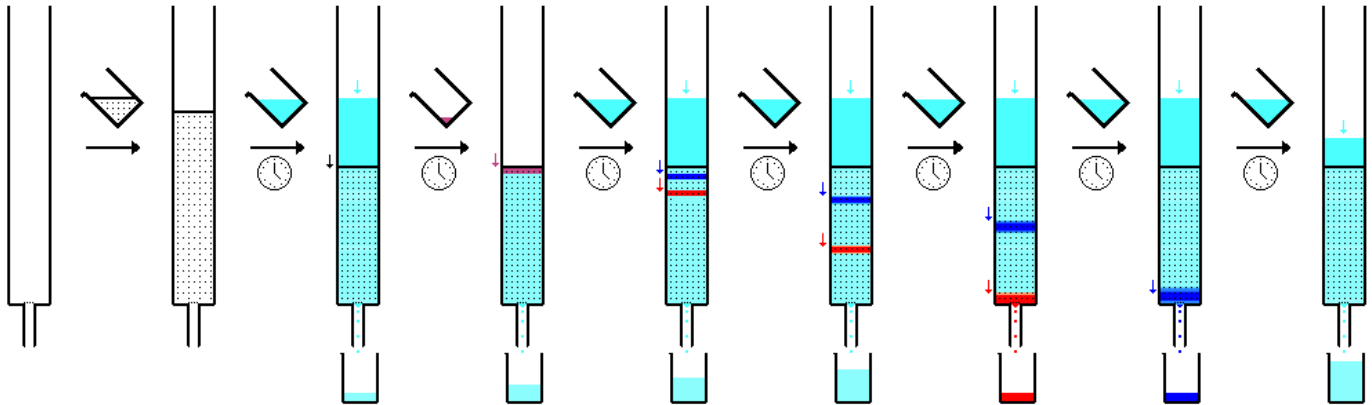


Chromatographische Methoden werden heute universell eingesetzt, insbesondere dort, wo die klassischen Trennverfahren wie Destillation oder Umkristallisation versagen. Die Chromatographie nutzt die nur geringfügigen Unterschiede zwischen ähnlichen Stoffen eines Gemisches aus, um sie voneinander zu trennen. Sie kann dabei sowohl der Stofftrennung (**präparativer Chromatographie**) als auch der Analyse (**analytische Chromatographie**) dienen.

Bei der Chromatographie wird das Substanzgemisch von einer gasförmigen oder flüssigen **mobilen Phase** an einer **stationären Phase** mit Poren und großen inneren Oberflächen vorbeigeführt. Dabei findet laufend ein Stoffaustausch der zu trennenden Substanzen zwischen stationärer und mobiler Phase statt. Die Komponenten der Mischung durchwandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in Strömungsrichtung der mobilen Phase und trennen sich dadurch auf:



Schematische Darstellung einer präparativen Chromatographie mit einer Säule. Quelle: commons.wiki.org. Autor: quantockgoblin

Zwei Prinzipien tragen zur Trennung bei

Alle chromatographischen Methoden beruhen auf der unterschiedlichen Verteilung von chemischen Substanzen in der stationären und mobilen Phase eines chromatographischen Systems. Je nach der chemischen Natur des Stoffes wird er also sein Weitertransport durch die stationäre Phase unterschiedlich stark verzögert (**retardiert**). Bei der Verzögerung (Rückhaltung, **Retention**) können folgende beiden **Retentionsmechanismen** beitragen.

