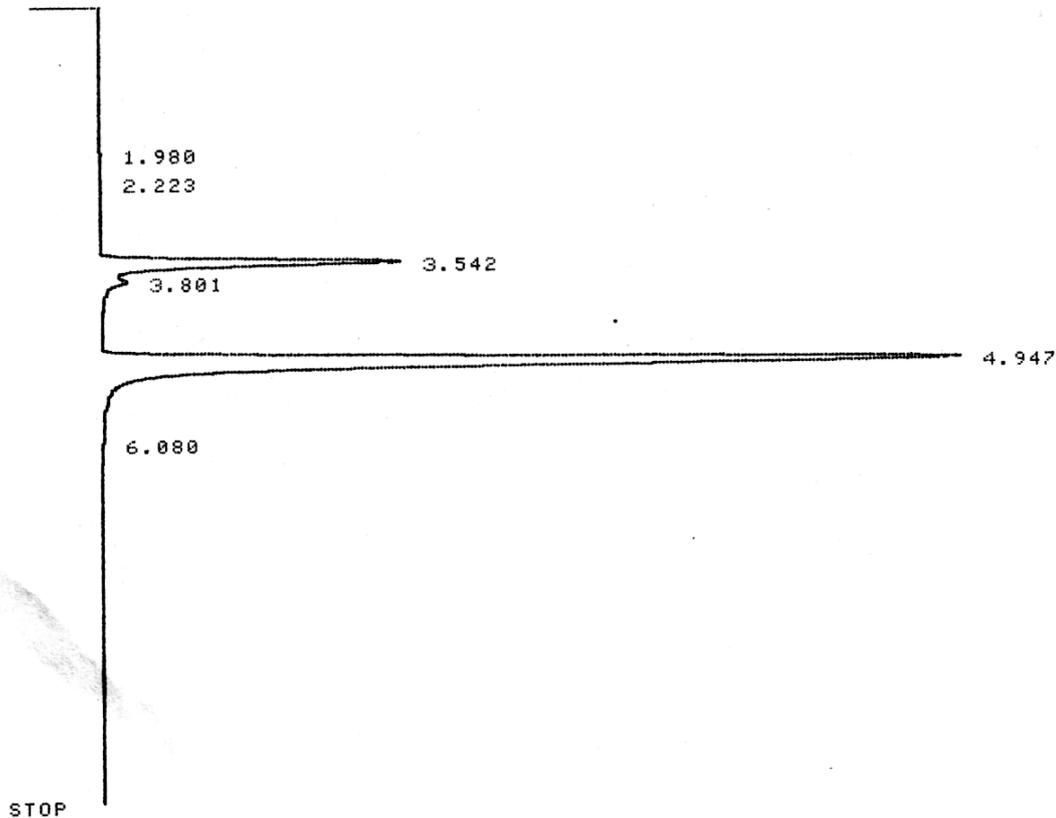


1.1 Trennung von Paracetamol und HPLC

Im LTC-Praktikum wurde in einer Kalibrierlösung Paracetamol und Coffein über eine HPLC getrennt. **Bedingungen:** $\beta(\text{Cof}) = 12,5 \text{ mg}/100 \text{ mL}$. $\beta(\text{Paracetamol}) = 10 \text{ mg}/100 \text{ mL}$. Gesamt-Einspritzvolumen: ca. $5 \mu\text{L}$. Detektionswellenlänge: $\lambda = 274 \text{ nm}$. stationäre Phase: RP- C_{18} . mobile Phase: isokratisch 70% Methanol, 30% H_2O . Es resultierte folgendes Chromatogramm:



RUN# 4 JAN 1, 1901 02:00:32

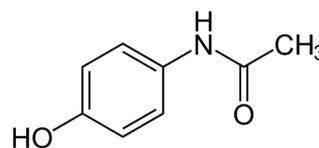
RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
3.542	4151248	BV	.119	19.92664
3.801	472322	VB	.154	2.26722
4.947	16209080	PB	.163	77.80614

TOTAL AREA=2.0833E+07

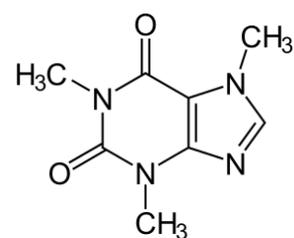
a) Ordnen Sie den beiden Peaks, die Verbindungen Paracetamol und Coffein zu.

b) Obwohl die Konzentration in der Probelösung ähnlich war, unterscheiden sich die Flächen erheblich. Wie ist dies möglich?

