

Vorlesung **529-1041-00 G**

# Analytische Chemie

(für Biol. / Pharm. Wiss.)

Teil „Chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren“

Dr. Thomas Schmid

HCI D323

Tel.: 044 - 632 61 12

[schmid@org.chem.ethz.ch](mailto:schmid@org.chem.ethz.ch)

<http://www.analytik.ethz.ch/>

Überarbeitete Version des 2009 neu gestalteten Skripts, das in Teilen auf früheren Skripten von Xiangyang Zhang, Markus Kalberer und Martin Badertscher aufbaut.

Zürich, September 2011



## Literatur

Zur Vertiefung dieser Vorlesung sei das folgende Lehrbuch empfohlen:

K. Cammann,  
Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2001

Aber auch andere allgemeine Lehrbücher der Analytischen Chemie, wie z.B.:

G. Schwedt,  
Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis  
Verlag Wiley-VCH, Weinheim, 2008 (2. Auflage)

R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, H. M. Widmer,  
Analytical Chemistry,  
Verlag Wiley-VCH, Weinheim, 1998

Sehr detaillierte Einblicke in instrumentelle Aufbauten und  
Chromatographietechniken liefern:

D. A. Skoog, J. J. Leary,  
Instrumentelle Analytik, Grundlagen, Geräte, Anwendungen,  
Springer, Berlin, 1996

K. Robards, P. R. Haddad, P. E. Jackson,  
Principles and practice of modern chromatographic methods,  
Academic Press, London, 1994

... und viele mehr ...

Zum Nachschlagen einzelner Begriffe empfehlen sich auch Lehrinhalte aus dem Internet, wie die Chemgapedia, wo Professoren und Dozenten verschiedene Sachverhalte kurz und verständlich erklären: <http://www.chemgapedia.de>



# Inhaltsverzeichnis

erstellt von Biologie-Studentin Jenny Spaak

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Analytische Chemie .....	1
1.2 Der analytische Prozess .....	2
<b>2. Grundlagen</b> .....	<b>7</b>
2.1 Chromatographie verstehen .....	7
2.1.1 Schritt 1: Ein kleines Experiment.....	7
2.1.2 Schritt 2: Historisches .....	8
2.1.3 Schritt 3: Ein Gedankenexperiment .....	9
2.1.4 Schritt 4: Von der Extraktion zur Chromatographie .....	10
2.2 Grundlagen der Chromatographie .....	15
2.2.1 Einteilung chromatographischer Techniken.....	18
2.2.2 Grundlegende Formeln.....	20
2.2.3 Das Chromatogramm und daraus abgeleitete Grössen .....	21
2.2.4 Die ideale Peakform und daraus abgeleitete Grössen .....	24
2.2.5 Abweichungen von der idealen Peakform .....	25
2.2.6 Effizienz einer chromatographischen Trennung .....	33
2.2.7 Einfluss kinetischer Grössen auf die Bodenhöhe: Die <b>van-Deemter-Gleichung</b> .....	35
2.2.8 Auflösung einer chromatographischen Trennung .....	40
2.3 Quantifizierung in der Chromatographie.....	45
2.3.1 Ein kleiner Ausflug in die Statistik .....	46
2.3.2 Kalibrierung .....	49
- Kalibrierung mit externem Standard	
- Kalibrierung mit internem Standard	
- Standardaddition	

