



Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften

Grundlagen der Chromatographie

Praktikum Physikalische und Analytische Chemie

Frühjahrssemester 2020

1. Einführung

Chromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem die zu trennenden Substanzen zwischen einer **mobilen und einer stationären Phase** verteilt werden. Die beiden Phasen sind **nicht mischbar**, und die Trennung beruht auf unterschiedlichen Verteilungskonstanten der verschiedenen Substanzen. Die Technik ist so konzipiert, dass sich das Verteilungsgleichgewicht in einer kontinuierlichen Abfolge mehrmals während des Trennprozesses einstellen kann.

Mithilfe der folgenden Punkten wird die Chromatographie definiert und charakterisiert:

- Trenntechnik
- Zwei nicht mischbare Phasen
- Eine mobile und eine stationäre Phase
- Trennung beruht auf der Verteilung von Substanzen zwischen den Phasen
- Kontinuierliche Abfolge von Gleichgewichtseinstellungen

Die angegebene Bedingung im letzten Gesichtspunkt ist ideal und nicht zwingend erreichbar. Für das System sollte aber die Möglichkeit bestehen, dass sich mehrmals wiederholend ein **Verteilungsgleichgewicht** einstellen kann. Es ist durchaus möglich, dass aufgrund der Kinetik der eigentliche Gleichgewichtszustand mit dem realen Wert der Gleichgewichtskonstante nach Nernst gar nicht erreicht wird. Entscheidend ist, dass die Triebkraft der Trennung die Tendenz zur Gleichgewichtseinstellung ist.

