

1 Grundlagen der Chromatographie

Chromatographie für Einsteiger. Karl Kaltenböck
Copyright © 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
ISBN: 978-3-527-32119-3

1.1

Einführung

Chromatographie ist eine Analysetechnik, die mit Hilfe von Wechselwirkungen eine Auftrennung von komplexen Proben ermöglicht. Um einem Laien zu erklären, worum es dabei geht, bietet sich ein kleines Experiment mit wasserlöslichen Farbfilzstiften an.

Dabei werden auf einem rechteckig zugeschnittenen Filterpapier Punkte mit verschiedenen Farben gezeichnet. Anschließend wird das Filterpapier mit dem unteren Ende in Wasser eingetaucht. Durch die Kapillarwirkung des Papiers werden die Farbpunkte nach oben mitgezogen, dabei erfolgt eine Auftrennung in die verschiedenen Farben, die in einem Filzschreiber enthalten sind (Abb. 1.1 c).

Eine kurze Geschichte (Abb. 1.1 b)

Die Erfindung der Chromatographie wird Michail Semjonowitsch Tswett (1872–1919) zugeschrieben. Er beschrieb als erster die Auftrennung eines Chlorophyll-Extrakts in einer mit Inulin (ein Kohlenhydrat) gefüllten Glassäule und nannte diese Methode Farbschreibung oder Chromatographie.

Erst 30 Jahre später wurde diese Methode weiter verfolgt. Theoretische Grundlagen und chromatographische Kenngrößen wurden erarbeitet sowie der erste Gaschromatograph entwickelt. 1965 entstand das Standardwerk für Dünnschichtchromatographie von Stahl.

In den 1970er Jahren wurde aus der offenen Säulenchromatographie die Hochdruckflüssigkeitschromatographie entwickelt. Die Säulenmaterialien konnten dadurch auf 10 µm verkleinert werden, was die Trennleistung verbesserte. Eine weitere wesentliche Verbesserung brachte der Einsatz von Reverse-Phase-Säulen. Jetzt konnten auch Stoffe mit sehr ähnlichen Eigenschaften aufgetrennt werden.

Der Einsatz des Massenspektrometers als Detektor und Hochleistungscomputer zur Steuerung und Auswertung der Detektordaten (3D) eröffnet neue Möglichkeiten für die Chromatographie.

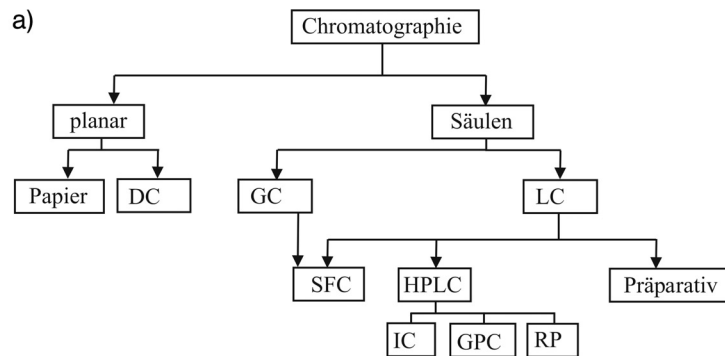
Was ist Chromatographie?

Chromatographie ist ein Verfahren, bei dem Stoffgemische durch eine unterschiedliche Verteilung in zwei miteinander nicht mischbaren Phasen aufgetrennt werden (Abb. 1.1 a).

Dabei ist eine Phase stationär (Feststoff oder Flüssigkeit), die andere Phase mobil (Gas oder Flüssigkeit).

Nach Beschaffenheit der mobilen oder stationären Phase unterscheidet man zwischen Papier- oder Dünnschichtchromatographie DC, Gaschromatographie GC, Säulenchromatographie LC und Hochdruckchromatographie HPLC.

Spezialgebiete sind noch Ionenchromatographie IC, präparative LC, superkritische Fluidchromatographie SFC, Gelpermeations-Chromatographie GPC/SEC. Manchmal wird auch die Elektrophorese zu den chromatographischen Analysetechniken gerechnet.



b)

1859	Runge Farbbilder
1907	Tswett erste Säulenchromatographie
1938	Kuhn Auftrennung von Pflanzenfarbstoffen
1940	Martin & Synge theoretische Grundlagen
1948	Tiselius Elektrophorese
1951	Martin & James erster Gaschromatograph
1952	Bloch/Purcell NMR
1956	Gruppe Klingenberg Van-Deemter-Gleichung
1965	Stahl Grundlagen der DC
1970	HPLC 10 μ Material
1980	RP-Säulen /Automatische Probengeber
1982	SFC Superkritische Fluidchromatographie
1989	CE Kapillarelektrophorese
1995	GC/MS
2006	HPLC Säulenmaterial 1,8 μ Druck 600 bar

c)

