

Kapitel 3: Flüssigchromatographie (LC)

Aus dem Bereich der Flüssigchromatographie (*liquid chromatography* = LC) haben wir bereits die Papierchromatographie und die Säulenchromatographie (Experiment von Tswett) kennen gelernt. Die heute am häufigsten eingesetzte instrumentelle Variante der LC ist die **Hochleistungsflüssigchromatographie** (*high performance liquid chromatography* = HPLC).

Die Abkürzung HPLC leitete sich ursprünglich von *high pressure liquid chromatography* ab, da die wesentliche Neuerung bei Einführung der HPLC in der Verwendung von Hochdruckpumpen bestand, die einen konstanten Druck von 300–400 bar aufrecht erhalten können. Dadurch konnten gepackte Säulen mit kleineren und damit dichter gepackten Partikeln (μm -Bereich) verwendet werden, was die Trennung wesentlich verbesserte. Heute hat die HPLC einen sehr weiten Anwendungsbereich, der von kleinen anorganischen oder organischen Ionen, neutralen organischen Molekülen und Organometallkomplexen bis zu grossen Biomolekülen (z.B. Proteine) reicht. Da Trenneffizienz und weiter Anwendungsbereich nicht alleine auf den Hochdruckbetrieb zurückzuführen sind, meint man heute *high performance liquid chromatography*, wenn man von HPLC spricht.

3.1 Trennprinzipien

Heutzutage existieren sehr viele Varianten der LC, die zum Teil sehr spezifisch auf Trennprobleme (z.B. Ionentrennung) zugeschnitten sind. Die wichtigsten Varianten sind die HPLC mit Normal- und Umkehrphasen, wobei die Umkehrphasen etwa 70% aller Anwendungen ausmachen. Tabelle 3 führt Trennmethode und zugrunde liegende Trennprinzipien auf.

Tab. 3: Trennmethode und –prinzipien in der LC.

Trennmethode	Trennprinzip
Normalphasen-HPLC	Adsorption (und Verteilung)
Umkehrphasen-HPLC	Verteilung (und Adsorption)
Grössenausschlusschromatographie	Grössenausschluss
Ionenchromatographie	Ionische Wechselwirkung
Affinitätschromatographie	Bindungsaffinität (nicht-kovalente Bindungen)
Komplexierungschromatographie	Komplexierung von Metallionen mit Liganden
Chirale Chromatographie	Bildung und Trennung von Diastereomeren

Im Folgenden werden die Trennprinzipien kurz vorgestellt, die Trennmethode und zugehörigen stationären Phasen (also z.B. Normalphasen und Umkehrphasen) werden wir im Anschluss bei der Beschreibung der einzelnen Techniken kennen lernen.

3.1.1 Adsorptionschromatographie

Von Adsorptionschromatographie spricht man, wenn die Trennung auf der unterschiedlich starken Adsorption der Analytmoleküle an die Oberfläche einer festen stationären Phase beruht. Dies ist das wesentliche Trennprinzip der **Normalphasen-LC** (*normal phase liquid chromatography* = NPLC), wo meist Kieselgelpartikel als stationäre Phase eingesetzt werden, an welche Analytmoleküle aufgrund ihrer

Polarität unterschiedlich stark adsorbieren. Die Trennung erfolgt also gemäss der Polarität der Moleküle.

3.1.2 Verteilungschromatographie

In der Verteilungschromatographie beruht die Trennung auf der Verteilung zwischen zwei fluiden Phasen. Die Flüssig-flüssig-Chromatographie (*liquid liquid chromatography* = LLC) mit immobilisierten flüssigen stationären Phasen spielt heute keine Rolle mehr. In der **Umkehrphasen-LC** (*reversed phase liquid chromatography* = RPLC) werden aber an Kieselgelpartikel chemisch gebundene stationäre Phasen verwendet (z.B. Alkylketten), weshalb man von keiner reinen Adsorptionschromatographie mehr sprechen kann. Im Gegensatz zur NPLC ist hier die stationäre Phase apolar bzw. hydrophob, weshalb die Moleküle in umgekehrter Elutionsreihenfolge nach **Polarität** bzw. nach ihrer Hydrophobizität getrennt werden.

3.1.3 Grössenausschlusschromatographie

In der **Grössenausschlusschromatographie** (*size exclusion chromatography* = SEC), wozu die **Gelpermeationschromatographie** (*gel permeation chromatography* = GPC) und die **Gelfiltration** zählen, arbeitet man mit porösen Partikeln als stationäre Phase. Kleine Moleküle können in die Poren eindringen und werden deshalb retendiert, wogegen sehr grosse Moleküle nicht in die Poren eindringen und mit der Lineargeschwindigkeit die Säule durchströmen. Die Trennung erfolgt also nach der **Molekülgrösse**, wobei grosse Moleküle zuerst und kleine Moleküle später die Säule verlassen.

3.1.4 Ionenchromatographie

In der **Ionenchromatographie** (*ion chromatography* = IC) beruht die Trennung auf der ionischen Wechselwirkung zwischen den Analyten (anorganische oder organische Ionen) und positiv oder negativ geladenen Ionenaustauscherharzen als stationäre Phase. Die Trennung erfolgt im Wesentlichen nach **Ladung und Grösse** der Ionen.

3.1.5 Affinitätschromatographie

In der Affinitätschromatographie macht man sich sehr spezifische Bindungsaffinitäten zwischen den Analyten und darauf zugeschnittenen Liganden zunutze. Häufig handelt es sich dabei um **biochemische nicht-kovalente Wechselwirkungen**. Ein bekanntes Beispiel sind auf Säulenmaterial immobilisierte Antikörper, welche zur Trennung der entsprechenden Antigene eingesetzt werden können. Solche **Immunoaffinitätssäulen** werden auch in der Probenaufarbeitung in Form der Festphasenextraktion eingesetzt, um einen Analyten oder eine Gruppe von chemisch ähnlichen Analyten spezifisch aus einer Probe abzutrennen und so für die weitere Analyse vorzubereiten.

3.1.6 Komplexierungschromatographie

Die eher selten angewandte Komplexierungschromatographie beruht auf der unterschiedlich starken und unterschiedlich schnellen **Komplexbildung zwischen Metallionen und organischen Liganden (Organometallkomplexe)**. Hierbei sind zwei Varianten möglich. In der ersten sind – ähnlich der Affinitätschromatographie – organische Komplexbildner (Liganden) auf Kieselgelpartikeln oder einem Polymer

immobilisiert. Mittels dieser stationären Phase werden dann Metallionen getrennt, welche mit den Liganden Komplexe bilden können. In der zweiten Variante trennt man organische Liganden auf einer stationären Phase, auf der Metallionen an immobilisierte Liganden gebunden sind. Hierbei bleiben Koordinationsstellen frei, an welche die zu trennenden Liganden aus der mobilen Phase binden können. Die Komplexbildung läuft aber sehr langsam ab, weshalb breite Peaks oft typisch für diese Varianten der LC sind.

3.1.7 Chirale Chromatographie

Sollen chirale Moleküle in die beiden Enantiomere (also R- und S-Form) getrennt werden, muss man sich eines Tricks bedienen. Enantiomere haben nämlich annähernd die gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, da sie sich praktisch nur in ihrer Wechselwirkung mit polarisiertem Licht unterscheiden. Aus diesem Grund lassen sich Enantiomere als solche nicht trennen. Enantiomere liegen vor, wenn ein Molekül ein chirales Zentrum besitzt. Im Fall organischer Moleküle ist das ein Kohlenstoffatom, welches an vier unterschiedliche Reste gebunden ist. Hier sind zwei verschiedene räumliche Anordnungen der Reste möglich, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten. Das sind die beiden Enantiomere des Moleküls. Liegen zwei oder mehrere chirale Zentren vor, können auch Diastereomere gebildet werden, welche sich in ihren Eigenschaften unterscheiden und mittels Chromatographie getrennt werden können. Die Trennung von Enantiomeren beruht daher auf der Bildung von Diastereomeren und deren Trennung. Dies wird meist durch chirale stationäre Phasen erreicht (z.B. auf Kieselgel immobilisierte enantiomerenreine Aminosäuren, wie Leucin oder Phenylglycin), wobei sich bei Wechselwirkung mit den Analyten „Diastereomere“ ergeben, auch wenn hier keine kovalente Bindung zugrunde liegt. Alternativ können der Probe auch chirale Hilfsreagenzien zugegeben werden, welche in der mobilen Phase mit den Analyten Diastereomere bilden.

3.2 Die van-Deemter-Gleichung in der LC

In Abschnitt 2.2.7 haben wir die van-Deemter-Gleichung (siehe Gleichung 2.20) kennen gelernt, welche die Bodenhöhe H als Maß für die Trenneffizienz in Abhängigkeit von der Lineargeschwindigkeit u beschreibt. Einfluss auf die Bodenhöhe und damit auf die Peakbreite haben Eddy-Diffusion (A -Term), Longitudinaldiffusion (B -Term) und Massentransporteffekte (C -Term). Wir sind bereits dort auf Unterschiede zwischen LC und GC eingegangen und wollen hier nur kurz einige Besonderheiten der LC herausarbeiten.

Die **Eddy-Diffusion** ist ein typischer Effekt in der LC, weil hier mit gepackten Säulen gearbeitet wird. Der Partikeldurchmesser der stationären Phase hat einen wesentlichen Einfluss auf den A -Term: Je kleiner und dichter gepackt, umso geringer werden die Weglängenunterschiede, die zur Eddy-Verbreiterung führen.

Die **Longitudinaldiffusion** ist abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit in der mobilen Phase. Aufgrund der kleinen Diffusionskoeffizienten von Molekülen in Flüssigkeiten (etwa vier Größenordnungen kleiner als in Gasen) hat der B -Term in der LC kaum einen Einfluss auf den Verlauf der van-Deemter-Funktion.

Bei den **Massentransporteffekten** kann man meist den Anteil der stationären Phase vernachlässigen, da Adsorptions- und Desorptionsvorgänge an der Oberfläche von festen stationären Phasen schnell ablaufen. Der *C*-Term hängt also im Wesentlichen von Eigenschaften der mobilen Phase ab. Er ist umso grösser, je langsamer die Diffusion in der mobilen Phase abläuft und ist deshalb indirekt proportional zum Diffusionskoeffizienten in der mobilen Phase. Je langsamer die Stofftransportprozesse ablaufen, umso grösser die Peakverbreiterung. Auch die Partikelgrösse der stationären Phase hat einen indirekten Einfluss auf den *C*-Term. Je grösser und schlechter gepackt die Partikel, umso grösser wird der von der mobilen Phase gefüllte Zwischenraum. Die Moleküle müssen also eine grössere Strecke zurücklegen, um zur stationären Phase zu diffundieren. Der Stofftransport wird also verlangsamt, was zu einer ineffizienteren Trennung führt.

3.3 HPLC: Aufbau und Funktionsweise

In diesem Abschnitt wird der allgemeine Aufbau einer HPLC-Anlage beschrieben. Bei Funktionsweise und stationären Phasen konzentriert sich dieser Abschnitt auf die am häufigsten eingesetzten **Umkehrphasen** (*reversed phase* = **RP**) und **Normalphasen** (*normal phase* = **NP**). Weitere LC-Varianten wie Ionenchromatographie und Dünnschichtchromatographie werden nach Besprechung der Detektoren getrennt behandelt.

In der HPLC wird die mobile Phase mittels spezieller Pumpen mit hohem Druck (300–400 bar) durch eine dicht gepackte Säule transportiert. Die Fliessgeschwindigkeit liegt meist im mL/min-Bereich. Im Fall der NP- und RP-Chromatographie werden die Moleküle im Wesentlichen **nach ihrer Polarität getrennt**. Im Vergleich zur GC ist das Einsatzgebiet der LC sehr viel breiter. In der GC lassen sich nämlich nur unzerstört verdampfbare Substanzen trennen. Der HPLC sind **auch thermolabile und nichtflüchtige Substanzen** bis hin zu Biopolymeren (z.B. Proteine) zugänglich. **Der Analyt muss nur ausreichend in dem als mobile Phase fungierenden Lösungsmittel löslich sein.** Mobile und stationäre Phase werden so gewählt, dass sie eine möglichst unterschiedliche Polarität aufweisen, also im Fall einer polaren stationären Phase eine apolare mobile Phase und umgekehrt. So sind die Verteilungskonstanten der Analyten und damit ihre Retentionszeiten hauptsächlich durch ihre Polarität bestimmt.

Betrachten wir dies für die beiden Fälle der NPLC und der RPLC:

In der **Normalphasenflüssigchromatographie (NPLC bzw. NP-HPLC)** kommen meist Kieselgelpartikel (SiO_2) als stationäre Phase zum Einsatz. Diese weisen polare $-\text{OH}-$ bzw. $-\text{O}^-$ -Gruppen an der Oberfläche auf. Die stationäre Phase ist also polar. Der Begriff „Normalphase“ hat einfach historische Gründe. Polare Phasen waren historisch die ersten LC-Phasen. Im Gegensatz zur polaren stationären Phase wählt man eine apolare mobile Phase, also Lösungsmittel wie Hexan oder Heptan. Mit der NPLC lassen sich also überwiegend hydrophobe Substanzen trennen, die ausreichend gut in apolaren organischen Lösungsmitteln löslich sind. Eher polare Substanzen halten sich länger an der stationären Phase auf und werden retendiert, während sich apolare Substanzen vor allem in der mobilen Phase aufhalten und früher die Säule verlassen.

In der **Umkehrphasenflüssigchromatographie (RPLC bzw. RP-HPLC)** kommen meist chemisch modifizierte Kieselgelpartikel als stationäre Phase zum Einsatz. Durch kovalentes Binden von Alkylketten (z.B. Octadecyl- bzw. C₁₈-Ketten) an die Kieselgeloberfläche wird aus dem polaren Kieselgel ein apolares Säulenmaterial. Eigenschaften und Elutionsreihenfolge drehen sich also gerade um. Passend zur apolaren stationären Phase arbeitet man in der RPLC mit polaren mobilen Phasen, also z.B. Wasser, Acetonitril, Methanol oder Gemischen davon. In der RPLC lassen sich also in polaren Lösungsmitteln lösliche Substanzen trennen, was auf die meisten für biologische, medizinische, pharmazeutische und umweltanalytische Anwendungen relevanten Moleküle zutrifft und die grosse Verbreitung dieser Trenntechnik erklärt. Eher apolare Stoffe gehen stärkere Wechselwirkungen mit der apolaren stationären Phase ein, weshalb sie stärker retendiert werden. Polare Stoffe verlassen dagegen früher die Säule.

3.3.1 Elutrope Reihe

Werden in der HPLC mit Normalphasen sehr polare Moleküle getrennt, kann es sein, dass diese sehr stark an die polare stationäre Phase binden und die Elutionskraft der apolaren mobilen Phase nicht ausreicht, was zu sehr langen Retentionszeiten führen kann. Die **Elutionskraft** eines Lösungsmittels korreliert mit der Verteilungskonstante. Je grösser die Elutionskraft, umso kleiner die Verteilungskonstante und umso mehr Analytmoleküle werden von der stationären in die mobile Phase überführt und dadurch schneller eluiert. Anders ausgedrückt ist die Elutionskraft dann besonders hoch, wenn die mobile Phase eine ähnliche Polarität wie die stationäre Phase aufweist.

In der **elutropen Reihe** werden Lösungsmittel nach ihrer Elutionskraft geordnet. Die elutrope Reihe in Abbildung 3.1 bezieht sich auf die **Normalphasenchromatographie** und ordnet daher die Lösungsmittel nach aufsteigender Polarität. Natürlich hängt die Elutionskraft von der verwendeten stationären Phase und den Analyten ab, weshalb man in verschiedenen Lehrbüchern leicht davon abweichende Reihenfolgen finden kann. In der Normalphasenchromatographie verwendet man apolare Lösungsmittel, d.h. vor allem die Lösungsmittel am Anfang der elutropen Reihe.

In der **Umkehrphasenchromatographie** kehrt sich die elutrope Reihe um, das heisst apolare Lösungsmittel haben die grösste Elutionskraft. Man setzt üblicherweise sehr polare Lösungsmittel ein, also v.a. die Lösungsmittel am Ende der elutropen Reihe in Abbildung 3.1. Häufig werden Wasser, Methanol und Acetonitril eingesetzt.