Paracetamol



Coffein

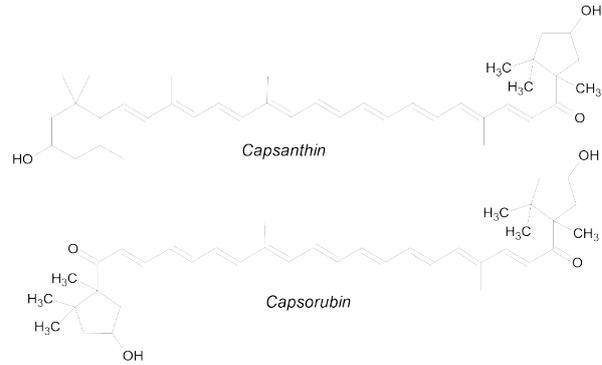


c) In einer anderen Probe mit unbekanntem Gehalten, besitzt der Paracetamol-Peak eine Fläche von $7,34 \cdot 10^6$ Flächeneinheiten, der Coffein-Peak eine Fläche von $9,87 \cdot 10^6$ Flächeneinheiten. Berechnen Sie die Gehalte der beiden Analyte und benennen Sie wie diese Art der Kalibrierung genannt wird.

d) In einem weiteren Probelauf wurde das Einspritzvolumen verdoppelt. Trotzdem ergaben sich nahezu dieselben Peakflächen. Wie ist dies möglich?

1.2 Capsanthin und Capsorubin sind Carotinoide die über eine RP-HPLC getrennt werden können.

- a) Beschreiben Sie kurz, was mit RP-HPLC gemeint ist und geben sie zwei Lösungsmittel an, die häufig in großen Mengen als mobile Phase eingesetzt werden.
- b) Begründen Sie ob Capsanthin oder Capsorubin in der RP-HPLC die größere Retentionszeit besitzt.



1.3 Eine Lösung enthält die Aromaten Ethylbenzen ($C_2H_5-C_6H_5$) und Propylbenzen als Analyten und Isopropanol als Lösungsmittel. Sie wird auf einer C_{18} -Säule mit einem Eluentengemisch aus 80 Volumenprozent Methanol und 20 Volumenprozent Wasser getrennt.

- a) Begründen Sie, ob es sich bei diesem Verfahren um eine Normalphasen- oder eine Umkehrphasenchromatographie handelt, und geben Sie die Retentionsreihenfolge an. Notieren sie auch die Strukturformel der beiden Analyte.
- b) Es hat sich gezeigt, dass die Peaks erst nach ungünstig langer Zeit erscheinen. Welcher Nachteil (außer Zeitverlust und Mehrverbrauch an Eluent) geht damit einher?
- c) Schlagen Sie ein Volumenverhältnis H_2O /Methanol vor, bei dem die Peaks eine kleinere Retentionszeit besitzen.
- d) Zur quantitativen Bestimmung der Analyten wurde neben der Probe auch eine Kalibrierlösung chromatografisch aufgetrennt. Dazu wurden 0,4515 g Ethylbenzen und 0,4846 g Propylbenzen eingewogen und auf 20 mL mit Isopropanol gelöst. Die Lösung wurde anschließend wiederum ein 1:5 mit Isopropanol verdünnt. Mit einer 5µL-Probeschleife ergaben sich folgende Flächen:

	Probeflösung	Kalibrierlösung
Ethylbenzen	948425 Flächeneinheiten (AU)	894841 AU
Propylbenzen	1018489 AU	990057 AU

Berechnen Sie die Massenkonzentration beider Analyten in der Probeflösung!

