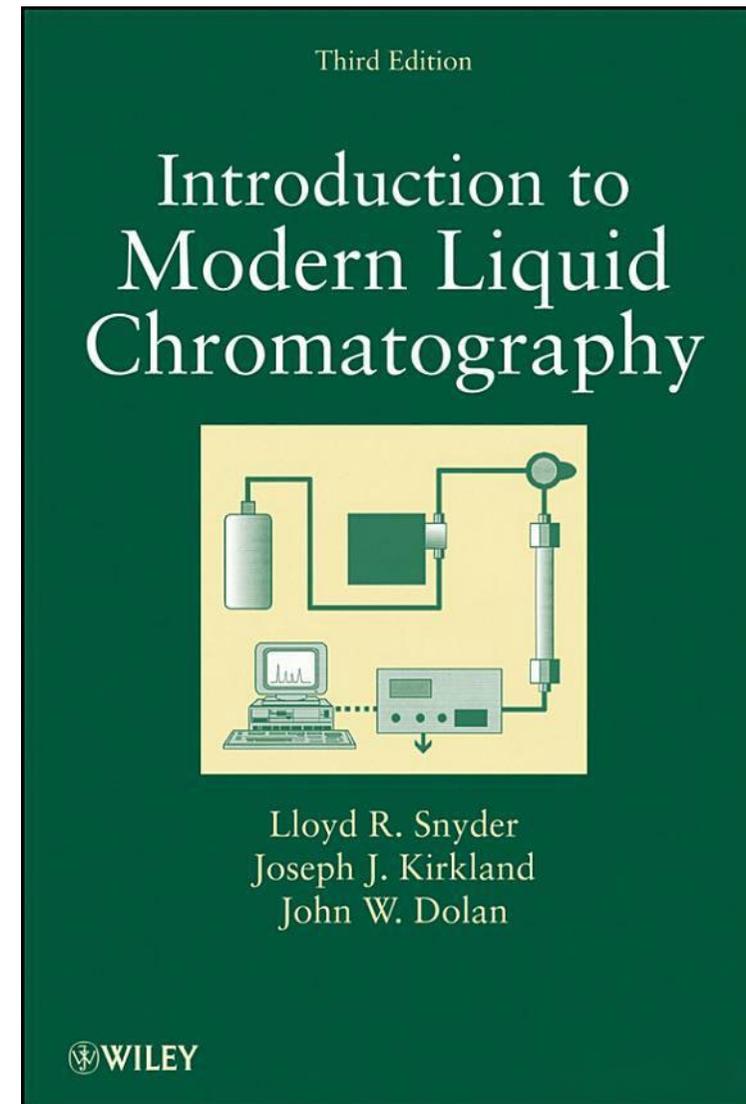


# Flüssigkeitschromatographie

## Überblick und grundlegende Konzepte 1. und 2. Vorlesung

Dr. Sebastian Opitz  
Master HS 2019



# Notwendigkeit analytischer Trennmethoden

## Entwicklung der Chromatographie

### Zu analysierende Probe

- Enthält verschiedene chemische Stoffe
- Enthält Substanzen mit sehr ähnlicher oder verschiedener Struktur und Eigenschaft
- Enthält Substanzen in sehr unterschiedlichen Anteilen (z.B. Verunreinigungen)

**Ziel:** ein vorliegendes Gemisch in einem Gang in Einzelkomponenten aufzutrennen und zu quantifizieren

Verschiedene Phasen der Chromatographie (Abbildung).

Methoden der **Flüssigkeitschromatographie** sind oft geeignet, komplexe Proben zu analysieren.

