

Hoher Druck und hohe Leistung in der Chromatographie (HPLC)- LÖSUNGEN

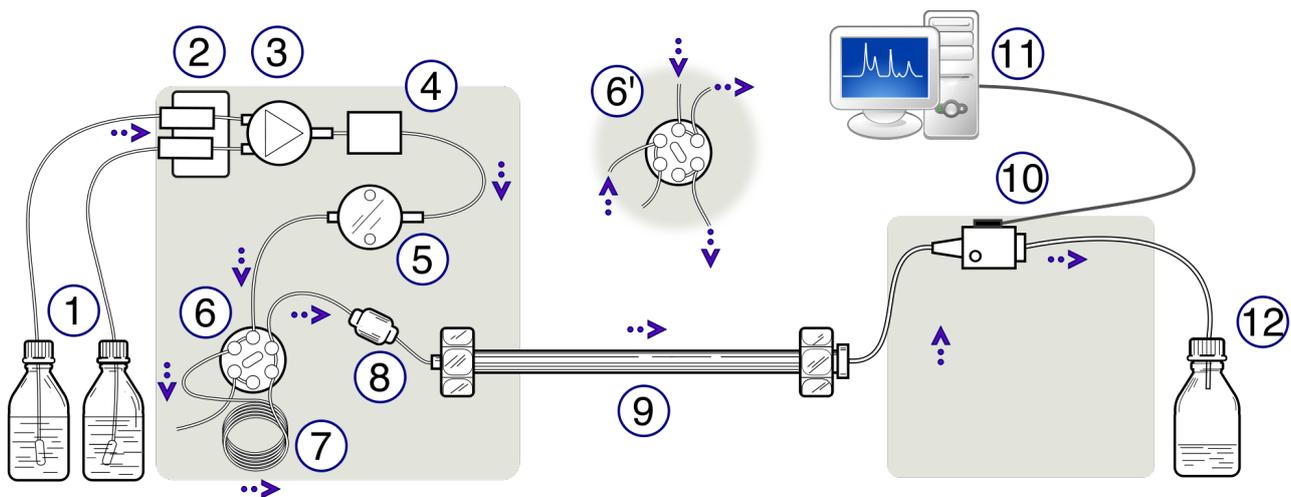
CCL

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, **HPLC**) ist eine analytische Methode in der Chemie. Die HPLC ist ein Flüssigchromatographie-Verfahren, mit dem man nicht nur Substanzen trennt, sondern diese auch über Standards identifizieren und quantifizieren (die genaue Konzentration bestimmen) 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)

(1) Solvent reservoirs (Lösungsmittelbehälter)

(2) Solvent degasser (Entgasungseinheit)

(3) Gradient valve (Mischventil)

(4) Mischgefäß

(5) High-pressure pump (Hochdruckpumpe)

(6) Switching valve (Probe-Einlass-Ventil)

(7) Sample injection loop (Dosierschleife)

(8) Pre-column (Vorsäule)

(9) Analytical column (Trennsäule)

(10) Detector (Detektor)

(11) Data acquisition (Datenauswertung)

(12) Waste, fraction collector (Lösungsmittelabfall, Fraktionensammler)

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_2O_3 -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 Probekomponenten 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 unpolarer 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?

Bei beiden Trennmethode(n) nehmen die Peakhöhen mit steigender Retentionszeit ab und es kommt zur Peakverbreiterung. (Hintergrund: multiplikative Verteilung! und Zunahme der ungerichteten Bewegungen der Teilchen). Wegen derselben Gehalte und Detektionsempfindlichkeiten, sind die Flächen der Peaks identisch

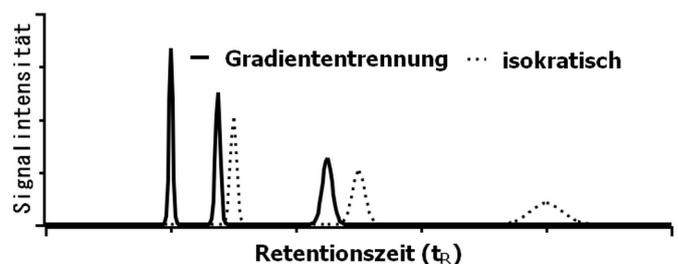


Abb. 2.1: Chromatogramme (schematisch) von 3 Stoffen: Alle mit demselben Gehalt (!) und Responsefaktor (!) ($\hat{=}$ Detektionsempfindlichkeit)

Bei der Gradiententrennung ist neben den besseren Peakformen auch die Trennzeit/Analysezeit kürzer!

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 µm 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) .