- **Adsorption bzw. Adsorptionschromatographie:** Die Moleküle gehen eine direkte bindende Wechselwirkung mit den großen Oberflächen der **festen** stationären Phase ein. Es kommt zu einer **Konkurrenz um die Bindungsstellen** zwischen den Molekülen der mobilen Phase und den verschiedenen Probemolekülen. Je stärker die *Adsorptionskräfte* einer Molekülart zur stationären Phase ist, desto mehr kann die Molekülart die Bindungsstellen für sich beanspruchen und die anderen Moleküle verdrängen: Je höher die **Affinität (Bindungsbestreben)** einer Probenkomponente zur stationären Phase, desto stärker wird sie retardiert.
- **Verteilung bzw. Verteilungschromatographie:** Das feste Trägermaterial ist mit einem nur wenige Moleküle breiten Flüssigkeitsfilm benetzt. Zu diesem Flüssigkeitsfilm tragen auch Wassermoleküle bei, die viele Materialien der stationären Phase von Natur aus besitzen. Die Trennung beruht jetzt auf unterschiedlichen Löslichkeiten der Probenkomponenten in der **flüssigen** stationären Phase und der vorbeiströmenden mobilen Phase. Es kommt zu Verteilungsgleichgewichten der Komponenten zwischen der ‚freien‘ (mobile Phase) und der in den Poren zurückgehaltenen Flüssigkeit (stationäre Phase).

Bei den meisten chromatographischen Systemen tragen beide Retentionsmechanismen zur Auftrennung bei, denn sie schließen sich nicht gegeneinander aus! Der jeweilige Anteil variiert je nach stationärer Phase und mobiler Phase.

Liegt die stationäre Phase bzw. deren Träger in einer Säule vor, die von der mobilen Phase durchströmt wird, so spricht man auch von **Säulenchromatographie**. Bei der **Dünnschichtchromatographie** ist die stationäre Phase auf einem planaren (=ebenen) Träger (Glasplatte oder Kunststoffolie o.ä.) aufgetragen. Bei der **Papierchromatographie** ist dieser Träger gleichzeitig auch die stationäre Phase.

Dünnschichtchromatographie – Moleküle auf Wanderschaft

C2CL

Die **Dünnschichtchromatographie (DC)** ist ein Trennverfahren, das hauptsächlich zur Untersuchung der Zusammensetzung von Proben genutzt wird, zum Beispiel zum raschen Nachweis ihrer Reinheit und Identität. Seltener dient sie auch zur Aufreinigung und Gewinnung reiner Substanzen (**präparative DC**).

Die Trennung erfolgt während des Durchströmens einer Flüssigkeit, der **mobilen Phase**, in der DC auch **Fließmittel** genannt, durch eine Pulverschicht. Die unterschiedlichen Probenbestandteile werden durch das Fließmittel weiter transportiert und zeigen dabei unter geeigneten Bedingungen, d.h. passende Wahl der Flüssigkeit und der Pulverschicht, deutlich unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten. Auf der DC-Platte kommt es also zur Auftrennung des Probengemisches in einzelne Substanzflecken. Im Gegensatz zu säulenchromatographischen Verfahren verbleiben die aufgetrennten Stoffe in der stationären Phase, so dass man hier auch von einer **inneren Chromatographie** spricht.

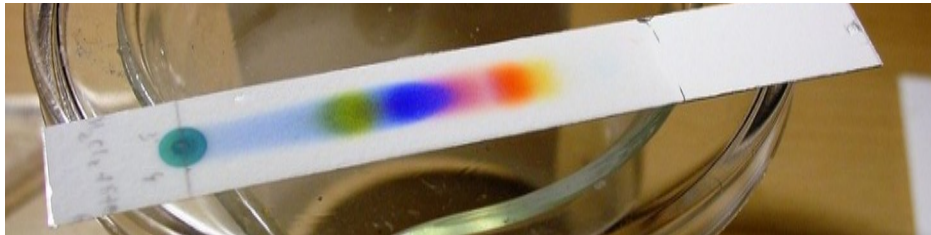


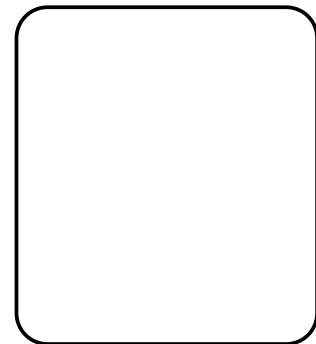
Abb. 1.1: Trennergebnis, bei der Auftrennung eines schwarzen Permanentmarkers auf der DC-Schicht mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch als Fließmittel. (Quelle: commons.wikimedia.com. Autor: Natrij)

Es ist auch notwendig, dass Methoden zur Verfügung stehen, die die in der Regel farblosen Substanzen nach der Trennung sichtbar machen.

