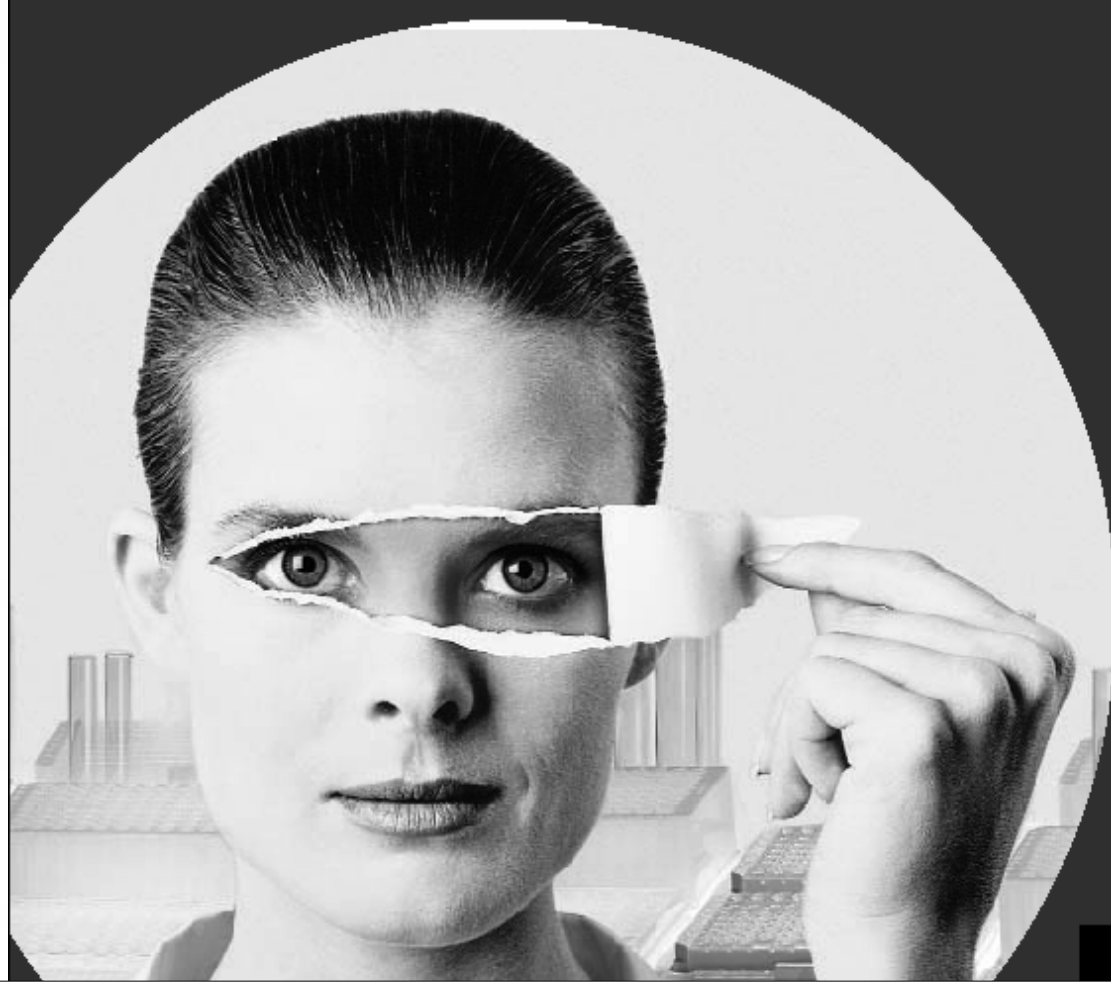




Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold



*Einführung in die* **HPLC**



**Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold**

***Dr. R. Vasold***

***Analytik - Abteilung***

***Institut für Organische Chemie***

***Prof. B. König***



***Kapitel I: Einführung***

***Kapitel II: Grundprinzipien***

***Kapitel III: Der chromatographische Prozeß***

***Kapitel IV: Das Chromatogramm***

***Kapitel V: Literatur***



Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold



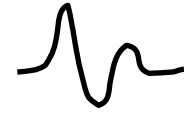
## ***Kapitel I: Einführung***



# I Einführung

## I.1 Was heißt *HPLC* ?

5



**H**igh  
**P**erformance-**P**ressure  
**L**iquid  
**C**hromatography

( = Hochleistungs/Druck  
-Flüssig-Chromatographie)



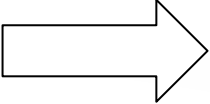
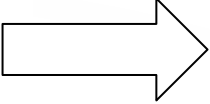
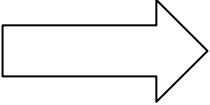
# I Einführung

## I.2 Was bedeutet *HPLC* ?

6



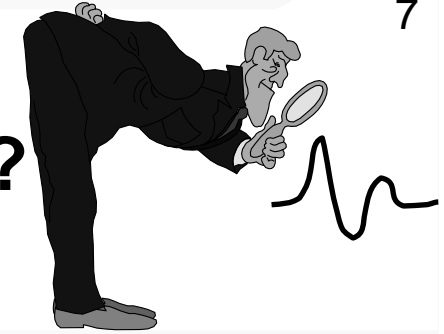
**Unterschied zwischen moderner HPLC und klassischer Säulen-Chromatographie ?**

-  **wesentlich höhere Auflösung bei Trennung  
(Trennung von bis zu 100 Komponenten und mehr)**
-  **Drastische Verkürzung der Analysendauer  
(h → Bereich von Minuten)**
-  **Erhebliche Verbesserung der Empfindlichkeit  
(ca.  $10^{-10}$  g)**



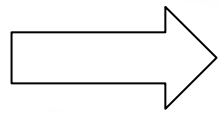
# I Einführung

## I.3 Wann wird HPLC angewendet ?

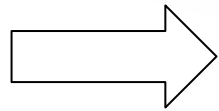


☆ **Notwendige Voraussetzung ist die Löslichkeit der zu analysierenden Substanz in einem geeignetem Solvens**

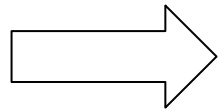
☆ **Die HPLC wird eingesetzt, wenn:**



**Substanzen schwer flüchtig oder nicht flüchtig sind (sonst alternativ Einsatz von GC)**



**Substanzen mit hohem Molekulargewicht vorliegen (MW > 500)**

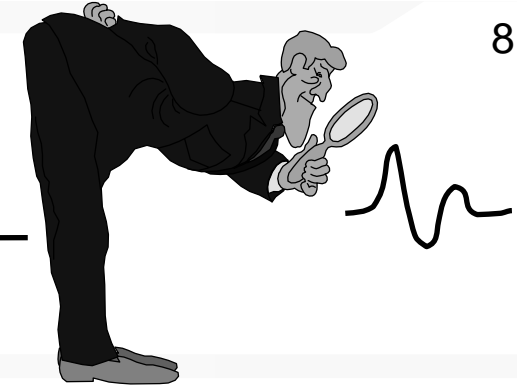


**es sich um thermisch instabile oder (leicht zersetzliche) Substanzen handelt.**



# I Einführung

## I.4 Wo wird HPLC eingesetzt ?



- ➔ **Zur Reinheits- und Produktkontrolle chem. Substanzen**
- ➔ **Zur Analyse von Arzneistoffen**
- ➔ **Zur Bestimmung von Wirkstoffen in biolog. Matrices**
- ➔ **Zur Bestimmung von Schadstoffen (Umweltanalytik)**
- ➔ **Zur Trennung und Reinigung von Biopolymeren (Enzymen, Nukleinsäuren, Peptiden ...)**
- ➔ **Standardmethode in fast allen chem. Laboratorien**



# I Einführung

## I.5 Wie wird die HPLC durchgeführt ?

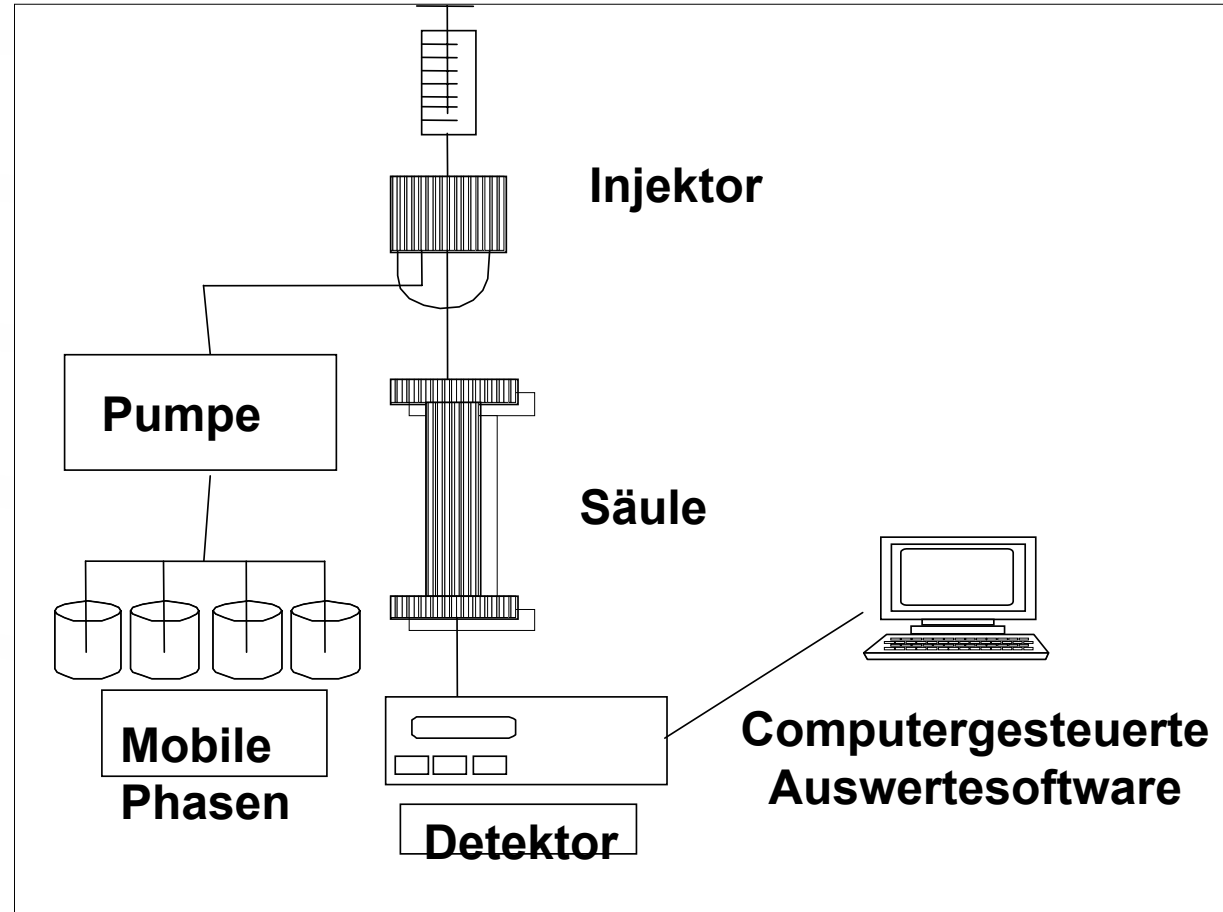


Abb. 1: Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage



# I Einführung

## I.5 Wie wird die HPLC durchgeführt ?



Abb. 2: Moderner HPLC-Arbeitsplatz



Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold



## ***Kapitel II: Grundprinzipien***



# II Grundprinzipien

## II.1 Grundbegriff: Chromatographie

### Historie:

Der Begriff „**Chromatographie**“ wurde 1906 bei der Beobachtung geprägt, daß sich ein Gemisch aus Blattfarbstoffen auf einer mit Calciumphosphat gefüllten Säule in verschieden gefärbte Einzelfarbstoffe auftrennen läßt.