<b>3. Flüssigchromatographie (LC)</b> .....	<b>57</b>
3.1 Trennprinzipien .....	57
3.1.1 Adsorptionschromatographie .....	57
3.1.2 Verteilungschromatographie .....	58
3.1.3 Grössenausschlusschromatographie .....	58
3.1.4 Ionenchromatographie .....	58
3.1.5 Affinitätschromatographie .....	58
3.1.6 Kompleksierungschromatographie .....	58
3.1.7 Chirale Chromatographie .....	59
3.2 Die van-Deemter-Gleichung in der LC.....	59
3.3 HPLC: Aufbau und Funktionsweise .....	60
3.3.1 Elutrope Reihe .....	61
3.3.2 Elutionsreihenfolge .....	63
3.3.3 Aufbau einer HPLC-Anlage .....	64
3.3.4 Stationäre Phasen .....	66
- Normalphasen (NP)	
- Umkehrphasen (RP)	
3.3.5 Mobile Phasen .....	68
- Normalphasenflüssigchromatographie (NPLC)	
- Umkehrphasenflüssigchromatographie (RPLC)	
- Gradientenelution	
3.4 Detektoren in der HPLC.....	69
3.4.1 UV/VIS-Detektor .....	69
3.4.2 Brechungsindexdetektor (RID) .....	72
3.4.3 Verdampfungs-Lichtstreuendetektor (ELSD).....	72
3.4.4 Fluoreszenzdetektor .....	73
3.4.5 Leitfähigkeitsdetektor.....	75
3.4.6 Elektrochemische Detektoren .....	75
3.4.7 Massenspektrometer als HPLC-Detektoren .....	75
3.4.8 Weitere Detektoren .....	77
3.4.9 Derivatisierung .....	78
3.5 Weitere Varianten der LC .....	79
3.5.1 Ionenchromatographie.....	79
3.5.2 Dünnschichtchromatographie (TLC) .....	84
3.5.3 Grössenausschlusschromatographie (SEC).....	89
3.5.4 Affinitätschromatographie .....	92

<b>4. Gaschromatographie (GC) .....</b>	<b>93</b>
4.1 Aufbau und Funktionsweise eines Gaschromatographen .....	94
4.1.1 Aufbau .....	94
4.1.2 Stationäre Phase .....	95
- Gepackte Säulen	
- Kapillarsäulen	
4.1.3 Mobile Phase .....	97
4.1.4 Injektor .....	99
4.1.5 Detektoren .....	101
4.2 Optimierung von GC-Trennungen .....	101
4.2.1 Einfluss der stationären Phase .....	101
4.2.2 Einfluss der Säulenlänge .....	103
4.2.3 Einfluss des Säuleninnendurchmessers .....	104
4.2.4 Einfluss der Filmdicke der stationären Phase .....	105
4.2.5 Einfluss der Säulentemperatur .....	105
- Gradientenelution (Temperaturprogramme)	
4.2.6 Einfluss von Probenmenge und Splitverhältnis .....	106
4.3 Detektoren in der GC .....	108
4.3.1 Der Flammenionisationsdetektor (FID) .....	109
4.3.2 Der Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD bzw. TCD) .....	110
4.3.3 Der Elektroneneinfangdetektor (ECD) .....	111
4.3.4 Der Flammenphotometrische Detektor (FPD) .....	112
4.3.5 Der Atomemissionsdetektor (AED) .....	113
4.3.6 Massenselektive Detektion .....	115

<b>5. Elektrophorese .....</b>	<b>117</b>
5.1 Gel-Elektrophorese .....	118
5.1.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	119
5.1.2 SDS-PAGE .....	120
5.2 Kapillarelektrophorese (CE) .....	121
5.2.1 Theoretische Grundlagen der CE .....	122
5.2.2 Kapillaronenelektrophorese (CZE) .....	124
5.2.3 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) .....	125
<b>6. Probenvorbereitung .....</b>	<b>127</b>
6.1 Analyten in Lösung bringen .....	129
6.1.1 Soxhlet-Extraktion .....	129
6.2 Abtrennen fester Störsubstanzen .....	130
6.3 Abtrennen gelöster Störsubstanzen (Extraktion) .....	131
6.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) .....	131
6.3.2 Festphasenextraktion (SPE) .....	132
6.3.3 Affinitätschromatographie .....	133
6.3.4 Festphasen-Mikroextraktion (SPME) .....	134
6.4 Aufreinigen der Extrakte (clean up) .....	134
6.5 Einstellen einer geeigneten Analytkonzentration in einem geeigneten Lösungsmittel .....	135
6.5.1 Der Rotationsverdampfer .....	135
6.5.2 Einengen der Analytlösung im N <sub>2</sub> -Strom .....	135

# Kapitel 1: Einleitung

## 1.1 Analytische Chemie

Die Analytische Chemie befasst sich mit der Untersuchung verschiedenster Proben auf ihre chemische Zusammensetzung. Hierbei werden die Stoffe, die in der Probe nachgewiesen und analysiert werden sollen, als „Analyten“ bezeichnet. Analyten können sowohl Atome bzw. Ionen (Elementanalytik) als auch Moleküle sein (Molekülanalytik).

