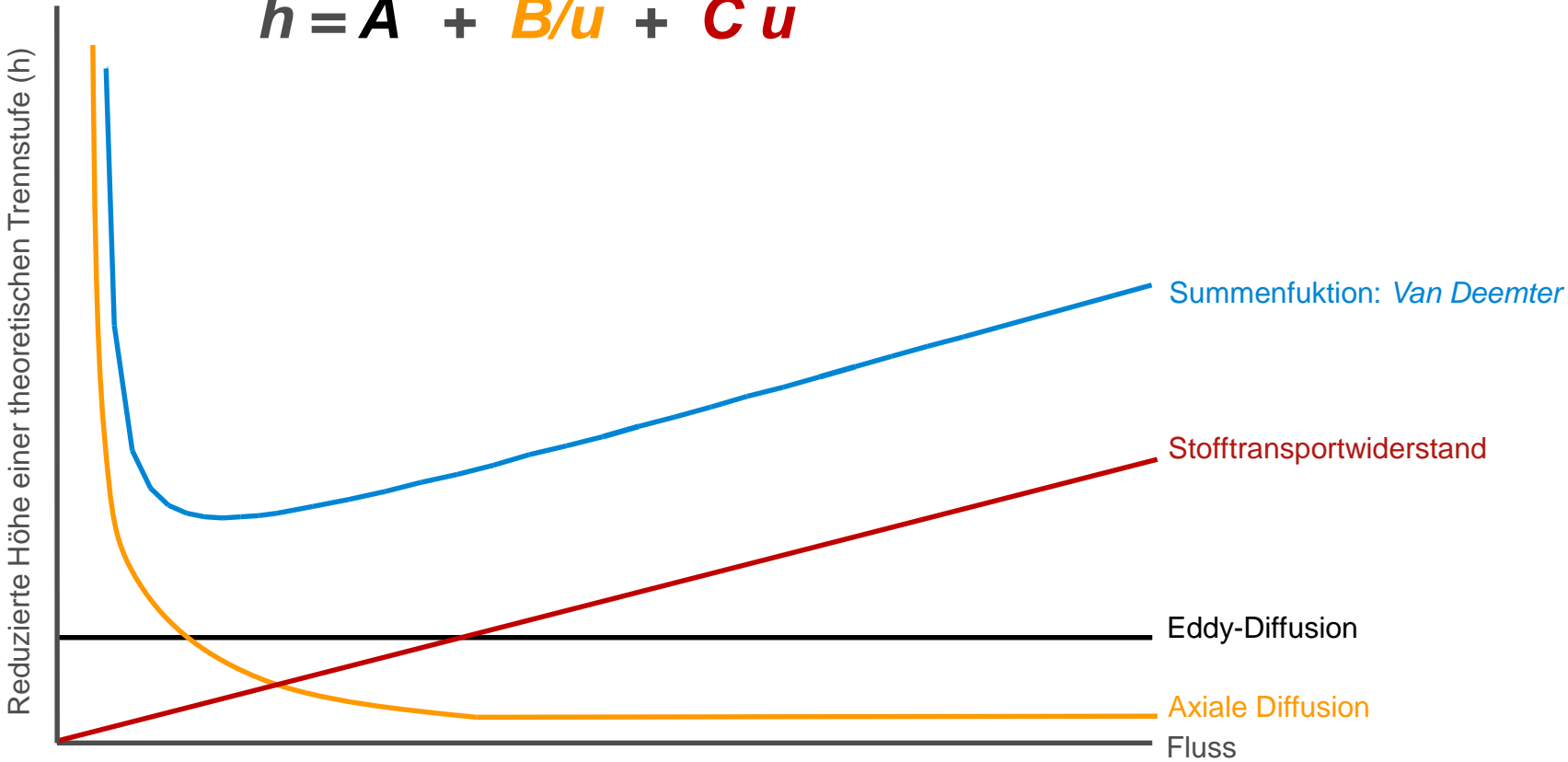
$$h = f (W_{Eddy} + W_{ax} + W_C)$$

- Eddy-Diffusion
- Diffusionskoeffizient
- Stofftransportwiderstand

$$h = A + B/u + C u$$

Van-Deemter-Gleichung

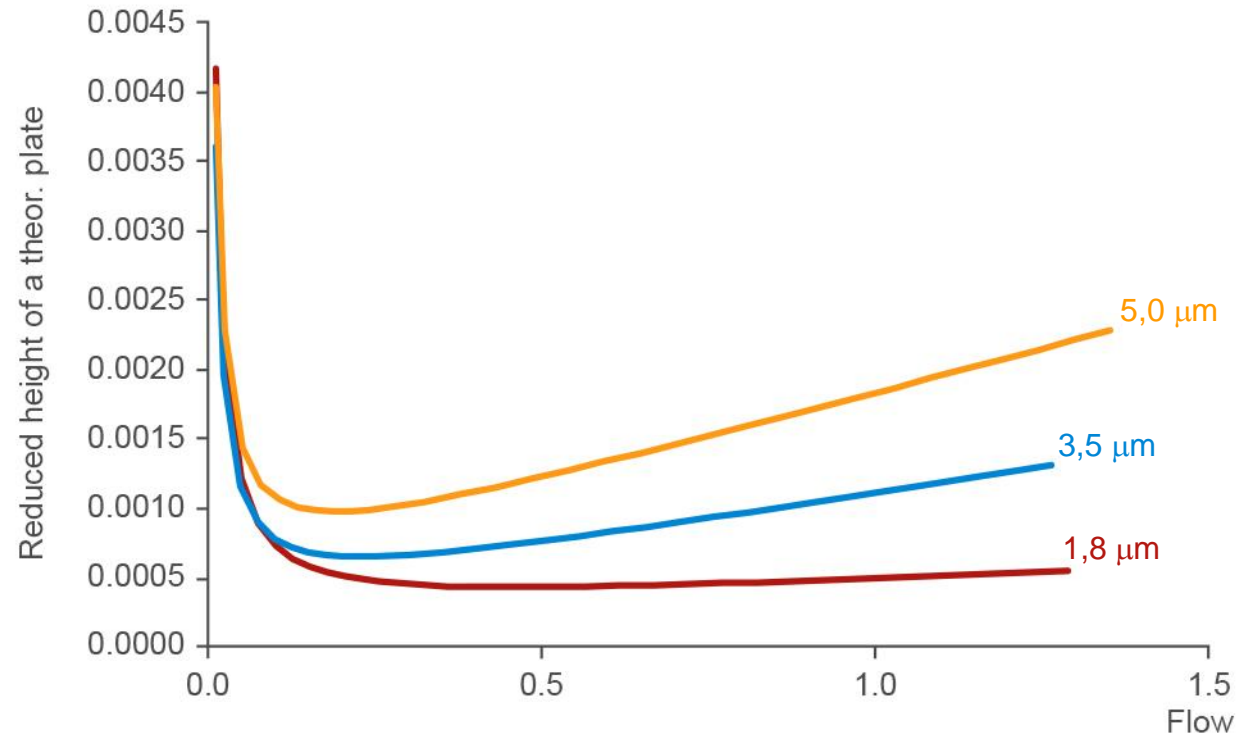
$$h = A + B/u + C u$$



Van-Deemter-Gleichung

Gemessen für unterschiedliche Partikelgrößen

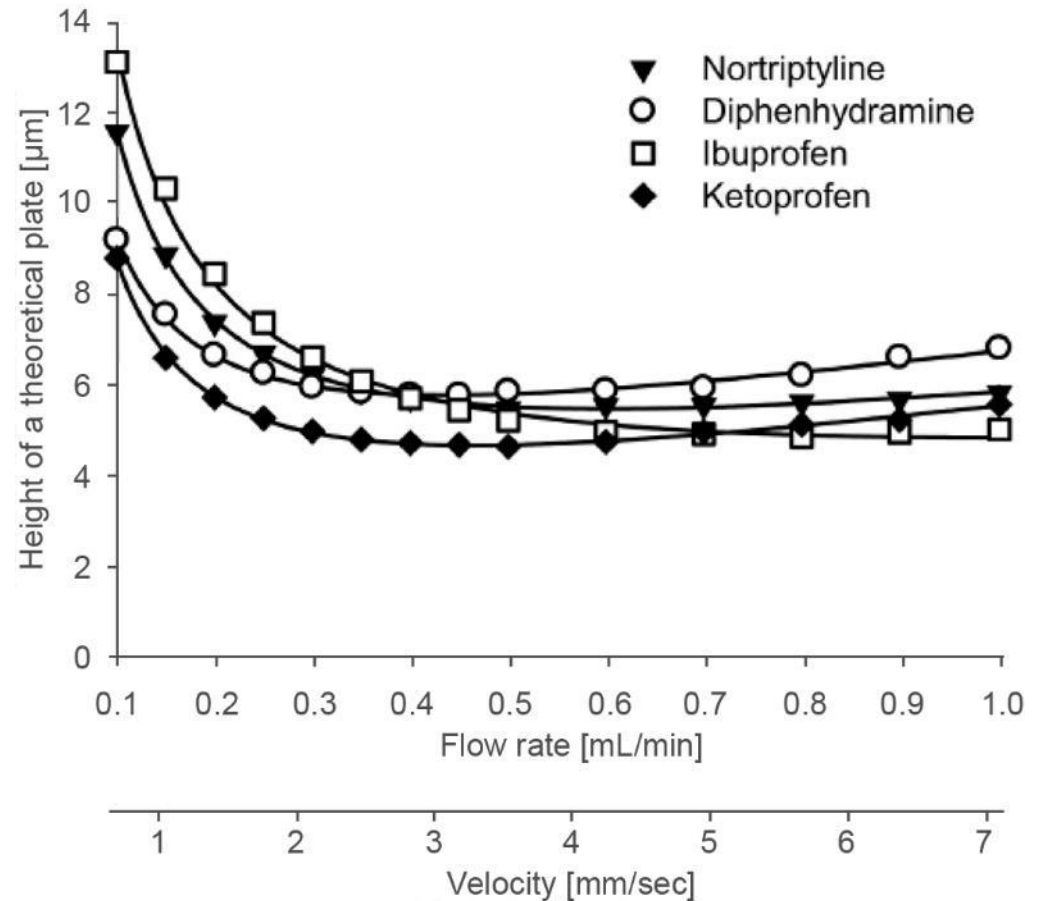
- Kleine Partikel führen zu geringeren Höhen der theoretischen Trennstufe und daher zu einer höheren Trenneffizienz
- Bei kleineren Partikeln wird die Trenneffizienz bei Erhöhung der Flussrate weniger stark beeinträchtigt



Van-Deemter-Gleichung

Tatsächliche Kurven für unterschiedliche Analyten

- Van-Deemter-Gleichung nur bei isokratischen Analysen
- Verbindungs- und gerätespezifisch
- Selbst für Sub-2- μm -Partikel nicht horizontal
- Optimale Flussrate hängt von der Verbindung ab



P. Petersson et al (AZ), *J.Sep.Sci*, 31, 2346-2357, 2008

Peakkapazität

Gradientenanalysen

$h = f(w^2)$ Reduzierte Höhe einer theoretischen
Trennstufe als Funktion der Peakbreite

Isokratische Analyse:

Peakbreite hängt nur von Diffusionsprozessen ab.