**Chroma = Farbe / Graphiein = schreiben**

### Definition: Chromatographie

Mit dem Ausdruck „**Chromatographie**“ bezeichnet man einen **Trennprozess**, bei welchem das Probengemisch zwischen zwei **nicht miteinander mischbaren** Phasen im sog. chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird. Eine **Hilfsphase (stationäre Phase)** ruht dabei, während die andere **Hilfsphase (mobile Phase)** an ihr vorbei strömt.





# II Grundprinzipien

## II.2 Grundbegriff: Hilfsphasen

### Stationäre Phase:

- ☆ **Meist** ist in der Chromatographie die stationäre Phase **fest** (Chromatographiebett).
- ☆ **Selten** ist die stationäre Phase **flüssig** (dann aber als unbeweglicher „stationärer“, flüssiger Film auf der Oberfläche eines Feststoffes aufgebracht z.B. als adsorbierter Wasserfilm auf Cellulose), oder als unbewegliche flüssige, sog. quasistationäre Phase im Inneren von porösen Kugeln (Gelpermeationschromatographie).

### Mobile Phase:

Die mobile Phase kann sein:

- ☆ **gasförmig** → **Gaschromatographie** **GC**
- ☆ **flüssig** → **Liquidchromatographie** **LC**



# II Grundprinzipien

## II.3 Grundbegriff: Verteilungskoeffizient $K$

beschreibt die unterschiedliche Verteilung der Substanzen zwischen **stationärer** Phase und **mobiler** Phase:

$$K = \frac{c_s(X)}{c_m(X)} \quad (1)$$

$K$  = *Verteilungskoeffizient*

$c_s(X)$  = Stoffmengenkonzentration der Substanz  $X$  in der festen Phase

$c_m(X)$  = Stoffmengenkonzentration der Substanz  $X$  in der mobilen Phase



# II Grundprinzipien

## II.4 Grundbegriff: Kapazitätsfaktor $k$

beschreibt die unterschiedliche Verteilung der Substanzen zwischen **stationärer** Phase und **mobiler** Phase :

$$k = \frac{n_s(X)}{n_m(X)} \quad (2)$$

$k$  = Kapazitäts- oder Retentionsfaktor

$n_s(X)$  = Stoffmenge der Substanz  $X$  in der festen Phase

$n_m(X)$  = Stoffmenge der Substanz  $X$  in der mobilen Phase



# II Grundprinzipien

## II.4.1 Zusammenhang zwischen $k$ und $K$

da  $n = c \cdot V$

Kapazitätsfaktor

Verteilungskoeffizient

$$k = \frac{n_s(X)}{n_m(X)} = \frac{c_s(X) V_{st}}{c_m(X) V_{mob}} = K \frac{V_{st}}{V_{mob}} \quad (3)$$

$V_{st}$  = *Volumen der stationären Phase*

$V_{mob}$  = *Volumen der mobilen Phase*

Diese **unterschiedliche Verteilung** von Substanzen in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen ergibt eine Vielzahl **unterschiedlicher Chromatographiearten**:



# II Grundprinzipien

## II.5 Chromatographiearten (Auswahl)

untersch. Löslichkeit

Verteilungs-Chromatographie  
flüssig / flüssig

untersch. Adsorptions-  
verhalten

Adsorptions-Chromatographie  
flüssig / fest  
NP / RP-HPLC

untersch. elektrostatische  
WW

Ionenaustausch-  
Chromatographie

unterschl. Größe od.  
Gestalt

Gel-Chromatographie  
SEC, GPC



# II Grundprinzipien

## II.6 Strategie der Trennung

Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
 Dr. R. Vasold

| Molecular Weight | Solubility    |                  | Mode                     | Column  |
|------------------|---------------|------------------|--------------------------|---|
| <2000            | Organic       | Hexane           | Adsorption               | Hypersil 120 Silica<br>Hypersil 100 Silica  |
|                  |               | Hexane + Alcohol | Polar phase              | Hypersil APS-2<br>Hypersil CPS<br>Hypersil BDS Cyano<br>Hypersil Phenyl<br>Hypersil BDS Phenyl<br>HyPURITY Cyano  |
|                  |               | Alcohol          | Reversed-phase           | Hypersil SAS<br>Hypersil MOS<br>Hypersil ODS<br>Hypersil 100 C8<br>Hypersil 100 C18<br>Hypersil BDS C8<br>Hypersil BDS C18<br>Hypersil Phenyl<br>Hypersil BDS Phenyl<br>HyPURITY C18<br>HyPURITY Advance<br>HyPURITY C8 |
|                  | Water Soluble | Non-Ionic        | Polar phase              | Hypersil CPS<br>Hypersil Phenyl<br>HyPURITY Cyano<br>Hypersil BDS Cyano<br>Hypersil BDS Phenyl  |
|                  |               |                  | Reversed-phase           | Hypersil SAS<br>Hypersil MOS<br>Hypersil ODS<br>Hypersil Phenyl<br>Hypersil 100 C8<br>Hypersil 100 C18<br>Hypersil BDS C8<br>Hypersil BDS C18<br>Hypersil BDS Phenyl<br>HyPURITY C18<br>HyPURITY Advance<br>HyPURITY C8 |
|                  |               |                  | Wide-pore reversed-phase | Hypersil PEP 300 C18<br>HyPURITY C4   |
|                  |               | Ionic            | Ion exchange             | Hypersil Duet C18/SAX<br>Hypersil Duet C18/SCX<br>Hypersil SAX<br>Hypersil SCX<br>Hypersil APS-2  |
|                  | >2000         | Water Soluble    | Ionic                    | Ion exchange  |
| Non-Ionic        |               |                  | Wide-pore reversed-phase | Hypersil PEP 300 C4<br>Hypersil PEP 300 C18<br>HyPURITY C4  |

Abb. 3:  
 Schema zur Auswahl  
 der passenden  
 Chromatographieart



# II Grundprinzipien

## II.7 Die Säulenauswahl

Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold

|                                | URACIL VOID |    |   | TAILING  |        |           |      |         |     |
|--------------------------------|-------------|----|---|----------|--------|-----------|------|---------|-----|
|                                | TIME (MIN)  |    |   | PEAKS    |        |           |      |         |     |
|                                |             |    |   | SEE PAGE |        |           |      |         |     |
| Adsorbosphere® UHS C18         | P           | L  |   | N=4.52   | B=4.53 | T=6.94    | 1.04 |         | 368 |
| Inertsil® ODS-3                | P           | L  |   | N        | B      | T=4.55    | 1.39 |         | 412 |
| Apollo C18                     | P           | L  |   | N        | B      | T=4.50    | 1.18 |         | 378 |
| Alltima™ C18                   | P           | L  |   | N        | B      | T=4.44    | 1.19 |         | 371 |
| Kromasil™ C18                  | P           | L  |   | N        | B      | T=4.27    | 1.17 |         | 404 |
| Luna™ C18                      | P           | L  |   | N        | B      | T=4.23    | 1.28 |         | N/A |
| Columbus™ C18                  | P           | L  |   | N        | B      | T=4.10    | 1.35 |         | N/A |
| LiChrospher® RP-18             |             | PL |   | N        | B      | T         | 1.30 | P       | 439 |
| Brownlee Spheri™-5 RP-18       |             | RL |   | N        | B      | T         | 1.22 | P, B    | 410 |
| LiChrospher RP®-18 (endcapped) | P           | L  |   | N        | B      | T         | 1.30 |         | 439 |
| Inertsil® ODS-2                | P           | L  |   | N        | B      | T         | 1.28 |         | 412 |
| Adsorbosil® C18                |             | L  | P |          | B      | T         | 1.27 | P       | 367 |
| Econosil™ C18                  |             | L  | P |          | B      | T         | 1.26 | P       | 381 |
| Brownlee Spheri-5™ ODS         |             | L  | P |          | B      | T         | 1.25 | P, N, B | 410 |
| Prevail C18                    |             | RL |   | N        | B      | T         | 1.24 |         | 393 |
| Prodigy™ ODS (3)               | P           | L  |   | N        | B      | T         | 1.31 |         | N/A |
| Symmetry® C18                  | P           | L  |   | N        | B      | T         | 1.20 |         | N/A |
| Luna™ C8                       | P           | L  |   | N        | B      | T         | 1.29 |         | N/A |
| Adsorbosphere® HS C18          | P           | L  |   | N        | B      | T         | 1.38 | P       | 368 |
| Zorbax® ODS                    |             | IP |   | N        | B      | T         | 1.20 | P, B    | N/A |
| AquaSep™ AQS C8                |             | RL |   | N        | B      | T         | 1.46 | P       | N/A |
| Waters Spherisorb® ODS-2       |             | RL |   | N        | B      | T         |      |         |     |
| Ultrasphere® C18               | P           | L  |   | N        | B      | T         |      |         |     |
| YMC ODS-A                      | P           | L  |   | N        | B      | T         |      |         |     |
| Microsorb™-MV C18              | P           | L  |   | N        | B      | T B=18.71 |      |         |     |
| Nucleosil® C18 AB              | P           | L  |   | N        | B      | T         |      |         |     |

### Key Chart

- P — Pyridine
- L — Phenol
- N — N,N-Dimethylaniline
- B — 4-Butylbenzoic Acid
- T — Toluene