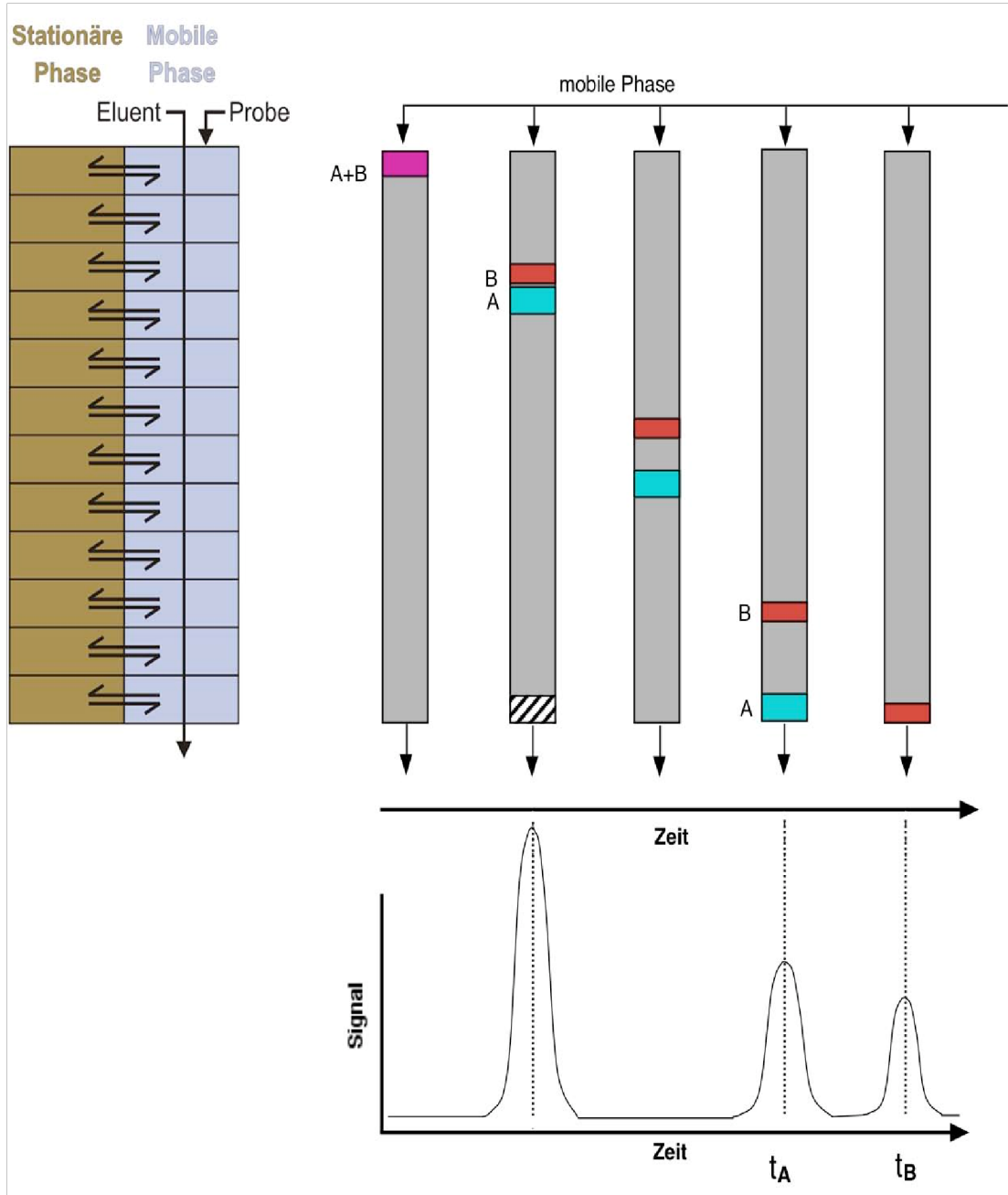


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Prinzips der (Säulen-)Chromatographie

Abbildung 1.1 links illustriert schematisch die sich wiederholenden Gleichgewichtseinstellungen zwischen **stationärer und mobiler Phase** während die Analytspesies mit der mobilen Phase (**Eluent**) durch die Säule transportiert werden. Die einzelnen Kompartimente existieren nicht wirklich, vermitteln aber die zugrundeliegende Idee.

Die chromatographische Trennung ist vielmehr eine kontinuierliche Wiederholung von fließend ineinander übergehenden Gleichgewichtseinstellungen. Die Vorstellung einer kompartimentierten Säule hilft aber, sich den Trennprozess zu veranschaulichen und theoretisch zu beschreiben.

Abbildung 1.1 rechts zeigt schematisch Momentaufnahmen einer Säule während der Trennung der Komponenten A und B. Die beiden Komponenten werden als Gemisch (violette Probenlösung) auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss wird mit Lösungsmittel (Eluent) nachgespült. Am unteren Ende der Säule befindet sich ein **Detektor**, der bei Ankunft der entsprechenden Komponente ein Signal erzeugt. Das detektierte Signal ist von der Konzentration der Komponente abhängig.

Als erstes erreicht eine **Inertsubstanz** das Ende der Säule. Sie wurde der Probe zugesetzt und so gewählt, dass sie nicht mit der stationären Phase wechselwirkt und daher mit derselben Geschwindigkeit wie der **Eluent** durch die Säule transportiert wird. Sie dient der Bestimmung der **Lineargeschwindigkeit** durch die Säule, und ihre Detektion bestimmt praktisch den „Startpunkt“ der Trennung. Die Komponenten A (türkis) und B (rot) trennen sich aufgrund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten und dementsprechend unterschiedlicher Retention auf. Im Vergleich mit Komponente B wechselwirkt die Komponente A weniger stark mit der stationären Phase, weshalb sie auch früher das Ende der Säule erreicht. Man sagt auch: A wird früher **eluiert**.

Abbildung 1.1 rechts, unten zeigt einen **Graphen** mit aufgetragener **Zeit versus Detektorsignal**. Wenn eine Substanz die Säule verlässt, steigt das Signal an und fällt anschließend wieder auf das Niveau der Grundlinie ab. Die räumliche Trennung auf der Säule wird als eine zeitliche Trennung am Detektor dargestellt. Man nennt diese Auftragung von Zeit versus Detektorsignal Chromatogramm. Die einzelnen Kurven im Chromatogramm nennt man **Peaks**. Ein solcher Peak lässt sich im Idealfall mit einer Gauß-Funktion beschreiben. In der Praxis sind aber meistens Abweichungen von dieser Peakform zu beobachten.

Den Zeitpunkt, an dem das Peakmaximum im Chromatogramm auftritt, nennt man **Retentionszeit**. Sie ist für ein gegebenes chromatographisches System (Säulenmaterial, Eluent, usw.) charakteristisch für eine bestimmte Substanz. Sie ist für jeden Analyten für ein gegebenes chromatographisches System charakteristisch. Die Analyten werden mittels Vergleich von Retentionszeiten zwischen Probenlösung und Kalibrationslösung identifiziert.

Die Bestimmung von Retentionszeiten liefert **qualitative Information** über die Zusammensetzung der Probe. Um **quantitative Information** zu erhalten, müssen die Peakflächen miteinander verglichen werden. In guter Näherung kann auch die Betrachtung der Peakhöhen eine gute Abschätzung der Analytkonzentration(en) liefern.

Die theoretische Grundlage der Chromatographie ist durch das **Verteilungsgesetz nach Nernst** gegeben. Die Trennung beruht auf der Verteilung der Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase, was durch die folgende Gleichgewichtsreaktion ausgedrückt werden kann:



A_M repräsentiert hierbei einen sich in der mobilen Phase befindenden Analyten und A_S einen auf der stationären Phase adsorbierten Analyten. Stellt sich also ein Gleichgewicht ein, so gilt das Verteilungsgesetz nach Nernst und der daraus abgeleitete Verteilungskoeffizient K_C kann wie folgt ausgedrückt werden:

$$K_C = \frac{c_S}{c_M} \quad (1.2)$$

Der Verteilungskoeffizient K_C wird als Konzentrationsverhältnis zwischen Analytkonzentration in stationärer und mobiler Phase ausgedrückt und ist bei gegebener Temperatur konstant.