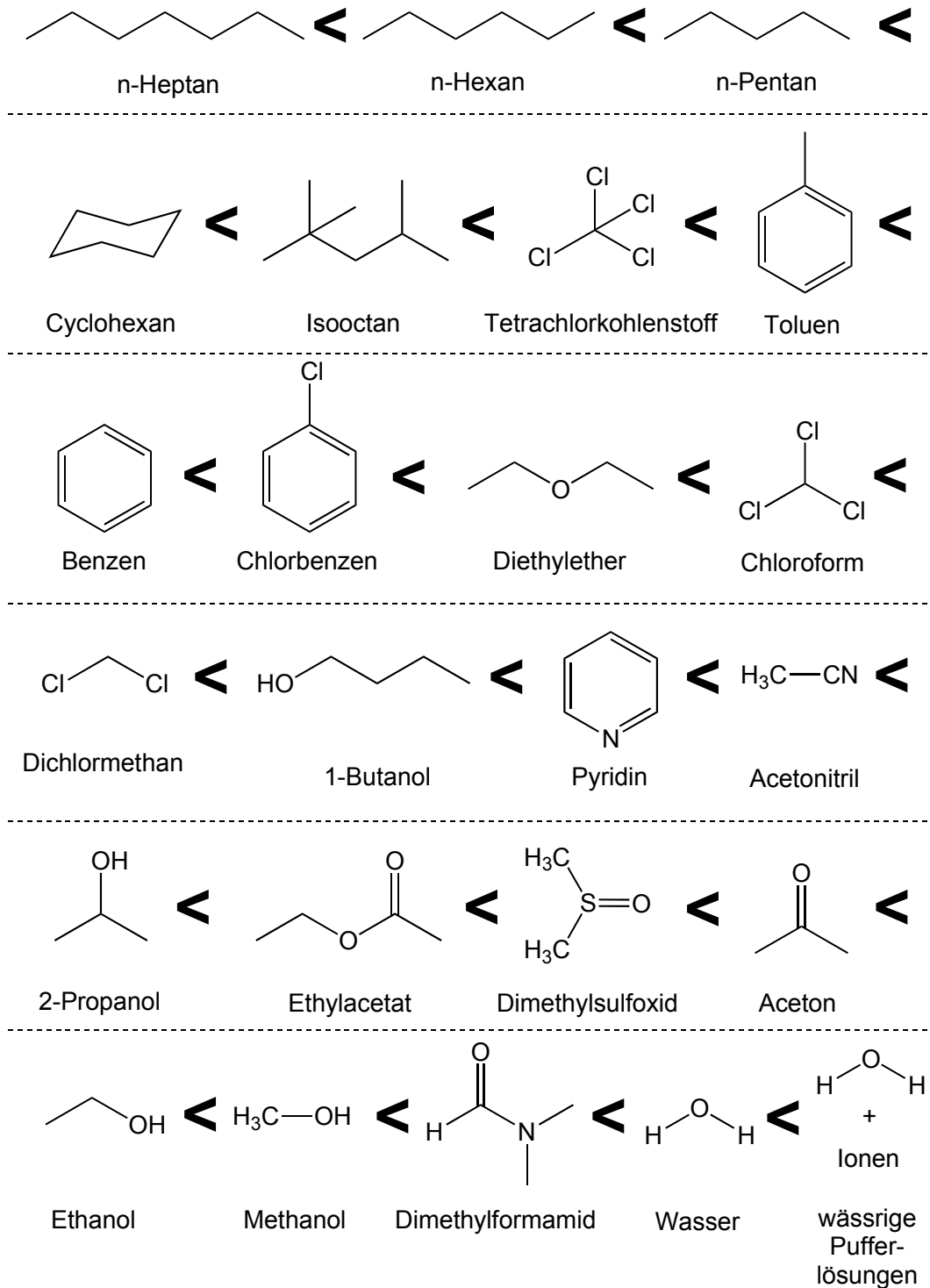


Abb. 3.1: *Elutrope Reihe: Ordnung einiger Lösungsmittel nach aufsteigender Polarität. Die Reihe beschreibt in dieser Form die Elutionskraft von Lösungsmitteln in der Normalphasenchromatographie. In der Chromatographie mit Umkehrphasen dreht sich die Reihenfolge der Lösungsmittel um.*

3.3.2 Elutionsreihenfolge

In der HPLC mit Normal- und Umkehrphasen werden die Moleküle nach ihrer Polarität getrennt. Analyten, die in ihrer Polarität ähnlich der stationären Phase sind, werden stärker retentiert, während der mobilen Phase ähnliche Moleküle früher eluiert werden. Das bedeutet, dass in der NP-HPLC apolare Moleküle als erstes eluiert werden, wogegen in der RP-HPLC polare Moleküle die kleinsten Retentionszeiten aufweisen.

Für die **Normalphasenchromatographie** ergibt sich etwa die in Abbildung 3.2 aufgeführte Elutionsreihenfolge. In der **Umkehrphasenchromatographie** dreht sich die Reihenfolge um. Natürlich haben die genaue Struktur der Moleküle sowie stationäre und mobile Phase einen Einfluss auf die Elutionsreihenfolge, weshalb Abbildung 3.2 nur eine ungefähre Idee vermitteln kann.

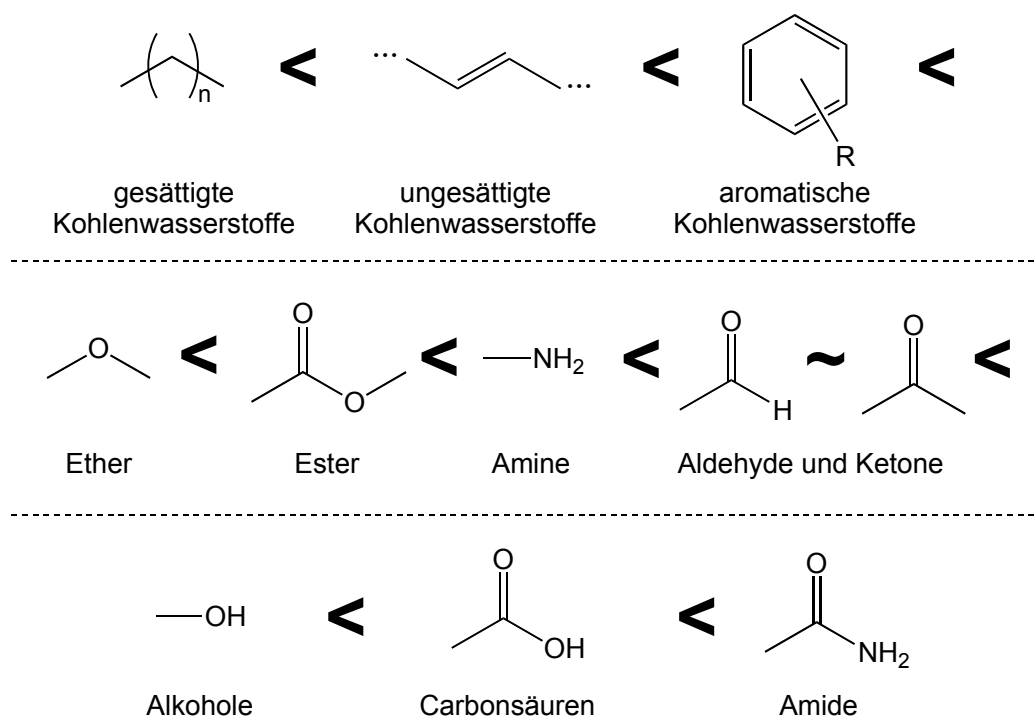


Abb. 3.2: Typische Elutionsreihenfolge einiger Verbindungsklassen in der Normalphasenchromatographie.

Tabelle 4 fasst die wichtigsten Eigenschaften von Normalphasen- und Umkehrphasenchromatographie zusammen.

Tab. 4: Eigenschaften der NP-HPLC und RP-HPLC.

Trennmethode	stationäre Phase	mobile Phase	Elutionsreihenfolge
Normalphasen-LC (NPLC bzw. NP-HPLC)	polar	apolar	apolare Analyten vor polaren Analyten
Umkehrphasen-LC (RPLC bzw. RP-HPLC)	apolar	polar	polare Analyten vor apolaren Analyten

3.3.3 Aufbau einer HPLC-Anlage

Abbildung 3.3 zeigt den typischen Aufbau einer HPLC-Anlage. Eine HPLC ist meist modular aufgebaut und enthält neben der Trennsäule Module zum Entgasen der Lösungsmittel, Mischen von Lösungsmittelgradienten, Pumpen der mobilen Phase, Probeninjektion und Detektion der getrennten Substanzen als Peaks.

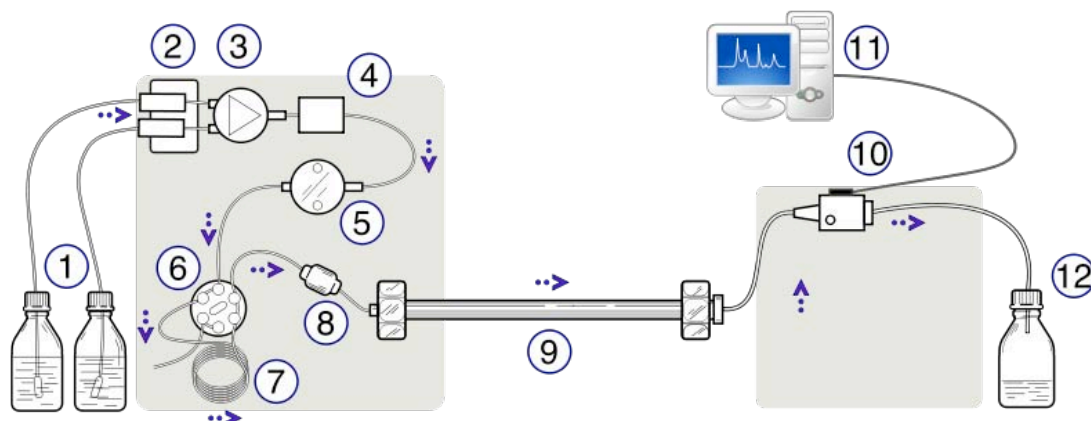


Abb. 3.3: Typischer Aufbau einer HPLC-Anlage: (1) Eluentenvorrat, (2) Entgaser, (3) Mischventil und (4) Mischkammer des Gradientenmischer, (5) Pumpe, (6) Injektionsventil mit (7) Probenschleife, (8) Vorsäule, (9) Trennsäule, (10) Detektor, (11) Computer zur Datenerfassung und –auswertung, (12) Abfallgefäß.

- **Eluentenvorrat und Entgaser**

In der HPLC müssen entgaste Lösungsmittel verwendet werden, um Gasblasenbildung bei Druckunterschieden im System zu vermeiden. Vor dem Anschliessen der Vorratsflaschen an die Apparatur empfiehlt sich, die Lösungsmittel durch Anlegen von Unterdruck oder durch Entgasen im Ultraschallbad von gelöster Luft zu befreien. Die meisten HPLC-Anlagen sind zusätzlich mit Entgasern ausgerüstet, in denen das Lösungsmittel durch einen Teflonschlauch fließt und der mobilen Phase mittels Unterdruck gelöste Gase durch die Teflonmembran hindurch entzogen werden.

- **Gradientenmischer**

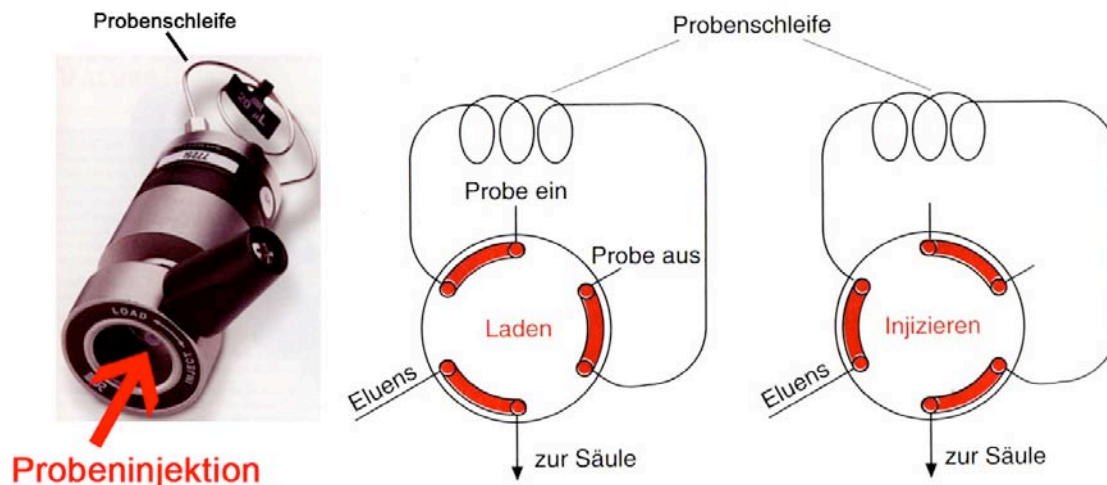
An viele HPLC-Anlagen lassen sich mehrere Lösungsmittelflaschen gleichzeitig anschliessen. Ein eingebauter Gradientenmischer stellt die gewünschte Lösungsmittelmischung her, die sich während der Trennung in Stufen oder fließend ändern lässt (Gradientenelution).

- **Hochdruckpumpe**

An eine HPLC-Pumpe werden hohe Ansprüche gestellt, da sie konstant einen hohen Druck halten und pulsationsfrei gleich bleibende Flüsse gewährleisten muss. Eine HPLC-Pumpe arbeitet typischerweise bei 200–400 bar und liefert Flüsse von bis zu 10 mL/min, typisch sind Werte um 1–2 mL/min.

• Injektionsventil

Die Probe wird über ein Injektionsventil kurz vor der Säule in die Anlage eingespritzt. Am gängigsten sind hier 6-Wege-Ventile, deren Funktionsweise Abbildung 3.4 erklärt.



Probeninjektion

Abb. 3.4: Funktionsweise eines Sechswegventils zur Injektion der Probe in eine HPLC-Anlage.

Ein Injektionsventil hat sechs Anschlüsse, von denen je nach Stellung des Ventils je drei Paare von Anschlüssen miteinander verbunden sind (in den Prinzipskizzen hervorgehoben). In der Position „**Laden**“ wird die Probe mit einer Spritze injiziert und in die Probenschleife gedrückt bis diese vollständig mit Probe gefüllt ist. Gleichzeitig wird der Eluent durch das Ventil direkt zur Säule transportiert. Das Volumen der Probenschleife bestimmt genau und reproduzierbar das Probenvolumen, das auf die Säule aufgegeben wird. Im Anschluss wird auf „**Injizieren**“ umgeschaltet. Der Eluent fließt dann durch die Probenschleife bevor er die Säule erreicht und transportiert so die Analytmoleküle zum Säulenanfang, wo die Trennung beginnt.

Viele HPLC-Anlagen sind heute neben einem Ventil zur manuellen Injektion mit einem **Autosampler**, also einem automatischen Probengeber, ausgerüstet. Dieser lässt sich mit Probengefäßen beladen, deren Inhalt vor jeder Trennung automatisch injiziert wird. So lässt sich eine Serie von Analysen automatisch, also auch über Nacht durchführen.

• Säule

HPLC-Säulen sind meist Stahlrohre mit typischen Längen von 10–50 cm und Innendurchmessern von 1–10 mm. HPLC-Säulen sind in den meisten Fällen mit porösen Partikeln von 3–10 µm Durchmesser gepackt, wobei eine dichte und einheitliche Packung wichtig ist. Die Partikel bestehen meist aus Kieselgel, Aluminiumoxid, Zirkonoxid oder Polymeren und weisen eine enge Größenverteilung auf. Je nach Verwendungszweck kommen poröse oder nicht poröse Partikel zum Einsatz, die häufig mit einer organischen Phase beschichtet werden. Chemisch modifiziertes **Kieselgel** ist die am häufigsten eingesetzte stationäre Phase. Zur Modifizierung werden meist lange Alkylketten kovalent an die Oberfläche der Kieselgelpartikel gebunden, was zu einer apolaren bzw. hydrophoben Oberfläche und damit zu einer

Umkehrphase führt. Die wichtigste Umkehrphase (RP) stellt mit Octadecyl-Resten (C_{18}) modifiziertes Kieselgel dar (RP18).

