



Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Laboratorium für organische Chemie

Praktikum physikalische und analytische Chemie
Frühjahr 2016

Grundlagen der Chromatographie

1. Grundlagen

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.

Damit eine Technik eine Chromatographie ist, müssen folgende Punkte vorhanden bzw. erfüllt sein:

- 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

Der letzte Punkt sollte nicht zu eng gesehen werden. Hier ist gemeint, dass das System die Möglichkeit haben muss, das Verteilungsgleichgewicht mehrmals wiederholt einzustellen. Es kann dabei aber durchaus sein, dass aufgrund der Kinetik der eigentliche Gleichgewichtszustand mit dem realen Wert der Gleichgewichtskonstante nach Nernst gar nicht erreicht wird. Vielmehr ist wichtig, dass die Triebkraft der Trennung die Tendenz zur Gleichgewichtseinstellung ist.

Abbildung 1.1 gibt rechts Momentaufnahmen einer Säule während der Trennung der Komponenten A und B wieder. Die beiden werden in Form der Probenlösung (violett) als Gemisch auf die Säule gegeben. Im Anschluss wird mit reinem Lösungsmittel (**Eluent**) nachgespült. Am unteren Ende der Säule befindet sich ein Detektor, der bei jeder Substanz ein Signal erzeugt, welches von der Konzentration der Substanz abhängt. 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 gleich schnell 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. In der weiteren Folge trennen sich die beiden Komponenten A (türkis) und B (rot) aufgrund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten und daher unterschiedlicher Retention immer mehr auf. Dabei ist die Wechselwirkung von A mit der stationären Phase schwächer als die von B, weshalb A früher die Säule verlässt. Man sagt auch: A wird früher **eluiert**.