**Abb. 4: Beispiel verschiedener HPLC-Säulen**



Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold



## ***Kapitel III: Der chromatographische Prozeß***



# III Der chromatographische Prozeß<sup>21</sup>

## III.1 Der Trennvorgang

Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold

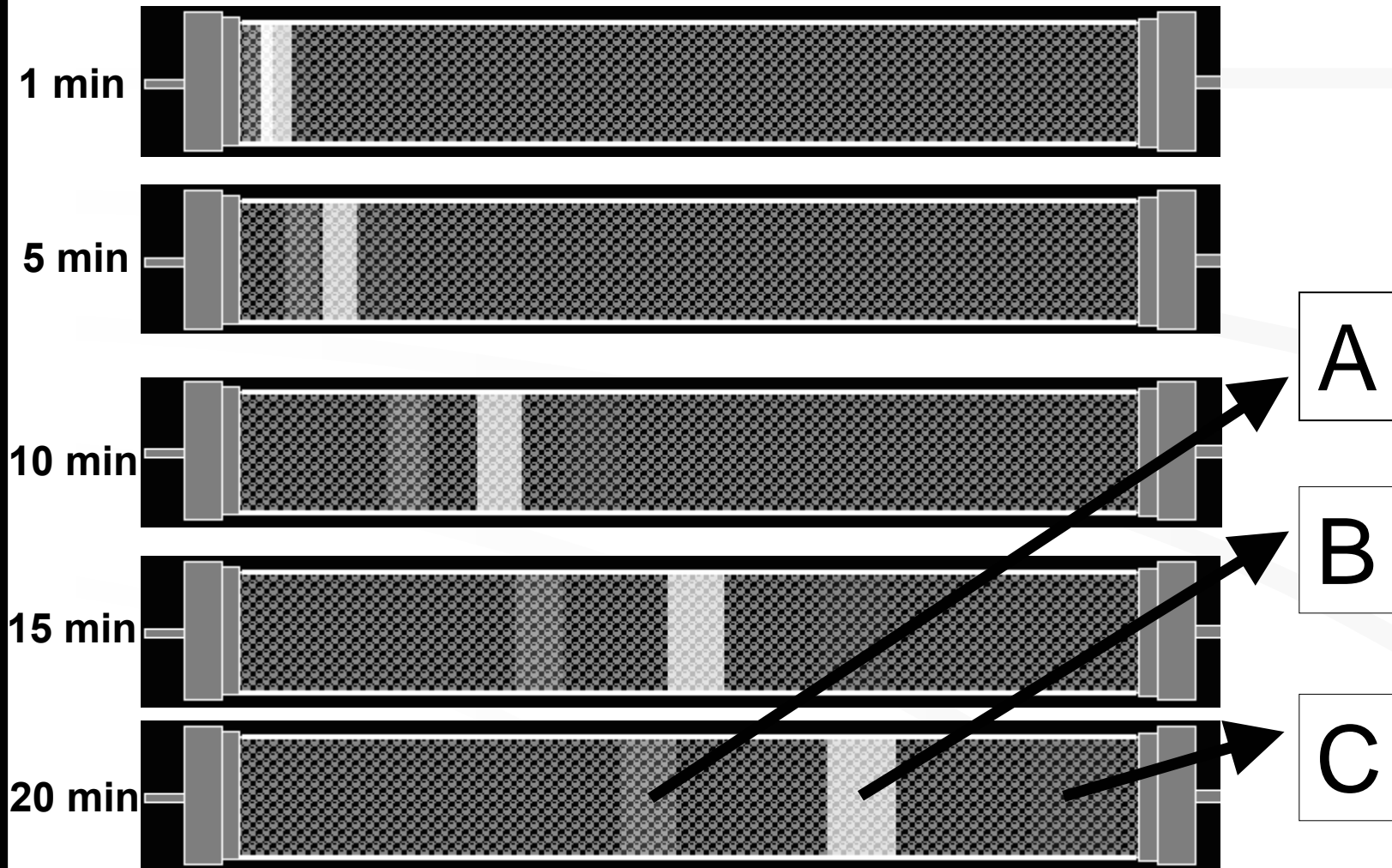


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf einer chromatographischen Trennung



# III Der chromatographische Prozeß<sup>22</sup>

## III.2 Definitionen

### Definition: Chromatogramm

Mit dem Ausdruck „**Chromatogramm**“ bezeichnet man die graphische Auftragung der Größenwerte einer Größe (z.B. der Absorption), die am Ende der stationären Phase, also z.B. am Säulenausgang, in der mobilen Phase gemessen werden, gegen die Zeit oder das Volumen der mobilen Phase.



### Definition: Retentionsvolumen / -Zeit

Das Volumen der mobilen Phase, das die stationäre Phase vom Moment der Probenaufgabe bis zum Erscheinen der Substanz **X** als Peak im Chromatogramm passiert hat, nennt man das Retentionsvolumen der Substanz X:  $V_R(X)$

Die zugehörige Zeit nennt man die Retentionszeit:  $t_R(X)$ .





# III Der chromatographische Prozeß<sup>23</sup>

## III.3 Das Retentionsvolumen $V_R(X)$

$$V_R(X) = F \cdot t_R(X) \quad (4)$$

*Retentionsvolumen [ml]*

*Retentionszeit [min]*

*Volumenfließgeschwindigkeit [ml·min<sup>-1</sup>]*



# III Der chromatographische Prozeß<sup>24</sup>

## III.4 Die lineare Fließgeschwindigkeit $U_m$

$$u_m = \frac{F}{A_f} = \frac{F}{A \cdot \varepsilon} = \frac{F}{\pi \cdot r^2 \cdot \varepsilon} \quad (5)$$

$u_m$  : lineare Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase  
[cm·s<sup>-1</sup>]

$F$  : Volumenfließgeschwindigkeit [ml·s<sup>-1</sup>]

$A_f$  : freie Säulenquerschnittsfläche [cm<sup>2</sup>]

$A$  : Säulenquerschnittsfläche [cm<sup>2</sup>]

$r$  : Säulenradius [cm]

$\varepsilon$  : Interpartikel-Porosität der Säule ( Kieselgel  $\approx 0.8$ )



# III Der chromatographische Prozeß<sup>25</sup>

## III.4.1 Die Interpartikelporosität $\varepsilon$

$$\varepsilon = \frac{V_c - V_{st}}{V_c} = \frac{V_0}{V_c} \quad (6)$$

$\varepsilon$  : *Interpartikelporosität*

$V_c$  : *geometrisches Säulenvolumen [cm<sup>3</sup>]*

$V_{st}$  : *Volumen der stationären Phase [cm<sup>3</sup>]*

$V_0$  : *Interpartikelvolumen der Säule [cm<sup>3</sup>]*



# III Der chromatographische Prozeß<sup>26</sup>

## III.5 Zusammenhang zwischen $u_m$ und $u(X)$



Die **lineare** Wanderungsgeschwindigkeit  $u(X)$  der Substanz  $X$  muß der **linearen** Wanderungs-(Fließ)-Geschwindigkeit der mobilen Phase  $u_m$  direkt proportional sein.

d.h.  $u(X)$  wird immer kleiner  $u_m$  oder höchstens gleich  $u_m$  sein.

$$u(X) \propto u_m \quad \text{und} \quad u(X) \leq u_m \quad (7)$$



# III Der chromatographische Prozeß<sup>27</sup>

## III.5.1 Der Proportionalitätsfaktor $\chi_m(\mathbf{X})$



Der Proportionalitätsfaktor  $\chi_m(\mathbf{X})$  muß also zwischen **0** und **1** liegen.

$$u(\mathbf{X}) = \chi_m(\mathbf{X}) \cdot u_m \quad (8)$$

Es kann sich bei  $\chi_m(\mathbf{X})$  nur um den **Stoffmengenanteil** der Substanz **X** in der **mobilen Phase** handeln, weil ja die Substanz **X** nur dann überhaupt mit der Geschwindigkeit  $u_m$  transportiert werden kann.

Dieser **Stoffmengenanteil** ist wie folgt definiert:

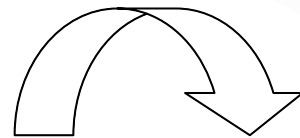


# III Der chromatographische Prozeß<sup>28</sup>

## III.6 Zusammenhang $\chi_m(X)$ und $k$

$$\chi_m(X) = \frac{n_m(X)}{n_s(X) + n_m(X)} = \frac{1}{\frac{n_s(X)}{n_m(X)} + 1} = \frac{1}{k + 1} \quad (9)$$

$$u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m = \frac{1}{k + 1} u_m \quad (10)$$



$k$  = Retentionsfaktor

$$\frac{u_m}{u(X)} = k + 1 \quad (11)$$



# III Der chromatographische Prozeß<sup>29</sup>

## III.6.1 Grenzfälle

$$u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m = \frac{1}{k+1} u_m \quad (10)$$

Da für jeden Stoffmengenanteil gilt:  $0 \leq \chi_m(X) \leq 1$

Erhält man zwei Grenzfälle:

1.) Für  $\chi_m(X) = 0 \implies u(X) = 0$

d.h. es befindet sich **keine** Substanz **X** in der mobilen Phase - **alles** ist an die **stationäre** Phase gebunden, d.h. **keine Wanderung** der Substanz

2.) Für  $\chi_m(X) = 1 \implies u(X) = u_m$

d.h. es befindet sich die **gesamte** Substanz **X** in der **mobilen** Phase – **X** hat somit keine Wechselwirkung mit der stationäre Phase, d.h. **Wanderungsgeschwindigkeit** von **X** gleich der der **mobilen Phase**.



# III Der chromatographische Prozeß<sup>30</sup>

## III.7 Die Totzeit $t_0$

Die Zeit, die im **2. Fall** verstreicht, wenn also keine Wechselwirkung der Substanz **X** mit der stationären Phase stattfindet, bezeichnet man häufig als sog.

„**Totzeit**“ der Säule  $t_0$ .

Analog dazu wird das zugehörige Volumen als sog.

„**Totvolumen**“  $V_0$  der Säule bezeichnet.

Der Gebrauch dieser Bezeichnungen  $V_0$ ,  $t_0$  wird von der **IUPAC** jedoch wegen vieler

**Verwechslungsmöglichkeiten** heute **nicht mehr empfohlen**.



# III Der chromatographische Prozeß<sup>31</sup>

## III.8 Die Durchbruchzeit $t_m$

So ist mit dem sog. „Totvolumen“  $V_0$  oft nicht nur das **eigentliche Totvolumen** der **Säule** gemeint, sondern zusätzlich das „Totvolumen“ das durch das jeweilige Chromatographiesystem verursacht wird (z.B. durch die Volumina der **Verbindungskapillaren**, der **Anschlüsse**, der **Konnektoren** etc.)

Dies wird berücksichtigt in den Ausdrücken:

**Durchbruchsvolumen bzw. Durchbruchzeit**

Als Symbole von der **IUPAC** empfohlen:

$V_m$  und  $t_m$



# III Der chromatographische Prozeß<sup>32</sup>

## III.8.1 Durchbruchsvolumen $V_m$ und -zeit $t_m$

### Definition: Durchbruchsvolumen / -zeit

Als Durchbruchsvolumen  $V_m$  bzw. -zeit  $t_m$  wird dasjenige **Volumen** (bzw. die dazu **korrespondierende Zeit**) bezeichnet, das benötigt wird, um eine **nicht-retardierende** Substanz von der **Eingabe** bis zur **Detektionsstelle** zu befördern. Dieses Volumen umfaßt also genau genommen zusätzlich zum **Volumen der mobilen Phase im Säulenbett**  $V_{mob}$  die „**Totvolumina**“ des **Gerätes** z.B. im Einspritzventil, in den Verbindungskapillaren, im Detektor etc..

$t_m$  Ist für alle Substanzen **gleich**

Die Auftrennung der Substanzen kommt ausschließlich dadurch zustande, daß sich die Substanzen **unterschiedlich lange** in der **stationären Phase** aufhalten und somit zu unterschiedlichen **Retentionszeiten** eluieren.





