

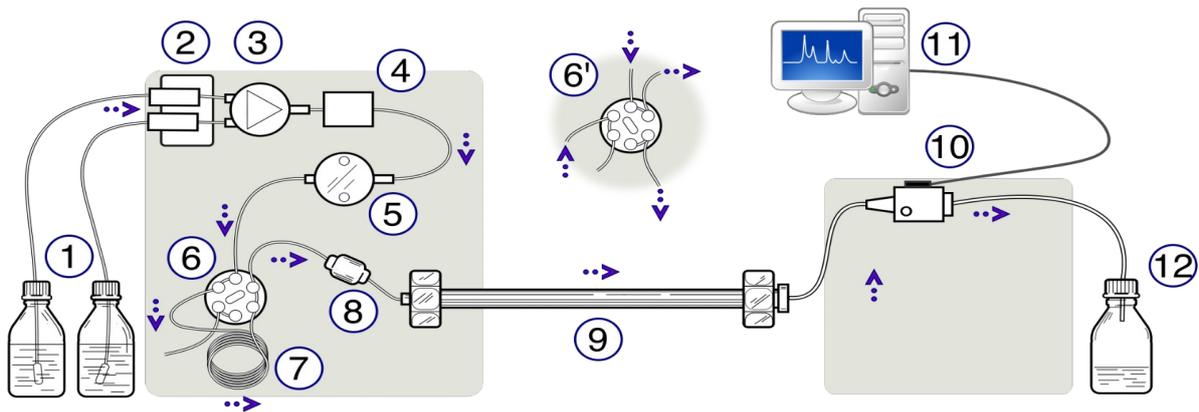
**Hoher Druck und hohe Leistung in der Chromatographie (HPLC) C2CL/C3CL**



**Hochleistungsflüssigkeitschromatographie** (*high performance liquid chromatography, HPLC*) ist ein Flüssigchromatographie-Verfahren, mit dem man nicht nur Substanzen trennt, sondern diese auch über Standards identifizieren und quantifizieren kann.

**1. Funktionsweise - Überblick**

Es handelt sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase (auch "Elutionsmittel" oder "Eluent" genannt) durch eine sogenannte Trennsäule, welche die stationäre Phase enthält, gepumpt wird. Dabei werden die einzelnen Komponenten vor dem Zusammenmischen zur mobilen Phase über **Mischventile**, jede für sich allein, erst einmal entgast. Eine Trennsäule in einem HPLC-Gerät ist zwischen 1,8 und 30 cm lang und hat zumeist einen **Innendurchmesser von 2 - 4,6 mm** im Falle von analytischen HPLC-Systemen. Gelegentlich wird eine sogenannte **Vorsäule** aus wirtschaftlichen Gründen vorgeschaltet; dabei handelt es sich um eine kurze Säule, die Verunreinigungen von der Hauptsäule abhalten soll. Die HPLC findet auch Verwendung für die Reinigung von Substanzen als (semi-)präparative HPLC. Die Innendurchmesser können erheblich größer sein, da bis hin zum Produktionsmaßstab eine Aufreinigung durchgeführt werden kann. Der auf die wesentlichen Elemente reduzierte Aufbau einer typischen HPLC-Apparatur kann aus unten stehenden Abbildungen entnommen werden:



**Abb. 1.1:** Schema eines HPL-Chromatographs (hier: Variante mit Niederdruckmischsystem)

1.1 Ordnen Sie die Nummern 1 – 12 einem der folgenden Begriffe zu. Geben Sie auch eine deutsche Übersetzung des Begriffs. (Quelle: wikipedia.org)

- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| (...) Sample injection loop .....                          | (...) Pre-column .....            |
| (...) Solvent degasser .....                               | (...) Detector (i.e. IR, UV)..... |
| (...) Solvent reservoirs .....                             | (...) Analytical column .....     |
| (...) Gradient valve .....                                 | (...) High-pressure pump .....    |
| (...) Switching valve .....                                | (...) Data acquisition .....      |
| (...) Mixing vessel for delivery of the mobile phase ..... |                                   |
| (...) Waste or fraction collector .....                    |                                   |

Neben dem oben dargestellten Niederdruckmischsystem (Niederdruckgradient) gibt es auch HPLC-Anlagen mit Hochdruckmischsystem (Hochdruckgradient). Hier werden die Komponenten der mobilen Phase durch getrennte Pumpen gefördert und erst nach den Pumpen miteinander gemischt.

