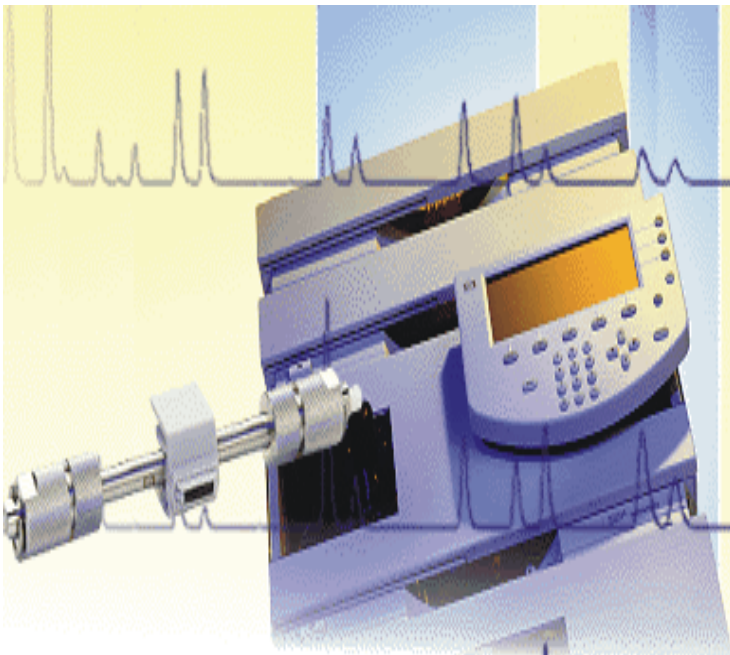


Rüdiger Kuhnke

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



Eine Einführung für
Auszubildende in
biologischen und
chemischen Berufen

Übersicht

1. Analytische Chemie
2. Prinzip der Chromatographie
3. Die Komponenten einer HPLC-Anlage
4. Detektion und Quantifizierung
5. Reversed Phase HPLC
6. Abschluß und Zusammenfassung

Analytische Chemie

- Analyse und Analytik
- Wie macht man eine Analyse?
- Instrumentelle Analytik

Analyse und Analytik

Analyse:

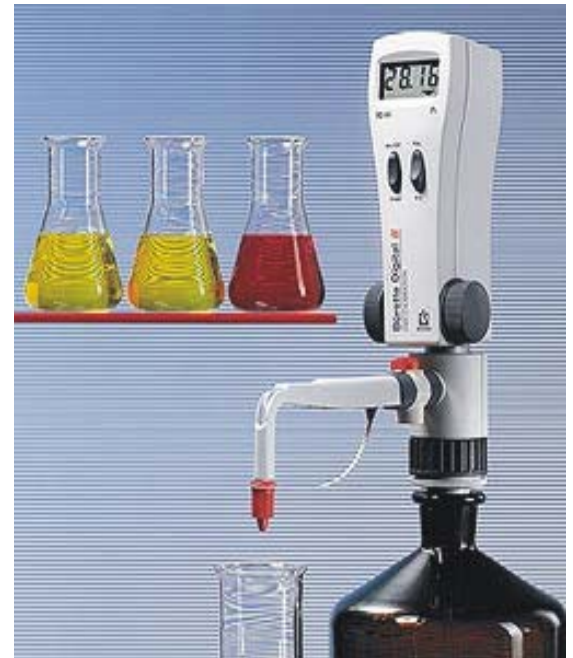
Ermittlung der Zusammensetzung von Stoffen und Stoffgemischen

- *Qualitative* Analyse: *Was* ist in der Probe enthalten?
- *Quantitative* Analyse: *Wieviel* von einer bestimmten Substanz ist in der Probe enthalten?

Analytische Chemie (Analytik):

Die Wissenschaft von der chemischen Analyse: wie und mit welchen Mitteln wird eine Analyse durchgeführt?

Entweder mit klassischen naßchemischen Methoden wie Gravimetrie, Titration etc. oder mit instrumenteller Analytik...



Instrumentelle Analytik

- Optische Methoden, z. B. Spektroskopie
- Elektroanalytische Methoden, z. B. Elektrophorese
- Trennmethode, z. B. Chromatographie

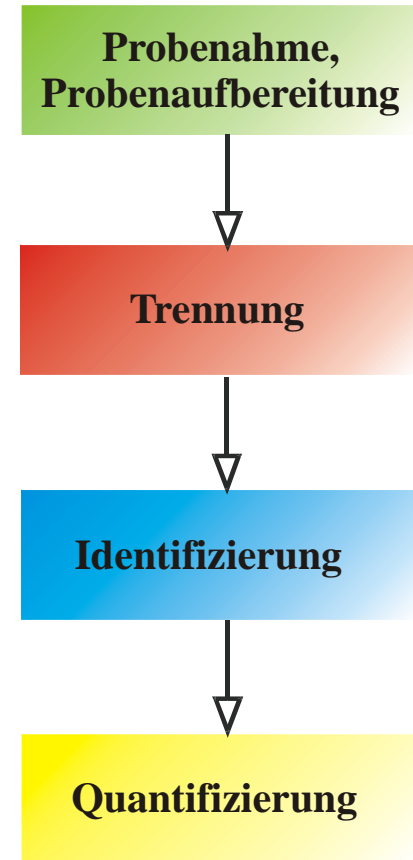


Anwendung findet die HPLC in allen denkbaren Bereichen: Pharmazie, Lebensmittelchemie, Chemische Industrie, Petrochemie, Biochemische Analytik, forensische Biochemie, in der Medizin mit all ihren Teilbereichen etc.

Es gibt kaum Substanzklassen, die nicht mit HPLC analysiert werden können, und ihre Anzahl wächst ständig.

Wie macht man eine Analyse?

1. Probenahme, Probenvorbereitung (z. B. Anreicherung, Aufschluß, Lösung)
2. Auftrennung in die (interessierenden) Komponenten
3. Identifizierung der gefundenen Komponenten (Qualitative Analyse)
4. Mengenbestimmung der gefundenen Komponenten (Quantitative Analyse)



1. Einführung: Analytische Chemie
- 2. Prinzip der Chromatographie**
3. Die Komponenten einer HPLC-Anlage
4. Detektion und Quantifizierung
5. Reversed Phase HPLC
6. Abschluß und Zusammenfassung

Prinzip der Chromatographie

- Chromatographische Trennung
- Zentrale Begriffe: mobile und stationäre Phase, Probe

Chromatographische Trennung

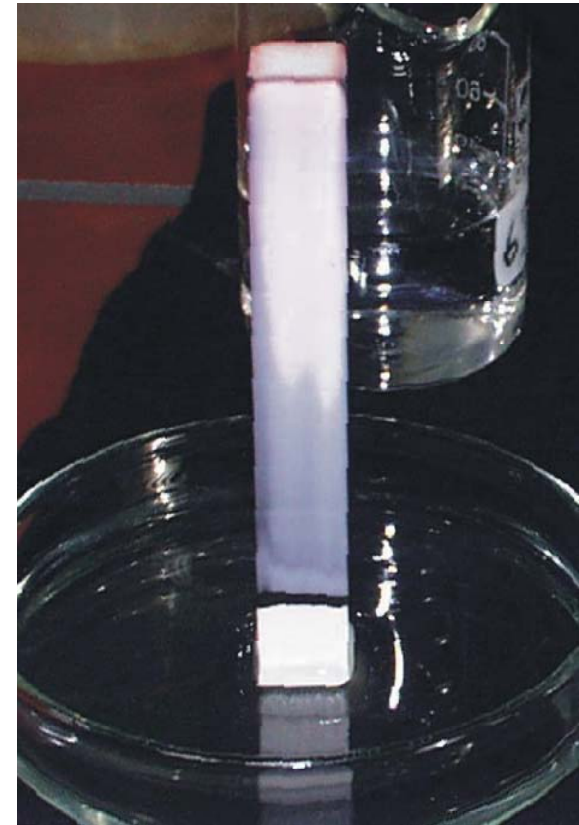
Ein einfacher Versuch zur Chromatographie ist die Trennung organischer Farbstoffe in einem Stück Tafelkreide.

