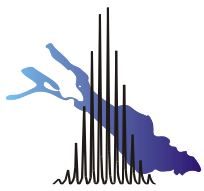


ANALYTISCHE CHEMIE I

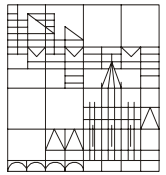
Trennmethoden

1. Grundlagen Chromatographie

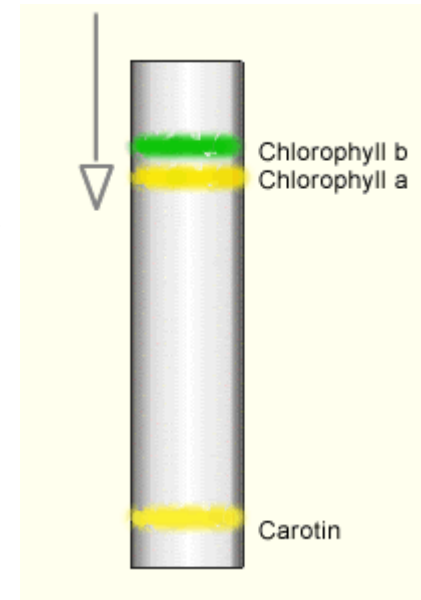
WS 2007/2008

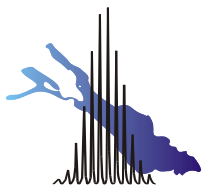


Chromatographie

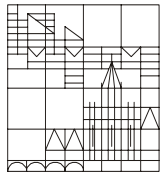


- Physikalische Trennmethode, bei der die zu trennenden Komponenten zwischen einer **feststehenden (stationären)** und einer **beweglichen (mobilen)** Phase verteilt werden.
- Die erste Beschreibung der Technik geht auf den russischen Botaniker Tswjett zurück, der um 1900 damit verschiedene Farbpigmente von Pflanzen aufgetrennt hat. Daraus ergab sich der Name (**chroma** und **graphein**: Griechisch für **Farbe** bzw. **schreiben, zeichnen**).
- Man kann mit der Methode das Vorhandensein von Stoffen nachweisen und ihre Konzentration bestimmen (analytische Chromatographie). Zusätzlich können die einzelnen Stoffe auch zur weiteren Verwendung isoliert werden (präparative Chromatographie).





Technische Entwicklung der Chromatographie



- 1903 Tswett - Erfindung der Chromatographie

- vor 1970 nur wenige kommerzielle chromatographische Methoden
- alle drucklos in Form von Säulenchromatographie, Dünnschicht- und Papierchromatographie
- Quantifizierungen und Bestimmung ähnlicher Substanzen sehr eingeschränkt
- erste Eluentenaufbringungen mit Druck waren nicht reproduzierbar

- 1940 Martin, Synge - Verteilungschromatographie

- 1951 erster Gaschromatograph von Martin, James

- 1965 Stahl - Etablierung der Dünnschichtchromatographie

- Mitte der 70er Jahre gelang es, trennstärke Säulen mit kleinen Packungsteilchen (10 µm) herzustellen - HPLC mit Normalphasen-Säulen entwickelt

- Ende der 70er Jahre Reversed-Phase-Säulen, damit Trennung auch von Stoffen ähnlicher Eigenschaften möglich

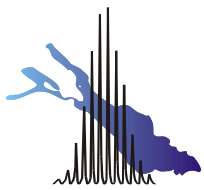
- seit 1982 erste kommerzielle Geräte der SFC (seit 1962 SFC bekannt)

- in den 80er Jahren schnelle Entwicklungen hinsichtlich Trennleistung, Identifizierung, Reinigung und Quantisierung - Einführung von automatisierten Probengebern

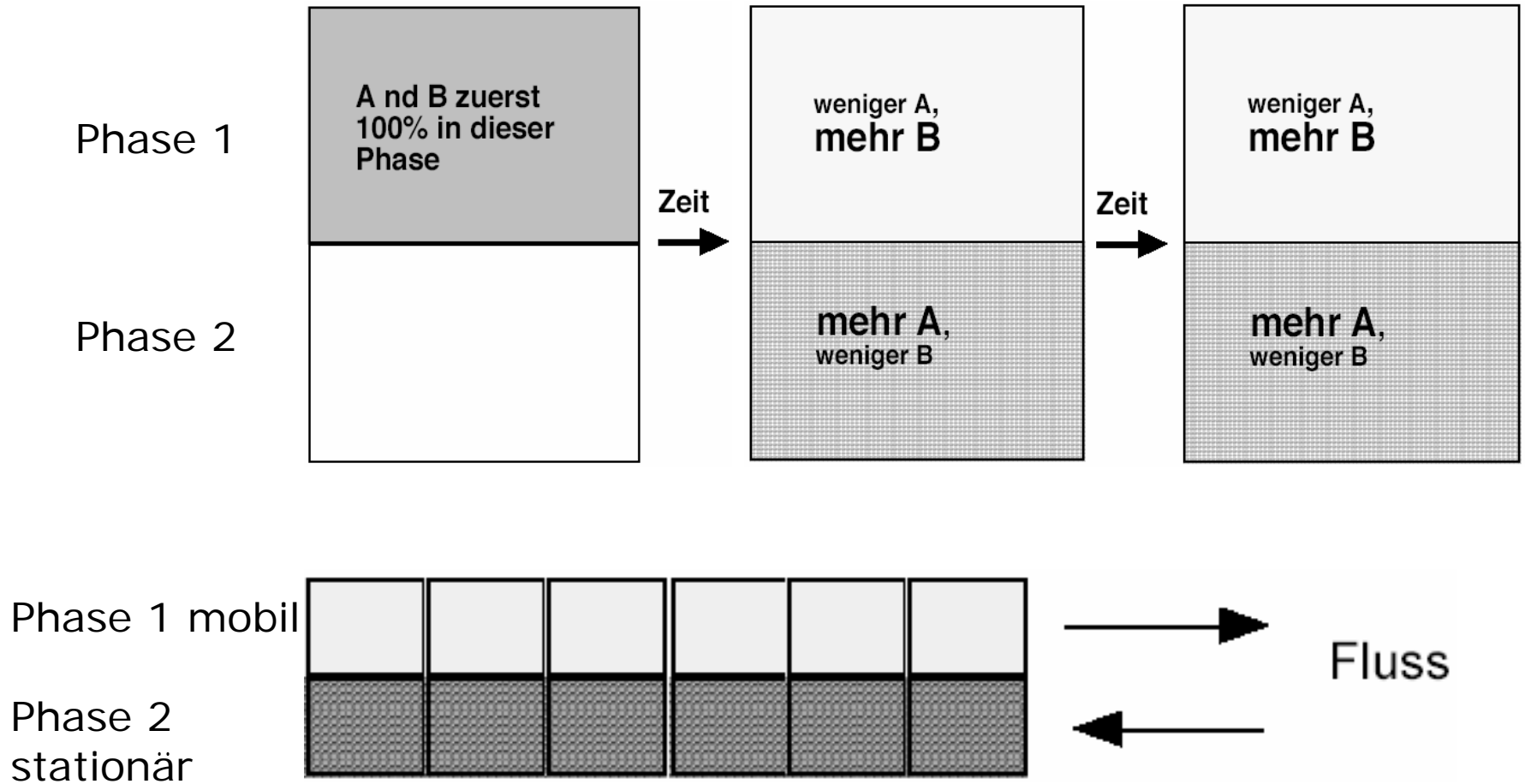
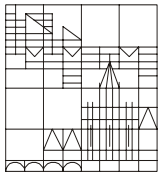
- 1989 erste kommerzielle Geräte der Kapillarelektrophorese (CE)

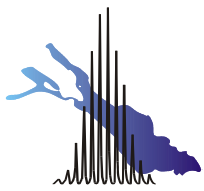
- Mitte 90er Jahre Kopplungstechniken (z.B. mit Massenspektrometrie)