2. Prinzip

Wechselwirkt ein Bestandteil der zu untersuchenden Substanz stark mit der stationären Phase, verbleibt er relativ lange in der Säule. Wechselwirkt er hingegen schwach mit der stationären Phase, verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Zeiten, den **Retentionszeiten**, am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden können.

Es werden zwei Methoden unterschieden: **Normalphase (NP)** und **Umkehrphase (engl. reversed phase, RP)**. Bei der NP-HPLC wird eine polare stationäre Phase (z.B. Kieselgel) genutzt. Die Stärke der Elutionskraft der mobilen Phase ist im allgemeinen abhängig von deren Polarität. Die verschiedenen Lösungsmittel sind nach steigender Polarität in der **elutropen Reihe** angeordnet. Je polarer eine mobile Phase ist, desto schneller wird eine Substanz eluiert. Aus der entsprechenden Liste (vgl. z.B. *Tabellenbuch*) kann man ablesen, dass eine polare Substanz wie Acetylsalicylsäure auf einer Kieselgel- oder Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Säule mit Hexan sehr langsam läuft, mit Methanol sehr schnell. Im Allgemeinen werden Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische zur Trennung von Substanzen eingesetzt, die zu einer mäßig schnellen Laufgeschwindigkeit bei den interessantesten Probestoffen führen.

**Merke: Polare Moleküle werden auf der NP-Säule länger retardiert (zurückgehalten) als unpolare Moleküle und verlassen deshalb die Säule später. Die Elution eines Stoffs nimmt mit steigender Polarität der mobilen Phase zu.**

Auch bei der RP-HPLC ist die Retentionszeit einer Substanz abhängig von der Verweildauer in der stationären Phase (Lösungsmittelfilm um die Alkylketten des modifizierten Kieselgels). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Zurücklösung in die mobile Phase. Die RP-HPLC ist in der Praxis die gängigste Methode. 70% aller analytischen HPLC-Trennungen sind RP-Trennungen (Jahr 2017). Hier wird eine unpolare stationäre Phase verwendet, und die Elutionskraft der mobilen Phase sinkt mit steigender Polarität.

Die stationäre Phase wird hergestellt, indem man Silane, welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert wurden, mit Silicagel reagieren lässt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen, also die Polarität umgekehrt (engl.: "reversed"). Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril oder Methanol eingesetzt. Bei **isokratischen Trennungen** bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während der gesamten Zeit gleich. Bei **Gradiententrennungen** wird die Polarität des Fließmittelgemisches während der Analyse verändert. Die RP-HPLC beschränkt sich nicht nur auf die Trennung unpolare Analyte (z.B. Alkylbenzene). Auch eine Trennung von polaren Substanzen, die in der Normalphasenchromatographie zu hohe Retentionszeiten besitzen würden, ist mittels RP-HPLC mit einer C18-Säule möglich.

2.1. Wie verändern sich die Peaks bei der isokratischen Trennung mit steigender Retentionszeit? Wie verändert eine Gradiententrennung das Chromatogramm?

.....

.....

.....

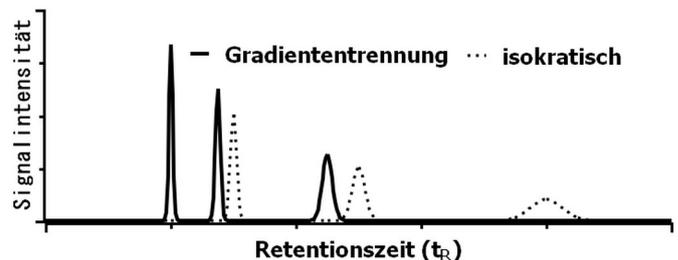
.....

.....

.....

.....

.....