Die Trennung beruht auf der unterschiedlich starken Wechselwirkung der Farbstoffe mit der Kreide:

Ist die Wechselwirkung stark, so wird das Weiterwandern des Farbstoffs mit der Flüssigkeit erschwert.

Ist die Wechselwirkung schwach, so wandert der Farbstoff schneller.

Das Ergebnis ist eine Auftrennung des Farbstoffgemisches in seine Bestandteile.

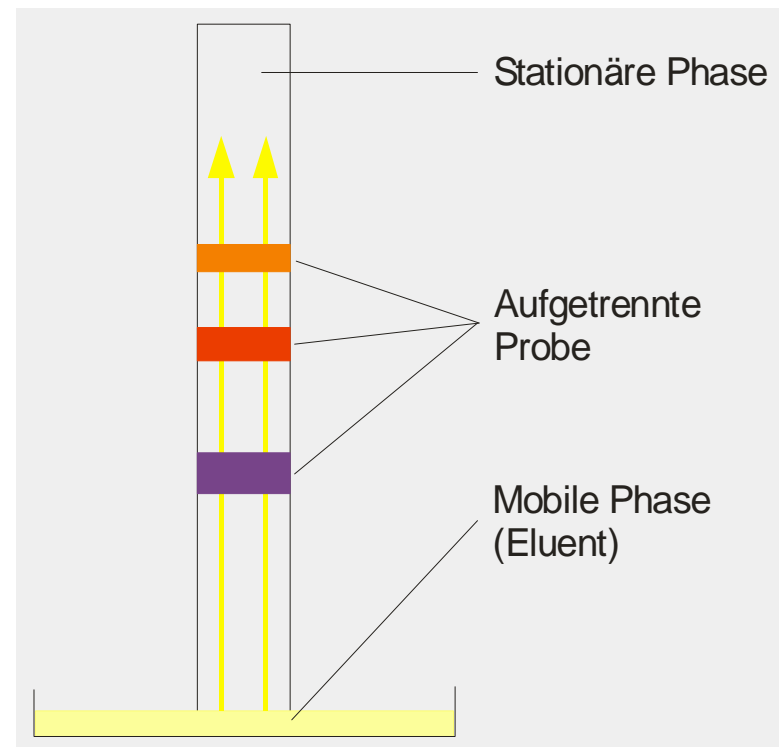


Wichtige Begriffe

Anhand des Beispiels der Trennung des Farbstoffs in der Kreide lernen wir folgende Begriffe kennen:

- Die Kreide heißt *stationäre Phase*.
- Die in der Kreide aufsteigende Flüssigkeit heißt *mobile Phase* oder *Laufmittel* oder *Eluent*.
- Der Farbstoff ist das, was analysiert werden soll und heißt *Analyt* oder einfach *Probe*.

Es liegt hier also eine chemische Wechselwirkung zwischen drei Substanzen vor.



1. Einführung: Analytische Chemie
2. Prinzip der Chromatographie
3. **Die Komponenten einer HPLC-Anlage**
4. Detektion und Quantifizierung
5. Reversed Phase HPLC
6. Abschluß und Zusammenfassung

Die Komponenten einer HPLC-Anlage

- Die Trennsäule
- Die Pumpe
- Der Probengeber

Die Trennsäule

Üblicherweise wird als stationäre Phase keine Kreide verwendet; ein häufig anzutreffendes Material ist chemisch behandeltes Kieselgel.

Das Kieselgel wird in eine Stahlkartridge gepackt, damit haben wir das „Herzstück“ einer jeden HPLC-Anlage: die *Trennsäule*.

Die Kieselgelpartikel eines Säulenmaterials mit 5 µm Korngröße werden beim Einatmen von den Bronchien nicht zurückgehalten und können in die Lunge gelangen. Öffnen Sie keine HPLC-Säulen!



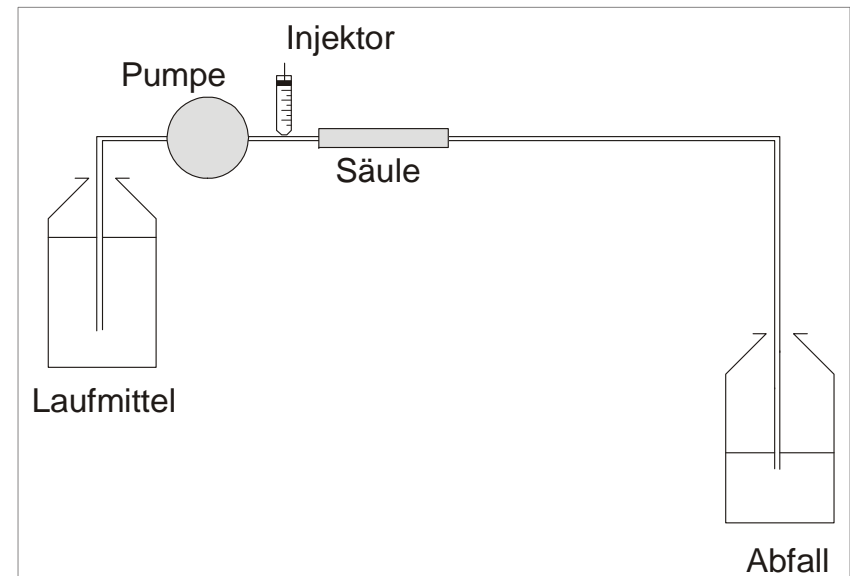
Pumpe und Probengeber

- Wie kommt die mobile Phase zur Säule?

Mit einer *Pumpe* (dazu gehören Vorrats- und Abfallbehälter).

- Wie kommt die Probe zur Säule?
Mit einem *Injektor* oder *Proben-*
geber.

Die Bezeichnung HPLC bedeutete ursprünglich „**High Pressure Liquid Chromatography**“. Heute steht die Abkürzung für „**High Performance Liquid Chromatography**“

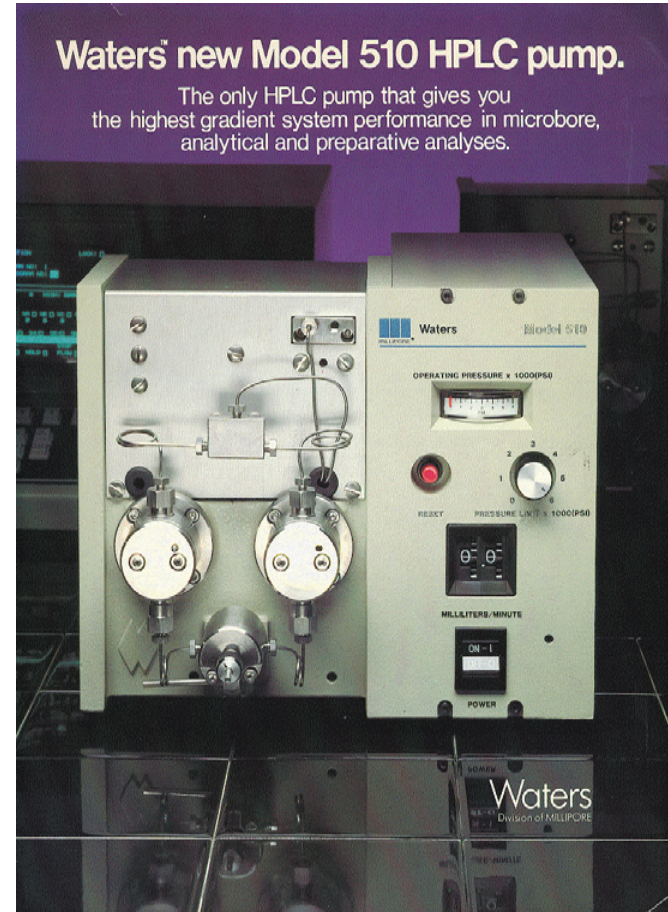


Die Pumpe

Wichtigste Anforderung an eine HPLC - Pumpe ist eine pulsationsfreie Förderung mit konstantem Fluß.