- enorme Entwicklung der Rechentechnik ermöglichte auch große Fortschritte in der Nutzung der Chromatographie (3dimensionale Daten z. B. mittels Dioden-Array-Detektoren)

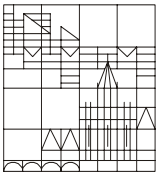


Funktionsprinzip der Chromatographie





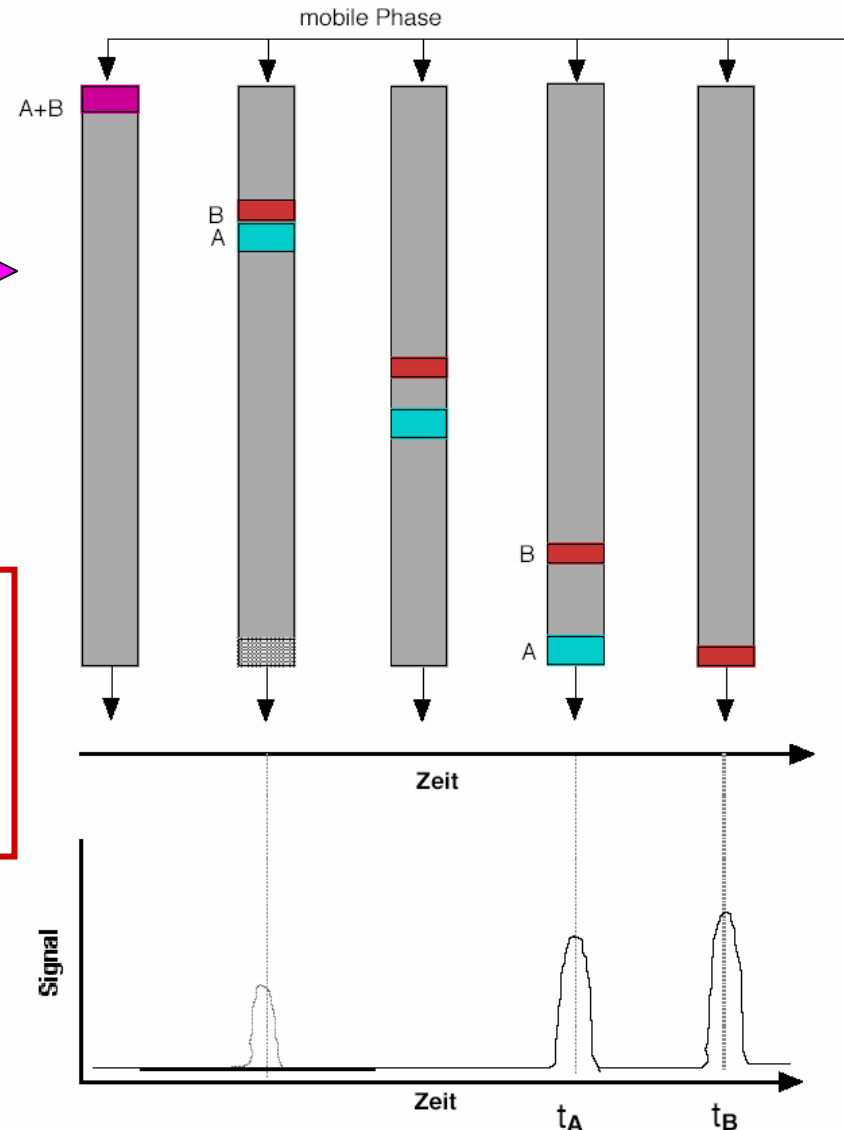
Chromatographie

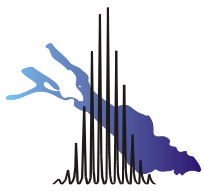


Stoffgemisch

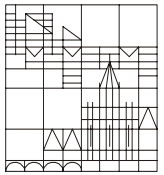


- **Unterschiedliche Adsorption**
- **Unterschiedliche Teilchengrösse**
- **Unterschiedliche Löslichkeit**



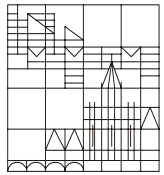
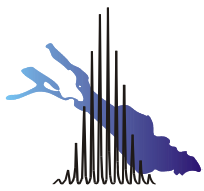


Chromatographische Verfahren – Einteilung nach dem Trennprinzip



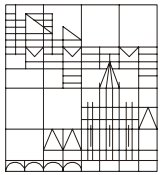
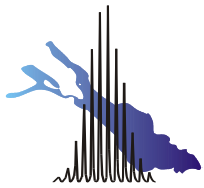
- **Adsorptions-Chromatographie** - Hier kommt es zu einer Trennung der verschiedenen Komponenten auf Grund der unterschiedlich starken adsorptiven Bindungen zur ruhenden Phase. Die bewegte Phase kann ein mehr oder weniger polares Lösungsmittel oder bei gasförmigen Stoffen ein Trägergas sein.
- **Verteilungs-Chromatographie** - Ähnlich dem Extraktionsverfahren wird hier die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Komponenten ausgenutzt. Bei der Chromatografie bleibt aber das Lösungsmittel als ruhende Phase auf einem Trägermaterial haften. Die bewegte Phase kann wieder eine Lösung oder ein Trägergas sein.
- **Ionenaustauschchromatographie** - Die bewegte Phase ist hier meist eine Lösung der zu trennenden Ionen. Die ruhende Phase ist ein fester Ionenaustauscher. Ionenaustauscher bilden zwischen den verschiedenen Ionen der bewegten Phase unterschiedlich stabile Bindungen aus.
- **Affinitätschromatographie** - Als stationäre Phase wird eine für jeden Analyten spezifische chemische Verbindung eingesetzt, die auf Grund nichtkovalenter Kräfte eine Trennung bewirkt. Es handelt sich hierbei um eine hochselektive Methode.

Chromatographische Verfahren – Einteilung nach den Phasen



- **Flüssigchromatographie (engl. liquid Chromatography, LC)**
- **Planare Chromatographie**
 - Papierchromatographie - Als feste Phase wird Papier verwendet, das entweder liegt oder (meist) senkrecht in einem Glasbehälter steht.
 - Dünnschichtchromatographie - Als feste Phase werden z. B. Silikapartikel in einer feinen Schicht auf einer flexiblen Trägerfolie aus Aluminium oder Plastik oder einer Glasplatte aufgetragen.
- **Säulenchromatographie**
 - Niederdruckchromatografie - Die hier verwendeten Säulen weisen Durchmesser von einem bis mehreren Zentimetern auf. Diese Form der Flüssigchromatografie wird vor allem für präparative Trennungen eingesetzt.
 - Hochleistungschromatographie (unrichtig, jedoch sehr gebräuchlich ist auch der Ausdruck Hochdruckchromatographie; engl. HPLC High Performance (Pressure) Liquid Chromatography) - Sie stellt die heute am weitesten verbreitete in der Analytik eingesetzte Trennmethode dar. Hier werden bis zu 400 bar bei einer Flussrate der mobilen Phase bis zu 5 ml/min erzeugt, die jedoch mit der Trennleistung nicht zu tun haben, sondern nur zur Fortbewegung des Eluentengemischs in der Säule dienen.

Chromatographische Verfahren – Einteilung nach den Phasen

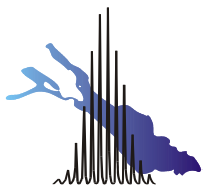


- **Gaschromatographie**

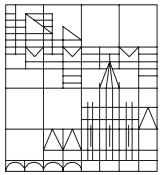
- Gepackte Säulen - Das Innere einer Säule (lange Röhre) ist mit einem feinkörnigem Material gefüllt. In der Regel besteht dabei die stationäre Phase aus einem dünnen Film einer weitgehend inerten und hochsiedenden Flüssigkeit, der die Pulverkörner überzieht.
- Kapillarsäulen - Nur die Säulenwand ist mit einer dünnen Schicht aus stationärer Phase bedeckt.
 - Flüssige stationäre Phase
 - Feste stationäre Phase

- **Überkritische Fluidchromatographie (engl. SFC supercritical fluid chromatography)**

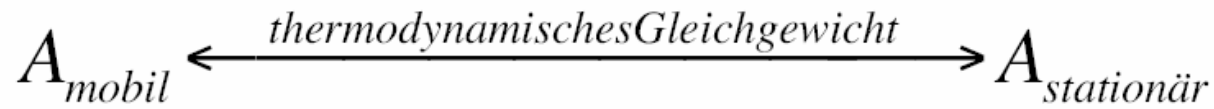
Als mobile Phase wird eine Substanz in ihrer überkritischen Phase (Zustand zwischen Gas und Flüssigkeit) eingesetzt. Hierbei handelt es sich meist um Kohlendioxid. Bei dieser Methode werden nur Säulen als Träger von stationären Phasen eingesetzt.



