

# 1

## Einführung

### 1.1

#### Entwicklungen von den klassischen zu den instrumentellen Trennmethoden

Chromatographische Methoden haben heute einen hohen Stellenwert und eine weite Verbreitung in all jenen Laboratorien gefunden, die sich mit der Analytik komplexer Substanzgemische beschäftigen. Trennungen chemischer Stoffe, die nach unserem heutigen Verständnis in den Bereich der Chromatographie gehören, wurden mit ersten systematischen Ansätzen bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben. Die eigentliche, sehr stürmisch fortschreitende Entwicklung zu einer Trenn- und Bestimmungsmethode und damit sowohl zu einer qualitativen als auch quantitativen Analysenmethode begann aber erst in den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts und hat zu den Fortschritten in den gesamten Naturwissenschaften und auch in der Medizin einen wesentlichen Beitrag geleistet.

Der Begriff Chromatographie umfasst heute alle physikalisch-chemischen Trennmethoden, bei denen eine Trennung von Stoffen infolge unterschiedlicher Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase zustande kommt. Ein chromatographisches System besteht demnach aus einem nicht mischbaren Phasenpaar, dessen eine Phase sich an der anderen vorbei bewegt. Noch 1950 wurde von *Zechmeister* (1889–1972) eine Definition in folgendem, weitaus engerem Sinn gegeben: „Die Chromatographie umfaßt diejenigen Prozesse, welche die Trennung von Substanzen aus einem Stoffgemisch und ihre selektive Fixierung auf der festen Oberfläche eines Trägers gestatten“ (Weil 1954). Zu diesem Zeitpunkt gab es noch keine Gas-Flüssigkeits-Chromatographie. Flüssigkeits-chromatographische Trennungen beruhten in erster Linie auf Adsorptionseffekten und wurden in Säulen oder an dünnen Schichten durchgeführt.

In den vergangenen 50 Jahren sind Methoden und Techniken entwickelt worden, bei denen außer der Adsorption auch andere Vorgänge wie Flüssig-flüssig-Verteilung, Ionenaustausch und Gelpermeation den Trenneffekt bestimmen.

Die Bezeichnung „Chromatographie“ wurde bereits 1835 im Angelsächsischen als Fachausdruck zur Beschreibung von Farben, in der analytischen Chemie erstmalig von dem Botaniker *M. Tswett* (1872–1919) verwendet. Tswett gebrauchte in seinen historischen Arbeiten von 1903 (siehe unten) zunächst noch den Begriff der Adsorptionsanalyse, 1906 für sein Verfahren zur Trennung von Pflanzenfarbstof-

fen die Bezeichnung „chromatographische Adsorptionsanalyse“. Die wörtliche Übersetzung des Wortes Chromatographie aus den griechischen Wörtern *chroma*: Farbe und *graphein*: schreiben lautet demnach „Farbschreiben“. Die ersten von Tswett getrennten Substanzen waren Farbstoffe (Chlorophylle, Xanthophylle, Carotine) und erst mit den erweiterten Möglichkeiten apparativer Detektion können heute auch farblose Stoffe chromatographisch analysiert werden.

**Vorläufer chromatographischer Trennmethode** Bei der Auswertung der wissenschaftlichen Arbeiten, die nach heutiger Definition in den Bereich der Chromatographie gehören, lassen sich nach *Weil* und *Williamson* (1953) drei historische Perioden unterscheiden: 1. die empirische, 2. die wissenschaftliche (theoretische) und 3. die technologische Periode.

Innerhalb der ersten Periode beschäftigten sich mehrere Wissenschaftler auf verschiedenen Gebieten der Naturwissenschaften mit den experimentellen Möglichkeiten zur Trennung von Stoffen.

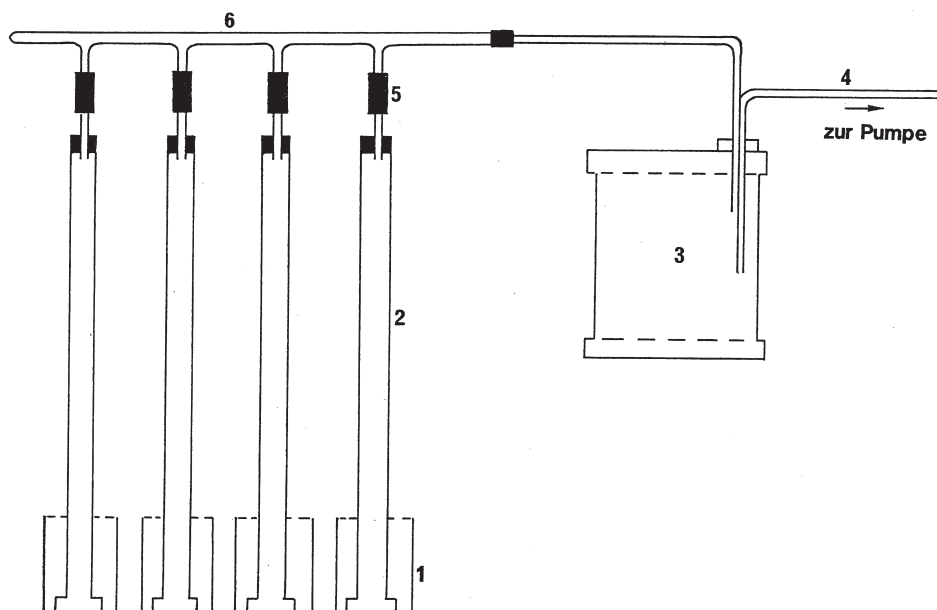
Von Friedlieb Ferdinand *Runge* (1794–1867), der sich vorwiegend mit Farbstoffen beschäftigte, stammen die recht ästhetischen Bilder, die er nach dem Auftragen gefärbter Flüssigkeiten auf Druck- und Löschpapier erhielt. Auch chemische Reaktionen führte er auf Löschpapier durch und beschrieb die Ergebnisse dieser Form von Tüpfelanalyse in seinen Werken „Der Bildungstrieb der Stoffe. Veranschaulicht in selbständig gewachsenen Bildern“ (1855) und „Zur Farbenchemie, Musterbilder für Freunde des Schönen und zum Gebrauch für Zeichner, Maler, Verzierer und Zeugdrucker“ (1850). *Runge* wird aufgrund dieser Arbeiten die Priorität in der Entdeckung der Papierchromatographie zugeschrieben (*Weil* und *Williamson* 1953). Eine analytisch-chemische Absicht oder gar Problemstellung ist diesen Arbeiten jedoch nicht zu entnehmen.