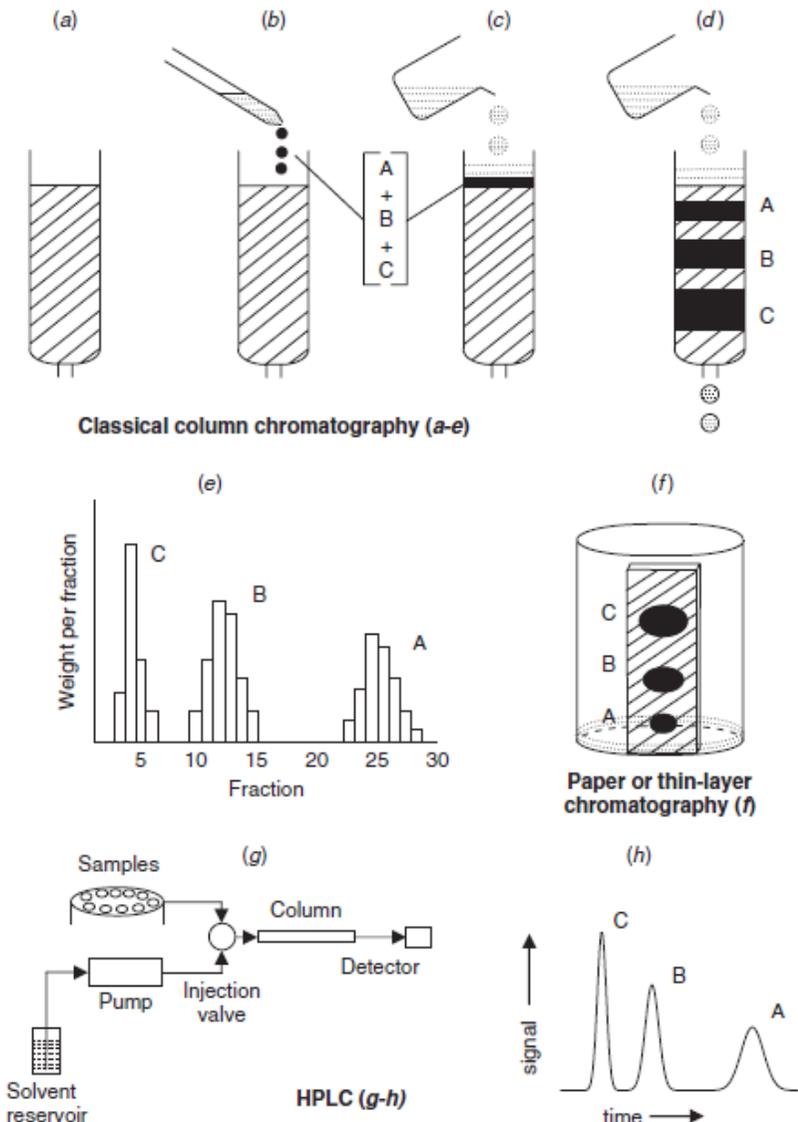
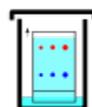


Figure 1.1 Different stages in the development of chromatography.

Papierchromatographie

Dünnschichtchromatographie

Säulenchromatographie

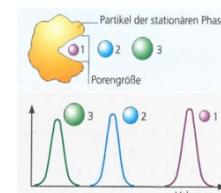
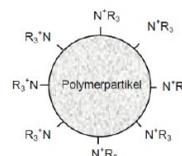


## High Performance Liquid Chromatography

## Überkritische Fluidchromatographie (supercritical fluid chromatography)

## Ionenaustauschchromatographie

## Grössenausschlusschromatographie



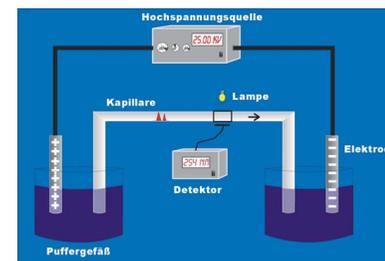
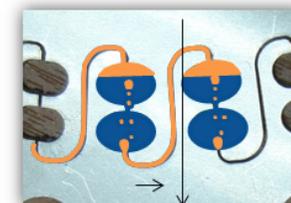
[Gasphase - Gaschromatographie: ca. 25 % aller bekannten Substanzen mit GC analysierbar (höhere Effizienz – schnellere und bessere Trennung)]

Gegenstromverteilungschromatographie (countercurrent chromatography)

Feld-Fluss-Fraktionierung (Field flow fractionation)