Für eine lange Lebensdauer der in der Regel recht teuren Säulen sollte man unbedingt darauf achten, dass die vom Hersteller angegebenen Parameter wie pH-Bereich, Flussrate, Temperatur und Druck eingehalten werden. Sehr hilfreich ist der Einsatz von so genannten Vorsäulen. Diese enthalten dieselbe stationäre Phase wie die eigentliche Trennsäule und halten all jene Komponenten zurück, die ansonsten für immer auf der analytischen Säule haften würden, sodass diese für weitere Trennungen nicht mehr zu benutzen wäre. Vorsäulen müssen in regelmässigen Abständen ausgetauscht werden, um ihre Schutzfunktion zu gewährleisten.

• Detektor

In der HPLC kommt eine Vielzahl verschiedener Detektoren zum Einsatz. Darunter sind eher generell einsetzbare Detektoren und entsprechend weit verbreitete Detektoren, die eine Vielzahl von Substanzen „sichtbar machen“ können. Zu dieser Gruppe zählen der Brechungsindex-Detektor und mit Einschränkungen der UV/VIS-Detektor. Andere Detektoren sind auf bestimmte Substanzklassen zugeschnitten bzw. können nur bestimmte Stoffe erfassen. So erkennt ein Fluoreszenzdetektor nur Moleküle, die zur Fluoreszenz angeregt werden können. Möchte man nicht fluoreszierende Analyten erfassen, besteht die Möglichkeit diese zu derivatisieren, das heisst fluoreszierende Moleküle an die Analyten chemisch zu binden und die Derivate chromatographisch zu trennen und mit einem Fluoreszenzdetektor zu erfassen. Die verschiedenen Detektoren werden in Abschnitt 3.4 besprochen.

3.3.4 Stationäre Phasen

• Normalphasen (NP)

Als Normalphasen kommen poröse Festkörperpartikel mit einer grossen, polaren Oberfläche zum Einsatz, wie Kieselgel oder Aluminiumoxid. Am häufigsten eingesetzt werden Kieselgelpartikel mit Durchmessern im Mikrometerbereich. Kieselgel weist an der Oberfläche negativ geladene $-OH-$ bzw. im deprotonierten Zustand $-O^-$ -Gruppen auf, welche für den polaren Charakter des Säulenmaterials verantwortlich sind (siehe Abbildung 3.5).

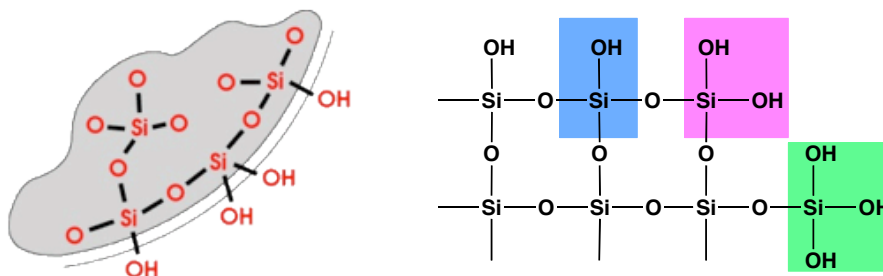


Abb. 3.5: Aufbau einer Kieselgeloberfläche. Die $-OH-$ bzw. $-O^-$ -Gruppen sind für den polaren Charakter der Oberfläche verantwortlich.

• Umkehrphasen (RP)

Es wird mit organischen stationären Phasen gearbeitet, die meist chemisch an Kieselgel-Partikel mit Durchmessern von 3–10 µm gebunden sind. Kieselgel hat den Vorteil, dass es mechanisch stabil ist (was bei den hohen Drücken der HPLC nötig ist) und dass organische Verbindungen relativ einfach und vor allem in dichter Packung daran gebunden werden können. Es kommen poröse und unporöse Materialien zum Einsatz.

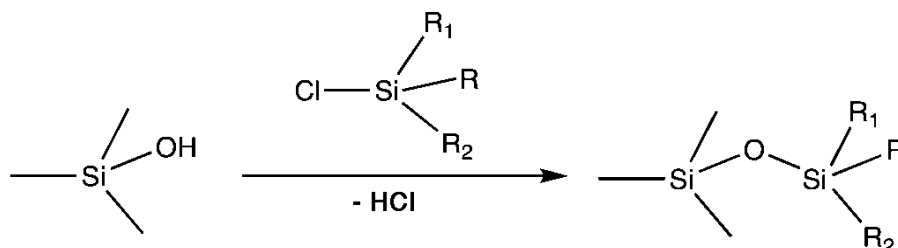
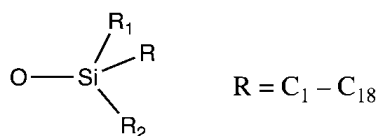


Abb. 3.6: Modifizierung einer Kieselgeloberfläche durch Reaktion mit einem Chloralkylsilan, was zu kovalent gebundenen Alkylgruppen auf der Kieselgeloberfläche führt.

Es sind Säulenmaterialien mit einer Vielzahl von Oberflächenmodifizierungen erhältlich, wobei im Bereich der Umkehrphasen die Modifizierung natürlich zu einer hydrophoben bzw. apolaren Oberfläche führt. Weit verbreitet sind unverzweigte Alkylgruppen von C₁ (Methyl) bis C₁₈ (Octadecyl). Am weitesten verbreitet ist die C₁₈- bzw. RP18-Phase. Es existiert aber auch viele andere Varianten, wie Cyclohexyl-, Phenyl- und Alkylphenyl-Umkehrphasen.

Straight-chain hydrocarbons (C₁₈, C₁₂, C₈, C₆, C₄, C₃, C₂, C₁)



Cyclohexyl, phenyl, alkylphenyl

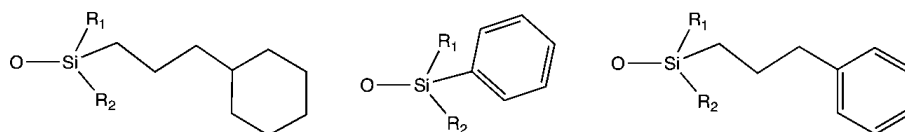


Abb. 3.7: Beispiele für Umkehrphasen.

Mit diesen Substitutionsreaktionen können aufgrund sterischer Limitierungen oft nur die Hälfte oder weniger der Silanolgruppen derivatisiert werden. Somit ist die stationäre Phase immer noch relativ polar. Um einen Teil der restlichen OH-Gruppen auch noch umzusetzen, kann ein „End-capping“ durchgeführt werden, indem man XSi(CH₃)₃ (X = Halogen) mit der Oberfläche reagieren lässt.

3.3.5 Mobile Phasen

- **Normalphasenflüssigchromatographie (NPLC bzw. NP-HPLC)**

In der Normalphasenchromatographie kommen passend zur polaren Säule apolare Lösungsmittel als mobile Phase zum Einsatz. Typisch sind z.B. Hexan und Pentan. Generell kommen Lösungsmittel in Frage, die eher am Anfang der elutropen Reihe in Abbildung 3.1 stehen.

- **Umkehrphasenflüssigchromatographie (RPLC bzw. RP-HPLC)**

In der Umkehrphasenchromatographie kommen polare Lösungsmittel als mobile Phase zum Einsatz, d.h. Lösungsmittel am Ende der elutropen Reihe in Abbildung 3.1. Typisch sind Wasser und Methanol sowie Acetonitril als Lösungsmittel mit leicht apolaren Eigenschaften. Die gewünschte Polarität lässt sich durch Mischungen von polaren (z.B. Wasser) mit leicht apolaren Lösungsmitteln (z.B. Acetonitril) erreichen.

- **Gradientenelution**

Häufig wird in der HPLC die Gradientenelution angewandt, bei der – im Gegensatz zur isokratischen Elution – die Zusammensetzung der mobilen Phase in Stufen oder graduell während der Trennung geändert wird. Der Einsatz von Gradientenelution hat im Wesentlichen zwei Gründe: (1) Optimierungsschritte (siehe Abschnitt 2.2.8) bei isokratischer Elution verbessern die Trennung bestimmter Peaks und verschlechtern gleichzeitig die Trennung anderer Peaks im Chromatogramm. Unterschiedliche Trennbedingungen zu verschiedenen Zeiten während einer Trennung können Abhilfe schaffen. (2) Das generelle Problem bei einer chromatographischen Trennung besteht meist darin, dass bei der Trennung von Substanzen mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften (also z.B. unterschiedlicher Polarität) bei isokratischer Elution sehr unterschiedliche Retentionszeiten auftreten. Dies hat lange Analysenzeiten und die Verbreiterung der Peaks hoher Retention zur Folge.

Gerade wegen (2) ist es sinnvoll, die Elutionskraft der mobilen Phase während der Trennung kontinuierlich zu erhöhen. Dies hat zur Folge, dass stark retendierte Substanzen schneller von der stationären in die mobile Phase überführt werden. Die Peaks werden zu kleineren Retentionszeiten verschoben und dadurch schmaler. Erhöhung der Retentionskraft bedeutet, die Eigenschaften der mobilen an die der stationären Phasen anzupassen (siehe auch „Elutrope Reihe“ in Abschnitt 3.3.1).

Im Fall der Umkehrphasenchromatographie beginnt man die Trennung oft mit einem polaren Eluenten oder Eluentengemisch (z.B. Acetonitril–Wasser 10% : 90%). Dadurch werden die Verteilungskonstanten der Substanzen geringer Retention sehr unterschiedlich, was zu einer guten Trennung in diesem Teil des Chromatogramms führt. Im Lauf der Trennung wird die Elutionskraft der mobilen Phase erhöht, d.h. in ihrer Polarität an die stationäre Phase angepasst. In der RPLC wird daher der mobilen Phase immer mehr apolares Lösungsmittel (z.B. Acetonitril) zugemischt, wodurch eine solche Trennung bei z.B. Acetonitril–Wasser 90% : 10% enden könnte. Apolare Analyten, die zu stark an die polare stationäre Phase binden, werden vom apolaren Lösungsmittelgemisch früher eluiert, was zu einer Verringerung der Analysenzeit und zu schmalere Peaks führt (siehe Abb. 3.8).

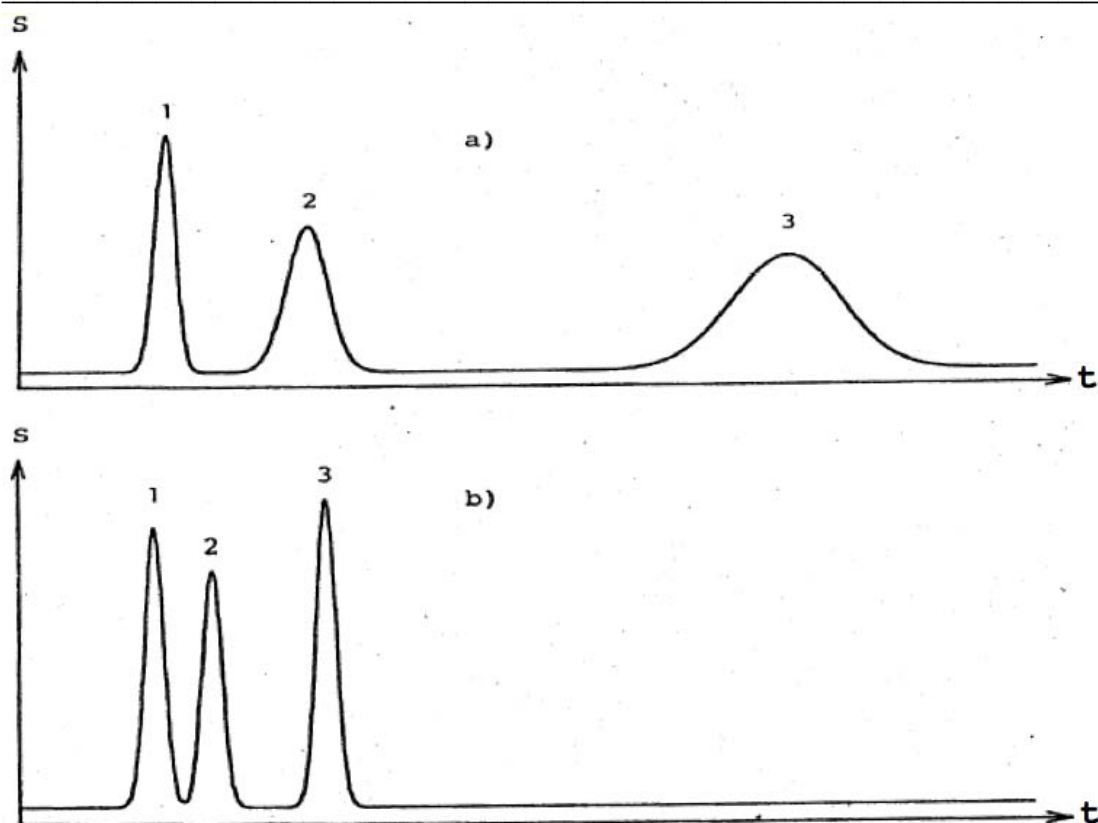


Abb. 3.8: Vergleich einer (a) isokratischen Elution mit einer (b) Gradientenelution in der HPLC. Bei der Gradientenelution wurde während der Trennung die Elutionskraft der mobilen Phase kontinuierlich erhöht.

3.4 Detektoren in der HPLC

In der HPLC wird eine Vielzahl unterschiedlicher Detektionsprinzipien eingesetzt, die sich z.B. in ihrer Selektivität, ihrer Nachweisstärke, ihrer Empfindlichkeit und ihrem linearen Messbereich sowie in ihrem Preis unterscheiden. Die jeweiligen Vor- und Nachteile müssen für jedes Trennproblem abgewogen werden. So kann es von Vorteil sein, wenn ein Detektor sehr selektiv die gewünschten Analyten „sichtbar macht“, während andere Substanzen im Chromatogramm nicht erscheinen. In vielen Fällen will man aber einen Universaldetektor haben, der möglichst viele unterschiedliche Substanzen erfassen kann. Am häufigsten werden in der HPLC UV/VIS- und Brechungsindex-Detektoren eingesetzt.

3.4.1 UV/VIS-Detektor

Alle Bauarten von UV/VIS-Detektoren basieren auf dem **Prinzip des UV/VIS-Spektrometers bzw. Spektralphotometers**. Durch Messen der optischen Transmission wird also die Extinktion der Lösung „Analyt + mobile Phase“ bestimmt. Gemäss dem Lambert-Beerschen Gesetz hängt diese linear vom Extinktionskoeffizienten, der Schichtdicke und der Konzentration der jeweiligen Substanz ab. Um möglichst geringe Konzentrationen noch messen zu können, ist also eine hohe Schichtdicke der Messzelle notwendig. Gleichzeitig muss das Volumen der Messzelle aber gering gehalten werden, da es dort zur teilweisen Vermischung bereits getrennter Substanzen und zu Peakverbreiterung kommen kann (siehe „Extra Column Effects“ in

Abschnitt 2.2.7). Aus diesem Grund werden lange Messzellen mit geringem Durchmesser eingesetzt, wobei je nach Hersteller verschiedene Bauarten, wie die Doppel-L-Zelle und die Z-Zelle existieren.

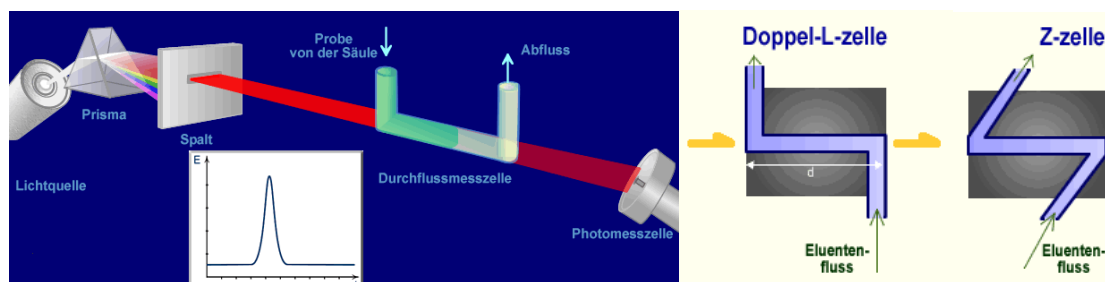


Abb. 3.9: Prinzipieller Aufbau eines UV/VIS-Detektors (links) und verschiedene Varianten der Messzelle (rechts).