Wichtig sind hierbei die folgenden vier W-Fragen:

- Was liegt vor? bzw. Welcher Analyt liegt vor?  
→ qualitative Analyse
- Wieviel eines Analyten liegt in der Probe vor?  
→ quantitative Analyse
- Welche Anordnung oder Form des Analyten liegt vor?  
→ Struktur- und Speziationsanalyse
- Wo befindet sich der Analyt?  
→ Verteilungs- oder Oberflächenanalyse

Diese Vorlesung soll eine Einführung in die Analytische Chemie – dieser Teil im Speziellen in die Trenntechniken – geben und konzentriert sich auf die **qualitative und quantitative Analyse von zumeist organischen Molekülen**. Eine Ausnahme bildet z.B. der Abschnitt über Ionenchromatographie, welcher auch die Analyse anorganischer Ionen beschreibt.

Die Analytische Chemie kann als Wissenschaft im Grenzbereich mehrerer Naturwissenschaften gesehen werden, da sie sich zum Gewinn chemischer Information häufig physikalischer oder auch biologischer/biochemischer Werkzeuge bedient. Auch im Bereich der Anwendungen ergibt sich für die Analytische Chemie ein weites Feld. Die folgende Liste zufällig ausgewählter Beispiele soll einen ersten Eindruck vermitteln.

Einige Anwendungsgebiete der Analytischen Chemie:

- Umwelt / Umweltverschmutzung → Umweltanalytik  
z.B. Dioxin, Feinstaub, Radon, Industrieabwässer, Düngemittel in Oberflächengewässern und Grundwasser
- Kriminalistik → forensische Analytik
- Landwirtschaft / Lebensmittel  
z.B. Ionen im Mineralwasser, Pestizide, Gammelfleisch, Melamin, Nährstoffe/Düngemittel im Boden
- Medizin / Doping / Drogen → klinische Analytik  
z.B. Kontrollen im Leistungssport, Partydrogen, THC, Blut- und Urinproben
- Industrie / technische Prozesse → Prozessanalytik
- Pharmazeutische und andere Produkte → pharmazeutische Analytik, Qualitätskontrolle

## 1.2 Der analytische Prozess

Der analytische Prozess, also der Gesamtablauf einer chemischen Analyse, gliedert sich üblicherweise in folgende Abschnitte:

- Probenahme
- Probenvorbereitung / Probenaufarbeitung
- Messung (Anwendung analytischer Techniken)
- Auswertung und Statistik
- Berichterstattung und Beurteilung der Ergebnisse

Der erste Schritt des analytischen Prozesses ist immer die **Probenahme**. Diese ist für das Analysenergebnis von entscheidender Bedeutung. Fehler, die hier gemacht werden, kann auch das teuerste Messinstrument später im Labor nicht mehr ausgleichen. Im Rahmen dieser Einführungsvorlesung kann nicht im Detail darauf eingegangen werden. Hier sollen nur einige Denkanstöße gegeben werden. Eine Probe muss z.B. repräsentativ für die Gesamtmasse des zu untersuchenden Objektes sein. Wird etwa eine Bodenprobe genommen, so sollte sie im Idealfall die mittlere chemische Zusammensetzung des gesamten Feldes widerspiegeln. Auch die Tiefe, in der die Bodenprobe genommen wird, hat einen wichtigen Einfluss (verschiedene Bodenschichten, trockene/feuchte Bereiche, anaerobe/aerobe Bereiche). Art und Ort der Probenahme muss dem analytischen Labor bekannt sein, um das Ergebnis richtig interpretieren zu können. Des Weiteren muss man sich Gedanken über Aufbewahrung und Transport der Probe machen. Probenahme, Probenaufbewahrung und –transport sind auch davon abhängig, worauf die Probe später untersucht werden soll. Das Ziel der Analyse muss von vorneherein feststehen. Im Fall einer Boden- oder Wasserprobe kann die Frage etwa lauten: Sollen eher apolare organische Moleküle (z.B. Pestizide, Umweltgifte) oder ionische anorganische Stoffe (z.B. Nitrat, Phosphat, Kationen) nachgewiesen bzw. quantifiziert werden? Im ersten Fall wird man eher eine Glasflasche zur Aufbewahrung wählen, da apolare Moleküle bevorzugt an die apolare Wand einer Plastikflasche binden würden und z.B. Weichmacher aus der Plastikflasche die Probe sogar kontaminieren könnten. Sollen Ionen analysiert werden, wird man dagegen die Probe in einer Plastikflasche aufbewahren, da die Ionen an die polare Wand einer Glasflasche binden oder aus dem Glas gelöste Ionen die Probe kontaminieren könnten. Ob Kontamination oder Adsorption der Analyten an die Gefäßwand eine Rolle spielen muss im Zweifelsfall für jede Stoffart überprüft werden. Im Zweifelsfall sollte das analytische Labor hierzu konsultiert werden.