1. Auftragung

Man gibt kleine Volumina Probelösung und Referenzlösungen punktförmig oder als kurze Striche auf eine dünne Schicht aus sehr feinkörnigem Material (z. B. Kieselgel, Kieselgur, Aluminiumoxid, Cellulose), die **Trennschicht** oder auch **stationäre Phase** genannt wird. Diese Trennschicht ist gleichmäßig auf einer **Trägerplatte** aus Kunststoff, Aluminiumblech oder Glas aufgetragen und in unterschiedlichen Schichtdicken erhältlich.

Damit die Probeflecken möglichst nahe zu allen Referenzflecken sind, wird die Probe auf der Platte auf einer mittigen Position aufgetragen!

**1.1 Fertigen Sie eine Schemazeichnung an.**

Es ist entscheidend, die Auftragezonen möglichst eng zu halten (max. 1-3 mm). Deshalb gibt es spezielle **DC-Kapillaren** mit einem sehr geringen Durchmesser. Beim Eintauchen in die flüssige Lösung steigt durch die Kapillarkraft etwas Volumen das Röhrchen hoch. Berührt man damit die DC-Platte, so entleeren sie ihren Inhalt auf einem Punkt. Kommerziell erhältlich sind auch DC-Folien mit so genannten **Konzentrationszonen**. Damit sind so besonders enge Auftragezonen erzielbar. Die Probeflecken werden dadurch nach Beginn der Chromatographie in der Richtung der Laufstrecke zusammengestaucht (Zone mit geringer Adsorption wird vorgeschaltet).

2. Auftrennung

Die Trennung führt man in allgemein in einer mit dem Fließmittel gesättigten Atmosphäre in einem geschlossenen Gefäß durch (**Kammersättigung**). Ist die Kammersättigung nicht erreicht, treten folgende negative Effekte auf :

- Die Trennung dauert länger, weil ständig Fließmittel während des Hochsteigens von der Platte verdunstet. So wandert die Lösungsmittelfront langsamer nach oben.
- Die relative Laufhöhe einer Substanz im Vgl. zur Lösungsmittelfront (R_F -Wert, *siehe unten*) ist nicht konstant. Trennergebnisse auf verschiedenen Platten sind so untereinander nicht vergleichbar, obwohl dieselbe mobile und stationäre Phase genutzt wurde.
- Die Laufmittelfront ist ungleichmäßig hoch („mit Wellen“).

Bei großen DC-Kammern kann die Kammersättigung viele Stunden dauern. Wegen des schnelleren Erreichens einer Kammersättigung ist es sinnvoll, eine DC-Kammer mit möglichst kleinem Kammerraum zu benutzen. Ist die Kammersättigung erreicht, stellt man die DC-Platte senkrecht in ein Gefäß (**DC-Kammer**) mit einem geeigneten Fließmittel, der mobilen Phase, in die die DC-Folie zu einem geringen Teil eintaucht, und verschließt es.

Als Laufmittel wird meist eine Mischung eines unpolaren und eines mäßig polaren Lösungsmittels genutzt (z.B. n-Hexan und Essigsäureethylester). Über das Mischungsverhältnis kann man die Polarität des Fließmittels gut steuern. Das Fließmittel saugt sich nun über Kapillarkräfte in der stationäre Phase nach oben. Sobald die Flüssigkeit den Gemischfleck erreicht hat, wird er gelöst; seine Moleküle sind nun den Anziehungskräften der stationären Phase einerseits und den Anziehungskräften der mobilen Phase andererseits ausgesetzt.

