



CBI Messtechnik Praktikum:
Versuchsanleitung HPLC
SS 2009

Lehrstuhl für Thermische Verfahrenstechnik

Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Arlt

Betreuer:

Martin Reithinger

Raum T 2.104; Tel. (09131) 85 – 27453; martin.reithinger@cbi.uni-erlangen.de

Florian Lottes

Raum T. 3.58; Tel. (09131) 85 – 27455; florian.lottes@cbi.uni-erlangen.de

Jin Geng

Raum T. 2.63; Tel. (09131) 85 – 27449; jin.geng@cbi.uni-erlangen.de

Sprechstunde: Mi 9:00-10:00

Rückfragen bitte nur innerhalb der Sprechstunde

Abgabe des Praktikumsprotokolls bis spätestens 2 Wochen nach dem Versuch. Später abgegebene Protokolle können leider nicht berücksichtigt werden!

1 Grundlagen der HPLC

Die HPLC (High Performance bzw. High Pressure Liquid Chromatography) ist eine leistungsfähige Methode zur analytischen (hier will man üblicherweise unbekannte Substanzen identifizieren und/oder ihren Gehalt quantifizieren), wie auch präparativen (hier will man üblicherweise bekannte Substanzen voneinander trennen um reine Stoffe in größeren Mengen zu gewinnen) chromatographischen Trennung von organischen und anorganischen Verbindungen fast aller Klassen. Für fast alle Verbindungen, die man in Lösung bringen kann, kann man in der Regel auch ein chromatographisches Trennsystem finden, mit dem man die Verbindungen trennen und anschließend qualitativ oder quantitativ bestimmen kann. Aber: die HPLC ist (noch) keine Knopfdruckmethode! Ihre erfolgreiche Anwendung erfordert die richtige Auswahl des chromatographischen Trennsystems, sorgfältiges, sauberes Arbeiten und viel Fingerspitzengefühl. Man muss die Eigenschaften der zu trennenden Substanzen und ihr Verhalten im Trennsystem abschätzen können, man muss Misserfolge bei der Trennung erklären können und sich am besten durch viel Praxis einen großen Erfahrungsschatz erwerben.

1.1 *Theoretische Grundlagen*

1.1.1 Grundprinzip und -begriffe

Chromatographie“ heißt „Farbschreiben“ und wurde von dem russischen Forscher Tswett entdeckt. Sie ist ein Trennverfahren, bei dem ein Stoffgemisch zwischen zwei Hilfsphasen verteilt wird, von denen eine mobil ist (sich also bewegt) und die andere stationär ist (sich folglich auch nicht bewegt). Die mobile Phase ist bei der HPLC flüssig (heißt ja auch „... Liquid Chromatography“), sie kann aber auch gasförmig sein. Man spricht dann von Gaschromatographie. Sie transportiert die zu trennenden bzw. die zu analysierenden Substanzen durch die Trennsäule und sorgt dafür, dass die Substanzen, die in die Säule injiziert wurden nach einer gewissen Zeit, die man Retentionszeit nennt, die Säule wieder verlassen. In der Fachsprache spricht man von eluieren. Der Transport durch den Strom der mobilen Phase sorgt aber noch nicht für eine Trennung der Substanzen bzw. für unterschiedliche Retentionszeiten, die ja das eigentliche Ziel eines

chromatographischen Verfahrens sind. Schließlich will man die Substanzen ja identifizieren (man tut dass anhand der charakteristischen Retentionszeit) bzw. trennen

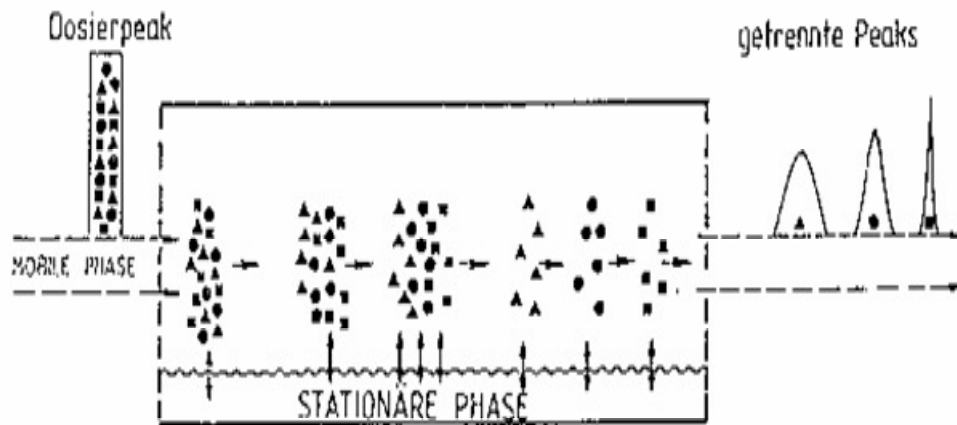


Abbildung 1.1: Prinzip der chromatographischen Trennung

(auch da müssen die Substanzen natürlich zu unterschiedlichen Zeiten eluieren).

Um dies zu erreichen benötigt man neben der mobilen Phase die stationäre Phase. Die Stofftrennung erfolgt aufgrund des Stoffaustausches zwischen stationärer und mobiler Phase. Hierbei ist die Verweildauer in der stationären Phase für unterschiedliche Molekülarten verschieden groß, so dass sie zeitlich versetzt bzw. mit unterschiedlichen Retentionszeiten die Säule verlassen (s. Abbildung 1.1). Einige Substanzen werden eben stärker retardiert (haben eine höhere Verweildauer in der stationären Phase) als andere. Die Wirkungsmechanismen der Trennung sind thermodynamischer Natur, man unterscheidet:

- Adsorptionschromatographie: Die Komponenten werden an der stationären Phase unterschiedlich stark adsorbiert und damit retardiert.
- Ionenaustauschchromatographie: Die stationäre Phase enthält ionische Gruppen, welche mit den zu trennenden Komponenten in Coulomb-Wechselwirkung treten. Je stärker die Wechselwirkung je stärker die Retardierung.

- **Ausschlusschromatographie:** Die Komponenten werden nach der Molekülgröße getrennt, da die großen Moleküle nicht oder nur in einen Teil der stationären Phase eindringen können (Porengröße) und dadurch schneller durch die Säule strömen (eluieren). Sehr große Moleküle können sogar schneller als die mobile Phase sein, da diese in der Regel in die Poren eindringt.