Kapillarelektrophorese

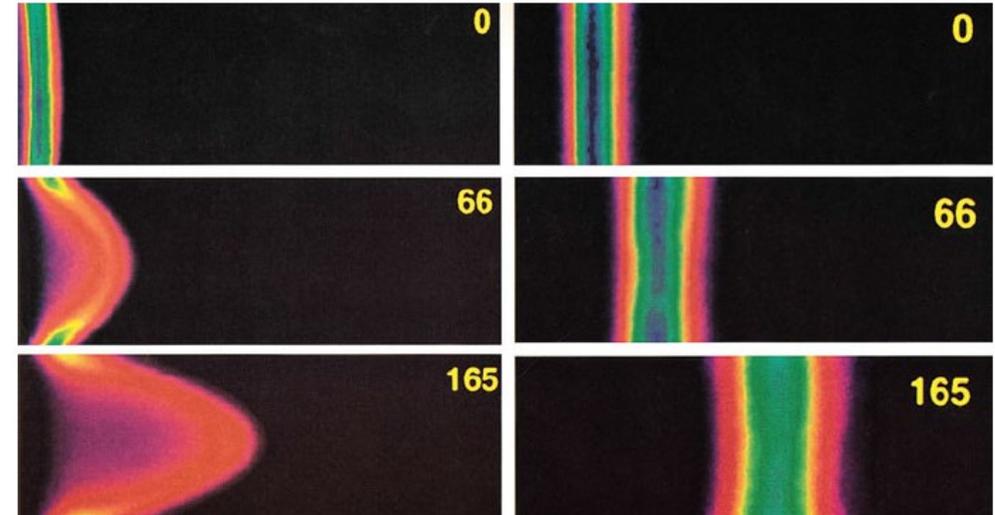
(Andere Trennart: Wanderung der Analyten (m/z ratio) in Kapillare unter Einfluss eines elektrischen Feldes).



# Spezielle Formen der Flüssigchromatographie Werden nicht behandelt

## **Kapillarelektrochromatographie**

- Trennung durch Elektroosmose (anstatt Druck)
- HPLC + Elektrophorese kombiniert:  
**HPLC-Teil:** stationäre Phase in Kapillare → Interaktion zwischen Analyt + stationärer Phase  
**Elektrophorese-Teil:** elektrisches Feld anlegen → Trennung auf der Basis der  $m/z$  ratio
- Höhere Effizienz der Trennung:  
elektroosmotischer Fluss ist gleichmässiger (entsteht an Kapillarwand) und nicht abhängig von Partikelgrösse, Durchmesser oder Länge der Säule.



**Farbtafel 30** Geschwindigkeitsprofile für hydrodynamischen und elektroosmotischen Fluss (Abschnitt 25.6). In einer Kapillare wurde ein Fluoreszenzfarbstoff 0, 66 und 165 ms nach Beginn des Flusses abgebildet. Die höchste Konzentration des Farbstoffs zeigt sich in den Bildern durch die blaue und die niedrigste durch die rote Farbe, da verschiedene Farben zu verschiedenen Fluoreszenzintensitäten gehören. [P. H. Paul, M. G. Garguilo und D. J. Rakestraw, Anal. Chem. 1998, 70, 2459. Siehe auch: D. Ross, T. J. Johnson und L. E. Locascio, Anal. Chem. 2001, 73, 2500.]

## **HPLC on a chip**

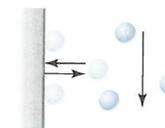
- Kleine Proben werden durch eine Micro-Säule (z.B.  $43 \times 0.06$  mm) als Teil eines Chips getrennt. Säule sitzt zwischen Micro Pumpe und MS.
- Prinzip gleich der HPLC, aber Vorteile in Trennkapazität (Dead Volumina, Peak dispersion) und sehr kleine Probenvolumina
- Stichwort Nano-HPLC



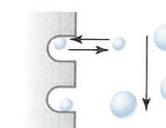
# 4 Trennprinzipien der HPLC

Trennprinzip	Chromatographische Methode (Unterteilung)	spezielle Varianten
Adsorption	Adsorptions-Chromatographie (auch als Chromatographie mit überkritischen Fluiden: <i>supercritical fluid chromatography</i> , SFC)	Affinitäts- und Bioaffinitäts-Chromatographie
	a) Adsorptions-Gas-Chromatographie (GC bzw. CSC), b) Adsorptions-Flüssigkeits-Chromatographie (LC)	Normal-Phasen-Chromatographie an chemisch modifizierten Kieselgelen
Verteilung	a) Verteilungs-Gas-Chromatographie b) Flüssig-Flüssig-Chromatographie	Umkehrphasen- (Reversed-phase-, RP-)Chromatographie, Ionenpaar-Reversed-phase-Chromatographie
Ionenaustausch	Ionenaustausch-/Ionen-Chromatographie (IC)	
Gelpermeation	Gelpermeations- (Ausschluss-)Chromatographie (CPC)	