Das Grundprinzip der Chromatographie kann folgend zusammengefasst werden: Moleküle verteilen sich auf zwei Phasen in einem bestimmten Verhältnis (Gleichgewichtszustand). Entscheidend ist, dass sie individuell mit hoher Geschwindigkeit von der einen Phase in die andere wechseln und wieder zurück (dynamischer Gleichgewichtszustand). Es wird angenommen, dass die gelösten Probemoleküle, solange sie sich in der mobilen Phase aufhalten, dieselbe Geschwindigkeit haben wie die Fließmittelmoleküle. Sind sie an die stationäre Phase gebunden, ist die Geschwindigkeit dagegen gleich Null („**stop and go**“-Modell). Wegen ihres unterschiedlich hohen Bindungsbestrebens an die stationäre Phase, unterscheidet sich der Zeitanteil, den die einzelne Probenkomponente sich in der mobilen Phase verbringt. So werden also Verteilungsunterschiede in Geschwindigkeitsunterschiede verwandelt. Auch wenn die Geschwindigkeitsunterschiede gering sind, ist es nur eine Frage der Zeit bzw. der Länge der Wegstrecke, bis es zu einer ausreichenden Auftrennung gekommen ist. Bei langer Laufstrecke werden zwar auch die Zonen/Flecken breiter, es überwiegt jedoch der Vorteil räumlichen Auftrennung. Daher ist es bei schwierigen Trennungen sinnvoll, größere DC-Folien und Laufstrecken zu verwenden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die unterschiedliche Wechselwirkungen der Komponenten des aufgetragenen Gemischs mit der stationären und der mobilen Phase für die Trennung verantwortlich sind. Die Kräfte und somit das Wanderverhalten eines Teilchens hängen sowohl von der Art des Schichtmaterials und des Fließmittels, als auch von der Art des Teilchens ab. In den meisten Fällen lassen sich Schichtmaterialien und Fließmittelgemische so kombinieren, dass die verschiedenen Teilchensorten eines Gemisches verschieden weit wandern, sodass sie sich von einander trennen lassen.

3. Normalphasenchromatographie und eluotrope Reihe (gilt auch für die anderen chromatographischen Verfahren)

In der **Normalphasenchromatographie** werden polare stationäre Phasen (z.B. Kieselgel oder Aluminiumoxid) benutzt. Die aufzutrennenden Stoffe binden mit polaren Wechselwirkungen (hauptsächlich H-Brücken, aber auch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) an die stationäre Phase. **Je stärker die Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase sind, d.h. je polarer der Stoff, desto besser kann er an das Material binden und desto langsamer wandert er durch die stationäre Phase.**

Die mobile Phase muss, um ein Analytteilchen weiterzutransportieren, dieses von der stationären Phase ablösen (**eluieren**). Die Elutionswirkung der verwendeten Lösungsmittelkomponenten unterscheidet sich. Sie wird in der **eluotrope Reihe** (auch „elutrope Reihe“) wiedergegeben. Für Kieselgel ergibt sich folgende Reihe (Auszug):

3.1 Schreiben Sie rechts neben den Bezeichnungen die Strukturformeln und geben sie in Klammern Synonyme an.

3.2 Nach welchem Kriterium ist die Liste (hauptsächlich) sortiert? Welcher der aufgeführten Lösungsmittelkomponenten hat die größte Elutionswirkung? Begründen Sie!

1. *n*-Hexan
2. Tetrachlormethan
3. Diisopropylether
4. Toluol
5. Diethylether
6. Methylenchlorid (Dichlormethan)
7. Chloroform (.....)
8. Aceton
9. Tetrahydrofuran (THF)
10. MTBE (*tert*-Butylmethylether)
11. Ethylacetat (.....)
12. Acetonitril
13. 2-Propanol (Isopropanol)
14. Ethanol
15. Essigsäure

In der Regel verwendet man zur optimalen Trennung in der NP-Cchromatographie Lösungsmittelgemische die im Vergleich zur stationären Phase eher unpolar bis mäßig polar sind. Häufig werden Ester, Ether und Alkohole verwendet.