**Abb. 2.1:** Chromatogramme (schematisch) von 3 Stoffen: Alle mit demselben Gehalt (!) und Responsefaktor (!) (Quelle: eigenes Werk)

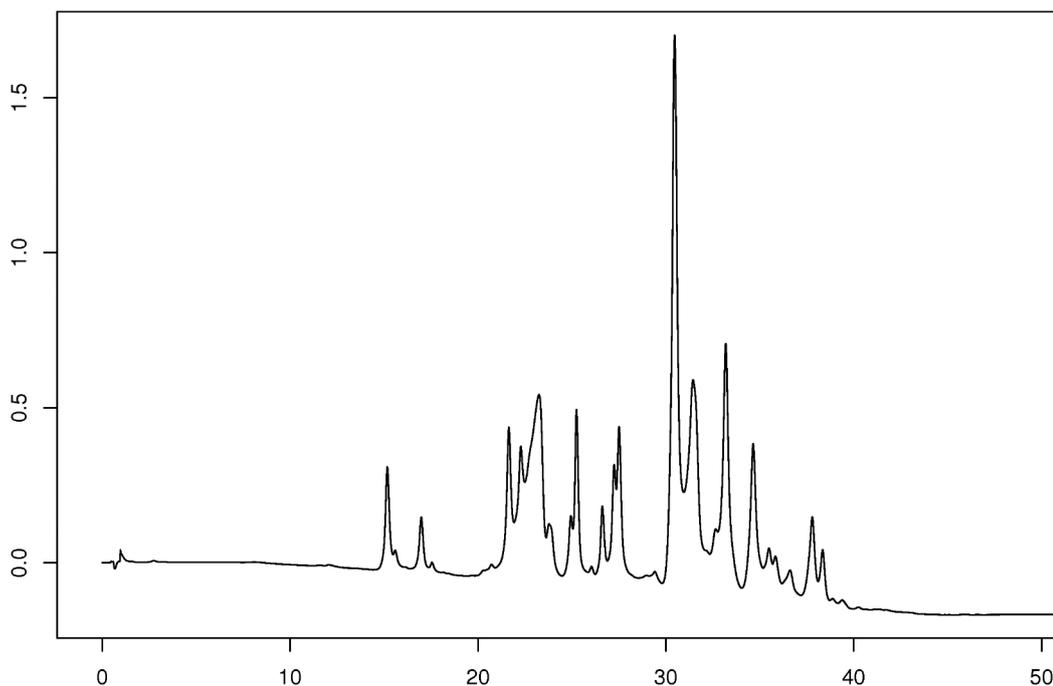
## Warum ein so hoher Druck?

2.2 Geben Sie die Informationen der englischsprachigen Wikipedia stichwortartig und sinngemäß auf Deutsch an:

HPLC is distinguished from traditional ("low pressure") liquid chromatography because operational pressures are significantly higher (50–350 bar), while ordinary liquid chromatography typically relies on the force of gravity to pass the mobile phase through the column. Due to the small sample amount separated in analytical HPLC, typical column dimensions are 2.1–4.6 mm diameter, and 30–250 mm length. Also HPLC columns are made with smaller sorbent particles (2–50  $\mu\text{m}$  in average particle size). This gives HPLC superior resolving power (the ability to distinguish between compounds) when separating mixtures, which makes it a popular chromatographic technique. The use of smaller particle size packing materials requires the use of higher operational pressure ("backpressure") and typically improves chromatographic resolution (*i.e.* the degree of separation between consecutive analytes emerging from the column).

## Aufbau eines Chromatogramms, Totzeit, Totvolumen, Brutto- und Nettoretentionszeit

2.3 Beschriften und kommentieren Sie das Diagramm. Gehen Sie dabei auch auf die Begriffe der Überschrift ein und stellen Sie mathematische Zusammenhänge auf. Markieren Sie den Lösungsmittelpeak (nicht immer ist er sichtbar!)

