

Rüdiger Kuhnke

HPLC

High Performance Liquid Chromatography

*Eine Einführung für naturwissenschaftlich-
technische und medizinische Berufe*



Analytische Chemie

Chromatographie und HPLC

Einige technische Details

Die Trennsäule

In und hinter der Säule

Der Trennprozess

Fittings und Kapillaren

Zum Schluss

Analytische Chemie

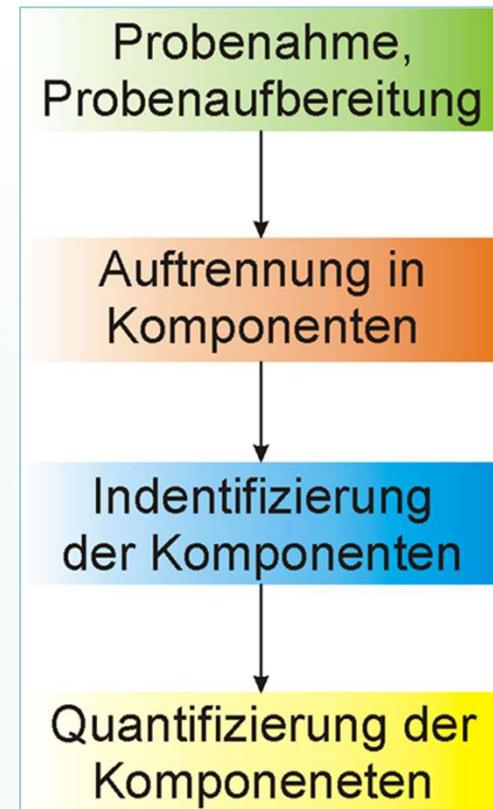
Die *Analytische Chemie* oder kurz *Analytik* ist ein Teilgebiet der Chemie und beschäftigt sich mit der Frage, welche Stoffe in einer Probe enthalten sind. Auch die Strukturaufklärung, d. h. die Anordnung der Atome in einem Molekül, ist Gegenstand der Analytik.

Fragestellungen der Analyse

- *Qualitative Analyse:* Was ist in der unbekanntem Substanz enthalten?
- *Quantitative Analyse:* Wieviel von einer bestimmten Substanz ist in der Probe enthalten?
- *Strukturanalyse:* Wie ist der molekulare Aufbau der Substanz?

Ablauf einer Analyse

1. Probenahme, Probenvorbereitung (z. B. durch Anreicherung, Aufschluss, in Lösung bringen usw.)
2. Auftrennung in die interessierenden Komponenten
3. Identifizierung der gefundenen Komponenten
4. Mengenbestimmung der gefundenen Komponenten



Nass-chemische Methoden ...

Die klassischen nass-chemischen Methoden beruhen darauf, dass durch Veränderungen von Temperatur, pH-Wert oder anderen Parametern Substanzen z. B. als Niederschlag ausfallen, in Lösung gehen, komplexiert werden usw.



Bild: Brand GmbH & Co KG

... oder Instrumentelle Analytik

Die Instrumentelle Analytik bedient sich in hohem Maße physikalischer Methoden:

Optische Spektroskopie, Massenspektroskopie, NMR-Spektroskopie, Radioanalytik, Elektroanalytische Methoden usw.

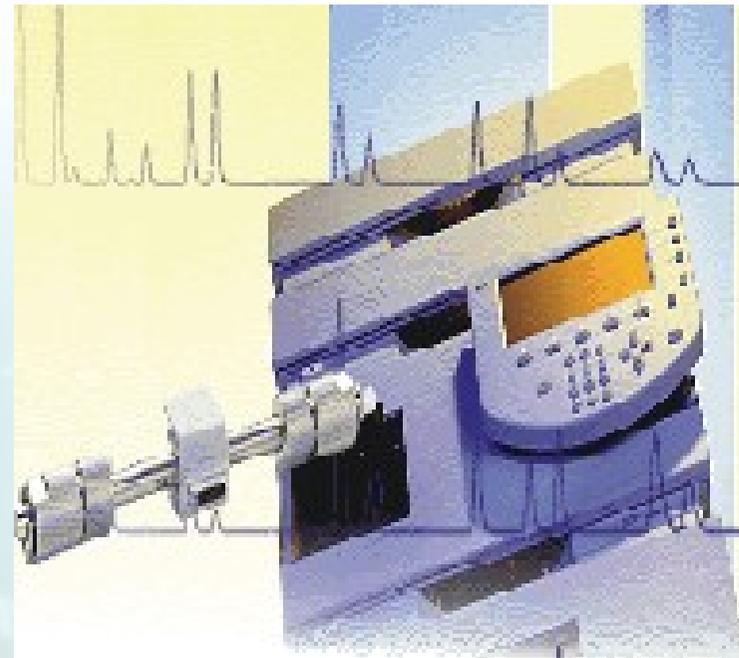


Bild: Hewlett-Packard

Instrumentelle Analytik: HPLC

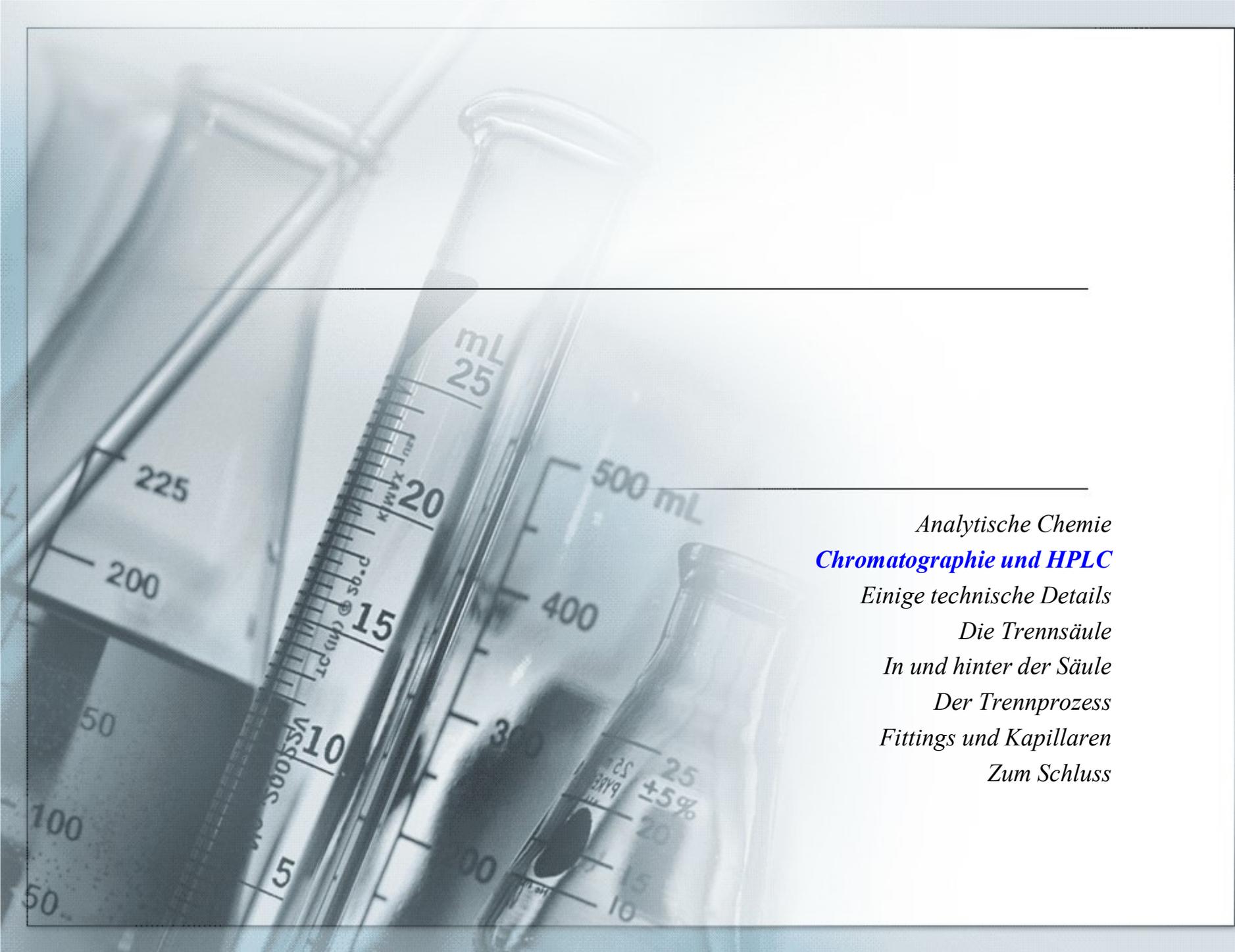
Eine Methode der Instrumentellen Analytik ist die HPLC. Das bedeutete ursprünglich „*High Pressure Liquid Chromatography*“. Heute stehen die hohe Leistungsfähigkeit und Vielseitigkeit im Vordergrund: „*High Performance Liquid Chromatography*“.



Bild: Waters Corporation

Anwendungsgebiete der HPLC

- Reinheits- und Produktkontrolle von Industriechemikalien
- Gehalts- und Reinheitsbestimmung von Medikamenten
- Bestimmung von Umweltschadstoffen
- Analyse der Molmassenverteilung von Polymeren
- Lebensmittelchemie
- Petrochemie
- Biochemische Analytik
- Forensische Biochemie
- Medizin mit all ihren Teilbereichen etc.



Analytische Chemie
Chromatographie und HPLC
Einige technische Details
Die Trennsäule
In und hinter der Säule
Der Trennprozess
Fittings und Kapillaren
Zum Schluss

Wie alles anfang

1903 veröffentlichte der russische Botaniker Michail S. Tswett seine erste Arbeit über die Chromatographie:

„Über eine neue Kategorie von Adsorptionsphänomenen und ihre Anwendung auf die biochemische Analyse“



Bild: gemeinfrei

Tswetts Versuch (1)

Tswett kam es auf Pflanzenpigmente an; seine Probe war ein in Petrolether gelöstes homogenisiertes Pflanzenmaterial. Außerdem befüllte er ein Glasrohr mit Inulin.

Petrolether: Kein Ether im chemischen Sinne, sondern ein Gemisch aus verschiedenen Kohlenwasserstoffen

Inulin: Ein Mischung aus Polysacchariden



Bild: illumina-chemie.de



Bild: VWR

Tswetts Versuch (2)

Der Versuch beginnt damit, den Extrakt aus dem Pflanzenmaterial auf die Säule zu geben und gleich anschließend das reine Lösungsmittel nachzufüllen.

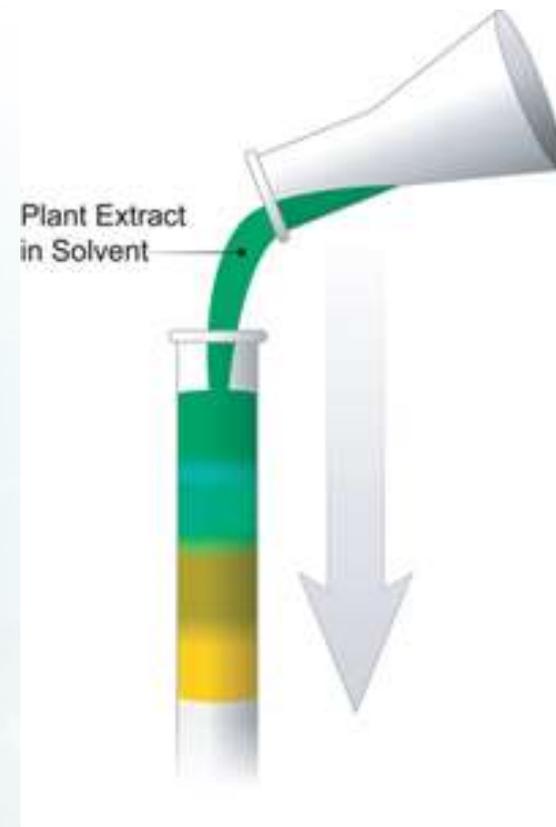


Bild: Waters Corporation

Tswetts Versuch (3)

Die Probe sinkt langsam durch die Säule nach unten, und nach einiger Zeit sind verschiedenfarbige Banden zu sehen, weil einige Komponenten schneller durchlaufen und andere etwas zurückbleiben.

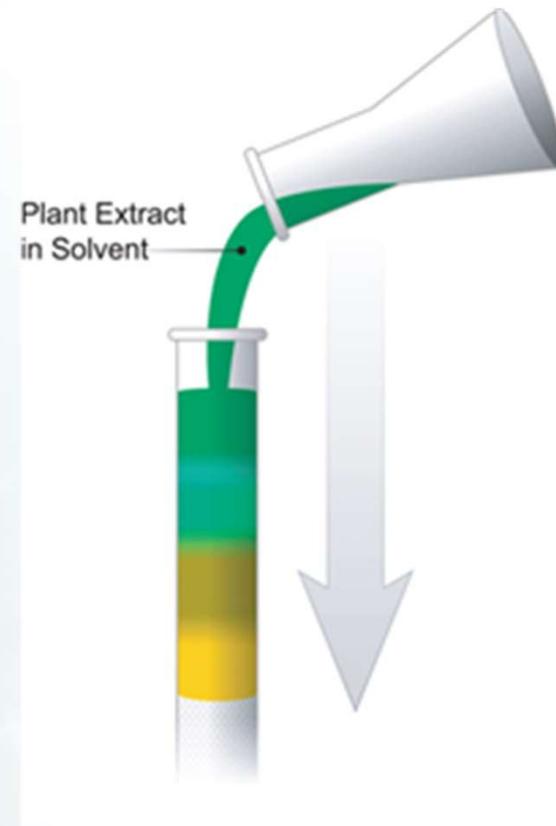
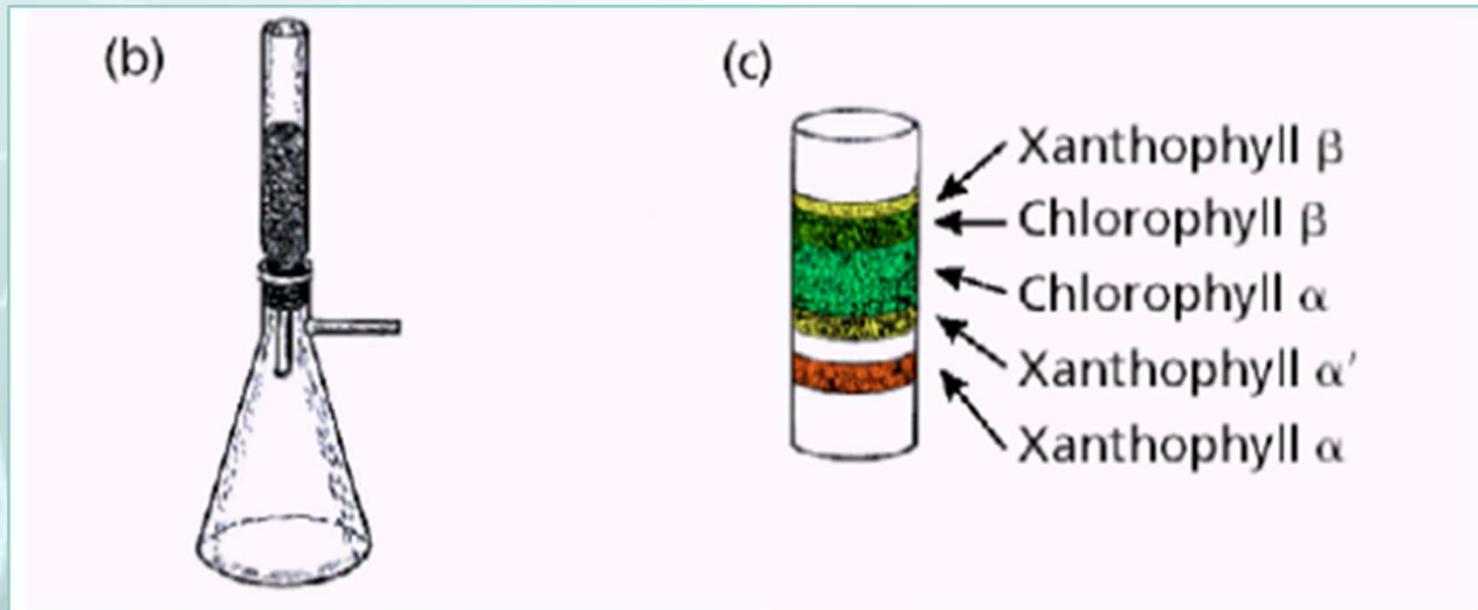


Bild: Waters Corporation

Aus Tswetts Publikation



Хроматография

Mit seinem Versuch hatte Tswett eine analytische Trennung der im Extrakt gelösten Komponenten vorgenommen. Er konnte erstmals Chlorophyll a eindeutig von Chlorophyll b abtrennen.

Tswett prägte für dieses Verfahren den Namen *Chromatographie*, abgeleitet vom Griechischen χρῶμα (Farbe) und γράφειν (schreiben).

Kurioserweise bedeutet der russische Name Цвет *Farbe*. Tswettographie? ;-)

Dünnschichtchromatographie

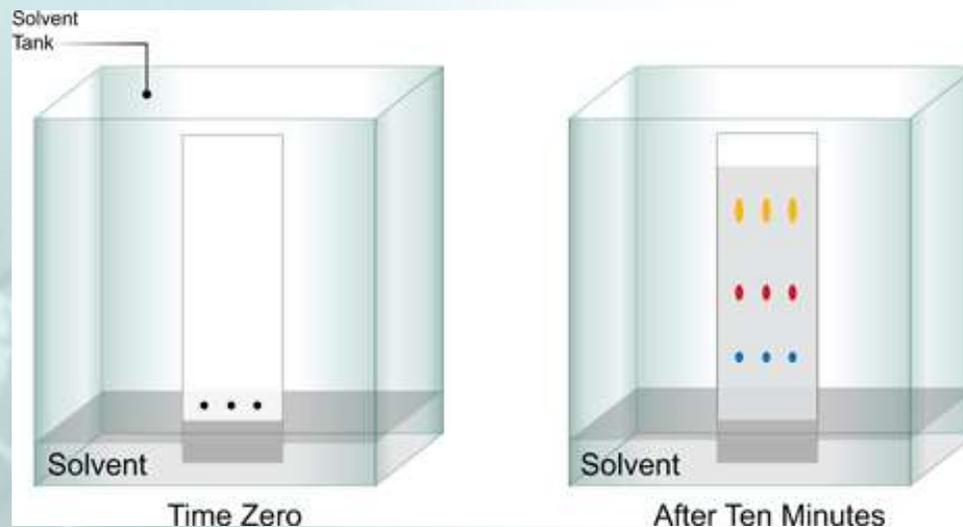


Photosynthese-
pigmente

Bild: R. Kuhnke, EUS

Dünnschichtchromatografie

- Die Probe wird als Punkt auf die dünne Schicht (stationäre Phase) aufgebracht. Der untere Rand der Platte steht im Lösungsmittel.
- Der Fluss wird durch Kapillarwirkung verursacht: Das Lösungsmittel (mobile Phase) diffundiert in die trockene Partikelschicht.



Chromatographie mit Kreide

Einfacher Versuch zur Chromatographie: Trennung organischer Farbstoffe in Tafelkreide.