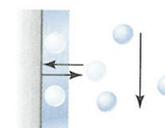
**Adsorption chromatography:**  
solutes adsorb to a support's surface



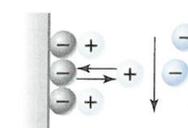
**Size-exclusion chromatography:**  
porous support separates solutes based on size/shape



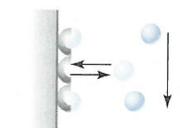
**Partition chromatography:**  
solutes partition into a non-polar or polar coating



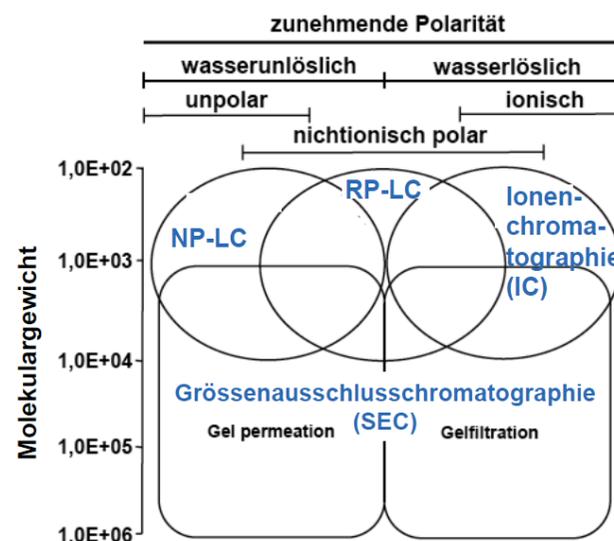
**Ion-exchange chromatography:**  
charged solutes bind to fixed charges



**Affinity chromatography:**  
Solutes selectively bind to a biologically-related ligand



- Adsorption
- Verteilung
- Ionenaustausch
- Grössenausschluss
- (Affinität)



Zusammenhang zwischen Molekülgrösse und Polarität

**Umkehrphasenchromatographie** (Reversed-phase chromatography, RPC)

**Normalphasenchromatographie** (Normal-phase chromatography, NPC)

**Nicht-wässrige reversed-phase Chromatographie** (non aqueous RP, NARP)

**Hydrophile Interaktionschromatographie** (HILIC)

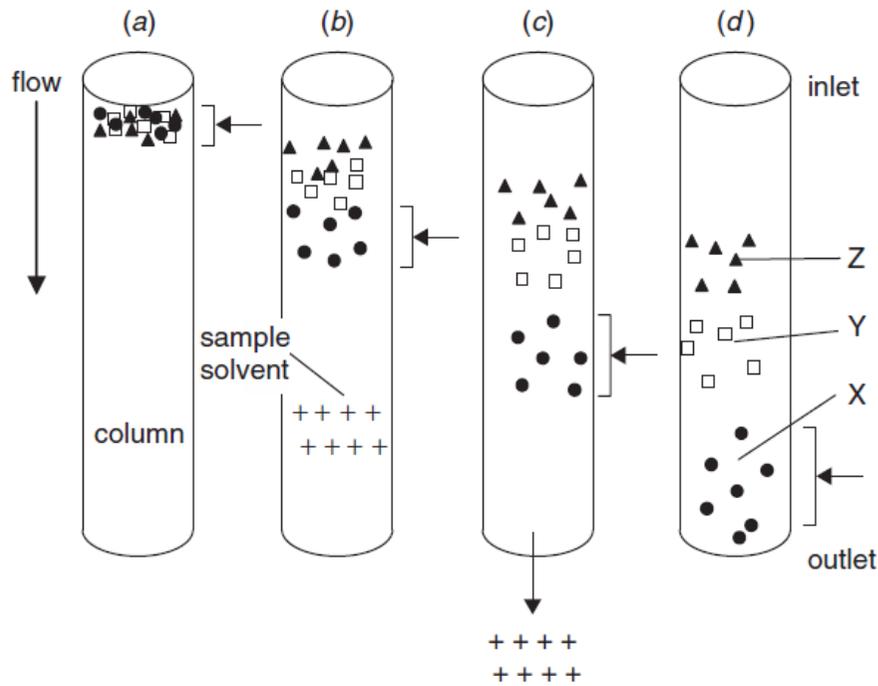
**Ionenaustauschchromatographie** (Ion-exchange chromatography, IEC)