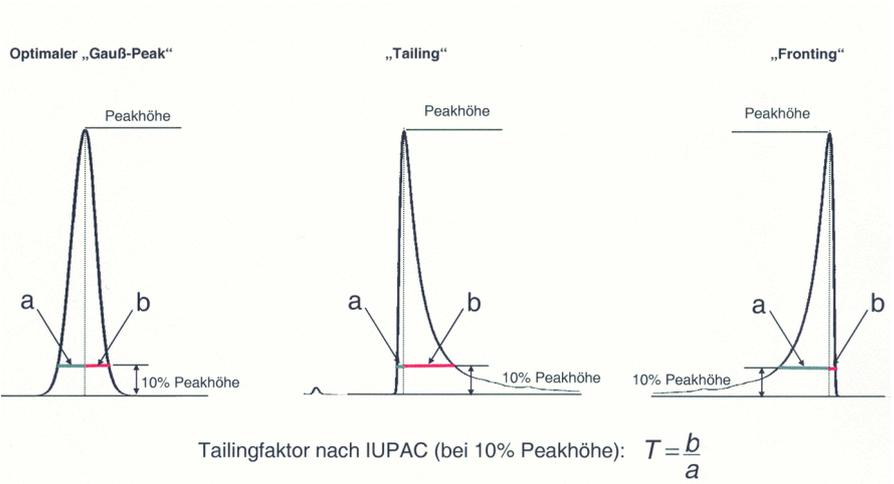


**Abb. 2.2:** HPLC chromatogram of „J'Adore“ perfume water, as example of complex mixture analysis. Separation on C18 column using almost linear 5 - 100% acetonitrile-water gradient. (Quelle:www.commonswikimedia.org)

**Peaksymmetrie: Tailing und Fronting**

Die automatische Bestimmung der Fläche eines Peaks ist bei einem symmetrischen Peak am genauesten. Ursachen für asymmetrischen Peaks sind häufig:

- **Überladung der Säule**, d.h. von der Verbindung ist zu viel enthalten, um gleichmäßig weiter transportiert zu werden.
- **Geschädigte stationäre Phase**, beispielsweise durch Belegung mit Verschmutzungen oder irreversible altersbedingte Degradation der Endgruppen (z.B. Octadecylreste)



**Abb. 2.3:** Peaksymmetrien. Quelle: www.wikipedia.de. Autor: Tom\_S

2.4 Füllen Sie mithilfe der Abb. 2.3 die Lücken:

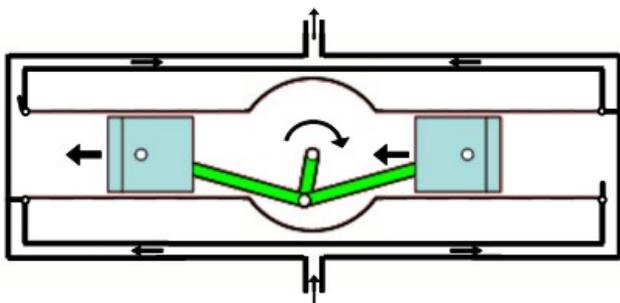
**Tailing** bezeichnet die Asymmetrie eines Peaks, bei dem der vordere Teil steiler ist als der hintere Teil. Für solche Peaks gilt:  $T \gg 1$ . Bei Peaks mit **Fronting** ist der hintere Teil steiler als der vordere Teil. Der Tailingfaktor beträgt  $T < 1$ .

**Eiselsbrücke zur Unterscheidung von Fronting und Tailing:** Ein getailter Peak zeigt ein stilisiertes L in der Form: Zeichnen Sie es in Abb. 2.3 ein!

3. Praktische Durchführung und detaillierte Informationen zu einzelnen Bauteilen

**Pumpe**

Die Pumpen für die HPLC müssen Flüssigkeiten mit Drücken bis zu 60 MPa (..... bar) durch die stationäre Phase transportieren. Dieses Durchdrücken muss mit konstanter und außerdem pulsationsfreier Strömung geschehen, da sonst vom Detektor kein brauchbares Signal zu erwarten ist. Heute arbeitet man häufig mit einem Doppelkolbenpumpen, damit die Pump- und Ansaugphase möglichst pulsationsfrei erfolgen



3.1. Erklären Sie anhand der Abbildung die Funktionsweise dieser Doppelkolbenpumpe.

.....

.....

.....