Analog kann das Phasenverhältnis β über die Volumina ausgedrückt werden:

$$\beta = \frac{V_M}{V_S} \quad (1.3)$$

2. Das Chromatogramm und daraus abgeleitete Größen

Der folgende Graph in *Abbildung 2.1* repräsentiert ein typisches Chromatogramm, in welchem die Zeit versus Detektorsignal aufgetragen wird.

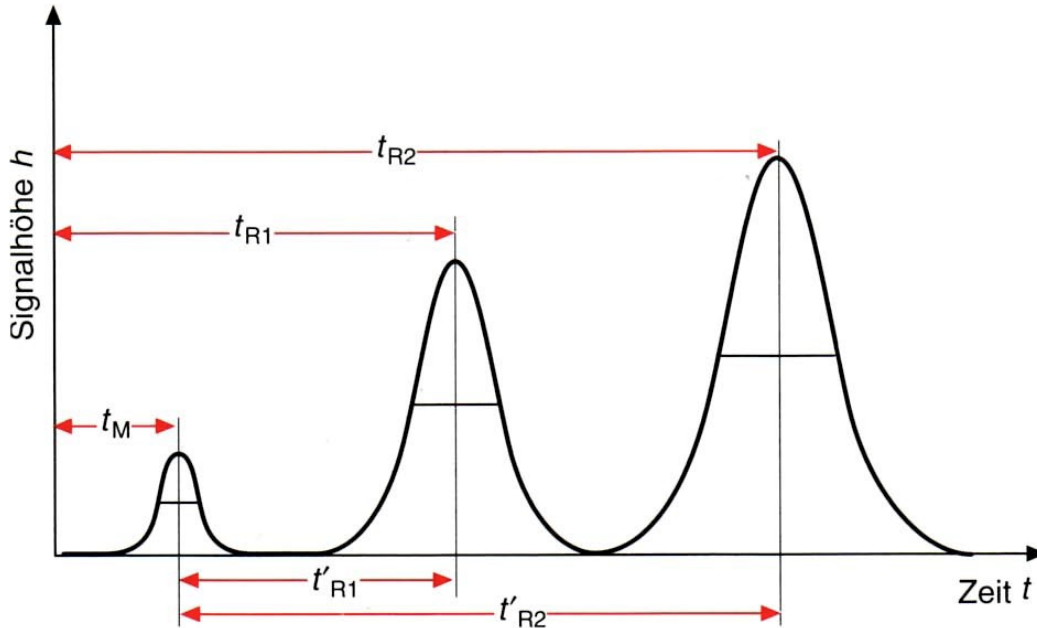


Abbildung 2.1: Chromatogramm mit charakteristischen Elutionspeaks

Durchflusszeit (oder Totzeit) t_M :

Unter der **Durchflusszeit (oder Totzeit) t_M** versteht man die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um vom Säulenanfang zum Säulenende zu gelangen. Der eigentlich veraltete Ausdruck Totzeit ist in der Praxis noch sehr geläufig. Die Totzeit bezeichnet aber vielmehr diejenige Zeit, welche die Probe im System verbringt, ohne einer Trennung zu unterliegen (z.B. Transport durch die Verbindungskapillaren zwischen Injektionsstelle und Säule oder zwischen Säule und Detektor).

Die Lineargeschwindigkeit u wird mithilfe der folgenden Gleichung definiert:

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (2.1)$$

Unter der Lineargeschwindigkeit u versteht man diejenige Geschwindigkeit, mit der sich die mobile Phase durch die Säule bewegt. Sie kann mithilfe **Säulenlänge L** und der **Durchflusszeit t_M** ausgedrückt werden.

Die **Retentionszeit t_R** eines Analyten ist definiert als die Zeit, bei der der korrespondierende Elutionspeak ein Maximum aufweist. Die Differenz aus der **Retentionszeit t_R** und der **Durchflusszeit t_M** wird als **Reduzierte Retentionszeit t'_R** bezeichnet und berechnet sich wie folgt:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2.2)$$

Das **Retentionsvolumen V_R** wird wie folgt angegeben:

$$V_R = t_R \cdot F \quad (2.3)$$

F ist hierbei die **Flussrate** des Eluents.