In der modernen HPLC unterscheidet man verschiedene Varianten von UV/VIS-Detektoren:

- **Festwellenlängengeräte**

Geräte, die bei nur einer festen Wellenlänge arbeiten können, spielen heute kaum mehr eine Rolle. Typisch ist hier die Verwendung einer Quecksilberdampflampe (Hg-Lampe) als Strahlungsquelle bei der Hauptemissionslinie mit der Wellenlänge 254 nm im UV-Bereich.

- **Geräte mit variabler Wellenlängeneinstellung**

Es existieren Geräte, deren Wellenlänge im UV-Bereich oder gesamten UV/VIS-Bereich eingestellt werden kann. Letztere verwenden meist zwei Lichtquellen, eine für den UV- und eine für den sichtbaren Bereich des Spektrums. Typisch sind Deuteriumlampen im Bereich 190–370 nm und Wolfram-Halogenlampen im Bereich von 370–800 nm. Mittels eines Monochromators (z.B. Prisma und Spalt, siehe Abb. 3.9) lässt sich die gewünschte Wellenlänge auswählen.

- **Diodenarraydetektoren (DAD)**

Die leistungsfähigsten UV/VIS-Detektoren sind heutzutage Diodenarraydetektoren (DADs), die wie der Name sagt, das Spektrum mittels eines Diodenarrays – also eines Arrays aus vielen Einzeldetektoren – erfassen. Die Lichtquellen sind die gleichen wie bei Detektoren mit variabler Wellenlänge. Der Unterschied besteht darin, dass polychromatisch angeregt wird und der Strahl nach Durchlaufen der Messzelle mittels eines Polychromators in die Wellenlängen zerlegt und das Spektrum auf einem Diodenarray mit z.B. 512 Pixeln abgebildet wird. So lässt sich für jeden Peak das gesamte Spektrum aufzeichnen. Dies eröffnet neue Möglichkeiten, wie die Subtraktion von Referenzwellenlängen, die Bestimmung von Intensitätsverhältnissen zur Reinheitsüberprüfung der Substanzen und in bedingtem Masse qualitative Aussagen zur chemischen Struktur. Im Falle zweier koeluerender Substanzen würden z.B. die Intensitätsverhältnisse bei verschiedenen Wellenlängen vom UV/VIS-Spektrum der jeweiligen Reinsubstanzen abweichen, und man würde einen Hinweis darauf bekommen, dass die Trennung noch weiter optimiert werden muss. Solche Aussagen sind bei der Detektion bei einer einzelnen Wellenlänge nicht möglich.

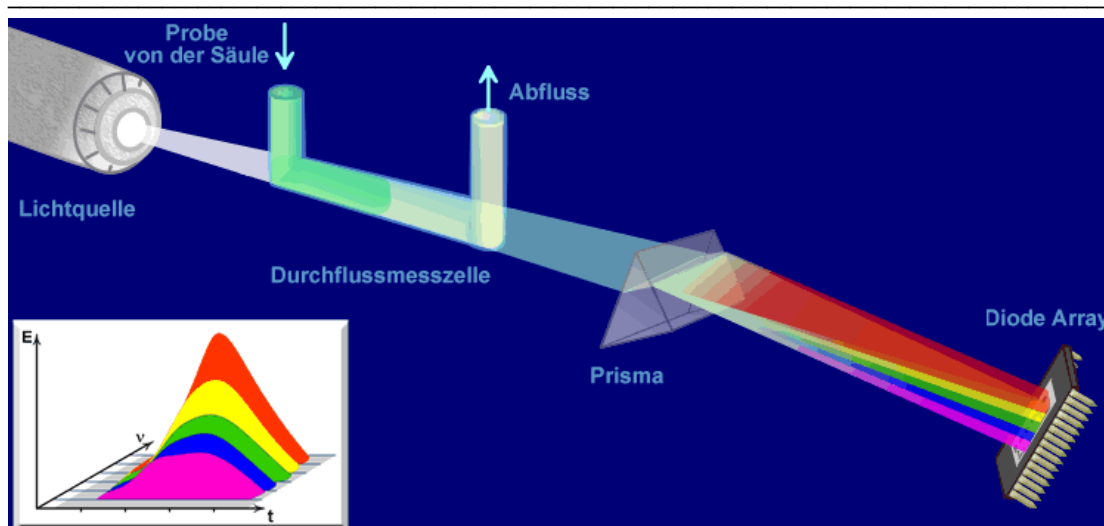


Abb. 3.10: Aufbau und Funktionsweise eines Diodenarraydetektors (DAD).

Allgemein ist zu sagen, dass UV/VIS-Detektoren zusammen mit Brechungsindexdetektoren zu den **am weitesten verbreiteten Detektoren in der HPLC** zählen. Dies liegt unter anderem daran, dass der UV/VIS-Detektor je nach gewählter Wellenlänge entweder selektiv für bestimmte Stoffe (z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) oder universell zur Erfassung vieler unterschiedlicher Analyten eingesetzt werden kann. Mit einem UV/VIS-Detektor lassen sich aber nicht alle Stoffe erfassen. Der Analyt muss UV-Strahlung oder sichtbares Licht der gewählten Wellenlänge **in ausreichendem Mass absorbieren**, um detektiert zu werden. Natürlich besteht die Möglichkeit, zu sehr kleinen Wellenlängen um 200 nm zu gehen, da viele Stoffe in diesem Bereich absorbieren. Das Problem stellt aber häufig die optische Absorption des Lösungsmittels dar, das ebenfalls kleine Wellenlängen absorbiert und von dem sich zu jedem Zeitpunkt viel mehr Moleküle als Analytmoleküle in der Messzelle befinden. Das Absorptionsmaximum der Analyten muss also im Vergleich zum Lösungsmittel zu höheren Wellenlängen verschoben sein.

Mit einem UV/VIS-Detektor lassen sich daher hauptsächlich Moleküle detektieren, die folgende Strukturelemente enthalten:

- **aromatische Ringe oder konjugierte Doppelbindungen**
(Haupt Einsatzbereich von UV/VIS-Detektoren; je grösser das System konjugierter Doppelbindungen bzw. je mehr kondensierte aromatische Ringe umso grösser wird im Allgemeinen die Wellenlänge des Absorptionsmaximums)
- **Doppel- und Mehrfachbindungen**
- **Carbonylgruppen (C=O)**
- **-Br, -I (daneben auch Schwefel- und Stickstoffverbindungen)**

UV/VIS-Detektoren zeichnen sich durch einen grossen linearen Messbereich und gute Nachweisstärken aus, sie werden bei beiden Kriterien aber von Fluoreszenzdetektoren übertroffen. Bei Substanzen, wie bestimmten polyzyklischen Aromaten, welche zur Fluoreszenz angeregt werden können, ist der Einsatz von Fluoreszenzdetektoren (siehe Abschnitt 3.4.4) daher vorteilhaft. Bei Verbindungen, die nicht ausreichend UV/VIS-aktiv sind, müssen Detektoren mit universellerem Einsatzbereich (z.B. Brechungsindexdetektor oder Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektor) verwendet werden.

3.4.2 Brechungsindexdetektor (RID)

Der **Brechungsindexdetektor** (*refractive index detector* = **RI detector** = **RID**) ist der klassische **Universaldetektor** in der HPLC. Mit ihm lassen sich fast alle Substanzen erfassen. Der Detektor ist ein **Durchflussrefraktometer**, welches zu jedem Zeitpunkt den Brechungsindex der Flüssigkeit bestimmt, welche durch das Gerät fließt. Natürlich hat auch der Eluent einen Brechungsindex, welcher die Grundlinie des Chromatogramms bestimmt und vom Gerät meist automatisch abgezogen wird. Da praktisch jede gelöste Substanz den Brechungsindex ändert, ist der Brechungsindexdetektor sehr universell einsetzbar. Allerdings ist die Nachweisstärke üblicherweise geringer als die des UV/VIS-Detektors. Die Nachweisgrenze liegt für viele Substanzen 2–3 Größenordnungen über der des UV/VIS-Detektors. Dies hängt mit der erforderlichen Differenzbildung zwischen dem Signal von Analyt + Eluent und dem reinen Lösungsmittelsignal und der starken Temperaturabhängigkeit des Signals zusammen. Um eine stabile Grundlinie zu erhalten, muss die Messzelle eines RI-Detektors auf 0.01 bis 0.001°C konstant gehalten werden, was unter Durchflussbedingungen kaum zu realisieren ist.

Aus diesem Grund wird der RI-Detektor meist nur dann eingesetzt, wenn UV/VIS-inaktive Analyten erfasst werden sollen. Dazu zählen:

- **Zucker, Kohlenhydrate**
- **Fettsäuren**
- **gesättigte Alkane und deren Alkohole**
- **gesättigte Polymere**

Ein weiterer Nachteil der Brechungsindexdetektion besteht in ihrer **Inkompatibilität mit der Gradientenelution**. Ändert sich der Brechungsindex des Eluenten dauernd während der Trennung, kann es zu sehr steilen Anstiegen oder Abfällen der Basislinie des Chromatogramms kommen, was eine Erfassung oder gar quantitative Auswertung von Peaks unmöglich machen kann. In solchen Fällen ist der ebenfalls universell einsetzbare Verdampfungs-Lichtstreuendetektor in den letzten Jahren immer wichtiger geworden.

3.4.3 Verdampfungs-Lichtstreuendetektor (ELSD)

Der **Verdampfungs-Lichtstreuendetektor** (*evaporative light scattering detector* = **ELSD**) ist wie der Brechungsindexdetektor **sehr universell einsetzbar**. Er basiert auf der Messung der Lichtstreuung an festen Analytpartikeln in der Gasphase. Der Eluentstrom wird mittels Stickstoff fein vernebelt. Man erhält ein Aerosol flüssiger Tröpfchen aus mobiler Phase mit gelösten Analyten. In einem beheizbaren Verdampferrohr wird das Lösungsmittel verdampft. Zurück bleiben feste Partikel der Analyten, die das Licht eines Lasers streuen. Das Streulicht wird von einem Photodetektor erfasst und stellt das Chromatographie-Detektorsignal dar, da nur dann Licht auf den Detektor trifft, wenn Analytpartikel im Stickstoffstrom sind.

Aufgrund des Detektionsprinzips lassen sich sehr viele unterschiedliche Substanzen erfassen. Der Einsatzbereich ist also ähnlich **universell** wie der des RI-Detektors. Die Einschränkung liegt darin, dass der **Analyt deutlich weniger flüchtig als der Eluent** sein muss. Ausserdem ist diese Detektionsart **nicht kompatibel mit salzhaltigen Pufferlösungen**, da die hohe Menge an Salzpartikeln das Licht stärker streuen würde

als die Analytmoleküle, welche bei diesem starken Hintergrundsignal nicht messbar wären. Dafür ist der ELSD im Gegensatz zum RI-Detektor **kompatibel mit der Gradientenelution**, da der Eluent bereits vor der Detektion entfernt wird.

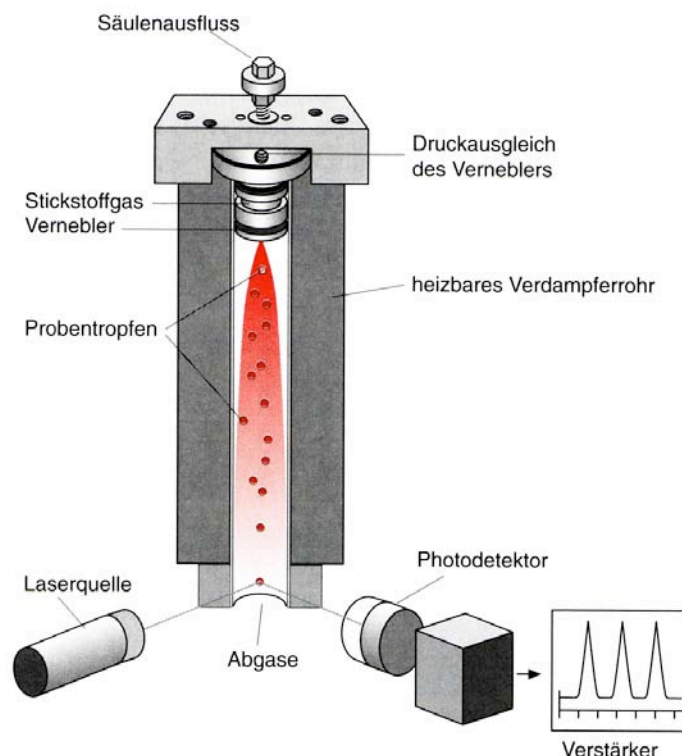


Abb. 3.11: Aufbau und Funktionsweise eines Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektors (ELSD).

3.4.4 Fluoreszenzdetektor

Einige Substanzen (v.a. polyzyklische Aromaten) lassen sich zur Fluoreszenz anregen, d.h. sie absorbieren Licht oder UV-Strahlung und geben die aufgenommene Energie in Form von Strahlung wieder ab. Aufgrund der Energieerhaltung ist die Wellenlänge der emittierten Strahlung gleich gross wie die der Anregungsstrahlung bzw. in den meisten Fällen zu längeren Wellenlängen verschoben (**Rotverschiebung**). Um möglichst nicht vom Anregungslicht beeinflusst zu werden, wird der Detektor meist senkrecht zur Einstrahlungsrichtung angebracht. Dabei nutzt man aus, dass die Fluoreszenzemission in alle Raumrichtungen erfolgt, wogegen der Anregungsstrahl geradlinig die Messzelle durchläuft.

Bei der UV/VIS-Extinktionsmessung wird die von der Probe transmittierte Lichtintensität bestimmt. Diese ist für das reine Lösungsmittel am höchsten und nimmt bei Vorhandensein von absorbierenden Analyten ab. Man muss also die leichte Abnahme eines starken Signals detektieren, um Analyten nachweisstark zu erfassen. Im Gegensatz dazu bestimmt man bei der Fluoreszenz ein Signal, das proportional zur Analytkonzentration und bei Abwesenheit eines Analyten gleich Null ist. Dies lässt sich messtechnisch sehr viel besser erfassen. Ausserdem ist das Signal – im Gegensatz zur UV/VIS-Extinktionsmessung – proportional zur Anregungsintensität. Mit intensiveren Anregungsquellen (bis hin zu Lasern; Laser-induzierte Fluoreszenz = LIF) lässt sich die Nachweisstärke also steigern. Beide Effekte führen dazu, dass

Fluoreszenzdetektion im Allgemeinen etwa drei Grössenordnungen nachweisstärker als UV/VIS-Detektion ist.

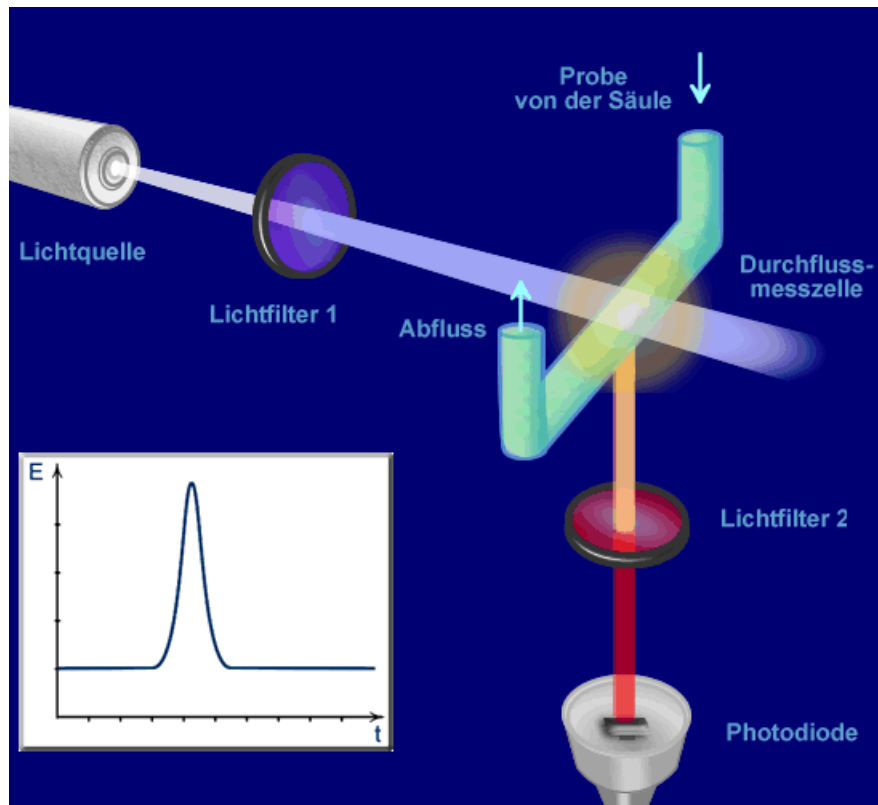


Abb. 3.12: Aufbau und Funktionsweise eines Fluoreszenzdetektors.

