

## 8 HPLC-Chromatographie [65]

Mit der Chromatographie können verschiedene Substanzen aus Gemischen getrennt werden, wobei ihre jeweilige unterschiedliche Wechselwirkung mit einer festen, unbeweglichen *stationären Phase* und einer bewegten, *mobilen Phase* ausgenutzt wird. Die Anordnung kann etwa in Papierstreifen (*Papierchromatographie*) oder Kieselgelschichten auf Glas- oder Aluminiumsubstrat (*Dünnschichtchromatographie*) bestehen, die in ein Lösungsmittel gestellt werden, oder in Form eines mit Kieselgel gefüllten Glasrohres (*Säulenchromatographie*), in das von oben das Lösungsmittel eingefüllt wird. In den ersten beiden Fällen steigt das Lösungsmittel, die mobile Phase, aufgrund von Kapillarkräften nach oben, während es bei der Säulenchromatographie unter seinem eigenen Gewicht durch die Säule wandert. Die stärker mit der stationären Phase wechselwirkenden Substanzen wandern langsamer mit dem Lösungsmittel, so daß sie sich in einzelne abtrennbare Fraktionen aufteilen.

Die HPLC (*HPLC: High Pressure Liquid Chromatography* oder *High Performance Liquid Chromatography*) kann als eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenchromatographie aufgefaßt werden, wobei im typischen Einsatzgebiet der Adsorptionschromatographie die Stärke der Trennung durch Verkleinerung der Kieselgelpartikel von ca. 100  $\mu\text{m}$  auf ca. 5  $\mu\text{m}$  wesentlich verbessert werden konnte. Dadurch konnten auch die Säulen deutlich verkleinert werden. Die meist verwendeten, druckfesten Edelstahlsäulen besitzen häufig nur noch eine Länge um 10 cm bei Durchmessern um 1 cm. Wegen des stark gestiegenen Widerstandes gegenüber dem Lösungsmitteldurchfluß wird die mobile Phase unter hohem Druck (10 - 400 bar) durch die Kieselgelschicht gepreßt, wodurch gegenüber der herkömmlichen Säulenchromatographie auch die Versuchsdauer verkürzt werden konnte.

Nach dem Austreten aus der Säule werden die Fraktionen meist mit UV-Dektoren durch ihre Absorption im UV, aber auch mit Spektrophotometern, durch Leitfähigkeitsmessung, Fluoreszenzdetektoren, Kapazitätsdetektoren oder Refraktometern registriert.

Es wird weiter zwischen Ionenaustausch-Chromatographie, Verteilungschromatographie, Ausschlußchromatographie und der verbreiteten Adsorptionschromatographie unterschieden, die alle in der Form der HPLC-Chromatographie eingesetzt werden können.

Die Chromatographie mit Ionenaustauschern (*Ionenaustausch-Chromatographie*), z.B. sulfoniertem Polystyrol, eignet sich zur Trennung von Säure- oder Basengemischen mit verschiedenen pK-Werten oder Gemischen von mehrwertigen Ionen.

Bei der *Verteilungschromatographie* wird, wie beim Ausschütteln, die unterschiedliche Verteilung zu trennender Substanzen in zwei flüssigen Phasen verwendet. Die

stationäre flüssige Phase ist dabei an ein poröses Trägermaterial, z.B. Kieselgur, gebunden. Die Verteilungschromatographie wird eingesetzt, wenn Verbindungen zu trennen sind, die an einer unbelegten konventionellen Säulenpackung katalytischen Reaktionen unterworfen sind.

Meist zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung organischer Polymere wird die *Ausschlußchromatographie* eingesetzt. Hier werden allein Größenunterschiede zur Trennung herangezogen, die Wechselwirkung mit der Oberfläche der Säulenfüllung sollte gering sein. Als Füllmaterial werden hochporöse Kieselgele oder organische Polymere eingesetzt. Kleinere Moleküle diffundieren auch in kleine Poren und werden von dem Transport mit der mobilen Phase vorübergehend ausgeschlossen. Daher treten kleine Moleküle bei diesem Trennverfahren zuletzt aus der Säule aus.