Zur teilweisen Trennung von Stoffen wurde ab 1861 von Christian Friedrich *Schönbein* (1799–1868), Professor in Basel, Entdecker des Ozons und der Schießbaumwolle, und von seinem Schüler Friedrich *Goppelsröder* (1837–1919) die Kapillarwirkung des Papiers systematisch untersucht und über das Verhalten verschiedener Stoffe berichtet. Bei dieser Technik wird ein Papierstreifen direkt in die zu untersuchende Lösung getaucht. Fließmittelgemische waren noch nicht bekannt, so dass erst durch mehrfache Wiederholung dieses Kapillarovorganges eine teilweise Trennung erreicht wurde (*Grüne* 1959). 1901 erschien von *Goppelsröder* die erste Monographie über die Ergebnisse dieser Arbeiten unter dem Titel „Capillaranalyse“, in der vor allem auch Anwendungen zur Arzneimittelprüfung beschrieben werden.

Bereits 1850 berichteten die englischen Chemiker *Thompson* und *Way* über einen Ionenaustausch an Feststoffen. Sie beobachteten nach der Behandlung von Bodenproben mit Ammoniumsalzen, dass Ammoniumionen sorbiert werden und Calciumionen dafür in Lösung gelangen. Die Reversibilität und Stöchiometrie des Ionenaustausches wurde 1858 bzw. 1876 von *Eichhorn* an Tonmaterialien bzw. von *Lemberg* an Aluminiumsilicaten beobachtet und beschrieben. An analytische Anwendungen dachte zu dieser Zeit niemand, der technische Gebrauch stand zunächst im Vordergrund – z. B. die Entfernung von Natrium- und Kaliumionen aus Zuckerrübensaft (1896).

Die ersten adsorptions-chromatographischen Trennungen in einer gefüllten Säule wurden 1893 von dem britischen Chemiker L. *Reed* an Kaolin durchgeführt – z. B. von  $\text{FeCl}_3$  und  $\text{CuSO}_4$ . Der amerikanische Chemiker und Geologe D. T. *Day* (1859–1925) berichtete in den Jahren 1897 bis 1903 in mehreren Arbeiten über das Verhalten von Petroleumproben an verschiedenen Feststoffen (Bodenproben wie z. B. Kalkstein). Er selbst bezeichnete sein Verfahren als fraktionierte Filtration, womit er verschiedene gefärbte Fraktionen erhielt (Abb. 1.1). Diese Technik würden wir heute als (erste chromatographische) Frontalanalyse bezeichnen. Day verglich seine Experimente zur Fraktionierung von Petroleum mit den Ergebnissen durch Destillation. Zur gleichen Zeit erschien auch ein Bericht der deutschen Chemiker *Albrecht* und *Engler* (Carl Oswald Viktor E., 1842–1925, Karlsruhe) in der Zeitschrift „Angewandte Chemie“ über den Vorgang der Filtration von Petroleum (Erdöl) durch Florida-Erde.

**Adsorptionschromatographie von Pflanzenfarbstoffen durch M. Tswett** Michael *Tswett* wurde als Sohn einer italienisch-türkischen Mutter und eines ukrainischen Vaters am 14. Mai 1872 in Asti/Italien geboren. Er wuchs in der Schweiz auf, wo er in Genf und Lausanne Botanik, Physik und Chemie studierte. Sein akademischer Werdegang führte ihn von Genf (Promotion 1896) über St. Petersburg nach Warschau (Privat-Dozent 1902), wo er an der Veterinärmedizinischen Fakultät 1907 zum Professor der Botanik ernannt wurde und 1908 eine Professur an der Techni-



**Abb. 1.1** Apparatur zur Technik der „fraktionierten Filtration“ mit mehreren Säulen für Petroleum nach der Methode von Day, um 1900. 1: Vorratsgefäße für Petroleumproben, 2: Sä-

len mit Adsorbentien, 3: Kammer zum Auffangen der Fraktionen, 4: Glasrohr zur Pumpe, 5 und 6: Verbindungsteile. Quelle: Schwedt (1982).

schen Hochschule übernahm. In Warschau entstanden seine grundlegenden Arbeiten zur Adsorptionschromatographie von Pflanzenfarbstoffen. In einem Vortrag am 21. März 1903 vor der biologischen Sektion der Warschauer Naturforschenden Gesellschaft berichtete er „Über eine neue Kategorie von Adsorptionserscheinungen und ihre Anwendung in der biochemischen Analyse“. Er stellte systematische Studien zu den Adsorptionseigenschaften einer großen Zahl anorganischer und organischer Farbstoffe vor, die mit der erfolgreichen Trennung (Adsorptionsanalyse) der Chlorophyllpigmente aus einer Ligroinlösung an gepulvertem Calciumcarbonat abschlossen.

1906 veröffentlichte Tswett in den „Berichten der deutschen botanischen Gesellschaft“ die grundlegende Arbeit zur „Adsorptionsanalyse und chromatographischen Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls“. In dieser Arbeit wurde noch nicht die Säulentechnik allgemein verwendet, sondern die fraktionierte Adsorption: Außer Calciumcarbonat erwies sich auch das Kohlenhydrat Inulin als geeignetes Adsorbens, um die Blattfarbstoffe im Reagenzglas von einander zu trennen. Die Elution der adsorbierten Substanzen erfolgte mit Ethanol. Die Adsorptionssäule wurde aber bereits in dieser Arbeit eingesetzt (Abb. 1.2).

Ganz wesentlich für die analytische Anwendung der Chromatographie ist die Tatsache, dass Tswett bereits in den ersten Arbeiten die Detektion in Form der Fluoreszenzanalyse mit den Trennungen verbindet; seine ersten wissenschaftlichen Arbeiten handeln von der Fluoreszenz der Pflanzenfarbstoffe. Durch die Ereignisse des Ersten Weltkrieges wurden diese erfolgreichen Arbeiten unterbrochen: Tswett musste nach Gorki (seit 1900 Nischni Nowgorod, russ. Gebietshauptstadt an der Mündung der Oka in die Wolga) fliehen, wurde 1918 Dozent in Dorpat (Estland), musste infolge der Kriegsergebnisse (Einmarsch deutscher Truppen) aber auch von dort wieder flüchten und starb am 29. Juni 1919 in Woronek, wohin die Universität Dorpat verlegt worden war. Sein erster Bericht über die Adsorptionsanalyse des Chlorophylls zeigt bereits in der Zusammenfassung, dass er die Möglichkeiten der analytischen Anwendung auf die verschiedensten Probleme der Praxis erkannt hatte. Jedoch sollten noch über 20 Jahre vergehen, bevor im Arbeitskreis von Richard Kuhn (1900–1967, Nobelpreis 1938) diese Methodik zu einem erheblichen Fortschritt in der Chemie der Naturstoffe beitragen konnte.