Da die üblicherweise eingesetzten Lösungsmittel nicht fluoreszieren, ist die Fluoreszenzdetektion mit allen üblichen Eluenten (auch Pufferlösungen) und **mit Gradientenelution kompatibel**.

Die Einschränkung besteht natürlich darin, dass die Analyten fluoreszieren müssen. Dies kann von Vorteil sein, wenn man gezielt bestimmte Analyten (z.B. polyzyklische Aromaten) ohne Störsignale von anderen Substanzen nachweisen will. Andererseits ist ein Fluoreszenzdetektor **bei weitem nicht so universell einsetzbar wie ein UV/VIS- oder gar ein RI-Detektor oder ELSD**. Ausserdem muss beachtet werden, dass Salzgehalt, pH-Wert und Temperatur der mobilen Phase die Fluoreszenz der Analyten beeinflussen können (Verringerung der Fluoreszenz = **Quenchen**).

Typisches Anwendungsgebiet des Fluoreszenzdetektors sind Analyten mit ausreichender Fluoreszenzquantenausbeute, das sind im Allgemeinen:

- **Polyzyklische aromatische Verbindungen**
- **durch Derivatisierung in Fluorophore überführte Analyten** (siehe Abschnitt 3.4.9)

Varianten der Fluoreszenzdetektion sind die **Phosphoreszenzdetektion**, welche zeitverzögerte Emission erfasst, und die **Chemilumineszenzdetektion**. Unter Chemilumineszenz versteht man Licht, welches bei bestimmten chemischen Reaktionen entsteht. Da nur wenige Substanzen solche Reaktionen eingehen können, ist diese Art der Detektion auf wenige biochemische Fragestellungen begrenzt. Sie ist allerdings

extrem nachweisstark. Der Detektoraufbau ist dem des Fluoreszenzdetektors sehr ähnlich mit dem Unterschied, dass keine Strahlungsquelle erforderlich ist. Dafür sind Möglichkeiten zur Zudosierung von Chemilumineszenz-Reagenzien und Reaktions-schleifen erforderlich, in denen die Substanzen genügend Zeit zur Reaktion haben.

3.4.5 Leitfähigkeitsdetektor

Die Detektion von Substanzen aufgrund von Leitfähigkeitsunterschieden des Gemisches „Analyt + Eluent“ ist besonders bei der Ionenanalytik von Bedeutung und wird im Abschnitt über **Ionenchromatographie** getrennt behandelt (siehe unten). Die Hauptschwierigkeit liegt in der hohen Grundleitfähigkeit der als mobile Phase eingesetzten Pufferlösungen. Deshalb werden vor dem Detektor Supressorsäulen eingebaut, in welchen die Ladung der Puffersalze neutralisiert wird.

3.4.6 Elektrochemische Detektoren

Zu den elektrochemischen Detektoren zählen amperometrische und coulometrische Detektoren. Die elektrochemische Detektion basiert auf der Messung des **Stromflusses zwischen zwei Elektroden während der Oxidation oder Reduktion von Analytmolekülen**. Elektrochemische Detektoren sind für bestimmte Stoffklassen sehr viel **nachweisstärker** als UV/VIS-Detektoren und stellen für einige Substanzen die mit Abstand nachweisstärkste Detektionsmöglichkeit dar (z.B. die Neurotransmitter aus der Gruppe der Catecholamine).

Die Haupteinschränkung dieser Detektoren liegt darin, dass **nur oxidierbare oder reduzierbare Substanzen erfasst** werden können. Ausserdem muss die Grundleitfähigkeit der mobilen Phase ausreichend sein, weshalb oft dem Lösungsmittel Leitsalze (z.B. quarternäre Ammoniumsalze) zugesetzt werden müssen. Da die Grundleitfähigkeit stark von der Lösungsmittelzusammensetzung abhängt, ist die elektrochemische Detektion im Allgemeinen **nicht mit Gradientenelution kompatibel**. Eine Ausnahme stellt ein von einem Hersteller erhältlicher coulometrischer Array-Detektor dar, bei dem zwischen vier und 16 Arbeitselektroden mit verschiedenen Potentialen in Serie geschaltet werden und ein mathematisches Verfahren die Steilheit der Grundlinie im Gradientenbetrieb auf ein erträgliches Mass senken kann. Dadurch ist die coulometrische Detektion auch im Gradientenbetrieb bedingt einsetzbar, der Preis dieses Detektors beträgt aber ein Vielfaches einfacher coulometrischer Detektoren.

Zum Einsatzbereich der elektrochemischen Detektoren zählen:

- **phenolische Verbindungen, Hydrochinone, Chinone**
- **aromatische Amine**
- **Stickstoff-Heterocyclen**
- **Thiole**
- **Nitroverbindungen**
- **Ferrocenderivate**

3.4.7 Massenspektrometer als HPLC-Detektoren

Die **Massenspektrometrie (MS)** stellt ein sehr leistungsfähiges Verfahren zur Detektion in der Chromatographie dar. MS ermöglicht die **qualitative Identifizie-**

rung von Substanzen sowie die **massenselektive Detektion**, wodurch im Prinzip auch koeluierende Substanzen getrennt erfasst werden können. Die Schwierigkeit einer Online-Kopplung von HPLC und MS besteht darin, die Analyten in die Gasphase zu überführen und das Lösungsmittel abzutrennen. Aus diesem Grund waren GC-MS-Kopplungen lange vor den ersten HPLC-MS-Geräten erhältlich. Nach ersten kommerziellen Ansätzen zur Kopplung von HPLC mit Elektronenstossionisations(EI)-MS in den 1990er Jahren verhalfen die neueren Ionisationsmethoden bei Atmosphärendruck der LC-MS zum Durchbruch. Besonders wichtig sind hier die weichen Ionisationsmethoden **Elektrosprayionisation (ESI)** und **chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionisation* = APCI)**.

- **Elektrosprayionisation (ESI)**

Beim ESI-HPLC-Interface wird das Eluat durch eine Kapillare, an die eine Hochspannung von etwa 3 kV angelegt ist, mit Hilfe eines Nebulizergases (meistens Stickstoff) in feine Tröpfchen versprüht. Es entstehen hochgeladene Tröpfchen, bei denen das Lösungsmittel auf dem Weg zum Massenspektrometer nach und nach verdunstet. Die Konzentration der Ladungen auf den immer kleiner werdenden Tröpfchen führt zu sogenannten „Coulomb-Explosionen“, was die Tröpfchen immer kleiner werden lässt und schliesslich zu desolvatisierten Analytionen führt, da die Ladungen letztendlich auf die Analyten übertragen werden. Diese Ionen werden in einem Massenspektrometer getrennt. Da es sich um eine weiche Ionisationsmethode handelt, entstehen hauptsächlich unterschiedlich stark geladene Formen des Pseudomoleküls $[M+H]^+$ bzw. $[M+nH]^{n+}$. Bei kleinen Molekülen wird vor allem das einfach geladene $[M+H]^+$ beobachtet. Mehrfach geladene Ionen spielen vor allem bei grossen Biomolekülen wie z.B. Proteinen eine Rolle. Ebenfalls sind MS-Messungen im negativen Modus möglich, wobei Pseudomoleküle der Form $[M-nH]^{-}$ detektiert werden.

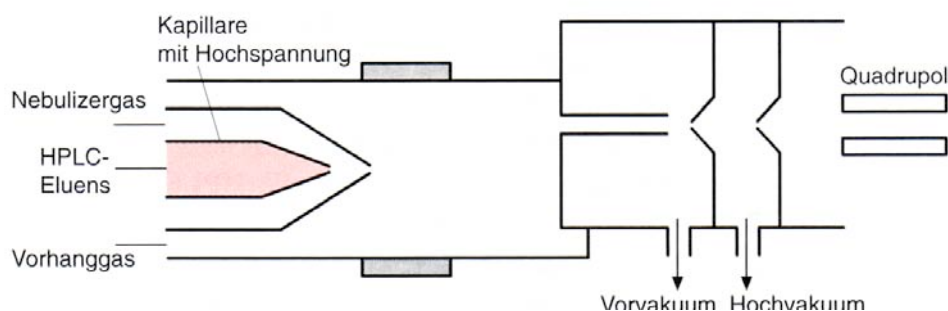


Abb. 3.13: Prinzipieller Aufbau eines ESI-HPLC-Interfaces.

Das ESI-Verfahren ist vor allem für polare Moleküle geeignet, insbesondere solche mit funktionellen Gruppen, die sich leicht protonieren oder deprotonieren lassen, was auf viele Moleküle bis hin zu Biopolymeren zutrifft. Dagegen sind unpolare Moleküle, wie unfunktionalisierte polyzyklische Aromaten der ESI nicht ohne vorherige Derivatisierung zugänglich.

- **Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)**

Auch für unpolare Moleküle geeignet ist das mit der ESI verwandte APCI-Verfahren. Auch hier wird das Eluat mittels einer Kapillare und eines Nebulizergases fein versprüht. Im Gegensatz zur ESI ist aber an die Kapillare keine Hochspannung

angelegt, die Kapillare wird dagegen stark geheizt. Eine Coronarentladung ionisiert hauptsächlich – aufgrund ihrer grösseren Anzahl – Moleküle des Trägergases und des Lösungsmittels. Diese übertragen ihre Ladung auf die Analytmoleküle während das Lösungsmittel verdampft. Auch hier handelt es sich um eine weiche Ionisationsmethode, welche protonierte und deprotonierte, unfragmentierte Pseudomolekülonen wie in der ESI erzeugt.

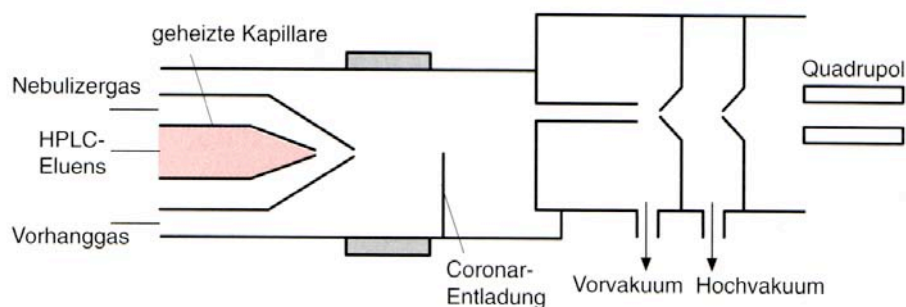


Abb. 3.14: Prinzipieller Aufbau und Funktionsweise eines APCI-MS-Interfaces.

Vorteil der weichen Ionisationsmethoden ist die einfache Interpretation der Spektren. Im einfachsten Fall werden die Ionen in einem Quadrupol-MS analysiert, was auf sehr einfache Weise die Bestimmung der Molekülmasse ermöglicht. Dagegen fehlen in dieser Variante die Strukturinformationen, die man z.B. in der EI-MS aus den Fragmentierungen erhält. Aus diesem Grund werden neben den einfachen Quadrupol- auch *Triple Quadrupole*-Geräte eingesetzt, in denen drei Quadrupole in Serie geschaltet sind. Ionen eines bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnisses werden im ersten Quadrupol selektiert. Im zweiten werden sie mit Hilfe eines Kollisionsgases fragmentiert und die Fragmente im dritten Quadrupol analysiert. Ionenfallengeräte (*ion trap* = IT) ermöglichen neben dieser Tandem-MS auch die Durchführung mehrerer Fragmentierungen hintereinander. Moderne kommerzielle Geräte ermöglichen die Durchführung von bis zu 10 Fragmentierungsschritten, was man als MS^{10} bezeichnet. Einem *Triple Quadrupol*-Gerät ähnlich ist das Quadrupol-Flugzeit-MS (*Quadrupole-time of flight* = *Quadrupole TOF* = QTOF). Auch hier wird ein Quadrupol-MS zur Selektion eines bestimmten Ions eingesetzt, das in einer Kollisionszelle fragmentiert wird. Die Fragmente werden dann aber in einem TOF-MS analysiert, das mit hoher Auflösung und in hoher Geschwindigkeit Fragmentspektren aufzeichnet. QTOF-Geräte sind teuer und kompliziert in der Wartung. Hochaufgelöste Fragmentspektren sind aber bei bestimmten Anwendungen in der Proteinanalytik unerlässlich.

3.4.8 Weitere Detektoren

Wesentlich seltener als die bisher genannten Varianten kommen die **Infrarotspektroskopie (IR)** und die **Kernmagnetische Resonanz (*nuclear magnetic resonance* = NMR)** als Detektionsprinzipien in der HPLC zum Einsatz.

- **Infrarot-Detektor (IR-Detektor)**

Ein IR-Detektor ist im Prinzip ähnlich aufgebaut wie ein UV/VIS-Detektor, wobei Infrarotstrahlung durch eine Küvette geschickt wird und das IR-Absorptionsspektrum der Lösung „Eluent+Analyt“ aufgenommen wird. Da das Lösungsmittel auch IR-Absorptionsbanden hat, muss es sorgfältig ausgewählt werden, um die Analytbanden nicht zu überdecken. Aufgrund dieser Limitierungen kann ein IR-Detektor oft nur begrenzt eingesetzt werden. Die Nachweisstärke der IR-Detektoren ist eher gering und etwa vergleichbar mit jener des Brechungsindexdetektors.

- **NMR-Detektor**

Wegen der Möglichkeiten zur Strukturaufklärung ist die Kernmagnetische Resonanz (*nuclear magnetic resonance* = NMR) prinzipiell eine hervorragende Detektionsmethode. NMR ist allerdings nicht sehr empfindlich, was technisch aufwendige „stopped-flow“ Einrichtungen nötig macht, da eine NMR-Messung Minuten dauern kann. Eine weitere Voraussetzung ist das Verwenden von deuterierten Lösungsmitteln. Da NMR zudem eine teure Methode ist, wird sie in der Praxis selten direkt mit LC gekoppelt.

3.4.9 Derivatisierung

Wie bei der Fluoreszenzdetektion (Abschnitt 3.4.4) bereits erwähnt, werden Derivatisierungen meist dann durchgeführt, wenn Analyten nicht oder nur mit ungenügender Empfindlichkeit mit einem bestimmten Detektor erfasst werden können. So sind der Fluoreszenzdetektion nur fluoreszierende Moleküle zugänglich. Alternativ kann man aber die Analyten durch chemische Reaktion mit Fluorophoren in fluoreszierende Derivate überführen. Auch für UV/VIS-inaktive oder nur schwach absorbierende Verbindungen besteht die Möglichkeit der Derivatisierung mit stark absorbierenden Molekülen, die z.B. aromatische Ringe enthalten.

Ein verbreitetes Verfahren zur Analyse von Aldehyden und Ketonen ist die Derivatisierung mit **2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)** zu den entsprechenden Hydrazonen und Trennung über RP18-Säulen mit anschließender UV-Detektion. Das Absorptionsmaximum von DNP-Hydrazonen liegt bei etwa 360 nm.