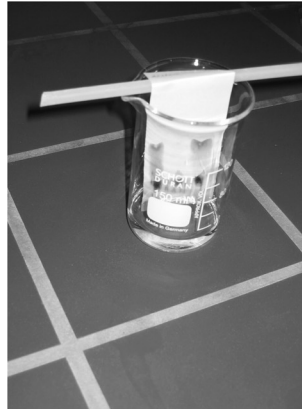


Abb. 1.1 Einführung in die Chromatographie:

a) Methodenübersicht, b) Überblick über die historische Entwicklung,
c) Auftrennung von Faserstifffarben auf Filterpapier mit Methanol.

Die wichtigsten Voraussetzungen für die Chromatographie sind: Feststoffe müssen löslich und Flüssigkeiten sollten unzersetzt verdampfbar sein.

Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie DC (TC)

Die gelöste Probe wird auf eine stationäre Phase (Papier oder Platte) punktförmig aufgetragen.

Die stationäre Phase besteht dabei aus Cellulose (Papierchromatographie) oder einer beschichteten Glasplatte oder Folie (DC).

Die mobile Phase (Wasser und/oder organisches Lösungsmittel) wird durch die Kapillarwirkung nach oben gezogen und es erfolgt dabei eine Auftrennung des Startpunkts in verschiedene Punkte des Substanzgemisches (Abb. 1.2).

Gaschromatographie GC

Bei der Gaschromatographie wird die gelöste oder flüssige Probe in einen Heizblock injiziert, verdampft auf eine Glas- oder Kapillarsäule aufgebracht. In dieser Säule (stationäre Phase) befindet sich eine Trägersubstanz mit Flüssigkeit oder ein dünner Flüssigkeitsfilm.

Als mobile Phase wird ein Gas (Wasserstoff, Stickstoff) durchgeleitet. Durch die unterschiedliche Verteilung werden die Substanzkomponenten getrennt. Ein Temperaturprogramm unterstützt dabei die Auftrennung. Am Ende der Säule wird der Gasstrom detektiert und in elektronische Signale umgewandelt (Abb. 1.3).

Säulenchromatographie LC

Die Säulenchromatographie hat als stationäre Phase ein poröses Material (z. B. Silicagel), das in einem Lösungsmittel aufgeschlämmt ist (Slurry).

Die Probe wird in möglichst konzentrierter aber flüssiger Form am oberen Ende aufgetragen, durch ständiges Nachgeben einer mobilen Phase nach unten befördert und dabei aufgetrennt. Die getrennten Schichten können am unteren Säulenende fraktioniert abgenommen und weiter bearbeitet werden. Diese Methode ist sowohl für analytische als auch für präparative Anwendung brauchbar.

High Pressure Liquid Chromatographie HPLC

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie hat sich aus der Säulenchromatographie entwickelt. Da die Auftrennung von Substanzen auch von der Teilchengröße des Säulenmaterials abhängt, wurden Teilchengrößen unter 10 µm notwendig. Dadurch wird jedoch ein höherer Druck benötigt, um die mobile Phase durch die Säule zu bewegen.

Bei der modernen HPLC befindet sich die stationäre Phase in einer Stahlsäule. Die mobile Phase wird durch eine Hochdruckpumpe (bis 600 bar) bewegt und die gelöste oder flüssige Probe wird durch einen automatischen Probengeber in Mikrolitermengen aufgetragen.

Ein Detektor zeichnet am Ende der Säule das aufgetrennte Substanzgemisch auf (Abb. 1.4).

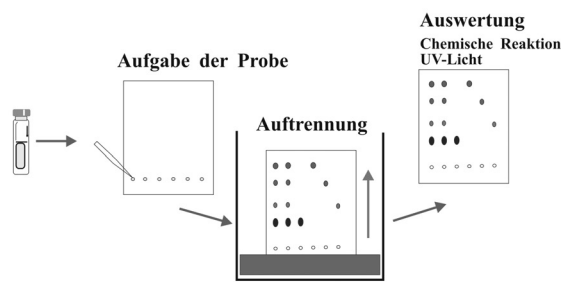
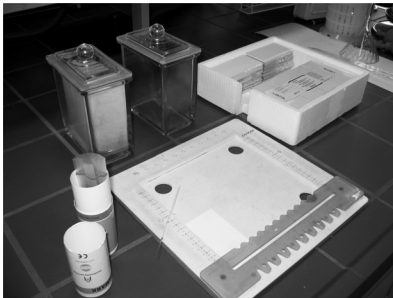


Abb. 1.2 Dünnschichtchromatographie: schematisch (rechts), Anlage im Labor (links).