Da die Trennung thermodynamischer Natur ist, kann sie natürlich auch mittels thermodynamischer Gesetzmäßigkeiten in Form so genannter Adsorptionsisothermen beschrieben werden. Einfach ausgedrückt beinhalten die Adsorptionsmechanismen die Information darüber, wie groß die Verweildauer in der stationären Phase denn eigentlich ist. Da dies für ein Analytikpraktikum nicht ganz so wichtig ist, soll an dieser Stelle darauf nicht näher eingegangen werden. Für die präparativen chromatographischen Trennungen sind diese Adsorptionsisothermen aber von entscheidender Bedeutung. Diese Bedeutung wird im Hauptstudium (Trenntechnik I und II) verdeutlicht werden.

Wichtig ist auch, dass die Thermodynamik von beiden verwendeten Phasen (mobiler und stationärer) abhängt. Die Trennergebnisse werden sich also sowohl ändern, wenn man die mobile Phase wechselt als auch, wenn man die stationäre wechselt. Das macht HPLC einerseits kompliziert (man hat sehr viele Möglichkeiten), andererseits aber auch so universell. Es gibt eine Lösung (Kombination von mobiler und stationärer Phase) für nahezu jedes Trennsystem.

1.1.2 Das Chromatogramm

Zur Beurteilung der Trennung werden die getrennten Komponenten nach dem Verlassen der Trennsäule durch die mobile Phase in einen Detektor transportiert, der sie aufgrund bestimmter physikalischer oder chemischer Eigenschaften erfasst. Die Detektorsignale werden Peaks genannt und ihre Gesamtheit Chromatogramm (s. Abbildung 3.2). Die Peaks liefern in der Analytik qualitative (welche Substanz ist es?) und quantitative (wie viel von der Substanz ist enthalten) Informationen über das getrennte Stoffgemisch:

- Die Retentionszeit $t_{R,i}$ einer Substanz ist charakteristisch für die jeweilige Substanz und kann zur Identifizierung genutzt werden. Wichtig ist es, dass die Retentionszeiten der Komponenten weit genug voneinander entfernt sind, damit diese einwandfrei identifiziert werden können.

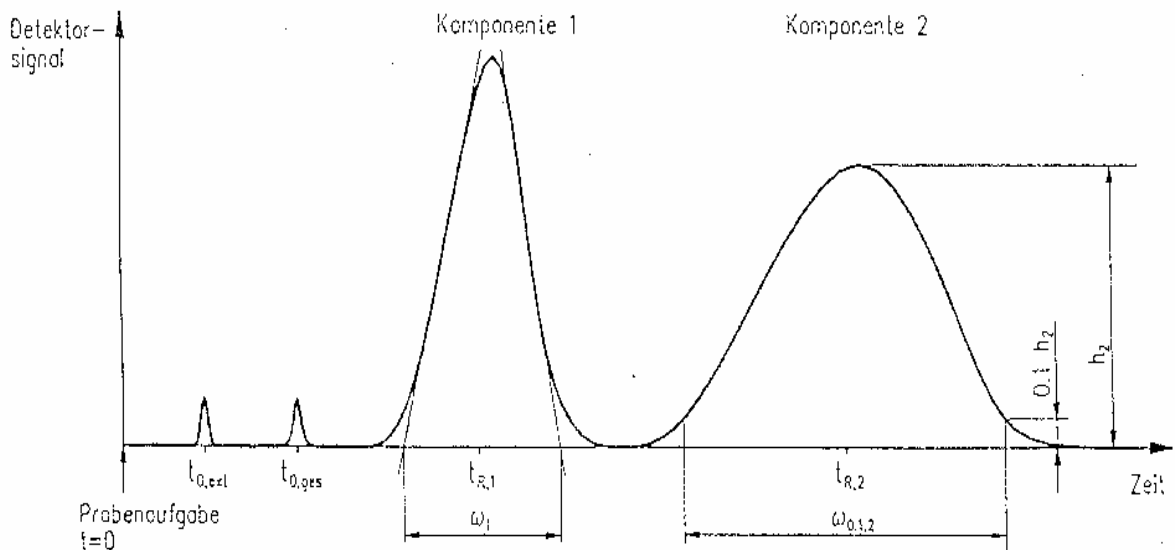


Abbildung 1.2: Chromatogramm und seine Kenngrößen

- Die Fläche unter den Peaks und die Peakhöhe h_i sind - je nach physikalischem Prinzip der Detektion - oft proportional zur eingespritzten Menge der Komponente, falls die Komponente eindeutig von anderen getrennt wird. Die Quantifizierung der Menge wird nach einer Kalibrierung möglich.
- Die Basisweite ω_i eines Peaks (beruht auf Anlegen der Wendetangenten und ist z.T. schwer zu bestimmen), sowie die Peakweiten bei 10% Peakhöhe $\omega_{0,1,i}$ und 50% Peakhöhe $\omega_{0,5,i}$ (die einfacher zu bestimmen sind) charakterisieren die Peakverbreiterung.
- Die *Totzeit* $t_{0,ext}$ entspricht der Retentionszeit einer Substanz, die nicht adsorbiert (also keine Verweilzeit in der stationären Phase hat) und nicht in die Poren der stationären Phase eindringt (deshalb Index „ext“ für extern).

- Einer Substanz, die in die Poren eindringen kann, ist das gesamte Flüssigkeitsvolumen (deshalb Index „ges“ für gesamt) zugänglich. Wenn sie nicht adsorbiert wird (also auch keine Verweilzeit in der stationären Phase hat), wandert sie mit der gleichen Geschwindigkeit wie die mobile Phase und erscheint nach der *Totzeit* $t_{0,ges}$.

Diese Kenngrößen sind in Abbildung 1.2 für die Stoffe 1 und 2 nochmals aufgeführt.