2. Weitere Aufgaben zur HPLC/Aufgabenüberschuss

2.1. HPLC: a) Geben Sie den Aufbau einer HPLC-Anlage in Form eines Schemas wieder. Beschränken Sie sich auf die wesentlichen (unerlässlichen) Bauteile / Funktionseinheiten.

- b) Erklären Sie folgende Begriffe in Textform und mithilfe einer beschrifteten Skizze eines Chromatogramms: Bruttoretentionszeit, Totzeit, Area
- c) Ein optimierte HPLC-Trennung erlaubt die größtmögliche Auflösung in der kleinstmöglichen Analysenzeit. Erläutern Sie 2-3 Möglichkeiten die dem Experimentator zur Verfügung stehen um nach diesen Prinzipien eine Trennung zu optimieren.

2.2. HPLC

Ein Probengemisch besteht aus Heptansäure, Hexan und Pentanal und wird auf Kieselgel mit einer mobilen Phase geringer Polarität getrennt.

- a) Zeichnen Sie die Strukturformeln der Verbindungen und geben Sie die Retentionsreihenfolge der Stoffe an (incl. Begründung)
- b) Welche Änderung erfährt das Chromatogramm wenn eine stark polare mobile Phase verwendet wird?

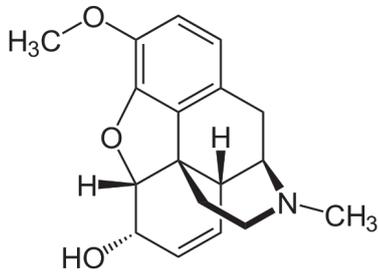
2.3. Säulenchromatographie und HPLC

- a) Was versteht man unter der eluotropen Reihe ? Ordnen Sie folgende Substanzen in der eluotropen Reihe ein. Hexan, Ethanol, Chlorbenzol, Aceton, Wasser

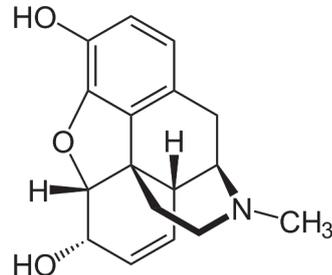
- b) Was versteht man in der Chromatographie unter „stationäre Phase“, „mobile Phase“ und „Retentionszeit“?
- c) In der HPLC wird ein Gemisch aus Ethanol, Wasser, Benzol und Aceton auf eine Kieselgelsäule injiziert. In welcher Reihenfolge treten die getrennten Substanzen aus der Säule aus? Begründen Sie ihre Antwort.

2.4. Drogenanalyse mit HPLC

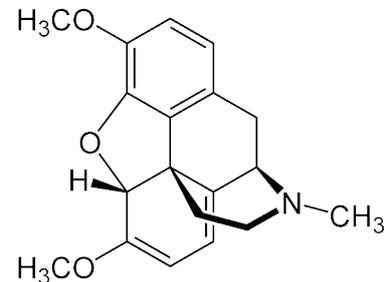
In Morphin sind folgenden halluzinogene Substanzen enthalten.



Codein



Morphin



Thebain

- a) Ordnen Sie diese Verbindungen nach Polarität und begründen Sie die Anordnung.
- b) Ein Opiumextrakt wird per RP-HPLC mit RP-18-Material getrennt. Erklären die Begriffe RP18 und machen Sie Aussagen zur chemischen Natur dieses Materials.
- c) Worin unterscheiden sich RP-Chromatographie und Normalphasen-Chromatographie?
- d) Geben Sie die Elutionsreihenfolge an, wenn als Elutionsmittel ein Gemisch aus Methanol (50%) und Wasser (50%) verwendet wird. Begründen Sie kurz.
- e) Die isokratische Trennung aus d) ergab, dass die ersten beiden Stoffe kaum getrennt werden, der 3. Stoff jedoch sehr viel später eluiert wird. Mit welcher Vorgehensweise lässt sich das Trennergebnis optimieren?