Eine HPLC-Pumpe ist ein hochwertiges elektromechanisches Gerät und sollte so sorgfältig wie eine Analysenwaage behandelt werden!

- Die Pumpe nimmt Schaden, wenn sie trockenläuft, d. h. Luft statt mobiler Phase fördert!
- Gelegentlich werden der mobilen Phase Puffersubstanzen, d. h. Salze zugesetzt. Nach der Analyse darf keine Pufferlösung in der Pumpe stehen bleiben!



Der Probengeber

Die Funktion des Probengebers ist es, eine genau dosierte Menge der Probe in den Laufmittelfluß zu geben. Dies geschieht über eine sogenannte *Dosierschleife* mit einem Rheodyne[®]-6-Wege-Ventil. Dabei ist das Probenvolumen durch die Dosierschleife festgelegt.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung einer Injektionspritze, mit der das gewünschte Volumen direkt eingespritzt wird.

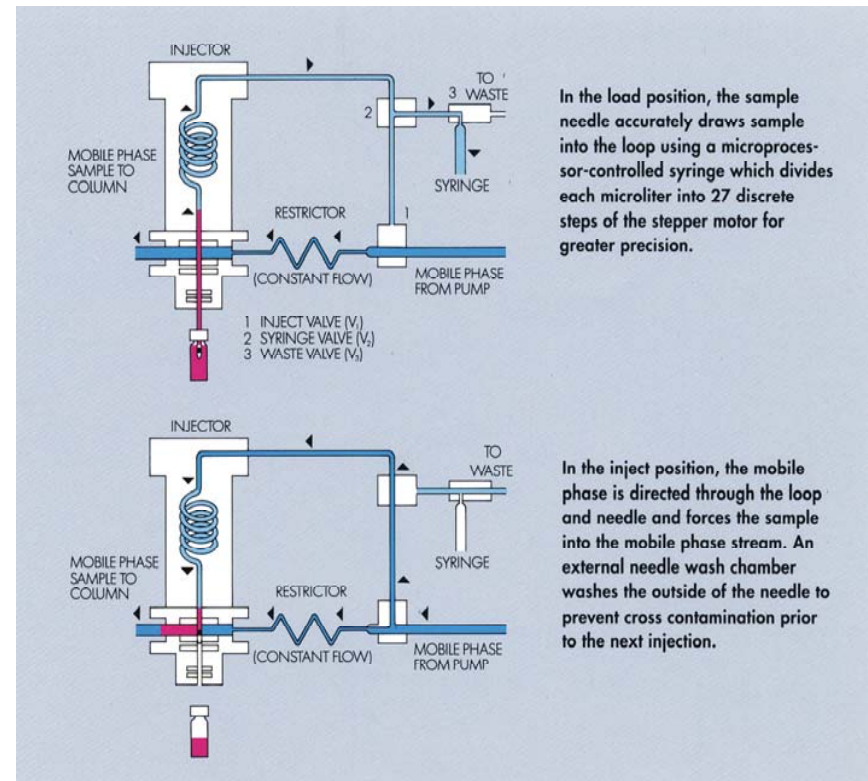
Heute werden üblicherweise automatische Probengeber, sog. *Autosampler* verwendet.



Injektionsvorgang bei einem Autosampler

Wenn die Nadel in die Probe eintaucht und die Spritze ansaugt, wird ein genau definiertes Probenvolumen in die mit Laufmittel gefüllte Dosierschleife gezogen.

Während der Injektion durchströmt das Laufmittel auf dem Weg zur Säule die Dosierschleife und nimmt das zuvor eingesaugte Probenmaterial mit.



1. Einführung: Analytische Chemie
2. Prinzip der Chromatographie
3. Die Komponenten einer HPLC-Anlage
4. **Detektion und Quantifizierung**
5. Reversed Phase HPLC
6. Abschluß und Zusammenfassung

Detektion und Quantifizierung I

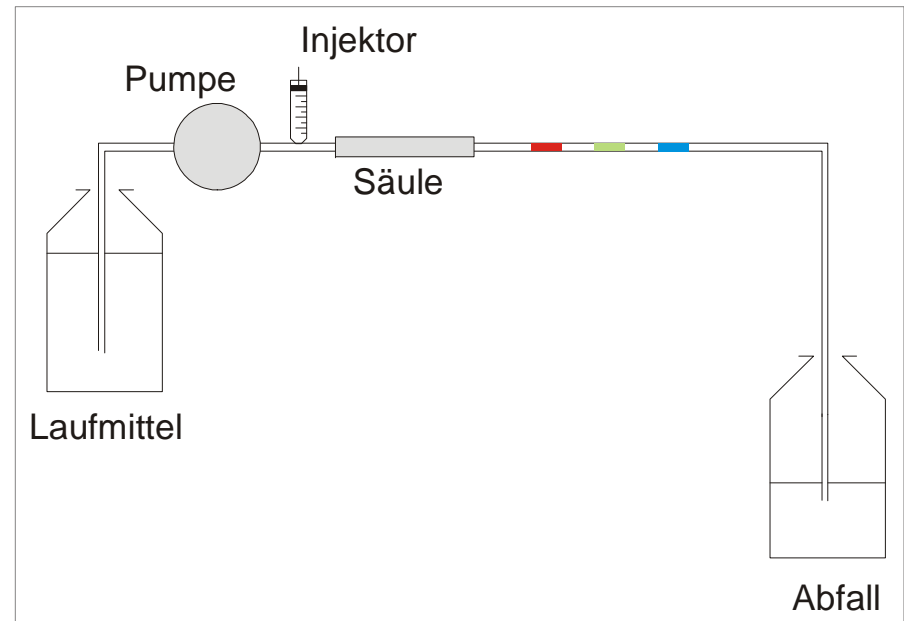
- Was passiert mit der Probe hinter der Säule?
- Ein einfacher Detektor
- Im Chromatogramm enthaltene Informationen
- Quantifizierung

Was passiert hinter der Säule?

Im Kreideexperiment war nach der Trennung Schluß, die Komponenten blieben in der Säule/Kreide.

Wird aber Laufmittel durch die Säule gepumpt, laufen die Komponenten hinter der Säule weiter, man sagt, sie werden *eluiert*.

Diese hinter der Säule erscheinende Substanz heißt *Eluat* und kann mit einem Detektor untersucht werden...