Die am häufigsten angewendete *Adsorptionschromatographie* verwendet die unterschiedlich starke Adsorption der zu trennenden Substanzen an der stationären Phase. Alle folgenden Ausführungen beziehen sich auf die Adsorptionschromatographie. Die Stärke der Adsorption und damit auch die Austrittszeit kann durch die eingesetzte mobile Phase, bei der HPLC auch *Eluent* genannt, beeinflußt werden.

Als Füllmaterial, den *Adsorbentien*, werden meist Kieselgele oder Aluminiumoxid ( $\gamma - \text{Al}_2\text{O}_3$ ) eingesetzt.

Bei Aluminiumoxid kommt als Adsorptionsform u.U. neben der Physisorption auch die irreversible und unerwünschte Chemisorption vor.

An diesen polaren Materialien werden polarere Substanzen stärker zurückgehalten, wogegen sehr unpolare Substanzen nicht zurückgehalten und nicht getrennt werden können. Mit dem Einsatz verschiedener Eluenten kann die *Retentionszeit*, die zusätzliche Verweilzeit in der Säule gegenüber der unbeeinflußten mobilen Phase, variiert werden.

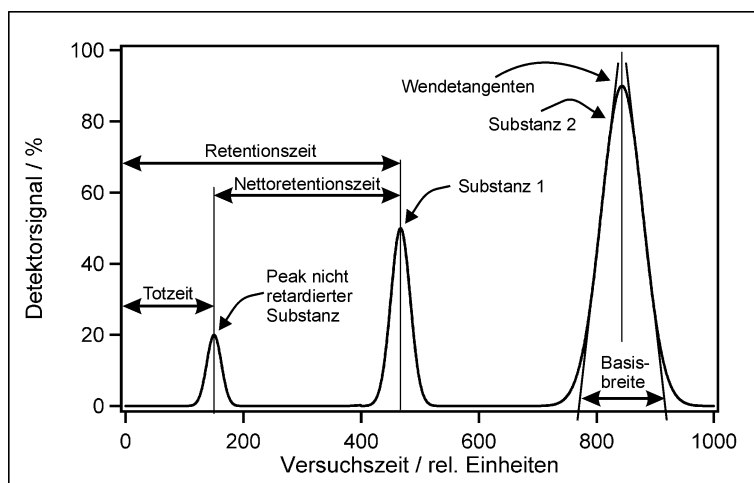
In der empirischen *eluotropen Reihe* wird die Stärke der Auswaschung der Proben-substanzen aus der Säule mit den unterschiedlichen Lösungsmitteln aufgeführt:

*Wasser > Ethanol > Acetonitril > Aceton > THF > Toluol > n - Hexan*

Die Gegenwart von geringen Mengen polarer Verunreinigungen in unpolaren Lösungsmitteln kann die Stellung in der eluotropen Reihe stark verändern.

Bei der Adsorptionschromatographie mit *reversed phase*-Säulen werden Füllmaterialien verwendet, bei denen durch chemische Reaktion organische Reste ohne funktionelle Gruppe an die Oberfläche des Trägermaterials gebunden werden. Über eine Si-O-R Bindung verknüpfte organische Reste sind wenig hydrolysestabil, dagegen können Trägermaterialien mit Si-N-R Bindungen im pH-Bereich von 4 bis 7,5 eingesetzt werden. Bei höheren pH-Werten ist auch der Kieselgelträger nicht mehr stabil.

Durch die nun unpolare Oberfläche des Kieselgels können unpolare Substanzen getrennt werden, deren Retentionszeit mit abnehmender Polarität zunimmt. Polare Substanzen werden kaum zurückgehalten, treten mit kurzen Retentionszeiten im *Vorlaufbereich* aus und können nicht mehr getrennt werden.



