

# Analytische Chemie (für Biol. / Pharm. Wiss.)

## Teil: Trenntechniken (Chromatographie, Elektrophorese)

Dr. Martin Pabst

HCI D323

[martin.pabst@org.chem.ethz.ch](mailto:martin.pabst@org.chem.ethz.ch)

<http://www.analytik.ethz.ch/>



ETH Zurich | Dr. Thomas Schmid, Dr. Martin Pabst [martin.pabst@org.chem.ethz.ch](mailto:martin.pabst@org.chem.ethz.ch)

Herbstsemester 2013



Prüfungen	Musterlösungen
<a href="#">Herbst 2002</a>	<a href="#">Herbst 2002</a>
<a href="#">Frühling 2003</a>	<a href="#">Frühling 2003</a>
<a href="#">Herbst 2003</a>	<a href="#">Herbst 2003</a>
<a href="#">Frühling 2004</a>	<a href="#">Frühling 2004</a>
<a href="#">Herbst 2004</a>	<a href="#">Herbst 2004</a>
<a href="#">Frühling 2005</a>	<a href="#">Frühling 2005</a>
<a href="#">Herbst 2005</a>	<a href="#">Herbst 2005</a>
<a href="#">Frühling 2006</a>	<a href="#">Frühling 2006</a>
<a href="#">Herbst 2006</a>	<a href="#">Herbst 2006</a>
<a href="#">Frühling 2007</a>	<a href="#">Frühling 2007</a>
<a href="#">Herbst 2007</a>	<a href="#">Herbst 2007</a>
<a href="#">Frühling 2008</a>	<a href="#">Frühling 2008</a>
<a href="#">Herbst 2008</a>	
<a href="#">Frühling 2009</a>	
<a href="#">Herbst 2009</a>	
<a href="#">Frühling 2010</a>	
<a href="#">Herbst 2010</a>	<a href="#">Herbst 2010</a>
<a href="#">Frühling 2011</a>	
<a href="#">Herbst 2011</a>	
<a href="#">Frühling 2012</a>	
<a href="#">Herbst 2012</a>	<a href="#">Herbst 2012</a>
<a href="#">Frühling 2013</a>	<a href="#">Frühling 2013</a>

[www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm](http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm)

## Übersicht über die letzte Einheit:

### Messergebnis mit absolutem Fehler:

$$\pm \sigma_x \quad \text{z.B. } 12.3 \mu\text{g/L} \pm 0.8 \mu\text{g/L}$$

### Messergebnis mit relativem Fehler:

$$\pm \sigma_{rel,x} \quad \text{z.B. } 12.3 \mu\text{g/L} \pm 7\%$$

### • Kalibrierung mit externem Standard:

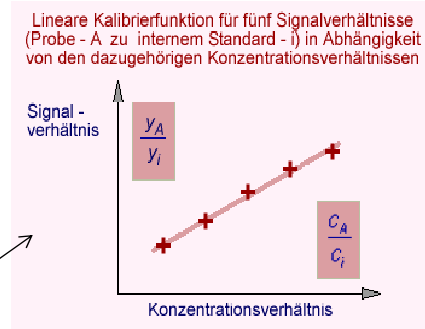
- einfachstes Kalibrierverfahren

### • Kalibrierung mit internem Standard:

- Kompensation systematischer Fehler
- Interner Standard hat nicht exakt die gleichen Eigenschaften wie der Analyt
- Matrixeffekte werden nicht kompensiert

### • Kalibrierung mittels Standardaddition

- Kalibrierung in der Probe mit dem Analyten als Standard
- Matrixeffekte können kompensiert werden



$$C_{\text{Analyt}} = C_{\text{interner Standard}} \frac{\left( \frac{A_{\text{Analyt}}}{A_{\text{interner Standard}}} - a \right)}{b}$$