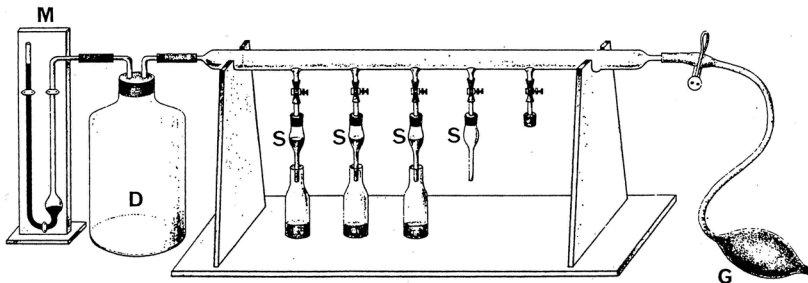


Abb. 1.2 Säulenchromatographie von Tswett (1906). S: Säulen, G: Gummiball zum Pumpen, M: Manometer, D: Druckgefäß. Quelle: Schwedt (1982).

**Verteilungschromatographie in Säulen** Der nächste Meilenstein in der Geschichte der Säulenchromatographie wurde 1941 von Archer John Porter *Martin* (geb. 1910) und Richard Laurence Millington *Synge* (1914–1994) gesetzt. Beide Wissenschaftler hatten in Cambridge/England Chemie studiert und arbeiteten zur Zeit ihrer historischen Experimente im Forschungsinstitut der Textilindustrie in Leeds. 1952 erhielten sie gemeinsam den Nobelpreis. Der von ihnen geschaffenen Methode der Verteilungs-(Flüssig-flüssig-)Chromatographie sind zunächst Untersuchungen zur Isolierung acetylierter Aminosäuren in Proteinhydrolysaten durch Extraktion in einer speziellen Apparatur aus der wässrigen in eine organische Phase (Chloroform) aufgrund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten vorausgegangen. Dieses Prinzip der Gegenstromverteilung wurde noch im selben Jahr von ihnen auf eine chromatographische Säule, gefüllt mit Kieselgel, übertragen: Von dem trockenen Kieselgel wird eine erhebliche Menge an Wasser aufgenommen, Chloroform wird als mobile Phase durch die Säule bewegt.

Mit Martin und Synge begann auch die zweite historische Phase der Chromatographie – nach der *empirischen Phase* wurde nun die *wissenschaftliche Epoche* eingeleitet. Beide Wissenschaftler haben auch die theoretischen Grundlagen der Flüssig-flüssig-Verteilung, auf denen die Verteilungschromatographie beruht, beschrieben und zur Trennung einer Reihe acetylierter Aminosäuren systematisch genutzt.

Einen weiteren Schritt zur heutigen breiten Anwendung der Säulenchromatographie stellt die Entwicklung der *Gradientenelutionstechnik* durch Arne Wilhelm Kaurin *Tiselius* (1902–1971) in Uppsala dar. 1952 erschien die erste grundlegende und systematische Arbeit, in der die stufenweise, diskontinuierliche Elution durch eine kontinuierliche Gradientenelution abgelöst wurde und die Anwendung auf die Trennung von Zuckern aus einem Dextrinhydrolysat gezeigt wird.

**Papierchromatographie** Die erste verteilungschromatographische Trennung in Säulen von acetylierten Aminosäuren ermöglichte keine Trennung basischer und Dicarboxylaminosäuren. Weitere Versuche mit Cellulose anstelle von Kieselgel und mit *n*-Butanol in der mobilen Phase lösten dieses Trennproblem und führten direkt zur Anwendung von geeignetem Filterpapier in Form der *Papierchromatographie*. Für die Trennung von Aminosäuren mit diesem chromatographischen System ist keine vorherige Acetylierung mehr erforderlich.

Der Ursprung der Papierchromatographie ist zwar bereits in den Arbeiten von Runge zu sehen, ein analytisch brauchbares Verfahren wurde aber erst mit der Herstellung von Papier mit gleichmäßiger Stärke 1943/44 möglich. *Consden*, *Gordon* und *Martin* beschrieben außerdem das Prinzip der zweidimensionalen Papierchromatographie (Abb. 1.3).

Mit diesen Arbeiten begannen systematische theoretische und praktische Untersuchungen, die der Papierchromatographie auch aufgrund der einfachen Durchführungstechnik ein weites Feld an Anwendungen eröffneten. Die Anzahl der Arbeiten, die auf der Papierchromatographie beruhen, wuchs in den Jahren von 1943 bis 1949 in geometrischer Reihe.

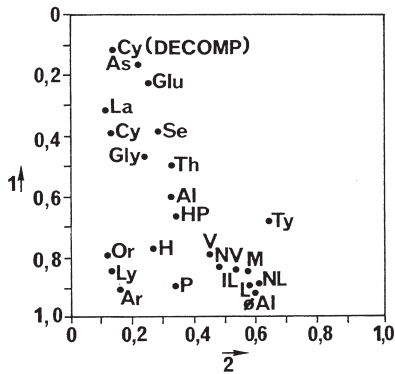


Abb. 1.3 Zweidimensionale Papierchromatographie von Aminosäuren nach Consden, Gordon und Martin (1944). 1. Fließmittel: 0,3 % Phenol in Ammoniak, 2. Fließmittel: Collidin (2,4,6-Trimethylpyridin), Al: Alanin, Ar: Arginin,

Gly: Glycin, H: Histidin, HP: Hydroxyprolin, Il: Isoleucin, La: Lanthionin, L: Leucin, Ly: Lysin, M: Methionin, NL: Norleucin, NV: Norvalin, Or: Ornithin, ØAl: Phenylalanin, P: Prolin, Se: Serin, Th: Threonin, Ty: Tyrosin, V: Valin. Quelle: Schwedt (1982).