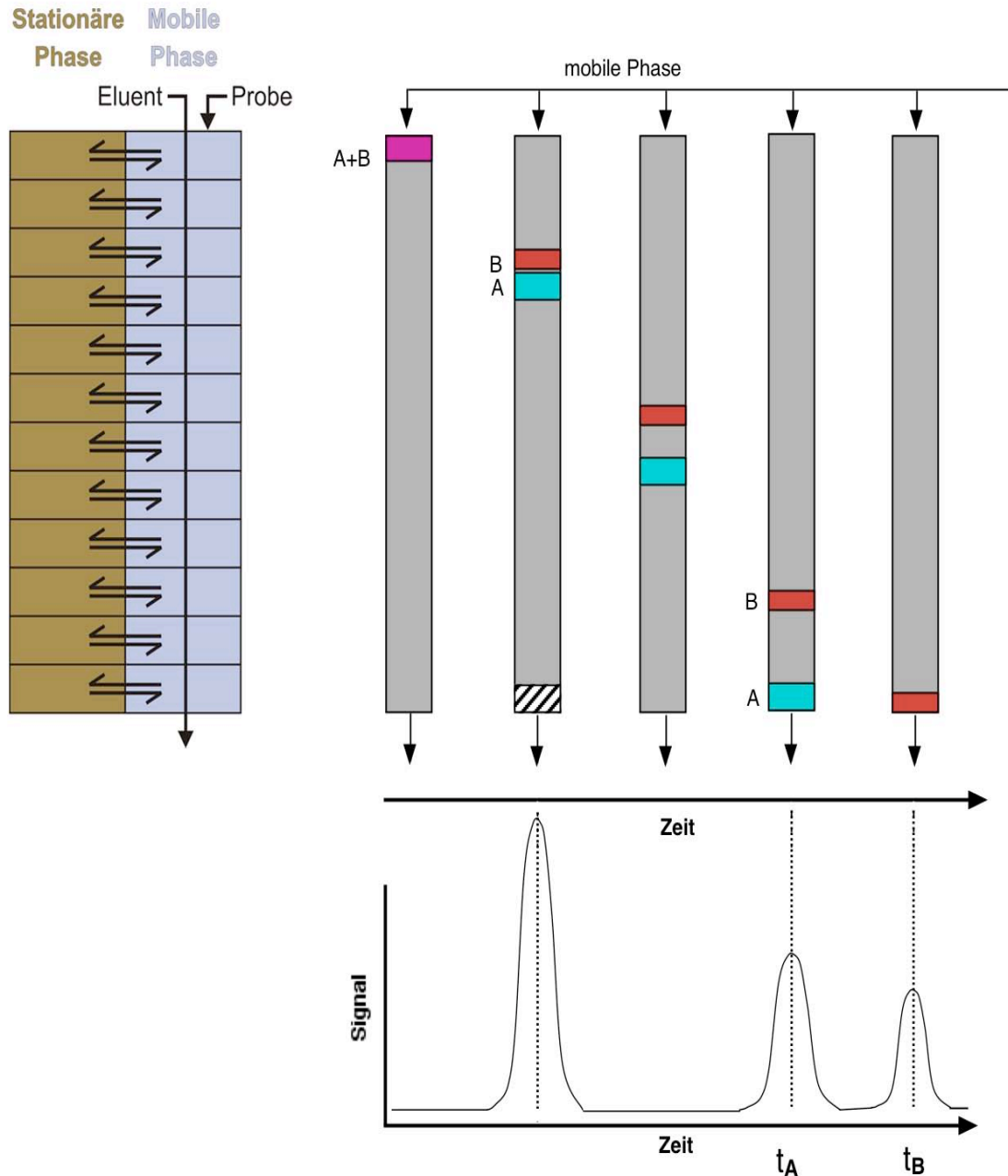


Abbildung 1.1 zeigt links oben die prinzipielle Vorstellung der wiederholten Gleichgewichtseinstellungen zwischen stationärer und mobiler Phase während die Probenmoleküle (Analyten) mit der mobilen Phase (Eluent) durch die Säule transportiert werden. In Wirklichkeit existieren die einzelnen Kompartimente nicht. 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.

Rechts unten zeigt Abbildung 1.1 die Auftragung des Detektorsignals gegen die Zeit. Wenn eine Substanz die Säule verlässt, steigt das Signal an und fällt anschliessend wieder auf das Niveau der Grundlinie ab. Wichtig ist hier, den Gedankensprung von einer räumlichen Trennung auf der Säule zu einer zeitlichen Trennung am Detektor nachzuvollziehen. In den meisten Fällen ist diese Signalauftragung gegen die Zeit das

Ergebnis eines Chromatographie-Experiments. Man nennt diese Auftragung **Chromatogramm**. Die einzelnen „Berge“ im Chromatogramm nennt man **Peaks**. Ihre Form lässt sich im Idealfall mit einer Gauß-Funktion beschreiben, in der Praxis sind aber meistens Abweichungen von dieser Form zu beobachten.

Der Zeitpunkt, zu dem das Maximum eines Peaks auftritt, also die Position eines Peakmaximums auf der x-Achse eines Chromatogramms, nennt man **Retentionszeit**. Sie ist für ein gegebenes chromatographisches System (Säulenmaterial, Eluent, usw.) charakteristisch für eine bestimmte Substanz. Durch Vergleich von Retentionszeiten bei der Trennung einer Probe mit denen von Reinsubstanzen (Referenzsubstanzen) lassen sich daher Moleküle identifizieren. Durch Bestimmung von Retentionszeiten ist also eine **qualitative Analyse** möglich. Die **quantitative** Information steckt in der Signalintensität, also in der Peakhöhe bzw. Peakfläche. Im Prinzip sind beide Größen dazu geeignet, die Konzentration eines Stoffes zu bestimmen.

Das **Verteilungsgesetz nach Nernst** bildet die Grundlage der Chromatographie. Die Trennung beruht auf der Verteilung der Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase. Dies lässt sich durch folgendes Gleichgewicht ausdrücken:



Hier sind A_M und A_S der Analyt in der mobilen bzw. stationären Phase. Von nun an bezeichnen die Indizes M und S generell die mobile bzw. stationäre Phase. Hat sich das Gleichgewicht eingestellt, gilt das Nernst-Verteilungsgesetz und der daraus abgeleitete Verteilungskoeffizient.

• **Der Verteilungskoeffizient K_C :**

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

Für ein gegebenes System aus mobiler und stationärer Phase ist das Konzentrationsverhältnis c_S / c_M bei konstanter Temperatur eine Konstante. Die Verteilungskonstante ist die Gleichgewichtskonstante des in Gleichung (2.5) beschriebenen Gleichgewichts.

• **Das Phasenverhältnis β :**

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

Das Phasenverhältnis ist das Verhältnis der **Volumina von mobiler (V_M) und stationärer Phase (V_S)**. Diese praktische Grösse wird in einigen Fällen zum Vereinfachen von Formeln eingesetzt.