Skript ab S57ff

# Flüssigchromatographie (liquid chromatography = LC)

flüssige mobile Phase  
feste stationäre Phase

# Flüssigchromatographie (LC)

Die heute am häufigsten eingesetzte instrumentelle LC-Technik ist die

## HPLC

### high performance liquid chromatography

ursprünglich: high pressure liquid chromatography



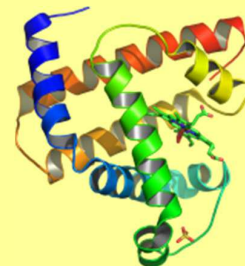
- Hochdruckpumpen zum Fördern der mobilen Phase (300–400 bar)
- Dicht gepackte Säulen mit kleinen Partikeln ( $\mu\text{m}$ -Bereich) als stationäre Phase

# LC: Einsatzbereich

Mittels **Gaschromatographie (GC)** lassen sich nur Analyten untersuchen, welche sich unzerstört verdampfen lassen  
(also v.a. kleine, unpolare, flüchtige Moleküle)

Die **Flüssigchromatographie (LC)** hat ein viel breiteres Anwendungsfeld, da man mit ihr auch thermolabile und grosse Moleküle trennen kann:

- z.B.
- kleine ungeladene Moleküle
  - anorganische und organische Ionen
  - Organometallkomplexe
  - Polymere
  - grosse (Bio-)Moleküle (z.B. Proteine)



Die Analyten müssen nur ausreichend in der mobilen Phase löslich sein.

Es existieren verschiedene Trennprinzipien, welche Moleküle nach verschiedenen Eigenschaften trennen (z.B. Polarität, Ionenladung, Grösse)

## LC: Trennprinzipien

Trennmethode	Trennprinzip
Normalphasen-HPLC	Adsorption (und Verteilung)
Umkehrphasen-HPLC	Verteilung (und Adsorption)
Grössenausschlusschromatographie	Grössenausschluss
Ionenchromatographie	Ionische Wechselwirkung
Affinitätschromatographie	Bindungsaffinität (nicht-kovalent)
Chirale Chromatographie	Enantiomertrennung durch Bildung und Trennung von Diastereomeren

## LC: Trennprinzipien

Trennmethode	Trennung nach...
Normalphasen-HPLC	Polarität ( $t_R$ : polare > apolare Analyten)
Umkehrphasen-HPLC	Polarität ( $t_R$ : apolare > polare Analyten)
Grössenausschlusschromatographie	Molekülgrösse
Ionenchromatographie	Ladung und Grösse von Ionen

Polarität..... Ladungsverschiebung → getrennte Ladungsschwerpunkte → Dipolmoment

# Normalphasen- und Umkehrphasen-LC

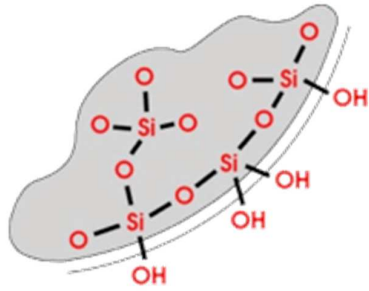
# Normalphasen- und Umkehrphasen-LC

Normalphasen- (NP) und Umkehrphasen(RP)-HPLC machen den **Grossteil aller flüssigchromatographischen Trennungen** aus. Die RP-HPLC deckt etwa 70% aller Anwendungen ab.

Methode	stationäre Phase	mobile Phase	Elutionsreihenfolge
NP-HPLC	polar	apolar	apolare vor polaren Analyten
RP-HPLC	apolar	polar	polare vor apolaren Analyten

NP- und RP-HPLC trennen die Moleküle nach ihrer **Polarität**.