Gradientenanalyse:

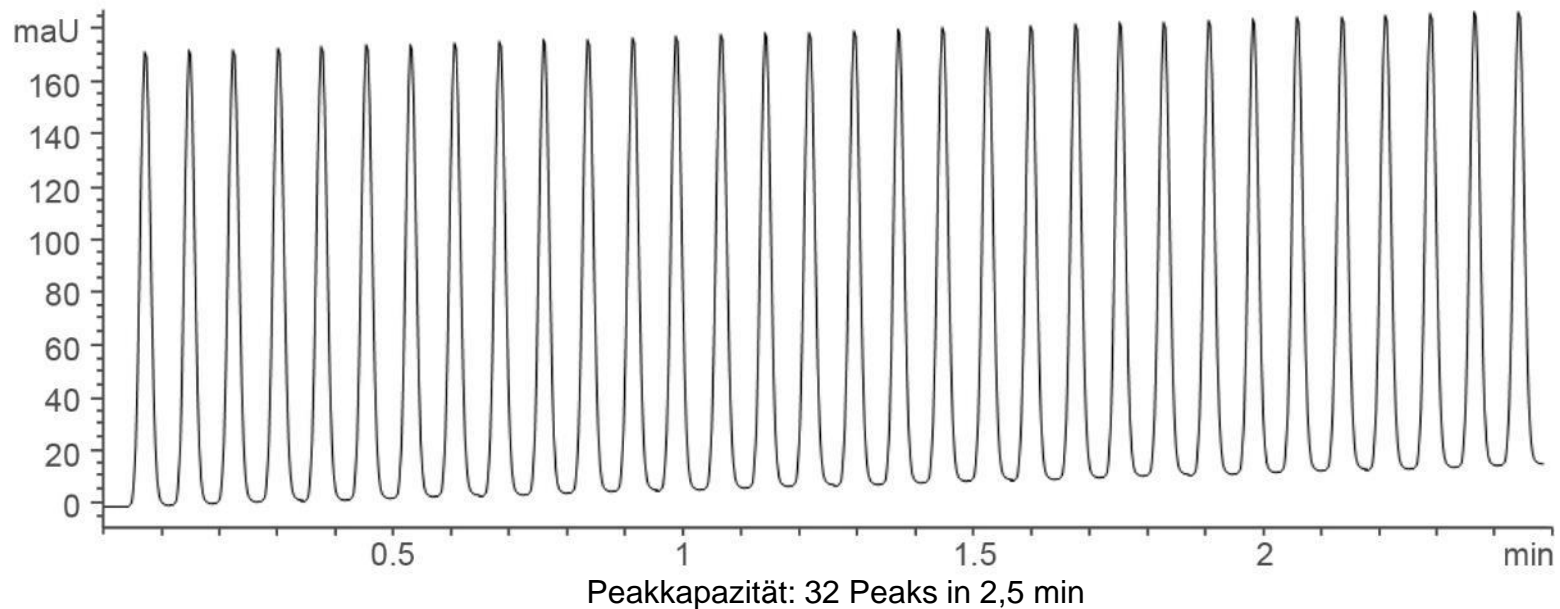
Peakbreite hängt von Diffusionsprozessen *und* der Gradientenfokussierung am Säulenkopf ab.

Peakkapazität

Definition

Die Peakkapazität ist die Anzahl an Peaks (n), die in einer bestimmten Zeit mit einer bestimmten Auflösung getrennt werden können.

Die Peakkapazität hängt von verschiedenen Faktoren ab, z. B. von der Säulenlänge und der Partikelgröße.



Peakkapazität

Bedeutung

„... mithilfe der statistischen Theorie der Peaküberlappung ...“

„... wird die Peakauflösung stark beeinträchtigt, wenn die Anzahl der Komponenten in einer Probe 1/3 der Peakkapazität übersteigt.“

J.M. DAVIS, J.C. GIDDINGS, ANAL. CHEM. 55 (1983) 418

„... um 98 % der Komponenten zu trennen, muss die Peakkapazität die Anzahl der Komponenten um den Faktor 100 übersteigen.“