2. Das Chromatogramm und daraus abgeleitete Grössen

Unter einem Chromatogramm versteht man die Auftragung eines Detektorsignals gegen die Trennzeit.

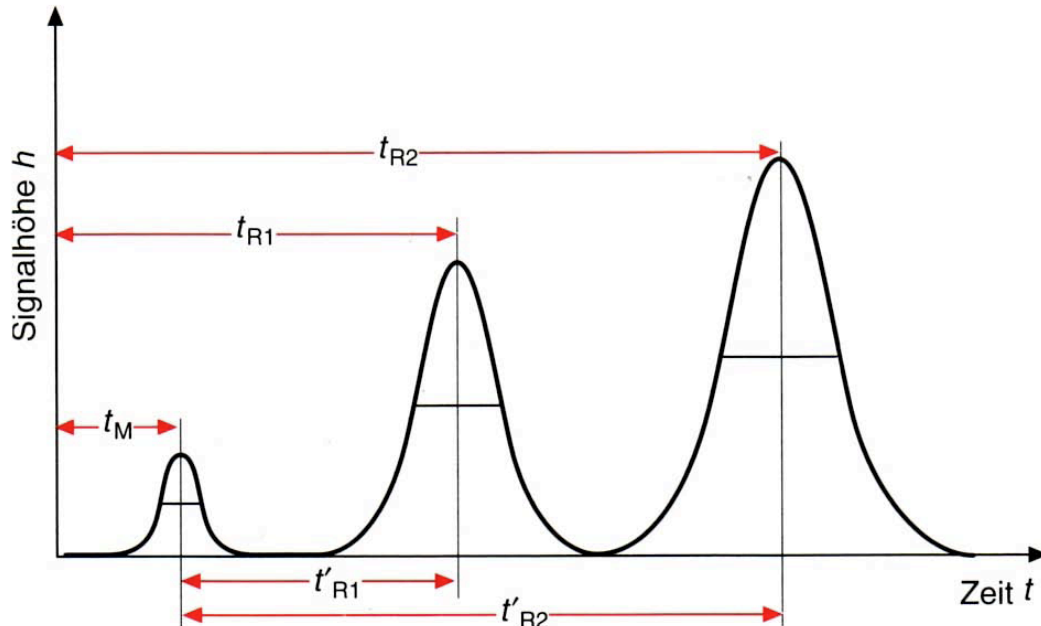


Abb. 2.1: Chromatogramm mit Gauß-förmigen Peaks und einigen wichtigen Grössen, die im Text erklärt werden.

- **Durchflusszeit (oder Totzeit) t_M :**

Unter der Durchflusszeit 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 die Zeit, welche Moleküle im System verbringen, ohne einer Trennung zu unterliegen (z.B. Transport durch die Verbindungskapillaren zwischen Injektionsstelle und Säule oder zwischen Säule und Detektor).

An Stelle der Retentionszeit t_R kann auch das Retentionsvolumen V_R verwendet werden. Dieses ist vom Eluentenfluss F unabhängig.

$$V_R = t_R \cdot F \quad (2.1)$$

- **Lineargeschwindigkeit u :**

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (2.2)$$

Unter der Lineargeschwindigkeit u versteht man die Geschwindigkeit der mobilen Phase durch die Säule. Sie berechnet sich aus der **Säulenlänge L** und der Durchflusszeit t_M .

• **Retentionszeit t_R :**

Die Retentionszeit t_R eines Peaks bzw. einer Substanz ist die Trennzeit, bei der das Maximum eines Peaks erscheint. Sie kann direkt aus dem Chromatogramm abgelesen werden.

• **Reduzierte Retentionszeit t'_R :**

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2.3)$$

Die reduzierte Retentionszeit t'_R eines Peaks bzw. einer Substanz berechnet sich als Differenz aus Retentionszeit t_R und Durchflusszeit t_M . Mit anderen Worten werden die Retentionszeiten so umgerechnet, dass das Peakmaximum der Inertsubstanz den Startpunkt der Chromatographie bildet und eine reduzierte Retentionszeit von Null erhält.