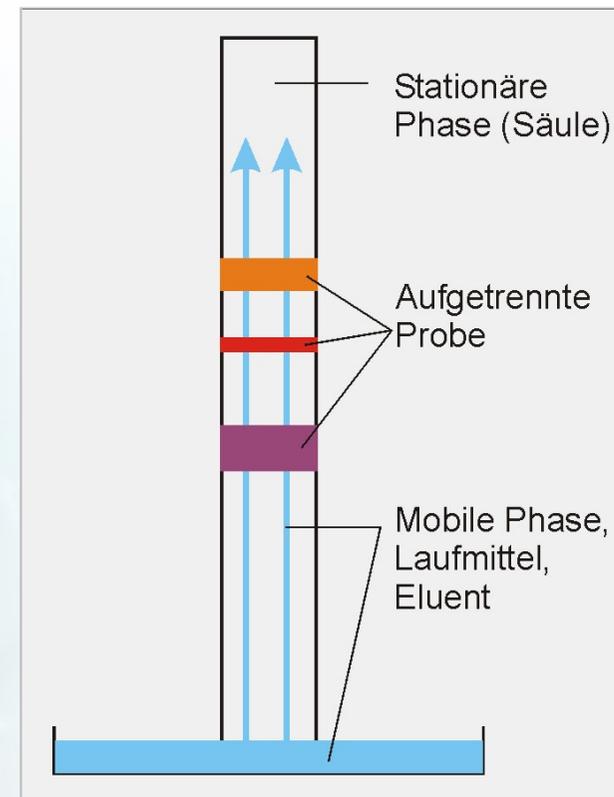
- Starke Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Kreide: Farbstoff wandert langsam
- Schwache Wechselwirkung: Farbstoff wandert schneller.

Ergebnis: Trennung des Farbstoffgemisches



Wichtige Begriffe

- Die Kreide heißt *stationäre Phase*.
- Die in der Kreide aufsteigende Flüssigkeit heißt *mobile Phase, Laufmittel* oder *Eluent*.
- Der Farbstoff ist das, was analysiert werden soll und heißt *Analyt*.



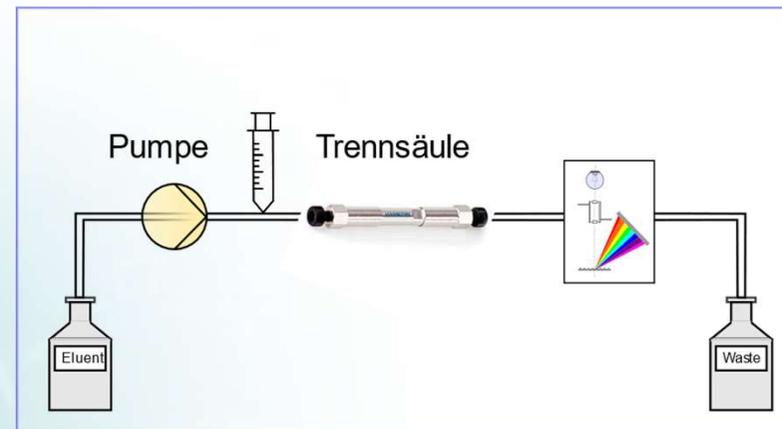
Geeignete Substanzen

- Damit eine Substanz mittels HPLC analysiert werden kann, muss sie in einem geeigneten Eluenten löslich sein
- Schwer flüchtige oder nicht flüchtige Substanzen, andernfalls kommt Gaschromatographie in Frage
- Substanzen mit großer molarer Masse
- Thermisch instabile oder anderweitig leicht zersetzliche Substanzen

Pumpe und Trennsäule

Tatsächlich haben wir anstelle von Tswetts Glasrohr bzw. unserer Kreide z. B. eine mit Kieselgel gefüllte Stahlkartusche, die *Trennsäule*.

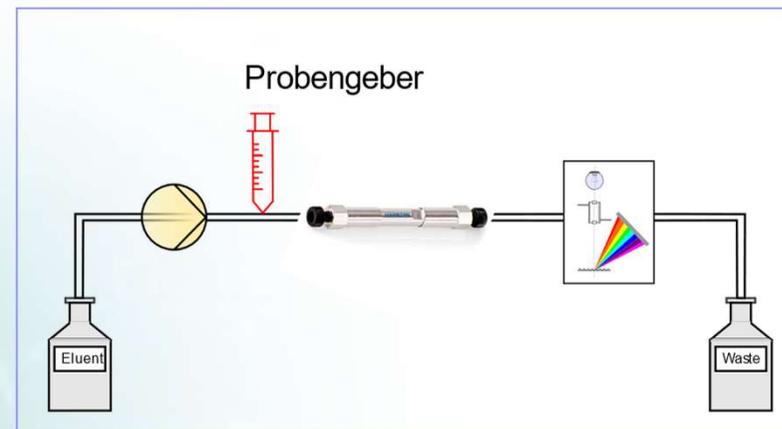
Wie kommt die mobile Phase zur Säule? Mit einer *Pumpe*.



Skizze einer HPLC: links die Pumpe, die den Eluenten zur Trennsäule befördert.

Probengeber

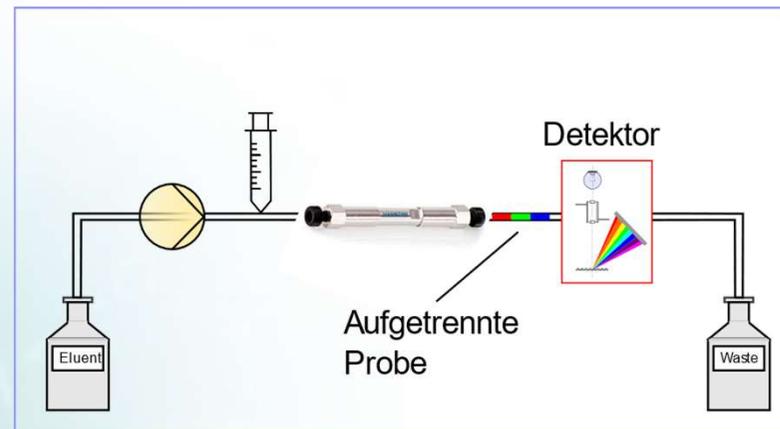
Wie kommt die Probe zur Säule? Anders als im offenen Glasrohr auf der Kreide brauchen wir einen *Injektor* oder *Probengeber*, was im einfachsten Fall eine Injektionsspritze sein kann.



Vor der Trennsäule wird die Probe in den Laufmittelfluss injiziert.

Was passiert mit der Probe?

Im Kreideexperiment war am oberen Ende einfach Schluss. Wird aber einfach weiter Laufmittel durch die Trennsäule gepumpt, laufen die aufgetrennten Komponenten hinter der Säule weiter und können mittels eines *Detektors* erfasst werden.

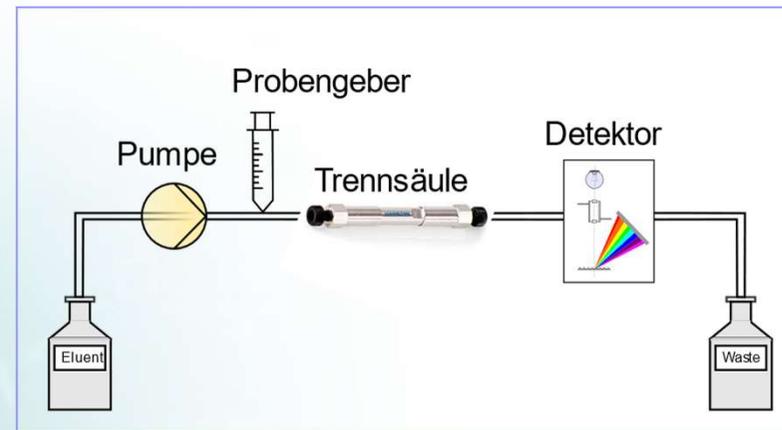


Die aufgetrennten Komponenten (hier durch verschiedene Farben angedeutet) passieren den Detektor, der sie identifiziert.

Eine (fast) komplette HPLC

- Pumpe
- Probengeber
- Trennsäule
- Detektor

... und die Kapillaren,
durch die das Laufmittel
gepumpt wird.





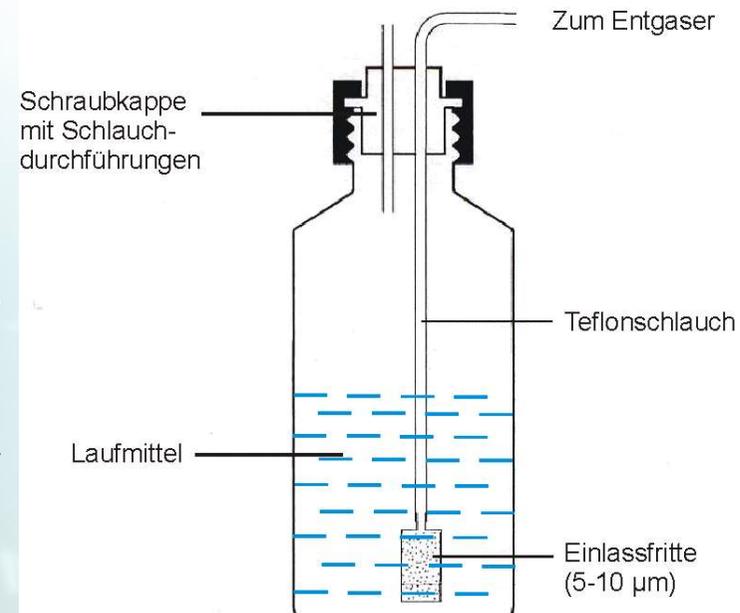
Analytische Chemie
Chromatographie und HPLC
Einige technische Details
Die Trennsäule
In und hinter der Säule
Der Trennprozess
Fittings und Kapillaren
Zum Schluss

Das Laufmittel (Eluent)

Einer der Grundsätze in der HPLC ist Sauberkeit!

Sie beginnt im Eluentenreservoir. Partikel im Eluenten werden mittels einer *Einlassfritte* zurückgehalten.

Bei wässrigen Eluenten ist der *mikrobielle Befall* ein Problem - deshalb sollten Laufmittel nicht aufgefüllt, sondern stets erneuert werden.



Auswahl der Eluenten (1)

- Die Probe muss im Eluenten löslich sein und darf mit ihm nicht chemisch reagieren.
- Der Eluent muss die stationäre Phase benetzen.
- Die Art der Wechselwirkung zwischen dem Eluenten und der stationären Phase soll eine möglichst schnelle Trennung ermöglichen.
- Der Eluent darf weder Schwebstoffe noch Gasblasen enthalten (Verstopfung von Kapillaren und Fritten, unregelmäßiger Fluss; Störungen im Detektor)

Auswahl der Eluenten (2)

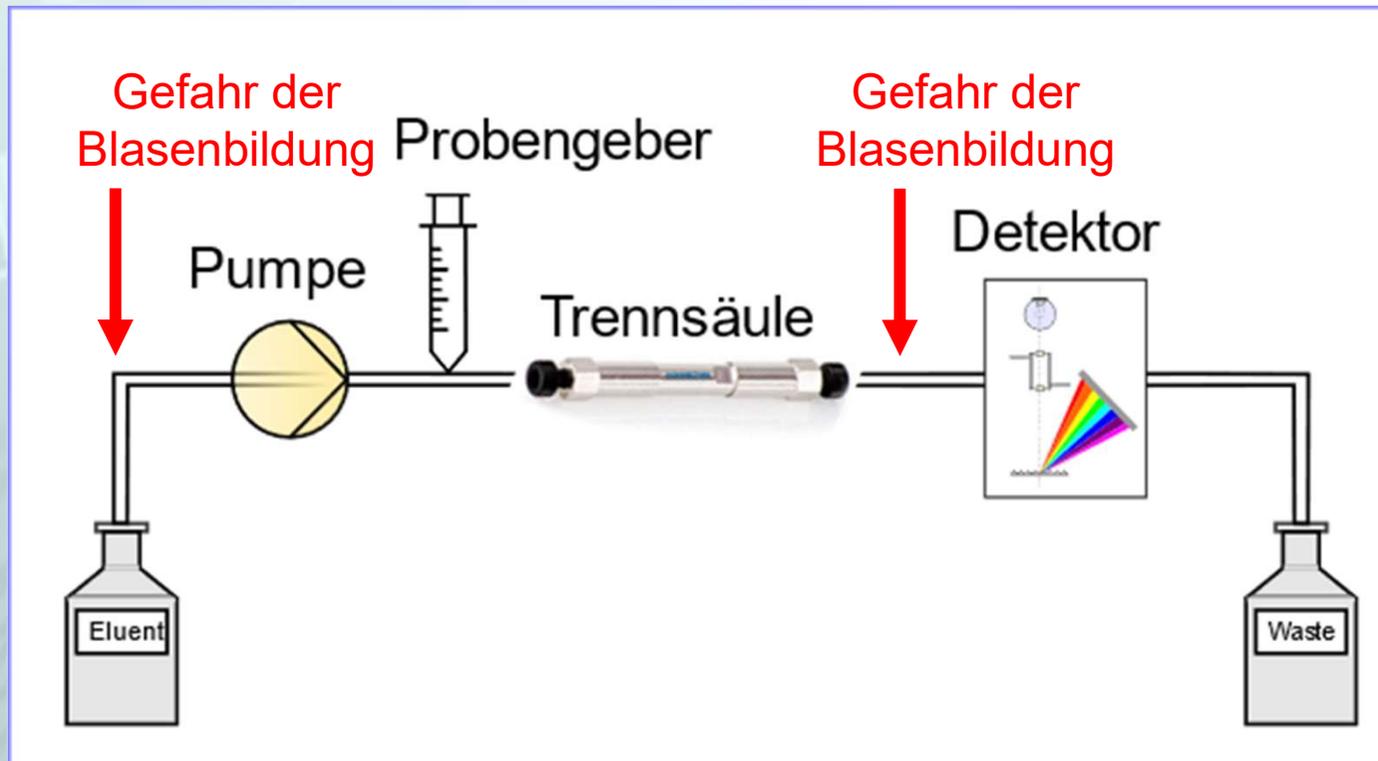
Je nach Versuchsbedingungen zu beachten:

- Reinheit
- Viskosität
- Brechungsindex
- Siedepunkt
- Toxizität
- UV-Durchlässigkeit/UV-Cutoff
- Löslichkeit

Entgasung der Laufmittel

- Wichtig: Entfernung von im Eluenten gelöster Luft. Gelöster Sauerstoff (Anteil in der Luft 20 %) verfälscht vor allem bei UV-Detektoren das Ergebnis.
- In den Pumpen können Luftblasen in den Ventilen unerwünschte Druckschwankungen hervorrufen. Die Folge sind Änderungen der Retentionszeiten.
- Hinter der Säule kommt es zu einem Druckabfall, was die Blasenbildung begünstigt. Im ungünstigsten Fall setzen sich Blasen in der Detektorzelle fest.

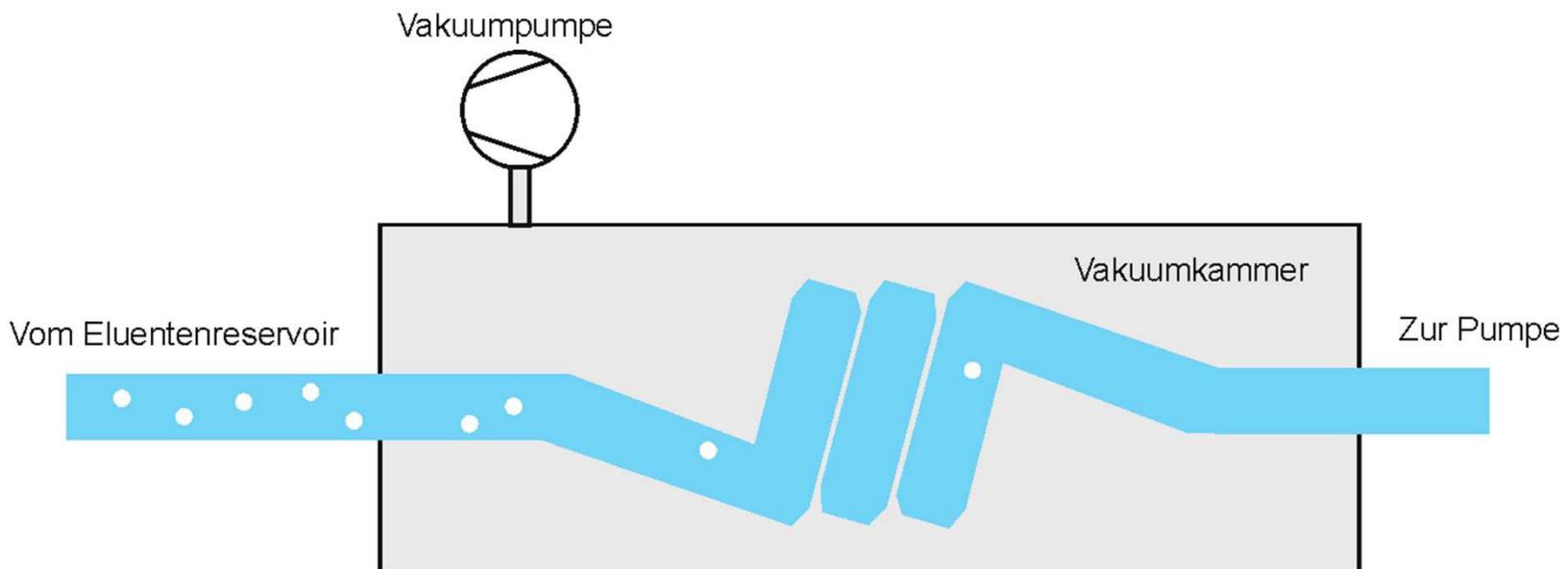
Entgasung der Laufmittel



Entgasungsmethoden

- Durchleiten von Helium durch das Laufmittelreservoir: Helium verdrängt die Luft und damit auch den Sauerstoff. Teuer!
- Entgasung mit Ultraschall: In der Flüssigkeit gelöstes Gas migriert in Vakuumbblasen, die die Flüssigkeit verlassen.
- Entgasung mit dem Permeations-Vakuumentgaser.

In-Line-Degasser



Der Eluent läuft durch eine semipermeable Membran, die zwar für Gas- nicht aber für Flüssigkeitsmoleküle durchlässig ist.

In-Line Degasser

Dieser Entgaser arbeitet mit einer elektronisch gesteuerten Pumpe, die abwechselnd zwei Pumpzyklen durchläuft:

- Zuerst wird schnell mit hoher Pumpleistung ein ausreichendes Vakuum hergestellt.
- Anschließend wird es mit geringer Pumpleistung kontinuierlich und schwankungsfrei aufrecht erhalten.