Die Tswett'sche Chromatographie, die Gegenstromverteilung und auch die Kapillaranalyse werden als die Pfeiler dieser speziellen Methode angesehen. Infolge der langen Trennzeiten (verursacht durch geringe Fließgeschwindigkeiten der mobilen Phase) und einer weniger guten Reproduzierbarkeit als bei anderen chromatographischen Methoden hat die Papierchromatographie heute jedoch keine Bedeutung mehr. Sie ist durch die Verwendung von dünnen Schichten aus Cellulose-Materialien in die Dünnschicht- bzw. Planarchromatographie integriert. In der Entwicklung der Chromatographie hat sie jedoch wesentlich zu unseren heutigen Kenntnissen beigetragen.

**Von der Dünnschicht- zur Planarchromatographie** 1938 erschien die erste Veröffentlichung zur Dünnschichtchromatographie von *Izmailov* und *Shraiber* unter dem Titel „A spot chromatographic method of analysis and its application in pharmacy“, in der die Tswett'sche Methode in Form loser Schichten aus Aluminiumoxid als Zirkularmethode angewandt wurde. Die Detektion zahlreicher pharmazeutisch wichtiger Substanzen erfolgte aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften unter einer UV-Lampe. Bindemittel (Stärke) setzten erstmals *Meinhard* und *Hall* 1949 ein und erhielten so eine mechanische Stabilität der Schichten, wodurch auch andere Entwicklungstechniken außer der Zirkularmethode möglich wurden. Die Unterlage für die Adsorbentien stellen in beiden Arbeiten Glasplatten dar.

Aber erst die zahlreichen Arbeiten von Egon *Stahl* (Saarbrücken) seit 1956 trugen zur schnellen Entwicklung der Dünnschichtchromatographie (DC) bis zu einer Hochleistungs-Planarchromatographie bei. Zunächst dominierte die Adsorptionschromatographie, heute lassen sich die verschiedensten chromatographischen Trennprinzipien – Verteilungs-, Ionenaustausch-, Umkehrphasen- und

Gelchromatographie – an zahlreichen Materialien sowie Fertigplatten und -folien durchführen.

Seit 1973 werden mit sehr eng fraktioniertem Kieselgel mit Teilchendurchmessern unter 5  $\mu\text{m}$  hohe Trennschärfen (Trennleistungen) auch in der Planarchromatographie, vergleichbar mit denen in der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie in Säulen (HPLC), erreicht. Von L. V. *Andreev* wurden zuerst mit diesen Materialien sehr schnelle Trennungen beschrieben, vom Institut für Chromatographie in Bad Dürkheim (R. E. *Kaiser*) kamen weitere Impulse zur Weiterentwicklung dieser speziellen DC-Technik, die zunächst als *micro thin layer chromatography*, später als *high-performance thin-layer chromatography* (HPTLC) oder wegen der eingesetzten geringen Substanzmengen auch als *Nano-DC* bezeichnet wurde. Damit hatte sich auch in der DC eine ähnliche technologische Entwicklung vollzogen wie in der Säulenchromatographie (siehe weiter unten).

**Vom Ionenaustausch zur Ionenchromatographie** Nach den Beobachtungen von Ionenaustauschvorgängen im Boden und an einzelnen anorganischen Materialien begann die analytische Anwendung in Säulen mit der ersten Synthese eines organischen Austauschermaterials durch *Adams* und *Holmes* 1935: Durch die Kondensation von Phenolsulfonsäuren mit Methanal (Formaldehyd) erhielten sie Ionenaustauscher, die im Gegensatz zu den bereits bekannten anorganischen Ionenaustauschern auf Zeolith-Basis aus wässrigen Lösungen nicht nur Metallionen sondern auch Wasserstoffionen (Hydroniumionen) austauschen können. Als Anionenaustauscher werden Kondensationsprodukte aus Polyaminen mit Methanal hergestellt. Ebenso wie die grundlegenden Arbeiten zur Verteilungschromatographie wurden auch diese Arbeiten in einem Forschungsinstitut außerhalb einer Universität durchgeführt (British Department of Scientific and Industrial Research).

Die erste Monographie zum Thema *Ionenaustauscher* erschien 1951 von *O. Samuelson*, Göteborg. In den sechziger und siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurde eine Reihe spezieller Ionenaustauscher synthetisiert, die u. a. über chelatbildende Gruppen verfügen (auch auf Cellulosebasis). Bereits in den 1950er Jahren wurden auch Ionenaustauscherpapiere (*M. Lederer*) hergestellt und erfolgreich eingesetzt. Ionenaustauschermaterialien haben sich auch für DC-Trennungen auf Fertigplatten bewährt.

Nach der zunächst überwiegenden Anwendung für die Analytik anorganischer Substanzen wurde 1949 die Ionenaustausch-Chromatographie von *W. E. Cohn* in der Biochemie und 1951 von *S. Moore* und *W. H. Stein* mit großem Erfolg in die Aminosäureanalytik eingeführt. Die damit beginnende Entwicklung im Bereich der Chemie und vor allem Biochemie von Aminosäuren, Proteinen und Peptiden ist mit auf die erfolgreiche Anwendung dieser chromatographischen Methoden zurückzuführen.

Eine der ersten Arbeiten zur Anwendung der HPLC in der Ionenchromatographie anorganischer Substanzen von *J. F. K. Huber* und *A. M. van Urk-Schoen* (1972) beschreibt die schnelle Trennung der Alkaliionen mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie. Die Autoren verwendeten Salze der radioaktiven Isotope, um

eine radiometrische Detektion durchführen zu können. Der Begriff *Ionenchromatographie* wurde drei Jahre später durch die Arbeit von *Small, Stevens* und *Bauman* geprägt – zunächst als „novel ion-exchange chromatographic method“. Ihre neue Technik bestand darin, dass sie eine Ionenaustauscher-Trennsäule mit einer sogenannten „Suppressorsäule“ (Ionenaustauscher), welche den Elektrolyten im Eluenten neutralisiert, und mit einem Durchfluss-Konduktometer zu einem Analysensystem verbanden. Seit 1979 lassen sich Ionentrennungen auch ohne Suppressor konduktometrisch detektieren: *Gjerde, Fritz* und *Schmuckler* setzten Anionenaustauscher mit niedriger Austauschkapazität und Eluenten geringer Leitfähigkeit ein (1985).