2.5. Ein Gemisch der drei aromatischen Verbindungen Benzylalkohol (C₆H₅-CH₂-OH), Benzoesäure (C₆H₅-COOH) und Benzoesäuremethylester (C₆H₅-C(O)-OCH₃) soll mittels HPLC getrennt werden.

- a) Begründen Sie, mit welcher Reihenfolge die drei Substanzen auf einer Kieselgel-Säule mit Benzen (Benzol, C₆H₆) als mobiler Phase am Detektor erscheinen.
- b) Wie verändert sich die Form von Peaks mit zunehmender Retentionszeit? Begründen Sie!
- c) Definieren Sie kurz die Begriffe Totzeit und Nettoretentionszeit.
- d) Welche Änderung des Chromatogramms erhält man, wenn man während der Elution den Methanolanteil der mobilen Phase kontinuierlich erhöht?

2.6 HPLC : Eine wässrige Probe soll über HPLC auf die Schadstoffe Phenol (C₆H₅-OH), 1-Phenylpropan (C₆H₅-CH₂-CH₂-CH₃) und Toluol (Methylbenzen, C₆H₅-CH₃) untersucht werden. Die Trennung erfolgt auf einer RP-C8-Säule mit einem Methanol-Wasser-Lösung als mobile Phase.

- a) Geben Sie schematisch den Aufbau der HPLC-Anlage an.
- b) Ordnen Sie den 3 Schadstoffen die Retentionszeiten $t_r = 16,1$ min, $t_r = 18,4$ min und $t_r = 24,6$ min zu und begründen Sie!
- c) Aufgrund einer Verunreinigung mit Benzoesäuremethylester ist noch ein 4. Peak zu sehen. Geben Sie an, in welchem Zeitraum (Zeitintervall) dieser Peak auftritt und begründen Sie (siehe auch Retentionszeiten der drei Peaks in Aufgabe b). HINWEIS: Benzoesäure = C₆H₅-COOH
- d) Definieren Sie kurz die Begriff Totzeit und Totvolumen.
- e) Weshalb kann die Detektion in diesem Fall mithilfe eines UV-Detektors erfolgen? Begründen Sie mit der Struktur der Moleküle/Analyte.
- f) Wie muss sich die Anfangszusammensetzung und die Zusammensetzung der mobilen Phase in einer Gradiententrennung ändern, damit alle 3 Peaks früher erscheinen und der letzte Peak näher bei den anderen liegt. Belegen Sie Ihre Aussagen mit Argumenten!

Lösungen ohne Gewähr

1.1 HPLC Paracetamol und Coffein

a) Paracetamol ist mit der OH-Gruppe und der NH-Gruppe polarer. Es eluiert in der RP-HPLC deshalb zuerst. $t_R = 3,542$ min. Coffein besitzt zwar mehr C=O- und N-C-Gruppen die sind jedoch deutlich weniger polar als die NH- und OH-Gruppen. Es eluiert langsamer. $t_R = 4,947$ min.

b) Der Detektor detektiert die beiden Stoffe mit unterschiedlicher Empfindlichkeit. So kann es sein, dass die Messwellenlänge des Detektors nahe beim Absorptionsmaximum von Coffein ist, aber das Paracetamol bei dieser Wellenlänge nur einen geringen Absorptionskoeffizient aufweist.

d) Das Volumen was auf die Säule gelangt, hängt nicht vom Einspritzvolumen ab, sondern vom Schleifenvolumen der Probeschleife.

1.2 HPLC und UV/VIS-Spektroskopie von Paprika-Farbstoffen

a) RP-HPLC: unpolare stationäre Phase und eine im Vergleich dazu polare mobile Phase. Lösungsmittel: Wasser, Ethanol, Acetonitril

b) Bei der RP-HPLC eluieren die polarsten Verbindungen zuerst. Je unpolarer die Verbindung desto später eluiert sie und desto höher ist die Retentionszeit, da diese Verbindungen besonders gut mit stationären Phase bindend wechselwirken können. Durch die fehlende 4. Sauerstofffunktion ist Capsanthin noch etwas unpolarer als Capsorubin und eluiert etwas später => Längere Retentionszeit.