Die Pumpe

Unterbrechungsfreie Förderung der Eluenten

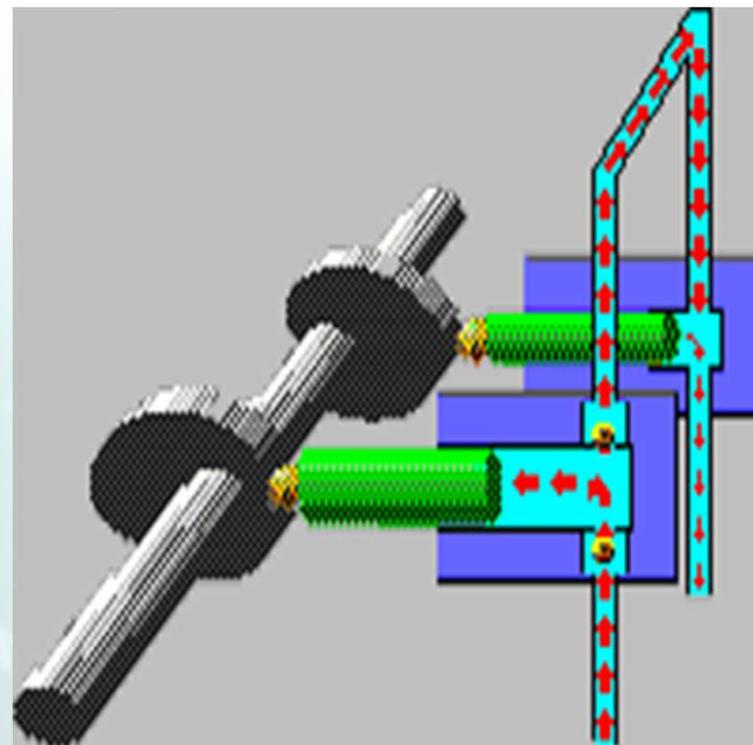
- mit konstanter Flussrate
- ohne Pulsationen
- ohne Druckschwankungen
- auch bei hohen Drücken (mehrere hundert bar bzw. mehrere tausend psi) stabiler Druck

Doppelkolbenpumpe

Die Doppelkolbenpumpe arbeitet für eine pulsationsfreie Förderung mit zwei gegenläufigen Kolben.

Ventile regeln das Ein- und Ausströmen der Eluenten.

Restschwankungen im Fluss werden über eine elektronische Regelung des Schrittmotors ausgeglichen.



Eine HPLC-Pumpe „in echt“

Softwaregesteuerte Doppelkolbenpumpe mit Präzisions-Schrittmotor mit einer Auflösung von 48 Schritten pro μL .

Gleichmäßiger Fluss auch bei Änderungen der Viskosität und Kompressibilität der Laufmittel.



Wichtig!

Eine HPLC-Pumpe ist ein hochwertiges elektromechanisches Gerät und sollte so sorgfältig wie eine Analysenwaage behandelt werden!

- Das Laufmittel ist meist zugleich Schmiermittel für die Kolben. Das heißt: die Pumpe nimmt Schaden, wenn sie trockenläuft, d. h. Luft statt mobiler Phase fördert!
- Häufig werden der mobilen Phase Puffersubstanzen zugesetzt. Nach der Analyse darf keine Pufferlösung in der Pumpe stehen bleiben. (Bildung schwer löslicher Ablagerungen in den Kapillaren und Ventilen, Korrosion)

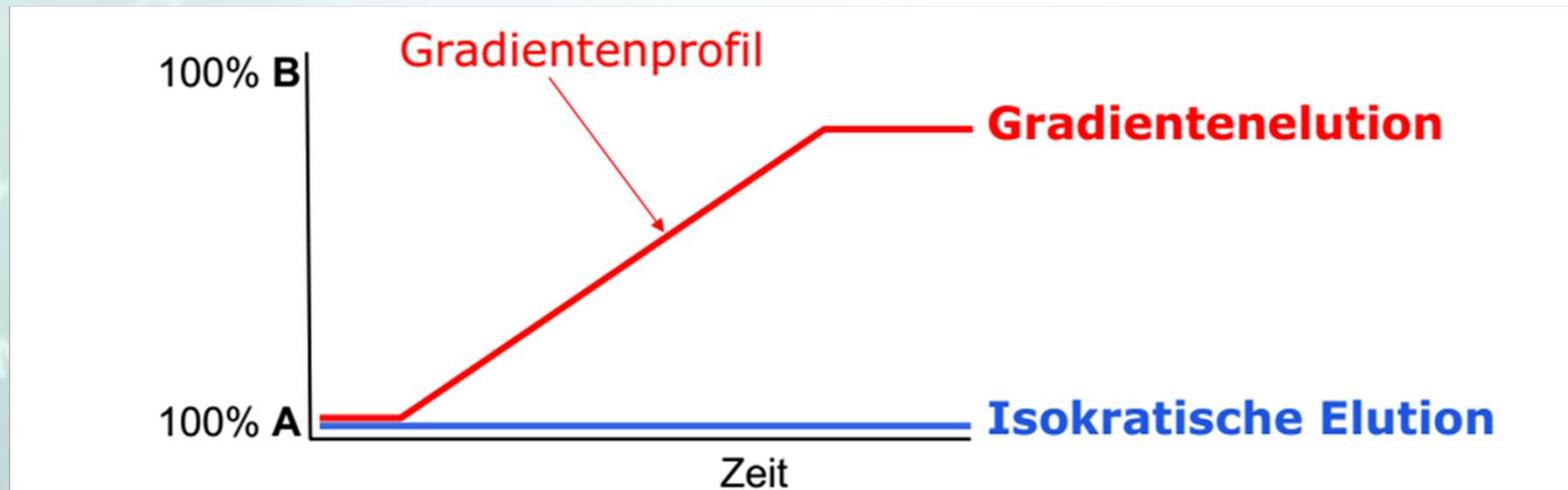
Gradiententechnik

Es kommt oft vor, dass die zu trennenden Komponenten aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften mit verschiedenen Laufmitteln eluiert werden müssen.

Gradiententechnik

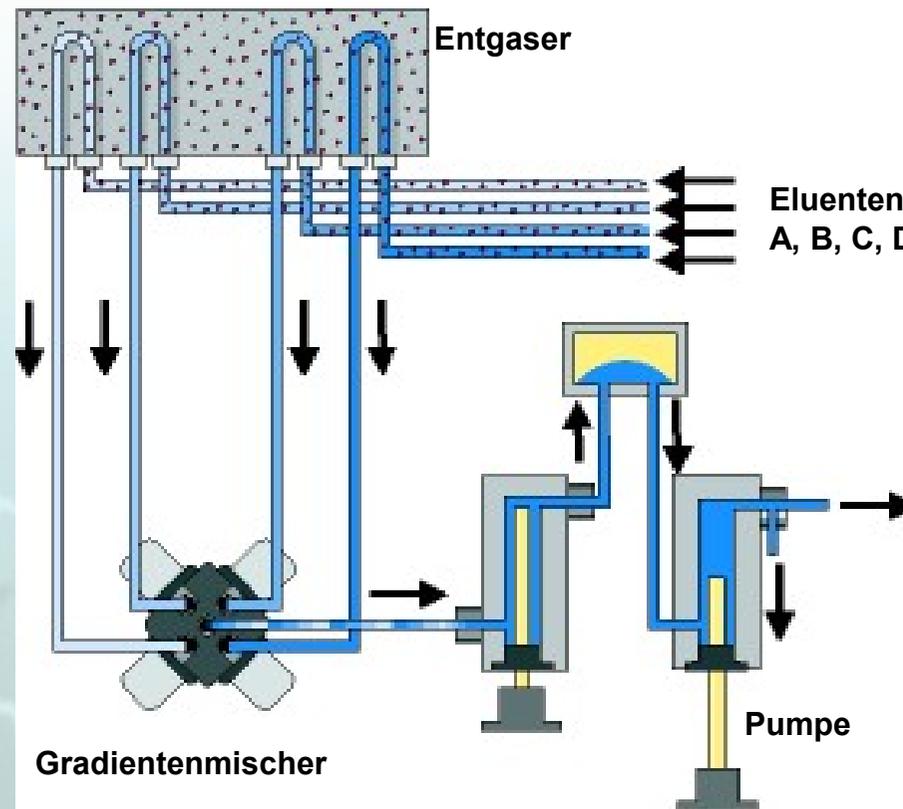
- Wenn während einer Analyse mehrere Laufmittel verwendet werden, spricht man von einem *Lösungsmittelgradienten* bzw. *Gradientenelution*. Nach Anzahl der Eluenten unterscheidet man *binäre*, *tertiäre* oder *quartäre* Systeme.
- Wird hingegen während der ganzen Analyse nur ein einziges Laufmittel verwendet, nennt man das *isokratische* Elution.

Eluentenprofile



Niederdruckgradient

Die Eluenten werden *vor* der Pumpe in einen Gradientenmischer dosiert, dessen Ventile sich proportional zum Anteil des jeweiligen Eluenten öffnen. Die so erzeugte Mischung wird durch eine Pumpe in das System gefördert.

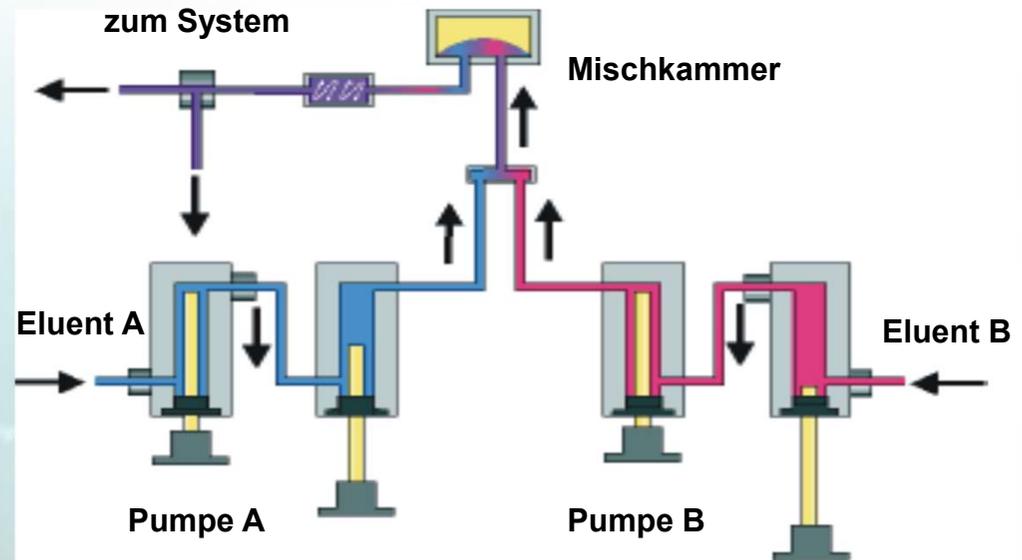


Quelle: HP/Agilent-Trainingsmaterialien

Hochdruckgradient

Jeder Eluent wird mit einer eigenen Pumpe gefördert. Die Mischung erfolgt *hinter* der Pumpe, also hochdruckseitig.

Je nach Anzahl der Pumpen hat man es mit einem binären, tertiären oder quarternären System zu tun.



Quelle: HP/Agilent-Trainingsmaterialien

Niederdruck: Vor- und Nachteile

Vorteile des Niederdruckgradienten:

- Flexibel, Anschluss beliebig vieler Vorratssysteme möglich
- Geringer apparativer Aufwand (Magnetventile, Mischkammer, Steuergerät)
- Billiger als Hochdrucksysteme

Nachteile des Niederdruckgradienten:

- Abweichungen im Mischungsverhältnis bei unterschiedlicher Kompressibilität der Lösungsmittel; Volumenkontraktion beim Mischen

Niederdruck: Vor- und Nachteile

Vorteile des Niederdruckgradienten:

- Flexibel, Anschluss beliebig vieler Vorratssysteme möglich
- Geringer apparativer Aufwand (Magnetventile, Mischkammer, Steuergerät)
- Billiger als Hochdrucksysteme

Nachteile des Niederdruckgradienten:

- Abweichungen im Mischungsverhältnis bei unterschiedlicher Kompressibilität der Lösungsmittel; Volumenkontraktion beim Mischen

Hochdruck: Vor- und Nachteile

Vorteile des Hochdruckgradienten:

- Sehr kurze Ansprechzeiten
- Exaktere Mischungsverhältnisse

Nachteile des Hochdruckgradienten:

- Hoher apparativer Aufwand (pro Lösungsmittel eine separate Hochdruckpumpe)
- Teurer als Niederdrucksysteme

Druckverhältnisse

Egal, ob Hoch- oder Niederdruckgradient:
Am Pumpenausgang herrscht immer Hochdruck!

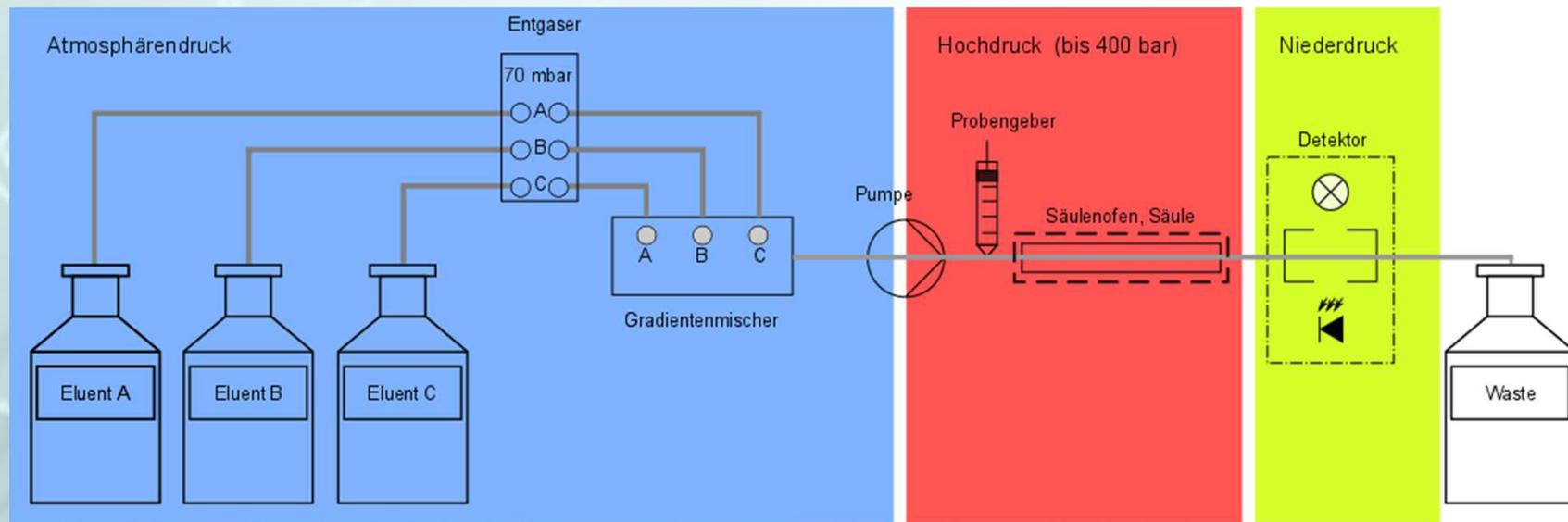
Diesem setzt der Rest des System den *Systemrückdruck* (*system back pressure*) entgegen.

Druckangaben in der HPLC erfolgen in der Einheit *psi* (*pounds per square inch*).

1 psi = 70 mbar; 1 bar = 14,5 psi

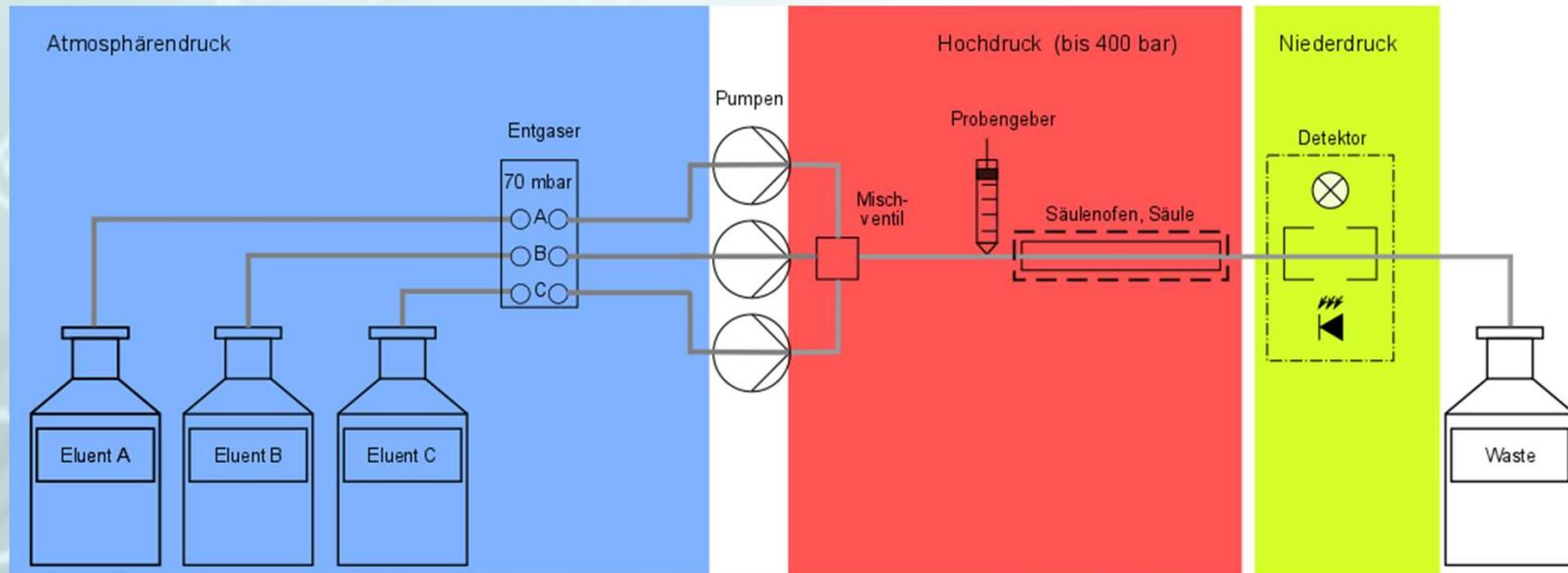
Übersicht Systemdruck

Niederdruckgradient



Übersicht Systemdruck

Hochdruckgradient



Die Probenaufgabe

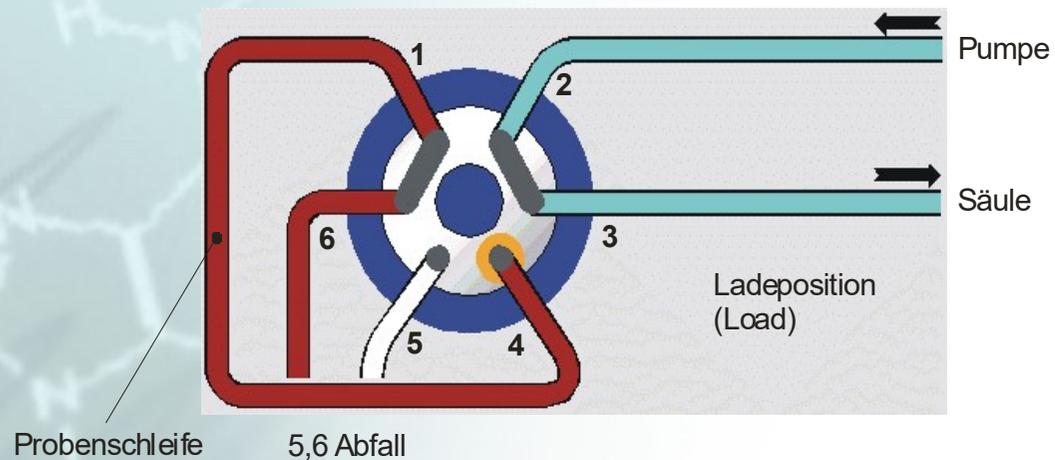
Die Injektion der Probe in das System kann auf verschiedene Weise erfolgen:

- Manuell mit einem 6-Wege-Ventil
- Automatisch mit einem Autosampler

Sechswegen-Ventil: Laden (1)

Injektion der Probe am Port 4 (orange) in die Do-
sierschleife (rot).