**Gelchromatographie** Die praktische Anwendung der Gelpermeation oder Gelfiltration begann erst 1959, als *Porath* und *Flodin* die ersten vernetzten Dextran-Gele synthetisierten, denen sie den Namen *Sephadex* aus *Separation – Pharmacia* (Pharmazeutische Fabrik in Uppsala) – *Dextran* gaben. Die Bezeichnung Gelfiltration wurde zunächst auf Vorschlag ihres Lehrers *Tiselius* gewählt. Mit Hilfe dieser Methode ließen sich in der folgenden Zeit zahlreiche Trennprobleme in der Biochemie lösen. Bereits wenige Jahre später wurden von *Moore* makroporöse Styrol-Divinylbenzen-Gele in den Laboratorien der Dow Chemical Company in Freeport/Texas zur Trennung von Substanzen über einen breiten Molmassenbereich eingesetzt. Beide Materialien haben sich bis heute in einer Reihe von Varianten sowohl in der Analytik nieder- und hochmolekularer Substanzen in der Naturstoff- und Biochemie als auch in der Analytik synthetischer Polymere bewährt. Begrifflich spricht man jedoch heute eher von Größenausschluss-Chromatographie in Anlehnung an die für die Trennung entscheidenden Prozesse.

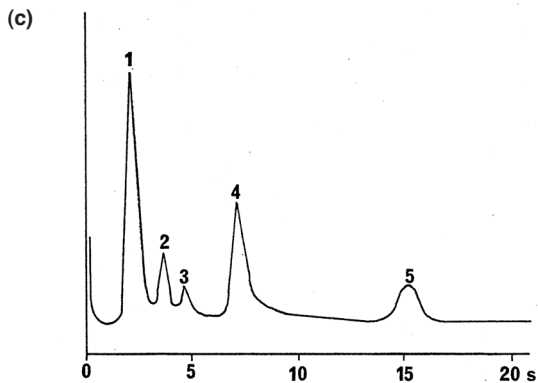
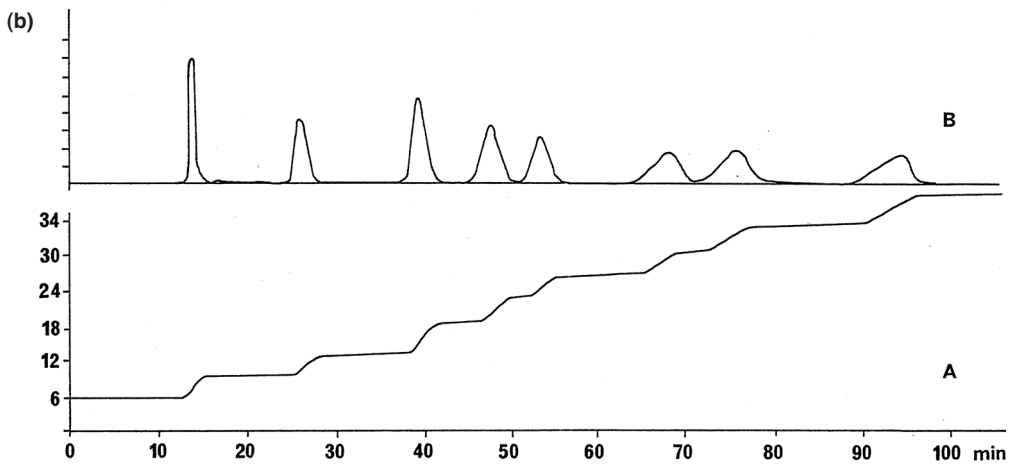
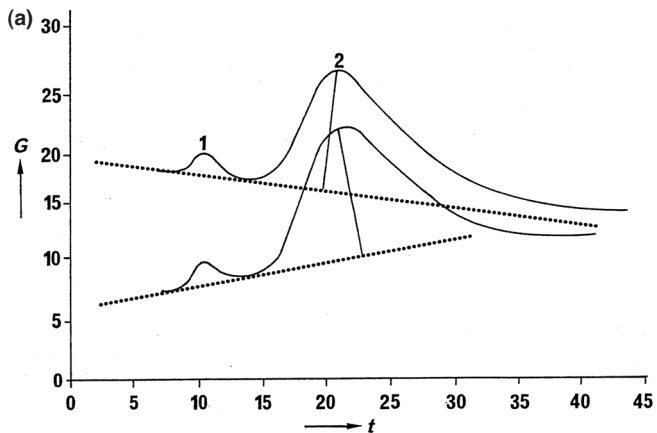
**Affinitätschromatographie** Das Prinzip der Affinitätschromatographie wurde erstmals von *Campbell* et al. 1951 beschrieben: Sie isolierten Antikörper im Säulenverfahren an einer Cellulose mit kovalent gebundenem Antigen. Ein wesentlicher Fortschritt wurde durch *Porath* und *Axén* 1967 erzielt: Sie führten die durch Bromcyan aktivierte *Sepharose* in die Affinitätschromatographie ein.

**Gaschromatographie** 1941 publizierten *G. Hesse* und Mitarbeiter die erste Arbeit zur präparativen Anwendung der Gas-Adsorptions-Chromatographie. Hesses Doktorand *H. Eilbracht* hatte an Kieselgel mit Kohlenstoffdioxid als mobiler Phase

**Abb. 1.4** Meilensteine der Gaschromatographie. (a) Das erste analytische Gaschromatogramm – Dissertation *Prior*, Innsbruck (bei *E. Cremer*): Trennung von Luft (1) und Kohlendioxid (2) an Kohle. (b) Erste Gas-Flüssig-Chromatographie von Fettsäuren. Säule (11 ft), flüssige Phase: Stearinsäure (10 %) in Silicon DC 550; Durchflussrate: 18,2 mL min<sup>-1</sup> Stickstoff; Temperatur: 137 °C. Quelle: James und

Martin (1952). A: Elutionskurve (ermittelt durch Mikrotitration), B: differentielle Kurve (berechnet). (c) Eines der ersten Kapillar-Gaschromatogramme von *Golay* (1958). Säule: 16 ft × 0,25 mm I.D., belegt mit Carbowax 1540; 1: Luft, 2: Aceton, 3: Schwefelkohlenstoff, 4: Chloroform, 5: Dichlormethan; Detektor: Wärmeleitfähigkeitszelle mit Oszilloskop.