Einflussfaktoren der Wanderungsgeschwindigkeit einer Verbindung in einem Chromatographischen System

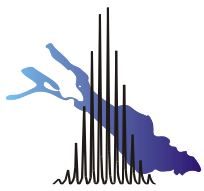


Verteilungskoeffizient K beschreibt das Verhältnis der Konzentrationen der Substanz **A** in der mobilen und der stationären Phase im thermodynamischen Gleichgewicht.

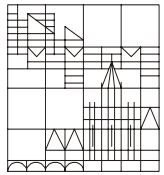


$$K = \frac{[A]_{stationär}}{[A]_{mobil}}$$

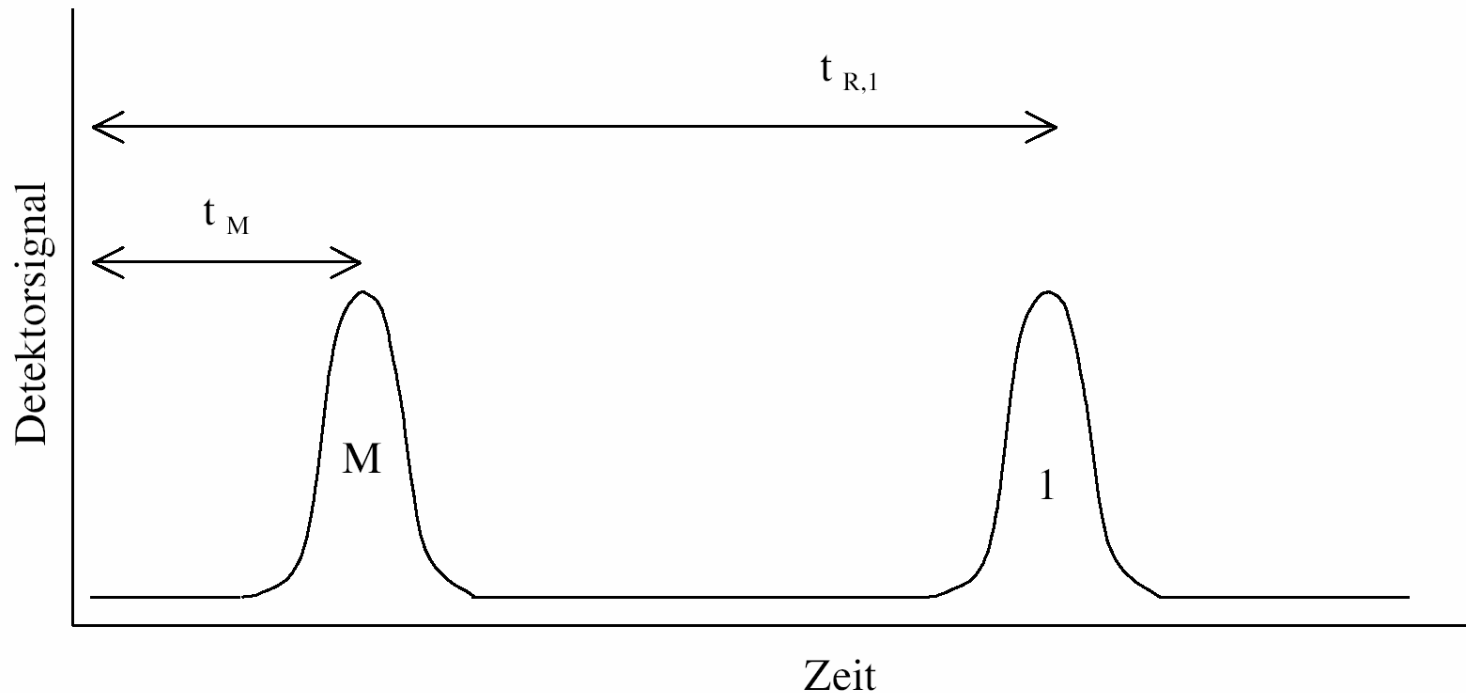
Falls verschiedene Substanzen in einem gegebenen chromatographischen System verschiedene K 's aufweisen, wird eine Trennung erreicht.



Einflussfaktoren der Wanderungsgeschwindigkeit einer Verbindung in einem Chromatographischen System

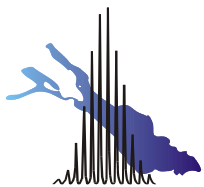


Retentionszeit t_R beschreibt die Zeit, die eine Substanz braucht, um ein chromatographisches System zu durchlaufen.

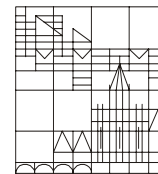


Der erste Peak mit der Retentionszeit t_M stellt eine Substanz dar, die von der stationären Phase nicht zurückgehalten wird.

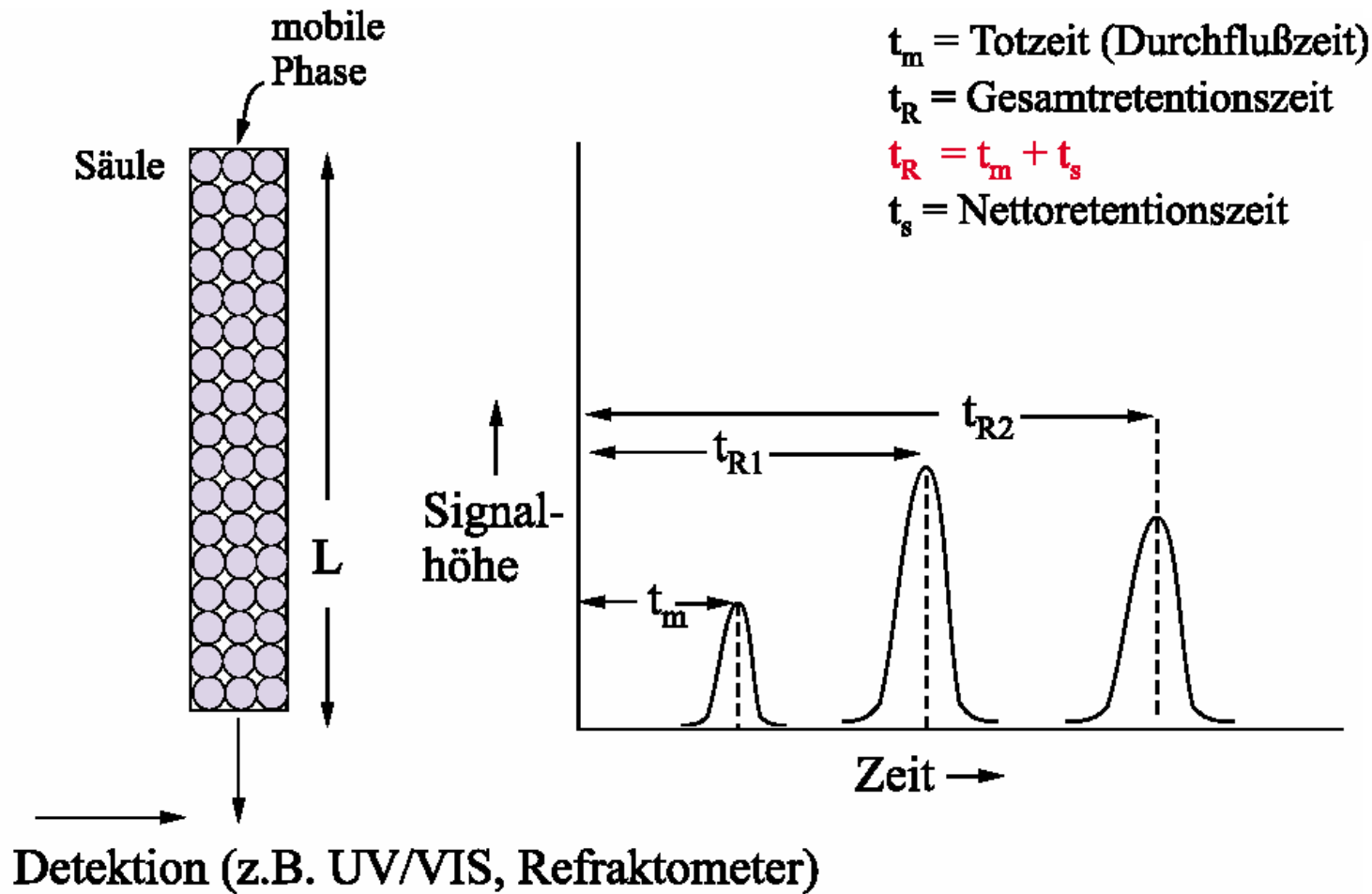
t_M wird häufig als **dead time** oder **solvent delay** bezeichnet.