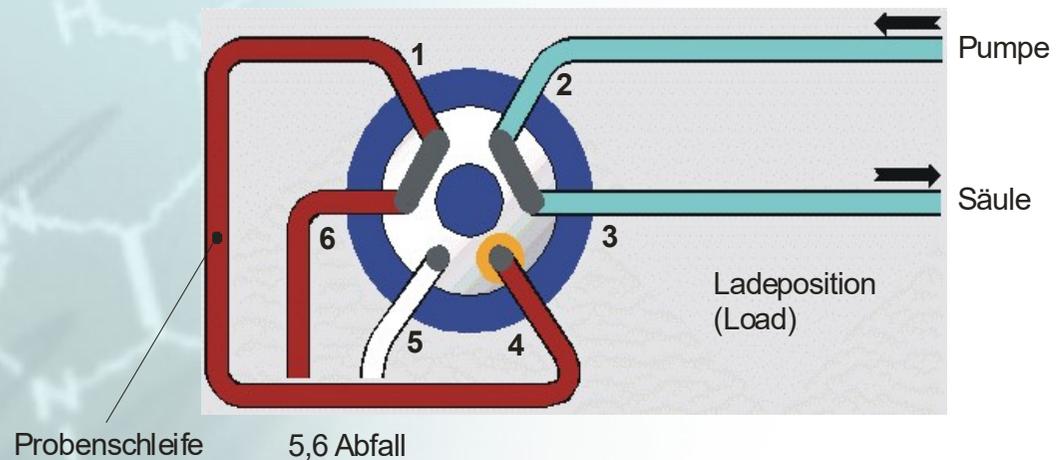
Zwecks vollständiger Füllung wird ca. das Fünf-
fache des Schleifenvolumens aufgegeben.



Sechswege-Ventil: Laden (2)

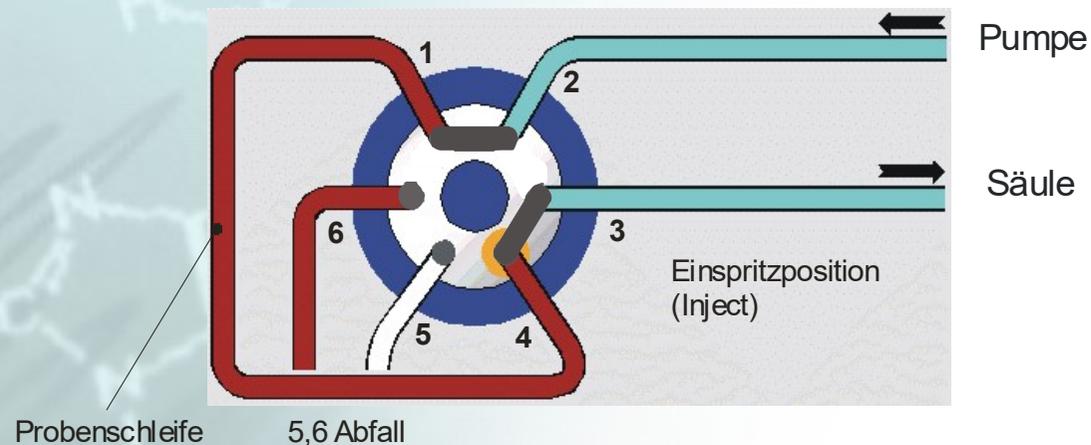
Überschüssige Flüssigkeit tritt aus Port 6 aus, der beim anschließenden Umschalten auf Injektionsstellung geschlossen wird.

Resultat: Genau definiertes Probenvolumen in der Schleife



Sechswege-Ventil: Injektion

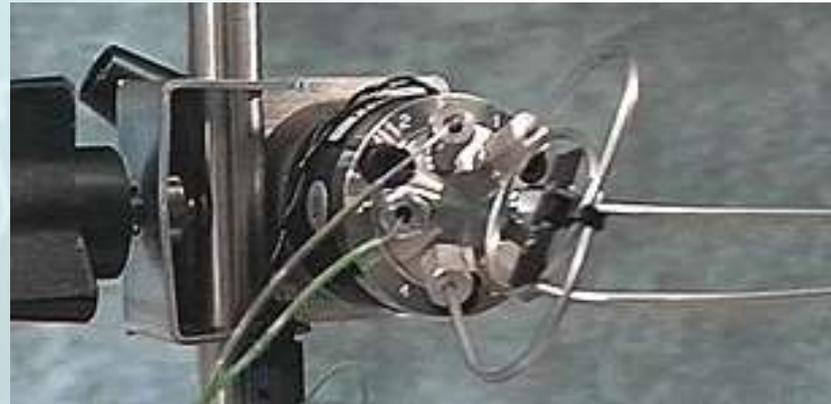
In der Injektionsstellung strömt der Eluent über Port 1 und 2 in die Probenschleife und nimmt dabei das gesamte Probenvolumen mit zur Säule (Port 3 und 4).



Das 6-Wege-Ventil

Vorderansicht: In der Mitte der Injektionsport, rechts der Umschalthebel für die Load/Inject-Positionen.

Rechts: Anschlussseite des Ventils mit Dosierschleife.



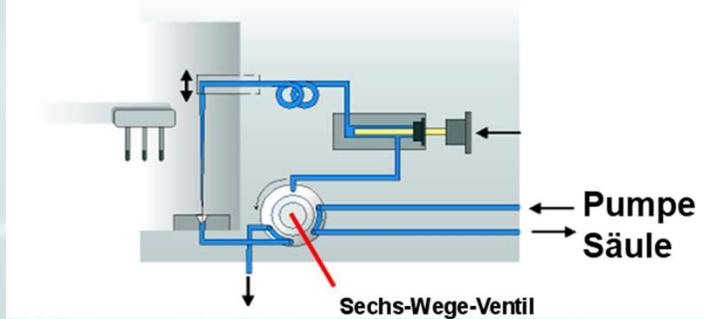
Der Autosampler

Eine größere Anzahl Analysen lässt sich mit manueller Injektion kaum bewältigen. Statt dessen verwendet man automatische Probengeber, auch *Autosampler* genannt.

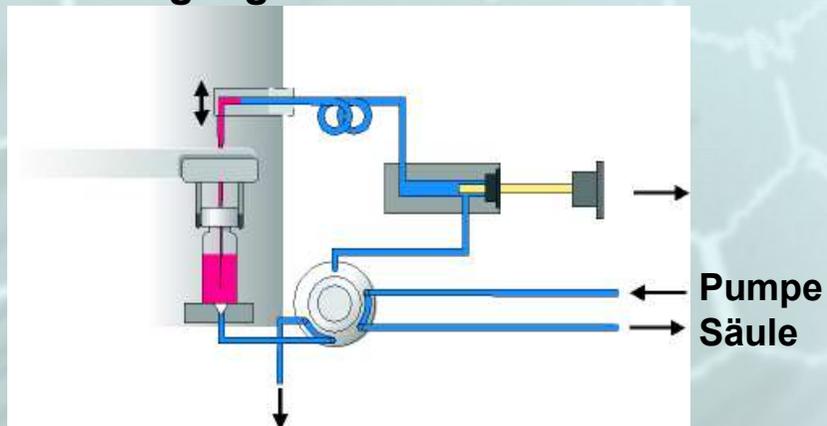
Er enthält entweder ein automatisch befülltes und gesteuertes 6-Wege-Ventil oder eine Spritze, die das Probenvolumen aufzieht und anschließend in den Eluentenlauf injiziert.

Autosampler: Sechswwege-Ventil

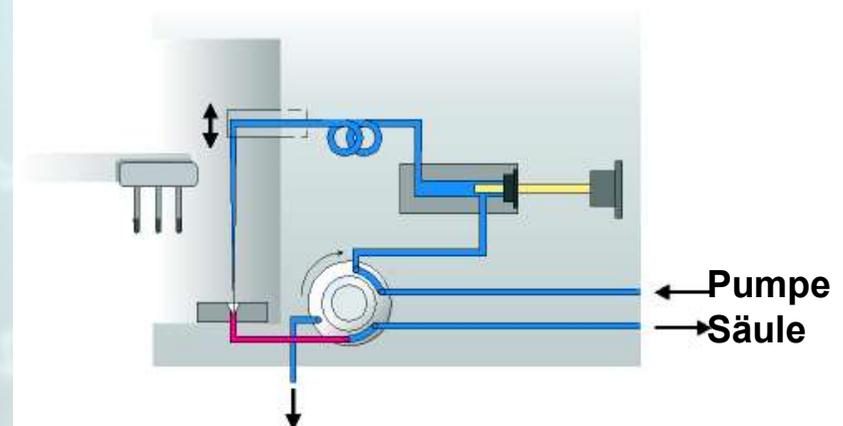
Normalbetrieb



Ladevorgang

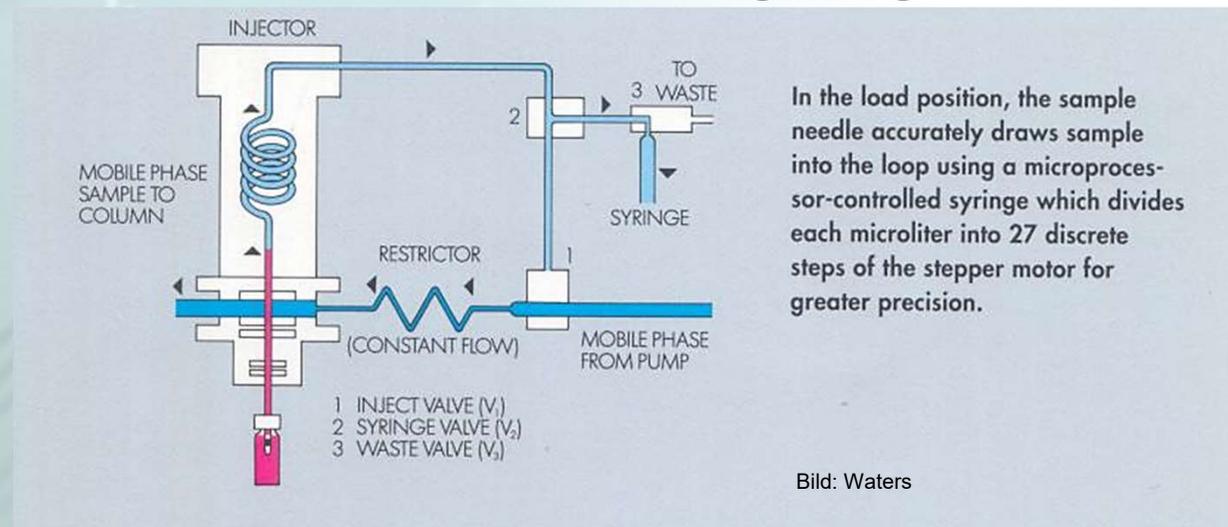


Injektionsvorgang



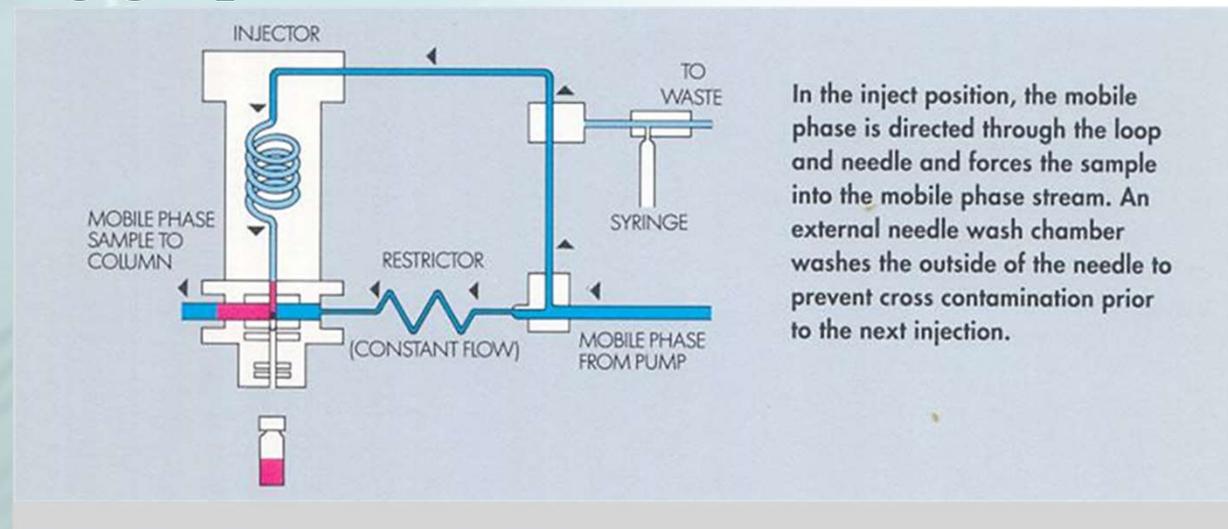
Autosampler: Injektionsnadel (1)

Ladeposition: Die Probennadel taucht in die Probe ein und zieht ein genau definiertes Probenvolumen in die mit Laufmittel gefüllte Dosierschleife. Dabei wird 1 μL in 27 Einzelschritten aufgezogen.



Autosampler: Injektionsnadel (2)

Das Laufmittel durchströmt die Dosierschleife und nimmt dabei die zuvor dosierte Probe mit. Zwischen zwei Injektionen wird die Nadel mit einer Waschlösung gespült.



Der Autosampler

Zu sehen gibt es nicht viel. Links hinter der Acrylglasverkleidung sitzt die Spritze, unten hinter der Klappe befindet sich ein Tray mit Platz für 48 oder 96 Proben. Das Gerät ist auch mit gekühltem Probenraum erhältlich.

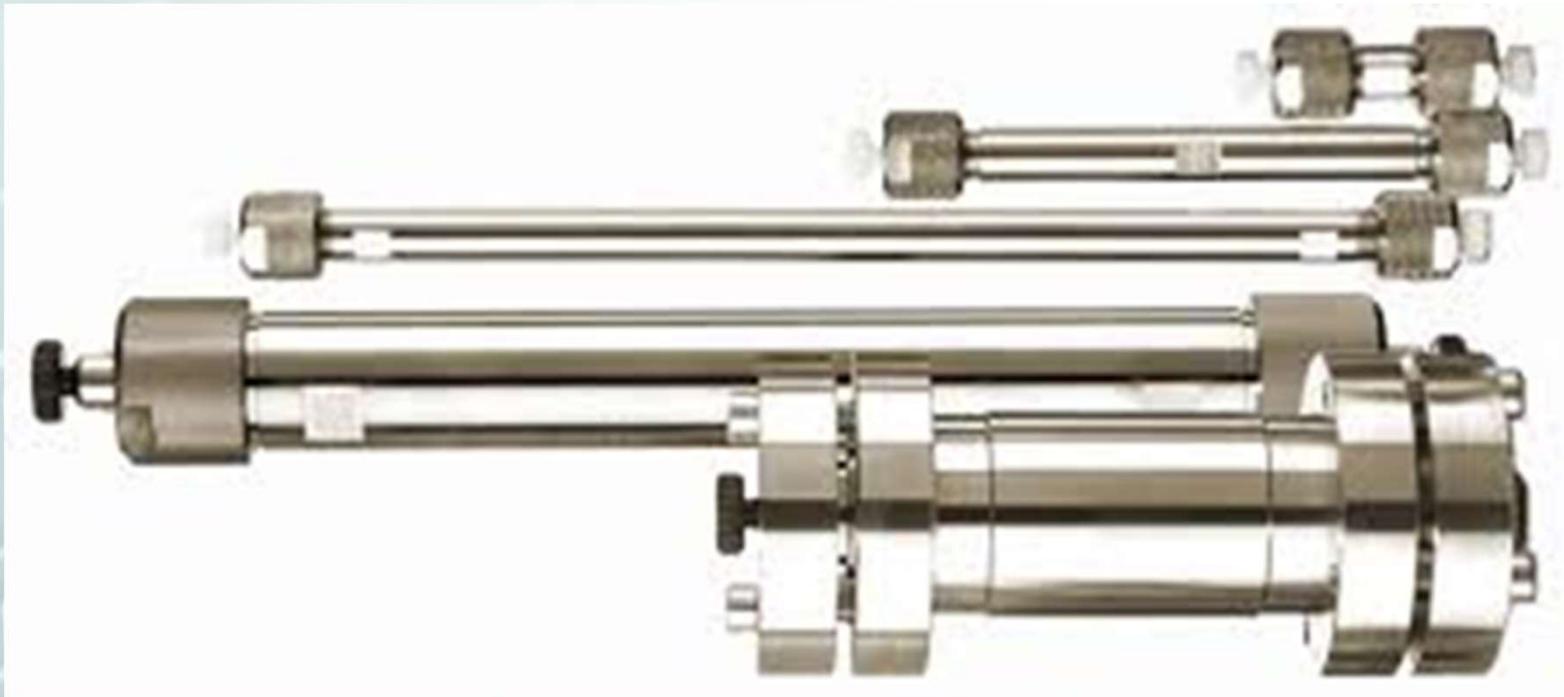


Bild: Waters



Analytische Chemie
Chromatographie und HPLC
Einige technische Details
Die Trennsäule
In und hinter der Säule
Der Trennprozess
Fittings und Kapillaren
Zum Schluss

Die Trennsäule (1)



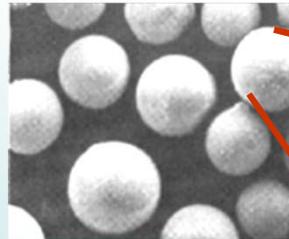
Die Trennsäule (2)

Üblicherweise wird als stationäre Phase keine Kreide verwendet, wie in unserem Beispiel; ein häufig anzutreffendes Material ist chemisch behandeltes Kieselgel.

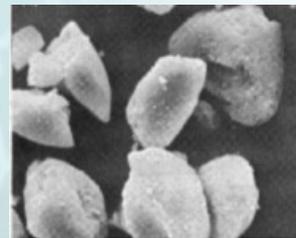
Das Kieselgel wird in eine Stahlkartusche gepackt, diese bildet dann das „Herzstück“ eines jeden HPLC-Systems: die Trennsäule.

Kieselgel als Packungsmaterial

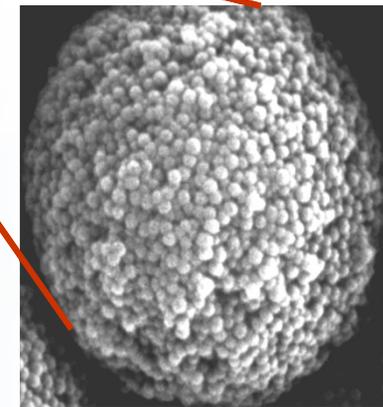
Die Kieselgel-Partikel der Säulenfüllung unterscheiden sich in ihrer Form (sphärisch, irregulär), in ihrer Größe (3 – 10 μm) und nach ihrer Porosität. Der Porendurchmesser beträgt nur etwa 1/1000 des Teilchendurchmessers.