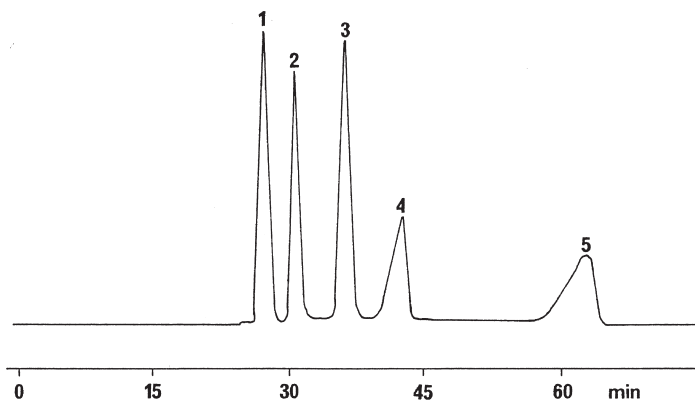


Brom und Iod sowie einige Carbonsäureester getrennt, die durch Destillation vorher nicht trennbar waren. Sie bezeichneten ihre Methode als Adsorptions-Destillation. Der erste vollständige Gaschromatograph zur analytischen Anwendung wurde im Laboratorium von Erika Cremer von ihrem Doktoranden F. Prior 1946 zur Trennung von Luft und Kohlenstoffdioxid entwickelt. Außer in dieser Dissertation wurde erstmals 1949 in Form eines Versammlungsberichtes des Vereins Österreichischer Chemiker über diesen Gaschromatographen mit Wärmeleitfähigkeitszelle und Oszilloskop berichtet (Abb. 1.4a).

Obwohl bereits 1941 von Martin und Synge für die Verteilungschromatographie auch eine gasförmige mobile Phase als einsetzbar postuliert wurde, werden die ersten Trennungen von Carbonsäuren (*n*-Alkansäuren) erst 1952 von James und Martin beschrieben (Abb. 1.4b). Ein ganz wesentlicher Fortschritt für die quantitative Analyse bestand in der Kombination der Trennsäule mit einer Mikrotitrationszelle. Die analytische Anwendung der GC weitete sich jedoch erst durch die nachfolgende Entwicklung von Detektoren wie des Flammenionisationsdetektors und Elektroneneinfangdetektors (z. B. durch E. Lovelock 1958) in wachsendem Umfang aus. Der Flammenionisationsdetektor wurde auf der Tagung des Institute of Petroleum in Amsterdam vorgestellt, wo zugleich auch das Prinzip des Elektroneneinfangdetektors beschrieben wurde. Als ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der Chromatographie ist die Entwicklung von Kapillarsäulen nach dem Konzept und den ersten Arbeiten von Golay 1957 zu verzeichnen, der damit einen entscheidenden Beitrag zur heutigen Leistungsfähigkeit der GC in vielen Bereichen der Naturwissenschaften und der Medizin geleistet hat (Abb. 1.4c).

**Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)** An der Entwicklung der modernen, schnellen Flüssig(chromatographie) in Säulen, der *high-performance liquid chromatography*, ist eine Reihe von Wissenschaftlern beteiligt. Die Basis dieser Säulentechnik bilden die Theorien von van Deemter u. a. zur Gaschromatographie sowie vor allem von J. C. Giddings (1965) und P. D. Hamilton (1966). Ergebnis ihrer Arbeiten ist der Einsatz von Teilchen geringer Durchmesser (3 bis 30  $\mu\text{m}$ ) in dünnen Trennsäulen von 2 bis 6 mm Innendurchmesser, wobei für Durchflussraten in gleichen Bereichen wie der klassischen, meist hydrostatisch betriebenen Säulenchromatographie Drücke bis zu 300 bar erforderlich wurden.

Mit Abschluss der empirischen Phase (klassische Säulenchromatographie) und der wissenschaftlichen Phase (Theorien der Chromatographie) begann mit der HPLC (und auch Kapillar-GC) die dritte historische Periode, die *technologische Phase*. Sie ist von den Fortschritten in der Technologie zur Herstellung von Trennmaterien zur weiteren Verbesserung der Trennleistungen (Verkürzung der Trennzeiten) und vor allem durch Entwicklungen im Bereich der Detektoren, Koppelungstechniken, Automatisierung und des Computereinsatzes geprägt. Eines der ersten Chromatogramme mittels HPLC hatte 1964 J. F. K. Huber (damals TH Eindhoven, später Universität Wien) erhalten (Abb. 1.5). Die erste instrumentelle HPLC-Analyse wurde 1966 in Rom durch C. Horváth vorgestellt. Auf einem Chromatographie-Symposium in Miami wurden bereits 1969 die ersten HPLC-Geräte vorgestellt.



**Abb. 1.5** Erstes Chromatogramm mit der HPLC (1964) nach J. F. K. Huber mit 4000 theoretischen Trennstufen, entsprechend einer Trennstufenhöhe von 0,19 mm. Säule: 770 × 1,5 mm aus Glas, gepackt mit Diatomit (Teilchendurchmesser 37–50 µm), belegt mit

1,2,3-Tris(cyanoethoxy)propan; mobile Phase: 2,2,4-Trimethylpentan; 1: Butylbenzen, 2: Nitrobenzen, 3: 2-Aminobenzoesäuremethylester, 4: 3-Phenyl-1-propanol, 5:  $\alpha$ -Hydroxytoluen (1-Methyl-2-hydroxybenzen), Schwedt (1982).

**Elektrophorese** Die Wanderung gelöster Ionen im elektrischen Feld hat grundlegend bereits 1897 F. W. G. *Kohlrausch* untersucht. Er entwickelte eine Theorie der Ionenwanderung. J. *Kendall* (USA) beschrieb 1923 eine „ion migration method“ zur Trennung Seltener Erden und einiger einfacher Säuren als erstes Beispiel der Isochaphorese. 1937 entwickelte der spätere Nobelpreisträger (1948) A. W. K. *Tiselius* (1902–1971) eine Apparatur und ein Verfahren zur trägerfreien Elektrophorese von Proteinen. Die Disk-Elektrophorese und die Verwendung von Polyacrylamidgelen wurden 1959 erstmals beschrieben bzw. angewendet. Als elektrokinetische Trennmethode bezeichnete *Kolin* 1953 die isoelektrische Fokussierung. Die Entwicklungen zur leistungsfähigen Kapillarelektrophorese (CE) beruhen auf den Arbeiten verschiedener Gruppen, vor allem denen von S. *Hjerten* (1967), von R. *Virtanen* (1974), von F. E. P. *Mikkers*, F. M. *Everaerts* und Th. P. E. M. *Verheggen* (1979) sowie von J. W. *Jorgenson* und K. D. *Lukacs* (1981).