# Normalphasenchromatographie



**Stationäre Phase:** polar (z.B. Kieselgel,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ )

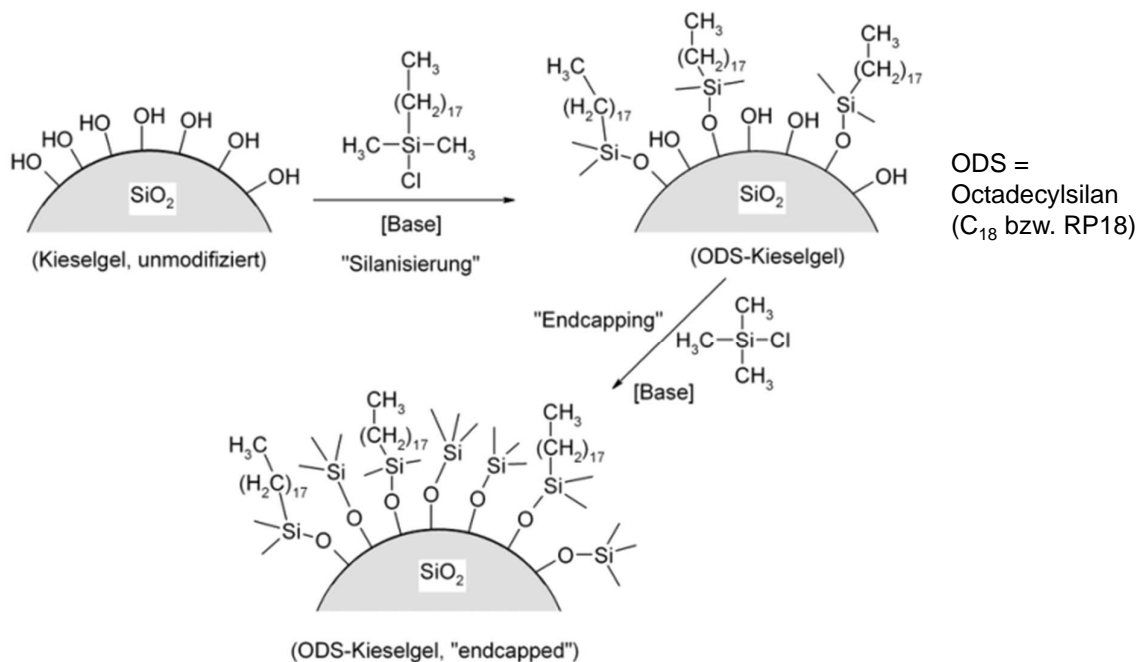
**Mobile Phase:** apolar (z.B. Hexan, Pentan)

Polare Moleküle adsorbieren stark an die polare stationäre Phase und werden retentiert. Apolare Moleküle halten sich vor allem in der apolaren mobilen Phase auf und werden schnell eluiert.

Geeignet für Moleküle, die in apolaren Lösungsmitteln löslich sind.

# Umkehrphasenchromatographie

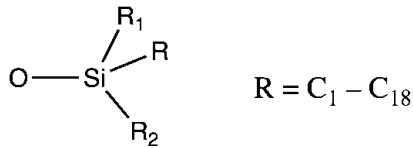
Hydrophobisierung der Kieselgeloberfläche durch Reaktion mit Alkylchlorsilanen



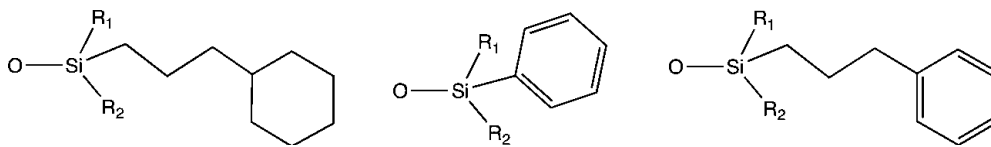
# Umkehrphasenchromatographie

## Typische Umkehrphasen

Straight-chain hydrocarbons ( $C_{18}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_8$ ,  $C_6$ ,  $C_4$ ,  $C_3$ ,  $C_2$ ,  $C_1$ )

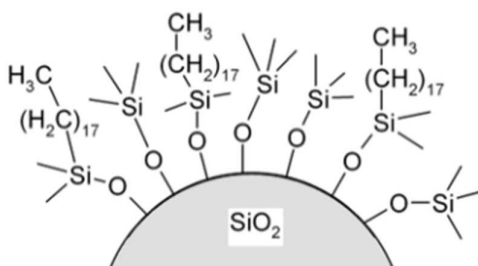


Cyclohexyl, phenyl, alkylphenyl



Am weitesten verbreitet ist die Octadecyl-Phase (auch  $C_{18}$  oder **RP18** genannt).