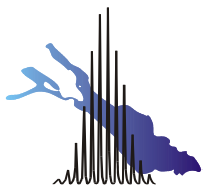


Chromatogramm (HPLC)

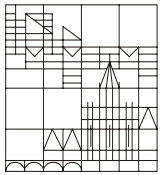


Idealisiertes Chromatogramm zur Beschreibung der Kenngrößen:



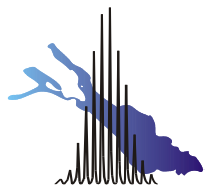


Modelle zur Chromatographie

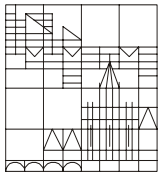


Zahlreiche Theorien der chromatographischen Trennung wurden über die Jahre entwickelt, u.a.:

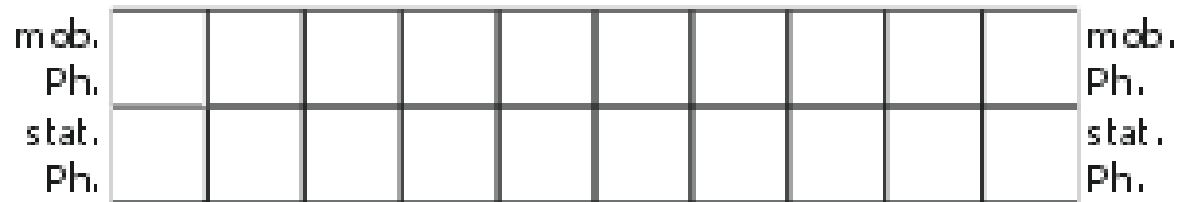
- Das **Trennstufenmodell (Bodentheorie)**, die **Kinetische Theorie** und die **Dynamische Theorie**
- mathematische Beschreibung, aus der die Konzentration der Analyten zu einer gegebenen Zeit oder an einem definierten Ort der Trennstrecke angegeben werden kann
- chromatographische Trennungen und Leistungsfähigkeit eines chromatographischen Trennsystems näherungsweise berechenbar und optimierbar

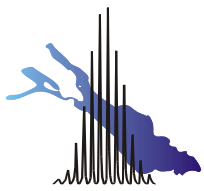


Trennstufenmodell - Bodentheorie (Martin und Synge, Nobelpreis 1952)

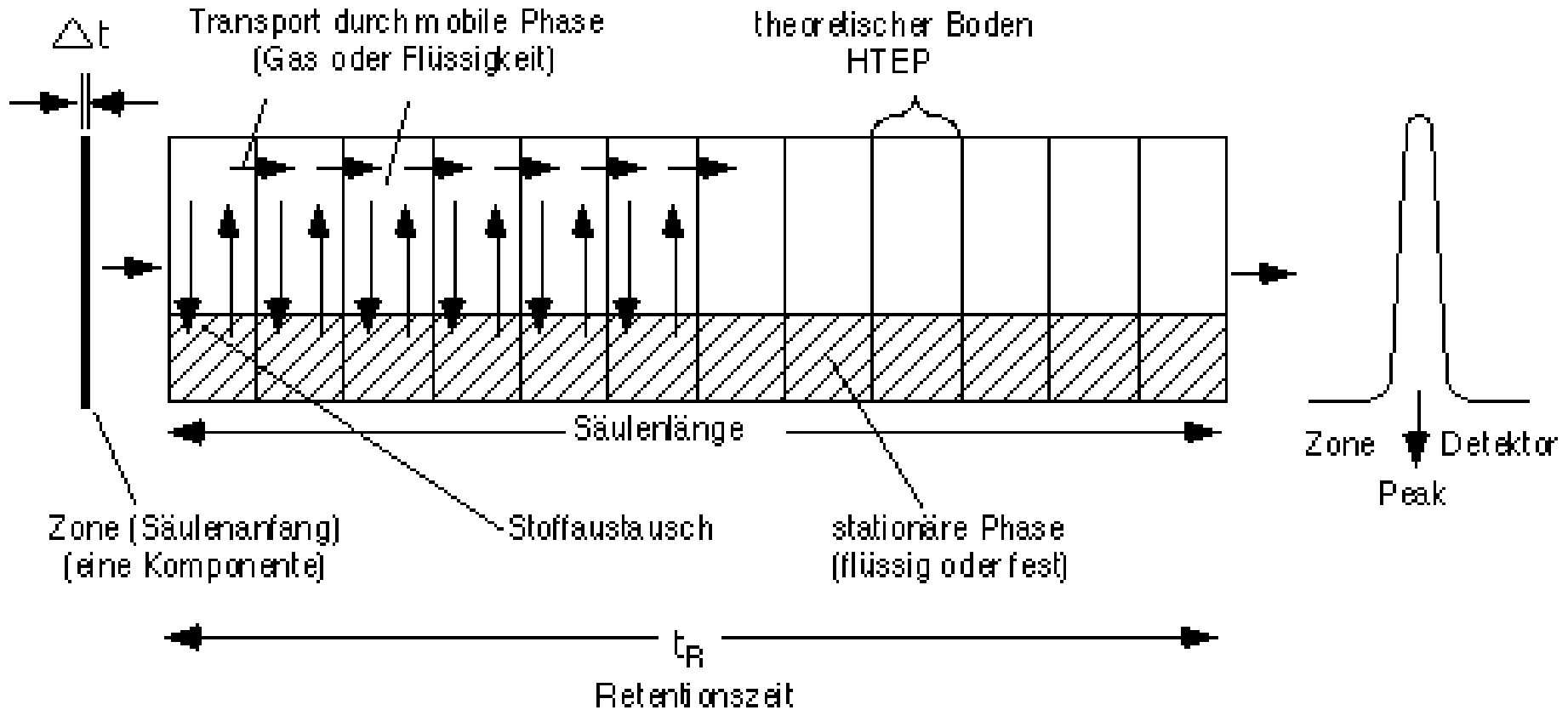
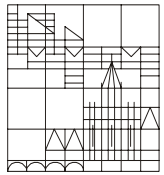


- Die Böden sind **voneinander getrennt** (keine Wechselwirkungen zwischen den Böden)
- Auf jedem Boden stellt sich ein **Gleichgewicht** der Teilchen zwischen mobiler und stationärer Phase ein.
Gleichgewichtskonstante = Verteilungskoeffizient
- Die Bewegung von Analyten entlang der Säule ist ein **schrittweiser Übergang** von mobiler Phase von einem Boden zum anderen

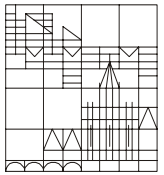
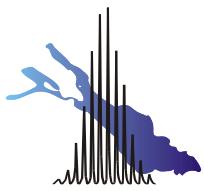




Bodentheorie - Grundlagen



HETP - Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens, engl. height equivalent to a theoretical plate



Was kann die Bodentheorie?