1984 kam als eine der „Brückenmethoden“ zur Kapillarelektrophorese die *mikzellare elektrokinetische Chromatographie* (MEKC) hinzu, die apparativ kaum Unterschiede zur CE aufweist. Der Trennmechanismus beruht hier auf einer Kombination aus Elektrophorese, Elektroosmose und Verteilung zwischen zwei Phasen: Einer elektrophoretischen Trennung wird hierbei also ein chromatographisches Trennprinzip überlagert. Die *Kapillar-Elektrochromatographie* als zweite Brückenmethode arbeitet im Unterschied zur MEKC mit einer immobilisierten stationären Phase. Ihre Vorzüge wurden bereits 1974 erkannt, apparativ wurde diese Methode jedoch erst mit Entwicklung der CE realisiert.

**Feld-Fluss-Fraktionierung** Eine der jüngsten Trennmethode, speziell für Polymere bzw. Makromoleküle und auch für Partikelentrennungen, stellt die *field flow fractionation*

nation, abgekürzt FFF (Feld-Fluss-Fraktionierung), auch *flow FFF* ( $F^4$ ) dar. Die grundlegenden Untersuchungen stammen von J. C. Giddings (ab 1966), aber erst seit einigen Jahren sind Analysengeräte auch kommerziell erhältlich. Die Trennwirkung der Methode beruht auf einer spezifischen Verteilung verschiedener Probenbestandteile in Bereiche unterschiedlicher Strömungsgeschwindigkeiten. Durch Kopplung mit modernen Detektionsmethoden hat sich die FFF zu einer leistungsfähigen, noch ausbaufähigen instrumentellen Methode für die Analytik großer Moleküle oder Partikel entwickelt.

## 1.2 Systematik und Definitionen

Eine Einteilung der *chromatographischen Trennmethode*n erfolgt allgemein nach der Art der stationären Phase bzw. der Kombination von stationärer und mobiler Phase. Einfache Trennmethode wie Filtration, Zentrifugation, Extraktion, Destillation u. ä. nutzen zur Stofftrennung meistens nur Unterschiede in einer Substanz-eigenschaft, so bei der Destillation die unterschiedlichen Dampfdrücke der Komponenten eines Gemisches. In diesem Fall ist die Wahrscheinlichkeit relativ groß, dass bei Gemischen mit vielen Komponenten die gewählte Eigenschaft zur Trennung nicht ausreicht – weil sie bei mehreren Komponenten identisch ist oder nur geringfügige Unterschiede bestehen. Der Trenneffekt lässt sich bereits wesentlich erhöhen, wenn mehrere Eigenschaften genutzt werden – so z. B. bei der Extraktion in Form der Flüssig-flüssig-Verteilung die Löslichkeiten der Komponenten in zwei Phasen. Eine ganz wesentliche Steigerung der Trennleistung wird erreicht, wenn der Trenneffekt der wiederholten Einstellung der Phasengleichgewichte zusätzlich mit den Trenneffekten kinetischer Vorgänge gekoppelt wird – wie es bei chromatographischen Trennverfahren der Fall ist.

Aufgrund der großen Zahl der bis heute entwickelten analytischen Trennmethode ist es nicht einfach, sie alle in ein umfassendes und zugleich einprägsames System einzuordnen. Die Klassifizierung kann anhand der zugrunde liegenden Trennmechanismen, der verwendeten apparativen Ausstattung und der Art der mobilen und stationären Phasen erfolgen. Eine Einteilung nach der Art der zu trennenden Substanzen – z. B. als Proteinchromatographie oder Ionenchromatographie – ist im Allgemeinen nicht üblich und auch nicht sinnvoll. Ein geeignetes Schema ergibt sich dann, wenn man zunächst einmal die *chromatographischen Verfahren* nach der eingesetzten mobilen Phase klassifiziert. Die *elektrophoretischen Trennverfahren* sowie die der *Feld-Fluss-Fraktionierung* bilden jeweils eine eigene Klasse.

Nach dem *Aggregatzustand* der mobilen Phase unterscheidet man zwischen *Gas- und Flüssigchromatographie* – GC bzw. LC – sowie *überkritischer Fluidchromatographie* (SFC). Zur deutschsprachigen Nomenklatur sind dazu im „Handbuch der Gaschromatographie“ von Leibnitz und Struppe (1984) folgende Anmerkungen zu finden:

„Im deutschen Schrifttum setzt sich mehr und mehr abweichend vom dreisprachigen Nomenklaturvorschlag von Bayer u. a. (1968) die Schreibweise „Gaschromatographie“ durch, womit nunmehr der Dudenregel zum sparsamen Gebrauch des Erläuterungsbindestricts entsprochen wird. Im Falle einer flüssigen mobilen Phase sollte nicht nur der Einfachheit halber auf die substantivierte Form „Flüssigkeits-Chromatographie“ verzichtet werden, sondern auch weil durch den Begriff „Flüssigchromatographie“ besser zum Ausdruck kommt, daß nicht „Chromatographie einer Flüssigkeit“, sondern „Chromatographie mit flüssiger mobiler Phase“ gemeint ist. Eine eindeutiger Bezeichnungsweise wie etwa Gasphasen- und Flüssigkeitsphasen-Chromatographie ist aber nicht eingeführt worden.“

Diese Vorschläge werden in den folgenden Kapiteln umgesetzt.

Als stationäre Phasen können bei allen Verfahren sowohl immobilisierte Flüssigkeiten als auch feste Phasen verwendet werden. Die Wahl von mobiler und stationärer Phase hängt entscheidend vom zu lösenden Trennproblem ab. Verschiedene Adsorbentien, Molekularsiebe und chemisch gebundene Phasen, Harze und polymere Gele werden als stationäre Phasen eingesetzt. Ihr Strukturen und Eigenschaften werden in den jeweiligen Abschnitten beschrieben.

In Säulen mit Innendurchmessern von einigen Mikrometern (Kapillaren) bis zu einigen Zentimetern, in denen sich die verschiedenen stationären Phasen (Trennmaterialien) befinden und durch welche die mobile Phase sowie das zu trennende Substanzgemisch strömen, werden Trennungen mittels GC, LC und SFC durchgeführt. Daneben existieren mit der Dünnschicht- (DC) und der heute nahezu bedeutungslosen Papierchromatographie (PC) noch zwei der Flüssigchromatographie zuzuordnende Verfahren, die ohne Säulen durchgeführt werden. Bei beiden Verfahren werden planar angeordnete Materialien als stationäre Phasen (Papier = Cellulose) oder auf Trägern (Glas, Aluminium, Kunststoff) verwendet – und daher als *Planarchromatographie* zusammengefasst.