# Umkehrphasenchromatographie



**Stationäre Phase:** apolar (z.B. RP18-Kieselgel)

**Mobile Phase:** polar (z.B. Wasser, Methanol, Acetonitril)

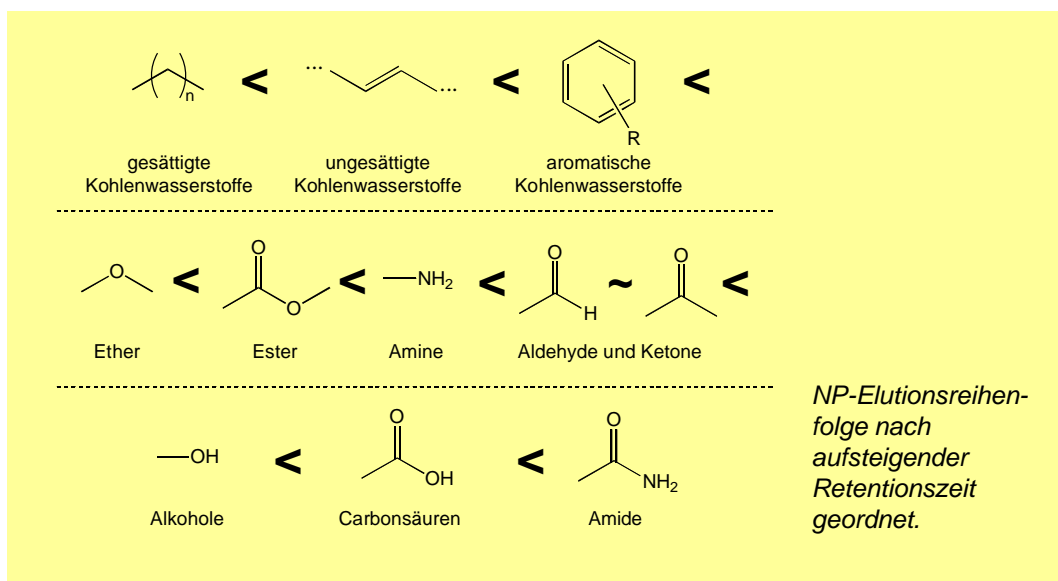
Die Verteilung der Moleküle zwischen chemisch gebundener stationärer und mobiler Phase liegt für apolare Moleküle auf der Seite der stationären Phase, weshalb polare Moleküle stärker retentiert werden als polare.

Geeignet für Moleküle, die in polaren Lösungsmitteln löslich sind (inkl. Wasser und wässrige Pufferlösungen).

# Elutionsreihenfolge und elutrope Reihe

## Elutionsreihenfolge

**Normalphasenchromatographie:** apolare Moleküle eluieren vor polaren Molekülen



**Umkehrphasenchromatographie:** Elutionsreihenfolge dreht sich um



# Elutionskraft

Die Elutionskraft bezeichnet die Fähigkeit eines Lösungsmittels, Analytenmoleküle **von der stationären in die mobile Phase zu überführen**.

Erhöhung der Elutionskraft führt zu kleineren **Retentionszeiten**.

Erhöhung der Elutionskraft führt zu kleineren **Verteilungskonstanten**.

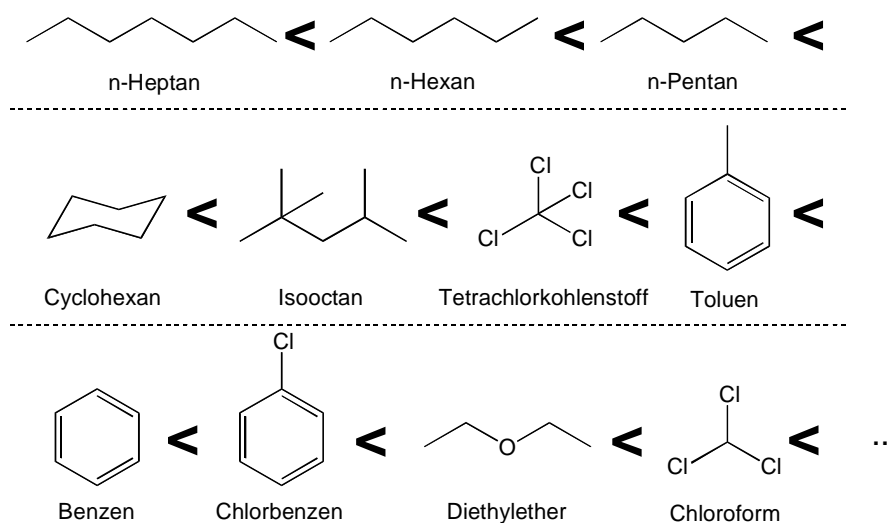
Die Elutionskraft eines Lösungsmittels ist dann hoch, wenn seine Polarität ähnlich der der stationären Phase ist.