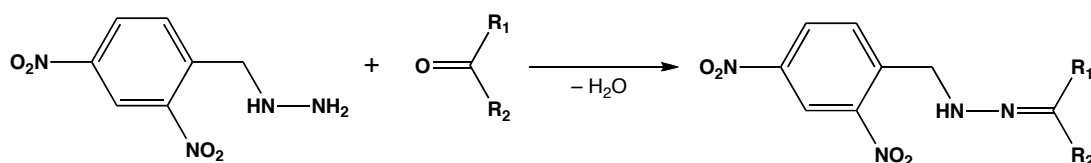


Abb. 3.15: Umsetzung von Aldehyden und Ketonen zu DNP-Hydrazonen.

Primäre Amine lassen sich durch Umsetzung mit **5-(N,N-Dimethylamino)-naphthalin-1-sulfonylchlorid (Dansylchlorid)** zu den entsprechenden Sulfonamiden der nachweisstarken Fluoreszenzdetektion in der HPLC zugänglich machen.

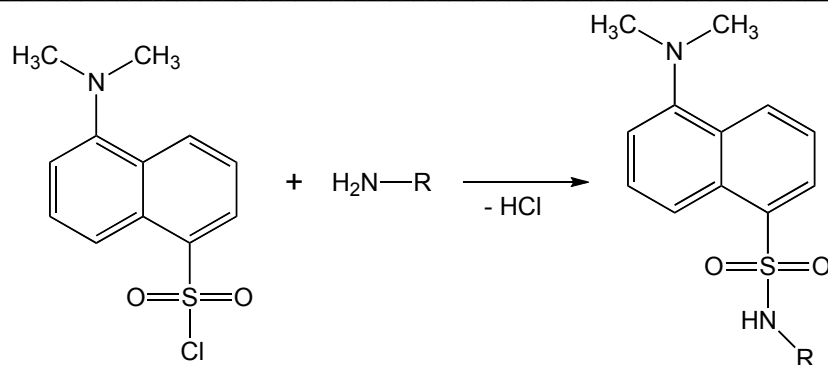


Abb. 3.16: Reaktion von primären Aminen mit Dansylchlorid zu den entsprechenden blau bis blaugrün fluoreszierenden Sulfonamiden.

Tabelle 5 führt einige Derivatisierungsmöglichkeiten für die HPLC auf.

Tab. 5: Derivatisierungsreagenzien für die HPLC.

Funktionelle Gruppe	Derivatisierungsreagenz	Detektor
-NH ₂ (Amine, Aminosäuren)	5-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid (Dansylchlorid)	Fluoreszenz
	2,4-Dinitrofluorbenzen	UV/VIS
-OH (Alkohole)	3,5-Dinitrobenzoylchlorid	Fluoreszenz
	Dansylchlorid	Fluoreszenz
-CHO (Aldehyde)	2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)	UV/VIS
-CRO (Ketone)	4-Hydroazino-7-nitrobenzofurazan	Fluoreszenz
-COOH (Carbonsäuren)	4-Brommethyl-7-methoxycoumarin	Fluoreszenz
-SH (Thiole)	Dansylaziridin	Fluoreszenz

3.5 Weitere Varianten der LC

Mittels der sehr universell einsetzbaren Normal- und Umkehrphasen lassen sich in der HPLC kleine Moleküle bis hin zu Biopolymeren nach ihrer Polarität trennen. Daneben existieren weitere Varianten der LC, die zum Teil speziell auf einen bestimmten Anwendungsbereich zugeschnitten sind, wie etwa Ionenanalytik mittels Ionenchromatographie oder die Trennung von Polymeren nach ihrer Grösse mittels Gelpermeationschromatographie.

3.5.1 Ionenchromatographie

Mittels Normalphasen- und Umkehrphasen-HPLC lassen sich im Allgemeinen nur ungeladene Moleküle analysieren. Für die Trennung von Ionen existiert eine mit der klassischen HPLC eng verwandte Technik: die **Ionenchromatographie (IC)**, wobei wir uns hier auf die **Ionenaustauschchromatographie (ion exchange chromatography = IEC)** als die bei weitem wichtigste Form beschränken.

- **Prinzip**

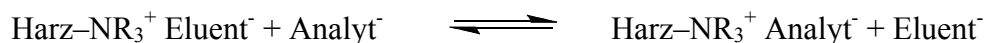
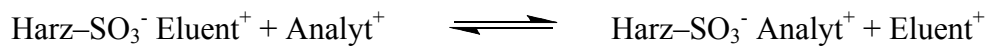
In der Ionenchromatographie werden Ionenaustauscher als stationäre Phase eingesetzt. Diese basieren meist auf organischen Polymeren (Austauscherharze), wie Copolymeren aus Polystyren und Divinylbenzen (PS-DVB), die an ihrer Oberfläche kovalent gebundene ionische Ankergruppen tragen. Im Falle eines Kationen-

austauschers sind dies anionische, im Fall eines Anionenaustauschers kationische Gruppen. Tabelle 6 gibt einige wichtige Beispiele.

Tab. 6: Funktionelle Gruppen herkömmlicher Anionen- und Kationenaustauscher.

	Funktionelle Gruppen	Eigenschaften
Kationenaustauscher	-COOH, -OPO ₃ H ₂	schwach sauer
	-SO ₃ H	stark sauer
Anionenaustauscher	Primäre Amine -NH ₂ bzw. -NH ₃ ⁺ OH ⁻	schwach basisch
	Quarternäre Ammoniumsalze -NR ₃ ⁺ OH ⁻	stark basisch

Bei einem Kationenaustauscher können Kationen aus einer Lösung an die Ankergruppen binden, die dabei andere Kationen (z.B. H⁺) an die Lösung abgeben. Im Gegensatz dazu tauschen Anionenaustauscher gelöste Anionen gegen andere Anionen wie OH⁻ aus. In der Ionenchromatographie durchströmt erst reiner Eluent die Säule, weshalb die Ankergruppen des Ionenaustauschers mit Eluentionen belegt sind. Wird die Probe injiziert, können diese mit Analytationen austauschen:



Die Analytationen konkurrieren also mit den Eluentionen um die Bindungsstellen auf dem Austauscherharz. Die Verteilungskonstanten sind damit durch die Gleichgewichtskonstanten dieser Gleichgewichtsreaktionen gegeben. Es wird auch klar, dass in der Ionenchromatographie nur entweder Kationen oder Anionen getrennt werden können, da für erstere ein Kationenaustauscher und für letztere ein Anionenaustauscher als stationäre Phase erforderlich ist.

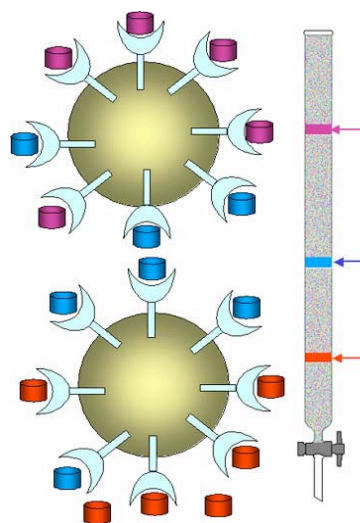


Abb. 3.17: Prinzip der Ionenaustauschchromatographie: Analytationen binden unterschiedlich stark an Ankergruppen eines Ionenaustauscherharzes.

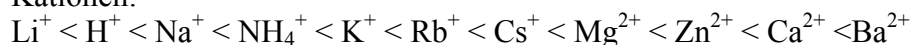
Als **mobile Phasen** kommen in der IC üblicherweise wässrige Pufferlösungen zum Einsatz, die zu den Austauschern passende Gegenionen enthalten. In der Anionenchromatographie ist dies häufig eine Natriumhydrogencarbonat-Lösung (Eluent⁻ = HCO₃⁻ in obiger Gleichung). In der Kationenchromatographie kommen oft stark verdünnte Salz- oder Salpetersäure zum Einsatz (Eluent⁺ = H⁺ in obiger Gleichung). Man wählt möglichst Elutionen, die eine ähnliche Bindungsstärke zum Austauscher aufweisen wie die Analytione. Das heisst, dass man bei der Trennung zweiwertiger Kationen auch zweiwertige Elutionen verwendet.

Die Trennung erfolgt also nach der Bindungsstärke der Analytione an das Ionenaustauscherharz. Diese wird im Wesentlichen von Ladung, Grösse (inklusive Hydrathülle) und Polarisierbarkeit des Ions bestimmt. Stärker geladene und kleinere Ionen binden im Allgemeinen stärker an die stationäre Phase und werden daher stärker retendiert, während grosse und schwach geladene Ionen früher eluiert werden. Da sich aber die Grösse der Hydrathülle und die Polarisierbarkeit oft schwer einschätzen lassen und daneben die Eigenschaften der mobilen Phase (z.B. pH-Wert und Salzkonzentration) die Trennung beeinflussen, kann die Elutionsreihenfolge oft nicht vorausgesagt werden. Allgemein kann man aber sagen, dass einwertige Ionen vor zweiwertigen eluiert werden.

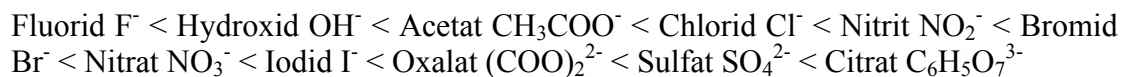
Die **Analyten** in der IC sind meistens anorganische Kationen oder Anionen. Ein typisches Anwendungsfeld ist die Wasseranalytik. So basiert das auf Mineralwasserflaschen angegebene Analysenergebnis meistens auf Ionenchromatographie. In selteneren Fällen wird die IC auch zur Trennung organischer Ionen eingesetzt. Der IC sind im Allgemeinen organische Stoffe zugänglich, die sich leicht protonieren oder deprotonieren lassen. Der pH-Wert des Eluenten muss in dem Fall so eingestellt werden, dass die Analyten sicher in ihrer ionischen Form vorliegen. Beispiele sind die Trennung von Aminen in saurer oder von Zuckern in stark alkalischer Lösung.

Man beobachtet oft folgende Elutionsreihenfolgen (nach aufsteigender Retentionszeit geordnet):

Kationen:



Anionen:



Abhängig von der mobilen und stationären Phase, die verwendet wird, beobachtet man mehr oder weniger starke Abweichungen von dieser Reihenfolge.

- **Aufbau**

Ein Ionenchromatograph ist sehr ähnlich wie eine HPLC für den Normalphasen- oder Umkehrphasenbetrieb aufgebaut (siehe Abbildung 3.3). Der Eluent wird mittels einer HPLC-Pumpe durch die Säule befördert, wobei auch Gradientenbetrieb möglich ist. Bei der Auswahl der Komponenten muss man beachten, dass die wässrigen, manchmal sauren, Eluenten korrosiv wirken können. Die Säulen bestehen aus diesem Grund auch nicht aus Edelstahl wie bei der normalen HPLC, sondern sind meist 1–5 mm breite und 5–25 cm lange Kunststoffrohre, die mit Ionenaustauscherharz gefüllt sind. Problematisch bei Edelstahl wäre zusätzlich, dass Ionen aus dem Material herausgelöst werden könnten, welche das Analysenergebnis verfälschen. Der typische Detektor in der IC ist der Leitfähigkeitsdetektor, welcher im Folgenden erklärt wird. Daneben lassen sich im Prinzip auch alle Detektoren verwenden, die aus der HPLC bekannt sind (siehe Abschnitt 3.4), ihr Einsatzbereich ist aber häufig auf wenige Ionen eingeschränkt. So kann ein UV-Detektor nur UV-absorbierende Ionen erfassen. Dazu zählen Bromid, Iodid, Nitrat und Nitrit.

- **Leitfähigkeitsdetektor**

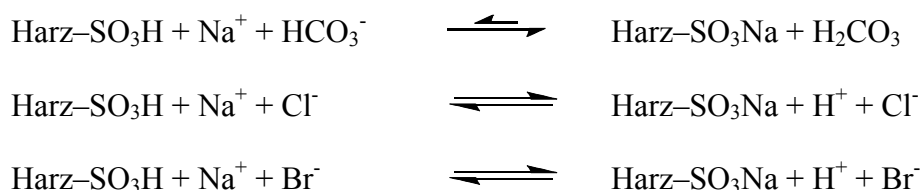
Der **Universaldetektor** in der Ionenchromatographie ist der Leitfähigkeitsdetektor, der ausnutzt, dass die elektrische Leitfähigkeit einer Flüssigkeit direkt proportional zur Konzentration der gelösten Ionen ist. Problematisch ist die Konzentration der Elutionen, welche die der Analytionen um ein Vielfaches übersteigt. Die Grundleitfähigkeit ist damit sehr hoch, und die geringen Änderungen bei Anwesenheit von Analytionen lassen sich kaum detektieren. Zusätzliche Probleme entstehen beim Gradientenbetrieb, da hier die kontinuierliche Änderung der Leitfähigkeit zu einer stark ansteigenden oder abfallenden Grundlinie im Chromatogramm führen, weshalb sich Peaks kaum erkennen geschweige denn quantitativ auswerten lassen. Aus diesen Gründen kommen sogenannte **Suppressoren** zum Einsatz.

Die klassische Form eines Suppressors ist die **Suppressorsäule**. Darunter versteht man Ionenaustauschersäulen, welche zwischen der Trennsäule und dem Detektor eingebaut sind. Im Fall der Kationenanalytik enthält die Suppressorsäule einen Anionenaustauscher, bei der Anionenanalytik ist der Suppressor ein Kationenaustauscher. Aufgabe des Suppressors ist es, die **Ladung von Elutionen zu neutralisieren und so die Grundleitfähigkeit herabzusetzen**.

Tab. 7: Eigenschaften von Trenn- und Suppressorsäule in der Ionenchromatographie.

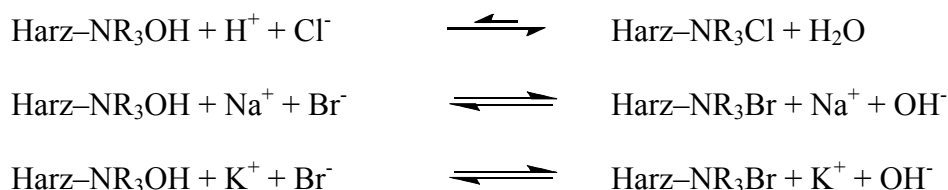
	Trennsäule	Suppressorsäule
Kationenanalyse	Kationenaustauscher	Anionenaustauscher
Anionenanalyse	Anionenaustauscher	Kationenaustauscher

Werden in der **Anionenanalytik** beispielsweise Chlorid und Bromid (jeweils als Natriumsalze) mit einem Natriumhydrogencarbonat-Eluenten getrennt, so laufen in der Suppressorsäule folgende Reationen ab:



In der ersten Reaktion wird das Elution in seiner Ladung neutralisiert, indem der Kationenaustauscher H^+ freisetzt, das mit HCO_3^- zur schwach dissoziierenden Kohlensäure reagiert. Da die Kohlensäure eine schwache Säure ist, liegt das Gleichgewicht deutlich auf der rechten Seite. Gleichzeitig können auch die Gegenionen der Analytionen (in diesem Fall Na^+) mit dem Kationenaustauscher reagieren, der wiederum H^+ freisetzt. Damit wird das Na^+ -Ion durch das kleine und damit gut leitende H^+ -Ion ersetzt. Neben der Verringerung der Grundleitfähigkeit wird also auch die Leitfähigkeit bei Anwesenheit von Analytionen erhöht. Beide Effekte erhöhen die Nachweisstärke des dem Suppressor nachgeschalteten Leitfähigkeitsdetektors.

Werden im gegenteiligen Fall in der **Kationenanalytik** Na^+ und K^+ mit einem HCl-Eluenten getrennt, laufen im Suppressor (in diesem Fall ein Anionenaustauscher) folgende Reaktionen ab:



In diesem Fall setzt der Ionentauscher bei Reaktion mit den Elutionen OH^- frei, was mit dem H^+ des Eluenten zu Wasser reagiert, welches im Vergleich zu HCl sehr viel schwächer dissoziiert. Damit wurden auch hier geladene Substanzen auf der linken Seite der Reaktionsgleichung in ungeladene überführt, weshalb die Grundleitfähigkeit sinkt. Gleichzeitig wird in diesem Beispiel Br^- gegen OH^- ausgetauscht, welches zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit bei Anwesenheit der Analytionen führt.