• **Retentionsfaktor (oder Kapazitätsfaktor) k :**

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

Der Retentionsfaktor k sagt aus, um wieviel länger ein Analyt mit der Retentionszeit t_R im Vergleich zur mobilen Phase benötigt, um durch die Säule transportiert zu werden. Anders ausgedrückt ist k ein Mass dafür, wieviel länger sich der Analyt an/in der stationären im Vergleich zur mobilen Phase aufhält. Aus diesem Grund ist k auch abhängig von der Verteilungskonstanten K_C und dem Phasenverhältnis β . Es gilt:

$$k = K_C \frac{V_S}{V_M} = \frac{K_C}{\beta} \quad (2.5)$$

• **Trennfaktor α :**

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{K_{C2}}{K_{C1}} \quad (2.6)$$

Der Trennfaktor beschreibt die relative Retention zweier Peaks zueinander. Er berechnet sich als Verhältnis der reduzierten Retentionszeiten t'_{Rn} (mit $n = 1 \dots 2$) zweier Peaks. Daneben bestehen auch Berechnungsmöglichkeiten basierend auf den Retentionsfaktoren k_n und Verteilungskoeffizienten K_{Cn} . Daneben ermöglicht Gleichung (2.6), Retentionszeiten, Retentionsfaktoren und Verteilungskoeffizienten ineinander umzurechnen. Nach Definition wird die Reihenfolge der Peaks so gewählt, dass $\alpha > 1$ ist. Bei $\alpha = 1$ **koeluierten** zwei Substanzen, d.h. sie haben die gleiche Retentionszeit.

3. Die ideale Peakform und daraus abgeleitete Grössen

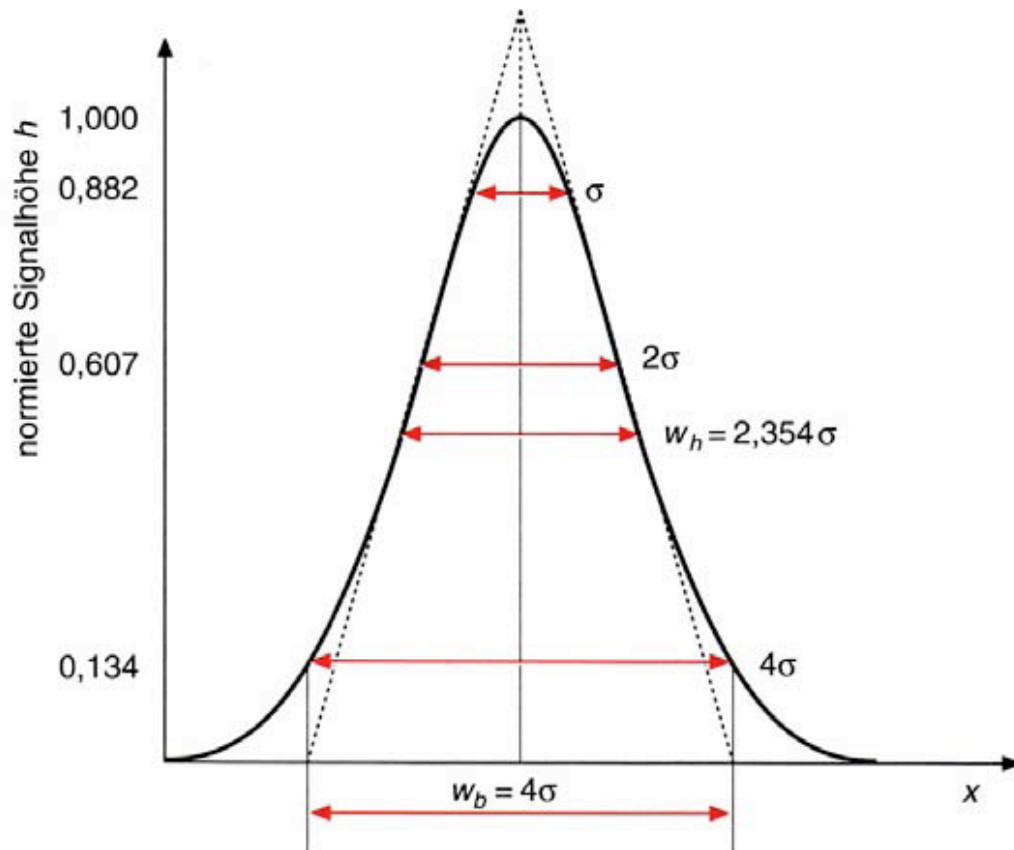


Abb. 3.1: Ideale Peakform, die einer Gauß-Funktion folgt und verschiedene Angaben zur Peakbreite.