Neben den zwei Grundarten Gas- und Flüssigchromatographie ist eine weitere Klassifizierung nach den Eigenschaften der stationären Phasen möglich. Mit den Eigenschaften sind die Wechselwirkungen, die prinzipiellen Mechanismen der Trennvorgänge angesprochen. Daraus ergibt sich unter Berücksichtigung der Ausführungsarten bei der Flüssigchromatographie – im Säulen- oder Dünnschichtverfahren – folgende Einteilung (Tab. 1.1):

Eine allgemeinere Einteilung der Chromatographie ist nach dem jeweiligen Aggregatzustand der beiden Phasen möglich – dann gilt:

- Gas-fest-Chromatographie (*gas-solid chromatography* GSC)
- Gas-flüssig-Chromatographie (*gas-liquid chromatography* GLC)
- Flüssig-fest-Chromatographie (*liquid-solid chromatography* LSC)
- Flüssig-flüssig-Chromatographie (*liquid-liquid chromatography* LLC)

In der Schreibweise werden die Grundworte Gas- oder Flüssigchromatographie sowie die Begriffe in Tab. 1.1 ohne Trennungsstrich von denen, die aus mehr als zwei Begriffen zusammengesetzt sind, unterschieden.

**Tab. 1.1** Systematik der chromatographischen Methoden (GC: Gaschromatographie, LC: Flüssigchromatographie in Säulen, DC: Dünnschichtchromatographie).

Trennmechanismus/-methode	Ausführungsart
Adsorptionschromatographie	GC, LC, DC
Molekularsiebchromatographie	GC
Ausschluss(Gel)chromatographie	GC, LC
Ionenaustausch-Chromatographie	LC, DC
Affinitätschromatographie	LC
Verteilungschromatographie	GC, LC, DC

Eine *praxisrelevante*, d. h. an der apparativen Ausstattung orientierte Systematik ergibt vier Systeme der Chromatographie:

- *Planarchromatographie* von der historischen Papierchromatographie bis zur instrumentellen *high performance thin-layer chromatography* (HPTLC) mit den Trennprinzipien Verteilung, Adsorption, Größenausschluss und Ionenaustausch
- *Flüssigchromatographie* (in Säulen) mit den Methoden der Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Ionenpaar-, Ionenausschluss-, Normalphasen-, Umkehrphasen-, Größenausschluss- und Affinitätschromatographie
- *Gaschromatographie* in gepackten oder (überwiegend) Kapillarsäulen als Adsorptions- und Verteilungschromatographie sowie als Trennungen an chiralen Phasen
- *Superfluid-Chromatographie* mit überkritischen Gasen als mobile Phasen – ein Spezialfall

Wie die Übersicht zeigt, ermöglicht es die Flüssigchromatographie, die größte Zahl an Trennprinzipien zu verwirklichen. Die Stellenwerte der einzelnen Techniken werden in den entsprechenden Kapiteln behandelt.

Elektrophoretische und apparativ sowie methodisch verwandte Trennmethode lassen sich im Hinblick auf die Geräteausstattung unter Elektrophoresetechniken mit planarer oder kapillarer Trennstrecke zusammenfassen. Darin sind auch die in Abschnitt 1.1 genannten neueren Methoden der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie und der Kapillar-Elektrochromatographie enthalten.

## Literatur

- Ettre, L.S., Zlatkis, A. (Ed.) (1979) *75 years of chromatography – a historical dialogue*, Journal of Chromatography Library, vol. 17, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York.
- Grüne, A. (1953) Kapillaranalyse, ein Weg zur Papierchromatographie, *Oesterr. Chemiker Ztg.* **60**, 301.
- Hjerten, S. (1967) Free Zone Electrophoresis, *Chromatogr. Rev.* **9**, 122–239.
- James, A. T., Martin, A. J. P., (1952) Gas–liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem. J.*, **50**, 679 – 690.
- Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. (1981) Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries, *Anal. Chem.* **53**, 1298–1302.
- Leibnitz, E., Struppe, G.(1984) Handbuch der Gaschromatographie, Akademische Verlagsgesellschaft Geest&Portig, Leipzig.
- Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, Th.P.E.M. (1979) High-performance zone electrophoresis, *Chromatogr.* **169**, 11–20.
- Schwedt, G. (1982) Von der Kapillaranalyse zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, *CLB Chemie für Labor und Betrieb* **33**, 99–108.
- Virtanen, R. (1974) Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection, *Acta Polytechnica Scand.* **123**, 1–67.
- Weil, H. (1954) Die Anfänge der Chromatographie I und II, *Chem.-Ztg.* **78**, 419 und 496.
- Weil, H., Williams, T.I. (1953) Der Ursprung der Papierchromatographie, *Naturwiss.* **40**, 1.

## Weiterführende Literatur

- Engelhardt, H. (1999) Chromatographie: immer schnellere und bessere Trennungen, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **47**, 1024–1025.
- Ettre, L.S. (2008) *Chapters in the evolution of chromatography*, Imperial College Pr., London.
- Ettre, L.S., Zlatkis, A. (1979) 75 years of chromatography – a historical dialogue, *J. Chromatogr. Library* Vol. 17, Elsevier, Amsterdam – Oxford – New York.
- Giddings, J.C., Yang, F.J., Myers, M.N. (1976) Flow Field-Flow Fractionation. A Versatile New Separation Method, *Science* **193**, 1244–1245.
- Kuhn, R., Hofstetter-Kuhn, S. (1993) Kap. 1.2 History, in *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 1–3.
- Pyell, U. (1997) MEKC und CEC – miniaturisierte Trenntechniken, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **45**, 33–35.
- Schwedt, G. (1985) Multi-Ionen-Chromatographie, *GIT Fachz. Lab.* **7**, 697–705.
- Thielking, H., Adolphi, U., Kulicke, W.-M. (1996) Querflussfraktionierung gekoppelt mit Lichtstreuung, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **44**, 370–372.
- Wintermeyer, U. (1989) *Die Wurzeln der Chromatographie. Historischer Abriß von den Anfängen bis zur Dünnschicht-Chromatographie*, GIT Verlag, Darmstadt.