Analytenmoleküle mit ähnlicher Polarität wie die stationäre Phase adsorbieren stark und brauchen eine mobile Phase mit hoher Elutionskraft, um eluiert zu werden.

Die **elutrope Reihe** ordnet Lösungsmittel nach aufsteigender Elutionskraft in der Normalphasenchromatographie.

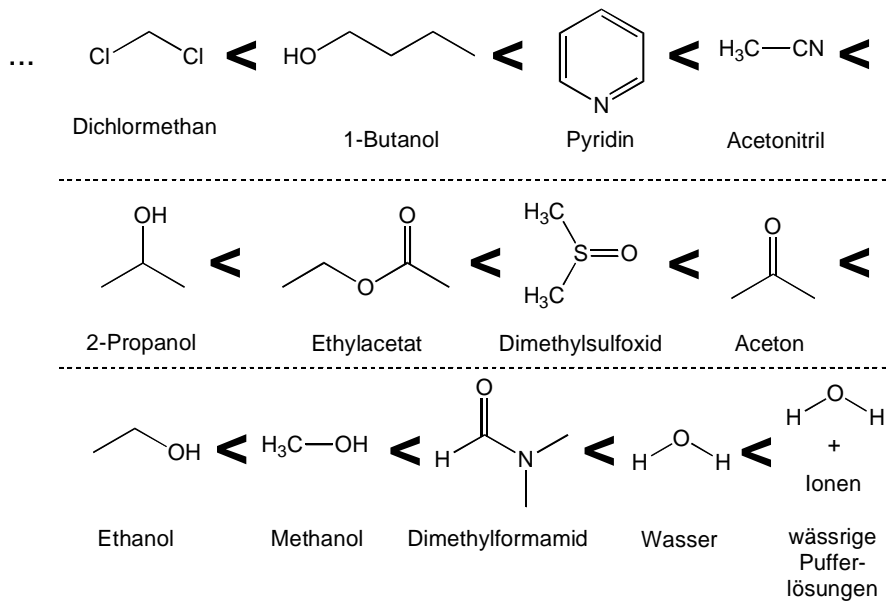
# Elutrope Reihe

Die elutrope Reihe ordnet Lösungsmittel nach aufsteigender Elutionskraft in der **Normalphasenchromatographie**.



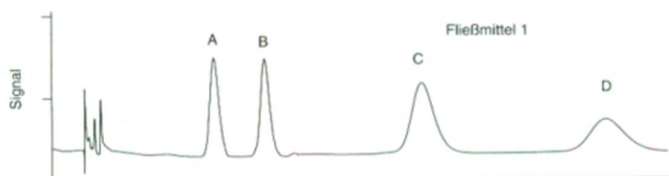
Fortsetzung →

# Elutrope Reihe

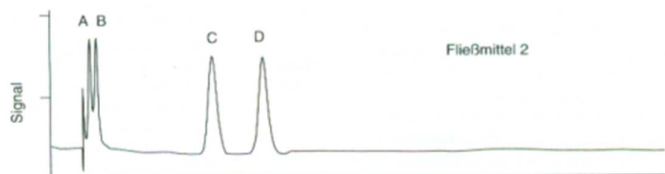


In der **Umkehrphasenchromatographie** dreht sich die Reihenfolge der Lösungsmittel im Vergleich zur hier gezeigten um.