3.3 Wird eine polare Substanz, wie Acetylsalicylsäure in der Normalphasenchromatographie von Hexan oder von Methanol schneller eluiert? Begründen Sie!

.....

.....

.....

3.4 An welcher Stelle der eluotropen Reihe würden Sie a) Wasser und b) Methanol als Substanzen einordnen? Begründen Sie! Überprüfen Sie anschließend ihre Antwort mithilfe des Tabellenbuchs!

.....

.....

3.5 In einem Protokoll schreibt ein Auszubildender: „Um einen relativ unpolaren Analyten in der Normalphasenchromatographie schneller durch die stationäre Phase wandern zu lassen, muss sein Bindungsbestreben (Affinität) zur mobilen Phase erhöht und zur stationären Phase vermindert werden. Die mobile Phase muss deshalb unpolarer gemacht werden.“ Nehmen Sie ausführlich Stellung zu dieser Aussage!

3.6 Auf einer DC mit Kieselgel werden folgende Analyte getrennt: 6-Hydroxyhexansäure und Hexandisäure.

- a) Geben Sie die Strukturformeln an.
- b) Mit reinem Aceton als Fließmittel, ist die Trennung schlecht: Beide Stoffe wandern sehr hoch, aber gleich weit. Begründen Sie beide Sachverhalte!
- c) Eine bessere Trennung gelingt mit Dichlorethan/Aceton (60%/40%). Begründen Sie. Welcher der beiden Stoffe wandert weiter?

4. Umkehrphasenchromatographie (reversed phase, RP)

Interessant ist auch die Verwendung von DC-Material, das unpolare Adsorptionsstellen aufweist (**Umkehrphasen-Chromatographie, reversed phase (RP) chromatography**). Hier werden polarere mobile Phasen benutzt, die als Hauptbestandteil z.B. Wasser enthalten können. Die Reihenfolge, in der die verschiedenen Probemoleküle eluieren ist im Vergleich zur Normalphasenchromatographie umgekehrt: Je polarer die Substanz, desto schneller wird sie eluiert. Vorteilhaft erweisen sich bei der Umkehrphasenchromatographie ist dabei unter anderem:

- Es werden weniger flüchtige organische Lösungsmittel (also weniger Ether, Ester oder Alkane) benutzt. $\Rightarrow$ Geringere Umweltgefährdung (Gesundheit, Naturschutz, Brandgefahr)
- Die Probe kann direkt als wässrige Lösung aufgebracht werden. Zur Auftragung der Probe bei der Normalphasenchromatographie muss i.d.R. das Wasser entfernt und durch ein unpolares Lösungsmittel ersetzt werden.

5. Nachweismöglichkeiten und Auswertung

Handelt es sich nicht um Farbstoffe, müssen die Substanzen sichtbar gemacht werden. Dafür gibt es mehrere Verfahren:

fluoreszierende DC-Platten: Viele Schichtmaterialien enthalten Zusätze, die im UV-Licht fluoreszieren. Diese Fluoreszenzfarbstoffe dürfen während der chromatographischen Trennung nicht wandern. Gebräuchlich sind vor allem Mangan aktiviertes Zinksilikat (wird mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm bestrahlt) und Calciumwolframat (wird mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 366$ nm bestrahlt). Auf die DC-Platte genau unterhalb der Substanzflecken gelangt dann weniger UV-Strahlung, so dass an diesen Stellen auch nur eine geringere Fluoreszenz auftritt (**Fluoreszenzminderung**). Die Substanzen sind als dunkle Flecken auf grün bzw. blau leuchtendem Hintergrund zu sehen. Stoffe die für diese Detektionsart in Frage kommen, müssen natürlich bei der eingestrahlten UV-Wellenlänge absorbieren, z.B. alle aromatischen Verbindungen. Solche Platten geben in der Bezeichnung die erforderliche Wellenlänge an (z.B. „Kieselgel F254“, „Cellulose F254“ oder Kieselgel F366“).