# III Der chromatographische Prozeß<sup>33</sup>

## III.8.1 Durchbruchvolumen $V_m$ und -zeit $t_m$



### Anmerkung !

Da bei modernen HPLC-Anlagen diese **eigentlichen „Totvolumina des Systems“** auf ein **Minimum** reduziert sind (durch minimale Kapillardurchmesser, optimierte Gerätegeometrie etc. ), können diese Parameter zur **Vereinfachung der Problematik** im Folgenden **vernachlässigt** werden, und es wird künftig davon ausgegangen, daß es sich bei  $t_m$  ausschließlich um die **Durchbruchzeit der Säule** handelt, und sich die **Wanderungsgeschwindigkeiten  $u(x)$**  um  $u_m$  alleine auf die **Säule** beziehen.



# III Der chromatographische Prozeß<sup>34</sup>

## III.8.2 Zusammenhang $t_m$ , $t_R(X)$ und $t_S$

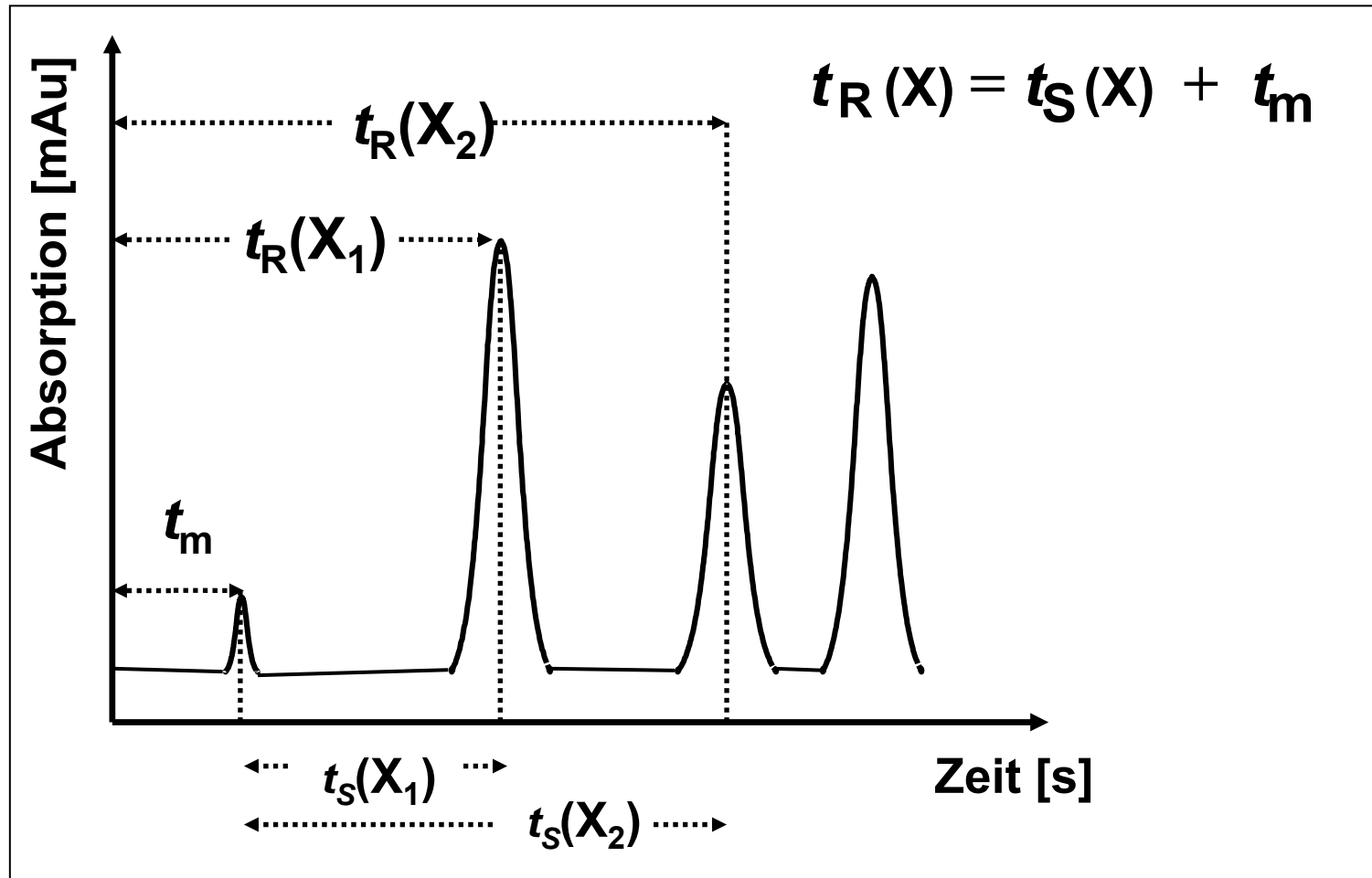


Abb. 6: Musterchromatogramm mit  $t_S(X)$  als Aufenthaltszeit der Komponente X in der stationären Phase



# III Der chromatographische Prozeß<sup>35</sup>

## III.8.3 Bestimmung von $t_m$ und $t_R(X)$



Wovon sind **Retentionszeit  $t_R(X)$**  und **Durchbruchszeit  $t_m$**  abhängig ?

- ☆ von den Abmessungen der Säule (**Länge:  $L$** )
- ☆ von den Wanderungsgeschwindigkeiten  **$u_m(X)$ ,  $u(X)$**

Durchbruchsvolumen

$$t_m = \frac{L}{u_m} = \frac{V_m}{F}$$

(12)

Retentionsvolumen

$$t_R(X) = \frac{L}{u(x)} = \frac{V_R(X)}{F}$$

(13)



# III Der chromatographische Prozeß<sup>36</sup>

## III.8.3 Bestimmung von $t_m$ und $t_R(X)$

$$\frac{t_R(X)}{t_m} = \frac{V_R(X)}{V_m} = \frac{u_m}{u(X)} \quad (14)$$

berücksichtigt man die bekannte Beziehung

$$u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m = \frac{1}{k+1} u_m \quad (10)$$



ergibt sich:



# III Der chromatographische Prozeß<sup>37</sup>

## III.8.4 Zusammenhang $t_m$ , $t_R(X)$ und $k$

$$\frac{t_R(X)}{t_m} = \frac{V_R(X)}{V_m} = k + 1 \quad (15)$$

$$V_R(X) = V_m \cdot (k + 1) \quad (16)$$

$$t_R(X) = t_m \cdot (k + 1) \quad (17)$$



# III Der chromatographische Prozeß<sup>38</sup>

## III.9 Berechnung des Kapazitätsfaktors $k$

Ausgehend von Gleichung (17) ergibt sich für den Kapazitätsfaktor  $k$  :

$$k = \frac{t_R(X) - t_m}{t_m} = \frac{t_S(X)}{t_m} = \frac{t_R(X)}{t_m} - 1 \quad (18)$$

$$\frac{t_S(X)}{t_R(X)} = \frac{k \cdot t_m}{k \cdot t_m + t_m} = \frac{k}{k + 1} \quad (19)$$



# III Der chromatographische Prozeß<sup>39</sup>

## III.9.1 Bedeutung des Kapazitätsfaktors $k$

$$k = \frac{t_R(X) - t_m}{t_m} = \frac{t_S(X)}{t_m} = \frac{t_R(X)}{t_m} - 1 \quad (18)$$

### Definition: Kapazitäts-(Retentions)faktor

Um „**Chromatogramme**“, die an verschiedenen langen und unterschiedlich dicken Säulen bei unterschiedlicher Flußgeschwindigkeit gemessen wurden, vergleichen zu können, bedient man sich einer dimensionslosen Größe, dem **Kapazitäts-(Retentions)faktor  $k$** .

Der **Kapazitäts-(Retentions)faktor  $k$**  einer Substanz **X** ist somit eine auf die Durchbruchzeit „normierte Elutionsgröße“.





# III Der chromatographische Prozeß<sup>40</sup>

## III.9.2 Beispiele

$$t_R(X) = t_m \cdot (k + 1) \quad (17)$$

Substanz eluiert unverzögert

$$t_R = t_m \quad k = 0$$

Literaturangabe  $k = 5$

mit eigener Säule  $t_m = 2.5 \text{ min}$

zu  
erwarten  
 $t_R = 15 \text{ min}$



# III Der chromatographische Prozeß<sup>41</sup>

## III.10 Zusammenhang $K$ und $V_R(X)$

Ausgehend von Gleichung (16)

$$V_R(X) = V_m \cdot (k + 1) \quad (16)$$

und der Beziehung (3) zwischen Retentionsfaktor  $k$  Verteilungskoeffizienten  $K$

$$k = \frac{n_s(X)}{n_m(X)} = \frac{c_s(X) V_{st}}{c_m(X) V_{mob}} = K \frac{V_{st}}{V_{mob}} \quad (3)$$

erhält man bei Annahme daß  $V_m = V_{mob}$

$$V_R(X) = K \cdot V_{st} + V_m \quad (20)$$



# III. Der chromatographische Prozeß<sup>42</sup>

## III.10 Zusammenhang $K$ und $V_R(X)$

$$V_R(X) = K \cdot V_{st} + V_m \quad (20)$$

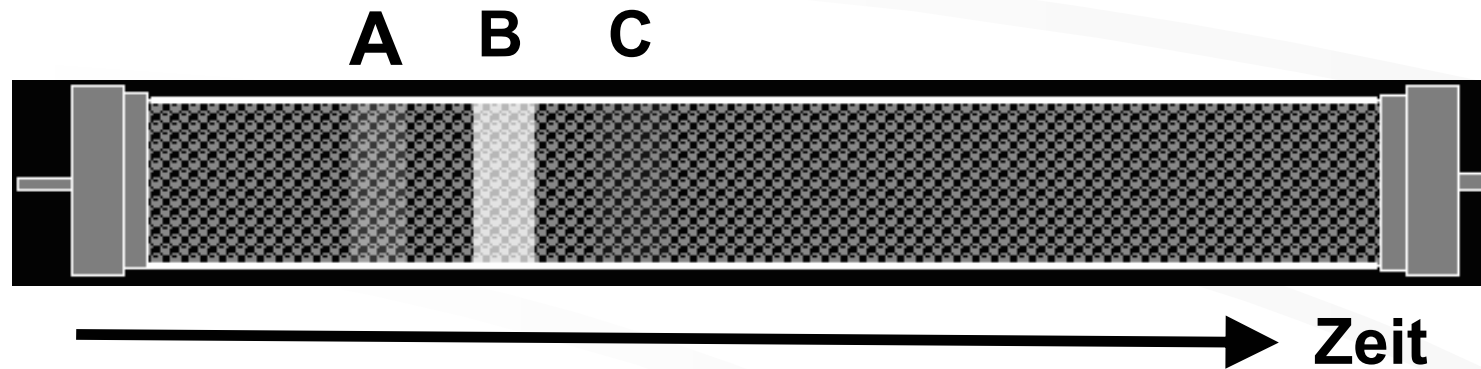
- ☆ Diese Beziehung (20) beschreibt den **Transport** eines **Analyten** durch die Säule.
- ☆ Gleichung (20) stellt eine **Verknüpfung** zwischen dem **Elutionsvolumen** einer Substanz  $V_R(X)$  mit der **thermodynamischen Größe  $K$**  (Verteilungskoeffizient) dar.