1. Relative Wanderungsgeschwindigkeiten für Substanzen beschreiben

- **Kapazitätsfaktor** k' für die Wanderungsgeschwindigkeit einer Substanz **relativ zum Lösungsmittel**:

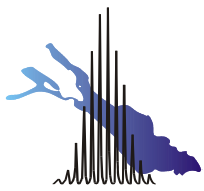
$$k'_A = K_A \frac{V_S}{V_M}$$

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

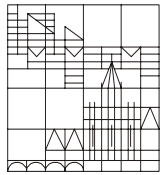
- **Selektivitätsfaktor** α für die Wanderungsgeschwindigkeit zweier Substanzen **A** und **B relativ zueinander**:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

$$\alpha = \frac{t_{R,B} - t_M}{t_{R,A} - t_M}$$



Was kann die Bodentheorie?



2. Die Gaußsche Form der chromatographischen Peaks erklären und Effizienz einer Säule beschreiben

Die Breite einer Gaußkurve ist mit der Varianz σ^2 definiert (σ = Standardabweichung)

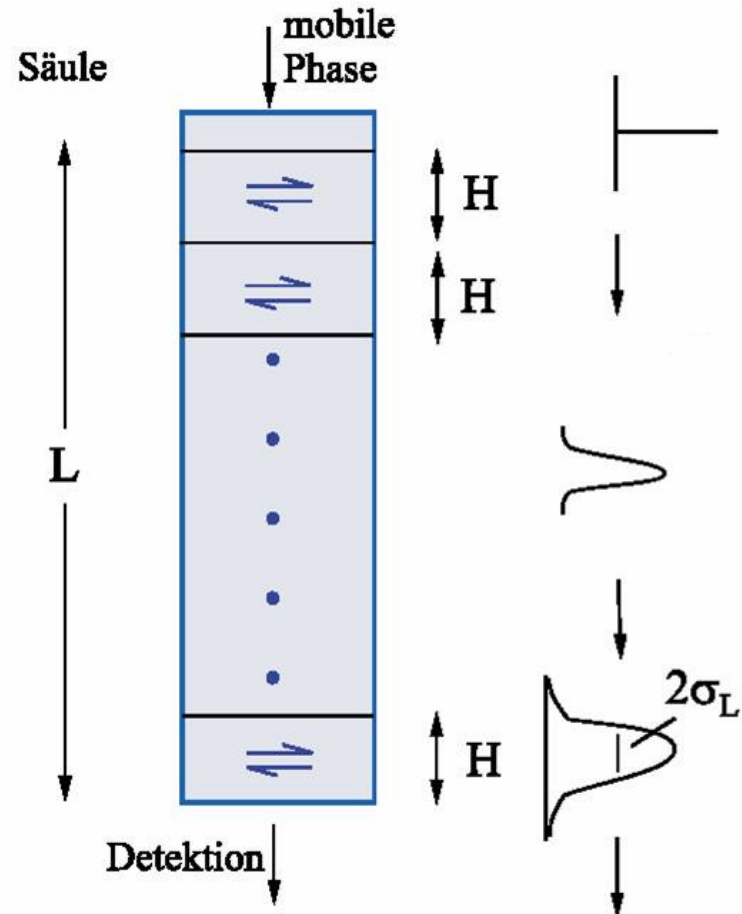
Effizienz einer Säule könnte mit Varianz pro Einheitslänge definiert werden

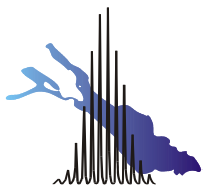
Bodenhöhe (Trennstufenhöhe):

$$H = \sigma^2 / L$$

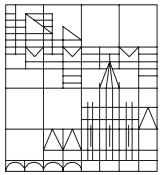
Bodenzahl (Trennstufenzahl):

$$N = L / H$$





Einschub: Gauß-Verteilung

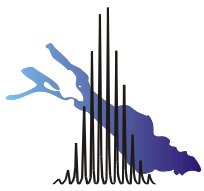


Bei punktförmiger Aufgabe der Probe (d.h. innerhalb eines **sehr kurzen Zeitintervalls Δt**) wandern die Komponenten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Trennsäule.

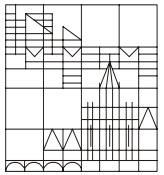
=> zeitlicher Verlauf der Konzentration zeigt ein Gauß-Profil mit Maximum bei der Retentionszeit t_{Ri} :

$$c_i^f = f(t)_L = (c_{i\max}^f)_L * \exp\left[-\frac{1}{2} \left[\frac{t - t_{Ri}}{\sigma_{ti}}\right]^2\right]$$

- L Länge der Säule
- $(c_{i\max}^f)_L$ Konzentrationsmaximum der Verteilungsfunktion am Ende der Säule
- t_{Ri} Retentionszeit (= mittlere Verweilzeit der Komponente i in der chromatographischen Trennstrecke)
- σ_{ti} halber Abstand der Wendepunkte der Gauß'schen Verteilungsfunktion der Komponente i (= Standardabweichung)



Was kann die Bodentheorie?



3. Die Effizienz einer Säule als Bodenzahl experimentell abschätzen

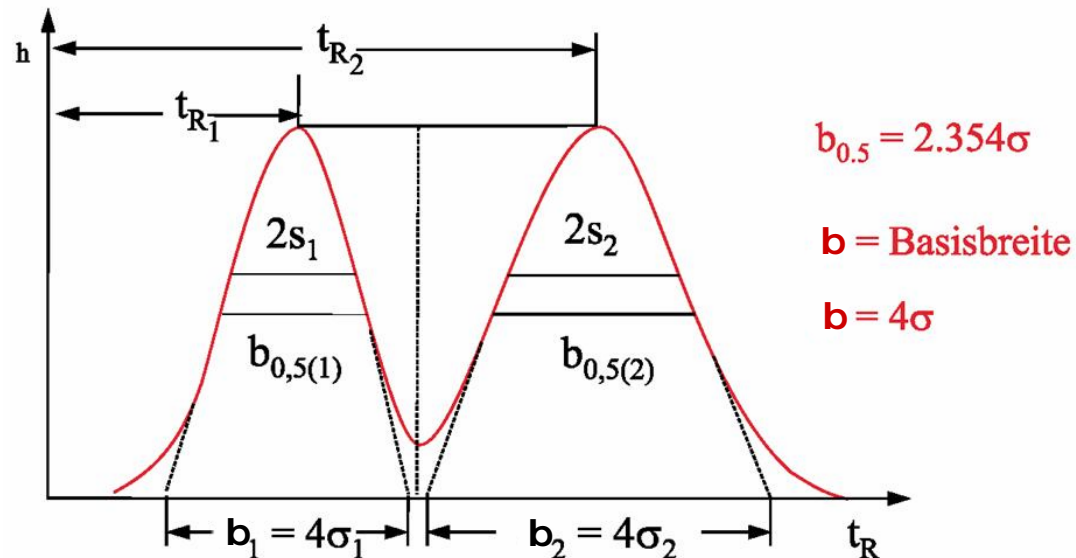
Theoretisch: Effizienz einer Säule könnte mit Varianz pro Einheitslänge definiert werden

Bodenhöhe (Trennstufenhöhe):

$$H = \sigma^2 / L$$

Bodenzahl: (Trennstufenzahl):

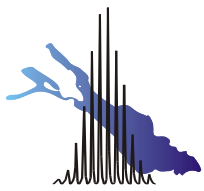
$$N = L / H = L^2 / \sigma^2$$



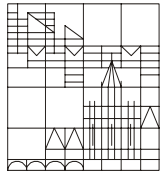
Experimentell:

Nach Umwandlung von Länge in Retentionszeit und σ in Peakbreite:

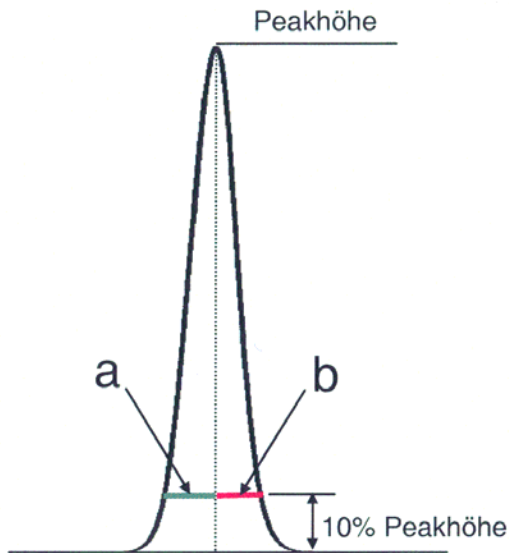
$$\text{Bodenzahl: } N = 16 (t_R / b)^2 = 5.54 (t_R / b_{0,5})^2$$



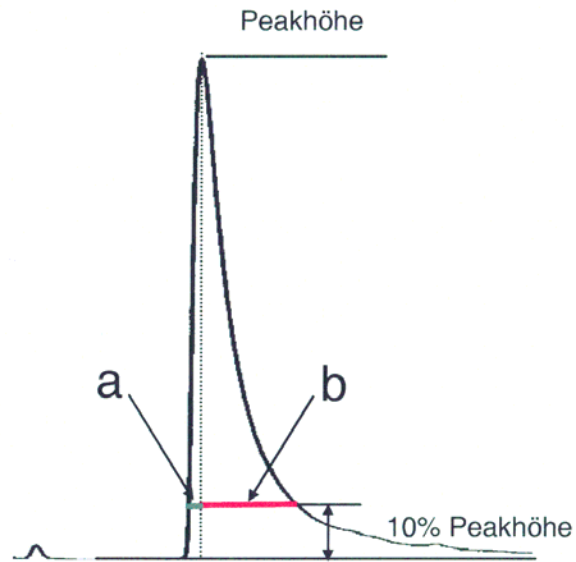
Einschub: Peaksymmetrie



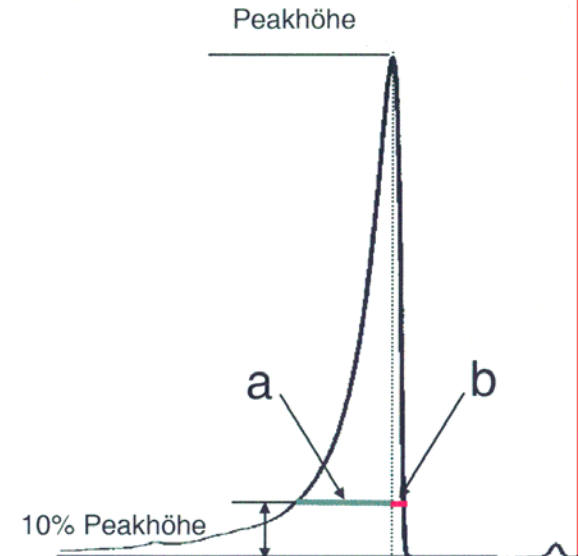
Optimaler „Gauß-Peak“



„Tailing“

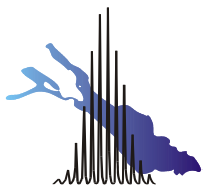


„Fronting“

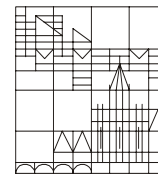


Tailingfaktor nach IUPAC (bei 10% Peakhöhe): $T = \frac{b}{a}$

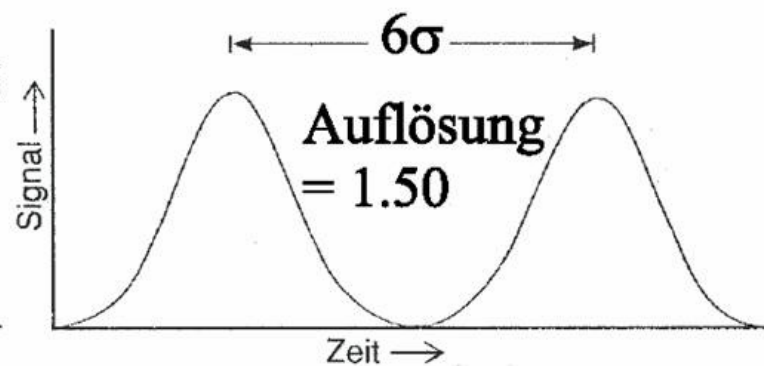
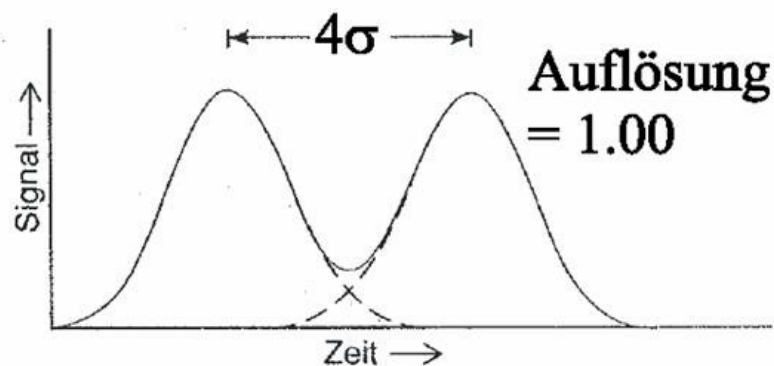
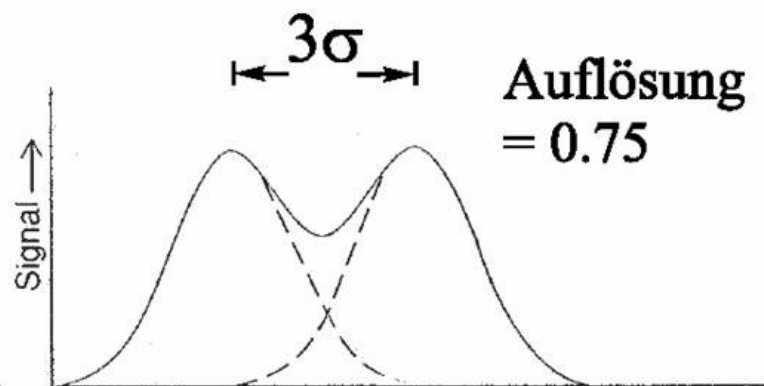
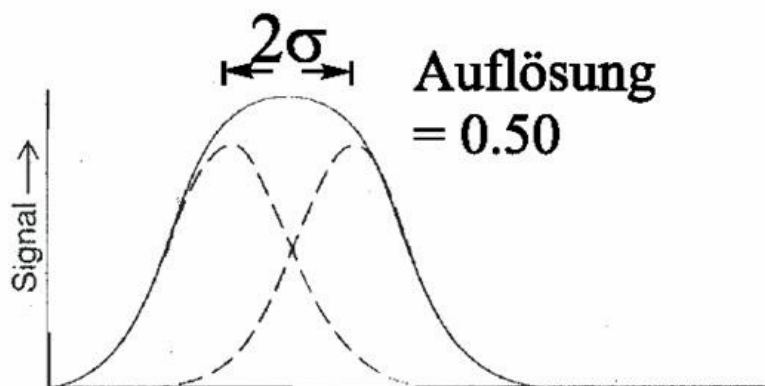
Tailingfaktor nach USP (bei 5% Peakhöhe): $PTF = \frac{a+b}{2a}$

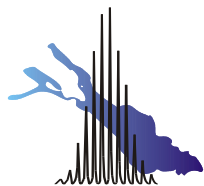


Wie hoch muss die Säuleneffizienz sein?

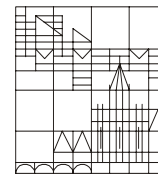


$$\text{Auflösung } R = 2 \cdot \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{b_{B2} + b_{B1}} \right)$$





Wie kann die Bodentheorie praktisch helfen?