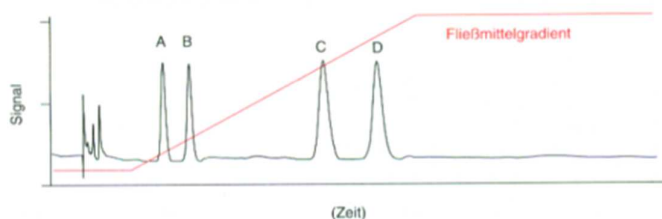
## Gradientenelution: Fließmittelgradienten



Eluent 1  
geringe Elutionskraft



Eluent 2  
hohe Elutionskraft



Gradient: Eluent 1 → Eluent 2  
geringe → hohe Elutionskraft

Meistens wird der Gradient so gewählt, dass die Elutionskraft während der Trennung ansteigt.

## Aufbau einer HPLC-Anlage

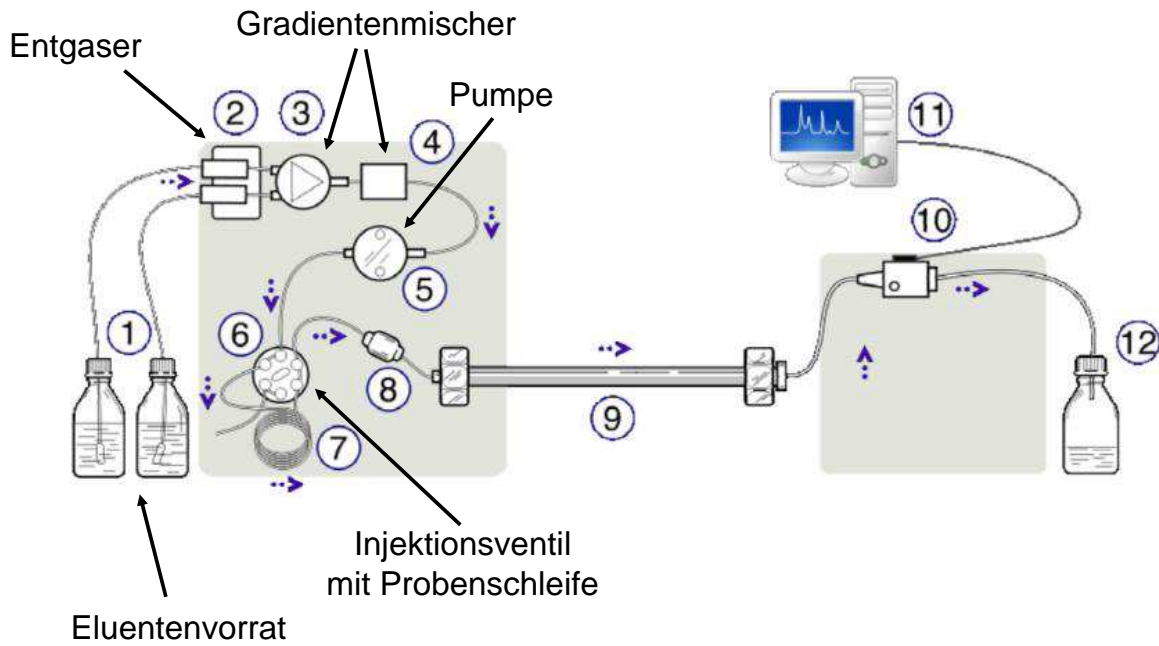
## Aufbau einer HPLC-Anlage



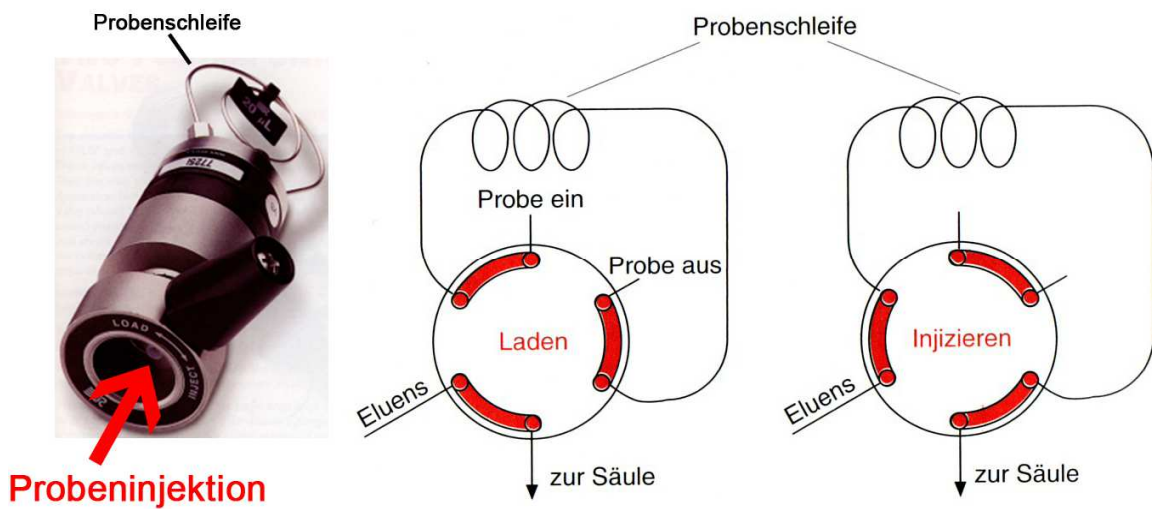
Oft modularer Aufbau mit Modulen  
zum/zur...