Abb.
5.1:



Dunkel erscheinende Flecken unter dem UV-Strahler. (Quelle: commons.wikimedia.org. Autor: Matt)

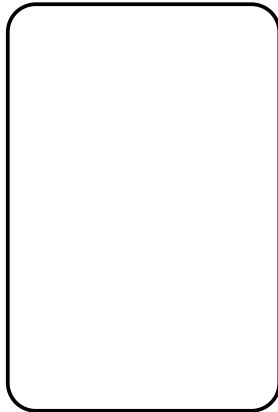
fluoreszierende oder radioaktive Stoffe: Auch die Fluoreszenz oder Radioaktivität von Substanzen kann zu deren Detektion herangezogen werden. Bei Eigenfluoreszenz ist die Bestrahlung mit UV-Licht erforderlich.

Derivatisierung: Sinnvoll und gebräuchlich ist eine Kombination von Methoden: zuerst Betrachtung unter der UV-Lampe, anschließend chemische Reaktionsmethoden. Die Substanzen können durch Besprühen mit Reagenzien-Lösungen evtl. mit anschließendem Erhitzen, sichtbar gemacht (detektiert) werden. Hierfür gibt es mehrere Möglichkeiten:

1. **Universalreagenzien:** Hierbei werden alle oder möglichst viele Substanzen durch das Reagenz sichtbar gemacht. Eine Methode besteht z.B. in der Bedampfung mit molekularem Iod. Dazu genügt es, in ein Glasgefäß ein paar Iod-Kristalle zu legen. Sie sublimieren und bilden dabei einen violetten Dampf. Durch Einlegen einer DC-Folie in einen solche Kammer, werden mit den Molekülen der Substanzflecken binnen kurzer Zeit lockere, reversible (!), farbige Komplexverbindungen gebildet.
2. **Spezielle Reagenzien:** Oft handelt es sich dabei um Farbreaktionen, die sich empfindlich und spezifisch zum Nachweis bestimmter funktioneller Gruppen eignen. In der Biochemie ist eine **saure Ninhydrin-Lösung** ein häufiges Sprühreagenz, um Aminosäuren oder Proteine zu detektieren.

Durch Auftragen von Referenzsubstanzen auf die gleiche DC-Platte wie entsprechende Probenkomponenten, kann man auf das qualitative Auftreten der Stoffen in der Probe schließen (**vergleichende Chromatographie**). Ist der Stoff in der Probe vorhanden, so liegt der Substanzfleck der Probe auf gleicher Höhe wie der Referenzfleck.

Um verschiedene DCs vergleichen zu können werden die so genannten **R_F-Werte** (im Deutschen für **Retentionsfaktor**) berechnet.



Original-Definition der IUPAC zum **retardation** [sic!] **factor** (Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed.): Ratio of the distance travelled by the centre of the spot to the distance simultaneously travelled by the mobile phase:

$$R_F = \frac{b}{a}$$

By definition the R_F values are always less than unity. They are usually given to two decimal places.

5.1 Vervollständigen und beschriften Sie die Zeichnung links, so dass Sie jeden Aspekt dieser Definition illustriert.

Abb. 5.2: R_F-Wert

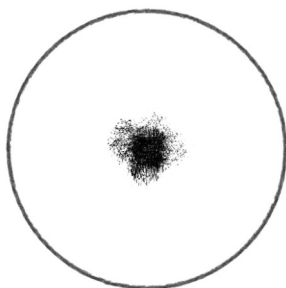
Die R_F-Werte sind nur bei gleichen Rahmenbedingungen für einen Stoff konstant!