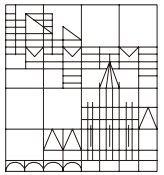
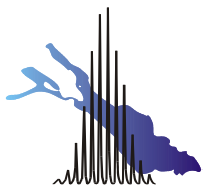


1. Mobile und stationäre Phase für analysierende Substanzen wählen
2. Optimale Säulenlänge und Säuleneffizienz für analysierende Substanzen bestimmen
3. Säuleneffizienz experimentell kontrollieren

Bodenzahl und Bodenhöhe für typische Gaschromatographie (GC)- und Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC)-Säulen

Säulentyp	N (pro Säule)	H (mm)
GC, Kapillarsäulen, 25m		
0,5 mm Innendurchmesser	20'000 – 50'000	0,5 – 1,3
0,1mm Innendurchmesser	30'000 - 100'000	0,2 – 0,6
HPLC, 25cm		
10mm Partikel	2'500 – 5'000	0,05 – 0,1
3mm Partikel	8'000 – 18'000	0,02 – 0,05

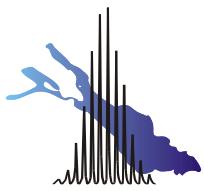
Was kann die Bodentheorie nicht?



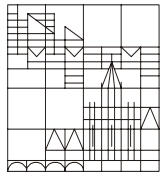
- **Bodentheorie kann die erwartete Säuleneffizienz nicht garantieren!**
- **In Wirklichkeit kann der Gleichgewichtszustand niemals realisiert werden!!**

Zusätzliche Bandverbreiterung ist abhängig von:

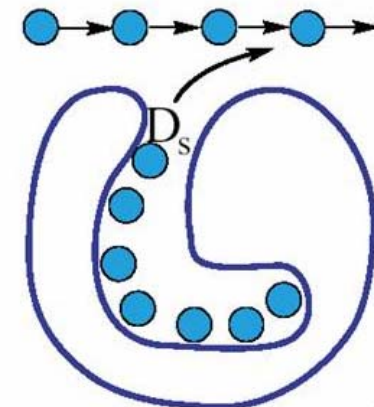
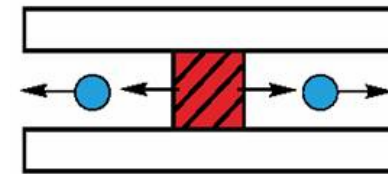
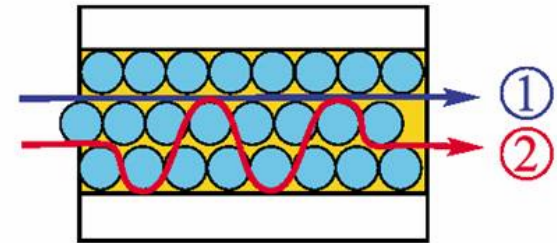
- 1. Lineare Fließgeschwindigkeit**
- 2. Diffusionskoeffizienten von Substanzen in der stationären und in der mobilen Phase**
- 3. Dicke des Flüssigkeitsfilms auf der stationären Phase, Teilchengröße der Packung**

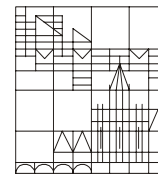
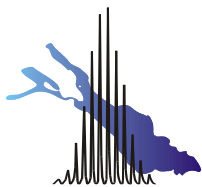


Kinetische Prozesse die zur Bandverbreiterung beitragen



1. Die **Streudiffusion (Eddy Diffusion)** ist abhängig von der Art des Füllmaterials, von der Korngröße und von der Packungsgüte
2. Die **Longitudinale (axiale) Diffusion** ist umgekehrt proportional der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase
3. Der **Massentransfer** in der stationären und in der mobilen Phase (Massentransferkoeffizienten C_s und C_M) ist proportional der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase

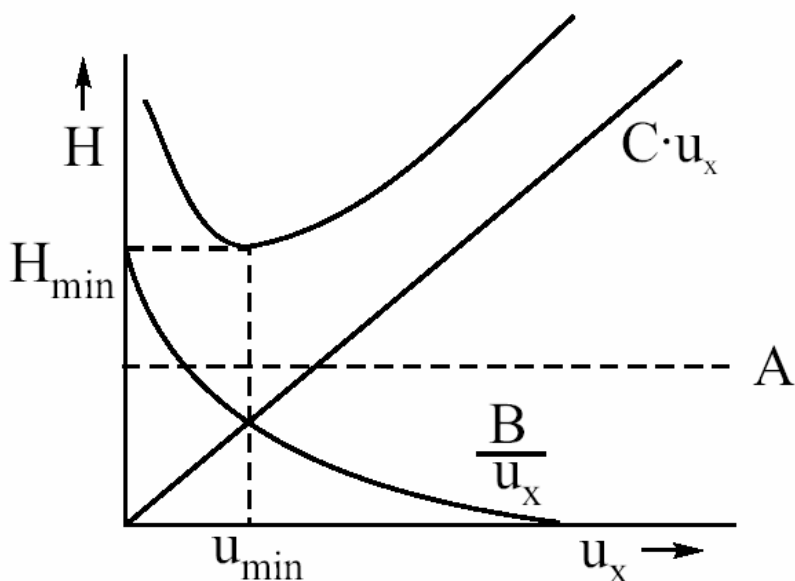




Dynamische Theorie

- Die dynamische Theorie beschreibt den chromatographischen Trennprozess in der Säule als dynamischen Prozess und betrachtet Massentransfer- und Diffusionsvorgänge.
- In der dynamischen Theorie wird die Trennstufenhöhe mit der Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase verknüpft.

van Deemter-Gleichung



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

H = Bodenhöhe

u_x = lineare Fließgeschwindigkeit

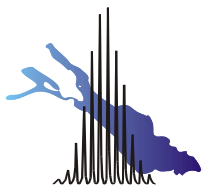
$$u_{\min} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

$$H_{\min} = A + 2 \cdot \sqrt{B C}$$

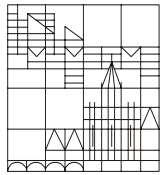
A Die Streudiffusion (Eddy Diffusion)

B/ u_x Longitudinale (axiale) Diffusion

$C \cdot u_x$ Massentransfer



A – Term (Streudiffusion)



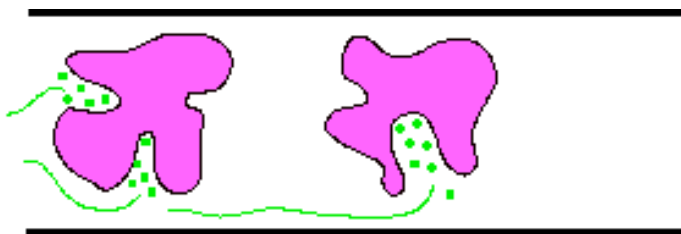
Die **Streudiffusion** ist abhängig von der Art des **Füllmaterials**, von der **Korngröße** und von der **Packungsgüte**



Beim Weg durch die Trennsäule legen die Probenmoleküle aufgrund unterschiedlicher Korngrößen auch unterschiedliche lange Wege zurück. Durchströmen die Teilchen feinkörniges Packungsmaterial, ist ihr Weg länger, als wenn sie grobkörniges Packungsmaterial durchströmen

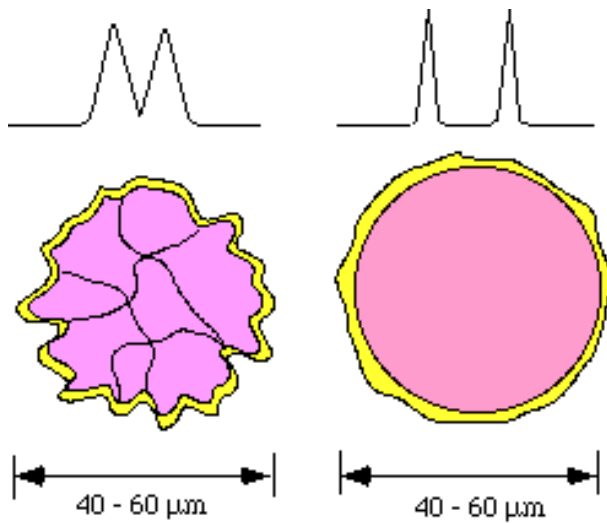
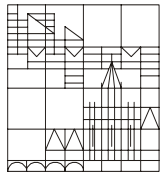
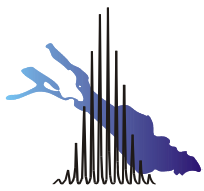


Ist eine Trennsäule nicht vollkommen gleichmäßig gepackt, dann bilden sich Kanäle, in denen sich das links dargestellte Strömungsprofil ausbilden kann. In der Strommitte der Kanäle ist die Geschwindigkeit der mobilen Phase am größten.