Sphärisch

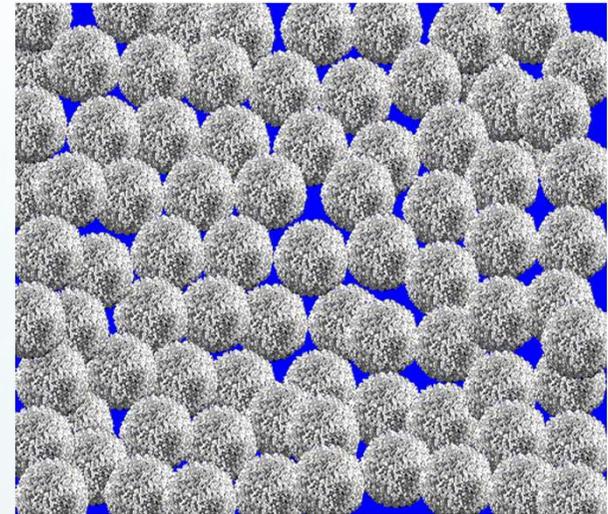
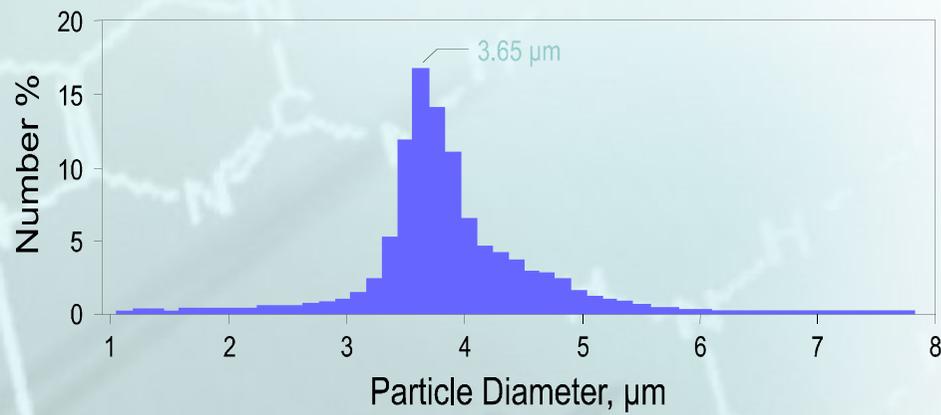


Irregulär



Silicagel

Packungsmaterial



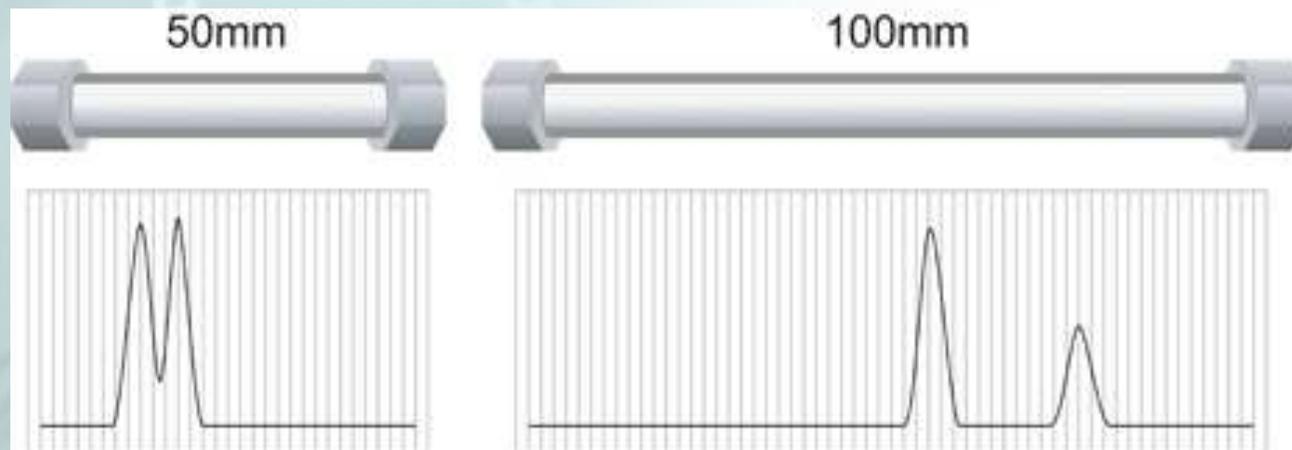
Quelle: Merck HPLC-Training

Säulenlänge und Partikelgröße

Die Trennleistung einer Säule wird durch ihre Länge und die Partikelgröße bestimmt. Analog zur Bodenzahl einer Rektifikationskolonne wird die Trennleistung durch die Kenngröße „theoretische Bodenzahl“ ausgedrückt.

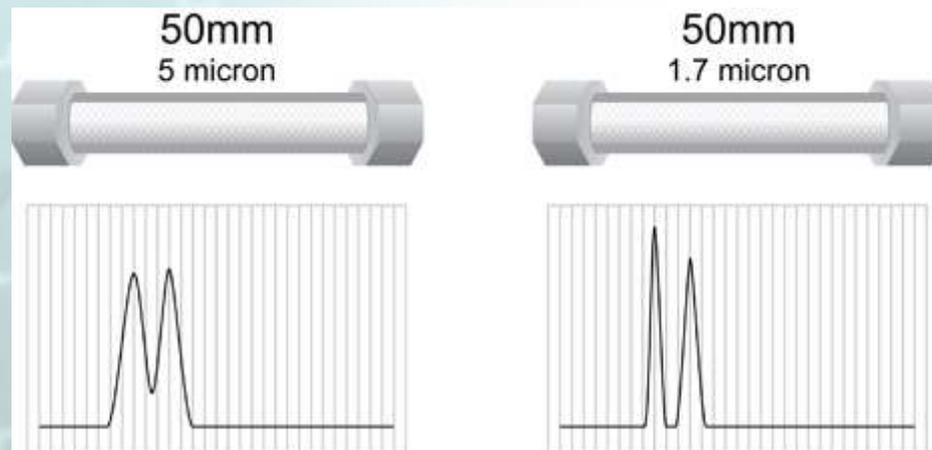
Länge der Säule

Bei gleicher Partikelgröße lässt sich die Trennung durch eine längere Säule verbessern. Man erkaufte dies jedoch mit längeren Analysezeiten und höheren Laufmittelverbrauch.



Partikelgröße

Unter ansonsten gleichen Bedingungen und gleicher Länge liefert eine Säule mit geringerer Partikelgröße eine bessere Auflösung. Dafür ist jedoch ein höherer Systemdruck in Kauf zu nehmen.



Angaben auf der Säule



Art.-Nr. xxxx **HPLC-Säule 250x3 mm**
Multospher 120 RP-18 HP-5
Ch. 70801
Säulen-Nr. 0103-01 **Flow ----->**
Muster-Chromatographie
Tel., Fax, mail

Säulendimensionen

Korngröße in μm

Modifizierung des Kieselgels

Porengröße (Ångström)

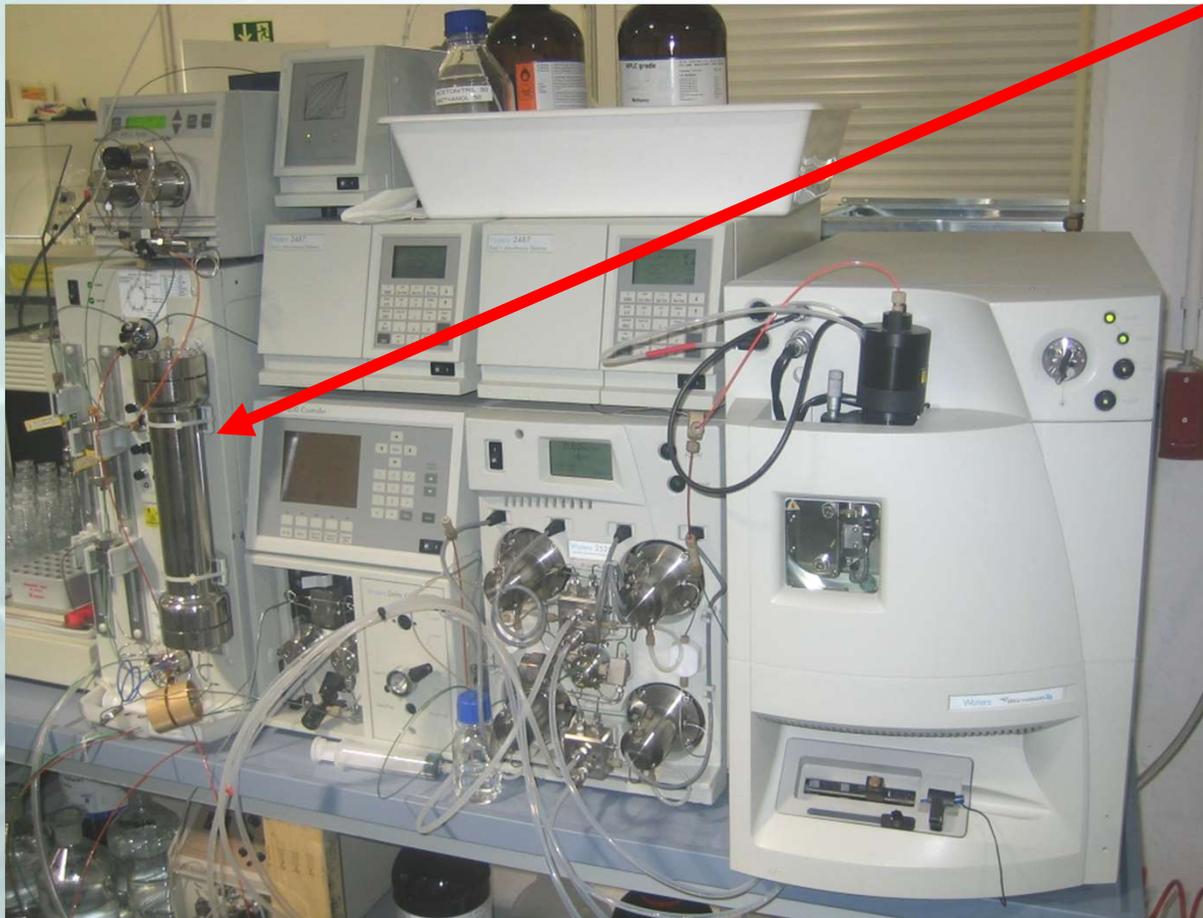
Handelsname des Kieselgels

Flussrichtung (nicht immer)

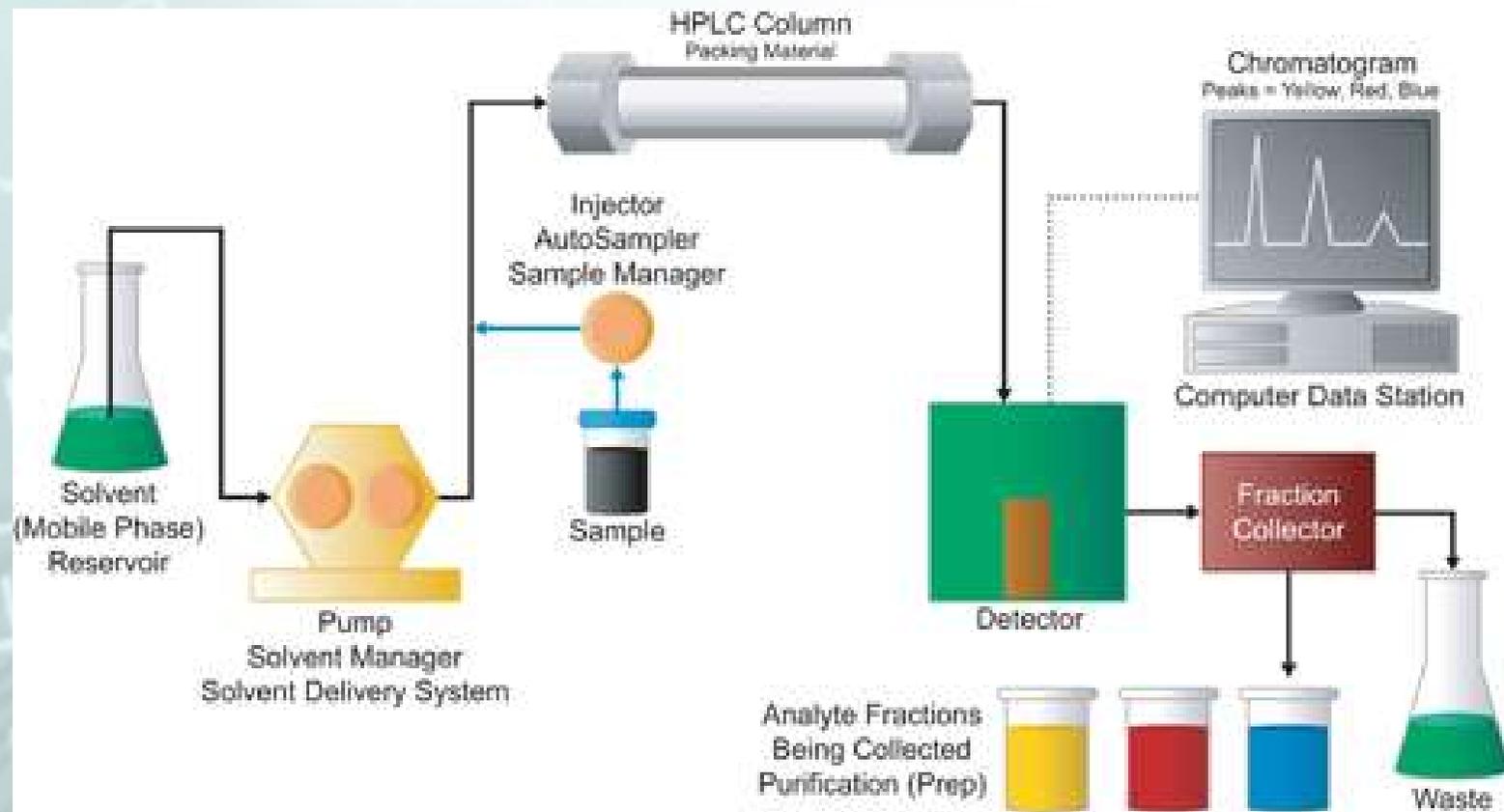
Equilibrierung

Vor Beginn der Analyse muss sich ein chemisch-physikalisches Gleichgewicht zwischen der stationären Phase (dem Säulenmaterial) und der mobilen Phase einstellen. Dazu lässt man reine mobile Phase einige Zeit durch die Säule strömen. Bei dieser *Equilibrierung* sollten ca. 5 bis 10 Säulenvolumina mobile Phase durch die Säule strömen.

Man beachte die HPLC-Säule!



Präparative HPLC



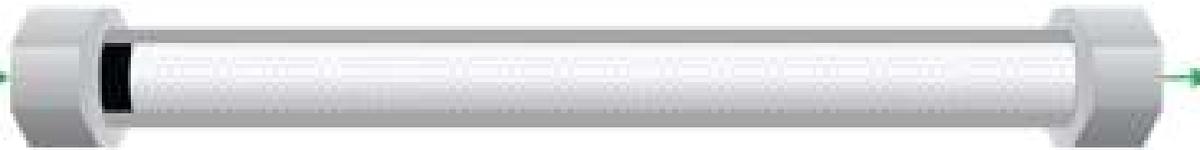


Analytische Chemie
Chromatographie und HPLC
Einige technische Details
Die Trennsäule
In und hinter der Säule
Der Trennprozess
Fittings und Kapillaren
Zum Schluss

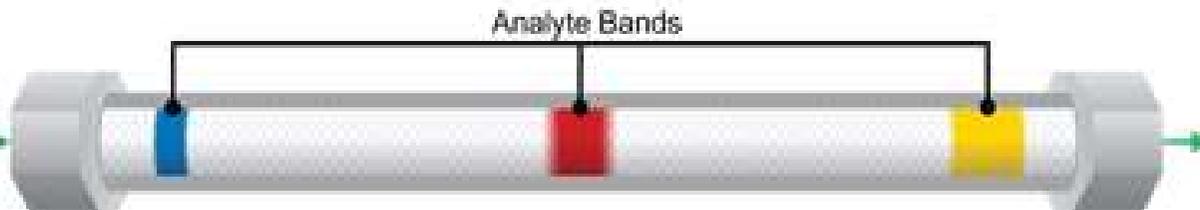
Auftrennung in der Säule

Injected Sample Band (Appears "Black") (Blue, Red, Yellow)

Time Zero
Mobile Phase



Time +10 Minutes
Mobile Phase

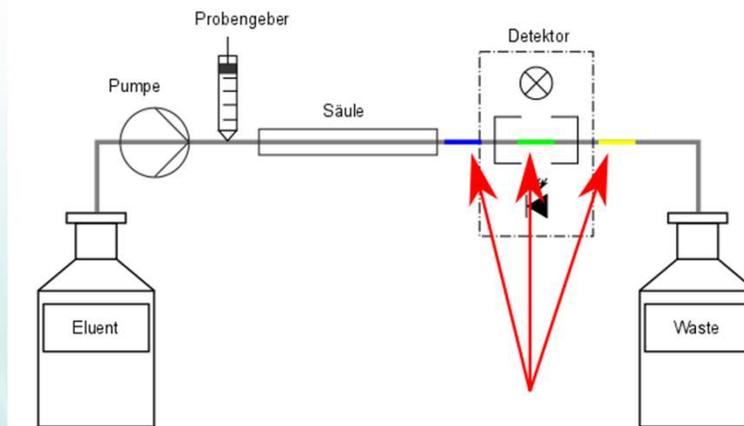


Was passiert hinter der Säule?

Im Kreideexperiment war nach der Trennung Schluss, die Komponenten blieben in der Säule bzw. der Kreide.

Wird aber kontinuierlich Laufmittel durch die Säule gepumpt, verlassen die Komponenten die Säule, sie werden *eluiert*.

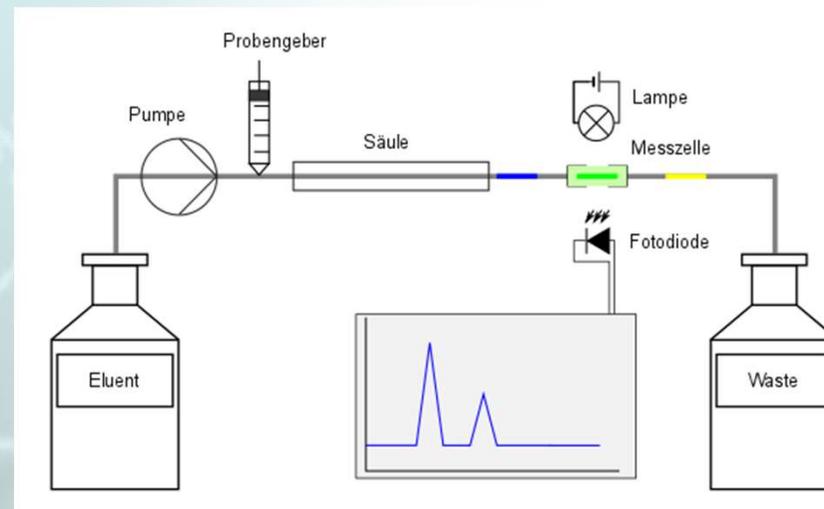
Die hinter der Säule erscheinende Substanz heißt *Eluat* und kann mit einem Detektor untersucht werden.



Ein einfacher Detektor

Ein einfacher Detektor besteht aus einer Lichtquelle und einer Photodiode. Das Laufmittel mit den aufgetrennten Probenbestandteilen durchströmt die Messzelle, eine mit Fenstern versehene kleine Kammer.