J.C. GIDDINGS, J. CHROMATOGR. A 703 (1995) 3

Peakkapazität

Berechnung der Peakkapazität

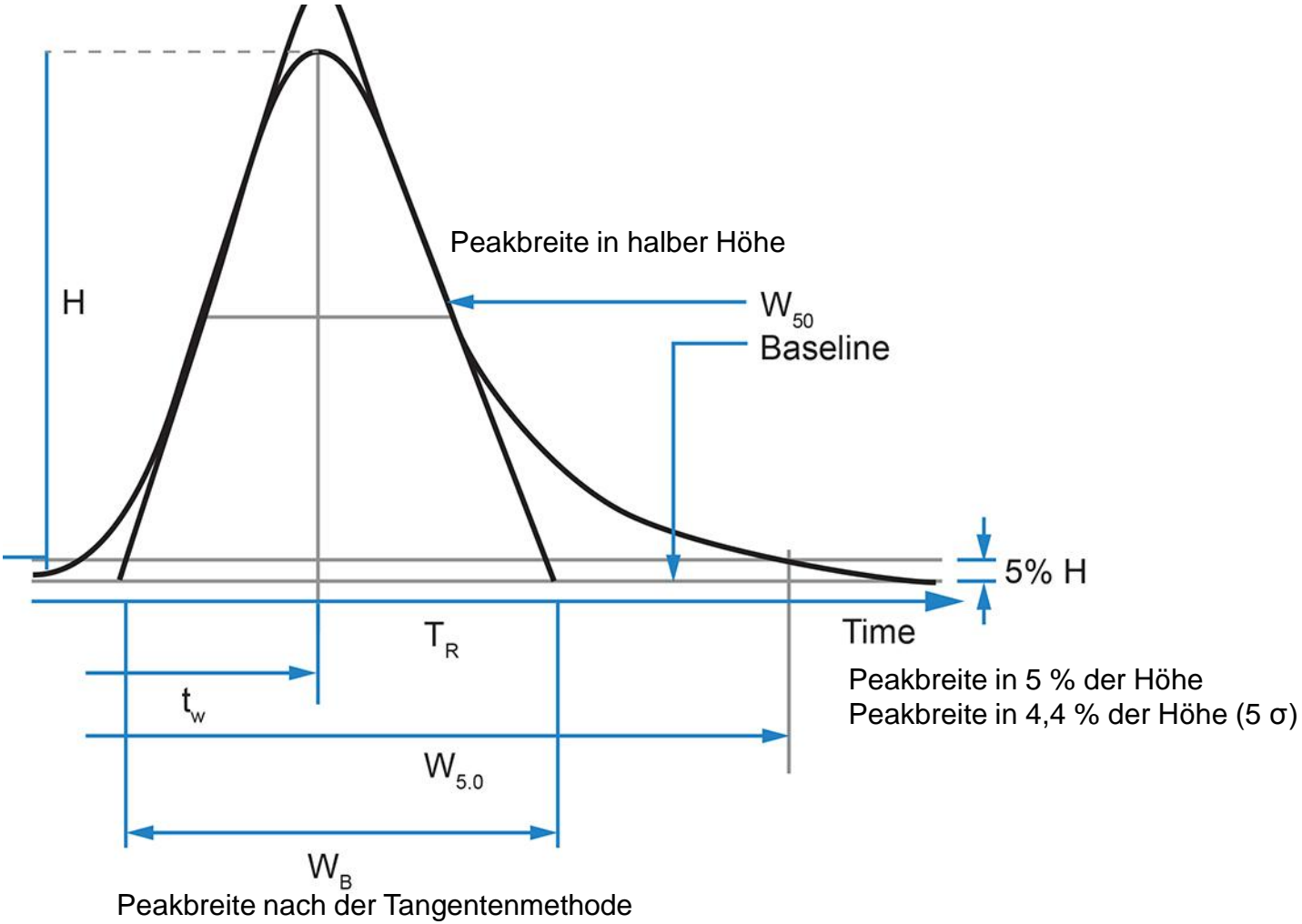
$$P = 1 + \frac{t_G}{\frac{1}{n} \sum_1^n w} = 1 + \frac{t_G}{w_{av}}$$