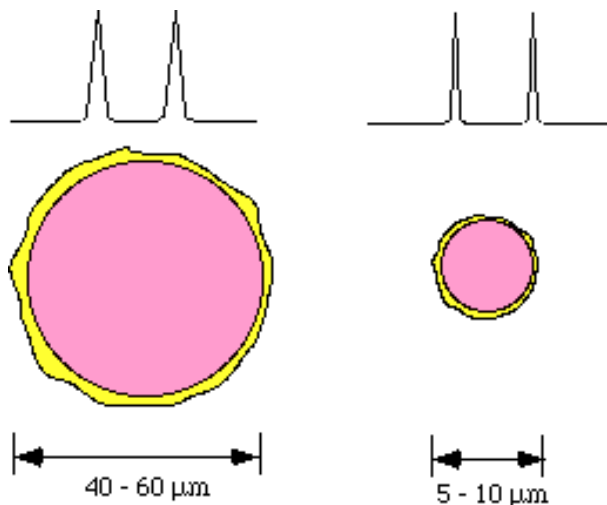


Ist die Oberfläche der stationären Phase sehr porös, dann bilden sich in den Vertiefungen schlecht durchströmte Bereiche. Probenmoleküle in diesen Bereichen werden von der mobilen Phase erst weitertransportiert, wenn sie die Poren durch Diffusion wieder verlassen haben

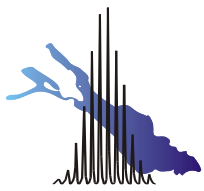
Der Einfluß der Korngröße und der Kornoberfläche



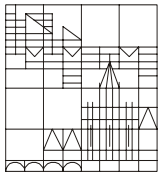
Bei gleicher Korngröße führt eine unregelmäßigere und porösere Kornoberfläche zu breiteren Peaks (schlechtere Auflösung)



Bei einem kugelförmigen Packungsmaterial geringer Porosität erhält man bei kleinerer Korngröße schmalere Peaks

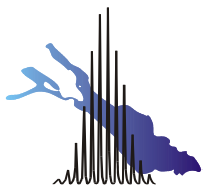


B – Term (Longitudinaldiffusion)

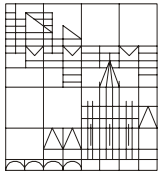


Der ***B***-Term beschreibt den **Einfluss der molekularen Diffusion entlang der Säulenachse (molekulare Axialdiffusion)**.

Bei unendlich kleiner Strömungsgeschwindigkeit würde sich eine Verbindung nur aufgrund der Molekularbewegung in beide Säulenrichtungen bewegen und zu einer Peakverbreiterung führen. Die Axialdiffusion ist zum einen davon abhängig, wie lange die Probenmoleküle sich in der mobilen Phase befinden. Dauert es lange, bis die Probenmoleküle mit der mobilen Phase durch die Säule transportiert werden, dann bekommt man breitere Peaks als wenn die Probenmoleküle schnell eluiert werden. Der Term B/u wird umso kleiner, je größer die Strömungsgeschwindigkeit ist. Dies hat zur Folge, dass eine Erhöhung der Trägergasströmung zu schmalere Peaks führt. B hängt nur vom Diffusionskoeffizienten der Verbindung in der mobilen Phase ab. In Gasen mit geringerer Dichte besitzen alle Stoffe größere Diffusionskoeffizienten. Deshalb müssen bei der Gaschromatographie für Wasserstoff und Helium größere Strömungsgeschwindigkeiten gewählt werden als für Stickstoff.

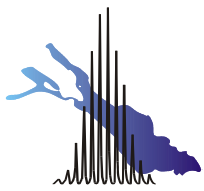


C – Term (Massenübergangsdiffusion)

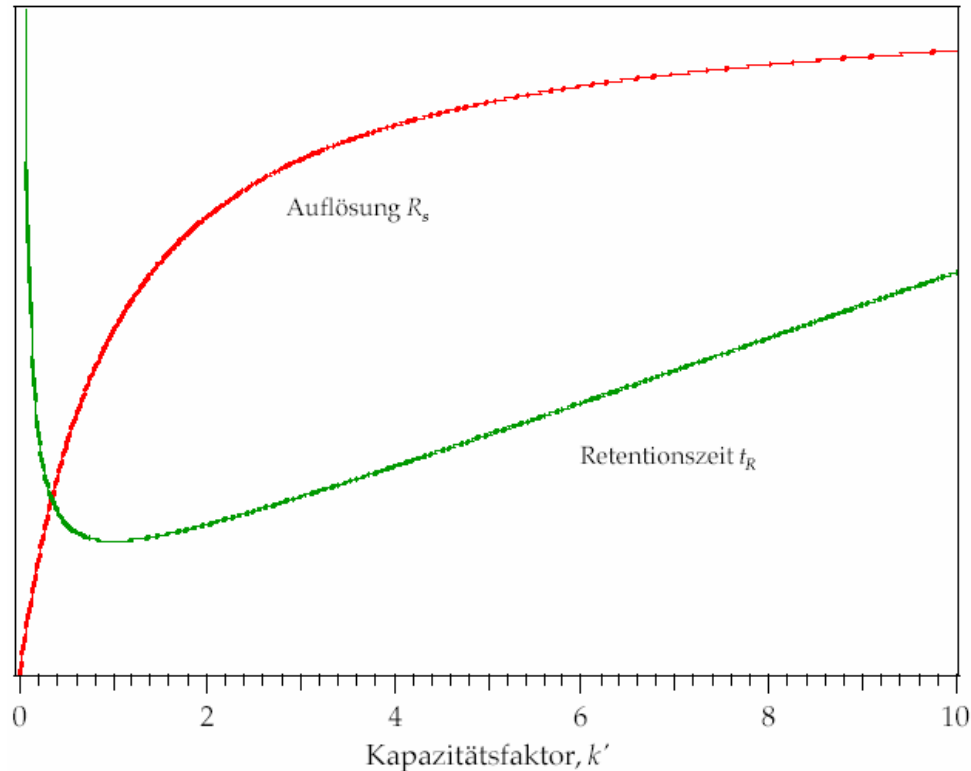
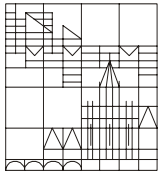


Der C-Term beschreibt die **Massentransfer-Beständigkeit**.

Dieser Term beschreibt, mit welcher Geschwindigkeit sich Probenmoleküle zwischen der mobilen und stationären Phase verteilen. Mit steigender Trägergasströmung haben die Probenmoleküle immer weniger Zeit zur vollständigen Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen der stationären und der mobilen Phase. Wird die Strömungsgeschwindigkeit zu hoch, dann bleibt nicht genug Zeit für die Gleichgewichtseinstellung. Ein Teil der Probenmoleküle wird durch die mobile Phase schon vorher weitertransportiert. Hierdurch kommt es zu Peakverbreiterungen.



Optimieren einer chromatographischen Methode



- geringe Korngrößen bzw. Filmdicken stationärer Phasen
- homogene Packungen der stationären Phase durch engverteilte Materialien
- kleine Säulendurchmesser
- große Diffusionskoeffizienten in der stationären Phase und kleine Diffusionskoeffizienten in der mobilen Phase