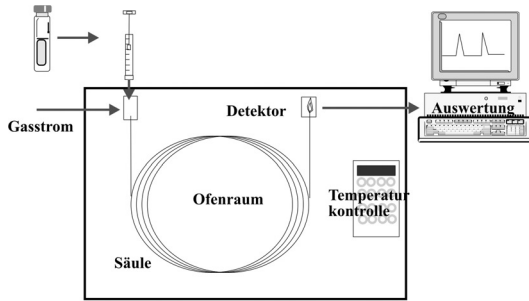


Abb. 1.3 Gaschromatographie: schematisch (links), Anlage im Labor (rechts).

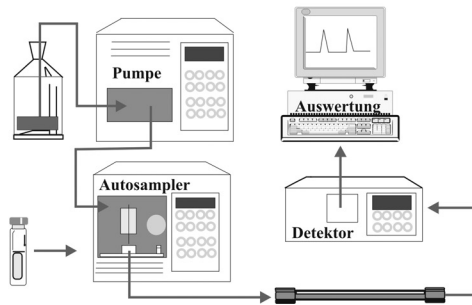


Abb. 1.4 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie: schematisch (rechts), Anlage im Labor (links).

1.2

Trennmechanismen

Welche Mechanismen ermöglichen eine Auftrennung?

In der Praxis sind immer mehrere Mechanismen für eine Trennung verantwortlich.

Die gängige Reverse Phase (Umkehrphase) kann der Adsorptions- oder auch der Verteilungschromatographie zugeordnet werden.

Molekülgröße

An porösen Oberflächen werden kleine Moleküle mehr zurückgehalten als große. Auch die Molekülform verändert die Wanderungsgeschwindigkeit (Gelfiltrationschromatographie, Abb. 1.5).

Adsorption

Adsorption ist die Anlagerung eines Stoffes an einen anderen. Dabei findet keine chemische Bindung statt. Wie groß die Affinität dabei zur mobilen Phase und zur stationären Phase ist, entscheidet über die Auftrennung (Adsorptionschromatographie, Abb. 1.6).

Verteilung

Dabei spielt die Löslichkeit in zwei miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten (oder einem Gas und einer Flüssigkeit) eine Rolle (Verteilungschromatographie, Abb. 1.7).

Ionenaustausch

An der stationären Phase sind chemische Gruppen gebunden, die entgegengesetzt geladene Teilchen der Probe binden. Ungeladene oder gleichgeladene Teilchen wandern schneller durch die stationäre Phase (Kationen- bzw. Anionenaustauschchromatographie, Abb. 1.8).

Affinität

Die Wechselwirkung von stationärer und mobiler Phase bewirkt eine Auftrennung (Affinitätschromatographie).

Dieser Spezialfall wird z. B. bei biochemischen Auftrennungen benützt (Antigen-Antikörper, Enzym-Inhibitor, Hormon-Träger Abb. 1.9).

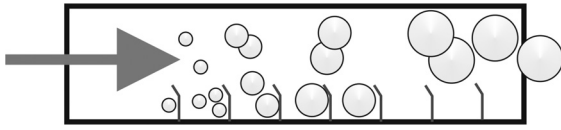


Abb. 1.5 Prinzip der Gelfiltrationschromatographie.

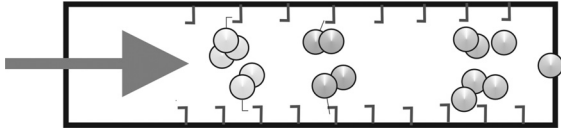


Abb. 1.6 Prinzip der Adsorptionschromatographie.

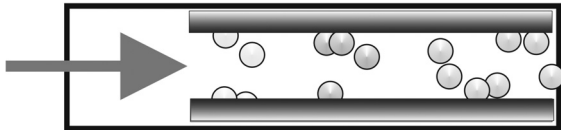


Abb. 1.7 Prinzip der Verteilungschromatographie.

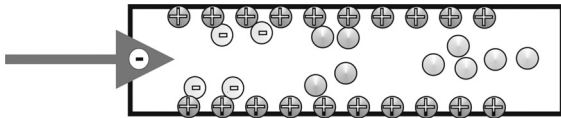


Abb. 1.8 Prinzip der Ionenaustauschchromatographie.