Die stationäre Phase besteht aus möglichst kleinen Partikeln. Dadurch wird die Anzahl der Trennböden, die in der Säule untergebracht werden können erhöht. Je höher die Anzahl der Trennböden, desto höher ist die chromatographische Auflösung, also die Fähigkeit 2 Stoffe getrennt voneinander zu Erfassen. *siehe auch* <https://www.youtube.com/watch?v=BJsD5J353jM&feature=youtu.be>

Da die Säule mit so feinen Partikel und damit sehr dicht gepackt ist, wird ein hoher Druck benötigt, um überhaupt mobile Phase hindurch befördern zu können.

Will man eine bestimmte Durchflussrate erzielen (z.B. 0,5 mL pro Minute), so ist hierfür ein sehr hoher Druck erforderlich.

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!)

$$t_R = t'_R + t_0 \quad \text{[Für was stehen die Symbole????]}$$

Totvolumen: Das bis t_0 ausgeflossene Flüssigkeitsvolumen ($\hat{=}$ Innenvolumen des Trennsystems)

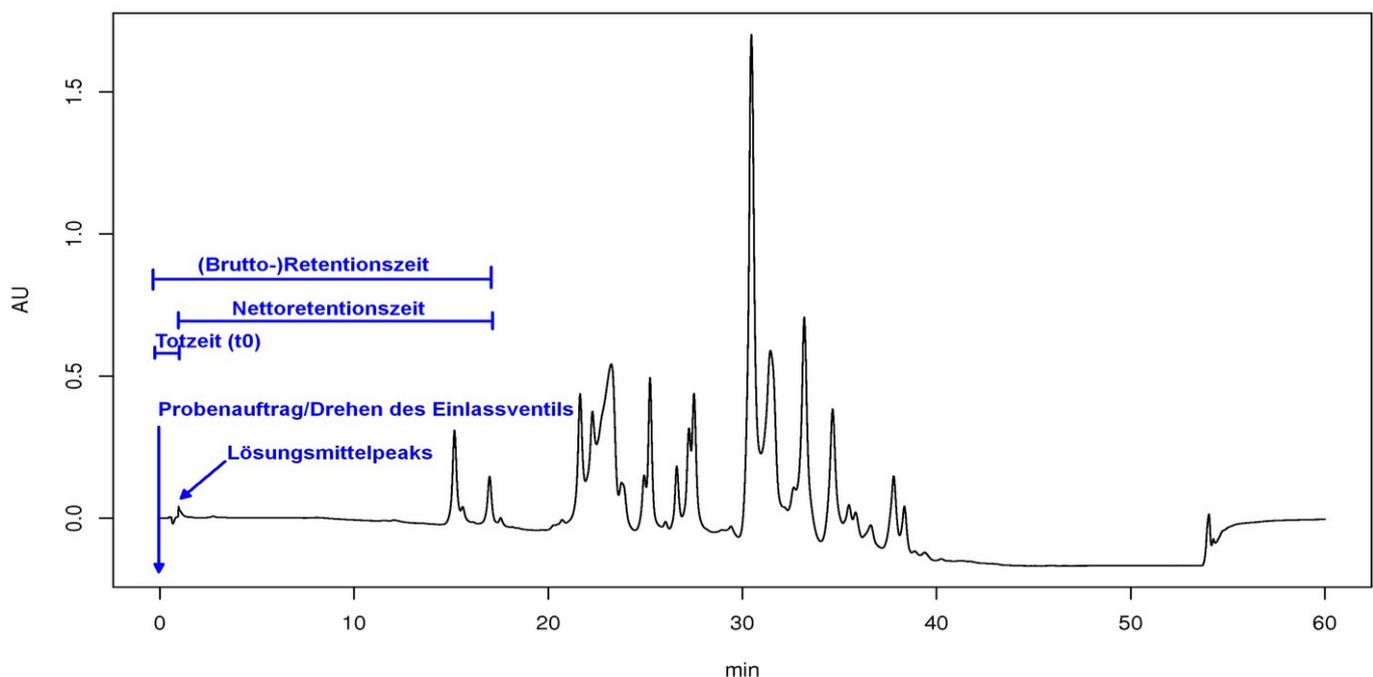
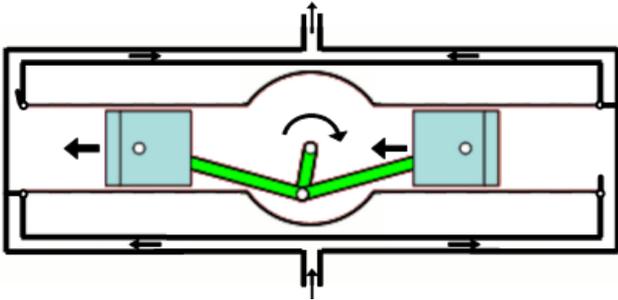


Abb. 2.2: HPLC chromatogram of J'Adore perfume water, as example of complex mixture analysis. Separation on C18 column using almost linear 5 - 100% acetonitrile-water gradient. (Quelle: www.commonswiki.org)

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.