Vereinfachung: $P = 1 + \frac{t_G}{W}$

- w_{av} Durchschnittliche Peakbreite
- n Anzahl an Peaks
- t_G Gradientendauer
- w Peakbreite des ausgewählten Peaks

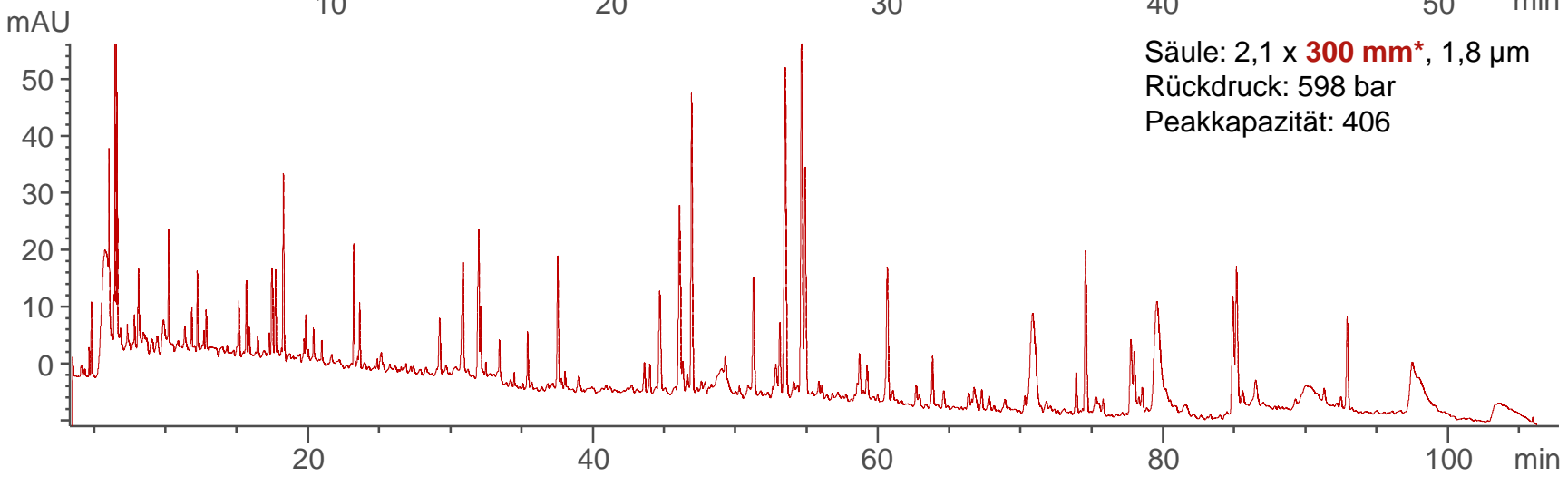
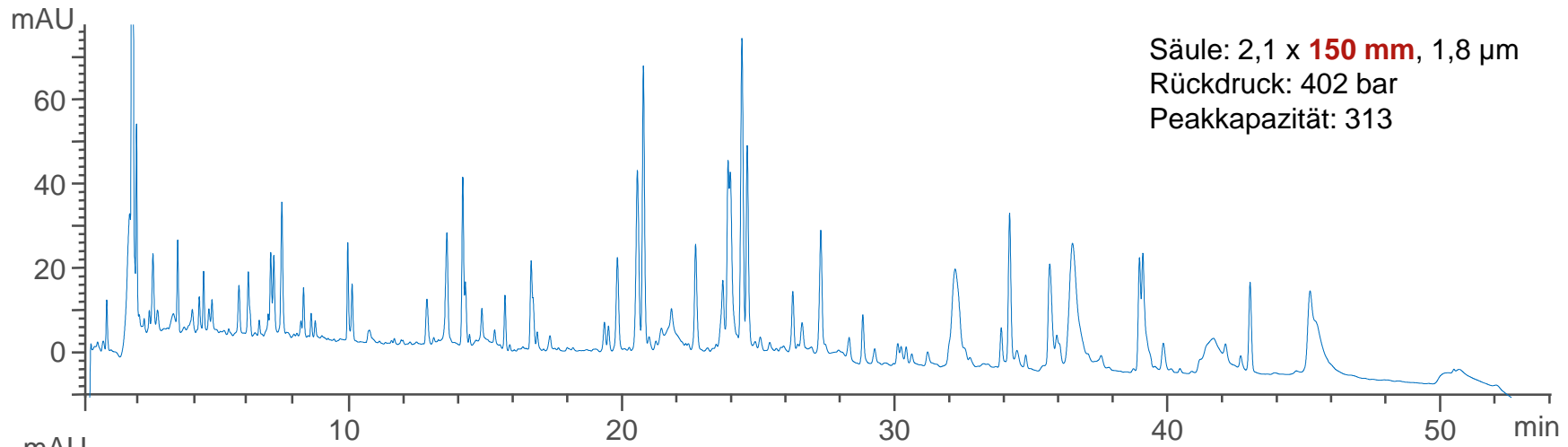
Peakkapazität