**Abb. 8.1:** Schematische Darstellung eines Chromatogramms. Drei Substanzfraktionen treffen nach Passieren der Säule nacheinander am Detektor ein. (nach [65])

Die elutrope Reihe kehrt sich bei der „reversed phase“-Chromatographie um, so daß nun unpolare Eluenten die unpolare Säule schneller eluieren.

Um die Versuchsdurchführung bei der „reversed phase“-Chromatographie zu beschleunigen, kann die Eluentenzusammensetzung kontinuierlich (linear) durch erhöhte Zugabe einer unpolaren Lösungsmittelkomponente verändert werden. Dadurch werden zwar auch die polaren Substanzen anfangs gut aufgetrennt, aber auch die unpolaren verlassen die Säule mit gesteigerter Elutionskraft des Lösungsmittelgemischs schneller. Wegen der geringeren Wechselwirkung zwischen Säulenoberfläche und Lösungsmittel sind die unpolaren Oberflächen der „reversed phase“-Chromatographie besser als normale Kieselgelfüllungen für die Gradientenelution geeignet.

Einige wichtige Größen bei HPLC-Messungen werden in dem schematischen Chromatogramm von Abb.8.1 dargestellt. Zunächst muß die *Totzeit* genannt werden, die Zeit bis die Lösungsmittelfront, die sich bei Versuchsbeginn an der Probenaufnahme befunden hat, nach Säulendurchlauf den Detektor erreicht. Sie wird durch das Maximum der ersten Fraktion markiert, wenn von ihr angenommen werden kann, daß sie ohne Verzögerung die Säule passieren konnte.

Die Zeitintervalle von Versuchsbeginn bis zum Eintreffen der anderen Fraktionen am Detektor, werden ihre jeweiligen *Retentionszeiten* oder auch *Bruttoretentionszeiten* genannt.

Die Verzögerung, die auf der Wechselwirkung mit der Säulenfüllung beruht und sich aus der Retentionszeit abzüglich der Totzeit errechnet, ist die *Nettoretentionszeit* der zugehörigen Fraktion. Sie ist für eine Substanz bei gleichem Lösungsmittel, Säulenmaterial und gleicher Volumengeschwindigkeit des Eluenten charakteristisch. Als *Volumengeschwindigkeit* wird das pro Zeiteinheit aus der Säule austretende

Lösungsmittelvolumen bezeichnet.

Rechts in Abb.8.1 ist die Methode der Bestimmung der Basislinienbreite der Peaks gezeigt, bei der die Tangenten der Kurve durch ihre Wendepunkte verwendet werden.

Für reproduzierbare chromatographische Messungen ist eine lineare Adsorptionsisotherme die Voraussetzung. Dann ist die adsorbierte Substanzmenge bei gleicher Temperatur proportional der Gesamtmenge der vorhandenen Substanz. Unter diesen Bedingungen besitzen die gemessenen Substanzmengen, bzw. die proportionalen Detektorsignale, die Form einer Gauss-Verteilung, wie sie in Abb.8.1 gezeigt ist.

Andernfalls ändert sich durch die veränderte Adsorption die Retentionszeit der Substanz mit der eingesetzten Menge. Bei gekrümmten Isothermen, etwa vom Langmuir-Typ mit Abnahme der zusätzlichen Adsorption bei steigender Konzentration, verkürzt sich die Retentionszeit. Zusätzlich verschiebt sich hier das Maximum des Fraktionspeaks zum Anfang hin, und ein „Verschmieren“ des Peaks zum Ende hin ist zu beobachten.

Die Adsorption an der stationären Phase sollte auf Physisorption, wie Wechselwirkungen zwischen Dipolen oder induzierten Dipolen, Wasserstoffbrückenbindung oder charge-transfer-Komplexen beruhen.

Chemisorption wird seltener beobachtet und kann zu irreversibler Adsorption, sehr langen Retentionszeiten mit dem Verschleppen in die folgende Versuchsreihe oder der chemischen Veränderung der zu trennenden Substanzen führen.

Weitere, detailliertere Informationen zur HPLC-Chromatografie können in [65] gefunden werden.