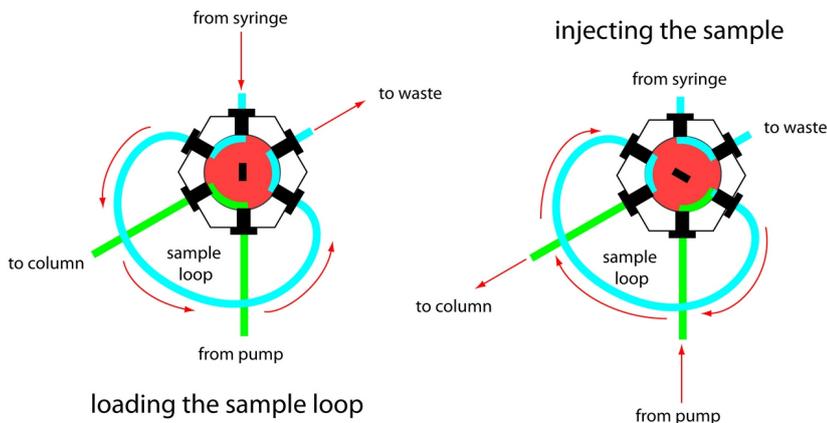
Durch die rotierende Anordnung leert sich der eine Kolben während der andere gerade gefüllt wird. → konstruktionsbedingt kaum pulsierende Druckschwankungen.

Abb. 3.1: Schema einer Doppelkolbenpumpen

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.

links: **Ladeposition**. Einspritzen der Probe in die Schleife (z.B. mit Mikroliterspritze). Dosierschleife füllt sich.

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

Überschüsse gelangen in Abfall. rechts: Auftragsposition. Nach Drehen des Ventils, wird die Probe auf die Säule gedrückt. Fazit: Das Dosierschleifenvolumen legt das aufgetragene Probevolumen fest.

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 Probenhalter 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 im 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?

Rauschen: periodische, zitterige Signaländerung aufgrund der Messelektronik/ elektronischen Verarbeitung.

Drift: Allmähliche Änderung der Grundlinie

Die Software ist i.d.R. so eingestellt, dass von Peak ausgegangen wird, wenn er mindestens doppelt so hoch wie das umgebende Rauschen.

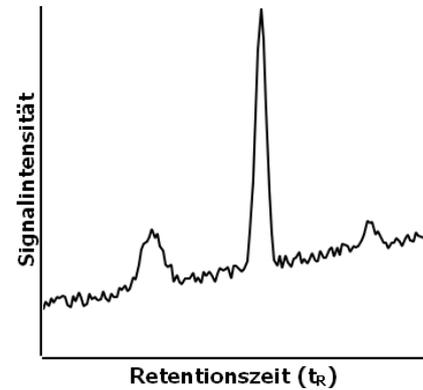


Abb. 4.1: Rauschen, Drift und Signal

UV/VIS-Detektor und DA-Detektor (DAD)