Der **Retentionsfaktor (oder Kapazitätsfaktor) k** ist wie folgt definiert:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (2.4)$$

Der Retentionsfaktor k gibt an, um welchen Faktor die Retentionszeit t_R des betrachteten Analyten gegenüber der Durchflusszeit t_M der mobilen Phase verlängert ist.

Der **Selektivitätskoeffizient α** wird ausgedrückt als Verhältnis zweier Retentionszeiten und ist durch die folgende Gleichung gegeben:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (2.5)$$

Der Selektivitätskoeffizient beschreibt die Güte der Trennung zweier Analyten. Ist $\alpha = 1$, so haben die untersuchten Analyten dieselbe Retentionszeit, «sie koeluierten».

3. Die Peakform und daraus abgeleitete Grössen

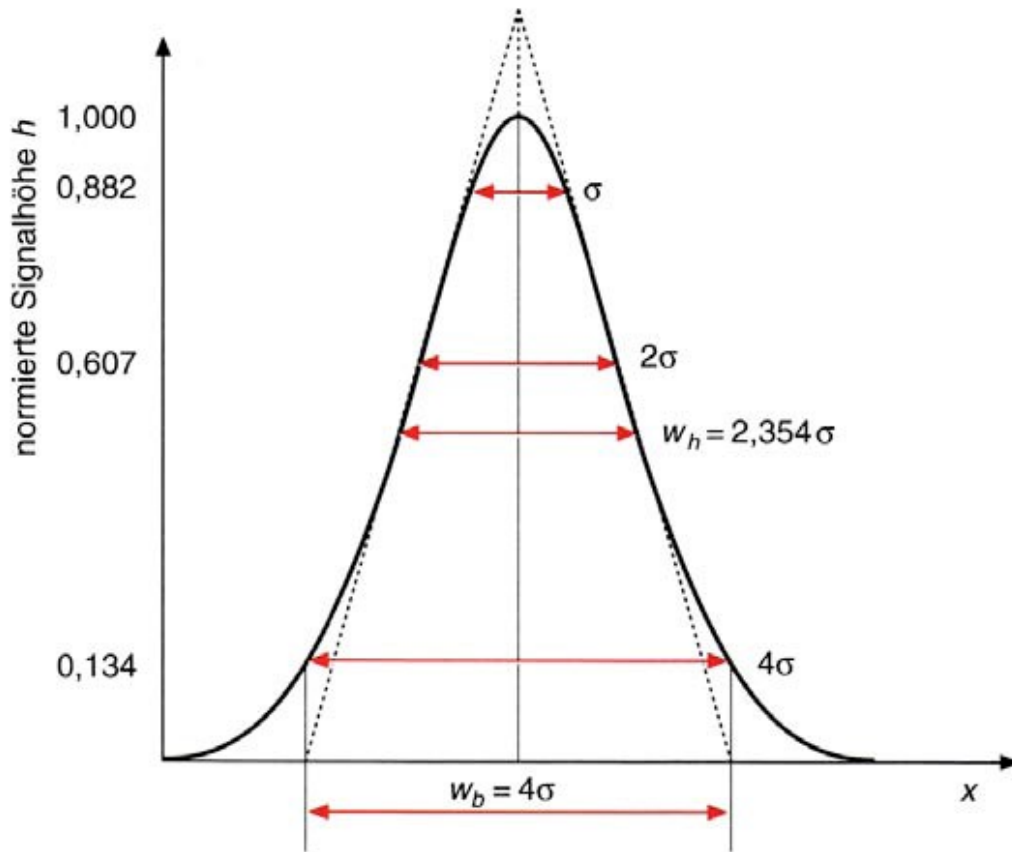


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung eines optimalen «Gauss-Peaks» mit Standardabweichung σ , Peakbreite zwischen den Wendepunkten 2σ , Peakbreite in halber Höhe w_h und die Basisbreite w_b .

Idealerweise kann die Peakform in der Chromatographie mithilfe der Gauss-Funktion beschrieben werden:

Die ideale Peakform in der Chromatographie ist in *Abbildung 3.1* dargestellt. Sie lässt sich mit einer Gauß-Funktion wie folgt beschreiben:

$$y = y_0 e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (3.1)$$

Hierbei ist y_0 als Peakhöhe, x_0 als Retentionszeit und σ^2 als Varianz gegeben.

Die Peakbreite zwischen den beiden Wendepunkten beträgt 2σ und für die Wendepunkte findet man $y=e^{-1/2} \approx 0.607$, was demnach 60.7% der Peakhöhe entspricht. Die Peakbreite in halber Höhe w_h (engl. **Full width at half maximum (FWHM)**) wird mit folgender Gleichung definiert:

$$w_h = 2\sigma\sqrt{2 \ln 2} \approx 2.345\sigma \quad (3.2)$$

w_h ist die Peakbreite bei 50% der Peakhöhe. Üblicherweise wird sie mithilfe der Abkürzung FWHM angegeben.