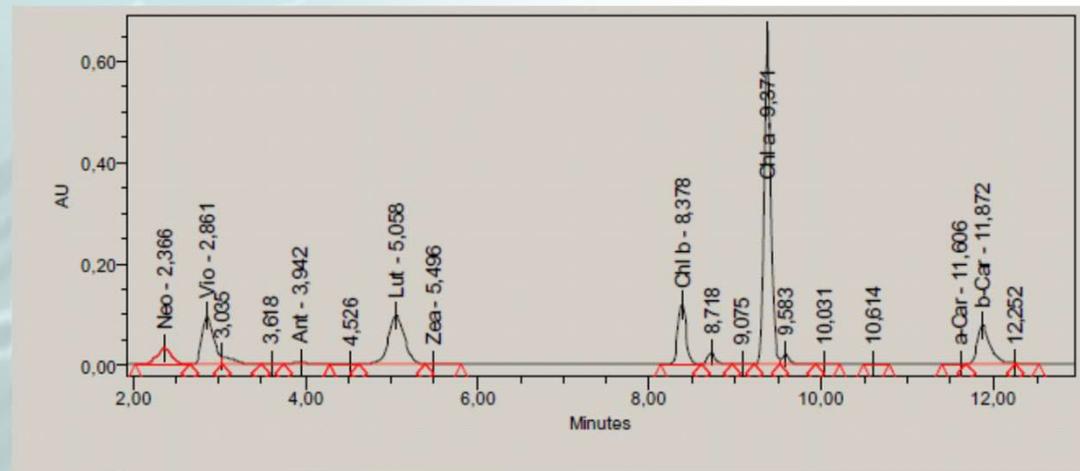
Läuft nur mobile Phase durch die Messzelle, wird das einfallende Licht etwas abgeschwächt. Läuft aber zusätzlich Eluat durch die Zelle, wird das Licht stärker abgeschwächt. Die Photodiode reagiert darauf, und die nachgeschaltete Elektronik erzeugt ein Signal.



Die Retentionszeit

Die verschiedenen Komponenten erscheinen in der Reihenfolge der Elution im *Chromatogramm*. Die Zeit vom Eintritt in die Säule bis zu ihrer Detektion heißt *Retentionszeit*.

Bei ausgearbeiteten chromatographischen Methoden, mit denen bekannte Substanzen untersucht werden, sind die Retentionszeiten der Komponenten bekannt. Sie werden also anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert.

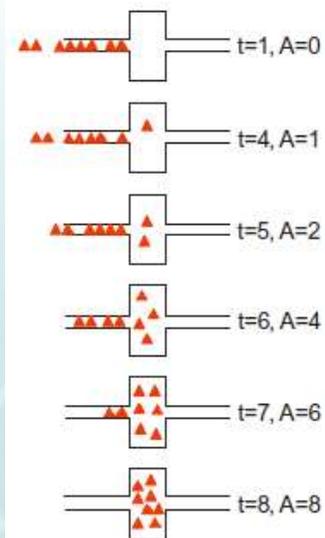


Der Peak

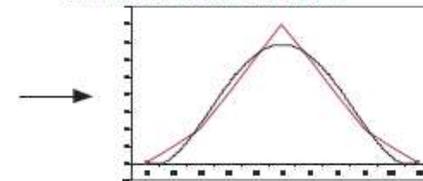
Die eluierte Komponente ist auf dem Weg von der Säule zum Detektor ein auseinandergezogener Pfropfen, dessen Konzentration in der Mitte am höchsten ist und zu den Enden hin abnimmt.

Läuft der Pfropfen in die Messzelle, so steigt die Absorption deshalb zunächst langsam an und erreicht bei der höchsten Konzentration ihren Maximalwert.

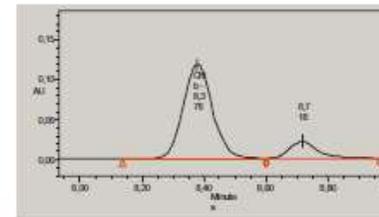
Außerdem hat die Konzentration der Probe Einfluss auf die Dauer des Verweilens in der Messzelle.



Mit gutem Willen läßt sich aus den Modellwerten ein annähernd realistischer Peak bilden...



...und so sehen zwei "richtige" Peaks aus:



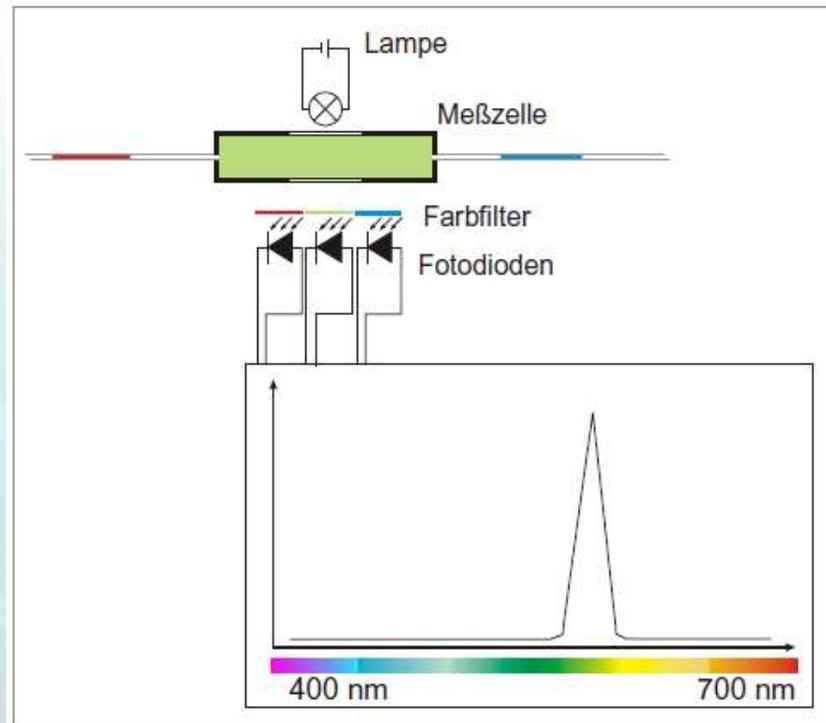
Die Fläche des Peaks ist proportional der Konzentration der eluierten Komponente.

Ein besserer Detektor

Wir verbessern den vorhin entworfenen Detektor nun so, dass er Farben "sehen" kann.

Statt einer Photodiode verwenden wir mehrere und setzen Farbfilter zwischen die Messzelle und die Dioden.

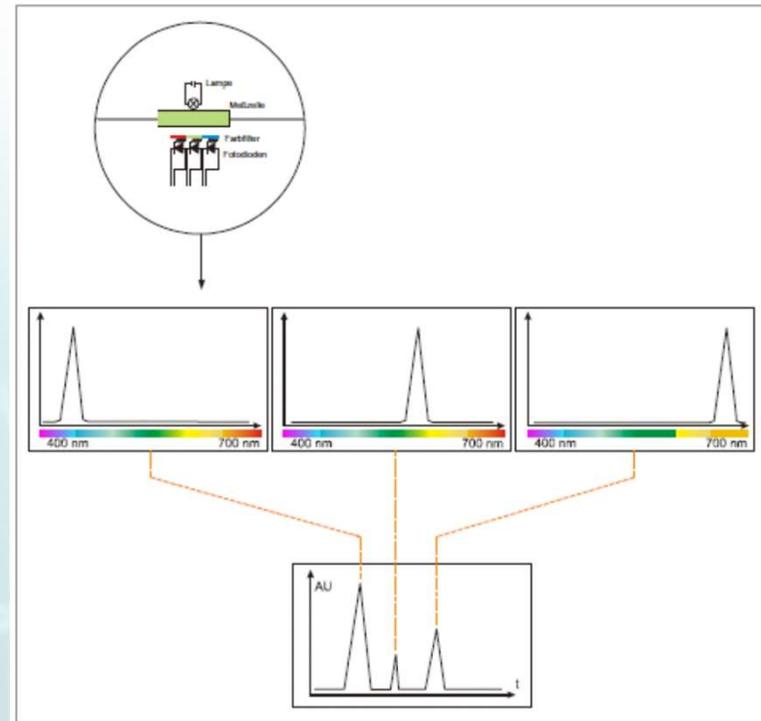
Läuft z. B. eine grüne Substanz durch die Messzelle, verlässt grünes Licht die Zelle. Das rote und das blaue Filter lassen dieses Licht nicht durch, es kommt also bei der entsprechenden Diode nichts an und es wird kein Signal erzeugt. Das grüne Filter lässt das Licht durch und die Photodiode spricht an.



Mehr Information über die Probe

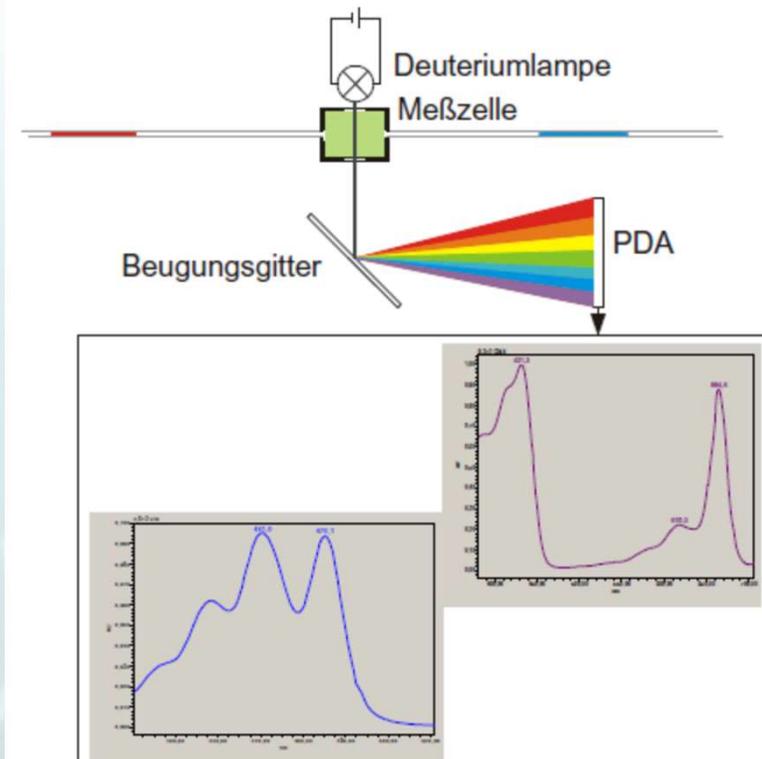
Mit den Daten, die der “farbensehende” Detektor liefert, stehen nun für jede eluierte Komponente zwei Informationen zur Verfügung, die eine Identifizierung ermöglichen:

- das Spektrum
- die Retentionszeit

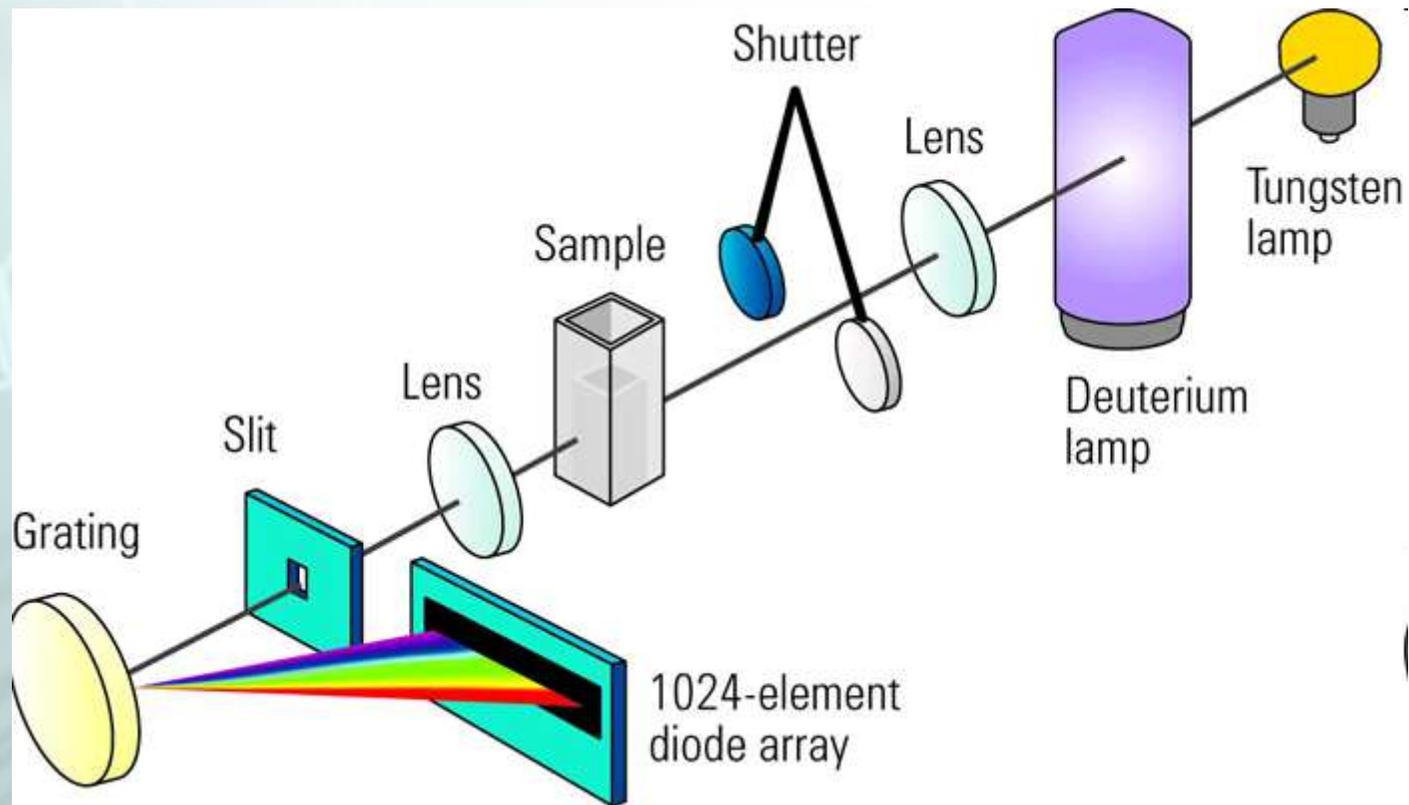


Photodiodenarraydetektor (PDA)

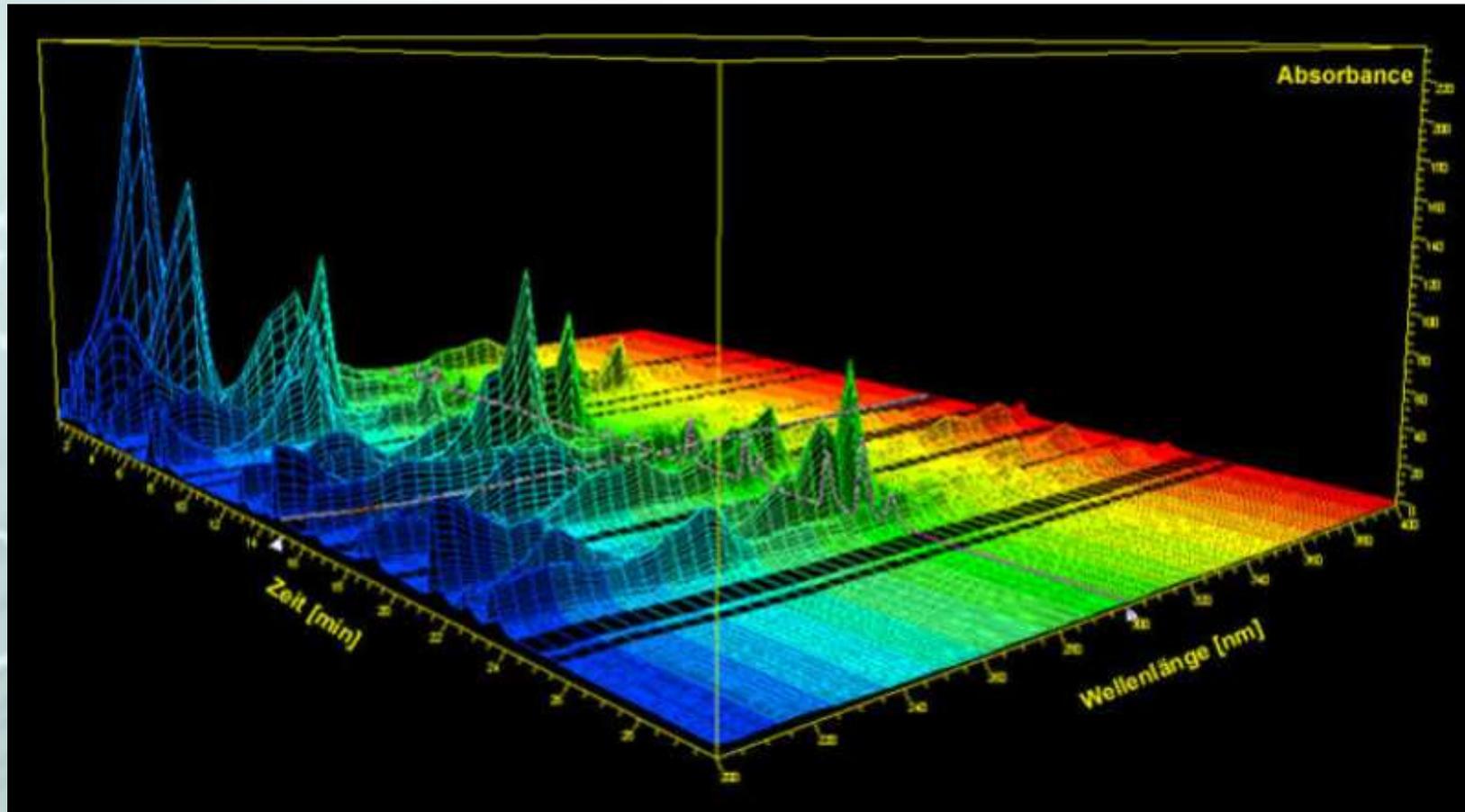
Ein Photodiodenarray kann z. B. 512 einzelne Dioden enthalten, so dass man ein von 190 nm (UV) bis 800 nm (nahes Infrarot) umfassendes Spektrum mit 1 nm Auflösung erhält. (Das heißt sozusagen, der Detektor kann 512 Farben erkennen; der von uns eben konstruierte Detektor konnte nur 3 Farben erkennen.) Statt der im „Selbstbaudetektor“ verwendeten Filter hat man hier ein *Beugungsgitter*, welches das aus der Messzelle austretende Licht in die Spektralfarben zerlegt.



