



HN

Prof. Dr. Harald Weber  
Dipl. Ing'in Marion Tegelkamp  
FB 01 Chemie  
Instrumentelle Analytik

## Praktikum Einführung in die Instrumentellen Analytik I

# Hochleistungs-Flüssigchromatographie HPLC

### Themen des HPLC- Praktikums:

#### I. Theoretische Grundlagen

1. Einführung in die HPLC

#### II. Praktischer Teil

1. Optimierung einer chromatographischen Trennung durch
  - a) Veränderung der mobilen Phase und
  - b) der Wellenlängeneinstellung bei der UV-Detektion
2. Qualitative Analyse: Identifizierung von Komponenten eines Testgemisches
3. Quantitative Analyse: Bestimmung des Konzentrationsgehalt von Komponenten im Testgemisch

### 1. Theoretische Grundlagen

**HPLC** = hochauflösende **Flüssigkeitschromatographie**  
= high performance liquid chromatography

Die **HPLC** ist eine **flüssigchromatographische** Methode zur Analyse **löslicher fester** und **flüssiger** Substanzgemische.

- Mit ihrer Hilfe können u.a. komplexe Probengemische in ihre einzelnen Komponenten **aufgetrennt, identifiziert** (Retentionszeit) **quantifiziert** (Detektor/Standards) werden.

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (kurz: HPLC) ist ein chromatographisches Verfahren, das sich in den 60er Jahren aus der Säulenchromatographie entwickelt hat. Bei der HPLC findet die chromatographische Trennung in einer Säule zwischen einer stationären und einer mobilen Phase statt. Die stationäre Phase, bildet räumlich fixiert das chromatographische Bett, welches in einem „Rohr“ eingeschlossen ist und die Trennsäule darstellt. Das chromatographische Bett, also die Säulenfüllung besteht häufig aus einem inerten, meist hochporösen Trägermaterial, auf dessen Oberfläche die eigentliche stationäre Phase trägt.

Die mobile Phase ist ein Lösungsmittel bzw. -gemisch, welches mit hohem Druck durch die Säule gepreßt wird und somit die zu analysierende Probe, die am Säulenanfang aufgegeben wird, durch die Säule transportiert.

Wichtige Voraussetzung ist dabei, dass die zu analysierenden Substanzgemische in dem jeweiligen LM oder LM-Gemisch (mobile Phase) löslich sind.

Haupteinsatzgebiet der HPLC ist die Untersuchung von:

- Substanzen die **schwerflüchtig oder nicht flüchtig** sind ( bei flüchtigen Substanzen GC)
- **Stark polare** oder **ionische** Substanzen
- Substanzen mit **hohem Molekulargewicht** MW>500
- **Thermisch instabile** und **leicht zersetzliche** Substanzen

Die HPLC ist in der analytischen, sowie der klinischen Chemie als auch in der Biochemie unverzichtbar.



## **Hochleistungs-Flüssigchromatographie HPLC**

### **1.1 Anwendungsgebiet der HPLC:**

Die HPLC hat sich zu einer universell anwendbaren Methode entwickelt.

Gründe dafür sind

- ihre Empfindlichkeit
- ihre einfache Eignung für **genaue quantitative Bestimmungen**
- ihre Eignung zur Trennung von **nichtflüchtigen oder thermisch instabilen Verbindungen**
- ihre weitverbreitete Anwendbarkeit auf Substanzen, die von vorrangigem Interesse für die Industrie usw. sind (Arzneimittel, Proteine, Kohlenwasserstoffe...)

### **1.2 allg. Definition der Chromatographie:**

Chromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem die Stofftrennung bewirkt wird durch die **unterschiedliche Verteilung eines Stoffes** bzw. Substanzgemisches **zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Hilfsphasen** von denen sich die eine bewegt = **mobile Phase** und die andere ruht = **stationäre Phase**

Stoffe, die sich bevorzugt in der mobilen Phase aufhalten, wandern schneller durch die Säule als Stoffe, die sich bevorzugt auf der stationären Phase aufhalten. (Nernst'sches Verteilungsgesetz!)

Die zu trennenden Stoffe wandern also unterschiedlich schnell durch die Säule!

bei vollständiger Trennung ist jede Substanz beim Verlassen der Säule einzeln im Eluenten gelöst und könnte im Prinzip als Reinstoff isoliert werden.