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

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

In einem Chromatogramm ist – wie bereits erklärt – auf der x-Achse die Zeit aufgetragen. Entsprechend ist auch x in Gleichung (3.1) die Zeit. Die Peakhöhe ist durch y_0 gegeben. In Abbildung 3.1 ist diese der Einfachheit halber auf einen Wert von eins normiert. Die Standardabweichung σ beschreibt die Peakbreite. In einem x-y-Koordinatensystem aufgetragen, erzeugt Gleichung (3.1) einen Gauß-Peak mit seinem Maximum bei $x = x_0$, wobei x_0 in diesem Fall die Retentionszeit bezeichnet.

• **Peakbreite zwischen den Wendepunkten w_i :**

$$w_i = 2\sigma \quad (3.2)$$

Zwischen den Wendepunkten erstreckt sich der Gauß-Peak nach Gleichung (3.1) von $x = -\sigma$ bis $x = +\sigma$ und hat also eine Breite von 2σ . Dies ist bei $y = e^{-1/2} \approx 0.607$ bzw.

60.7% der Peakhöhe gegeben (siehe Abbildung 2.8). Die Peakbreite w_i ist mathematisch von Bedeutung, in der Praxis lassen sich die beiden folgenden Peakbreiten aber wesentlich einfacher bestimmen. Anhand der gegebenen Beziehungen lassen sie sich ineinander umrechnen.

- **Basisbreite w_b :**

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

Wie in Abbildung 3.1 gezeigt, wird der Wert von w_b aus dem Abstand der Schnittpunkte der Wendetangenten mit der x-Achse bestimmt.

- **Peakbreite in halber Höhe $w_{1/2}$ (*full width at half maximum* = FWHM):**

$$w_{1/2} = 2\sigma\sqrt{2\ln 2} \approx 2.345\sigma \quad (3.4)$$

In der Praxis ist die Peakbreite in halber Höhe oft am einfachsten zu bestimmen. Neben $w_{1/2}$ wird auch die englische Abkürzung FWHM verwendet.

4. Abweichungen von der idealen Peakform

In der Praxis findet man häufig mehr oder weniger grosse Abweichungen von der Gauß-Form. Erscheint ein Peak an der linken, ansteigenden Flanke verbreitert, spricht man von **Fronting (oder Leading)**. Erscheint im gegenteiligen Fall die rechte, abfallende Flanke im Vergleich zur linken verbreitert, hat man es mit **Tailing** zu tun. Zur idealen Peakform einer Gauß-Kurve kommt es nur, wenn das Nernst-Gesetz exakt gilt und sich das Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase während der Trennung einstellen kann.

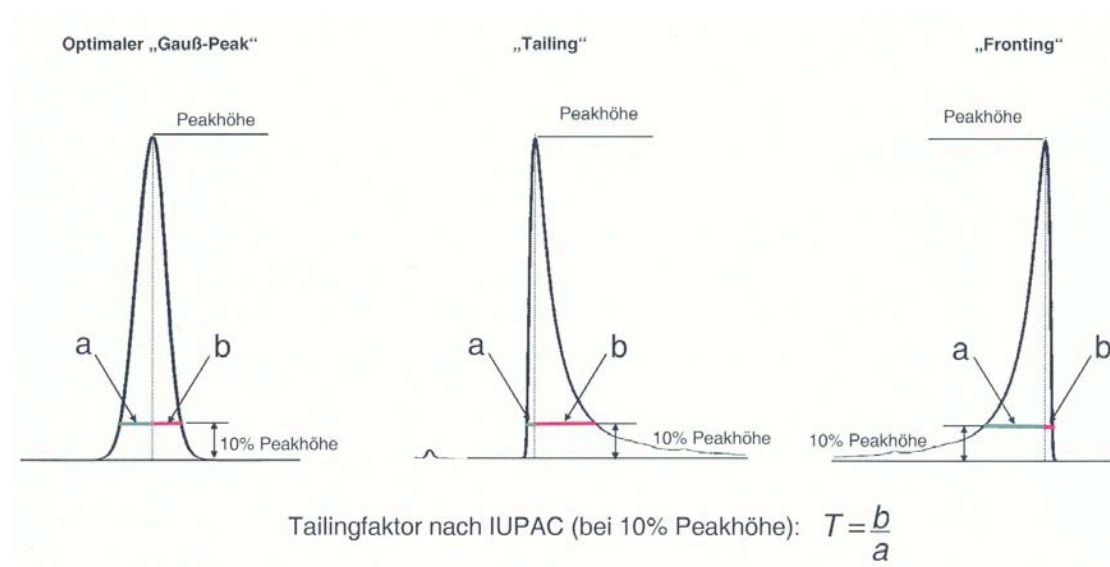


Abb. 4.1: Abweichungen von der idealen Peakform.