1.1.3 Beurteilung der Trennung

Eine weit verbreitete Kenngröße in der Chromatographie ist der so genannte Trennfaktor α . Er ist ein Maß dafür, wie weit (zeitlich) zwei Komponenten voneinander eluieren. Letztendlich ist der Trennfaktor eine rein thermodynamische Information. Im Hauptstudium (Trenntechnik I & II) wird er in analoger Form zur Beurteilung des Potentials einer Trenntechnik (z.B. der Destillation) zur Erreichung des Trennziels wieder auftauchen.

$$\alpha_{21} = \frac{t_{R,2} - t_{0,ext}}{t_{R,1} - t_{0,ext}} = \frac{K_2}{K_1} \quad (1.1)$$

Die Güte der Trennung wird durch die Auflösung R_s (von engl. resolution) beschrieben. Sie ist beruht ähnlich wie der Trennfaktor auf dem Unterschied der Retentionszeiten zweier Substanzen. Zusätzlich berücksichtigt sie aber auch, wie breit die beiden Peaks sind. Sie ist damit praxisorientierter als der Trennfaktor. Dieser sagt uns - vereinfacht ausgedrückt - nur wie gut eine Trennung theoretisch sein könnte. Die Auflösung berücksichtigt über die Peakbreiten auch, wie gut wir die Trennung in der Praxis tatsächlich ausführen.

$$R = \frac{t_{R,1} - t_{R,2}}{(\omega_1 + \omega_2)/2} \quad (1.2)$$

Zur Charakterisierung der Packungsgüte, d.h. der Effektivität der Trennsäule, kann die Trennstufenzahl N_i herangezogen werden (die man auch Effektivität nennt). Die N_i sagt aus, wie effizient eine Säule ist, d.h. wie scharf ein Peak eluiert. Sie kennzeichnet nur das Verhalten einer Komponente (deshalb der Index „i“, für jede Komponente kann diese Kennzahl berechnet werden). Aus dem Chromatogramm lässt sich für Peaks, die die Form einer Gaußkurve besitzen, die Trennstufenzahl einer Säule wie folgt bestimmen.

$$N_i = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{\omega_{0.5,i}} \right)^2 \quad (1.3)$$

2 Ziel des Praktikums

Das Ziel dieses Teils des Praktikums ist es, dem Studierenden eine Einführung in die HPLC zu geben. In diesem Praktikum sollen u.a.

- die einzelnen Bestandteile und Komponenten eines HPLC-Trennsystems kennengelernt werden, wie
 - die stationäre Phase (in diesem Fall eine sog. RP-Phase, d.h. reversed phase-Phase)
 - die Trennsäule, in die die stationäre Phase gepackt ist
 - die mobile Phase mit Eluentenversorgung
 - Pumpen und Einspritzventil (Autosampler)
 - der Detektor
 - die Steuerungs- und Auswertesoftware;
- die Trennleistung eines Systems an einem einfachen Beispiel beurteilt werden
 - wichtige chromatographische Kenngrößen, wie Retentionszeit, Trennstufenzahl, ... kennen lernen
 - die quantitative Bestimmung einer chemischen Substanz in verschiedenen Realproben durchgeführt werden.

Im Folgenden werden die Bestandteile und Komponenten eines HPLC-Systems näher beschrieben.

2.1 Die Trennsäule

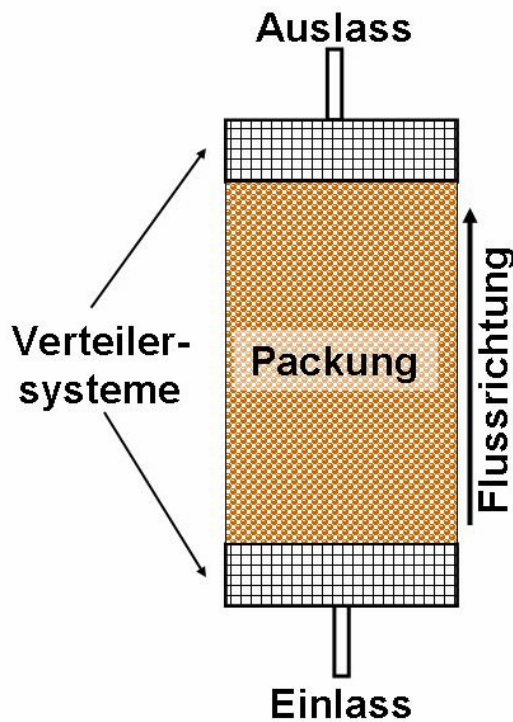


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer chromatographischen Säule

Der schematische Aufbau einer chromatographischen Säule ist in Abbildung 2.1 gegeben. Am Eingang und am Ausgang der Säule befinden sich Verteiler- bzw. Sammlersysteme, die der gleichmäßigen Verteilung der mobilen Phase über dem gesamten Säulenquerschnitt dienen. Meist werden diese Systeme als Fritten bezeichnet. Bei analytischen Säulen, wie sie im Rahmen dieses Praktikums verwendet werden, sind die Fritten meist aus Sintermaterial. Neben der gleichmäßigen Verteilung der mobilen Phase dienen sie gleichzeitig dazu, die kleinen Partikel, aus denen die stationäre Phase besteht, in der Säule zurückzuhalten. Zwischen

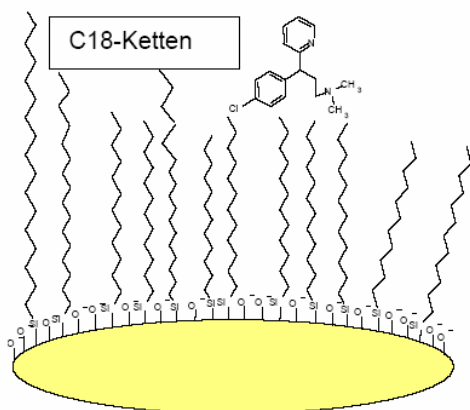
den Fritten befindet sich folglich die stationäre Phase deren Gesamtheit man in der Säule als Packung bezeichnet. Diese Packung sollte möglichst gleichmäßig und dicht sein, um eine gute Säulenqualität zu erhalten.

2.2 Die stationäre Phase

Für die im Rahmen des Praktikums durchgeführten Versuche wird eine sogenannte RP-Phase (reversed-phase-Phase) verwendet. RP-Phasen gehören zu den sog. chemisch modifizierten Kieselgelphasen, von denen eine kaum noch überschaubare Vielfalt im Angebot ist. Bei den RP-Phasen ist die normalerweise polare, nicht chemisch modifizierte, Kieselgeloberfläche (normal-phase-Phase) durch kovalent gebundene, hydrophobe Reste (z.B. C-18-Ketten [RP-18], C-12-Ketten [RP12], C-8-Ketten [RP8]

usw.) unpolar gemacht worden. Über die chemischen Einzelheiten der Herstellung solcher Festphasen und die verschiedenen Typen, sowie über die Eigenschaften (Einheitlichkeit der Korngröße, Porosität) und die Charakterisierung von RP-Phasen muss man sich in geeigneten Büchern oder beim Hersteller informieren. RP-Phasen haben gegenüber Normal-Phasen aber eine Reihe von Vorteilen, die dazu geführt haben, dass heute weit über 90% aller Trennungen auf RP-Phasen durchgeführt werden. Neben der öfteren Wiederverwendbarkeit (bei guter Pflege) liegt der wesentliche Vorteil in der schnellen Einstellung der Gleichgewichte beim Eluentenwechsel und der deutlich erhöhten Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten. Diese Eigenschaften sind vor allem bei einem Gradientenbetrieb (die Zusammensetzung der mobilen Phase ändert sich mit der Zeit) sehr wichtig.