### **1.3 chromatographische Trennverfahren in der HPLC:**

Entsprechend der Art der Wechselwirkungen, die die Probenmoleküle mit der stationären Phase eingehen können, unterscheidet man verschiedene Varianten der HPLC:

**Adsorptions-Chromatographie,**  
**Reversed-Phase-Chromatographie**

Je nach chemischer Natur der zu trennenden Komponenten wird man die jeweils am ehesten zu treffende Wechselwirkungsart und die dafür am besten geeignete stationäre Phase und mobile Phase (Eluent) auswählen.

#### *Adsorptionschromatographie*

##### a) Normalphasensystem NP

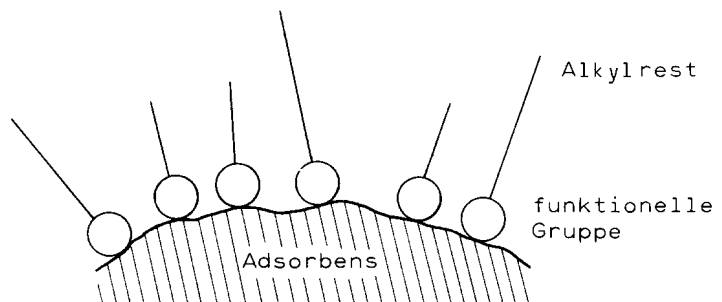
Als *stationäre Phase* dient ein festes relativ polares Adsorptionsmittel. Am gebräuchlichsten sind Silikagel (Kieselgel  $\text{SiO}_2$ ) oder Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

Die *mobile Phase* (Eluent) ist relativ unpolar. *Substanz*: kleine polare, aber nicht ionische Substanzen

Die Trennung erfolgt durch die unterschiedliche Adsorption der verschiedenen Probemoleküle an der Oberfläche der stationären Phase, dem Adsorbens.

Auf der Oberfläche sind beim Silikagel die Silanolgruppen gleichmäßig verteilt. Befindet sich ein Molekül in der Nähe, kann eine Art schwache "Bindung" eingegangen werden. Das "Knüpfen" dieser schwachen "Bindung" nennt man Adsorption, das Auflösen derselben Desorption. Das Lösungsmittel besetzt die aktiven Stellen der stationären Phase mehr oder weniger stark. Das Probemolekül kann also nur adsorbiert werden, wenn seine Wechselwirkung mit den aktiven Stellen stärker ist als die des Lösungsmittels. Die funktionelle Gruppe des Probemoleküls ordnet sich an der Adsorbensoberfläche an, wobei der Alkylrest vom Adsorbens abgewandt ist.

Abbildung : Anlagerung eines Probemoleküls an das Adsorbens





## **Hochleistungs-Flüssigchromatographie HPLC**

### *Reversed-Phase-Chromatographie:*

Die HPLC an chemisch gebundenen Umkehrphasen (reversed-phase-liquid chromatographie RPLC) stellt eine der am häufigsten gebrauchten HPLC-Techniken da.

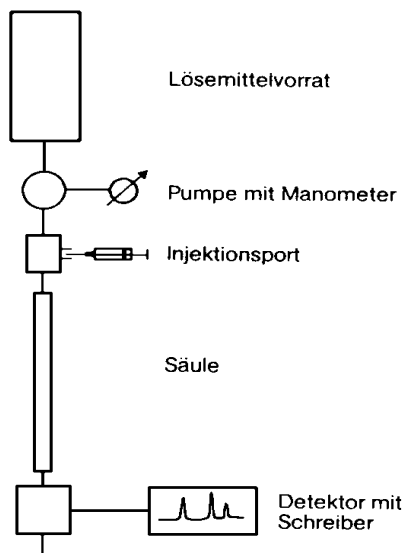
Bei der Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) ist die stationäre Phase **unpolar** und die mobile Phase relativ **polar**. Als stationäre Phase werden in der Regel poröse Kieselgele eingesetzt, an deren Oberfläche Alkylgruppen mit unterschiedlichen Kettenlängen chemisch gebunden sind. Die am häufigsten eingesetzten Umkehrphasen sind Trägermaterialien mit n-Octyl- RP8-, C<sub>8</sub>-Typen) oder n-Octadecylgruppen (RP18-, C<sub>18</sub>-Typen).