Die Einschränkung bei der Verwendung von Suppressorsäulen besteht darin, dass diese nach der Analyse regeneriert werden müssen, was den kontinuierlichen Betrieb und den Analysendurchsatz einschränkt. Heute verwendet man daher meist mehrere Suppressorsäulen in einer IC-Apparatur, von denen jeweils eine im Einsatz ist während die anderen regeneriert werden. Da das Umschalten automatisch erfolgt, ist ein kontinuierlicher Betrieb des Systems gewährleistet. Alternativ können auch Hohlfasermembransuppressoren eingesetzt werden, bei denen der Ionenaustausch durch eine Membran hindurch geschieht, die selektiv nur Kationen oder Anionen durchlässt. Der Eluent fließt hier durch eine Hohlfaser, deren Wand aus dem Membranmaterial besteht. An der Aussenseite der Membran wird im Gegenstrom die Regenerationslösung geführt.

• Weitere Detektoren

Im Prinzip lassen sich alle gängigen HPLC-Detektoren auch in einem IC-System betreiben. Da meist anorganische Ionen getrennt werden, ist ihr Einsatzbereich aber meist eingeschränkt. So lassen sich mit einem UV-Detektor nur UV-absorbierende Ionen erfassen. Dazu zählen NO_3^- , NO_2^- , Br^- und I^- . Auch die Fluoreszenzdetektion ist im Prinzip möglich, wenn man dem Eluenten fluoreszierende Hilfsreagenzien zusetzt, deren Fluoreszenz sich bei Anwesenheit von Analytionen ändert. Die weitaus am häufigsten eingesetzte Detektionsart ist aber die Leitfähigkeitsdetektion, da sich mit ihr alle ionischen Substanzen erfassen lassen.

3.5.2 Dünnschichtchromatographie

In der **Dünnschichtchromatographie (DC, thin layer chromatography = TLC)** arbeitet man anstelle von Säulen mit **planaren Chromatographiemedien (DC-Platten)**. Als stationäre Phase finden die gleichen Materialien wie in der Normalphasen-HPLC Verwendung, wie z.B. Kieselgel und Aluminiumoxid. Daneben sind auch Umkehrphasen erhältlich wie die in der HPLC weit verbreitete RP18-Phase. Darüber hinaus kommen auch DC-spezifische Phasen wie z.B. Cellulose zum Einsatz. Die stationäre Phase besteht üblicherweise aus Partikeln mit Durchmessern von 3–20 μm , welche in 100–250 μm dicken Schichten auf einem Trägermaterial (Kunststoff-, Aluminiumfolie oder Glasplatte) immobilisiert sind. Damit die Partikel ausreichend auf der Oberfläche haften, ist der stationären Phase oft ein Bindemittel (Calciumsulfat, Stärke oder Polymere) zugesetzt. Sehr kleine Partikel (< 5 μm), welche in der HPTLC zum Einsatz kommen (siehe unten), benötigen aufgrund ihrer starken Adhäsionskräfte kein zusätzliches Bindemittel.

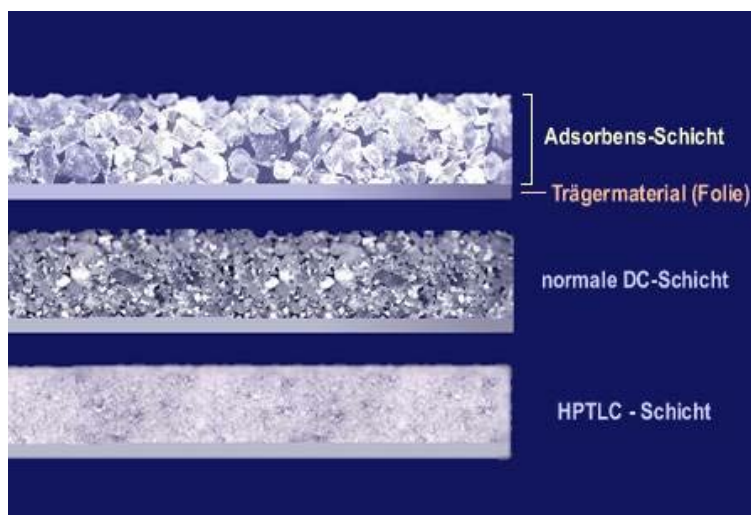


Abb. 3.18: Schnitt durch verschiedene DC-Platten mit unterschiedlichen Partikelgrößen der stationären Phase (auch Adsorbens-Schicht genannt). Es kommen unterschiedliche Partikelgrößen zum Einsatz, wobei die kleinsten (< 5 μm) in der HPTLC verwendet werden.

Ähnlich wie in der Papierchromatographie wird die DC-Platte (20–40 cm hoch und 5–20 cm breit) senkrecht in eine kleine Menge der mobilen Phase gestellt, welche dann aufgrund der Kapillarkräfte in der stationären Phase nach oben steigt. Die **Lineargeschwindigkeit** wird in diesem Fall also nicht durch eine Pumpe vorgegeben, sie ist im Wesentlichen durch Partikelgröße und -form sowie Eigenschaften der

mobilen Phase bestimmt. Beispielsweise bewegt sich Ethanol als mobile Phase etwa 10 mal so schnell durch eine typische RP18-Phase als ein 50% : 50% Ethanol-Wasser-Gemisch. Ähnlich wie in der HPLC kann eine Vielzahl an Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen als mobile Phase (Laufmittel) zum Einsatz kommen.

• Durchführung

Die Analyten werden als Lösung in Form kleiner Flecken oder dünner, waagrecht Linien auf die DC-Platte aufgebracht (1–2 cm oberhalb des unteren Randes, damit die Probe nicht direkt in die mobile Phase eintaucht). Zum Auftüpfeln der Proben benutzt man meistens dünne Glaskapillaren. Die Startlinie wird markiert (z.B. mit Bleistift). Die stationäre Phase befindet sich in einer DC-Kammer, die man oben verschliessen kann, damit die Gasphase immer mit Lösungsmitteldampf gesättigt ist, um reproduzierbare Bedingungen zu erzielen. Die mobile Phase steigt nach oben und nimmt die Analytmoleküle mit. Den Prozess, bei dem die mobile Phase über die stationäre läuft, nennt man in der DC bzw. TLC **Entwicklung**. Die Trennung kann nach beliebiger Zeit abgebrochen werden oder kommt zum Stillstand, wenn sich Kapillarkräfte und Gravitationskraft ausgleichen. Man nimmt die DC-Platte aus der Kammer, markiert die Position der Lösungsmittelfront und lässt die Platte trocknen. Wird bei einem Lauf keine ausreichende Trennung erreicht, besteht auch die Möglichkeit, die Trennung zu unterbrechen, die Platte trocknen zu lassen und anschliessend mit einem anderen Lösungsmittelgemisch weiterzuentwickeln. Dieses Vorgehen ist vergleichbar mit der Gradientenelution. Darüber hinaus kann man die Platte für den zweiten Lauf auch um 90° drehen, wobei man von 2D-DC spricht. Mit einer solchen zweistufigen Entwicklung ist es möglich, Verbindungen über einen weiten Polaritätsbereich (wie in der NP-HPLC und RP-HPLC erfolgt hier die Trennung nach der Polarität) auf einer Platte trennen.

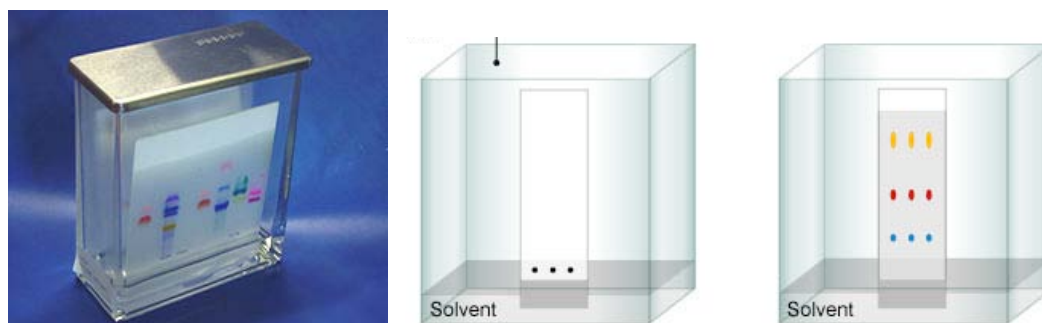


Abb. 3.19: (links) DC-Platte am Ende der Trennung verschiedener farbiger Substanzen in einer DC-Kammer. (rechts) Prinzipieller Ablauf einer Trennung.

• Detektion

Im Gegensatz zur HPLC erfolgt in der DC bzw. TLC keine zeitliche sondern eine räumliche Trennung der Analyten auf der Platte. Das Ergebnis ist also kein Chromatogramm, sondern die räumliche Anordnung der Analytflecken auf der Platte. Die Auswertung wird weiter unten beschrieben.

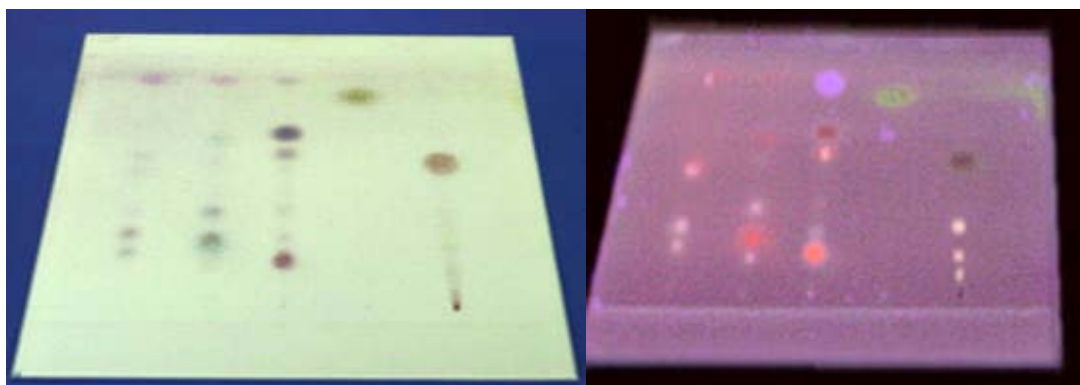


Abb. 3.20: (links) DC-Platte nach der Trennung verschiedener farbiger Substanzen. Hier wurden 5 Proben nebeneinander auf die Platte aufgetragen. (rechts) Im UV-Licht werden aufgrund von Fluoreszenz auch einige ungefärbte Flecken sichtbar.

Eine Auswertung der getrockneten Platte unmittelbar im Anschluss an die Trennung ist nur bei **gefärbten Substanzen** (z.B. Pflanzenfarbstoffe) möglich. Andere Substanzen müssen erst durch verschiedene Detektionsverfahren sichtbar gemacht werden.

Weit verbreitet ist die **Fluoreszenz** als Detektionsverfahren in der DC bzw. TLC. Einige Analyten (z.B. polyzyklische Aromaten) können selber zur Fluoreszenz angeregt (**Autofluoreszenz**) und so durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Am häufigsten angewandt werden UV-Lampen mit den Wellenlängen 254 nm und 366 nm, wobei es auch Geräte gibt, die beide Lampen enthalten, zwischen denen man umschalten kann. Für nicht fluoreszierende Verbindungen besteht die Möglichkeit, DC-Platten zu verwenden, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthalten. Im UV-Licht fluoresziert die ganze Platte. Flecken UV-absorbierender Substanzen schwächen die Fluoreszenz und heben sich so von der Umgebung ab. Kommerziell erhältliche Platten, die einen solchen **UV-Indikator** enthalten, tragen meist die Bezeichnung „F“, „F₂₅₄“ oder „F₃₆₆“ je nach der Absorptionswellenlänge des verwendeten Fluorophors. Die allgemeine Bezeichnung „F“ deutet meist auf einen 254 nm absorbierenden Fluorophor hin.

Bei Substanzen, die weder selber fluoreszieren noch die üblichen UV-Wellenlängen absorbieren und so die Fluoreszenz von „F“-Platten schwächen, müssen **chemische Färbemethoden** angewandt werden. Diese unterscheiden sich in ihrer Selektivität. Meist wird ein Reagens auf die entwickelte und getrocknete Platte aufgesprüht, die anschließend erhitzt wird, um eine chemische Reaktion zwischen den Analyten und dem Reagens ablaufen zu lassen, die zu gefärbten Produkten führt. Sehr universell einsetzbar sind z.B. Schwefelsäure oder Salpetersäure, die nach Erhitzen zu dunklen, verkohlten Analytflecken auf der Platte führen. Selektiver ist z.B. 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (DNPH). DNPH – welches auch als Derivatisierungsreagenz in der HPLC eingesetzt wird – reagiert selektiv mit Aldehyden und Ketonen zu gelb-orange gefärbten Hydrazonen. Für saure und basische Analyten bieten sich pH-Indikatoren zum Sichtbarmachen der DC-Flecken an.

Eine neuere Entwicklung stellt die Anwendung moderner oberflächenanalytischer Methoden zur Detektion in der DC bzw. TLC dar. Beispiele sind hier die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) oder die *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) MS.

- **Auswertung**

Da die DC keine zeitliche sondern eine räumliche Trennung darstellt, treten an die Stelle der Retentionszeiten die Laufstrecken, welche die Analyten während der Trennung zurückgelegt haben. Als Referenz verwendet man immer die Laufstrecke der mobilen Phase (Fließmittel). Aus diesem Grund wird die Fließmittelfront vor dem Trocknen der Platte markiert. Aus den Entfernungen von Analytfleck (z_s) und Fließmittelfront (z_f) von der Startlinie erhält man den **Verzögerungsfaktor oder R_F -Wert**.

$$R_F = \frac{z_s}{z_f} \quad (3.1)$$

Der R_F -Wert liegt zwischen 0 und 1 (1 würde bedeuten, dass die Substanz mit der Fließmittelfront mitgelaufen ist). Manchmal wird der R_F -Wert auch in Prozent angegeben, also der nach Gleichung (3.1) berechnete Wert mit 100% multipliziert, was zu R_F -Werten zwischen 0 und 100% führt. Es kann ausserdem sinnvoll sein, den R_F -Wert im Verhältnis zu einem Standard anzugeben, den man bei der Analyse mitlaufen lässt, was zu einem relativen R_F -Wert führt.

$$R_{F,rel} = \frac{R_{F,Analyt}}{R_{F,Standard}} \quad (3.2)$$

R_F -Werte sind ähnlich wie Retentionszeiten für eine Substanz charakteristisch. Somit lassen sich anhand der R_F -Werte **qualitative Aussagen** treffen. Es empfiehlt sich für qualitative Analysen, immer einen Standard oder ein Standardgemisch mitlaufen zu lassen, um sicherzustellen, dass der R_F -Wert einer Substanz in einer Probe dem R_F -Wert des entsprechenden Standards entspricht, da diese Werte je nach Trennbedingungen von Lauf zu Lauf leicht variieren können. Für eine sichere Identifizierung von Substanzen sind weitere Analysen (z.B. HPLC-MS) nötig.

Ähnlich wie in Gleichung (2.10) lassen sich auch in der DC bzw. TLC **Retentionsfaktoren k** berechnen.

$$k = \frac{z_f - z_s}{z_s} = \frac{1 - R_F}{R_F} \quad (3.3)$$

Auch ungefähre **Bodenzahlen N** und **Bodenhöhen H** lassen sich für Trennflecken in der DC bzw. TLC abschätzen.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{z_s}{W} \right)^2 \quad (3.4)$$

$$H = \frac{z_s}{N} \quad (3.5)$$

Hier ist W die Breite eines Probenflecks, die er in Fließmittelrichtung einnimmt.

Quantitative Aussagen lassen sich praktisch nur mit DC-Plattenscannern erzielen, die in der HPTLC eingesetzt werden (siehe unten).