Wie in *Abbildung 3.1* eingezeichnet, kann man aus den beiden Schnittpunkten der Wendetangenten mit der x-Achse die Basisbreite des Peaks w_b ermitteln. Sie ist definiert mit:

$$w_b = 4\sigma \quad (3.3)$$

4. Asymmetrische Peaks

In der Praxis findet man häufig signifikante Abweichungen der Peakform vom optimalen «Gauss-Peak». Eine ideale Peakform kann nur dann beobachtet werden, wenn das Nernst-Gesetz exakt gilt und sich das Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase während der Trennung einstellen kann.

Erscheint ein Peak an der rechten, abfallenden Flanke im Vergleich zur linken verbreitert, hat man es mit Tailing zu tun. Erscheint ein Peak an der linken, ansteigenden Flanke verbreitert, spricht man von Fronting (oder Leading).

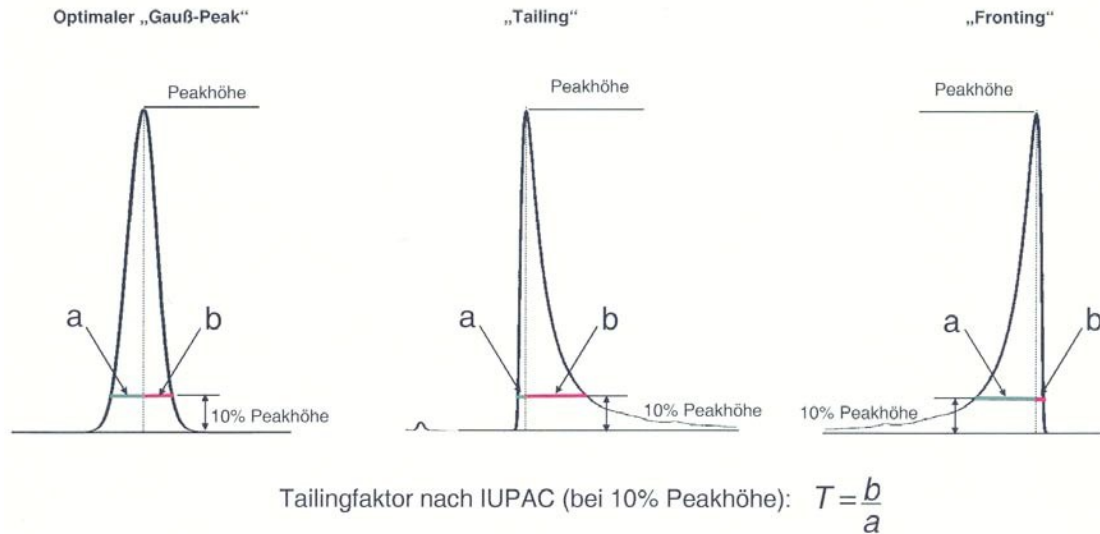


Abbildung 4.1 Schematischer Vergleich eines optimalen «Gauss-Peak» mit asymmetrischen Peaks.

Asymmetrien können eine Vielzahl von Gründen haben, die von Abweichungen vom Nernst-Gesetz über Nicht-Gleichgewichts-Bedingungen bis hin zu instrumentellen Problemen oder Unzulänglichkeiten bei der Probenaufgabe reichen können. Das Auftreten starker Abweichungen von der idealen Peakform ist daher von Fall zu Fall zu untersuchen.

Häufig sind **Überladungseffekte** (hohe Analytkonzentration) mögliche Gründe für unsymmetrische Peaks. Bei einer Überladung der mobilen Phase retinieren die Analyten auf der stationären Phase länger als unter idealen Bedingungen, sodass ein gewisser Anteil erst später eluiert wird. Andererseits kann aber auch eine Überladung der stationären Phase vorliegen, sodass mehr Analytspezies als Adsorptionsstellen auf der stationären Phase vorliegen, was zu einer früheren Elution als bei idealer Retention führt.

5. Effizienz einer chromatographischen Trennung

Im Idealfall kann man davon ausgehen, dass sich während der Trennung das Gleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase mehrmals einstellt (**Verteilungsgesetz nach Nernst**). In der Praxis wird der Gleichgewichtszustand jedoch nie erreicht. Dies führt zu (symmetrischen) Peakverbreitungen. Je mehr das System vom Gleichgewichtszustand abweicht, desto breiter werden die Peaks, und desto geringer wird die Effizienz der Trennung. Die Gründe dafür liegen in der langsamen Kinetik der Gleichgewichtseinstellung.