Nr. 2

a) Da die Trennung auf einer polaren stationären Phase erfolgt, werden die Stoffe, die die stärksten polaren Wechselwirkungen (H-Brücken) mit dieser eingehen können, am spätesten eluieren. Mit anderen Worten: Je schwächer die polaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase, desto früher eluiert die Verbindung und desto kleiner ist die Retentionszeit.

1. Serotonin eluiert zuerst, da es nur 2 funktionelle Gruppen besitzt, die zu H-Brücken mit stationärer Phase fähig sind: 1 OH-Gruppe + 1 NH₂-Gruppe

2. Dopamin eluiert als zweites, da 3 zur H-Brücke befähigte funktionelle Gruppen vorhanden sind.

3. Epinephrin eluiert als drittes, da 4 zur H-Brücken befähigte funktionelle Gruppen enthalten. Insgesamt kann die Verbindung nur etwas schwächere polare WW zur stationären Phase ausbilden als Norepinephrin, denn es besitzt ein polar gebundenes H-Atom an der Aminogruppe weniger (nur -NH-Gruppe statt -NH₂-Gruppe). Weiterhin hat es eine leicht höhere Affinität zur mobilen Phase, da die Aminogruppe eine Methylgruppe trägt. Diese trägt zu den bindenden van-der-Waals-Kräften zur unpolaren mobilen Phase bei.

4. Norepinephrin eluiert als polarster Stoff zuletzt. Es ist zwar der polarste der 4 Stoffe, aber global gesehen immer noch relativ unpolar! So löst sich Norepinephrin nur wenig in H₂O. Dass die Polarität vergleichbar ist mit Epinephrin sieht man auch daran, dass die Peaks hier ineinander fließen. Keine saubere Trennung!

b) Alle 4 Stoffe sind aromatisch und absorbieren im UV-Bereich. Dieser ist empfindlicher als der Brechungsindexdetektor und liefert auch bei sehr kleinen Gehalten noch hohe Signale. Er hat die kleinere Nachweisgrenze und ist deshalb besser geeignet als der Brechungsindexdetektor. .

2.1.

a) Die wesentlichen bzw. unverzichtbaren Bauteile sind:

Lösungsmittelvorrat → Entgasungseinheit → Pumpe → Probeschleife → Trennsäule → Detektor → Lösungsmittelabfall

b) **Bruttoretentionszeit:** Zeit die eine Verbindung nach der Probeauftragung bis zum Ankommen am Detektor benötigt.

Totzeit: Zeit, die die mobile Phase (und Teilchen die durch die Säule gar nicht zurückgehalten werden) benötigt um bis zum Detektionsort zu gelangen.

Netto-Retentionszeit ist definiert als Bruttoretentionszeit minus Totzeit. Sie ist ein besseres Maß dafür, wie stark eine Verbindung durch die Säule zurückgehalten (retardiert) wird als die Bruttoretentionszeit.

Area: englisch für „Fläche“. Gemeint ist die Fläche eines Peaks. Je größer die Peakfläche für einen gegebenen Stoff, desto mehr ist von diesem Stoff vorhanden. Die Umrechnung von Flächeninhalt in eine Stoffmenge/Konzentration kann mithilfe von Kalibrierkurven erfolgen. **Vorsicht:** Wenn ein Stoff A eine größere Fläche erzeugt als ein Stoff B, heißt das nicht, dass die Stoffmenge von A größer ist als die von B. Es kann nämlich sein, dass der Detektor auf den Stoff A empfindlicher anspricht als auf den Stoff B! **Beispiel:** Benutzt man einen UV/VIS-Detektor so hängt die Empfindlichkeit mit der ein Stoff detektiert wird maßgeblich davon ab, welche Detektionswellenlänge man wählt. Absorbiert der Stoff A bei der gewählten Detektionswellenlänge (z.B. $\lambda = 350 \text{ nm}$) große Anteile des Lichts, so kann schon eine kleine Stoffportion eine hohe Absorption bewirken und der Peak entsprechend groß ausfallen. Absorbiert der Stoff B bei der gewählten Detektionswellenlänge ($\lambda = 350 \text{ nm}$) nicht so gut, so werden nur geringe Anteile des eingestrahlt Lichts absorbiert. So kann trotz relativ hoher Stoffmenge/Konzentration an B der entsprechende Peak nur klein ausfallen. Eine Stoffmenge an B kann also unter Umständen größer sein als die von A und der Peak von B trotzdem viel kleiner als der Peak von A.