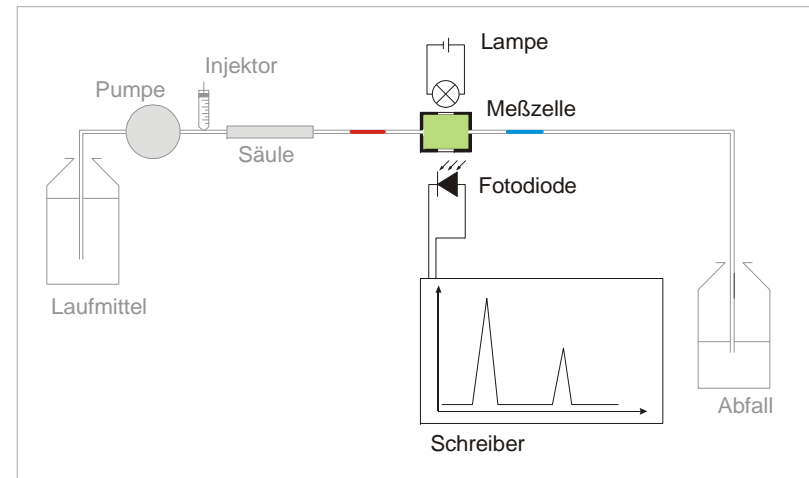


Ein einfacher Detektor

Ein mit geringem Aufwand zu realisierender Detektor besteht aus einer Lichtquelle und einer Photodiode.

Das Laufmittel durchströmt eine Meßzelle, eine mit Fenstern versehene Kammer mit genau definiertem Volumen.

Läuft nur die mobile Phase durch die Meßzelle, wird das einfallende Licht geringfügig abgeschwächt. Läuft aber zusätzlich die stärker lichtabsorbierende Probe durch die Zelle, wird das Licht stärker abgeschwächt. Die Photodiode reagiert darauf und die nachgeschaltete Elektronik erzeugt ein Signal, das auf einem Monitor sichtbar wird.

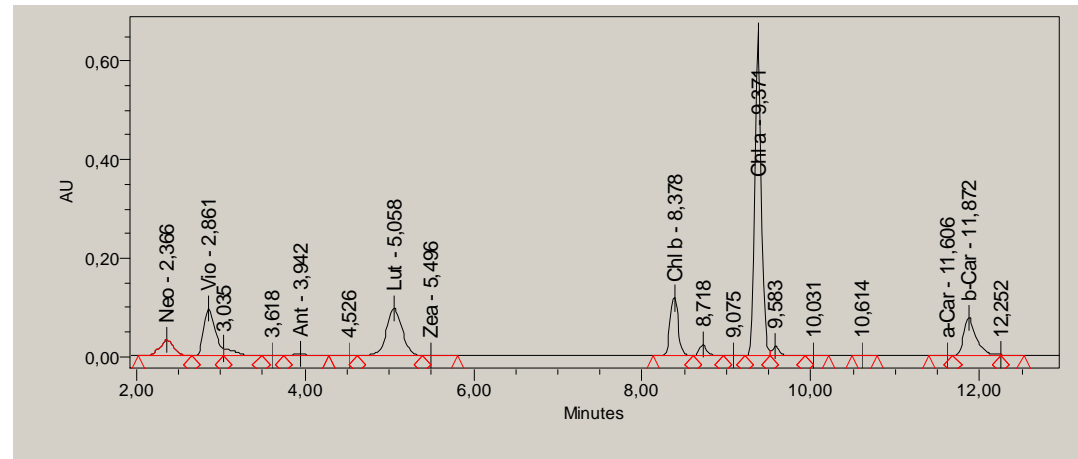


Im Chromatogramm enthaltene Informationen

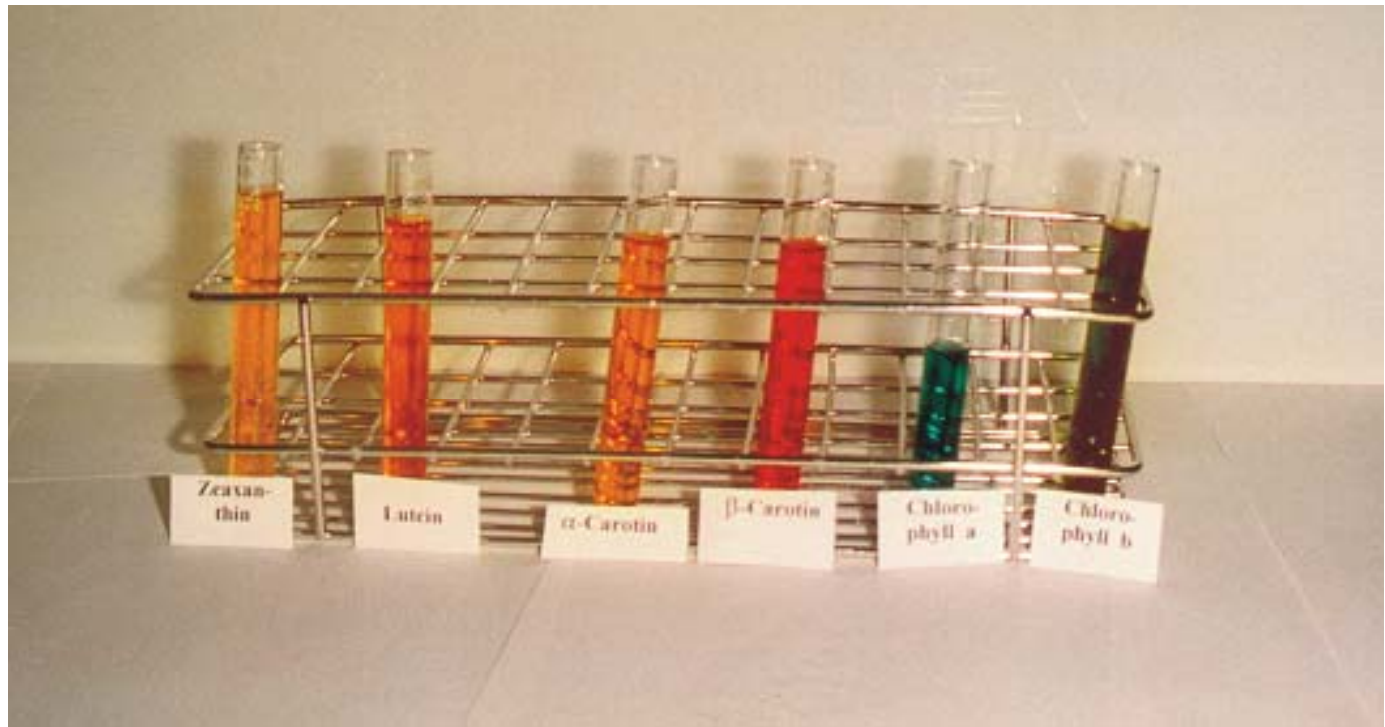
Die verschiedenen Komponenten erscheinen in der Reihenfolge der Elution im Chromatogramm. Die Zeit vom Eintritt in die Säule bis zu ihrer Detektion heißt *Retentionszeit*.

Bei ausgearbeiteten chromatographischen Methoden, mit denen bekannte Substanzen untersucht werden, sind die Retentionszeiten der Komponenten bekannt. Sie werden also anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert.

Die Abbildung zeigt eine typische Trennung pflanzenphysiologisch bedeutender Pigmente.



Ein Beispiel für Substanzen, die mittels HPLC analysiert werden:
Pflanzenpigmente



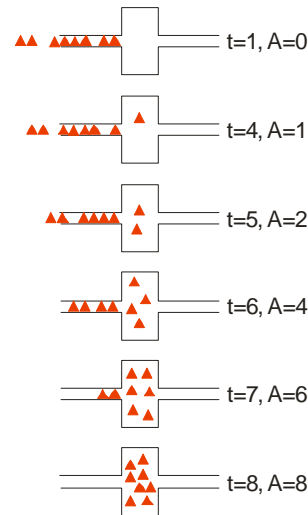
Quantifizierung

Die eluierte Komponente bildet auf dem Weg von der Säule zum Detektor einen etwas auseinandergezogenen Substanzpfropfen, dessen Konzentration in der Mitte am höchsten ist und zu den Enden hin abnimmt.