Im Versuch wird eine RP-18-Phase vom Typ NUCLEOSIL der Firma Macherey-Nagel verwendet (also eine Phase mit einem entsprechend „hydrophobem Schild“ auf der Kieselgelbasis). Bei Kieselgeloberflächen, bei denen nicht alle ursprünglich vorhandenen Silanolgruppen mit unpolaren Ketten modifiziert wurden, liegt ein je nach Hersteller unterschiedlicher Anteil der Silanolgruppen noch unmodifiziert vor. Wegen der schwach sauren Eigenschaften der Silanolgruppen verleiht dieser Restanteil den somit nicht vollständig „endgecappten“ RP-Phasen gewisse „Ionenaustauscheigenschaften“. Für ungeladene Substanzen hat das meist keine nachteiligen Folgen. Geladene Substanzen, bzw. Substanzen, die in Abhängigkeit vom pH-Wert ihren Ladungszustand ändern, z.B. saure Substanzen (z.B. Phenole) und besonders basische Substanzen (Amine, N-Heterocyclen) neigen jedoch auf solchen "nicht vollständig endgecappten“ RP-Phasen zur Bandenverbreiterung und zum Tailing. Bei manchen Aminen kann dieser unerwünschte Effekt so stark sein, dass man keine ausreichenden Trennungen erzielen kann. Deshalb gibt es heute viele spezielle RP-Phasen für basische Verbindungen. Bei diesen speziellen RP-Phasen werden auch die restlichen Silanolgruppen noch meist mit kürzeren organischen Resten (z.B. C12) möglichst vollständig modifiziert.



Durch fast vollständiges „endcapping“ sind weniger Wechselwirkungen mit noch freien Silanolgruppen (SiOH) möglich.

Folge: „scharfe Peakform“

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einer C-18 Phase

2.2.1 Richtiger Umgang mit HPLC-Säulen

Hauptursachen für die Schädigung von RP-Phasen und anderen Festphasen sind:

- Verunreinigungen und Verstopfungen am Säulenkopf durch irreversibel retardiertes (Proben)-Material oder unlösliche Bestandteile (Staub, Pumpenabrieb) in Probe oder Eluent. Abhilfe: Bessere Eluenten- und Probenvorbereitung (Filtration des Eluenten und der Probe); Verwendung von guard-columns (quasi eine Filtersäule vor der eigentlichen Trennsäule); Säulenspülung mit geeignetem Eluenten.
- Schrumpfung der Festphase bei Anwendung extremer pH-Werte. Abhilfe: Verwendung von "gepufferten Eluenten"
- Falsche Säulenaufbewahrung. Wegen Pilzwachstum (Pufferlösungen !) und der Gefahr des Auskristallisierens von Puffersalzen, sollen Säulen niemals in 100% Wasser oder gar in Pufferlösungen aufbewahrt werden. RP-Pasen müssen nach Verwendung von Puffern gut mit Wasser und anschließend mit Methanol od. Acetonitril gespült werden. Als Eluent für eine längere Aufbewahrung empfiehlt sich eine Mischung aus 20% H₂O und 80% Acetonitril.

2.3 Die mobile Phase

2.3.1 Bestandteile und Vorbereitung von mobilen Phasen

In der Normal-Phasen-Chromatographie besteht die mobile Phase aus einem unpolaren organischen Lösungsmittel(gemisch), dem nur in bestimmten Fällen etwas polares Lösungsmittel oder gar Wasser (in geringen Mengen) zugesetzt wird. Die Elutionskraft

Eluent	Polarität [E^0]	UV-Grenze [nm]
n-Hexan	0,00	190
Toluol	0,29	285
Chloroform	0,40	245
Dichlormethan	0,42	230
Aceton	0,56	330
Essigsäureethylester	0,58	260
Dimethylsulfoxid	0,62	270
Diethylamin	0,63	275
Acetonitril	0,65	190
Ethanol	0,88	210
Methanol	0,95	205
Wasser	>1,11	<190

Tabelle 1: Elutrope Reihe (Auszug). Die angegebenen E^0 -Werte gelten für Aluminiumoxid als Adsorbens, doch sind sie für Silicagel nur um einen konstanten Faktor verschieden: E^0 (SiO₂) = 0,77* E^0 (Al₂O₃). Die Lösungsmittelreihenfolge ändert sich also nicht, wenn man von Aluminiumoxid auf Silicagel übergeht.

oder „Stärke“ der verschiedenen Eluenten wurde empirisch bestimmt und ist für jeden Eluenten als Zahlenwert festgehalten. Als Symbol dafür verwendet man E^0 .

Die so gefundene Reihenfolge von schwachen zu mittleren bis hin zu starken Eluenten nennt man die Eluotrope Reihe. Es zeigt sich, dass darin die Eluenten nach ihrer Polarität geordnet sind. Ein (in der Normal Phase Chromatographie) starker Eluent ist polar, ein schwacher ist unpolar.

In der RP-Chromatographie ist es umgekehrt: Dort besteht die mobile Phase in der Mehrzahl der Fälle aus einem relativ polaren, mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel (meist Methanol oder Acetonitril), dem zur Erhöhung der Polarität ein bestimmter Wasseranteil (evtl. mit Zusatz von Salzen: Puffersysteme zur Einstellung eines erwünschten pH-Wertes) beigemischt wird. Bei der Wahl des mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels sind viele Aspekte zu erwägen, auf die hier nicht eingegangen werden soll. Bei Standardtrennungen ist meist Acetonitril die bessere Wahl. Das verwendete Wasser muss stets sehr rein sein und darf insbesondere keine organischen Verunreinigungen enthalten (deshalb niemals Wasser verwenden, das lediglich mit Ionenaustauschern entionisiert wurde). Solche Verunreinigungen werden auf RP-Phasen zunächst stark retardiert (adsorbiert), und erscheinen dann oft unerwartet (besonders gegen Ende eines Gradientenlaufes) als "Geisterpeaks" in einem Chromatogramm.