# III. Der chromatographische Prozeß<sup>43</sup>

## III.11 Die Theorie der Böden

Es gibt mehrere Möglichkeiten, den chromatographischen Trennprozess genauer zu beschreiben.



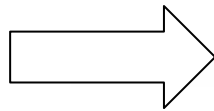
**Ziel:**

Die Position **jeder einzelnen Komponente** im chromatographischen Trennsystem und ihre dortige **Konzentrationsverteilung** in Abhängigkeit von der **Zeit** bestimmt zu können.

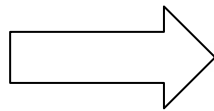


# III. Der chromatographische Prozeß<sup>44</sup>

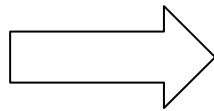
## III.11 Die Theorie der Böden



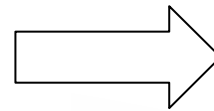
**Ein möglicher Ansatz:**



**Theorie der Böden  
(theoretisches Trennstufenmodell)**



**Übertragung der Theorie der fraktionierten  
Destillation auf die Säulenchromatographie**



**Übernimmt Begriffe von Bodenhöhe und  
Bodenzahl**

Anschaulich, aber natürlich nur näherungsweise richtig, da die Annahme einer wiederholten Einstellung separater Gleichgewichte beim Vorliegen einer bewegten mobilen Phase eher unrealistisch ist



# III Der chromatographische Prozeß<sup>45</sup>

## III.11 Die Theorie der Böden

Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold

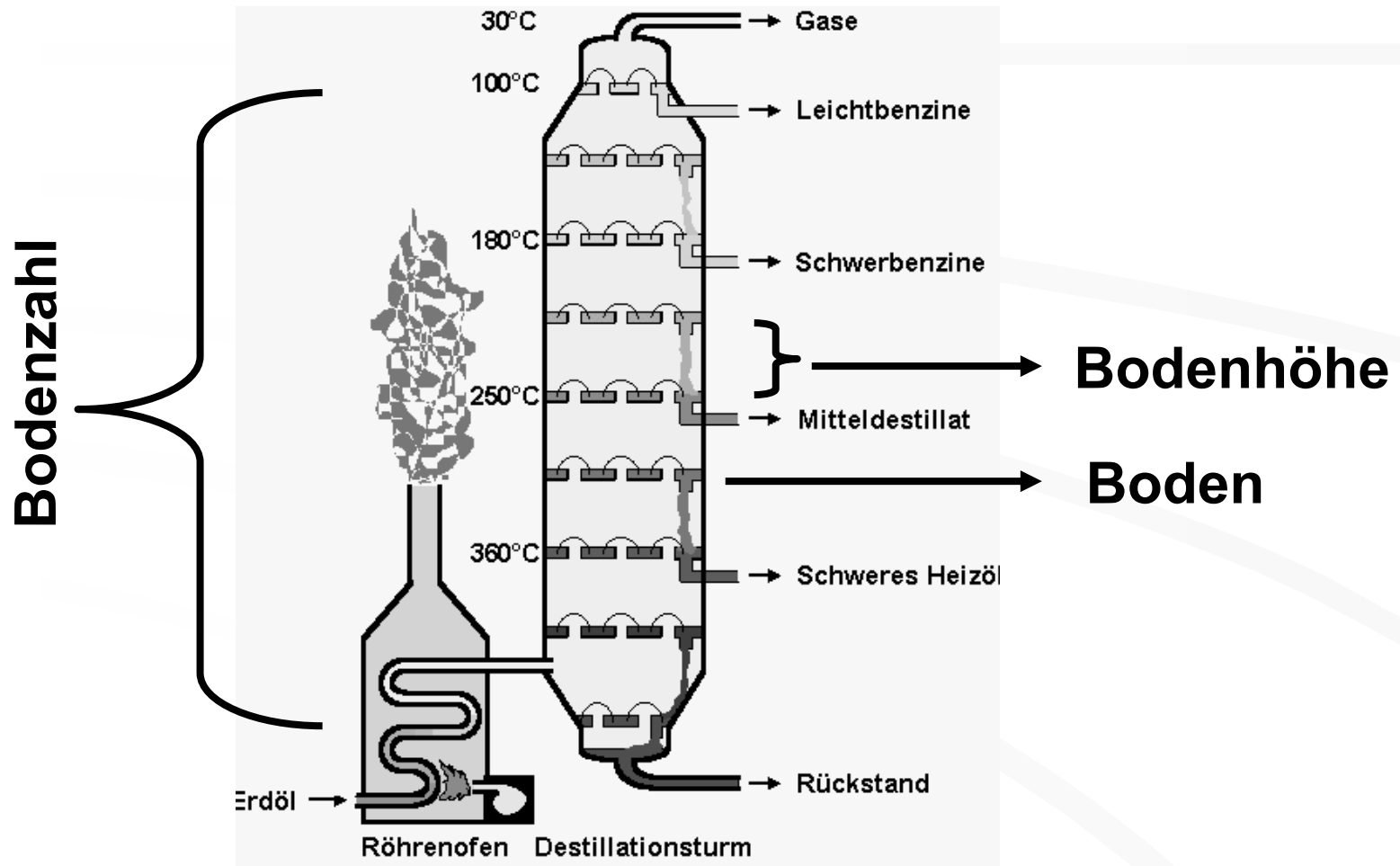


Abb. 7: Beispiel eines Destillationsturms



# III Der chromatographische Prozeß<sup>46</sup>

## III.11.1 Trennstufenhöhe und Trennstufenzahl

Bodenhöhe = Trennstufenhöhe  $H$

Bodenzahl = Trennstufenzahl  $N_z$

### Definition: Trennstufenhöhe

Die Trennstufenhöhe  $H$  (die Höhe eines Theoretischen Bodens), oder ***HETP (height equivalent to one theoretical plate)*** ist die Strecke, auf der sich beim Fließen der mobilen Phase das Gleichgewicht einmal einstellt.



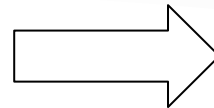
Wovon sind Trennstufenhöhe  $H$  und Trennstufenzahl  $N_z$  abhängig ?



# III Der chromatographische Prozeß<sup>47</sup>

## III.11.1.1 Beeinflussung von $H$ und $N_z$

Trennstufenhöhe und Trennstufenzahl werden beeinflusst von:



Länge der Säule

$$H = \frac{L}{N_z}$$

(21)



$$N_z = \frac{L}{H}$$

(22)



# III Der chromatographische Prozeß<sup>48</sup>

## III.11.1.2 Bedeutung von $H$ und $N_z$

$$H = \frac{L}{N_z}$$

(21)



$$N_z = \frac{L}{H}$$

(22)

Bedeutung:

$H$  minimal

$N_z$  maximal



Trennung  
optimal

$N_z$  charakterisiert somit die **Leistungsfähigkeit** einer Trennsäule. Je besser die Säule gepackt wurde (kleine Trennstufenhöhe), und je länger sie ist, desto größer ist die **Trennstufenzahl** und somit die **Trennleistung**.



# III Der chromatographische Prozeß<sup>49</sup>

## III.11.1.3 Einfluß von $u_m$ auf $H$ und $N_Z$



- ☆ vorgegebene Länge
- ☆ vorgegebene Porenweite
- ☆ vorgegebener Partikeldurchmesser

Für den Experimentator einzig variierbar soll der Fluß sein, bzw. die Fließgeschwindigkeit  $u_m$  der mobilen Phase durch die Säule.



Je größer der Fluß, desto **weniger oft** kann sich das Gleichgewicht einstellen -> **Trennung schlechter !!!**

Je niedriger der Fluß, desto **mehr** kommen z.B. Diffusionsvorgänge ins Spiel -> **Trennung schlechter !!!**



# III Der chromatographische Prozeß<sup>50</sup>

## III.11.1.4 Das H/u-Diagramm

Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold

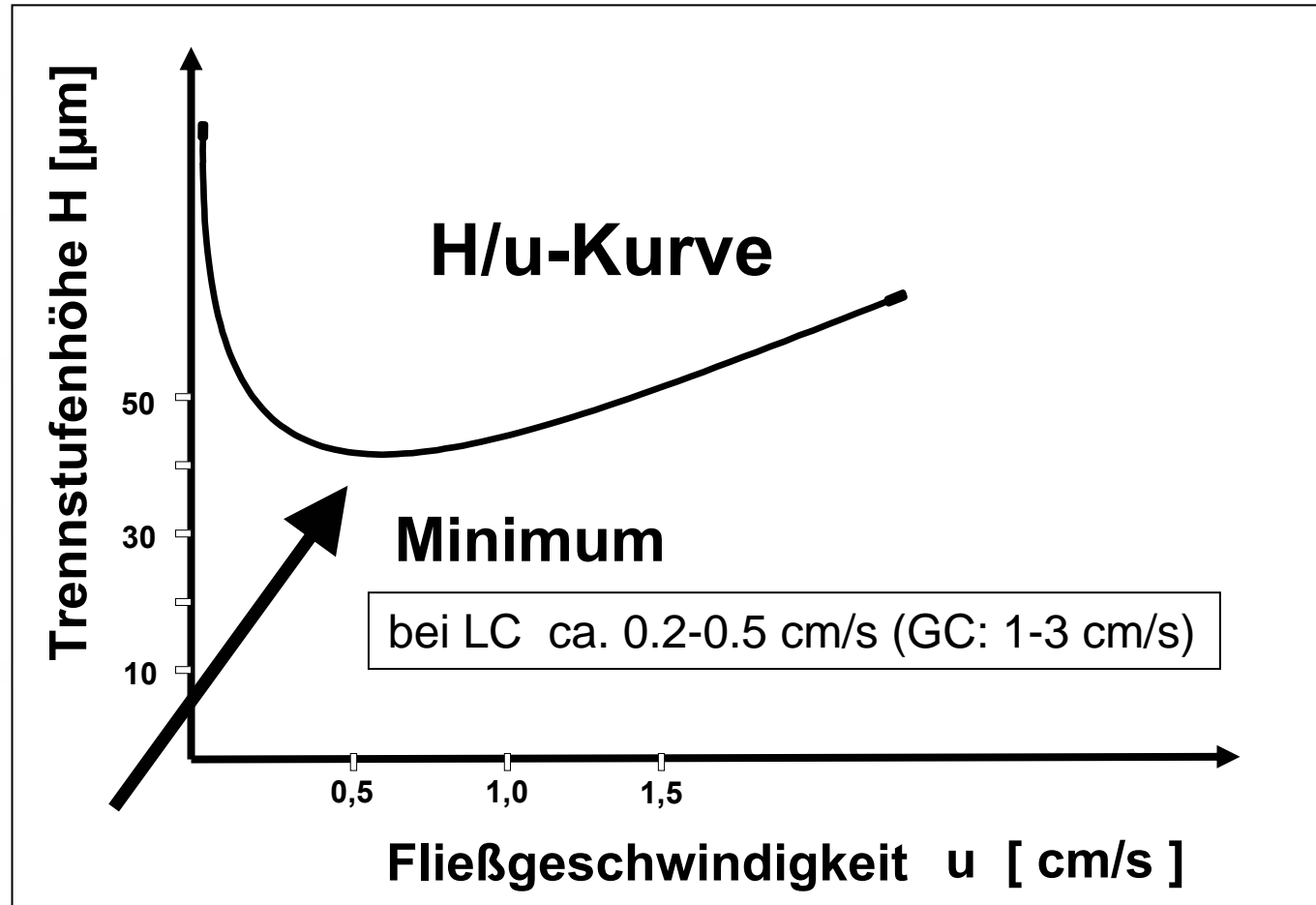


Abb. 8: H/u-Diagramm zur Bestimmung des optimalen Flusses

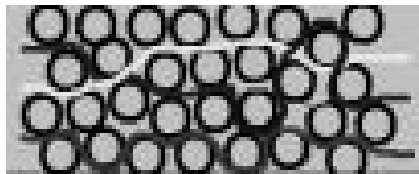


# III Der chromatographische Prozeß<sup>51</sup>

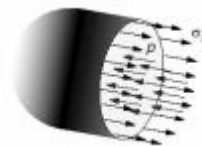
## III.12 Die van Deemter-Gleichung

Hierbei handelt es sich um eine empirische Gleichung mit folgenden Größen:

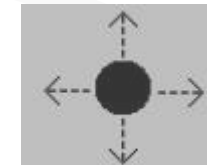
$$H = A + \frac{B}{u_m} + C \cdot u_m \quad (23)$$



**Eddy-Diffusion  
(Wirbeldiffusion)  
A-Term**



**Longitudinal-  
Diffusion  
B-Term**

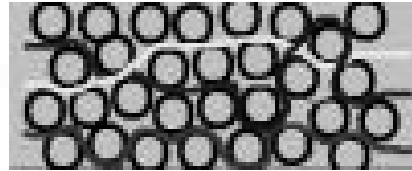


**Stoffaustausch-  
-Anteil  
C-Term**

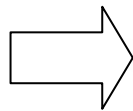


# III Der chromatographische Prozeß<sup>52</sup>

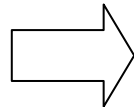
## III.12 Die van Deemter-Gleichung



### Eddy-Diffusion (Wirbeldiffusion) A-Term



beschreibt die **Bandenverbreiterung**, die von der **Geometrie der Festphasenteilchen** und von der **Packung dieser Teilchen in der Säule** herrührt.

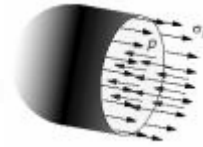


Statistisch gesehen haben einige **Probenmoleküle** einen **relativ kurzen Weg**, während andere **gezwungen sind**, einen „**Umweg**“ zu machen.

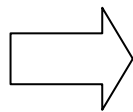


# III Der chromatographische Prozeß<sup>53</sup>

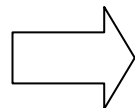
## III.12 Die van Deemter-Gleichung



### Longitudinal- Diffusion B-Term



**berücksichtigt: Strömungsverteilung !  
Laminare Strömung (Molekültransport) ist in der  
Mitte zwischen zwei Partikeln größer als in der  
Nähe der Packungspartikel.**

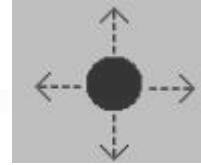


**berücksichtigt: Diffusion der Moleküle !  
beschreibt im H/u-Diagramm eine Hyperbel  
und ist in der LC zu vernachlässigen.**

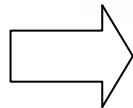


# III Der chromatographische Prozeß<sup>54</sup>

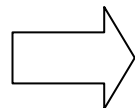
## III.12 Die van Deemter-Gleichung



**Stoffaustausch  
-Anteil  
C-Term**



**berücksichtigt: Kinetische Beiträge!  
Geschwindigkeit des Stoffaustausches  
zwischen stationärer und mobiler Phase.**



**Geschwindigkeit des Massentransportes der  
Probenmoleküle in die Poren der stat. Phase  
und aus ihnen heraus .**



# III Der chromatographische Prozeß<sup>55</sup>

## III.12 Die van Deemter-Gleichung

Die **H/u-Kurve** erhält man nach Addition aller drei Terme der van-Deemter- Gleichung:

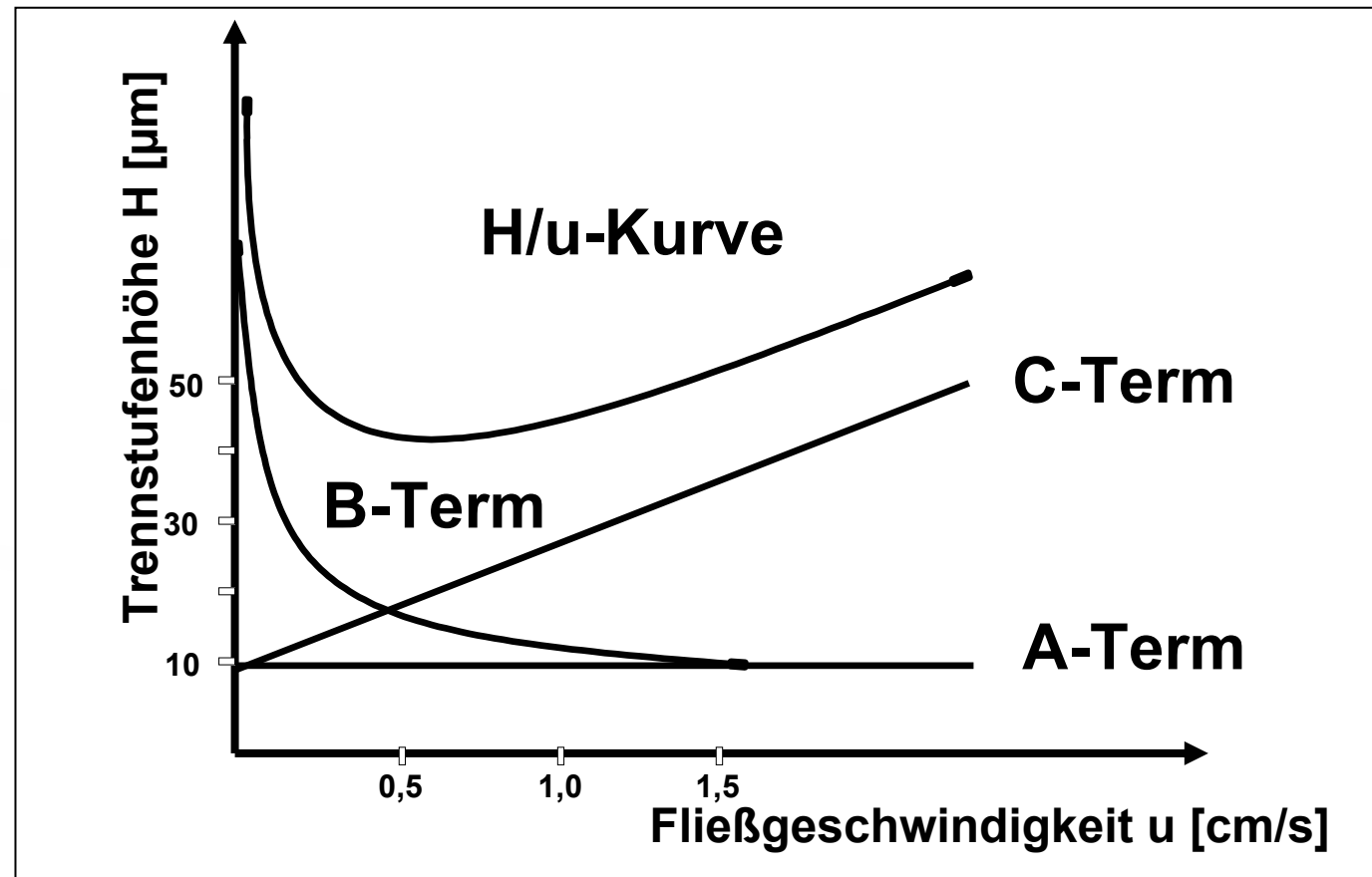


Abb. 9: H/u-Diagramm mit den Termen der Van-Deemter-Gleichung



# III Der chromatographische Prozeß<sup>56</sup>

## III.13 Zusammenfassung

In der Chromatographie ist man bestrebt, gute Trennungen in relativ kurzen Analysenzeiten durchzuführen. D.h. man versucht eine minimale Trennstufenhöhe bei möglichst flacher H/u Kurve zu erzielen.

Dies läßt sich erreichen durch:

- ➔ **Geringe Korngrößen**  
(Einfluß auf A-Term und C-Term)
- ➔ **Enge Korngrößenverteilung bzw. dichte Packung**  
(Einfluß auf B-Term)
- ➔ **Geringer Säulendurchmesser**  
(Einfluß auf A-Term und B-Term)



# III Der chromatographische Prozeß<sup>57</sup>

## III.14 Bedeutung in der Praxis

Bei gut gepackten HPLC-Säulen liegt  $H$  beim Doppelten bis Fünffachen des mittleren Teilchendurchmessers  $d_p$ .

**Beispiel:**

Bei einer 100 mm-Säule, gepackt mit 5 $\mu$ m-Material



**Trennstufenhöhe: 10-25  $\mu$ m**

**Trennstufenzahl: 4.000-10.000**



Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold



## Kapitel IV: Das Chromatogramm



# IV Das Chromatogramm

59

## IV.1 Qualitative Aussagen

- ➔ z.B. Zuordnung von Substanzen über identische Retentionszeit  $t_R(x)$ .
- ➔ Ggf. Injektion von Referenzsubstanzen.
- ➔ z.B. Identifizierung von Substanzen über UV-APEX-Spektren (Diodenarray), siehe Seminar und Praktikum.
- ➔ z.B. Identifizierung von Substanzen über Isoplot und 3-D-Plot .