Als mobile Phase werden Wasser/Methanol-, Acetonitril/Wasser- oder Wasser/Dioxan-Gemische eingesetzt. Bei der RPC wird die Probesubstanz um so stärker an der Oberfläche festgehalten, je unpolarer sie ist.

### **1.4 Aufbau HPLC**

Zur Grundausstattung einer HPLC-Apparatur gehören:

Eluentsvorrat (evtl. mehrere)  
Hochdruckförderpumpe  
Probeneinlaßsystem (Injektor)  
Trennsäule  
Detektor  
Signalverarbeitung (Schreiber, Integrator)



### Eluent / Lösungsmittel (mobile Phase):

Das Lösungsmittel bzw. der Eluent muß in der HPLC mehrere Bedingungen erfüllen:

- Die Probe muß im Eluent löslich sein und darf keine chemischen Reaktionen mit dem Eluent eingehen
- Die stationäre Phase muß vom Eluent benetzt werden
- Das Eluens sollte in Wechselwirkung mit der geeigneten stationären Phase, das Gemisch möglichst schnell trennen.
- Es sollte sich ein Verteilungsgleichgewicht der gelösten Proben zwischen den beiden Phasen einstellen
- Das Eluens sollte mit der Detektorfunktion verträglich sein.  
Für den UV-Detektor darf es bei der Meßwellenlänge keine nennenswerte Eigenabsorption besitzen.
- Das Eluens muß völlig frei von Schwebstoffen (Verstopfung von Fritten und unregelmäßiger Fluß) und Gasblasen sein (Bläschenbildungen! Störungen im Detektor; Entgasen mit Helium)



## Hochleistungs-Flüssigchromatographie HPLC

### Hochdruckpumpen:

Die Pumpen erzeugen einen hohen Druck, damit die mobile Phase mit einer annehmbaren Geschwindigkeit (Flußrate) durch die Säule, die durch die feinkörnige Säulenfüllung einen hohen Strömungswiderstand entgegengesetzt, fließen kann.

Der Arbeitsdruck hängt von den Meßbedingungen ab. Das obere Drucklimit der Pumpen liegt meist zwischen 400 und 600 bar.

### Pumpentypen:

Die üblichen Pumpentypen in den neueren HPLC-Maschinen sind Kurzhub-Kolben- und Membranpumpen. Die Kurzhub-Kolbenpumpen fördern weitgehend gleichmäßig und intervallfrei. Bei den Membranpumpen ist eine Durchflußregelung zur gleichmäßigen Förderleistung notwendig.

### Probenaufgabesysteme:

Probenaufgabesysteme bzw. Injektoren haben die Funktion der reproduzierbaren Aufgabe eines definierten und wählbaren Volumens des zu trennenden Substanzgemisches, als schmales Profil oder punktförmig, auf die Säule. Bei der Einspritzung ist es wichtig, daß keine Luft in die Säule gelangt und die Einspritzung sollte schnell und gleichmäßig erfolgen.

Als Injektionsventil wird meist ein *Sechswegventil* (Sixportventil) verwendet, das manuell oder automatisch betätigt werden kann. Das Dosiervolumen wird hierbei durch das Volumen (1-250µl) der Probeschleife bestimmt.

In der Stellung „füllen“ fließt das Eluens direkt zur Säule. In den Anschluß „ein“ wird die Probe mittels einer Spritze durch die Probeschleife gedrückt, bis der Überschuß bei „aus“ wieder austritt. Durch das Umschalten des Ventils in „injizieren“-Position wird die Probeschleife in den Eluentenstrom geschaltet und die Probe wird auf die Säule gespült.