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.

5. Effizienz einer chromatographischen Trennung

Bisher wurde davon ausgegangen, dass sich während der Trennung gemäss dem Nernst-Gesetz das Gleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase mehrmals einstellt. In der Praxis wird der **Gleichgewichtszustand jedoch nie erreicht**. Dies führt zu (symmetrischen) **Peakverbreitungen**. Je schlechter sich das Gleichgewicht einstellen kann, umso breiter werden die Peaks und umso geringer wird die Effizienz der Trennung. Die Gründe dafür liegen in der langsamen Kinetik der Gleichgewichtseinstellung

• Konzept der theoretischen Böden

Das Konzept der theoretischen Böden leitet sich von der fraktionierenden Destillation ab. 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.

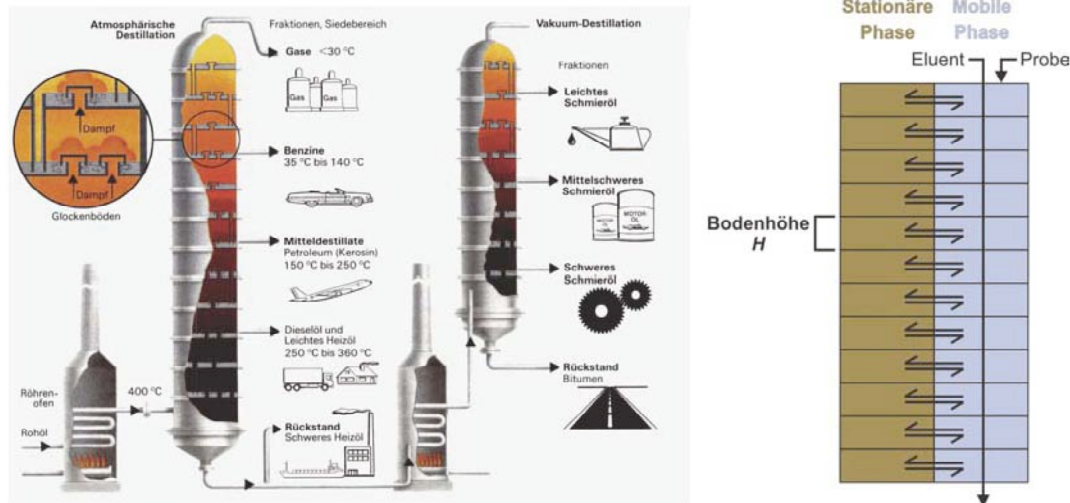


Abb. 5.1: Links: Fraktionierende Destillation mit Trennböden für die einzelnen Fraktionen. Rechts: Konzept der theoretischen Böden in der Chromatographie.

In der Theorie der theoretischen Böden nach Martin und Synge (1940er-Jahre) wird die Säule als Aneinanderreihung schmaler, diskreter Lagen aufgefasst. Auf jedem dieser Böden stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den Analyten in der stationären und mobilen Phase ein. Die Theorie kann die Chromatographie nicht vollständig beschreiben (z.B. Peakasymmetrien), trotzdem sind Anzahl der theoretischen Böden einer chromatographischen Säule und Bodenlänge heute noch **wichtige Parameter zur Beschreibung der Effizienz einer chromatographischen Säule**.

• **Anzahl der theoretischen Böden N :**

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \approx 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (5.1)$$

Die Anzahl der theoretischen Böden berechnet sich aus der Retentionszeit t_R und der Breite eines Peaks. Aus den verschiedenen Definitionen der Peakbreite ergeben sich verschiedene Berechnungsmöglichkeiten. Wie man sieht, gilt: Je breiter ein Peak, desto weniger theoretische Böden weist die Säule auf und desto weniger effizient ist die Trennung. Da jede Substanz eine unterschiedliche Anzahl an Gleichgewichtseinstellungen durchlaufen hat und damit N variieren kann, muss immer mit angegeben werden, für welchen Peak diese Grösse ermittelt wurde.