Weiterhin sollten die Eluenten (besonders das Wasser) keine gelösten Gase enthalten. Deshalb müssen die Eluenten vor Gebrauch sorgfältig entgast werden. Für diese Zwecke sind verschiedene Verfahren im Gebrauch: Vakuumentgasung (bei der für das Praktikum verwendeten Anlage wird die mobile Phase mit einem Online-Degasser kontinuierlich vakkumentgast bevor sie zu den Pumpen gelangt), Membranfiltration, Ultraschall, Heliumspülung (Helium ist in Wasser unlöslich und transportiert die in Wasser gelösten Gase, die mit Helium mischbar sind, ab). Ganz wichtig ist auch, dass die Eluenten (ebenso wie die Probenlösung) frei von Partikeln (z.B. Staub, ungelöste Substanzrückstände etc.) sind, die die sehr feinen Einlassfritten (2 μm) der Trennsäule verstopfen könnten oder gar die Pumpenköpfe schädigen könnten. Eine (Membran)-Filtration der Eluenten oder der Gebrauch von Einlassfiltern ist deshalb unerlässlich. Besondere Vorsicht ist bei der Verwendung von wässrigen Salzlösungen (Puffern) angeraten. Es muss sicher gestellt sein, dass es nicht zu Ausfällungen kommt, wenn die

wässrige Pufferlösung mit einem organischen Lösungsmittel vermischt wird. Niemals darf ein Eluentengemisch, das eine wässrige Salzlösung enthält, nach Beendigung der Trennung im HPLC-System verbleiben. Totalschäden an Pumpen, Säulen und Detektorzellen sind vorprogrammiert, wenn darin Salze im Laufe der Zeit auskristallisieren.

2.3.2 Einsatzarten von mobilen Phasen

Im Versuch wird ein Gemisch aus Wasser und Methanol verwendet. Der Volumenanteil von Methanol beträgt 25%. Anmerkung: Man muss sich leider damit abfinden, dass in allen HPLC-Büchern und Arbeitsanweisungen die Zusammensetzung der mobilen Phase nicht so wie oben unter Verwendung der definierten Gehaltsgröße σ "Volumenanteil", sondern oft nicht ganz eindeutig angegeben wird. So heißt es z.B. oft: "Methanol/Wasser 50:50" oder "50% Wasser in Methanol" oder "Methanol 50 proz". Man kann dann vermuten, dass damit wohl meist der Volumenanteil gemeint ist, weil das der gängigen Arbeitsweise entspricht. Beim Einsatz der mobilen Phasen unterscheidet man generell zwei Arbeitsweisen: Die isokratische Elution und die sog. Gradientenelution.

2.3.3 Die Isokratische Elution

Die Zusammensetzung der mobilen Phase ändert sich während der Trennung nicht. Die Eluenten werden im benötigten Verhältnis gemischt und entgast und können dann von z.B. nur einer Pumpe gefördert werden. Vorteil: es wird nur einer Pumpe benötigt; Nachteil: mangelnde Flexibilität, denn bei wechselnden Trennproblemen oder in der Erprobungsphase eines neuen Eluentensystems muss der Vorratsbehälter der mobilen Phase häufig gewechselt werden. Erfahrung oder langwierige Erprobungen sind nötig, um ein geeignetes isokratisches Eluentengemisch zu optimieren (Zeitaufwendig !!). Im Rahmen des Praktikumsversuchs wird eine isokratische Methode verwendet.

2.3.4 Die Gradienten Elution

Die Zusammensetzung der mobilen Phase ändert sich während der Trennung! Man spricht von binären Gradienten, wenn sich die mobile Phase aus zwei, von ternären bzw. quaternären Gradienten, wenn sie sich aus drei, bzw. vier Bestandteilen zusammensetzt. Der zeitliche Verlauf der Änderung der Zusammensetzung kann mit Hilfe der Steuerungssoftware programmiert werden. Auf diese Weise sind viele Arten

von Gradientenverläufen (linear, konvex, konkav, stufenförmig) möglich. Meist jedoch sind lineare Gradienten völlig ausreichend. Vorteil: hohe Flexibilität; Bewältigung von schwierigen Trennproblemen, die isokratisch nicht zu lösen sind; Verkürzung von Analysenzeiten bei stark retardierten Substanzen; Nachteil: es werden oft zwei Pumpen (Hochdruckgradient) benötigt; Erfahrungen im Gradientendesign sind nötig. So muss man z.B. wissen, daß Methanol-Wasser-Gemische zur Bildung von Gradienten nicht optimal sind, weil die Mischungsreaktion stark exotherm ist, sowie eine Volumenverminderung und eine Viskositätserhöhung (Druckerhöhung!) eintritt. Gemische aus Acetonitril und Wasser sind in dieser Hinsicht viel unproblematischer.

3 Bestandteile einer HPLC-Anlage

3.1 Die Pumpen

3.1.1 Anforderungen an das Pumpensystem

Über die raffinierten technischen Einzelheiten von Aufbau und Funktion der Pumpen muss man sich in geeigneten Büchern informieren. Als die zwei wichtigsten Anforderungen, die an die Pumpen gestellt werden müssen, seien genannt:

- Es muss eine konstante und reproduzierbare Fließgeschwindigkeit gewährleistet werden, da von der Fließgeschwindigkeit die Retentionszeiten der Peaks und damit die Reproduzierbarkeit der Messung abhängig sind
- Es muß ein möglichst pulsationsfreier Fluß gewährleistet werden, weil sonst die Grundlinie des Detektors zu unruhig wird, und Druckstöße die stationäre Phase schädigen können.

Bei den in analytischen Säulen eingesetzten, kleinen Partikeldurchmessern der stationären Phase ($< 5 \mu\text{m}$) kommt es bei hohen Fließgeschwindigkeiten zu sehr hohen Rückdrücken. Deshalb erfolgen LC-Trennungen im analytischen Maßstab (Trennsäulenlängen: bis 250 mm; Durchmesser bis 4 mm) meist bei Fließgeschwindigkeiten im Bereich zwischen 1 und 2 mL/min.