Proben können fest (z.B. Bodenprobe), flüssig (z.B. Wasserprobe) oder gasförmig (z.B. Industrieabgase) vorliegen. Die ersten Schritte im Labor werden unter den Begriffen **Probenaufarbeitung oder Probenvorbereitung** zusammengefasst. Die Probenvorbereitungsmethoden sind stark von den nachfolgenden Analysemethoden und auch von Analyteigenschaften abhängig.

Ziele der Probenvorbereitung sind:

- Die Analyten in Lösung auf eine geeignete Konzentration und in die richtige Form (neutral / ionisch) zu bringen;
- Die Analyten von störenden Beimengungen wie unlöslichem Feststoff / Polymer, Teer oder Farbstoff vorzeitig zu befreien.

Wie hier beschrieben, bringt man die Analyten in den meisten Fällen in eine gelöste Form. Die nachfolgenden Schritte der Trennung und Analyse arbeiten also meist mit Lösungen (z.B. in Wasser oder organischen Lösungsmitteln). Wir wollen deshalb bei der Beschreibung der einzelnen analytischen Techniken immer von Lösungen ausgehen. Die Beschreibung einiger Probenaufarbeitungstechniken erfolgt am Ende des Skripts, da erst ein Gefühl für die Arbeitsweise analytischer Techniken vermittelt werden soll und viele Probenvorbereitungstechniken speziell auf bestimmte analytische Techniken zugeschnitten sind, deren Funktionsweise deshalb vorher bekannt sein sollte.

Nach Probenahme und Probenvorbereitung erfolgt die eigentliche **Messung**, die sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse zum Ziel haben kann. Die Funktionsweise ausgewählter **analytischer Techniken**, die hierfür eingesetzt werden können, ist der Schwerpunkt dieser Vorlesung. Häufig werden verschiedene Techniken nacheinander oder als Gerätekombinationen eingesetzt, um das Ziel einer qualitativen und/oder quantitativen Analyse zu erreichen. Für die qualitative Analyse, also das Identifizieren einzelner Verbindungen in der Probe, bieten sich spektroskopische oder spektrometrische Techniken, wie NMR und MS an, welche im anderen Teil dieser Vorlesung behandelt werden. Jede Verbindung erzeugt hierbei ein charakteristisches Spektrum, das heisst ein Muster aus mehreren Signalen, welches typisch für ein bestimmtes Molekül ist. Nach der Probenaufarbeitung liegen aber normalerweise viele verschiedene Moleküle in der Probenlösung vor. Würde man hier direkt ein Spektrum aufnehmen, so würde man einen „Wald“ aus Signalen erhalten, der eine qualitative, geschweige denn quantitative Analyse unmöglich macht. Aus diesem Grund braucht man **Trenntechniken**, welche die einzelnen Molekülsorten zeitlich oder räumlich trennt, damit man sie nacheinander einer weitergehenden Analyse zuführen kann. Die am häufigsten angewandten Trenntechniken sind verschiedene Formen der Chromatographie, weshalb diese Methode einen wichtigen Teil in dieser Vorlesung einnehmen wird. Die Chromatographie ermöglicht im Allgemeinen sowohl qualitative als auch quantitative Analysen.