- **Anwendungen**

Die Hauptvorteile der DC bzw. TLC liegen in der **einfachen Durchführbarkeit, den geringen Kosten und der Möglichkeit, mehrere Proben gleichzeitig auf einer Platte zu analysieren**. Bekannt ist die DC bzw. TLC vor allem im organischen Syntheselabor, wo sie häufig zur Kontrolle von Reaktionslösungen eingesetzt wird, um herauszufinden, wie viele verschiedene Produkte bei einer Reaktion entstanden sind. Ausserdem lässt sich mit DC bzw. TLC die Reinheit eines aufgereinigten Reaktionsproduktes schnell und einfach überprüfen. Im analytischen Labor wird die DC bzw. TLC manchmal vor einer HPLC-Trennung durchgeführt, um mit der gleichen stationären Phase auf der DC-Platte zu überprüfen, ob eine HPLC-Trennung mit einem bestimmten Lösungsmittelgemisch Aussicht auf Erfolg hat.

Darüber hinaus hat sich die DC bzw. TLC aber auch zu einer eigenständigen Analyseverfahren entwickelt, die wegen ihres hohen Probendurchsatzes v.a. in industriellen Labors geschätzt wird. Ein wichtiges Schlagwort hierbei ist das **High-Throughput-Screening**. Darunter versteht man die Analyse vieler Proben in kurzer Zeit. Wird etwa ein industrieller Prozess überwacht, wozu zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen werden, so werden die meisten Proben die erwartete Zusammensetzung haben und somit in der DC die erwarteten R_F -Werte liefern. Ein zeitaufwändigeres Analyseverfahren ist hierzu oft nicht nötig. Nur in den Fällen, in denen „verdächtige“ oder unerwartete DC-Ergebnisse erhalten werden, wird mit HPLC oder anderen instrumentellen Verfahren „genauer hingeschaut“. Ein solches **High-Throughput-Screening** vermindert also Zeitaufwand und Analysekosten bei einem hohen Probenaufkommen ganz erheblich.

Darüber hinaus hat sich die DC bzw. TLC mit der HPTLC zu einem instrumentellen Verfahren weiterentwickelt, das sogar quantitative Analysen ermöglicht.

- **HPTLC**

Die **Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (high performance thin layer chromatography = HPTLC)** unterscheidet sich im Wesentlichen durch zwei Eigenschaften von der normalen DC bzw. TLC. Zum einen werden **kleinere Partikel** ($< 5 \mu\text{m}$) als stationäre Phase verwendet, was die Trenneffizienz erhöht, und zum anderen ist die HPTLC ein **instrumentelles analytisches Verfahren**. Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit werden die Proben von automatisierten Probenaufgabesystemen auf die Platten aufgetragen. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um einen x-y-Plotter, der Probenvolumina im Nanoliterbereich sehr präzise dosiert auf die Platte aufbringt. Nach der Entwicklung (meist mit einer waagrecht liegenden Platte) erfolgt die Auswertung der Probenflecken mittels spezieller Scanner, welche den Bereich der Probenflecken und die Platte neben den Flecken als Referenz abscannen und die Intensität des diffus zurückgestreuten Lichts (Remissionsmessung) oder die Fluoreszenzintensität quantitativ erfassen. Man erhält ein Ergebnis, welches einem Chromatogramm sehr ähnlich sieht (nur dass auf der x-Achse keine Retentionszeiten sondern z-Abstände aufgetragen sind) und dessen Peakintensitäten proportional zur Analytkonzentration sind.

3.5.3 Grössenausschlusschromatographie (SEC)

In der **Grössenausschlusschromatographie** (*size exclusion chromatography* = **SEC**) erfolgt die **Trennung nach der Grösse**, welche Moleküle in der mobilen Phase einnehmen (hydrodynamischer Durchmesser). Im Gegensatz zur NP-HPLC und RP-HPLC versucht man, Wechselwirkungen (z.B. Adsorption) zwischen Analytmolekülen und der Oberfläche der stationären Phase vernachlässigbar klein zu halten. Auch die Eigenschaften der mobilen Phase sollen einen möglichst geringen Einfluss auf die Trennung haben und lediglich als Transportmedium für die Analyten dienen. Im Idealfall beruht die Trennung nur darauf, dass Moleküle aufgrund ihrer Grösse unterschiedlich stark in die Poren der stationären Phase eindringen können und dadurch unterschiedlich retendiert werden.

Oft unterteilt man die Grössenausschlusschromatographie (SEC) weiter in **Gel-permeationschromatographie (GPC)** und **Gelfiltration**. In der GPC werden apolare Lösungsmittel und hydrophobe stationäre Phasen, in der Gelfiltration wässrige mobile Phasen und polare stationäre Phasen verwendet. GPC und Gelfiltration unterscheiden sich also lediglich in ihrem Anwendungsbereich für Analyten, die in organischen Lösungsmitteln (GPC) oder in Wasser oder Pufferlösungen (Gelfiltration) löslich sind. Die Funktionsweise ist allen SEC-Techniken gleich.

- **Prinzip**

In der SEC werden poröse Materialien als stationäre Phase eingesetzt. Weit verbreitet sind quervernetzte Copolymere aus Polystyren und Divinylbenzen (PS-DVB), deren Porengrösse durch den Anteil an DVB im Copolymer kontrolliert werden kann. Dieses Material wird auch als Harz in der Ionenchromatographie eingesetzt, wobei in der SEC aber die ionischen Ankergruppen fehlen. Daneben existieren auch andere poröse Polymerpartikel, Kieselgele und Glaskügelchen mit definierter Porengrösse, die als stationäre Phasen zum Einsatz kommen.

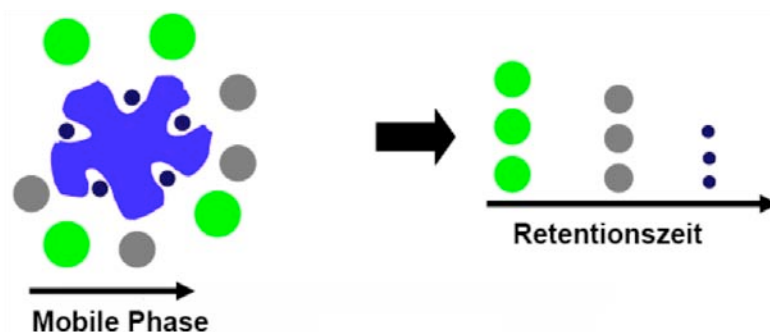


Abb. 3.21: *Prinzip der SEC: Kleine Moleküle können tiefer in die Poren der stationären Phase eindringen und erhalten dadurch eine höhere Retentionszeit.*

Die Retention beruht darauf, dass Moleküle unterschiedlicher Grösse unterschiedlich stark in die Poren eindringen können. Grosse Moleküle können nicht in die Poren eindringen und werden daher nicht retendiert, wogegen sehr kleine Moleküle sehr tief in die Poren eindringen und eine grosse Retentionszeit erhalten. Für die **Retentionsreihenfolge** heisst das: Grosse Moleküle verlassen die Säule vor den kleinen Molekülen.

In ihrem Aufbau ähnelt die SEC sehr der HPLC und ist mit den üblichen HPLC-Detektoren kompatibel.

• **Auswertung**

Im Gegensatz zur HPLC gibt man in der SEC oft anstelle von Retentionszeiten **Retentionsvolumina** V_R an. Retentionszeiten und -volumina lassen sich mit der Volumengeschwindigkeit V' (Volumenstrom z.B. in mL/min) ineinander umrechnen.

$$V_R = t_R \cdot V' \tag{3.6}$$

Das Gesamtvolumen V_t einer mit porösem Material gepackten Säule ist gegeben durch:

$$V_t = V_S + V_0 + V_i \tag{3.7}$$

Hier ist V_S das Volumen der stationären Phase, also der festen bzw. gelförmigen Partikel, V_i das Volumen des Lösungsmittels in den Poren und V_0 das Volumen des freien Lösungsmittels ausserhalb der Poren. Wird ein grosses Molekül nicht retendiert, befindet es sich nur im freien Lösungsmittelvolumen V_0 und verlässt entsprechend die Säule beim Retentionsvolumen V_0 bzw. nach der Retentionszeit $t_R = (1/V') \cdot V_0$. Kann ein sehr kleines Molekül im gegenteiligen Fall vollständig in die Poren eindringen, erhöht sich das Retentionsvolumen auf $V_0 + V_i$ bzw. die Retentionszeit auf $t_R = (1/V') \cdot (V_0 + V_i)$. Im Bereich zwischen diesen Extremfällen findet die Trennung statt. Es ergibt sich folgende allgemeine Formel für das **Retentionsvolumen**:

$$V_R = V_0 + K_C V_i$$

Hier ist K_C die Verteilungskonstante $K_C = c_S/c_M$. Diese ist für nicht retendierte, grosse Moleküle gleich Null und nimmt für kleinere Moleküle Werte bis Eins an.

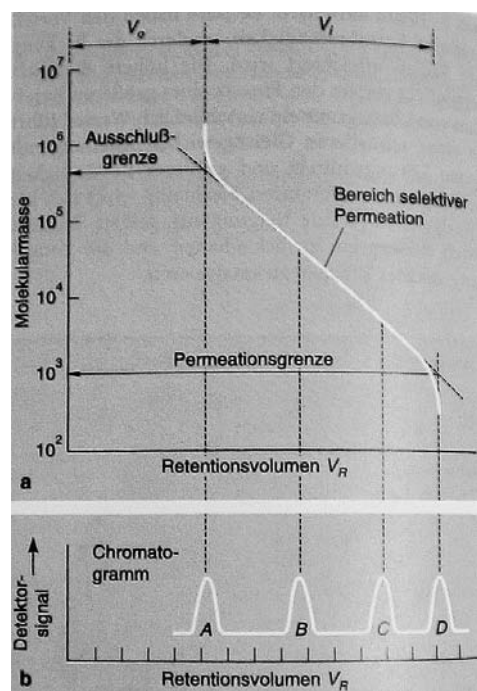


Abb. 3.22:

Typische Kalibrierkurve in der SEC (a). Der Logarithmus der Molekularmasse (als Mass für die Molekülgrösse) ist indirekt proportional zum Retentionsvolumen. Ausschluss- und Permeationsgrenze definieren das obere bzw. untere Ende des Messbereichs in dem Moleküle nach ihrer Grösse getrennt werden können. Die Kalibrierkurve kann durch Trennung von Standards bestimmt werden, wie es das Chromatogramm (b) zeigt. In den Peaks A und D koeluiieren alle für die Trennung zu grossen bzw. zu kleinen Moleküle.

Trägt man den Logarithmus der Molekülmasse als Mass für die Molekülgrösse gegen das Retentionsvolumen (bzw. die Retentionszeit) auf, ergibt sich eine abfallende Gerade. Die obere Grenze für die Molekülgrösse, die sich noch sinnvoll trennen lässt, nennt man **Ausschlussgrenze**. Bei und oberhalb dieser Molekülgrösse verlassen die Moleküle beim minimalen Retentionsvolumen V_0 die Säule. Die unterste bestimmbare Molekülgrösse ist durch die **Permeationsgrenze** gegeben. Moleküle dieser Grösse und alle kleineren verlassen beim maximalen Retentionsvolumen $V_0 + V_i$ die Säule. Die zu grossen Moleküle dringen nicht in die Poren ein und bewegen sich nur mit der mobilen Phase mit. Die zu kleinen Moleküle können wie die Moleküle an der Permeationsgrenze tiefstmöglich in die Poren eindringen, haben alle das gleiche Retentionsvolumen und lassen sich daher nicht mehr voneinander unterscheiden.

Die Kalibrierkurven werden mit Hilfe von Standards bekannter Molekülmasse ermittelt. Oft werden diese zusammen mit Angaben zu Ausschluss- und Permeationsgrenze vom Hersteller des SEC-Materials mitgeliefert.

• Anwendungen

Eine typische Anwendung der Grössenausschlusschromatographie ist die Trennung von Oligo- und Polymeren. Beispielsweise kann bei der Herstellung von Polymeren die Molekulargewichtsverteilung mittels SEC bestimmt werden. In Form der Gel-filtration sind auch wasserlösliche organische- und Biopolymere, aber auch kleinere Moleküle einer SEC-Trennung zugänglich. Abbildung 3.23 zeigt eine Trennung von Fettsäuren. Entsprechend dem Trennprinzip haben die kleinsten Moleküle dieser homologen Reihe die höchste Retentionszeit. Auch die Bestimmung des Molekulargewichts oder der Molekulargewichtsverteilung von polymeren Naturstoffen zählt zu den typischen Anwendungen der SEC.

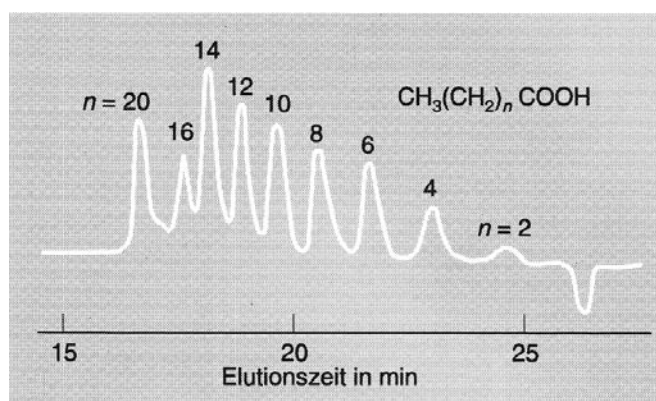


Abb. 3.23: Trennung einer homologen Reihe von Fettsäuren $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ mittels SEC.

Als Vorteil der SEC sind die kurzen Analysenzeiten zu nennen, die oft unter 10 min liegen. Ausserdem ist die Analysenzeit genau festgelegt, da zwangsläufig alle Moleküle zwischen den Retentionsvolumina V_0 und $V_0 + V_i$ die Säule verlassen. Nur im Fall unerwünschter Adsorptionswechselwirkungen zwischen Analytmolekülen und dem Säulenmaterial kommt es zu längeren Retentionszeiten. Zu den Nachteilen zählt, dass in der kurzen Analysenzeit nicht viele Peaks untergebracht und deshalb nur wenige Substanzen in einem Lauf getrennt werden können. Ausserdem muss sich die Molekülmasse der Analyten normalerweise um mindestens 10% unterscheiden, um eine ausreichende Trennung zu erzielen.

3.5.4 Affinitätschromatographie

In der Affinitätschromatographie beruht die Trennung auf unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zwischen Analyten und auf einem Trägermaterial immobilisierten Molekülen. Meist handelt es sich um Biomoleküle, und die Trennung beruht auf den **spezifischen biochemischen Wechselwirkungen** z.B. zwischen Antikörper und Antigen oder Enzym und Substrat. Die Durchführung ist oft **analog zur Festphasenextraktion (*solid phase extraction* = SPE)**, und die Affinitätschromatographie wird auch wie die SPE meist bei der **Probenaufarbeitung** eingesetzt. Man lässt im ersten Schritt die Probe über die Säule laufen, wobei die aufzureinigenden Moleküle z.B. an Antikörper auf der Säule binden. Im zweiten Schritt wäscht man mit reinem Lösungsmittel (meist Wasser oder wässrige Pufferlösungen), um unspezifisch gebundene Moleküle von der Säule zu entfernen. Im dritten Schritt lässt man ein anderes Lösungsmittelgemisch (z.B. mit anderem pH) über die Säule zu laufen, um die aufgereinigten, spezifisch gebundenen Moleküle zu eluieren.

Die Affinitätschromatographie kann die zu untersuchenden Moleküle auch aus komplexen Probengemischen **isolieren und aufreinigen**. Antikörper lassen sich im Allgemeinen für grosse Moleküle (meist Proteine) herstellen, welche im Immunsystem von Versuchsorganismen (oft Mäuse, Ratten oder Kanichen) eine Reaktion auslösen. Heutzutage werden aber auch für kleine Moleküle (z.B. Umweltschadstoffe) spezifische Antikörper hergestellt, indem man diese an Proteine bindet, diese den Versuchsorganismen injiziert und nach einer bestimmten Zeit die Antikörper z.B. aus dem Blutserum isoliert. Zu beachten ist, dass biochemische Wechselwirkungen wie z.B. zwischen Antikörper und Antigen meist nicht spezifisch für nur ein Molekül, sondern für mehrere strukturell ähnliche Moleküle sind. Aus diesem Grund isoliert die Affinitätschromatographie oft eine Gruppe verschiedener Moleküle, die nach dieser Probenaufarbeitung z.B. mit anderen Chromatographiemethoden eingehender untersucht werden müssen.