3.1.2 Beispiele für Pumpensysteme

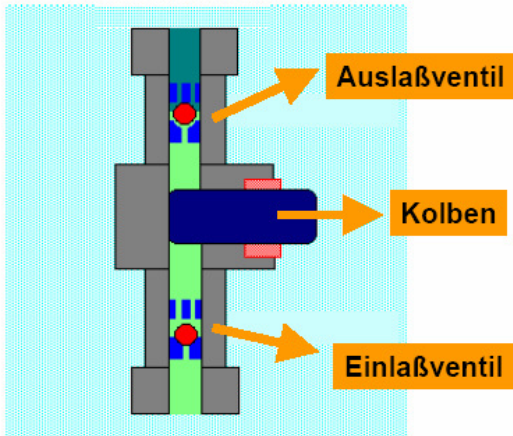


Abbildung 3.1: Kolbenpumpe

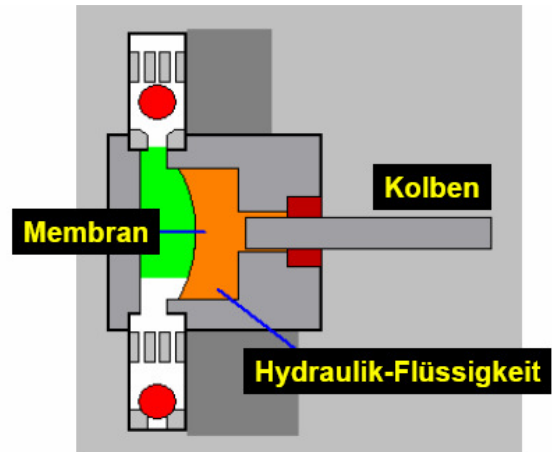


Abbildung 3.2: Membran-Kolbenpumpe

3.2 Die Injektionseinheit

3.2.1 Der automatische Probengeber (Autosampler)

Moderne HPLC-Anlagen sind fast ausschließlich mit einer automatischen Probengeber-Einheit ausgestattet. Die Vorteile liegen nicht nur in einer deutlichen Zeitersparnis beim Abarbeiten größerer Probenmengen, sondern auch in der außerordentlichen Reproduzierbarkeit und Präzision des Einspritzvorganges.

3.2.2 Die manuelle Injektion

Das Probeninjektionsventil bei der manuellen Injektion ist ein wichtiges, empfindliches und verschmutzungsanfälliges Einzelteil einer HPLC-Anlage. In Verbindung mit einer Probenschleife gestattet es die Injektion eines definierten Probenvolumens in ein HPLC-System, das unter hohem Druck steht. Über die technischen Einzelheiten von Aufbau und Funktionweise muss man sich in geeigneten Büchern informieren. Sollte man einmal in Ermangelung eines Autosamplers auf die Benutzung eines manuellen Injektionsventils angewiesen sein, seien hier einige wichtige Bedienungshinweise zur geflissentlichen Beachtung genannt:

- Niemals das Ventil ohne Lösungsmittelfluss betätigen.

- Vor jedem Einspritzen einer Probe muss die Probenschleife gespült werden.

Das kann per Hand mit einer Spritze geschehen. Zum Einspritzen der Probe dürfen nur spezielle Mikroliterspritzen mit stumpfen Endungen verwendet werden, damit die Dichtungen im Inneren des Ventils nicht beschädigt werden. Der Umschaltvorgang des Ventils von der "load"- auf die "inject"-Stellung, der ja bei laufenden Pumpen erfolgt, muss zügig und schnell erfolgen, da es sonst zu einem Druckstoß im System kommen kann, der die Säulenpackung schädigen kann oder eventuell die Sicherheitsabschaltung des gesamten Systems zum Ansprechen bringt. Das Probeninjektionsventil kann zu einer Quelle von Verunreinigungen werden, wenn es nicht regelmäßig gereinigt und gepflegt wird.

3.3 Der Detektor

Ohne Detektor ist jedes Chromatographiesystem blind. Die Wahl eines geeigneten Detektors ist abhängig von der Art der zu trennenden und zu bestimmenden Substanzen und von der Art der Begleitsubstanzen, deren eventuelle Anwesenheit man erkennen will. Es gibt eine Vielzahl von Detektionsverfahren. Diejenigen, die auf der Absorption von UV- oder sichtbarer Strahlung beruhen, haben einen großen Einsatzbereich. Viele organische und anorganische Moleküle (Aromaten, Carbonylverbindungen, Komplexe) absorbieren im mittleren UV-Bereich (250nm - 300nm) mit ausreichend großen Absorptionskoeffizienten (Lambert-Beersches-Gesetz). Wenn das nicht ausreicht, kann man auch in das kurzwellige UV (190nm - 250nm) wechseln. Dann allerdings ist die Verwendung von Eluenten mit Eigenabsorption ausgeschlossen. So muss man z.B. sehr sauberes Acetonitril an Stelle von Methanol verwenden, um auch noch bei einer Wellenlänge von 190 nm messen zu können.

Anstelle eines gewöhnlichen VWD¹-Detektors (Abb. 5) kann auch ein spezielles, computerunterstütztes Spektrophotometer, der Photodioden-Array-Detektor (DAD) mit sog. „inverser Optik“ eingesetzt werden (siehe Abb. 6). Die Bezeichnung „inverse Optik“ bedeutet, dass hier die Messzelle nicht nach, sondern vor dem spektralen Gitter angebracht ist. Das gesamte Licht fällt so durch die Flußzelle und wird erst danach am

¹ VWD = variable wavelength detector

Gitter spektral aufgeteilt. Der spektrale Lichtfächer fällt dann auf das Dioden-Array. Dies ist ein Chip mit zahlreichen (100 - 1000) lichtempfindlichen Photodioden, welche nebeneinander angeordnet sind. Diese Dioden werden elektronisch in sehr kurzer Zeit (ca. 50 ms) kontinuierlich ausgelesen und daraus eine Vielzahl von UV-Spektrum generiert. Der DAD-Detektor ist somit in der Lage, während einer chromatographischen Trennung die kompletten UV-Spektren der Peaks zu registrieren und abzuspeichern. Dies ist besonders wichtig zur Peakidentifikation, zur Reinheitskontrolle (Peak-Purity-Check) und zur Ermittlung optimaler Detektionswellenlängen bei der Untersuchung unbekannter Proben.