Abbildung 1.1 führt einige ausgewählte analytische Techniken auf und teilt sie in qualitative und quantitative Analytik ein. Wie man sieht, lassen sich mittels Chromatographie beide Analysearten durchführen. Wie dies genau geschieht, wird im Rahmen dieser Vorlesung erklärt. Wir werden dem Diagramm an anderer Stelle wieder begegnen. Eine genaue Trennung zwischen den Einsatzgebieten chromatographischer (dieser Vorlesungsteil) und spektroskopischer Techniken (anderer Vorlesungsteil) ist oft nicht möglich, da auch Kopplungstechniken eingesetzt werden. Da die Chromatographie nicht ohne einen Detektor auskommt, der oft auf einer Spektroskopie basiert (z.B. UV/VIS oder Fluoreszenz), kann sie in vielen Fällen *per se* als Kopplung aus Trenntechnik und Spektroskopie angesehen werden.

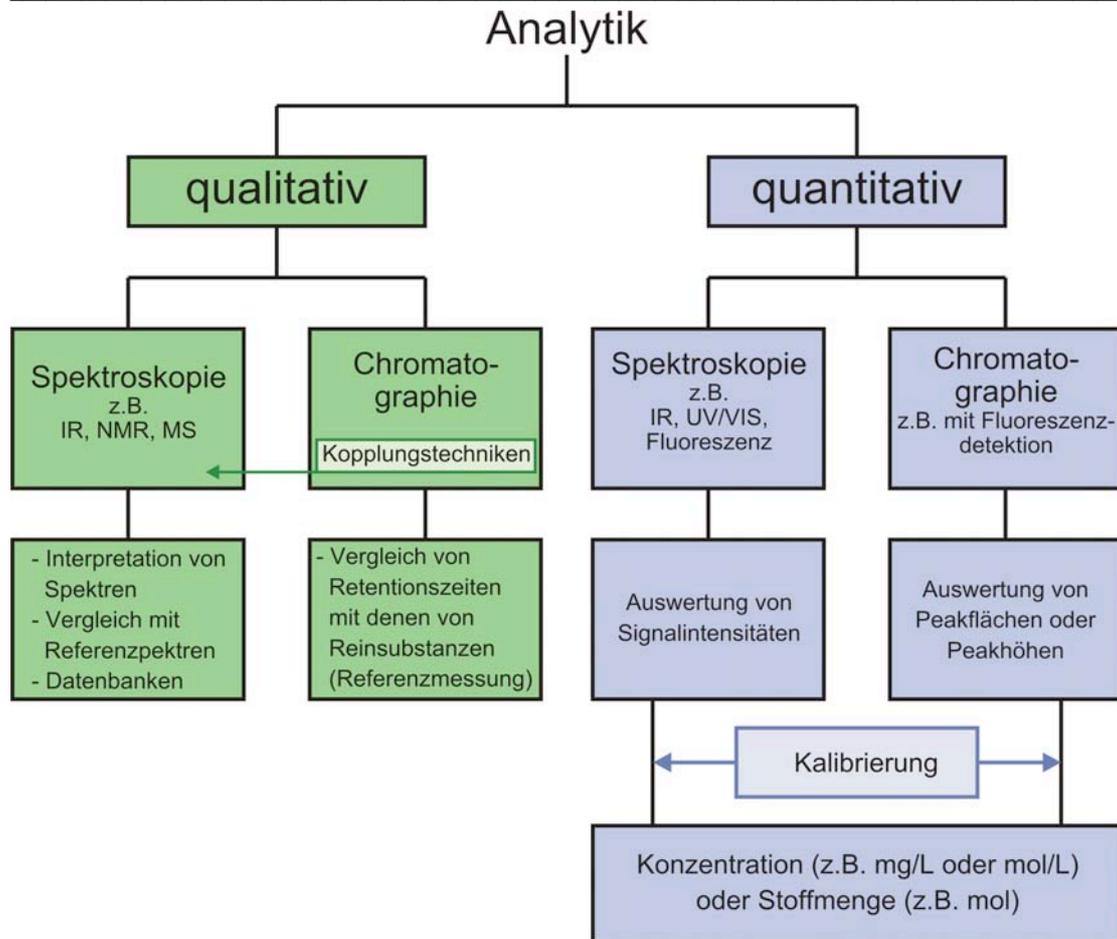


Abb. 1.1: Systematische Einteilung einiger ausgewählter analytischer Techniken. Dieser Vorlesungsteil beschäftigt sich mit Trenntechniken, wobei die Chromatographie den Schwerpunkt bildet. Sie kann für die qualitative und quantitative Analytik eingesetzt werden.