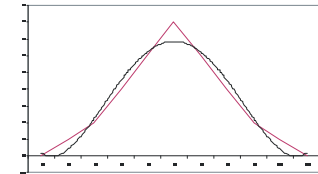
Läuft dieser Pfropfen in die Meßzelle, so steigt die Absorption deshalb zunächst langsam an und erreicht bei der höchsten Konzentration ihren Maximalwert.

• Je höher die Konzentration ist, desto größer größer wird die maximale Absorption.

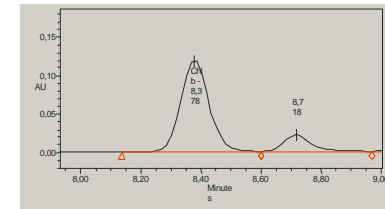
• Weiter hat die Konzentration der Probe Einfluß auf die Dauer des Verweilens in der Meßzelle.



Mit gutem Willen läßt sich aus den Modellwerten ein annähernd realistischer Peak bilden...



...und so sehen zwei "richtige" Peaks aus:



Die Fläche des Peaks ist proportional der Konzentration der eluierten Komponente.

Detektion und Quantifizierung II

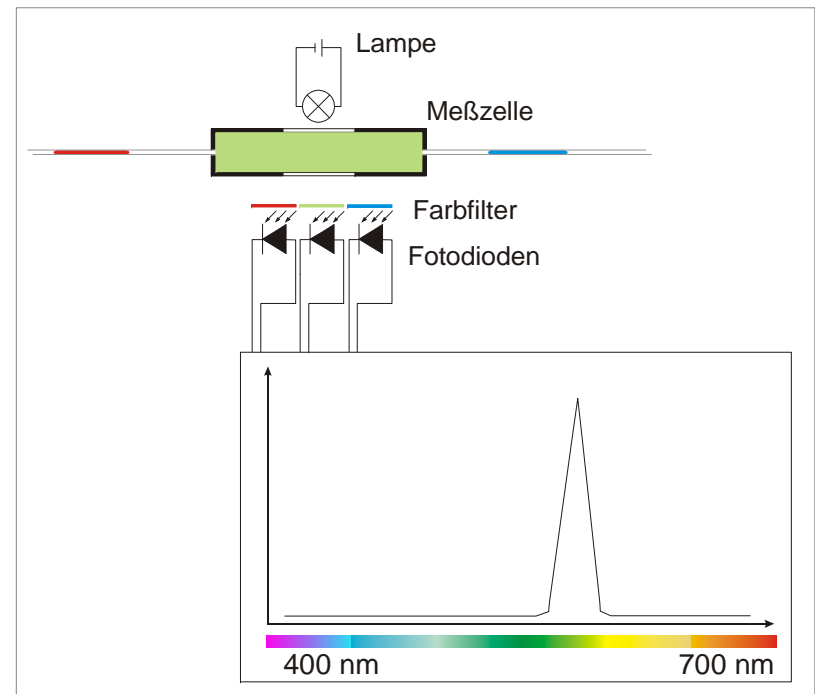
- Ein Detektor zur Spektrenaufnahme
- Zusätzliche Informationen im Chromatogramm
- Das dreidimensionale Chromatogramm I
- Zweidimensionale Chromatogramme
- Der Photodiodenarraydetektor (PDA)
- Das dreidimensionale Chromatogramm II

Ein Detektor zur Spektrenaufnahme

Wir verbessern nun den vorhin entworfenen Detektor dahingehend, daß er Farben “sehen” kann.

Statt einer Photodiode verwenden wir nun mehrere und setzen Farbfilter zwischen die Meßzelle und die einzelnen Dioden.

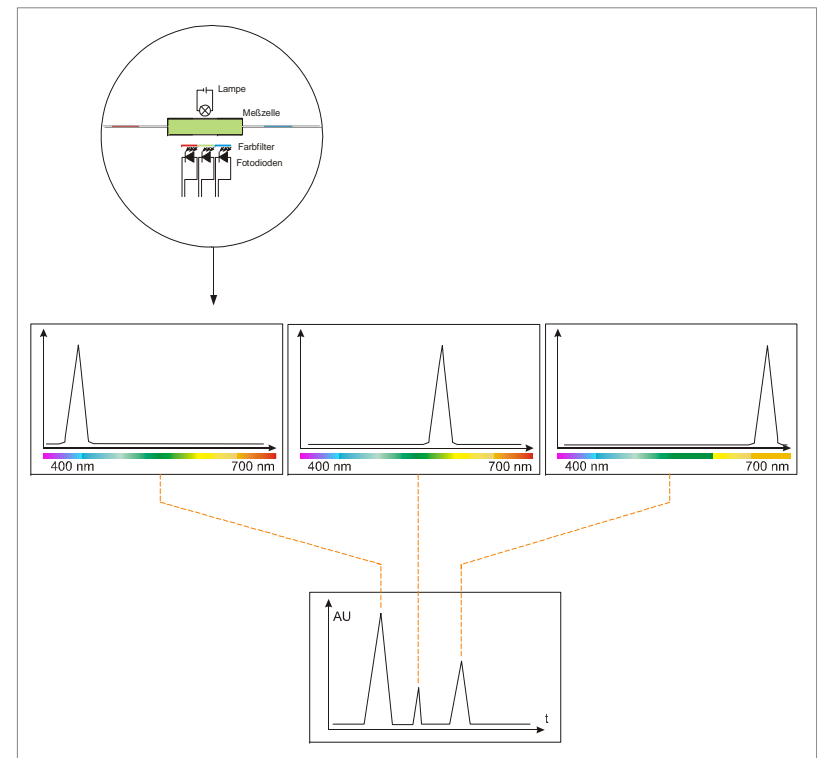
Läuft nun eine grüne Substanz durch die Meßzelle, verläßt grünes Licht die Zelle. Das rote und das blaue Filter lassen dieses Licht nicht durch, es kommt also bei der entsprechenden Diode nichts an und es wird kein Signal erzeugt. Das grüne Filter läßt das Licht durch und die Photodiode spricht an.



Zusätzliche Informationen im Chromatogramm

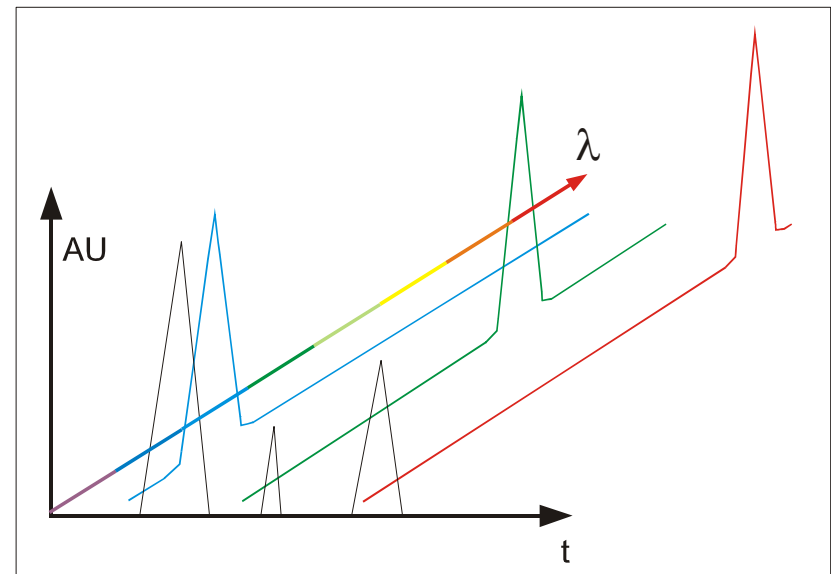
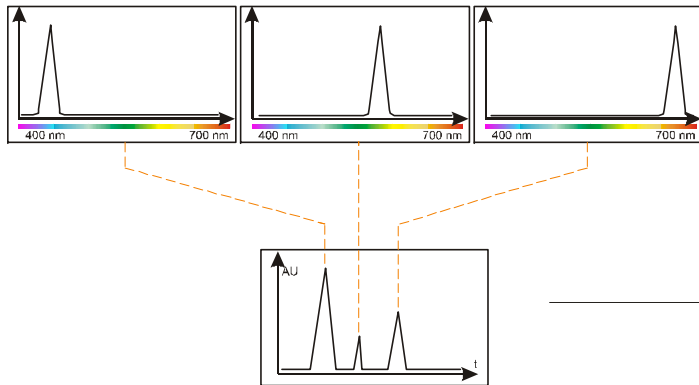
Mit den durch den “farbensehenden” Detektor gelieferten Daten stehen nun für jede eluierte Komponente zwei Informationen zur Verfügung, die eine Identifizierung ermöglichen:

- * das Spektrum
- * die Retentionszeit



Das dreidimensionale Chromatogramm I

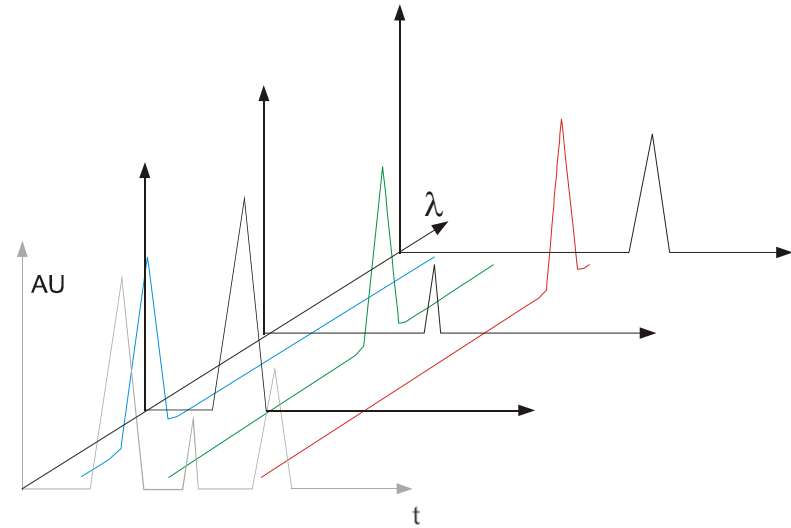
Die Chromatogramme mit den Retentionszeiten und den Spektren lassen sich nun in einer dreidimensionalen Anordnung gemeinsam darstellen.



Zweidimensionale Chromatogramme

Aus dem dreidimensionalen Chromatogramm lassen sich mehrere zweidimensionale Chromatogramme extrahieren.

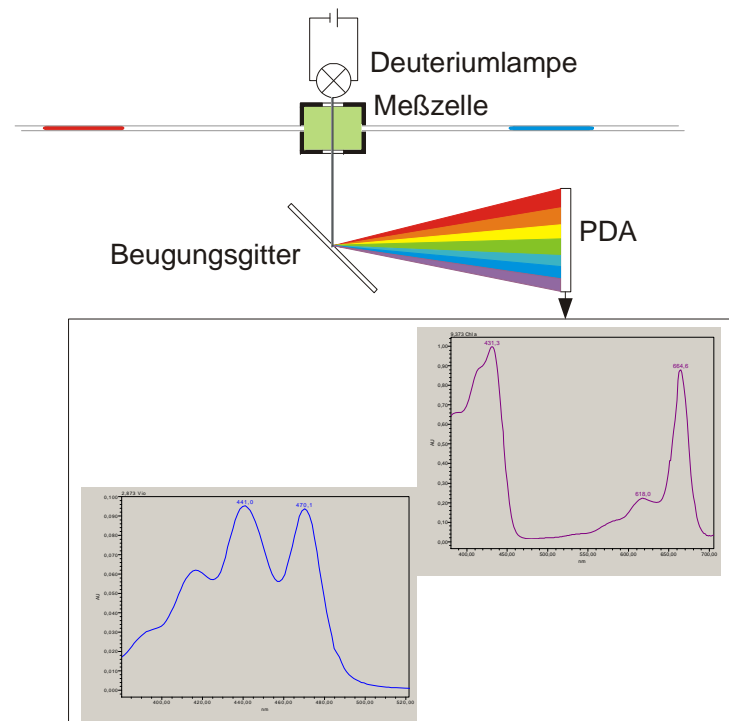
Wir haben jetzt also drei Spektren (für jede Komponente eines) und vier Chromatogramme (je eines bei drei verschiedenen Farben / Wellenlängen und ein aus den dreien durch Überlagerung entstanden).



Der Photodiodearraydetektor (PDA)

Photodioden sind heute so klein, daß man sehr viele davon auf kleiner Fläche unterbringen kann. Ein solches Feld (ein "Array") kann z. B. 512 einzelne Dioden enthalten, so daß man ein den ganzen Bereich von 180 nm (UV) bis 700 nm (roter Bereich des sichtbaren Lichts) bei mit 1 nm Auflösung erhält. (Das heißt sozusagen, der Detektor kann 512 Farben erkennen; der eben konstruierte Detektor konnte nur 3 Farben erkennen.)

Statt der im „Selbstbaudetektor“ verwendeten Filter hat man hier ein *Beugungsgitter*, welches das aus der Meßzelle austretende Licht in die Spektralfarben zerlegt.

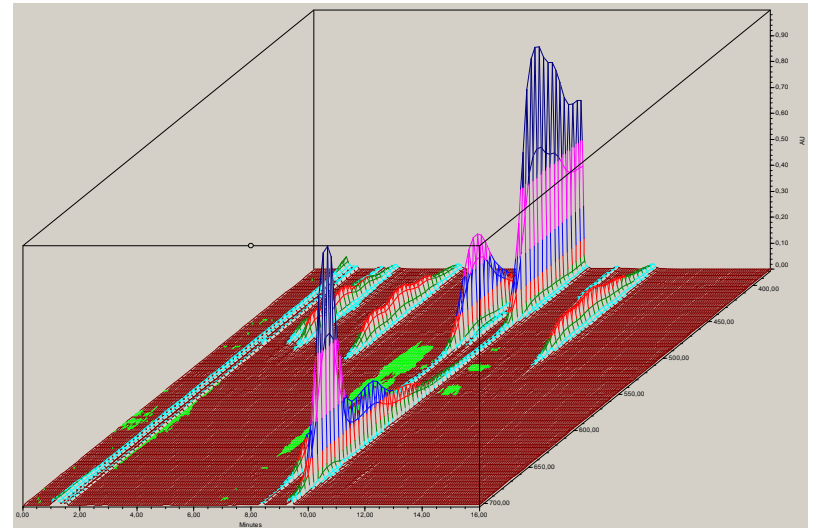


Das dreidimensionale Chromatogramm II

Die mit einem PDA-Detektor gewonnenen dreidimensionalen Daten liefern *Chromatogramme* und *Spektren*.

Da der Detektor Daten bei 512 verschiedenen Wellenlängen aufnimmt, liegen auch 512 einzelne “normale”, d. h. zweidimensionale Chromatogramme vor. Um daraus ein “brauchbares” Chromatogramm zu extrahieren, kann man z. B. das mit der höchsten Absorption auswählen.