Beim Einsatz eines UV-Detektors (bei anderen, komplizierteren Detektoren erst recht) sind mehrere Punkte zu beachten, die hier nur kurz angesprochen werden:

- Lampenart (Hg, Wolfram, Deuterium), Wellenlängenbereich und Lebensdauer, feste Wellenlänge, variable Wellenlänge, DAD.
- Volumen der Detektorzelle, das Peakvolumen und die Bandenverbreiterung.

Es sollte erwähnt werden, dass neben der Absorption von Licht weitere physikalische Prinzipien zur Detektion verwendet werden können. So gibt es so genannte RI²-Detektoren, die auf dem Brechungsindex des Mediums beruhen. Für ionische Substanzen können Leitfähigkeitsdetektoren verwendet werden. Bei optischen Isomeren werden Polarimeter eingesetzt. Sehr fortschrittlich (und teuer) sind Massenspektrometer, bei denen die Moleküle in Bruchstücke zerlegt werden und so ggf. auf die Komponenten zurück geschlossen werden kann.

Als Peakvolumen wird das während der Elution des Peaks geförderte Volumen bezeichnet. Es ist berechenbar aus der Basisbreite des Peaks und der Fließgeschwindigkeit. Es ist einzusehen, dass das Volumen der Detektorzelle viel kleiner sein muss als das Peakvolumen, denn sonst würden sich (im Extremfall) bereits getrennte Peaks in der Detektorzelle wieder vermischen. Zumindest kann ein zu großes

² RI = refractive index

Zellvolumen erheblich zur Bandenverbreiterung beitragen. Das Peakvolumen steigt mit der Retentionszeit und dem k-Wert eines Peaks (Substanz). Deshalb ist gerade für früh eluierende, schmale Peaks mit kleinen Peakvolumina das Zellvolumen eine kritische Größe.

Die Empfindlichkeit eines Detektors hängt von Art, Typ und Hersteller ab und kann meist in einem weiten Bereich eingestellt werden.

3.4 Die Steuerungs- und Auswerte-Software

Bei neueren HPLC-Anlagen werden alle zugehörigen Einzelgeräte (Probenaufgabe, Pumpen, Säulenthermostat, Ventile, Detektoren) von einem Rechner aus gesteuert. Die dafür nötige Software übernimmt auch die Darstellung, Speicherung und Verwaltung der Chromatographie-Daten. Nach Aufnahme des Chromatogramms muss die Software natürlich auch die Bearbeitung und Auswertung des Chromatogramms übernehmen und einen passenden Ausdruck der Ergebnisse liefern. Bei älteren HPLC-Anlagen, bei denen die Steuerung der Geräte nicht zentral von einem PC aus erfolgt, übernimmt ein separater Integrator die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme (heute nicht mehr gebräuchlich). Bei quantitativen Analysen ist die Ermittlung der Peakflächen (Integration) wohl die wichtigste Aufgabe der Auswerte-Software. Die beste Voraussetzung zur exakten Ermittlung der Peakflächen liegt vor, wenn die einzelnen Peaks völlig getrennt sind (Grundlinientrennung), und wenn die Grundlinie konstant verläuft. Zwar kann eine gute Integrationssoftware auch überlappende oder aufsitzende Peaks integrieren und auch eine eventuelle Drift der Grundlinie berücksichtigen, jedoch ist es immer angebracht, zunächst die Trennung zu optimieren oder die Probenvorbereitung zu verbessern um Störpeaks zu beseitigen. Für die Integration der einzelnen Peaks benötigt die Software die sog. Peakverarbeitungsparameter, die entweder vom Anwender gesetzt, oder aus den Chromatographie-Rohdaten automatisch ermittelt werden. Die beiden wichtigsten Peakverarbeitungsparameter sind:

- Peak-Width: legt die minimale Breite (in Sekunden) eines Peaks fest, der ausgewertet werden soll. Optimaler Wert: Halbwertsbreite des schmalsten interessierenden Peaks.

- Slope-Sensitivity: legt Beginn und Ende eines Peaks fest (Peakerkennungsempfindlichkeit).

Wenn die ermittelte positive (Peakbeginn) bzw. negative Steigung (Peakende) einen vorgegebenen, aus den Schwankungen der Grundlinie ermittelten Wert erreicht kommt es zur Peakerkennung durch die Software.

4 Analyseverfahren

In der HPLC ist es von großer Wichtigkeit, dass die vom Detektor erhaltenen Daten quantitativ ausgewertet werden können und somit unter geeigneten Bedingungen eine quantitative Bestimmung der untersuchten Komponenten erlauben. Als Messgröße dient in der Regel die Fläche unter einem Peak. Bei exakt symmetrischen (Gauß-) Peaks kann auch die Peakhöhe als Maß herangezogen werden. Peakfläche bzw. Peakhöhe sind dann proportional zur Menge der zu analysierenden Substanz. Das Detektorsignal ist jedoch außer von der Konzentration des Analyten auch stark von dessen Extinktionskoeffizienten³ abhängig. So können zwei Substanzen in einer Lösung durchaus die gleiche Konzentration besitzen, aber in der Messung eine gänzlich andere Fläche (oder Peakhöhe) ergeben. Aus diesem Grund sollte bei quantitativen Analysen vorzugsweise mit einer Kalibrierung gearbeitet werden. Dafür werden verschiedene Kalibrierungsmethoden benutzt, z.B. die Methode des Internen Standards, die Methode des Externen Standards, die Reinstoffkalibrierung, etc.

4.1 Reinstoffkalibrierung

Bei der Reinstoffkalibrierung bereitet man einige Vergleichslösungen mit *bekannter Konzentration (g/L)* des Reinstoffs im Lösungsmittel vor. Diese Lösungen werden nacheinander vermessen und die Flächen unter den Peaks bestimmt. Die Kalibrierungskurve, die die Abhängigkeit der Masse oder Konzentration von den Peakflächen angibt, wird bestimmt und mit einer linearen oder polynomischen Gleichung angepasst. Mit dieser Kalibrierungskurve oder Kalibrierungsgleichung werden die unbekannt Konzentrationen der Proben berechnet.