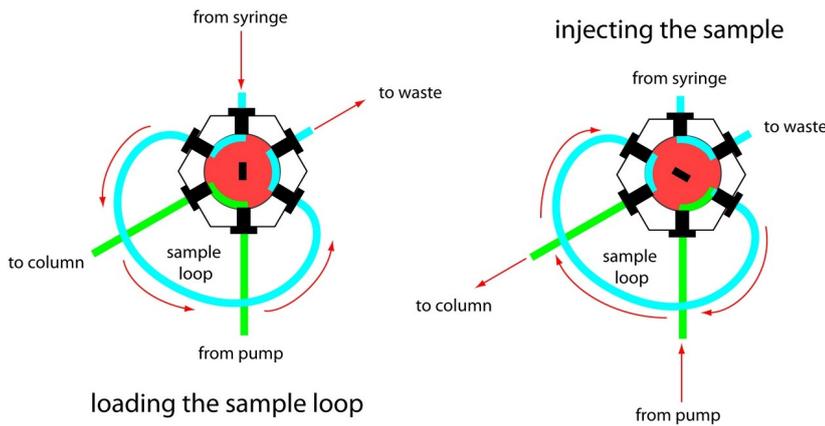
.....

**Abb. 3.1:** Schema der Doppelkolbenpumpe (eigenes Werk)

Ein wichtiger Faktor beim Pumpen und Mischen von Lösungsmitteln kommt dem **Entgasen der Laufmittel** zu: Da unter hohem Druck die Löslichkeit der Lösungsmittel für Gase vermindert sein kann, käme es ansonsten zum Ausgasen und die Pumpensysteme und Detektoren könnten dann nicht mehr optimal arbeiten. Viele **Entgasungseinheiten** können das Laufmittel online durch Vakuum und/oder Ultraschall und/oder Erwärmung entgasen, bevor es unter hohem Druck versetzt wird (**online degassing system.**)

### Probeneinlass und Autosampler

Für die Zuführung der Probe hat sich ein System mit einer Probeschleife und Ventilsystem durchgesetzt.



3.2. Erklären Sie anhand der Abbildung die Funktionsweise des Einlassventils. (Quelle: commons.wikimedia.org. Autor: Cahra)

.....

.....

.....

Abb. 3.2 und 3.3: Funktionsweise einer Dosierschleife (Quelle: 3.2: chem.libretexts.org, 3.3 wikipedia.de)

.....

.....

.....

.....

.....

Wichtig ist, in die Probeschleife mehrere Male unmittelbar hintereinander Probelösung zu injizieren, denn zu Beginn ist sie mit Eluent gefüllt. So injiziert man in eine 5µL-Probeschleife hintereinander z.B. 4 mal 20 µL Probe. Dadurch ist sichergestellt, dass die Schleife vollkommen mit unverdünnter Probelösung (ohne Eluentenreste) gefüllt ist .

Ein **Autosampler** macht den HPL-Chromatograph zum richtigen Arbeitstier. Hier kann man auf einen Probensteller viele **Behälter (vials)** unterbringen, die bei Bedarf z.B. gekühlt gelagert werden können. Die Proben und Standards werden in der programmierten Art jeweils zur Injektionsnadel geführt. Das Gerät bringt das eingestellte Volumen an Proben automatisch auf die Trennsäule auf. Darüber hinaus können bei Bedarf Probelösungen aus verschiedenen Behältern gemischt werden. Insgesamt kann so mithilfe eines Autosamplers das HPLC-Gerät z.B. auch nachts Analysen- und Trennaufgaben durchführen, was einen enormen ökonomischen Vorteil bedeutet.

### 4. Detektoren in der HPLC

Die Detektoren messen physikalische Veränderungen des Eluats und wandeln diese Information in elektronische Signale um. Die aufgenommenen Kurven (Peaks) und Chromatogramme (mehrere Peaks) können dann quantitativ und/oder qualitativ ausgewertet werden.

4.1. Beschreiben Sie die Bedeutung der Begriffe Rauschen und Drift. Inwiefern beeinflussen sie die Signalerkennung?

.....

.....

.....

.....

.....