Auf der Wellenlängenachse befinden sich die Spektren der einzelnen Komponenten. Hat man z. B. den Detektor so eingestellt, daß jede Sekunde ein Spektrum aufgenommen wird, so erhält man bei 20 Minuten Laufzeit 1200 Spektren.



1. Einführung: Analytische Chemie
2. Prinzip der Chromatographie
3. Die Komponenten einer HPLC-Anlage
4. Detektion und Quantifizierung
- 5. Reversed Phase HPLC**
6. Abschluß und Zusammenfassung

Reversed Phase HPLC

- Elektronegativität
- Polarität
- Polare und unpolare stationäre Phasen

Elektronegativität

Die chromatographische Trennung der Substanzen erfolgt häufig aufgrund der unterschiedlichen *Polarität* von mobiler Phase, stationärer Phase und Probensubstanz.

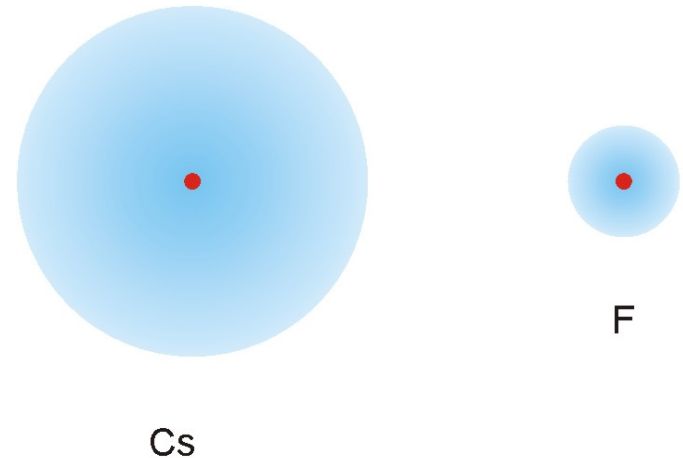
Die Polarität eines Moleküls beruht auf der *Elektronegativität* seiner Atome.

Atome innerhalb eines Moleküls haben mehr oder weniger die Fähigkeit, Elektronen (genauer: Bindungselektronen) anzuziehen. Die Elektronegativität (EN) ist ein Maß für Stärke dieser Anziehung. Die Ausprägung dieser Fähigkeit ist von der Größe der (positiven) Kernladung und von der Größe des Atoms abhängig. Es spielt ebenso eine Rolle, wie stark die Kernladung durch innere Elektronen abgeschirmt wird. (Siehe nächste Folie)

EN und PSE

Die schwächsten EN-Werte findet man im Periodensystem links unten, die stärksten Werte rechts oben.

Beispiel: Cäsium hat eine große Ladung im Kern: 55 Protonen. Da das Cäsiumatom aber auch viele Elektronen enthält und vergleichsweise groß ist, wird die Ladung nicht nur abgeschirmt, sondern auch der Abstand zu den Bindungselektronen ist recht groß. Die Fähigkeit, Elektronen anzuziehen, ist also nur schwach ausgeprägt, d. h. der EN-Wert ist mit 0,85 klein. Das Fluoratom hat zwar nur 9 positive Ladungen im Kern, die aber durch viel weniger Elektronen abgeschirmt werden, als beim Cäsium. Auch ist der Durchmesser der Fluoratoms dreimal kleiner, so daß die Bindungselektronen in Reichweite der Kernladung befinden. Fluor hat mit einem EN-Wert von 4,17 die stärkste Elektro-negativität aller Elemente.



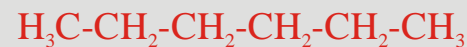
Ein Größenvergleich
zwischen einem Cäsium-
und einem Fluor-Atom

Polarität

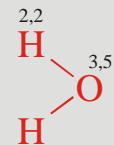
Bestehen Moleküle aus Atomen mit verschiedener Elektronegativität, so werden die Elektronenwolken innerhalb des Moleküls verschoben, das Molekül wird *polarisiert*.

Je stärker der Unterschied zwischen den Elektronegativitäten der beteiligten Atome ist, desto stärker polar ist die Verbindung.

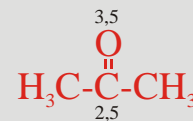
^{2,2} ^{2,5}
 $\text{H}-\text{C}$ Eine sehr schwach polare Bindung