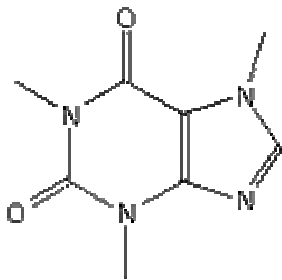
³ Der Extinktionskoeffizient gibt an, wie stark die jeweilige Substanz Licht der gewählten Wellenlänge absorbiert

5 Experimenteller Teil: HPLC Analyse von Koffein in Getränken (Kaffee, Tee und Cola)

5.1 Einleitung

Koffein gehört als pharmazeutischer Wirkstoff in die große Gruppe der Psychopharmaka und in die Untergruppe der Psychoanaleptika. Analeptika sind Substanzen, die das Zentralnervensystem stimulieren und in hohen Dosen Krämpfe auslösen. Psychoanaleptika sind unspezifisch wirksame Substanzen, die vorwiegend die "Psyche" anregen, aber auch noch andere, z.B. bei Koffein diuretische⁴, Wirkungen zeigen. Eine tägliche Koffeinzufuhr hinterlässt in der Regel keine bleibenden organischen Schädigungen.

Chemisch gesehen ist Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin), genau wie Theophyllin und Theobromin als Xanthinderivat eine Purinbase. Alle drei genannten Xanthinderivate kommen in Teeblättern vor, Theobromin auch in der Kakaobohne und in der Colanuss. In der Kaffeebohne und in Teeblättern ist Koffein gegenüber den beiden anderen Xanthinderivaten der Hauptbestandteil. In vielen käuflichen Limonaden ist Koffein in erlaubten Konzentrationen von 85 - 250 mg/L enthalten.



5.2 Durchführung

5.2.1 Vorbereitung der Kalibrierungslösungen

3-4 Kalibrierlösungen mit verschiedenen Koffeinkonzentrationen müssen vorbereitet werden:

Ca.10 mg (6, 4 und 2) Koffein (Aldrich >99%) werden auf eine Wagepapier eingewogen. Anschließend wird das Pulver vorsichtig in einen 25 ml Messkolben überführt und noch

⁴ Den Harnstoffwechsel anregende

mal eingewogen. Ca.10 ml Wasser wird dazu ergänzt. Der Messkolben wird verschlossen und 30 s gut unter Erwärmung (im heißen Wasser) geschüttelt. Dann wird der Messkolben abgekühlt und mit entionisiertem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Der Messkolben wird beschriftet (Lösung A / Konzentration-Koffein [mg/ml] !).

Filtration: Die so hergestellte Kalibrierungslösung wird in eine 2ml Einweg-Spritze mittels einer aufgesteckten Einwegkanüle (langer Typ) aufgezogen. Danach wird die Kanüle von der Spritze wieder entfernt (Achtung! Spritze dabei senkrecht nach oben halten, damit die aufgezogene Lösung nicht ausläuft!) und ein CHROMAFIL Einmalfilter (Typ AO-45/3, organisch/wässrig, Porendurchmesser 0.45µm, Fa. Macherey-Nagel) aufgesetzt. Die Lösung wird VORSICHTIG durch den aufgesetzten Filter in ein Autosampler-Injektionsgläschen (Vial) gedrückt. Das Gläschen wird mit einer Anbördelkappe fest verschlossen und beschriftet. Achtung: Konzentrationen in den Vials auf einer Liste notieren!

5.2.2 Vorbereitung der Proben

Die Probelösung (die aufgebrühte und auf Raumtemperatur abgekühlte Kaffee-Lösung oder Tee-Lösung bzw. die mittels eines Ultraschallbades entgaste Coca-Cola-Lösung) wird in eine 2ml Einweg-Spritze mittels einer aufgesteckten Einwegkanüle aufgezogen und durch den Filter in ein Vial gedrückt. Das Gläschen wird mit einer Anbördelkappe fest verschlossen und beschriftet. Inhalt der Vials auf der Liste notieren!

5.3 Durchführung der HPLC Analysen

Säule: EC 125/3 NUCLEOSIL 100-5 C18 von Fa. Macherey-Nagel

Vorbereitung: Nachdem die HPLC Anlage mit den benötigten Eluenten (Kanal A: 75% H₂O [entionisiert und mit 0,45µm Membranfilter filtriert] / 25% Methanol für die Flüssigkeitschromatographie [LiChrosolv, Fa. Merck]; Kanal B: nicht verwendet) bestückt wurde, wird zunächst die Säule für 10 min konditioniert. Zum Konditionieren wird die Säule bei einer Flussrate von 0,55ml/min mit Eluent A gespült. Derweil wird die Software programmiert. Zur Programmierung der Software ist der **Anhang „Bedienung des D-7000 HSM“** zu lesen. Hier sind auch ergänzende Angaben über die Methode zu finden.

6 Auswertung

Zunächst ist anhand der Chromatogramme bzw. der Reports eine geeignete Kalibrierkurve anzupassen, mit Hilfe derer die Koffeinkonzentration in den Proben (Kaffee, Tee, Cola) bestimmt werden kann. Anschließend soll die Koffeinkonzentration in den untersuchten Proben bestimmt werden.

Abschließend ist ein Versuchsprotokoll pro Gruppe anzufertigen. Das Protokoll sollte aus folgenden Teilen bestehen:

1. Grundlagen:

- Ziel des Versuches
- Die für den Versuch wesentlichen theoretischen Grundlagen knapp in eigenen Worten. Keine Reproduktion der Praktikumsanleitung!

2. Versuchsaufbau:

- Beschreibung des Aufbaus sowie der Bedeutung und Aufgabe wesentlicher Teile.

3. Versuchsdurchführung:

- Genau Beschreibung des Versuchsablaufes und des Vorgehens bei der Messung. (Auch in Stichworten möglich!)
- Eventuell besondere Vorkommnisse erwähnen!!

4. Auswertung:

- Geeignete Darstellung aller Messwerte in Tabellen und Diagrammen
- Geeignete Darstellung der Kalibrierkurve (auch Gleichung angeben)
- Geeignete Angabe der Koffeingehalte der untersuchten Getränke
- Kennzeichnung der Ergebnisse (z.B. durch Unterstreichen)

5. Bewertung:

- Zusammenfassung, kritische Betrachtung und Wertung des Versuches.

Grundsätzlich sollte Euer Protokoll so geschrieben sein, dass es auch für eine Person, die mit dem Versuch nicht vertraut ist, verständlich ist. Dies setzt eine klare Strukturierung voraus (teilt die Arbeit sinnvoll unter Euch auf und bespricht die

Endversion noch einmal gemeinsam). Grundsätzlich gilt, dass wenig Text mit viel Inhalt besser ist als viel Text mit wenig Inhalt. Aus diesem Grund soll Euer Protokoll viel Inhalt auf maximal 10 geschriebenen Seiten enthalten. Anhänge (z.B. Chromatogramme oder Reports zählen nicht mit).