c)

- * Variation der Zusammensetzung der mobilen Phase, z.B. Benutzung oder Veränderung eines Gradienten
- * Modifizierung der stationären Phase: z.B. statt Kieselgel eine RP-Säule benutzen (natürlich muss dann auch die mobile Phase daran angepasst werden)
- * Veränderung der Säulenlänge oder der Partikelgröße der stationären Phase
- * Veränderung der Trenntemperatur

2.2.

- a) Die polarsten Stoffe werden in der Normalphasenchromatographie am längsten zurückgehalten. => vgl. eluotrope Reihe
- b) Die Verwendung stark polarer Phasen in der Normalphasenchromatographie ist nicht möglich. Unpolare Stoffe, die keine bindenden Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen würden weiter transportiert werden. Da sie sich nicht gut in polaren Lösungsmitteln lösen, könnte evtl. unpolare Tröpfchen in einem polaren Medium entstehen, die weitertransportiert und herausgeschwemmt werden. Polare Substanzen werden wegen der günstigeren Wechselwirkungen mit der mobilen Phase ebenfalls schneller eluiert. Insgesamt nimmt die chromatographische Auflösung massiv ab und die Stoffe werden nicht oder nur schlechter voneinander getrennt. Die Elutionsreihenfolge bleibt jedoch erhalten (unpolare Stoffe zuerst).

2.3

a) Eluotrope Reihe:

Es handelt sich um eine Anordnung gängiger Lösungsmittel aus der Chromatographie nach ihrer Elutionswirkung auf polar gebundene Substanzen an einer stationären Phase. Wenn man Kieselgel oder Al_2O_3 als Grundlage nimmt, gilt (siehe Küster-Thiel):

Hexan → Chlorbenzol → Aceton → Ethanol → Wasser

b) **mobile Phase:** Phase in der die zu trennenden Substanzen weitertransportiert werden (Elutionsmittel, GC: Trägergas)

stationäre Phase: Phase, die mit den einzelnen Substanzen des Substanzgemisches Wechselwirkungen eingeht und sich innerhalb dieser nicht bewegt (z.B. Kieselgel bei der DC),.

Retentionszeit: Es wird unterschieden zwischen der Bruttoretentionszeit und der Nettoretentionszeit.

Bruttoretentionszeit: Zeitdauer von Probeauftragung bis zur Detektion der Verbindung. Nettoretentionszeit: Zeitdauer von Probeauftragung bis zur Detektion der Verbindung abzüglich der Zeit, die auch nicht-retardierte Stoffe benötigen, um das Probesystem zu durchlaufen. D.h. Nettoretentionszeit = Bruttoretentionszeit minus Totzeit

c) Die Stoffe werden unterschiedlich lange durch die polare stationäre Phase zurück gehalten. Je polarer die Verbindung, desto stärker wird der Stoff zurück gehalten. Zuerst tritt also das unpolare Benzol aus der Säule aus, gefolgt von Aceton, Ethanol und zum Schluss Wasser.

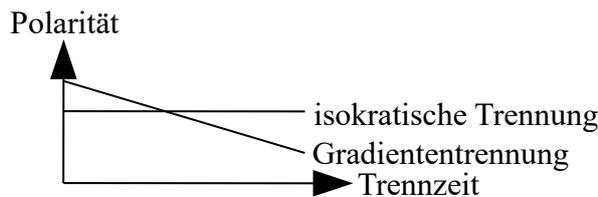
2.4.

a) – d) siehe Unterricht

e) Die Polarität der mobile Phase muss gegen Ende der Trennung im Rahmen einer Gradientenelution abnehmen, um das unpolare Thebain früher zu eluieren. Dieses hat dann eine höhere Affinität zur mobilen Phase.