• **Bodenhöhe H :**

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

Sollen verschiedene Säulen miteinander verglichen werden, ist klar, dass eine längere Säule bei sonst gleichen Eigenschaften mehr theoretische Böden hat. Deshalb wird meistens die Bodenhöhe als Grösse bevorzugt. Sie berechnet sich als Verhältnis aus Säulenlänge L und Anzahl der theoretischen Böden N .

Allgemein gilt: **Je grösser N bzw. je kleiner H , umso effizienter die Trennung**

6. Einfluss der Geschwindigkeit der mobilen Phase (Van-Deemter-Gleichung)

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

Hier sind A , B und C Grössen, welche die Beiträge von **Eddy-Diffusion**, **Longitudinaldiffusion** und **Stofftransport** zur Peakverbreiterung beschreiben, und u ist die Lineargeschwindigkeit durch die Säule. Die Van-Deemter-Gleichung gibt anstelle der Peakverbreiterung gleich die damit zusammenhängende Bodenhöhe H an. Je grösser A , B und C , umso weniger effizient die Trennung. Abbildung 6.1 zeigt einen allgemeinen Verlauf von H als Funktion von u . Die Beiträge von A -, B - und C -Term werden im Folgenden beschrieben. Beim **optimalen Wert der Lineargeschwindigkeit** hat $H(u)$ ein Minimum. Dort wird also die geringste Bodenhöhe und damit die höchste Effizienz erreicht.

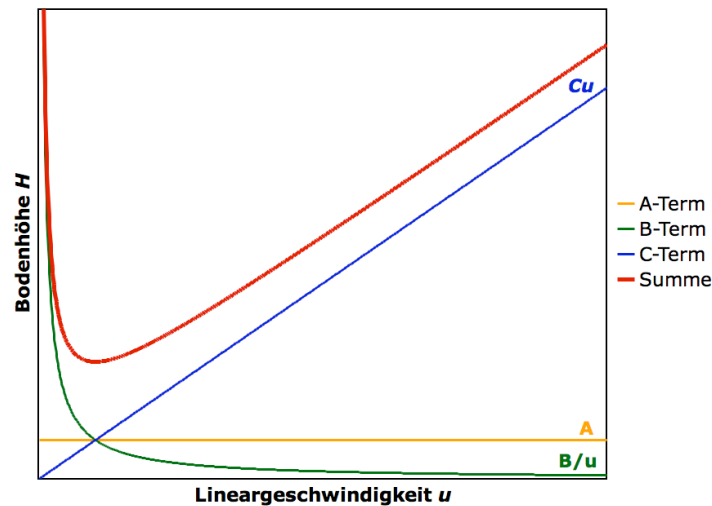


Abb. 6.1: Allgemeiner Verlauf der van-Deemter-Gleichung als Summe einer Konstanten (A-Term), einer Hyperbel (B-Term) und einer Geraden (C-Term). Dieser hypothetische Verlauf ergibt sich, wenn man für A, B und C je einen Wert von Eins einsetzt und H gegen u-Werte von 0 bis 10 aufträgt.

• A-Term: Eddy-Diffusion:

Die Peakverbreiterung durch **Eddy-Diffusion** ist darauf zurückzuführen, dass sich Eluent und Analytmoleküle nicht geradlinig entlang der Säulenachse durch die Trennsäule bewegen können, sondern z.B. das Packungsmaterial einer gepackten Säule umströmen müssen. Als „Eddy“ bezeichnet man im Englischen Wirbelströmungen hinter einem Strömungshindernis bzw. Wasserstrudel. Neben Wirbelströmungen sind es vor allem die unterschiedlichen Weglängen beim Umströmen des Packungsmaterials, welche die Peakverbreiterung bewirken.

Der A-Term ist unabhängig von der Lineargeschwindigkeit u . Auftragen von A gegen u ergibt daher eine zur x-Achse parallele Gerade.

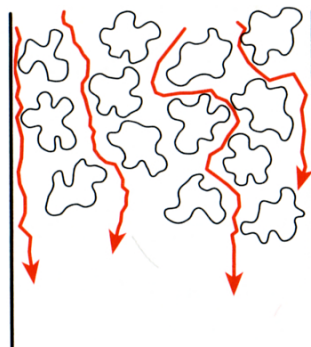


Abb. 6.2: Schematische Darstellung der Eddy-Diffusion. Die roten Pfeile stellen die Trajektorien einzelner Moleküle dar.