n-Hexan ist praktisch unpolar



Wasser ist polar



Aceton

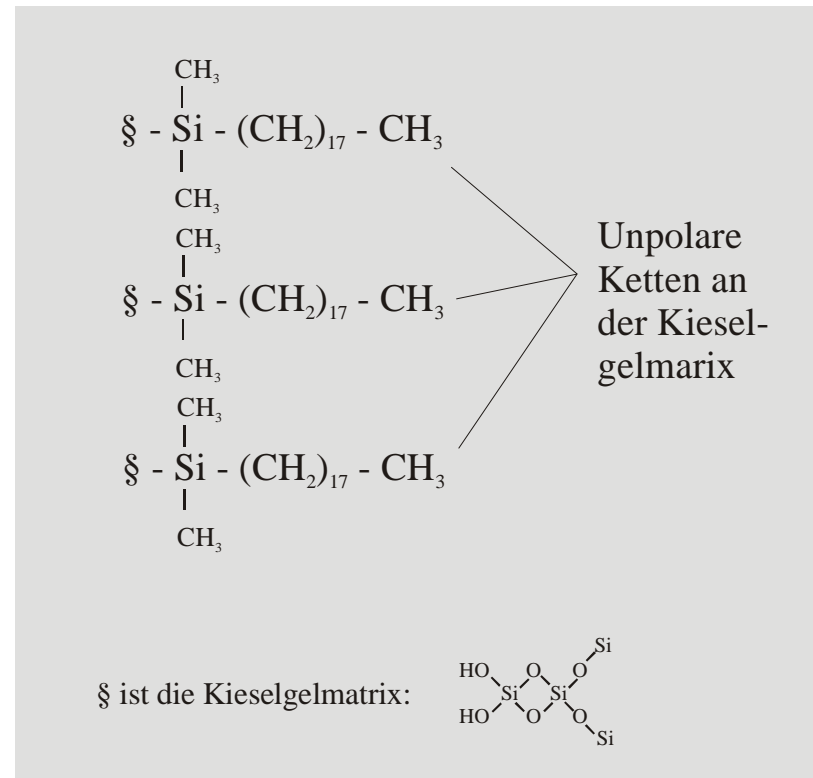


Acetonitril

Polare und unpolare stationäre Phase

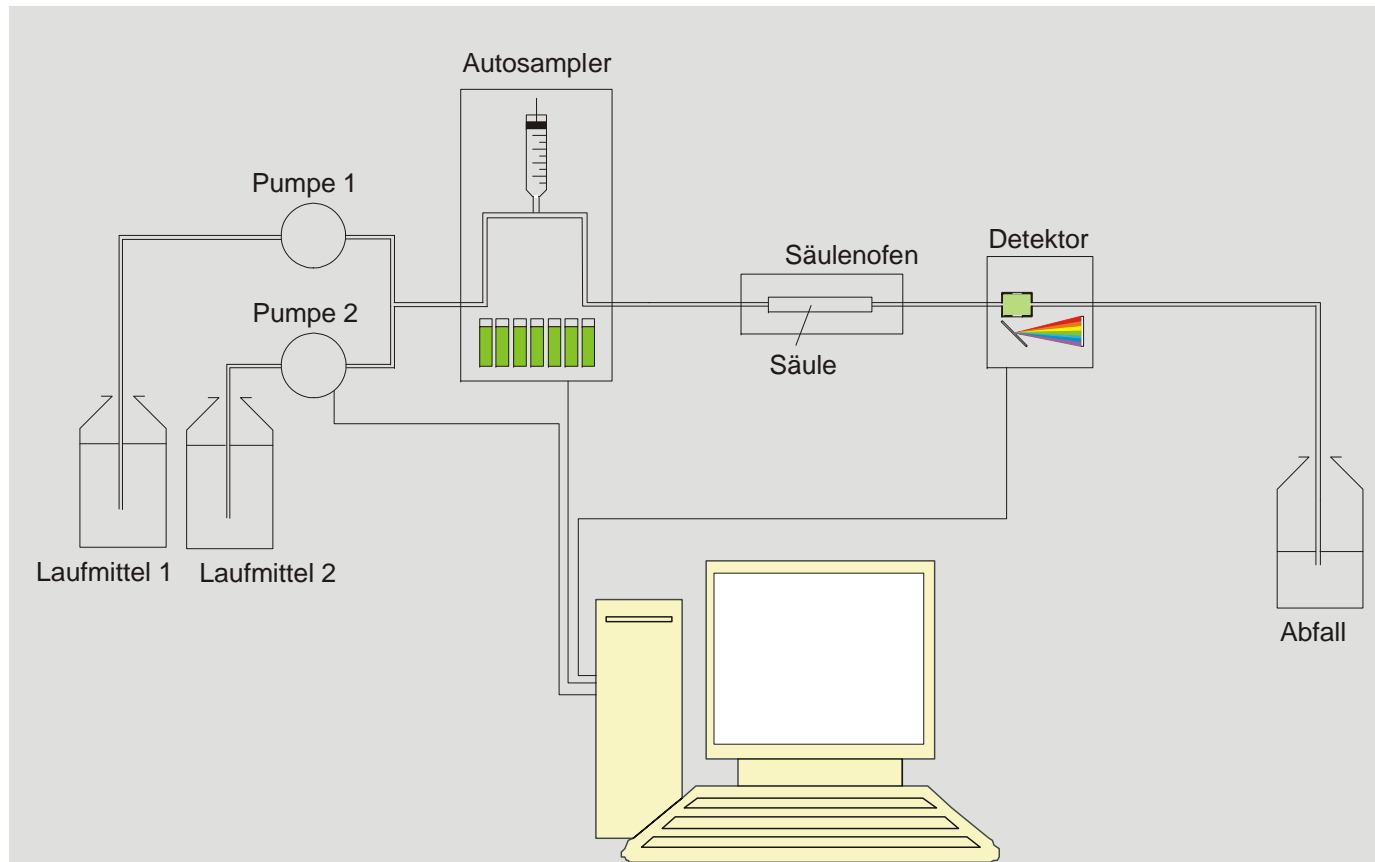
Ein häufig angewendetes Verfahren ist die *Umkehrphasen-* oder *Reversed Phase-HPLC*. Dabei ist das Laufmittel polarer als die stationäre Phase.

Kreide (Calciumcarbonat CaCO_3) ist polar, Kieselgel mit angehängten Octadecylketten ist wegen dieser Ketten unpolar.



1. Einführung: Analytische Chemie
2. Prinzip der Chromatographie
3. Die Komponenten einer HPLC-Anlage
4. Detektion und Quantifizierung
5. Reversed Phase HPLC
6. **Abschluß und Zusammenfassung**

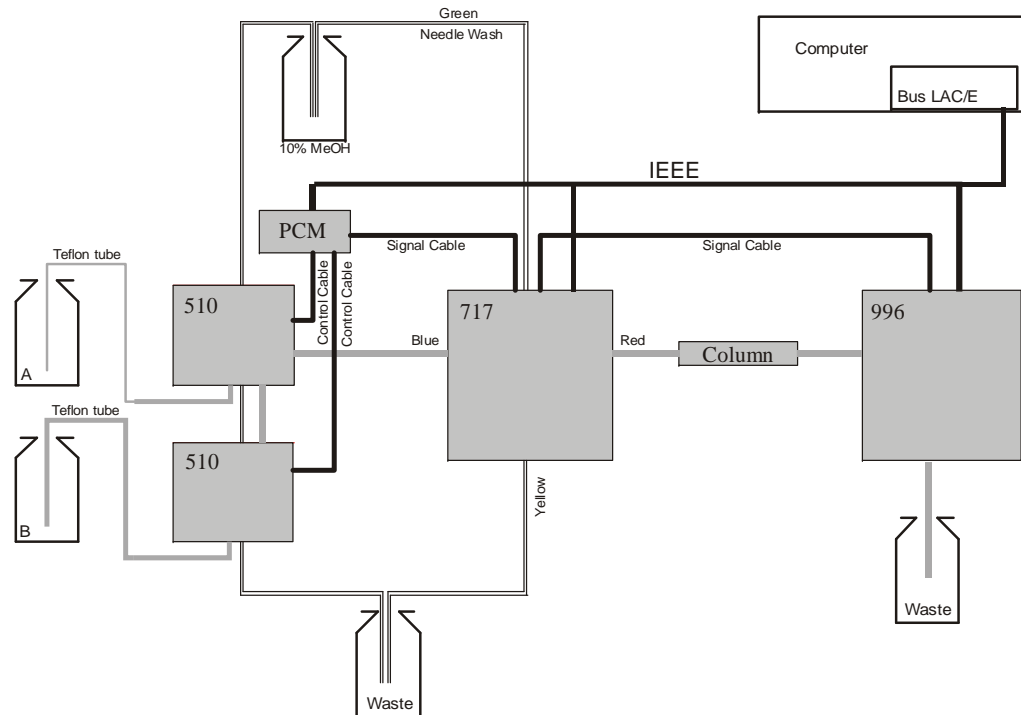
Übersicht: eine komplette HPLC



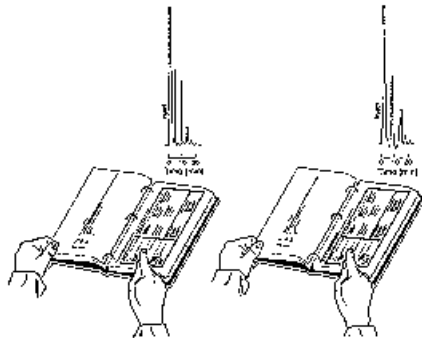
Wichtig: Systemplan erstellen!

Behalten Sie die Übersicht: Erstellen Sie einen Systemplan Ihrer Anlage, der alle Lauf- und Hilfsmittelwege sowie alle elektrischen Verbindungen enthält.

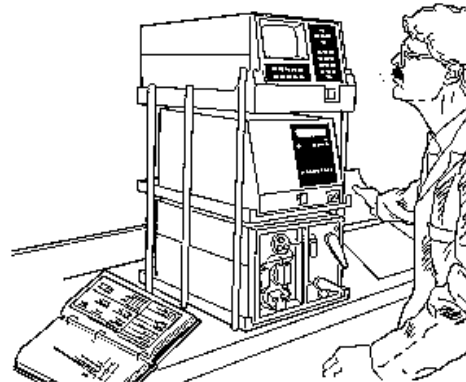
Ein Beispiel zeigt die Abbildung rechts.



Testen Sie die Anlage regelmäßig mit bekannten Substanzen und notieren Sie wichtige Daten. Sie haben damit im Problemfall immer eine Referenz zur Verfügung.



Auch wenn keine akuten Probleme auftreten, sollten Sie die Leistung des Systems regelmäßig mit den Normalwerten vergleichen.



Läuft die Anlage nicht einwandfrei, notieren Sie alle Symptome im Anlagenlogbuch und gehen Sie anhand bekannter Daten bei der Fehlersuche systematisch vor.