5.2 Welche Rahmenbedingungen sind das im einzelnen?

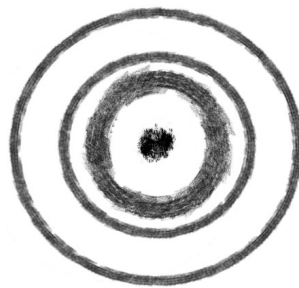
6. Weitere Aspekte in der (Dünnschicht-)Chromatographie

6.1 Schnellverfahren zur Ermittlung geeigneter Fließmittel-Adsorbens-Paare

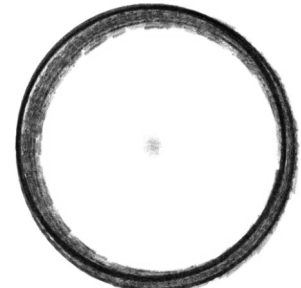
Mithilfe eines Schnellverfahrens lässt sich für die Trennung eines Substanzgemisches eine erste Auswahl für ein geeignetes Fließmittel treffen. Das zu trennende Substanzgemisch wird auf der DC-Schicht mehrmals aufgetragen (z.B. mit Kapillarröhrchen). Jeder Auftragungspunkt wird mit einigen Tropfen des zu testenden Lösungsmittel (Fließmittel) versetzt. Nun können die verwendeten Lösungsmittel hinsichtlich ihrer Elutionswirkung verglichen werden.



a)



b)



c)

Abb. 6.1: Elutionsversuch eines Zuckergemisches auf einer Kieselgelschicht mit drei verschiedenen Fließmittelgemischen aus Acetonitril und Wasser. (vgl. auch Aufgabe 6.1)

6.1 Ordnen Sie den Abbildungen a) – c) eines der folgenden Fließmittel zu und begründen Sie, welches am vielversprechendsten ist: V(Acetonitril): V(H₂O) = 85:15, V(Acetonitril): V(H₂O) = 60:40, V(Acetonitril): V(H₂O) = 95:05,

6.2 Quantitative Dünnschichtchromatographie

Eine quantitative Auswertung ist mit digitalisierten Bildern möglich, häufig werden zur Erstellung auch Dokumentationsgeräte („DC-Scanner“) eingesetzt. kann. Mithilfe von Bildanalyse-Programmen (z.B. das *freie Programm ImageJ) kann man die Farbmenge eines Flecks oder auch die Fleckenfläche bestimmen

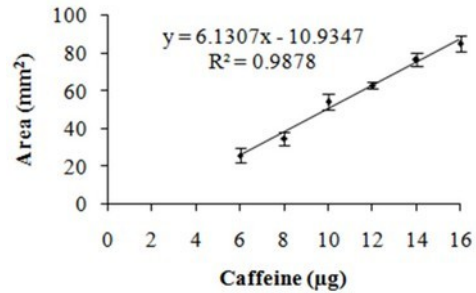
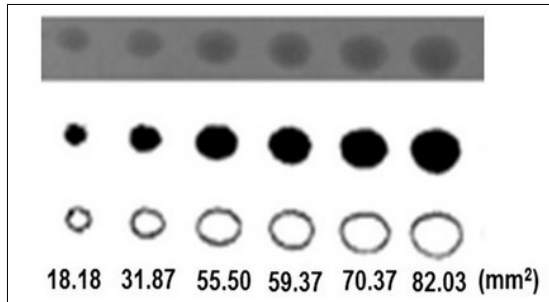


Abb. 6.2: Quantitative DC von Coffein. 1. Zeile: original-Flecken. 2. Zeile: Umwandlung in ein Schwarzweißbild zur Fleckenmessung. 3. Durch ImageJ erkannte Fläche.