Diese Vorlesung soll einen Einstieg in die Analytische Chemie bieten. Einige Studenten werden das Gelernte in anderen Vorlesungen und Praktika vertiefen. Aber selbst wenn Sie im weiteren Verlauf des Studiums nicht mehr direkt mit der Analytischen Chemie in Kontakt kommen, sollen Sie doch das Wissen über die Grundlagen der wichtigsten analytischen Techniken sowie Einblicke in die Denk-, Arbeits- und Ausdrucksweise von Analytischen Chemikern mitnehmen. Wie die folgende Abbildung zeigt, benutzen Analytische Chemiker gerne Abkürzungen und Akronyme, von denen Sie die wichtigsten im Lauf dieser Vorlesung kennen lernen werden. Die Kenntnis eines analytischen „Grundwortschatzes“ wird Ihnen helfen, wenn Sie in Ihrem späteren Beruf mit einem Analytik-Labor in Kontakt treten.

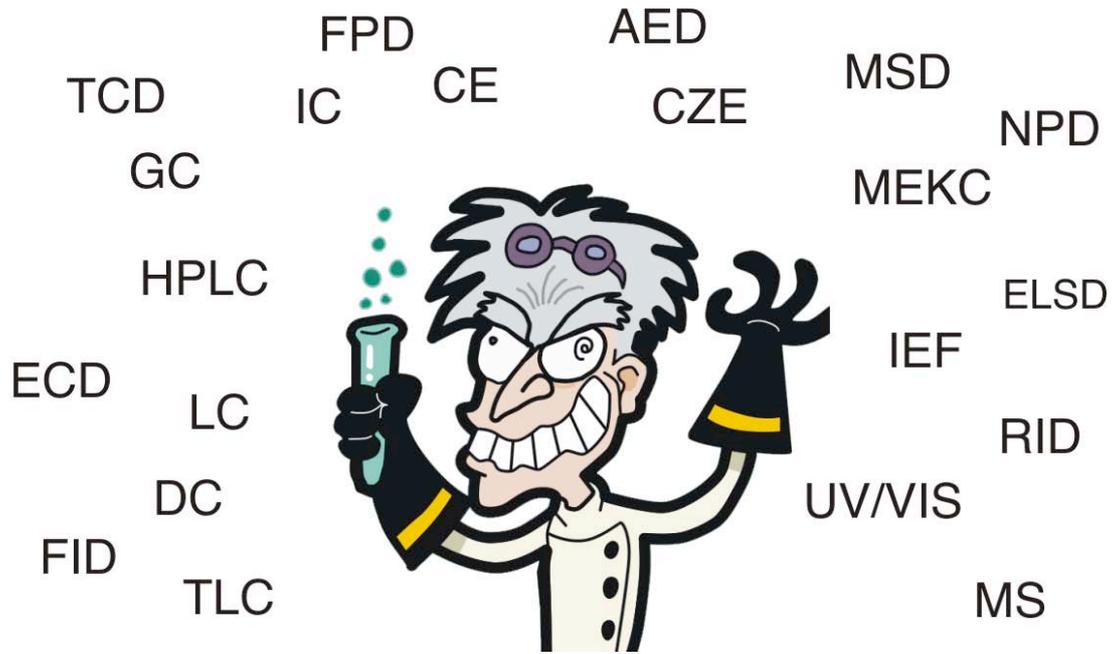


Abb. 1.2: *MfG – Mit freundlichen Grüßen: Analytische Chemiker lieben Abkürzungen. Die hier aufgeführten werden wir im Rahmen dieser Vorlesung kennen lernen.*