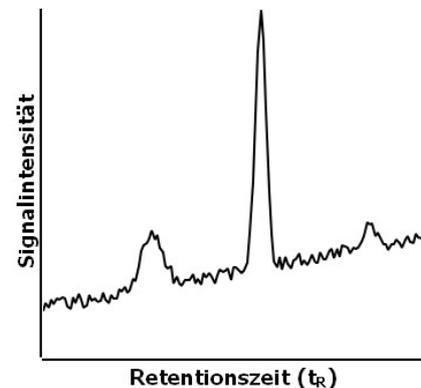
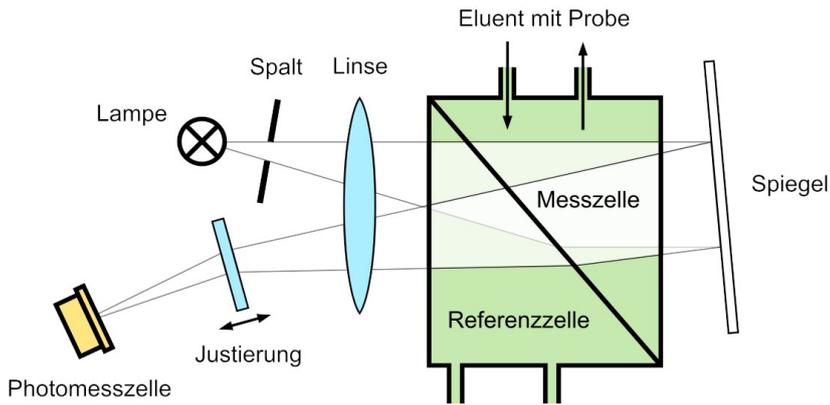


Abb. 4.1: Rauschen, Drift und Signal (Quelle: eigenes Werk)



## Brechungsindex-Detektor (RID)



**Abb. 4.4:** Bauprinzip eines Brechungsindex-Detektors

(Quelle: wikipedia.de, verändert)

Der Brechungsindex-Detektor misst, wie stark das Licht an der Grenzfläche zwischen Eluat und mobiler Phase gebrochen wird. Sobald das Eluat in seiner chemischen Zusammensetzung durch gelöste Stoffe von der eingesetzten mobilen Phase abweicht, kommt es zur Brechung an der Grenzfläche zwischen beiden Flüssigkeiten. Wie stark die Brechung ist, kann das Gerät quantitativ bestimmen und so Peaks aufnehmen. Beim RID handelt es sich um einen **Universal-detektor** der auch dann eingesetzt werden, wenn die Analyte keine UV/VIS-Spektren besitzen.

Er bleibt in seiner jedoch Empfindlichkeit weit hinter einem DAD oder einem UV/VIS-Detektor zurück. Da der Brechungsindex stark temperaturabhängig ist, ist für fehlerfreie Messungen eine konstante Temperatur des Eluenten unerlässlich. Moderne kommerzielle Geräte verfügen daher über exakt temperierte Messzellen..

### 4.2. Warum ist der RID bei einer Gradiententrennung nicht anwendbar?

.....

.....

## 5. Identifizierung der Substanzen

## 6. Aktuelle Entwicklungen

HPLC wird nicht ausschließlich zu analytischen Zwecken eingesetzt, sondern auch in der chemischen Industrie, um ein Produkt (z.B. Proteine) von Verunreinigungen zu trennen. Hierbei kommen Säulen mit bis zu einem Meter Durchmesser zum Einsatz.

Zur Zeit herrscht der Trend, immer höheren Probendurchsatz zu erreichen, d.h. die notwendige Trennzeit zu verkleinern. Hierfür werden bei der **Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)** Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 2  $\mu\text{m}$  als Säulenmaterial genutzt. Dadurch können Geschwindigkeit und Effizienz einer chromatografischen Auftrennung deutlich verbessert werden. Allerdings ist für die Durchführung einer Trennung mit einem solchen Säulenmaterial ein deutlich höherer Arbeitsdruck erforderlich (bis 120 MPa, d.h. .... bar!), der von klassischen HPLC-Anlagen nicht erreicht werden kann. Insgesamt beträgt die Analysezeit auf UHPLC-Anlagen nur ca. 1 Zehntel, von denen klassischer HPLC-Anlagen. Viele Trennungen benötigen mittlerweile eine Trennzeit von unter 1 Minute!