Die beiden Stoffe zu Beginn, werden schlecht getrennt. Wenn man die Retentionszeiten beider Stoffe erhöht, können individuelle Unterschiede in der Struktur stärker zum Tragen kommen. Die Affinität beider Stoffe zur mobilen Phase muss erniedrigt werden, damit sie länger auf der stationären Phase verweilen können. Dies erreicht man durch eine Erhöhung der Polarität zu Beginn.

Zusammenfassung: Zu Beginn wird für ein besseres Trennergebnis im Rahmen einer Gradiententrennung ein höherer H₂O-Anteil gewählt (polarere mobile Phase), der im Verlauf der Analyse sinkt (Verminderung der Polarität).



2.5.

a) Da es sich um eine polare stationäre Phase handelt, kommt der polarste der drei Stoffe am spätesten am Detektor an. Je polarer der Stoff, desto stärker kann er mit der stationären Phase bindend wechselwirken. Je polarer der Stoff, desto höher ist also der Zeitanteil mit dem an der stationären Phase gebunden ist und in dieser Zeit nicht weiter transportiert.

Benzoessäuremethylester ist der unpolarste der drei Stoffe. Er besitzt als einzige der 3 Verbindungen keine OH-Gruppe. Somit besitzt Benzoessäuremethylester die kürzeste Retentionszeit. Benzylalkohol besitzt eine OH-Gruppe und ist damit polarer als der Carbonsäureester. Er besitzt deshalb die mittlere Retentionszeit. Benzoessäure ist die polarste unter den 3 Verbindungen, denn neben der polaren OH-Gruppe ist auch noch eine polare Carbonylgruppe vorhanden. Hinzu kommt, dass diese Carbonylgruppe über negative induktive Effekte die Polarität der OH-Gruppe noch weiter erhöht. Benzoessäure hat somit die höchste der Retentionszeiten.

b) Mit zunehmender Retentionszeit werden die Peaks i.d.R. breiter. Der Grund für die Peakverbreiterung liegt in Diffusionsvorgängen. Damit ist die räumlich ungerichteten Fortbewegung von Molekülen gemeint, die sowohl in Fließrichtung aber auch quer zur Fließrichtung oder gegen die Fließrichtung erfolgen kann. Im letzteren Fall bewegt sich während dieser Zeit das einzelne Molekül mit *verlangsamter* Geschwindigkeit in Fließrichtung weiter (Fließrichtung und Diffusionsrichtung stehen einander entgegen, die Fließgeschwindigkeit ist jedoch höher). Querdiffusion (d.h. quer zur Fließrichtung) führt zu individuellen Unterschieden in der tatsächlich zurückgelegten Wegstrecke. Insgesamt sorgt die Diffusion dafür, dass sich die Retentionszeiten der Moleküle (d.h. der Zeit vom Auftragszeitpunkt bis zum Detektionszeitpunkt) leicht unterscheiden. Mit steigender Trennzeit/Säulenlänge nehmen solche Diffusionsvorgänge zu! Analogon: Viele Autos fahren gleichzeitig von Karlsruhe auf der gleichen Autobahn in Richtung Norden los. Obwohl alle mit der gleichen Geschwindigkeit unterwegs sind, erreichen sie Frankfurt schon leicht zeitversetzt. In Köln sind dann die

Unterschiede in den Ankunftszeiten schon größer geworden. Die Unterschiede kommen hier z.B. durch unterschiedliches zick-zack-Fahren auf der Autobahn (d.h. letztendlich leicht unterschiedliche Wegstreckenlängen („Querdiffusion“), zustande.

c) Totzeit: Dies ist die Zeit, die Moleküle, die überhaupt nicht durch die stationäre Phase retardiert werden, vom Auftragszeitpunkt bis zur Ankunftszeit am Detektor, benötigen.