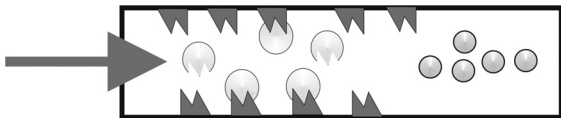


Abb. 1.9 Prinzip der Affinitätschromatographie.

1.3

Die Van-Deemter-Gleichung

Weitere Parameter, die auf den chromatographischen Prozess Einfluss nehmen, werden durch die Van-Deemter-Gleichung beschrieben (Abb. 1.10).

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

H = Bodenhöhe

Die Bodenhöhe ergibt sich aus der Anzahl der theoretischen Böden N und der Länge L einer Säule.

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

u = **Fließgeschwindigkeit** der mobilen Phase

A = Eddy Diffusion

Die Eddy Diffusion beschreibt den Einfluss des Säulenmaterials auf die Peakbreite: Die Probemoleküle legen verschieden lange Wege um die Teile der stationären Phase herum zurück. A ist unabhängig vom Fluss, hängt aber mit der Unregelmäßigkeit der Korndurchmesser zusammen (Abb. 1.11).

B = Längendiffusion

Diese Diffusion entsteht durch die Länge der Säule und das Konzentrationsgefälle vom Einspritzen bis zum Säulenende. Eine schnelle mobile Phase verbessert diesen Wert da die Verweildauer in der Säule dadurch kürzer wird (Abb. 1.12).

C = Stoffaustausch

Dieser Wert beschreibt die eigentlichen chromatographischen Prozesse. Die Wechselwirkung zwischen mobiler und stationärer Phase. Da die Wechselwirkung eine bestimmte Zeit dauert wird dieser Wert, durch einen geringen Fluss verbessert, die Längendiffusion jedoch verschlechtert.

Da alle Parameter u , A , B , C die Güte der chromatographischen Trennung beeinflussen, muss die Fließgeschwindigkeit so gewählt werden, dass eine möglichst große Bodenhöhe H eine optimale Chromatographie ermöglicht.

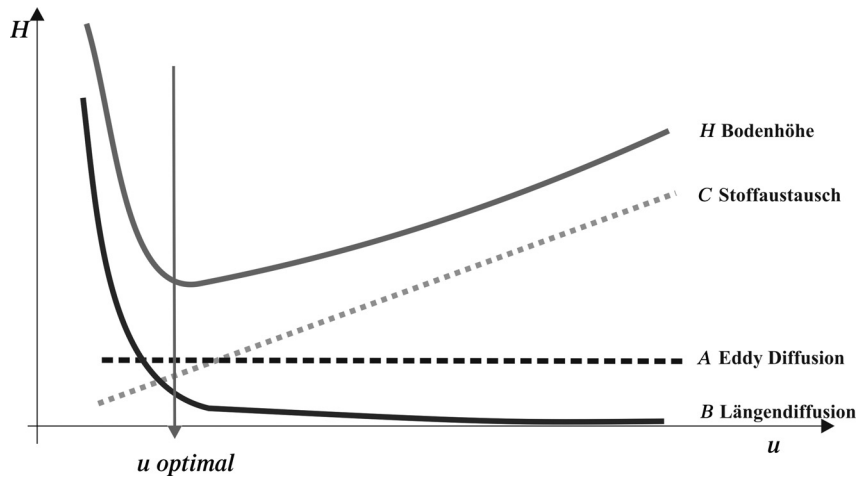


Abb. 1.10 Parameter in der Van-Deemter-Gleichung.

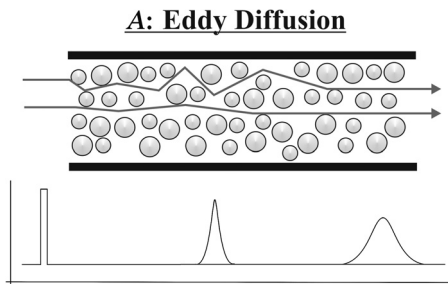


Abb. 1.11 Eddy Diffusion A.

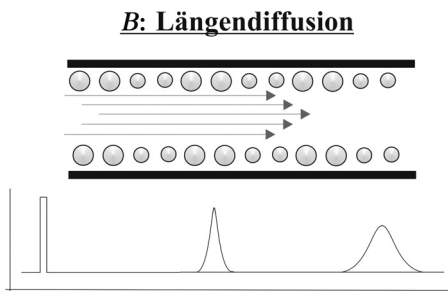


Abb. 1.12 Längendiffusion B.