# IV Das Chromatogramm

60

## IV.1.1 Der Isoplot

Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold

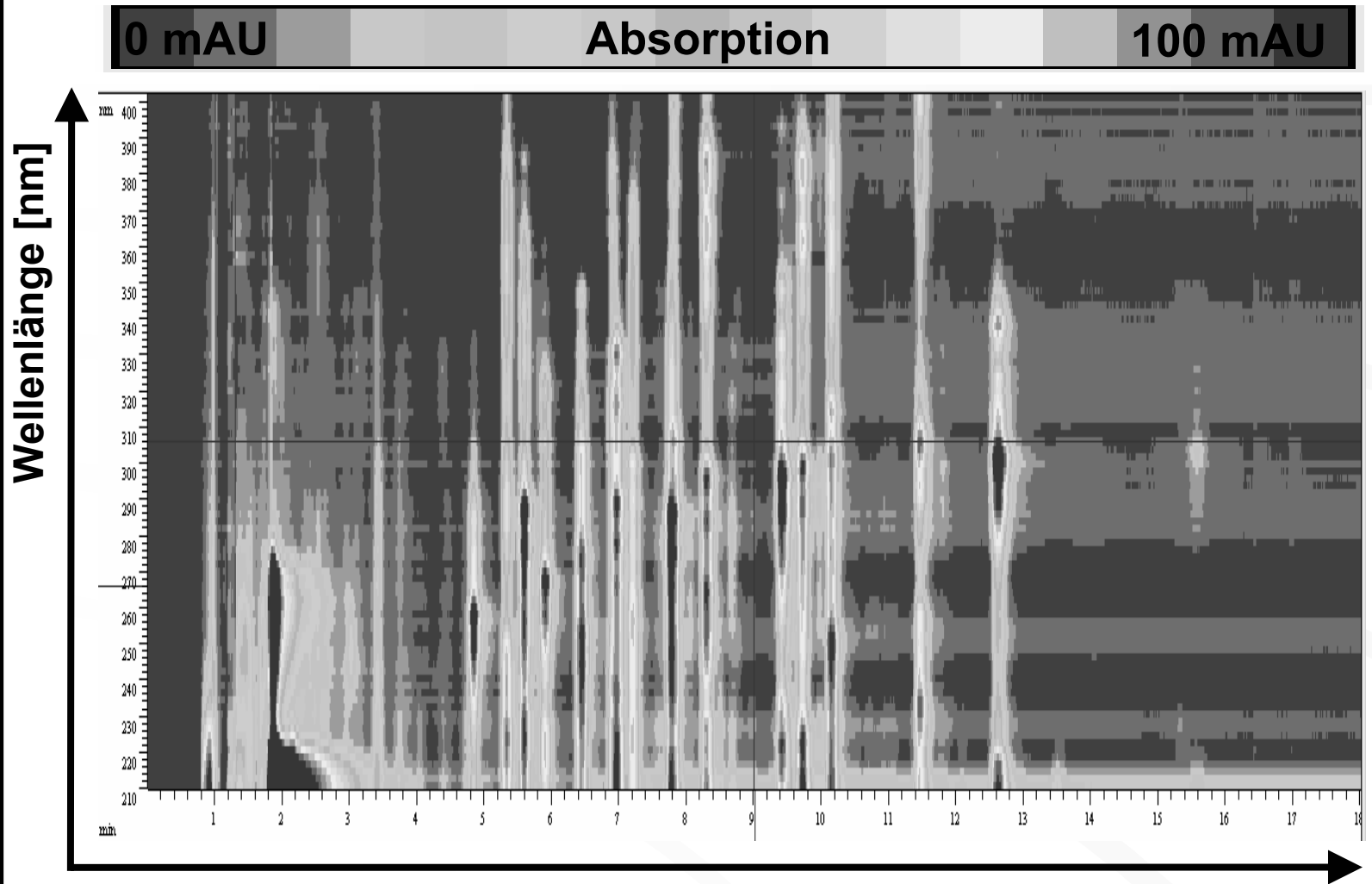


Abb. 10: Isoplot einer chromatographischen Trennung



# IV Das Chromatogramm

61

## IV.1.2 Der 3D-Plot

Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold

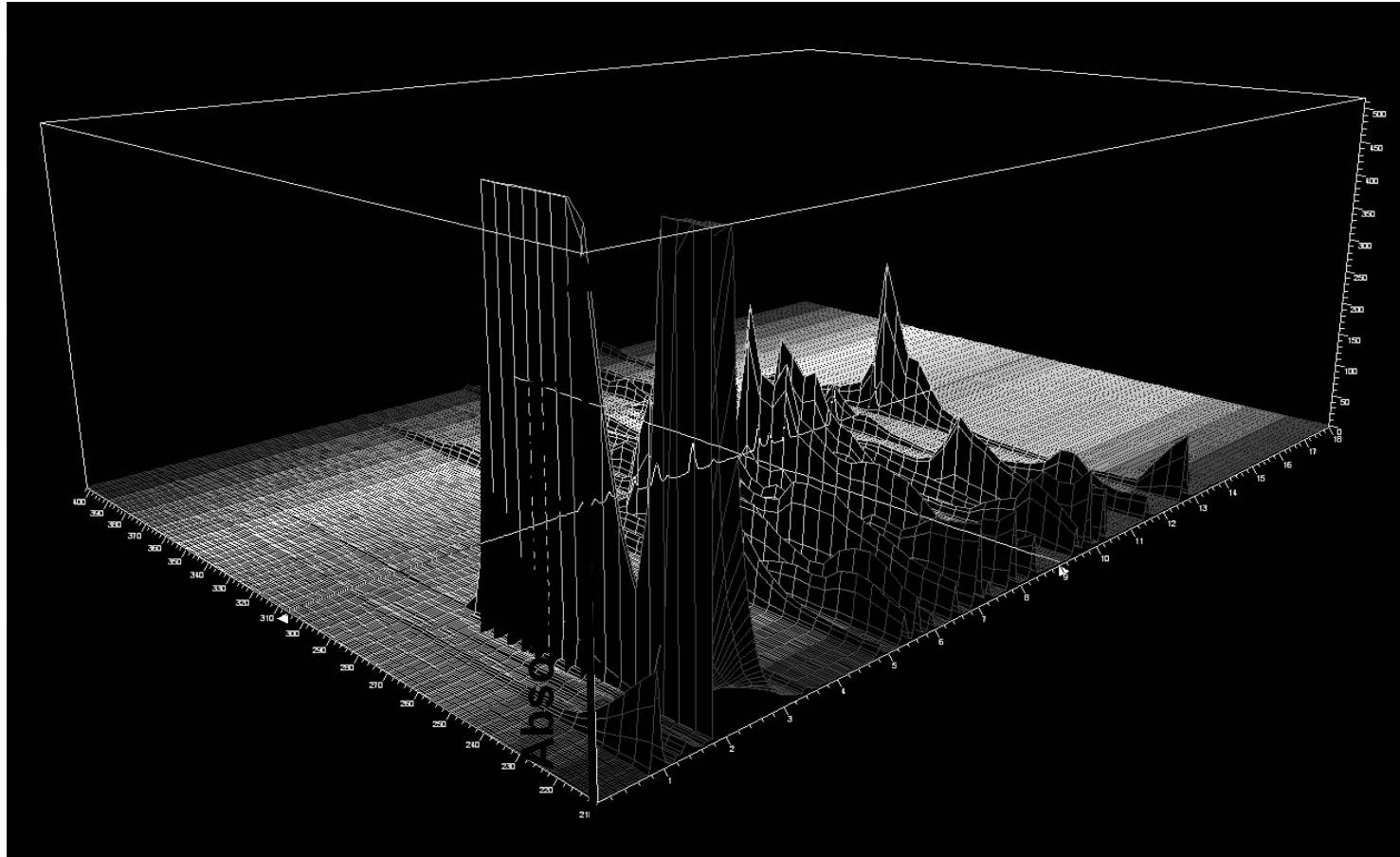


Abb. 11: 3D-Plot einer chromatographischen Trennung



# IV Das Chromatogramm

62

## IV.2 Quantitative Aussagen

- ➔ **Die Fläche eines Peaks ist der eingespritzten Stoffmenge proportional**
- ➔ **Dadurch hat jede Substanz für jede Chromatographiebedingung ihren eigenen Proportionalitätsfaktor.**
- ➔ **Diese Proportionalitätsfaktoren können durch Injektion von Kalibriergemischen, die die zu bestimmenden Substanzen in bekannter Konzentration enthalten, ermittelt werden (Methode des Internen Standards - siehe Seminar und Praktikum)**



# IV Das Chromatogramm

63

## IV.3 Kenngrößen des Chromatogramms

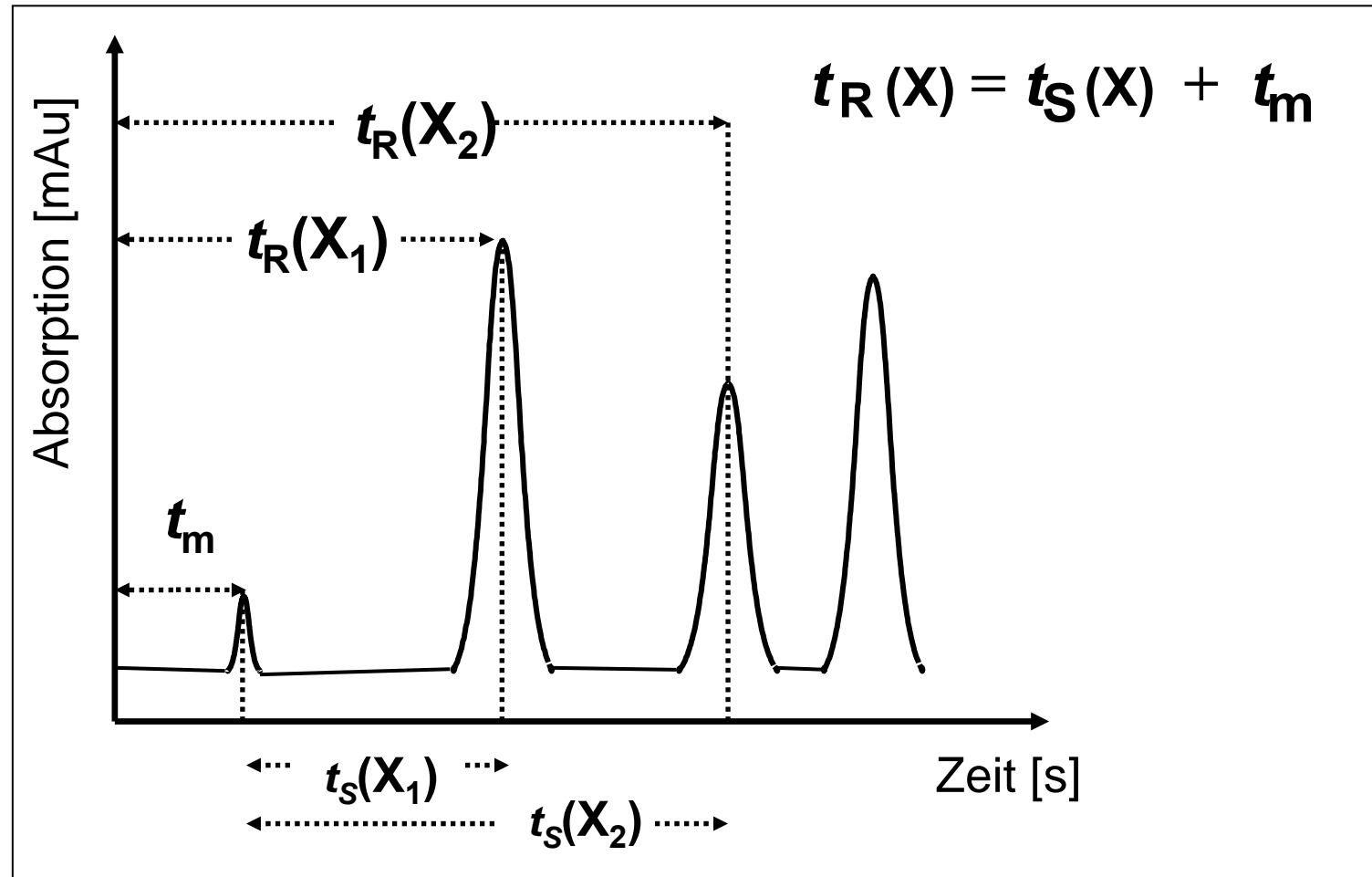


Abb. 12: Musterchromatogramm mit  $t_s(X)$  als Aufenthaltszeit der Komponente X in der stationären Phase