• B-Term: Longitudinaldiffusion:

Während die mobile Phase mit der Lineargeschwindigkeit durch die Säule bewegt wird, diffundieren die Analytmoleküle innerhalb der mobilen Phase zufällig in alle

Raumrichtungen. Triebkraft hierfür ist die zufällige Wärmebewegung der Moleküle. Beobachten kann man diesen Effekt, wenn man z.B. einen Tropfen Tinte in ein ruhendes Wassergefäss gibt, und sich die Tinte langsam in alle Raumrichtungen verteilt. Zur Peakverbreiterung tragen nur die Komponenten der Diffusion entlang oder entgegen der Strömungsrichtung bei, da nur diese zu einer schnelleren oder langsameren Bewegung der Moleküle zum Säulenende führt. Aus diesem Grund spricht man von **Longitudinaldiffusion**.

Der B -Term ist indirekt proportional zur Lineargeschwindigkeit u . Das ist darauf zurückzuführen, dass der Anteil der Longitudinaldiffusion umso grösser wird, je länger sich die Moleküle in der Säule aufhalten. Je grösser die Geschwindigkeit bzw. je kleiner die Aufenthaltszeit, umso kleiner wird der B -Term. Auftragen des B -Terms gegen die Lineargeschwindigkeit ergibt eine Hyperbel.

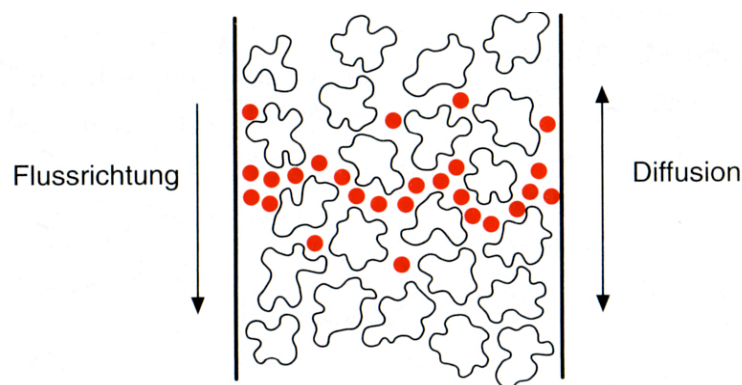


Abb. 6.3: Schematische Darstellung der Longitudinaldiffusion. Die roten Punkte stellen Moleküle dar, die sich aufgrund der Longitudinaldiffusion nicht alle auf der gleichen Höhe in der Säule befinden. Es gibt Moleküle, die zufällig schneller (Diffusion entlang der Flussrichtung) oder langsamer als der Mittelwert sind (Diffusion entgegen der Flussrichtung).

Ein Mass für die Diffusionsgeschwindigkeit eines Analytmoleküls ist sein **Diffusionskoeffizient** in einem bestimmten Medium (z.B. in der mobilen Phase). Je grösser der Diffusionskoeffizient, umso schneller die Diffusion. In der weiteren Folge heisst das, je grösser der Diffusionskoeffizient in der mobilen Phase D_M , umso grösser der Einfluss der Longitudinaldiffusion. Es gilt:

$$B \propto D_M \quad (6.1)$$

Der B -Term hat also nur dann einen starken Beitrag, wenn hohe Diffusionskoeffizienten in der mobilen Phase vorliegen.

• C-Term: Massentransport-Effekte:

Der C -Term beschreibt die bereits angesprochenen Effekte, wie die begrenzten Geschwindigkeiten von Diffusionsprozessen und Phasenübergängen, welche verhindern, dass sich das Gleichgewicht schnell genug einstellen kann. Sie werden unter dem Begriff **Massentransport-Effekte zusammengefasst**. Den C -Term kann man

genauer als Summe der Beiträge von stationärer (C_S) und mobiler Phase (C_M) beschreiben:

$$C = C_S + C_M \quad (6.2)$$

Der C -Term ist direkt proportional zur Lineargeschwindigkeit. Dies lässt sich damit erklären, dass die Analytmoleküle bei geringer Strömungsgeschwindigkeit mehr Zeit haben, den Gleichgewichtszustand zu erreichen. Auftragen des C -Terms gegen die Lineargeschwindigkeit ergibt eine Gerade.

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.