- Entgasen der Lösungsmittel
- Mischen von Lösungsmittelgradienten
- Pumpen der mobilen Phase
- Probeninjektion
- Trennung der Substanzen (Säule)
- Detektion der getrennten Substanzen

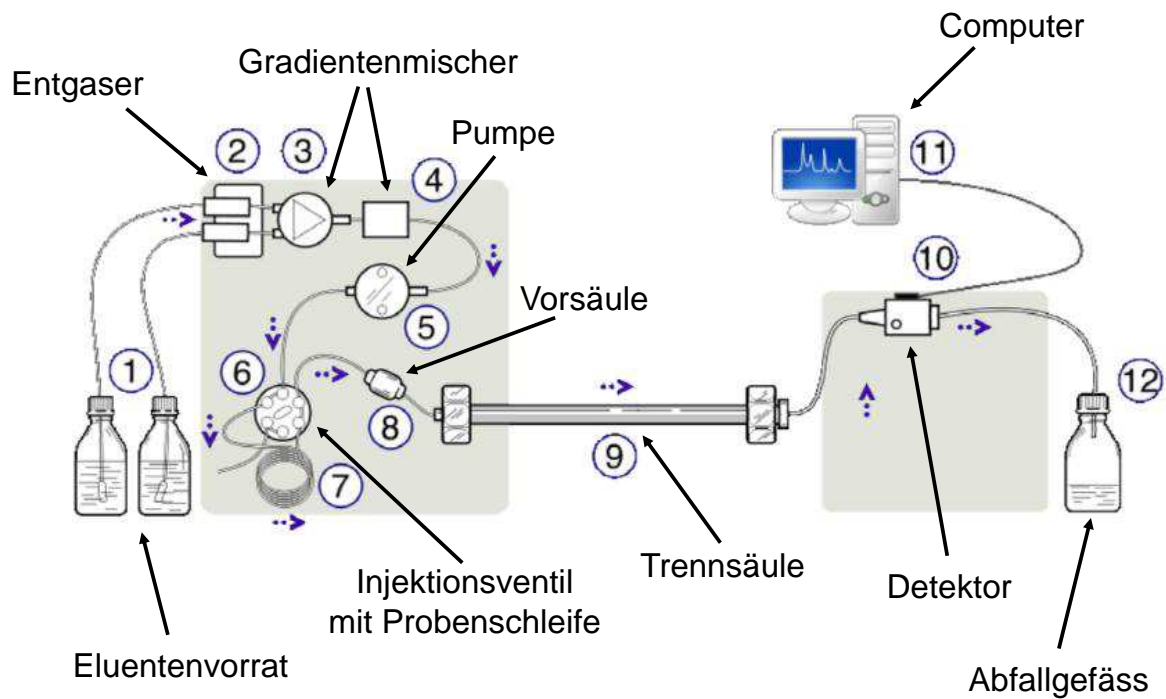
# Aufbau einer HPLC-Anlage



# HPLC-Injektionsventil



# Aufbau einer HPLC-Anlage



# Film: HPLC

## High Performance Liquid Chromatography HPLC



[http://www.youtube.com/watch?v=kz\\_egMtdnL4](http://www.youtube.com/watch?v=kz_egMtdnL4)