Peakbreite



Peakkapazität

Beispiel



*300-mm-Säule durch die Kupplung von zwei 150-mm-Säulen

Weitere Informationen

Weitere Informationen zu Produkten von Agilent finden Sie unter www.agilent.com oder www.agilent.com/chem/academia

Haben Sie Fragen oder Anregungen zu dieser Präsentation?
Kontakt: andrea_zenker@agilent.com

Publikation	Titel	Pub.-Nr.
Primer	The LC Handbook	5990-7595EN
Application Note	The influence of silica pore size on efficiency, resolution and loading in Reversed-Phase HPLC	5990-8298EN
Application Note	Increasing resolution using longer columns while maintaining analysis time	5991-0513EN
Artikel-Nachdruck	A simple approach to performance optimization in HPLC and its application in ultrafast separation development	
Poster	Study of physical properties of superficially porous silica on its superior chromatographic performance	
Application Note	Maximizing chromatographic peak capacity with the Agilent 1290 Infinity LC system using gradient parameters	5990-6933EN
Application Note	Maximizing chromatographic peak capacity with the Agilent 1290 Infinity LC	5990-6932EN
Application Note	Increased peak capacity for peptide analysis with the Agilent 1290 Infinity LC system	5990-6313EN
Internet	CHROMacademy – kostenloser Zugang zu Online-Kursen für Studenten und Mitarbeiter von Universitäten und Hochschulen	



**VIELEN
DANK**

 **Inhalt**

5991-5411DEE

Nur für Lehrzwecke

April 6, 2016

37



Agilent Technologies

**ACADEMIC
& INSTITUTIONAL
RESEARCH**

Abkürzungen

Abkürzungen	Definition
α	Selektivität
d_p	Partikelgröße
$\Delta\Phi$	Gradientenbereich
F	Flussrate
h	Reduzierte Höhe einer theoretischen Trennstufe, ein Maß für die Trennleistung einer Säule
k	Retentionsfaktor (früher bekannt als: k' - Kapazitätsfaktor)
L_c	Säulenlänge
λ	Qualität der Säulenpackung
N	Effizienz oder Trennstufenzahl der Säule
P	Peakkapazität
R	Auflösung

Abkürzungen	Definition
t	Zeit
t_r	Retentionszeit
t_0	Totzeit der Säule
t_G	Gradientendauer
V_m	Säulenvolumen
w	Peakbreite
$W_{1/2}$	Peakbreite in halber Höhe
W_{bi}	Peakbreite an der Basislinie
W_{Eddy}	Eddy-Diffusion
W_{ax}	Axiale oder longitudinale Diffusion
W_C	Stofftransportwiderstand
W_{av}	Durchschnittliche Peakbreite