Abb. 6.3: Diagramm zu Abb. 6.2. Quelle: siehe Abb. 6.2

Quelle (open source): Carmen Palacios., María L. F. Salatino, Antonio Salatino: TLC Procedure for Determination of Approximate Contents of Caffeine in Food and Beverages. World Journal of Chemical Education. 2017, 5(5), 148-152

6.3 High Performance thin layer chromatography (HPTLC)

Im Unterschied zur konventionellen TLC besteht hier die stationäre Phase aus kleineren Partikeln ($< 5 \mu\text{m}$). Die aufgetragenen Probenvolumina liegen im Nanoliterbereich und sind damit so klein, dass sie nicht mehr manuell aufgetragen werden. Statt dessen erfolgt die Auftragung mit einem Gerätes, der an einen Plotter erinnert (TLC sampler). Die quantitative Auswertung erfolgt durch einen DC-Scanner (vgl. Abb. 6.2). Die erforderliche Trennstrecke ist bei der HPTLC wesentlich kleiner als bei der herkömmlichen DC. Es ergeben sich folgende Vorteile:

- kürzere Trennzeiten, da nur geringere Trennstrecken erforderlich sind.
- Vollautomatische Durchführung mit Auftragsgerät und DC-Scanner möglich.

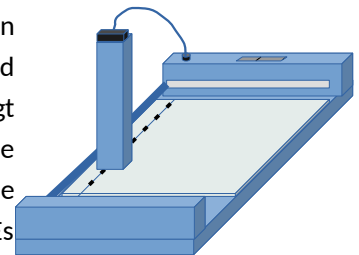


Abb. 6.4: Schema eines Auftragsgeräts für die (HP-)TLC

In der Kombination dieser beiden Vorteile lässt sich die HPTLC auch in Routineuntersuchungen einsetzen, bei der viele Trennungen in kurzer Zeit durch möglich geringen Personaleinsatz erfolgen müssen (z.B. Qualitätskontrolle).

Die Trennung um eine weitere Dimension erweitern: 2D-Dünnschichtchromatographie

Bei der **2-dimensionalen DC** kann nach dem ersten Chromatographie-Prozess und Abdampfen des Laufmittels, die Platte um 90° gedreht werden und in einem anderen Laufmittel erneut getrennt werden.

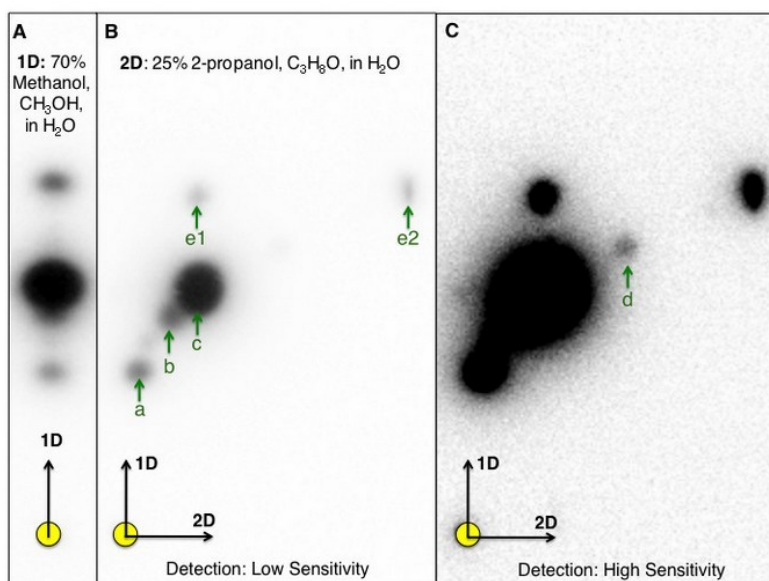


Abb. 6.4: Ergebnis der ersten und zweiten Dimension einer RP-2D-TLC

Quelle (open source): Gan HM, Dailey LK, Halliday N, Williams P, Hudson AO, Savka MA. 2016. Genome sequencing-assisted identification and the first functional validation of *N*-acyl-homoserine-lactone synthases from the Sphingomonadaceae family. PeerJ 4:e2332

6.2 Welche Vor- und Nachteile bietet die 2D-Chromatographie?

6.3 Warum können im Gegensatz zur eindimensionalen Chromatographie bei der 2D-Chromatographie keine Vergleichssubstanzen auf die Platte mit aufgetragen werden?