Verteilungschromatographie & Konzept der theoretischen Böden

Das Konzept der theoretischen Böden lässt sich von der fraktionierenden Destillation ableiten. An jedem Boden einer Destillationskolonne kann eine bestimmte Fraktion abhängig von ihrem Siedepunkt abgetrennt werden. Überträgt man dieses Konzept auf die Chromatographie, so meint man mit Böden die hypothetischen Kompartimente einer Säule, in der sich jeweils einmal das Gleichgewicht einstellt.

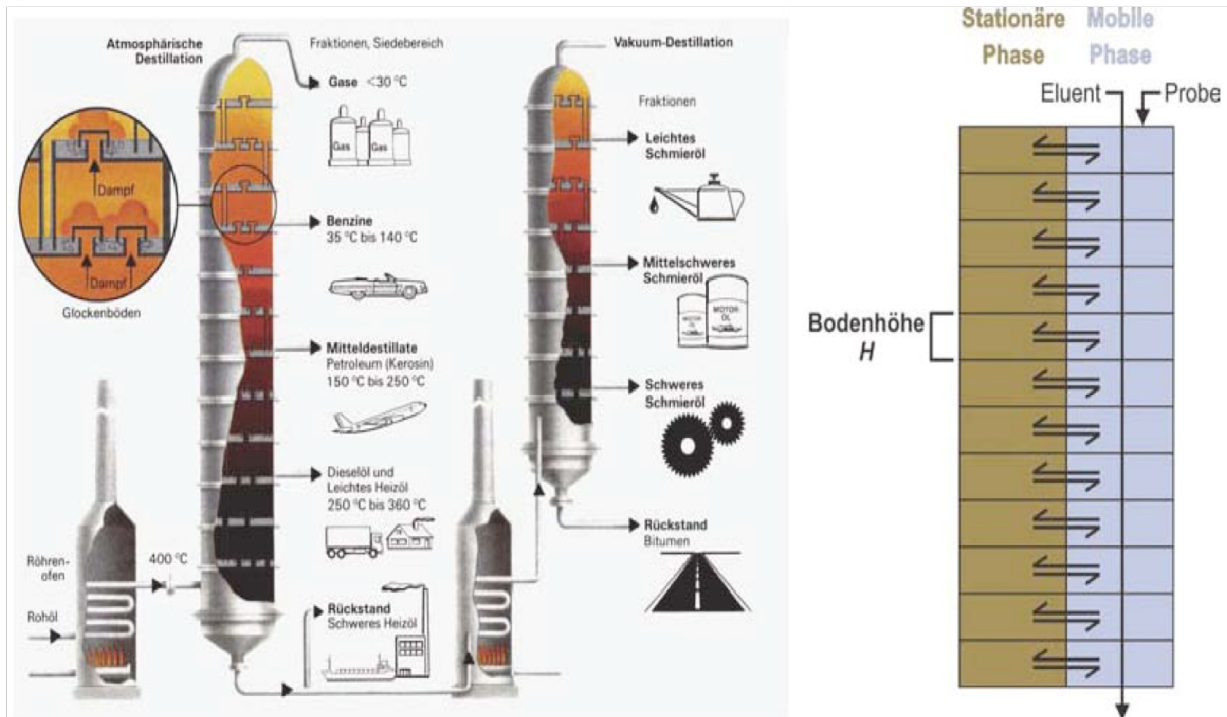


Abbildung 5.1 Links: Fraktionierende Destillation mit Trennböden für die einzelnen Fraktionen. Rechts: Konzept der theoretischen Böden in der Chromatographie.

Nach der **Theorie der Verteilungschromatographie** (theoretische Böden), entwickelt von **Martin und Syngé (1952 Nobelpreis für Chemie)**, wird die Säule als Aneinanderreihung schmaler, diskreter Lagen, d.h. Böden, aufgefasst. Auf jedem dieser Böden stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den Analyten in der stationären und mobilen Phase ein. Die Anzahl der theoretischen Böden einer und die Bodenhöhe werden bis heute noch als wichtige Parameter zur Beschreibung der Effizienz einer chromatographischen Säule herangezogen.

Die **Anzahl der theoretischen Böden N** ist definiert mit:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \approx 5.54 \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 \quad (5.1)$$

Die **Anzahl der theoretischen Böden N** lässt sich mithilfe der **Retentionszeit t_R** und der Peakbreite berechnen. Je breiter ein Peak, desto kleiner ist die Anzahl theoretischer Böden, was für eine weniger effiziente Trennung spricht. Die Anzahl theoretischer Böden ist für jeden Analyten verschieden und muss individuell ermittelt werden. (Warum?)