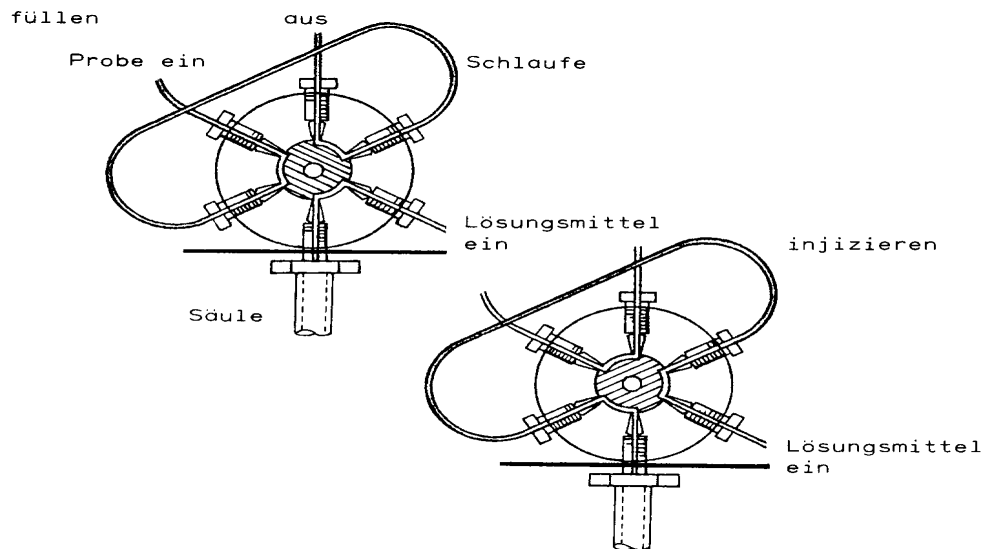


Abbildung :  
Dosierschleife  
„Sixportventil“

### Säulen (stationäre Phase):

Die Trennsäule bildet das Kernstück der HPLC, da in ihr der Trennprozeß abläuft.

Die meisten HPLC-Säulen werden aus Edelstahl hergestellt. Eine analytische HPLC-Säule wird unter hohem Druck mit dem meist hochporösen (einige 100 m<sup>2</sup>/g) Füllmaterial gepackt. Die Teilchen sind entweder gebrochen oder kugelförmig.

Die chemische Natur des Füllmaterials richtet sich nach der Art der zu betreibenden Chromatographie.

Die Säulen sind bei dem üblichen Druck in der HPLC beständig und besitzen eine ausreichende mechanische und chemische Stabilität. Die Korngrößenverteilung, vom kleinsten zum größten Korn, sollte möglichst eng sein und nicht größer als 2, besser 1,5 sein. Je kleiner die Teilchen sind, desto größer ist der benötigte Arbeitsdruck.

<i>Länge:</i>	von 250 mm bis 300 mm.
<i>innerer Säulendurchmesser:</i>	Säulen 4 mm und 4,6 mm.
<i>Korngröße der Teilchen:</i>	3 µm, 5 µm, 7 µm oder 10 µm



## Hochleistungs-Flüssigchromatographie HPLC

### Detektoren:

Die getrennten Komponenten des Probengemisches verlassen nacheinander die Trennsäule und werden dabei vom Detektor aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften erfasst und werden in Form eines elektrischen Signals an ein Datenerfassungs- und Auswertesystem (Schreiber oder Integrator) übertragen.

Der Detektor sollte alle Substanzen möglichst mit gleicher Empfindlichkeit registrieren, gegen Temperaturänderungen weitgehend unempfindlich sein, robust sein und kleine Substanzmengen noch erfassen können.

Der am häufigsten verwendete Detektor in der HPLC ist der UV-Detektor, der die Lichtabsorption im UV-Bereich (200-400nm) bei einer wählbaren Wellenlänge mißt.

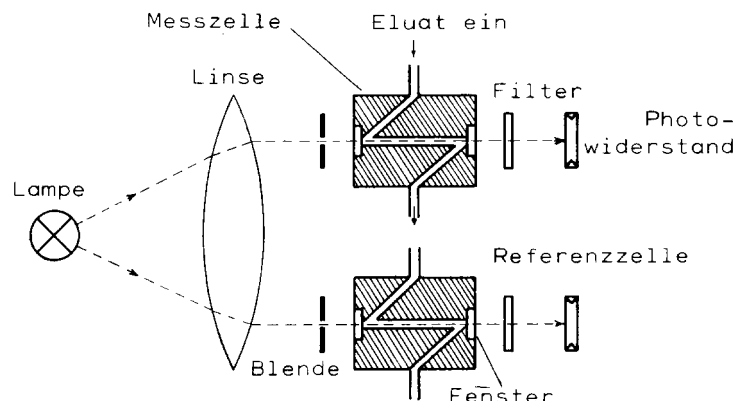


Abbildung: Beispiel für die Funktionsweise eines UV-Detektors

### 1.5 Arbeitsweisen in der HPLC

In der HPLC unterscheidet man zwei Arten von Arbeitsweisen:

- Isokratisch
- Programmierbare Gradientenelution (Gradientensysteme)

Erfolgt die Elution nur mit einem Lösungsmittel konstanter Zusammensetzung, so spricht man von einer isokratischen Elution. Dies bedeutet, daß das Probengemisch mit konstanter Fließmittelstärke eluiert wird. Komplexe Probengemische (in etwa mehr als 20 Komponenten) mit einem sehr weiten Elutionsbereich, stellen zum Trennen meist ein Problem dar.

Arbeitet man unter isokratischen Bedingungen, kann der Fall eintreten, daß Komponenten mit geringer Affinität zur stationären Phase schnell und in scharfen Peaks eluieren und solche mit hoher Affinität sehr lange auf der Säule bleiben und sich dabei stark verbreitern und im Rauschen des Detektors untergehen können.

Die Trennleistung wird durch Anwendung einer Gradientenelution erheblich verbessert.

Die Volumenverhältnisse in der Zusammensetzung der **mobilen Phase werden dabei schrittweise oder kontinuierlich verändert**, während die Substanzen durch die Säule wandern.

Die Änderung muß in einer Weise geschehen, das die **Elutionskraft** der mobilen Phase **zunimmt**.

Der Lösemittelgradient muß also so gewählt werden, daß die mobile Phase zu Anfang nur gerade so stark ist, daß sie die schnellsten Peaks eluieren kann und sich Laufe der Messung in ihrer Zusammensetzung derart geändert haben, daß sie auch die verzögert erscheinenden Komponenten gut eluiert und somit detektierbar macht

Von der Ausführung her unterscheidet man **Nieder- und Hochdruckgradientensysteme**, je nachdem, ob die verschiedenen LM vor oder hinter der Hochdruckpumpe gemischt werden



HN

Prof. Dr. Harald Weber  
Dipl. Ing'in Marion Tegelkamp  
FB 01 Chemie  
Instrumentelle Analytik

## Praktikum Einführung in die Instrumentellen Analytik I

# Hochleistungs-Flüssigchromatographie HPLC

## 2. Praktischer Teil

### Versuchsaufbau:

#### 1. Isokratische HPLC-Anlage:

- |                    |   |
|--------------------|---|
| a) Pumpe           | Series 10 Liquid Chromatograph PERKIN ELMER, Kurzhubkolbenpumpe     |
| b) Einspritzventil | Rheodyne 7125, 6-Wege-Ventil  |
| c) UV-VIS-Detektor | SHIMADZU, SPD-10 AV, Deuteriumlampe, Wellenlängenbereich 190-370 nm |
| d) Schreiber       | HP (3396 Series 2)  |

- 2. Trennsäule (stationäre Phase)** Merck, LiChrosorb Si 60 ( 10  $\mu\text{m}$  ) / 250-4•
- |                  |  |
|------------------|--|
| LiChrosorb       | = Warenzeichen für unregelmäßige Teilchen/ Firma Merck |
| Si               | = Kieselgel  |
| 60               | = Durchschnittliches Porendurchmesser in Å             |
| 10 $\mu\text{m}$ | = Korngröße der Teilchen                               |
| 250 mm           | = Länge der Säule                                      |
| 4 mm             | = ID der Säule   |

#### 3. Elutionsmittel (mobile Phase)

- Isooctan
- 1,4-Dioxan

- 4. Probelösung** Gemisch aus:
- |                    |
|--------------------|
| Toluol             |
| Azobenzol          |
| Nitrobenzol        |
| 2,6-Dimethylphenol |
- gelöst in Isooctan

### Aufgaben:

#### 1. Optimierung einer chromatographischen Trennung

- 1.1 Problemstellung: Die Probelösung soll durch veränderte Variationen in der Zusammensetzung der mobilen Phase optimal getrennt werden!