Nettoretentionszeit: Dies ist die tatsächliche Retardierungszeit, d.h. die Bruttoretentionszeit minus der Totzeit.

d) Durch den höheren Methanolanteil erhöht man die Polarität der mobilen Phase. Die Elutionskraft der mobilen Phase gegenüber den mit polaren Gruppen gebundenen Analyten nimmt zu. D.h. alle Retentionszeiten sinken, die Gesamtanalysezeit sinkt. Die Affinität der polaren Stoffe zur mobilen Phase erhöht sich, d.h. der Zeitanteil den diese Moleküle in der mobilen Phase verbringen und dabei in Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase weiter transportiert werden, nimmt zu. So sinken die Retentionszeiten.

2.6

a) Vorratsgefäß der mobilen Phase – Entgasungseinheit – Hochdruckpumpe – Probeeinlass/Probeschleife – Chromatographiesäule – Detektor (incl. Auswertelektronik) – Lösungsmittelabfall

b) RP8: Umkehrphase mit unpolaren Octylresten: Je unpolarer ein Stoff, desto stärker kann er mit der stationären Phase wechselwirken, d.h. desto höher der Zeitanteil an dem der Stoff nicht mit der (polaren) mobilen Phase weiter transportiert wird. => Desto höher die Nettoretentionszeit. **Phenol**: Zwar ist auch dieser Stoff unpolar, aber von der gegebenen Auswahl durch die Hydroxylgruppe noch am polarsten. Deshalb besitzt er die kleinste der angegebenen Retentionszeiten ($t_R = 16,1$ min). **Toluen** und **1-Phenylpropan** sind beide ungefähr gleich unpolar. 1-Phenylpropan hat jedoch den längeren Alkylrest und kann sich so leichter selbst polarisieren (spontane Dipolbildung!) und polarisiert werden (induzierte Dipolbindung). Es bildet deshalb stärkere van-der-Waals-Kräfte zu den Octylresten der stationären Phase aus, als Toluen. Deshalb besitzt 1-Phenylpropan die längere Retentionszeit von $t_R = 24,6$ min und Toluen die Retentionszeit von 18,4 min.

c) Der Benzoesäuremethylester besitzt mit seiner Sauerstofffunktion eine höhere Polarität als die gegebenen Kohlenwasserstoffe und eine niedrigere Polarität als Phenol. Der Peak wird also im Zeitfenster zwischen 16,1 min und 18,4 min erscheinen, also als zweiter Stoff eluiert werden.

d) **Totzeit**: Zeit, die ein nicht-retardierter Stoff vom Probeeinlass bis zur Ankunft am Detektor benötigt. Solche Stoffe sind beispielsweise Bestandteile der mobilen Phase. Häufig erkennt man ihre Ankunft am Detektor als „Lösungsmittelpeak“.

Totvolumen: Das bis zur Totzeit ausgeflossene Flüssigkeitsvolumen. Entspricht dem Volumen des chromatographischen Systems abzüglich der stationären Phase.

e) Alle 4 Stoffe sind einkernige Aromaten, deren C_6H_5 -Reste alle im UV-Bereich absorbieren.

f) Die Affinität der Stoffe zur mobilen Phase muss erhöht werden, damit der Zeitanteil, den diese Stoffe in dieser Phase verbringen, erhöht ist. Dies führt dazu, dass sie die Säule früher verlassen und alle früher detektiert werden können (geringere Retentionszeiten). Dafür muss die mobile Phase etwas unpolarer gemacht werden, denn alle Stoffe sind ausnahmslos unpolar. Dies geschieht z.B. in dem der Methanolanteil erhöht und der Wasseranteil verringert wird. Gerade zum Ende hin muss die mobile Phase noch weiter in der Polarität abgesenkt werden, damit auch das Phenylpropan leichter eluiert werden kann. D.h. Gradiententrennung mit geringerem Wasseranteil zu Beginn, der im Verlauf der Trennung noch weiter sinkt. Weitere Möglichkeit: Im Verlauf der Trennung steigende Zumischung einer unpolaren Komponente (z.B. Butanol).