Die **Bodenhöhe H** wird mithilfe der folgenden Gleichung ausgedrückt:

$$H = \frac{L}{N} \quad (5.2)$$

Die **Bodenhöhe H** lässt sich aus dem Verhältnis von **Säulenlänge L** und der **Anzahl der theoretischen Böden** bestimmen. Die Grösse, Bodenhöhe H, ist nützlich, wenn verschiedene Säulen bezüglich ihrer Trennungseffizienz miteinander verglichen werden sollen. Vergleicht man also zwei Säulen miteinander (Säulenlänge L sei konstant), so hat beispielsweise diejenige Säule, die eine höhere Anzahl theoretischer Böden aufweist, eine geringere Bodenhöhe, was für eine effizientere Trennung spricht.

6. Dynamische Theorie

Die Dynamische Theorie der Chromatographie lässt sich mithilfe der sogenannten **Van-Deemter-Gleichung** beschreiben:

$$H(u) = A + \frac{B}{u} + C u \quad (6.1)$$

Die **Van-Deemter-Gleichung** ist ein Ausdruck für die Bodenhöhe in Abhängigkeit der **Lineargeschwindigkeit u** . **Term A** beschreibt die **Eddy-Diffusion** in der gepackten Säule, **Term B** bezieht die **Longitudinaldiffusion** mit ein und **Term C** berücksichtigt **Massentransport-Effekte**. Die mithilfe dieser Terme beschriebenen Effekte führen zu einer Verbreiterung des Elutionspeaks. *Abbildung 6.1* zeigt den Kurvenverlauf sowohl für die Funktion $H(u)$ (Gleichung 6.1) in Abhängigkeit aller drei Terme A, B und C, als auch für die Funktion $H(u)$ in Abhängigkeit der einzelnen Terme A, B oder C.

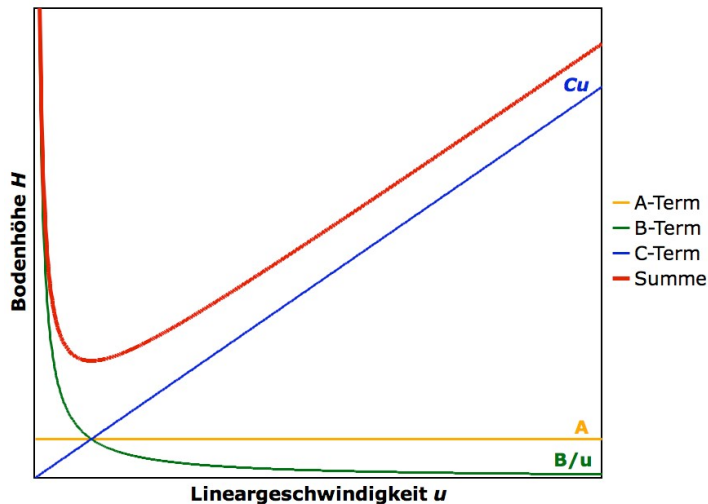


Abbildung 6.1 Kurvenverlauf der Van-Deemter-Gleichung in Abhängigkeit der Lineargeschwindigkeit u (rote Kurve). Der Beitrag durch den A Term ist unabhängig von der Lineargeschwindigkeit u , wohingegen sich der Beitrag des B Terms antiproportional und der Beitrag des C Terms proportional zur Lineargeschwindigkeit verhält. Das Minimum von $H(u)$ entspricht derjenigen Lineargeschwindigkeit u , für die die kleinste Bodenhöhe H erreicht wird, was für die höchste Trennungseffizienz spricht.

A-Term: Eddy-Diffusion

Der Beitrag des A Terms zur Bodenhöhe ist unabhängig von der Lineargeschwindigkeit und daher konstant. «Eddy», englisch für Wirbelströmung, soll beschreiben, dass das Packungsmaterial der Säule von Eluent und Analyt umströmt werden muss. (Die Bewegung von Eluent und Analyt ist keineswegs geradlinig entlang der Säulenachse!) Dabei treten Wirbelströmungen auf und die Weglängen, die innerhalb der Säule von den Analyten zurückgelegt werden, werden unterschiedlich lang. Dies führt einer Peakverbreiterung.

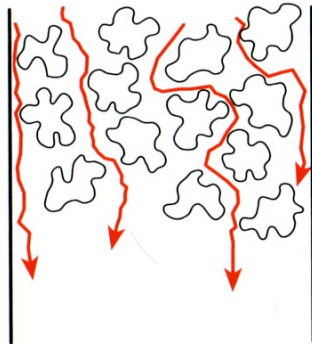


Abbildung 6.2 Schematische Darstellung der Eddy-Diffusion. Die roten Pfeile stellen die Trajektorien einzelner Analytspezies dar. Das Packungsmaterial der Säule muss von der Probelösung umströmt werden. Wie könnte man die Eddy-Diffusion verringern?