Durchführung:

Je 1  $\mu\text{L}$  der Probelösung wird über den Probeninjektor auf die Trennsäule gebracht und jeweils bei verschiedenen prozentualen Zusammensetzungen des Eluenten vermessen bis eine optimale Trennung der Einzelkomponenten erreicht ist.

Analysenbedingungen:

Injektionsvolumen: 1  $\mu\text{l}$   
Elutionsmittel: Isooctan/Dioxan-Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung  
Flußrate: 2ml/min  
Detektor: Wellenlängeneinstellung  $\lambda=270\text{nm}$   
Papiervorschub: 5mm/min

- 1.2 Problemstellung: Einfluß der gewählten Wellenlänge auf die Nachweisempfindlichkeit

Durchführung:

Das Testgemisch wird unter den zuvor unter Punkt 1.1 optimierten Analysenbedingungen chromatographiert nur die Wellenlänge am Detektor wird von 270nm auf 290nm geändert.



HN

Prof. Dr. Harald Weber  
Dipl. Ing'in Marion Tegelkamp  
FB 01 Chemie  
Instrumentelle Analytik

## Praktikum Einführung in die Instrumentellen Analytik I

# Hochleistungs-Flüssigchromatographie HPLC

## 2. Qualitative Analyse des Testgemisches

2.1. Problemstellung: Die optimal getrennten Einzelkomponenten der Probelsg. sollen identifiziert werden!

Durchführung:

- a) Identifizierung der Komponenten über die Retentionszeit
  - Zur Ermittlung der Totzeit ( $t_0$ ) wird 1  $\mu$ l Tetrachlorethylen auf die Säule injiziert und durch Messen mit dem Lineal ermittelt
  - 1  $\mu$ l der Probelösung wird auf die Säule injiziert und nach erfolgter Trennung die Bruttoretentionszeiten ( $t_R$ ) der Einzelkomponenten durch Messen mit dem Lineal ermittelt. Die jeweiligen Nettoretentionszeiten ( $t_{R'}$ ) werden nach folgender Formel berechnet:  
$$t_{R'} = t_R - t_0$$
  - 1  $\mu$ l der Einzelkomponenten wird auf die Säule gegeben und die sich ergebenden Nettoretentionszeiten mit den Nettoretentionszeiten der Probelösung verglichen.
- b) Bestimmung der Komponenten über Standardaddition  
Die Probelösung wird mit der zu bestimmende Komponente aufgestockt und durch das nun deutlich verstärkte Signal im Chromatogramm identifiziert.

## 3. Quantitative Analyse von Toluol

3.1. Problemstellung: In der Probelsg soll die Konzentration von Toluol ermittelt werden!  
Aufnahme der Kalibrationskurve über externen Standard!

Analysenbedingungen:

Injektionsvolumen: 1  $\mu$ L

Elutionsmittel: Isooctan/Dioxan

Flußrate: 1 mL/min (bis Toluol-Peak erscheint, dann 3 mL/min)

Detektor: Wellenlängeneinstellung  $\lambda=270$ nm

Papiervorschub: 30 mm/min

Durchführung:

Je 1  $\mu$ l der Toluol-Lösung wird auf die Säule injiziert. Aus den erhaltenen Chromatogrammen werden jeweils die Peakflächen von Toluol von Hand bestimmt (Fadenzähler!)

Die einfachste Flächenbestimmung erfolgt über das Produkt:

$$\text{Fläche} = \text{Peakhöhe} * \text{Halbwertsbreite}; \quad F = h * 0,5b$$

Erstellung der Kalibrationskurve

Es werden 3 verschiedene Konzentrationen von Toluol-Lösungen (0,5%; 2%; 10%) angesetzt und jeweils 3 mal vermessen.

Die Peakflächen werden wieder von Hand gemessen und ermittelt.

Die ermittelten Peakflächen (Mittelwerte) werden auf Millimeterpapier in ein Koordinatensystem eingetragen (Peakfläche gegen Konzentration) und eine Kalibrationskurve erstellt.

Anschließend wird die zuvor ermittelte Peakfläche der Toluollösung eingetragen. Der sich ergebene Konzentrationswert stellt die gesuchte Konzentration von Toluol in der Probelösung da.