Optik eines PDA-Detektors



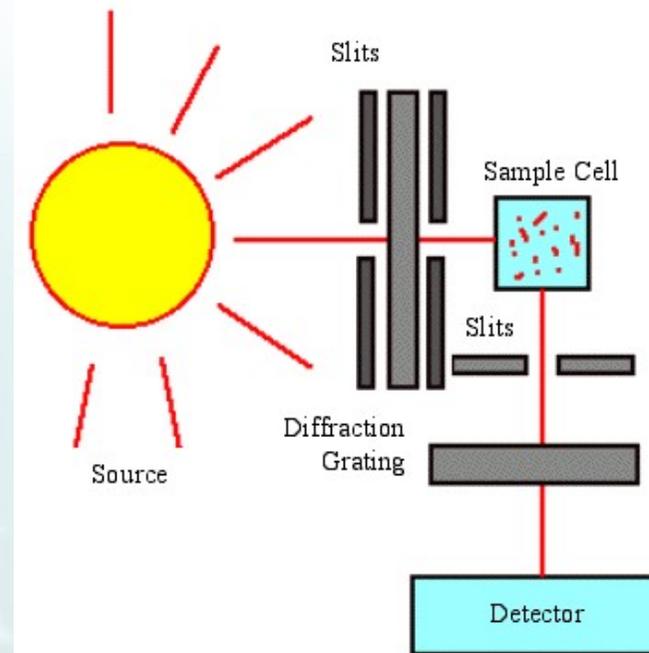
3D-Chromatogramm



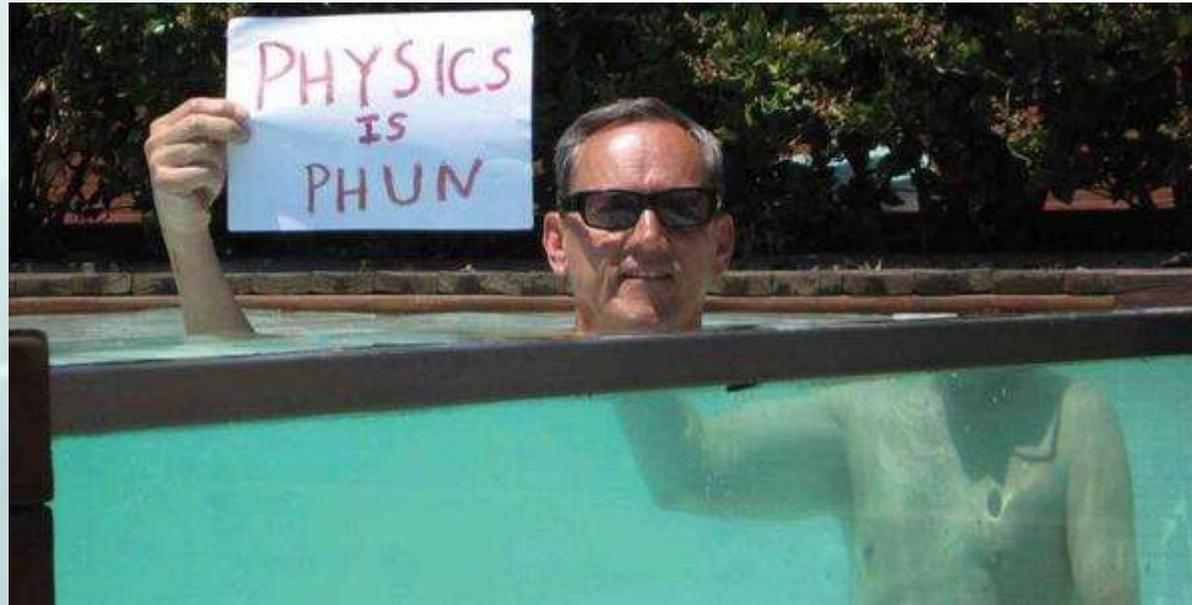
Fluoreszenz-Detektor

Für fluoreszierende Analyten, z. B. Tocopherole oder andere Antioxidantien, eignet sich ein Fluoreszenz-Detektor.

Eine Lichtquelle (meist eine Xenon-Blitzlampe) regt die Fluoreszenz des Analyten an, das Fluoreszenzlicht wird detektiert und seine Intensität gemessen.

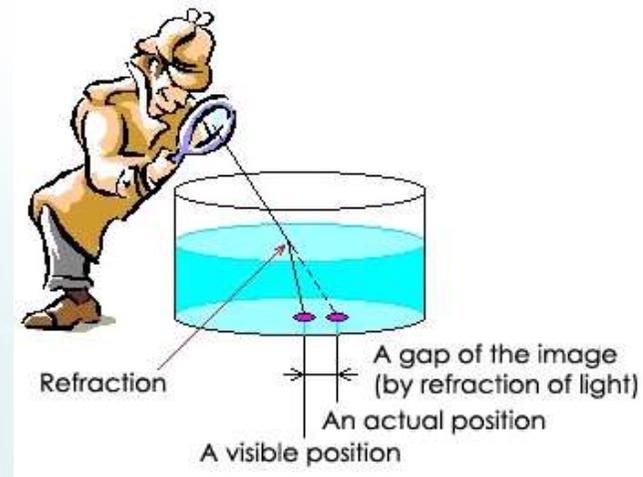


Brechung



Brechungsindex-Detektor

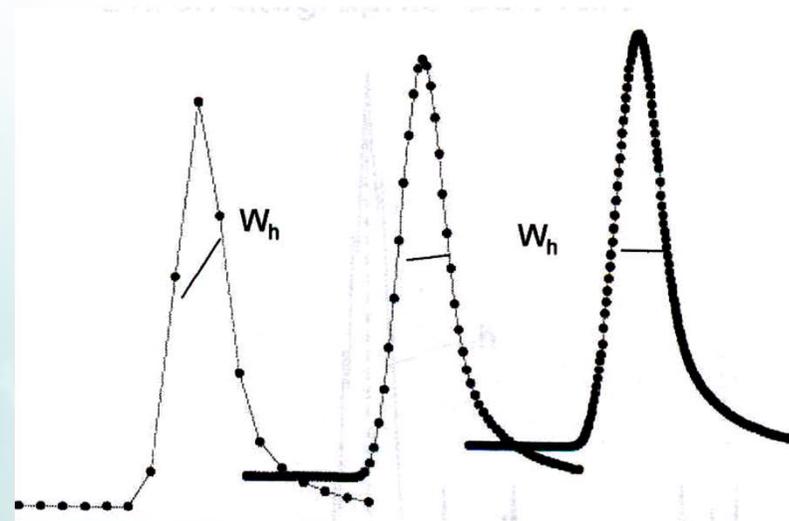
Bei einigen Substanzen, wie z. B. bei Sacchariden, ändert sich der Brechungsindex des Eluats beim Durchlaufen der Messzelle, wodurch ein einfallender Lichtstrahl abgelenkt wird. Die Folge ist eine messbare Abschwächung des an der Photozelle ankommenden Lichts.



A/D-Wandler

Das kontinuierliche, analoge Spannungssignal des Detektors wird vom A/D-Wandler in digitale Daten umgewandelt.

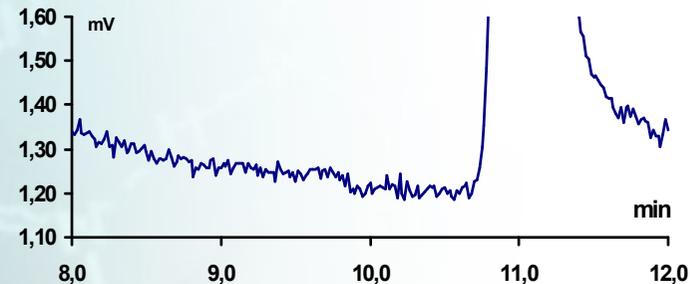
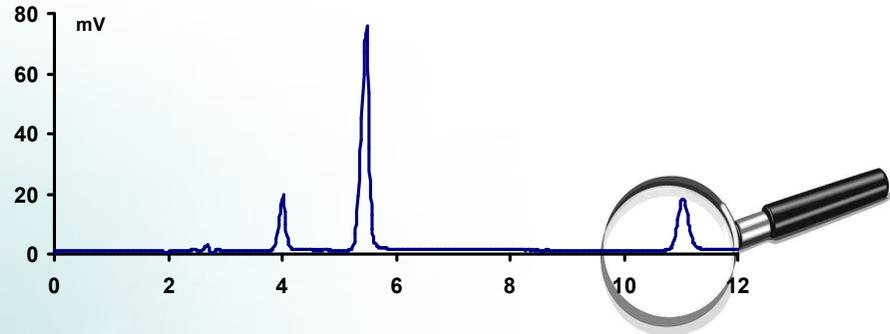
Die einstellbare Abtastfrequenz bestimmt die Auflösung.



Peakerkennung

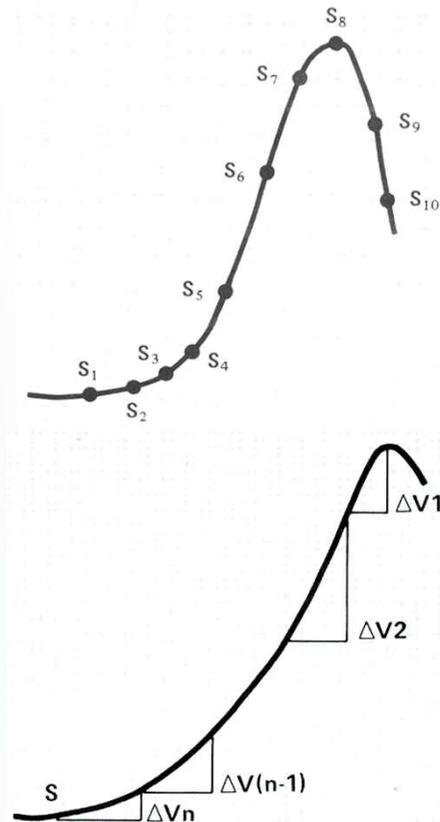
Die *Sensitivität* des *Detektors* gibt die *Minimalkriterien* zur *Erkennung* eines *Peaks* an:

- Das *Verhältnis* des *Signals* zum *Rauschen* (*S/N ratio*)
- Die *Mindestfläche* des *Peaks*

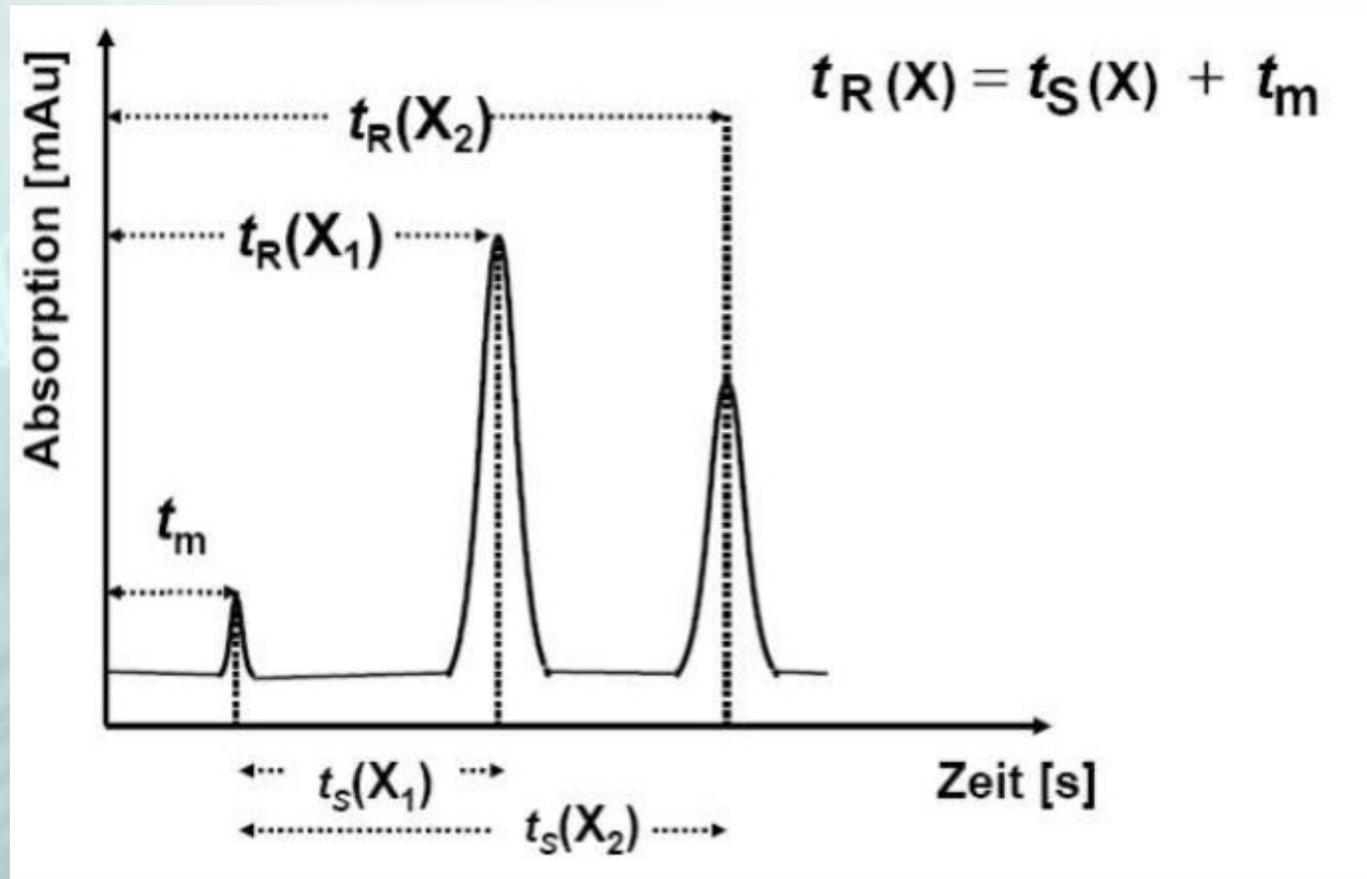


Peakerkennung

- Erkennen der Peakspitze:
Aufeinanderfolgende Messwerte werden miteinander verglichen: sobald ein Messwert $S_{(n+1)}$ kleiner als S_n ist, wird S_n als Peakspitze angenommen.
- Erkennen eines Peaks:
Der Anstieg des Signals ($\Delta V/\Delta t$) wird bei aufeinanderfolgenden Messwerten verglichen. Beim Überschreiten eines bestimmten Werts wird der Peak erkannt und hier die Basislinie gelegt.



Kenngößen eines Chromatogramms



UHPLC (1)

Mit dem Ziel höherer Probendurchsätze wurde im letzten Jahrzehnt die *UHPLC* entwickelt (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*). Je nach Hersteller gibt es unterschiedliche Bezeichnungen, z. B. RRLC (Rapid Resolution LC) oder RSLC (Rapid Separation LC, UFLC: Ultra Fast LC).

Als erste hat die Firma Waters diese Technik 2004 unter der Bezeichnung UPLC auf den Markt gebracht.

UHPLC (2)

Bei der UPLC hat das Packungsmaterial Partikelgrößen von weniger als 2 μm . Damit verbunden ist ein gegenüber der „klassischen“ HPLC deutlich höherer Arbeitsdruck, dem auch die anderen Bestandteile des Systems gewachsen sein müssen. Auch sind teilweise konstruktive Änderungen vorgenommen worden, so müssen die Arbeitszyklen der Autosampler kürzer werden und Gradientenmischer an höhere Flussraten angepasst werden.



Analytische Chemie
Chromatographie und HPLC
Einige technische Details
Die Trennsäule
In und hinter der Säule
Der Trennprozess
Fittings und Kapillaren
Zum Schluss

Wechselwirkungen

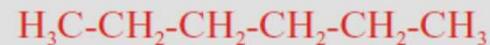
Die chromatographische Trennung der im Eluenten gelösten Komponenten hängt davon ab, wie stark sie mit der stationären Phase wechselwirken. In der GPC z. B. beruht die Trennung auf Unterschieden der Molekülgröße, in der Ionenaustauschchromatographie auf den Ladungen (z. B. von Proteinen); sehr häufig ist die Trennung der Komponenten nach ihrer Polarität.

Polare und unpolare Verbindungen

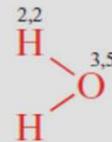
Bestehen Moleküle aus Atomen mit verschiedenen starken Elektronegativitäten, werden die Moleküle *polarisiert*.

Je stärker der Unterschied zwischen den Elektronegativitäten der beteiligten Atome ist, desto stärker polar ist die Verbindung.

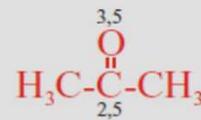
^{2,2} ^{2,5}
H-C Eine sehr schwach polare Bindung



n-Hexan ist praktisch unpolar



Wasser ist polar



Aceton

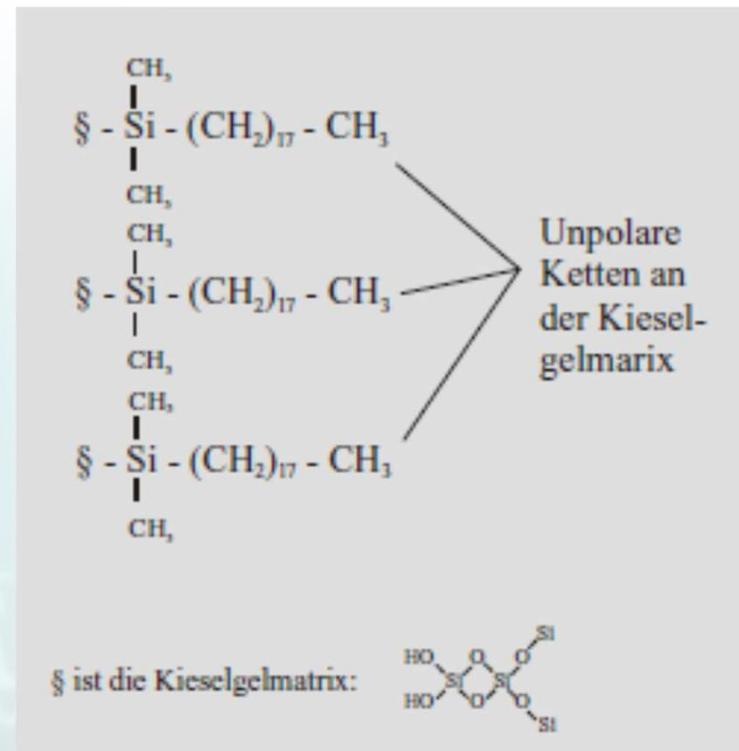


Acetonitril

Stationäre Phasen

Bei der Umkehrphasen- oder *Reversed-Phase-HPLC* ist das Laufmittel polarer als die stationäre Phase.

Kreide (CaCO_3 , Calciumcarbonat) ist polar, Kieselgel mit angehängten Octadecylketten ist dieser Ketten unpolar.



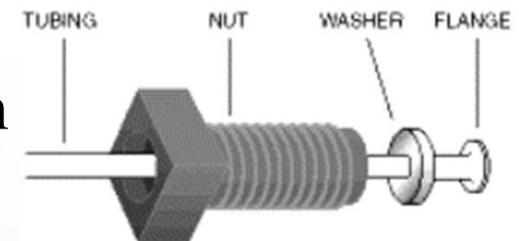


Analytische Chemie
Chromatographie und HPLC
Einige technische Details
Die Trennsäule
In und hinter der Säule
Der Trennprozess
Fittings und Kapillaren
Zum Schluss

Schläuche, Fittings, Kapillaren

Niederdruckbereich

- Schläuche und Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 1/8" (3,175 mm)
- Innendurchmesser von über 0,2 mm
- Die Dichtung erfolgt über die geflanschte („aufgespreizte“) Kapillare oder einen Dichtkegel (Ferrule), der beim Schrauben auf die Kapillare gepresst wird.