# IV Das Chromatogramm

## IV.4 Das Gaußprofil

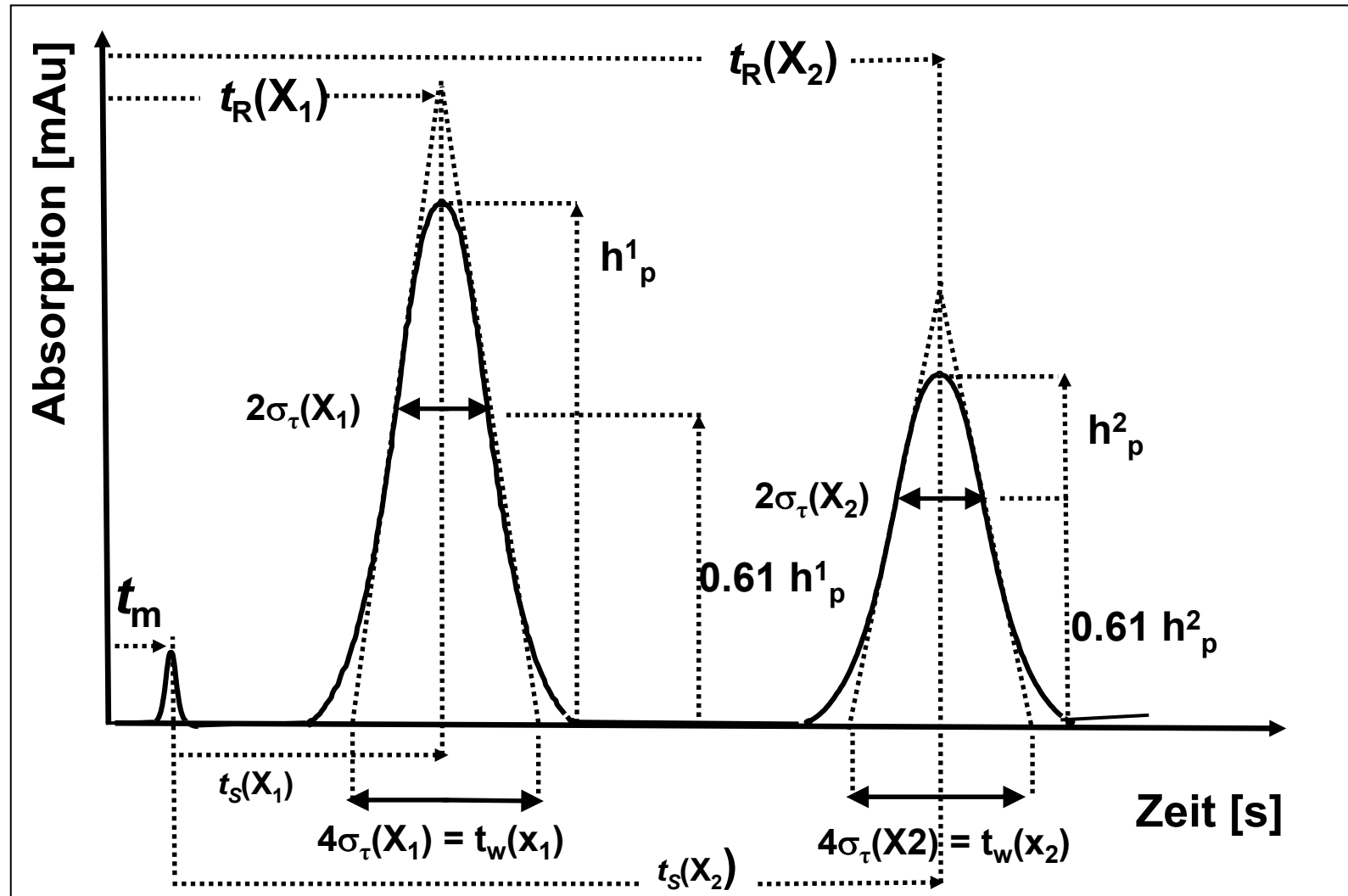


Abb. 13: Musterchromatogramm mit  $\sigma_\tau(X)$  als Diffuse Bandenverbreiterung und  $t_w$  als Basisbreite



# IV Das Chromatogramm

## IV.5 Berechnungsbeispiele

### Beispiel:

$$t_m = 2 \text{ min} \quad \Longrightarrow \quad 120 \text{ s}$$

$$t_R(X_1) = 5 \text{ min} \quad \Longrightarrow \quad 300 \text{ s}$$

$$t_R(X_2) = 10 \text{ min} \quad \Longrightarrow \quad 600 \text{ s}$$

$$k_1 = \frac{t_R(X_1) - t_m}{t_m} = \frac{300 \text{ s} - 120 \text{ s}}{120 \text{ s}} \approx 1,5$$

$$k_2 = \frac{t_R(X_2) - t_m}{t_m} = \frac{600 \text{ s} - 120 \text{ s}}{120 \text{ s}} \approx 4,0$$



# IV Das Chromatogramm

66

## IV.6 Bewertung der Retentionsfaktoren

Optimale Trennung bei  $1,5 < k < 5$

$k < 1,5$

*Zu wenig Wechselwirkung  
zwischen Substanz und  
stationärer Phase*

$k > 5$

*Zu lange Analysenzeiten  
Zu breite Peaks*



# IV Das Chromatogramm

67

## IV.7 Das Problem schlecht getrennter Peaks

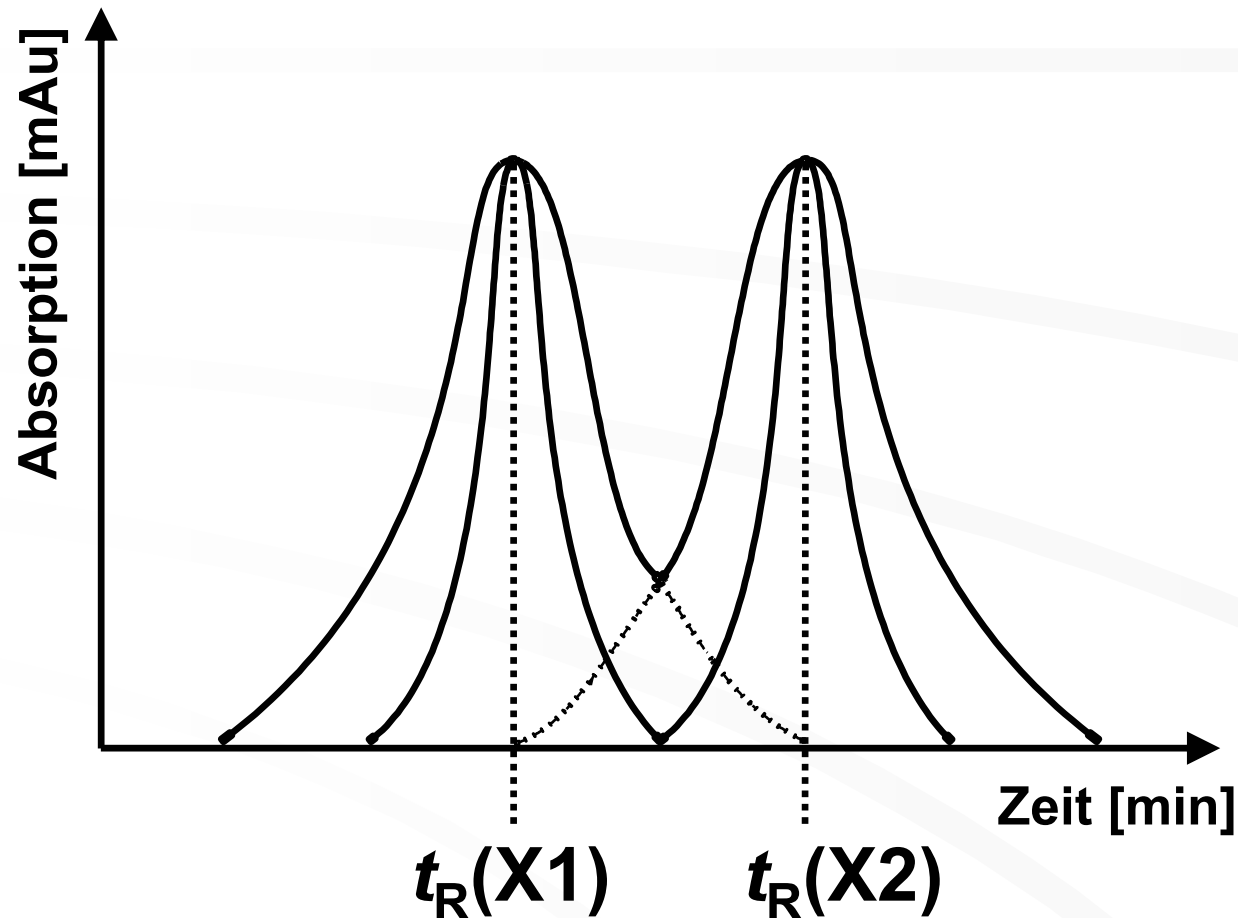


Abb. 14: Chromatogramm mit schlecht aufgelöstem Peakpaar



# IV Das Chromatogramm

## IV.8 Die Selektivität (Trennfaktor) $\alpha$

beschreibt die Güte der Trennung zweier benachbarter Peaks

Wird gebildet aus dem Quotienten der beiden Retentionsfaktoren  $k_1$  und  $k_2$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_s(X_2)}{t_s(X_1)} \quad \text{mit } k_2 \geq k_1$$

$$\alpha = 1$$



*Keine Trennung*

$$1 < \alpha < 5$$



*optimale Trennung*



# IV Das Chromatogramm

69

## IV.9 Die Auflösung $R_S$

Die geometrische Definition lautet:

$$R_S = \frac{(t_R(X_2) - t_R(X_1))}{0,5 (t_w(X_1) + t_w(X_2))}$$

Basisbreite vom Peak  
der Komponente X1

Basisbreite vom Peak  
der Komponente X2



# IV Das Chromatogramm

70

## IV.10 Bewertung der Auflösung $R_S$

$$R_S = 1$$



*Peaks liegen um ihre  
mittlere Basisbreite  
auseinander d.h.  
Überlappung 3%*

$$1 < R_S < 1.5$$



*fast vollständige  
(meist ausreichende)  
Trennung*

$$1.25 < R_S < 1.5$$



*vollständige, gute  
Trennung*

$$R_S > 1.5$$



*meist unnötig gute  
Trennung d.h. zu  
lange Retentionszeit*



Vorlesung HPLC / WS 2003/04  
Dr. R. Vasold



## ***Kapitel V: Literatur***



# V Literatur

72

Snyder L.R., Kirkland J.J.,  
*Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley.

Meyer V.R.,  
*Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*,  
Salle+Sauerländer.

Unger K.K.,  
*Handbuch der HPLC*, GIT Verlag.

Scott R.P.W.,  
*Chromatographic Detectors*, Jack Cazes, Cherry Hill,  
New Jersey

Huber L., George, S.A.,  
*Diode Array Detection in HPLC*, Jack Cazes, Cherry Hill,  
New Jersey