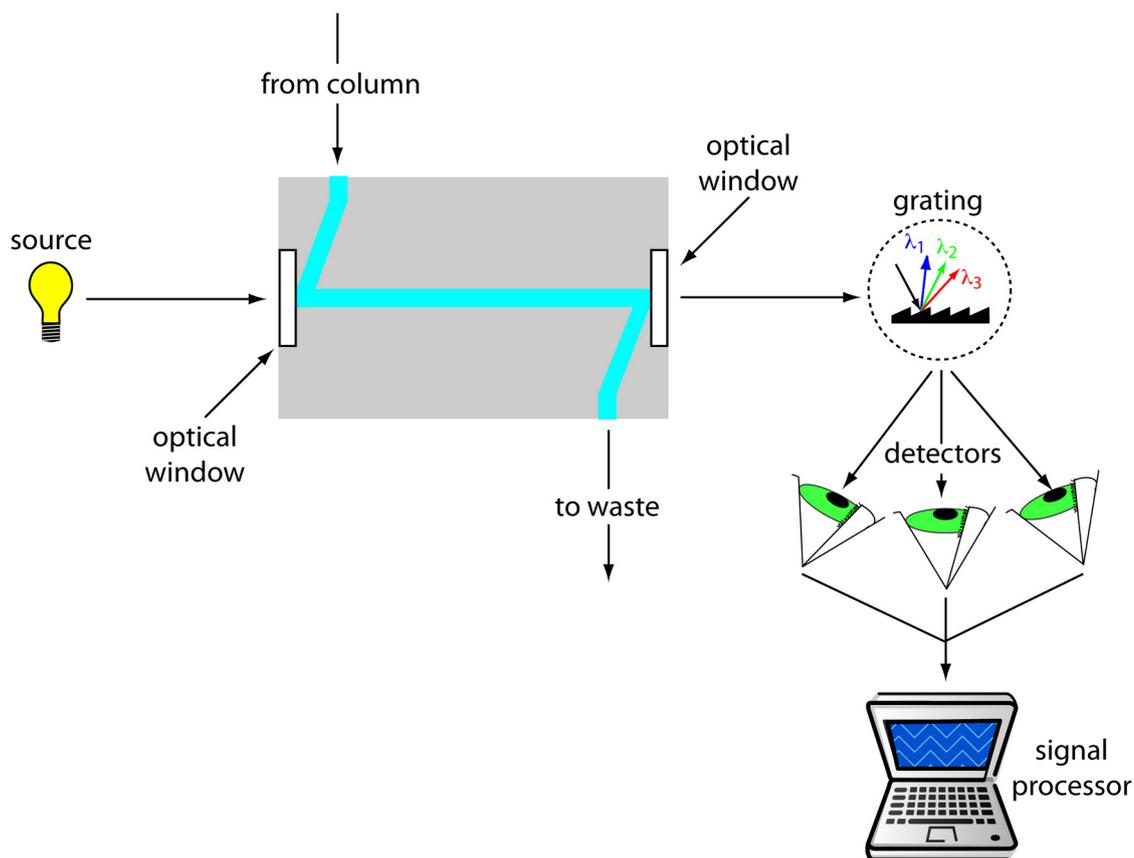


Abb. 4.2: Schema eines DAD (Quelle: www.chem.libretexts.org)

4.3. Erklären Sie anhand Abb. 4.2 den baulichen Unterschied zwischen einem UV/VIS-Detektor und einem DAD, sowie den Vorteil letzteren.

Bei einem UV/VIS-Detektor ist ein Monochromator vor der Durchlaufküvette: Es gelangt nur die vorausgewählte Wellenlänge auf die Lösung. Bei einem DAD wird die Probe mit dem gesamten Wellenlängenspektrum durchstrahlt und erst anschließend das Licht in die Wellenlängen zerlegt. Diese bestrahlen ein flächiges Bauelement (Diodenarray) als Detektor. Alle Wellenlängen werden gleichzeitig detektiert.

Brechungsindex-Detektor (RID)

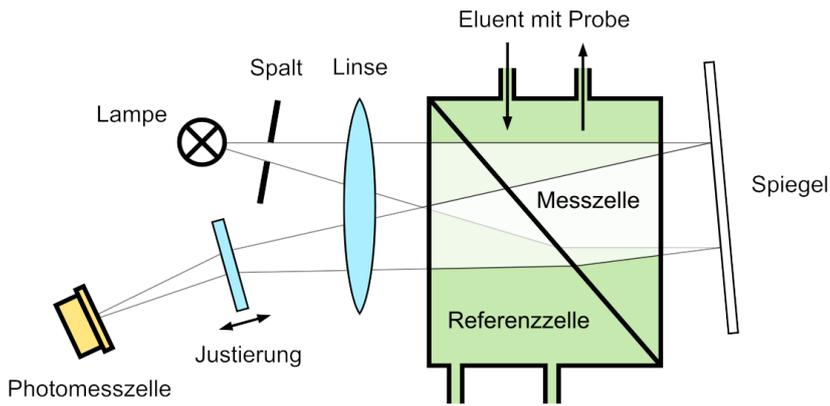


Abb. 4.4: Bauprinzip eines Brechungsindex-Detektors

(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?

Die aktuelle Zusammensetzung der mobilen Phase beeinflusst deren Brechungsindex. Der Inhalt der Referenzzelle müsste der aktuell aus der Säule fließenden Zusammensetzung ständig angepasst werden. Die aktuelle Zusammensetzung am Detektor ist nicht genau bekannt, weil auch die Totzeit meist nicht genau bekannt ist

5. Identifizierung der Substanzen

* Ist die Retentionszeit eines Analyts mit der einer Referenzsubstanz unter den gleichen Bedingungen (gleiches chromatographisches System) identisch und das Vorhandensein des Analyts in der Probe plausibel, so spricht es dafür, dass es sich um denselben Stoff handelt. Zur Untermauerung dieser Vermutung kann der Probe noch direkt Referenzstoff zugemischt werden. Nimmt die Peakfläche zu, handelt es sich um denselben Stoff.

* Zur genaueren Untersuchung, gerade bei chemisch eng verwandten Stoffen, kann man mit dem DAD das UV-VIS-Spektrum vom Analytpeak anzeigen und mit dem Referenzstoff-Spektrum auf identische Form (z.B. Lage der λ_{\max}) abgleichen.

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 μm 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. **1200 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!

Quellen: www.wikipedia.de (diverse Artikel, Stand Juni 2020); <https://chem.libretexts.org/> (Kapitel: 12.5: High-Performance Liquid Chromatography)