Geflanschte Kapillare mit Schraube



„Flangeless Fitting“:
Kapillare mit Dichtkegel

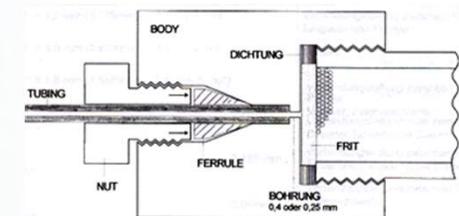
Schläuche, Fittings, Kapillaren

Hochdruckbereich

- Schläuche und Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 1/16" (1,588 mm)
- Innendurchmesser:
 - Zwischen Pumpe und Injektor: 0,5 mm
 - Zwischen Probengeber und Detektor: 0,25 mm.
- Die Dichtung erfolgt über ein Ferrule, der beim Aufschrauben auf die Kapillare gepresst wird.
- Materialien: hauptsächlich Edelstahl und druckstabile Kunststoffe (PEEK, PTFE)

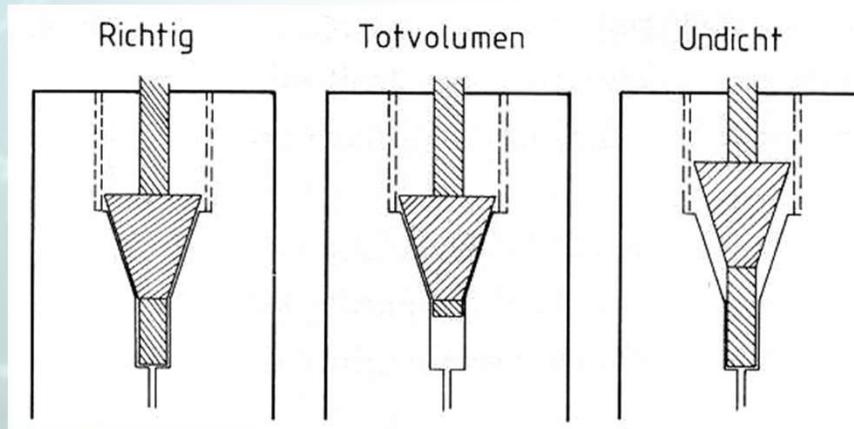
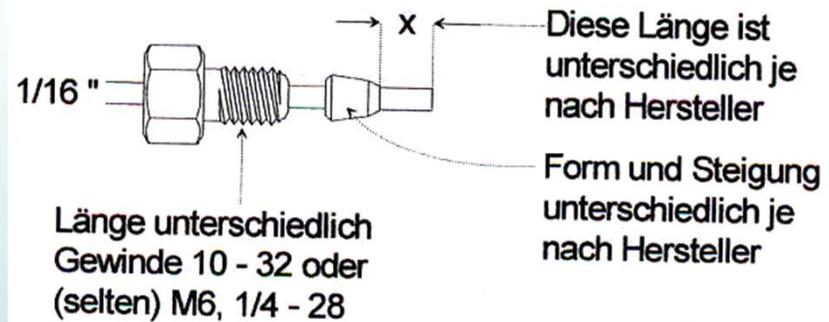


„Fingertight Fitting“

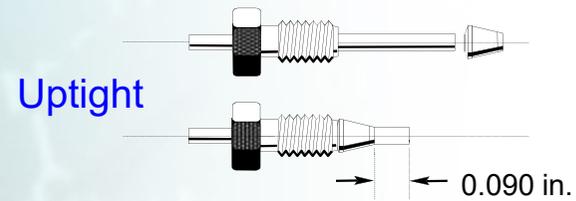
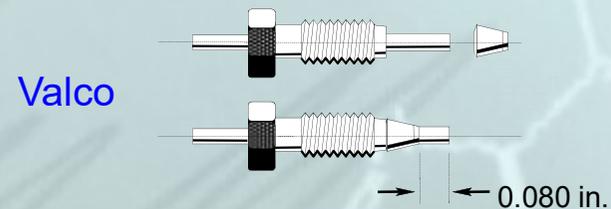
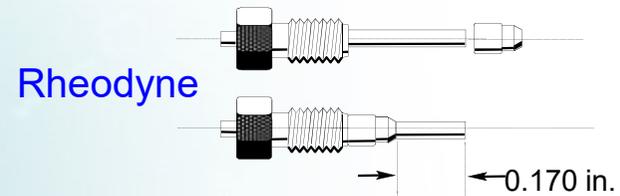
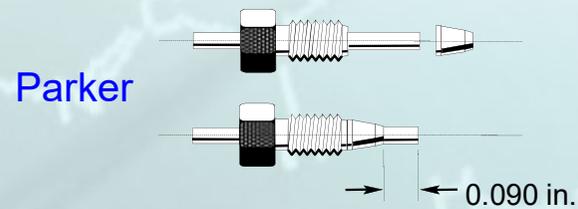
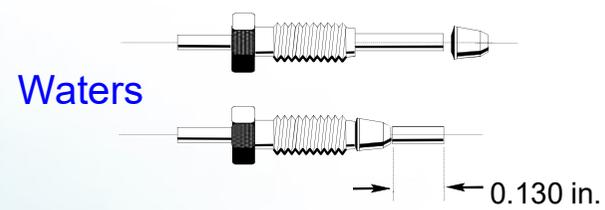
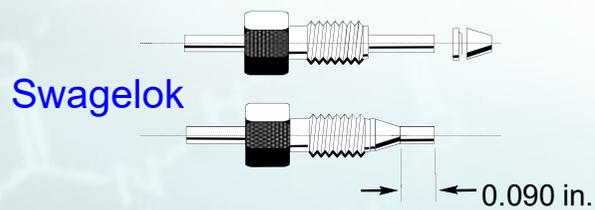


Schläuche, Fittings, Kapillaren

Hochdruckbereich

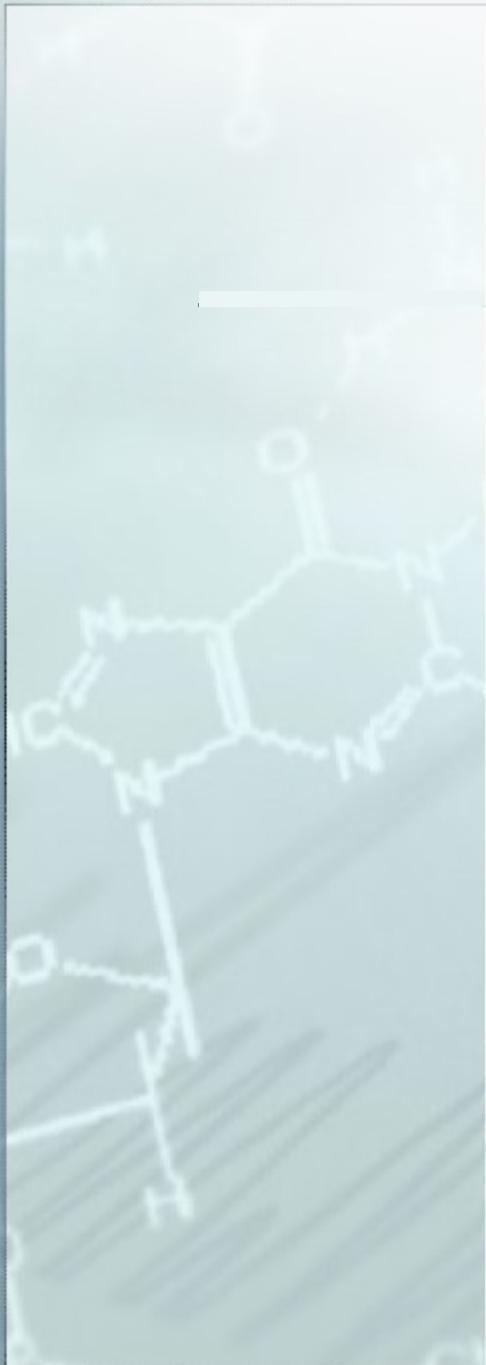
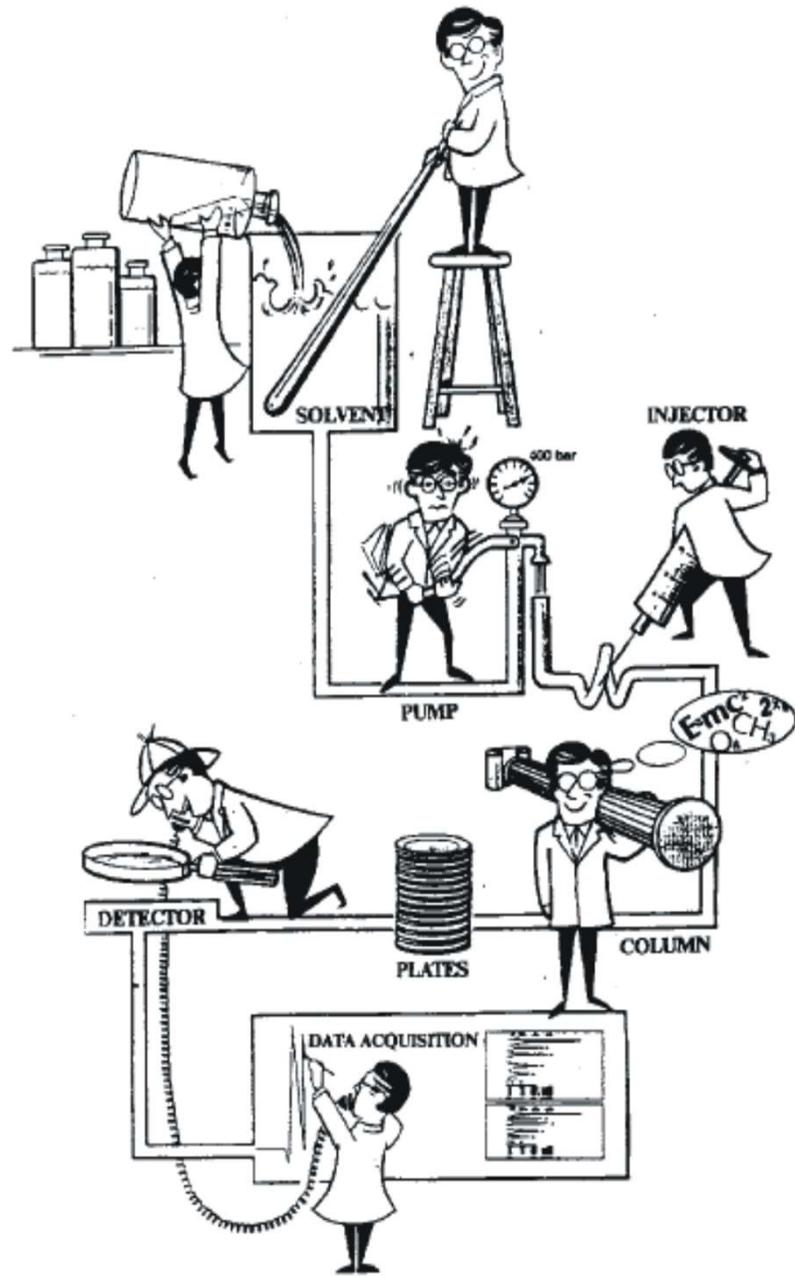


Chaos im Hochdruckbereich





Analytische Chemie
Chromatographie und HPLC
Einige technische Details
Die Trennsäule
In und hinter der Säule
Der Trennprozess
Fittings und Kapillaren
Zum Schluss

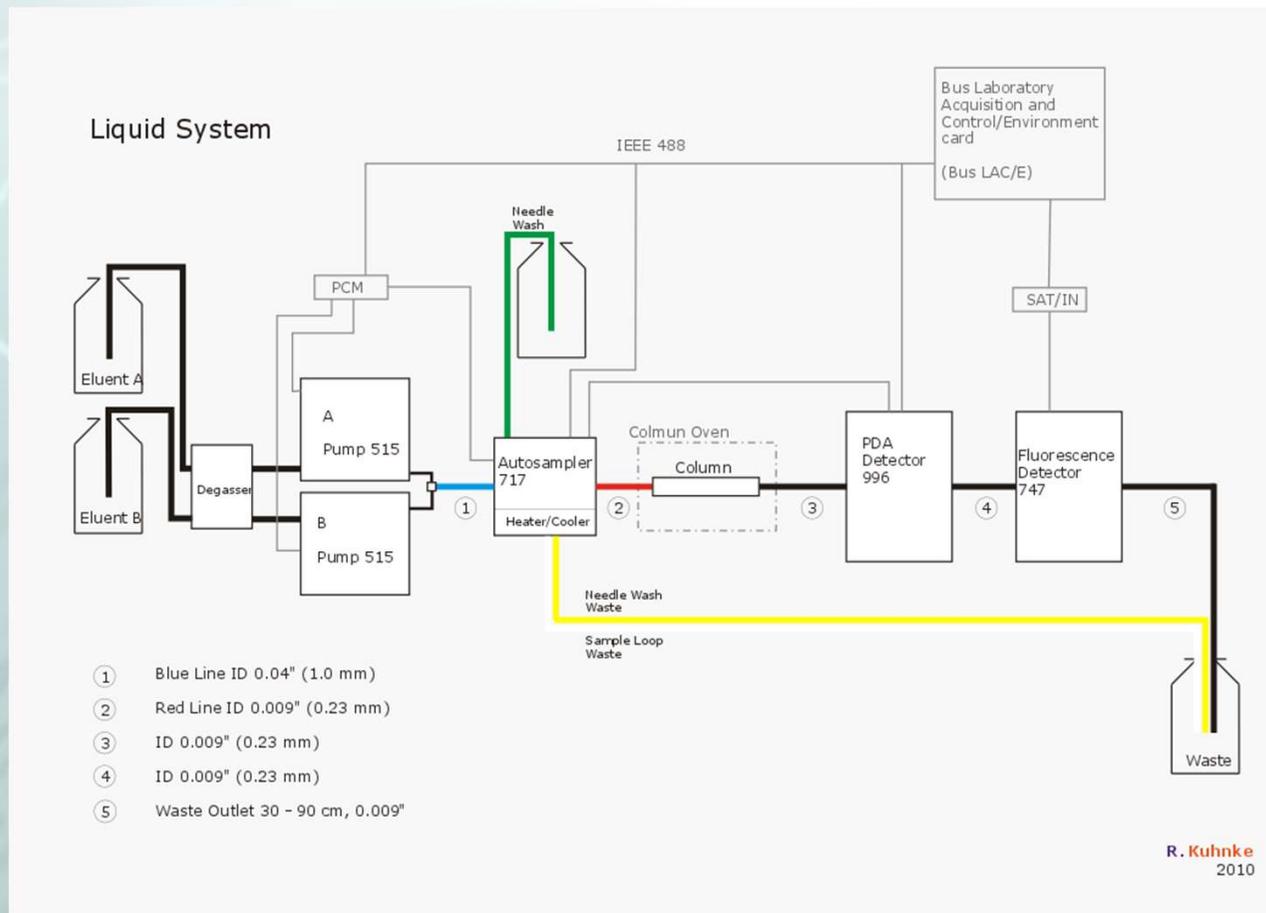


Systemplan

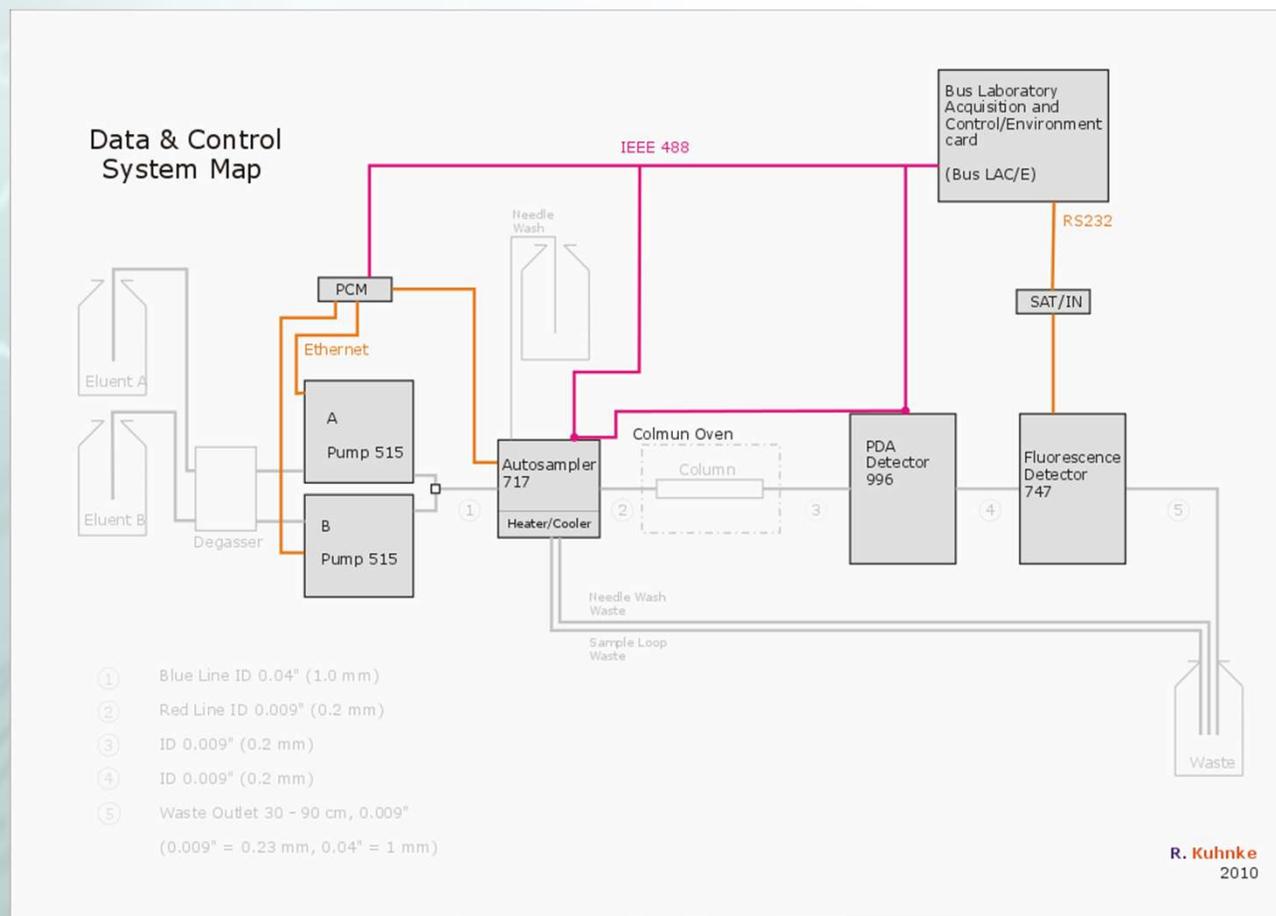
Zum optimalen Betrieb eines analytischen Systems gehört dessen eingehende Kenntnis. Dazu gehören

- Eine Übersicht über den Lauf der Flüssigkeiten, die Druckverhältnisse und kritische Punkte
- Eine Übersicht über die elektronischen Komponenten, deren Steuerung und den Datenfluss

Systemplan Flüssigkeiten (Beispiel)



Systemplan Daten (Beispiel)



Vor der Analyse: Systemcheck

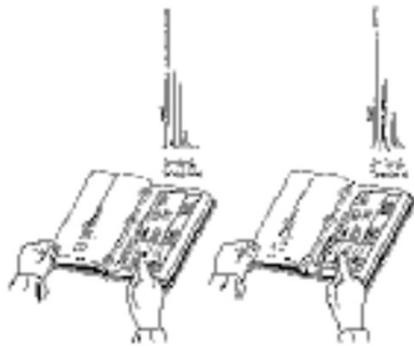
Vorbereitung der Anlage

- HPLC-Anlage ist mit Eluenten gespült
- Säule ist mit dem Eluentengemisch equilibriert
- Detektor zeigt ein stabiles Signal
- Keine Lecks sichtbar

Probenvorbereitung

- Probe ist zur Injektion vorbereitet
- Klare Lösung, ggf. filtriert
- Kompatibel mit dem Eluenten

Testen Sie die Anlage regelmäßig mit bekannten Substanzen und notieren Sie wichtige Daten. Sie haben damit im Problemfall immer eine Referenz zur Verfügung.



Auch wenn keine akuten Probleme auftreten, sollten Sie die Leistung des Systems regelmäßig mit den Normalwerten vergleichen.



Läuft die Anlage nicht einwandfrei, notieren Sie alle Symptome im Anlagenlogbuch und gehen Sie anhand bekannter Daten bei der Fehlersuche systematisch vor.