B-Term: Longitudinaldiffusion

Die mobile Phase bewegt sich mit der Lineargeschwindigkeit u durch die Säule. Hierbei diffundieren die Analytspezies innerhalb der mobilen Phase zufällig in alle Raumrichtungen. (Warum?) In diesem Fall spricht man von Longitudinaldiffusion, da lediglich die Diffusion entlang der Säulenachse einen Einfluss auf die Elutionzeit hat. Diffusion in Richtung und entgegen der Strömungsrichtung führt zu einer Peakverbreiterung.

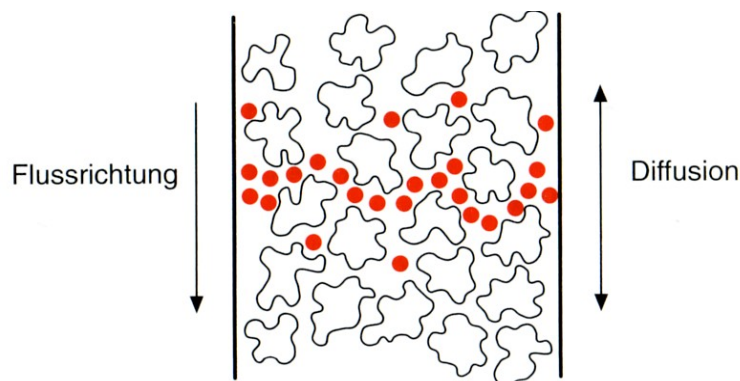


Abbildung 6.3 Schematische Darstellung der Longitudinaldiffusion innerhalb der Säule. Die roten Punkte stellen die Analytspezies dar, die sich aufgrund der Longitudinaldiffusion nicht exakt mit derselben Lineargeschwindigkeit durch die Säule bewegen.

Der Beitrag des B-Terms zur Trennleistung ist umgekehrt proportional zur Lineargeschwindigkeit u und ist demnach umso grösser, je länger sich die Analytspezies in der Säule aufhalten. Dementsprechend führen hohe Lineargeschwindigkeiten zu geringeren, und tiefe Lineargeschwindigkeiten zu grösseren Diffusionseffekten. In der Praxis wählt man also eine nicht zu hohe, aber auch nicht zu tiefe Lineargeschwindigkeit u , um eine möglichst effiziente Trennleistung zu erzielen.

Ein Mass für die Diffusionsgeschwindigkeit einer Analytspezies ist ihr Diffusionskoeffizient D_M in einem bestimmten Medium in der mobilen Phase. Er ist direkt proportional zum B-Term. Je grösser der Diffusionskoeffizient D_M , desto schneller ist die Diffusion, und desto grösser ist der Einfluss der Longitudinaldiffusion auf die Trennleistung.

C-Term: Massentransport-Effekte

In diesem Term werden weitere kinetische Phänomene wie Massentransportraten zwischen Phasen, Adsorptionsraten oder Reaktionsraten berücksichtigt. Hierbei wird ein Massentransport-Widerstand angenommen, der diejenige Geschwindigkeit bestimmt, mit der sich die Analytspezies zwischen mobiler und stationärer Phase hin- und her bewegen, und mit der sie wechselwirken. Man findet eine Proportionalität zur Lineargeschwindigkeit u . Je kleiner also die Lineargeschwindigkeit u , desto länger ist die Aufenthaltsdauer der Analytspezies, und desto geringer sind die Massentransport-Effekte. Wie bereits oben erwähnt, wird in der Praxis aber eine nicht zu hohe, aber auch nicht zu tiefe Lineargeschwindigkeit u gewählt, um eine möglichst effiziente Trennleistung zu erzielen.

7. Literatur

- [1] R. M. Smith; Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, 1988
- [2] G. Guiochon, C. L. Guillemin; Quantitative gas chromatography, Journal of chromatography library Vol 42, Elsevier, Amsterdam, 1988
- [3] G. Schomburg; Gaschromatographie, Verlag Chemie, Weinheim, 1987.
- [4] R.L. Grob; Modern Practice of Gas Chromatography, Wiley-Interscience, New York, 1977
- [5] B. Baars, H. Schaller; Fehlersuche in der Gaschromatographie, VCH, Weinheim (D), 1994
- [6] E. Leibnitz, H.G. Struppe; Handbuch der Gaschromatographie, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig (D), 1984
- [7] K. Grob, Jr., G. Grob, K. Grob, J. of Chromatography, 156 (1978) 1-20
- [8] Skript Analytische Chemie für Biol. / Pharm. Wiss., Dr. Thomas Schmid, ETH Zürich, 2009.
- [9] J.J. van Deemter, Chemical Engineering Science, 1956, Vol 6, pp 271-289