**Ionenpaarchromatographie** (Ion-pair chromatography, IPC)

**Grössenausschlusschromatographie** (Size-exclusion chromatography, SEC)

**Chirale Chromatographie und Affinitätschromatographie**

# Beispiel einer Trennung, RPC

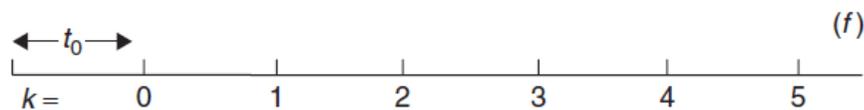
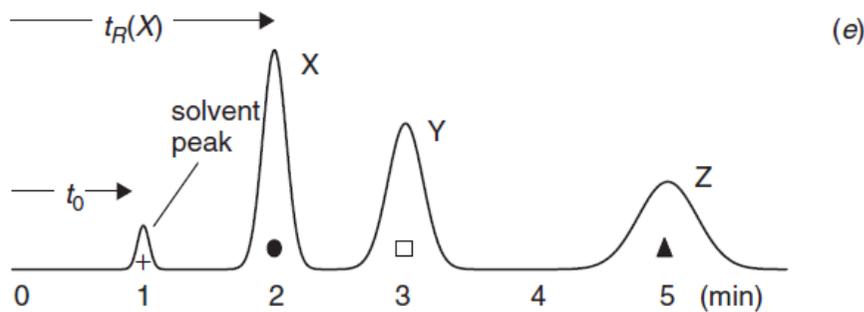


(a-d) Trennungsprozess

(e) Resultierendes Chromatogramm

(f) resultierende  $k$  – Werte aus dem Chromatogramm herausgelesen

Gelöste Moleküle (Analyten)  $X \bullet$ ,  $Y \square$ , and  $Z \blacktriangle$  und Lösungsmittelmoleküle +

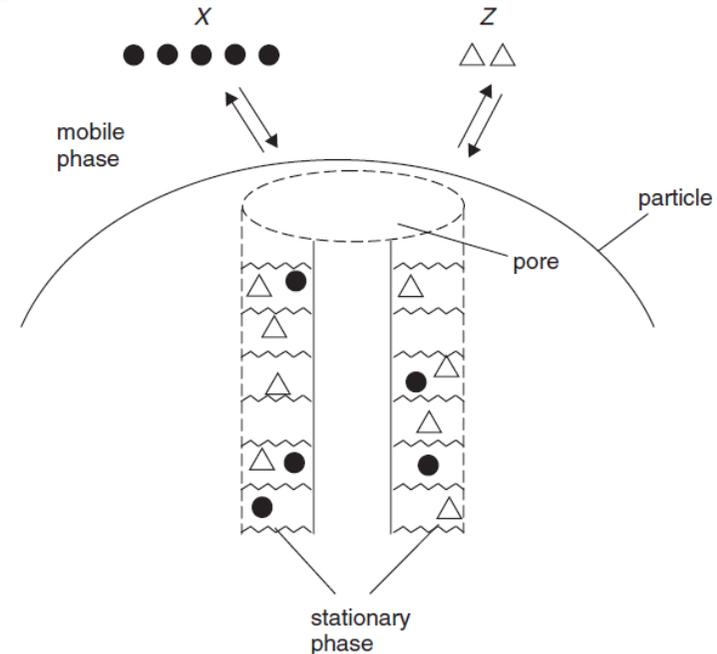
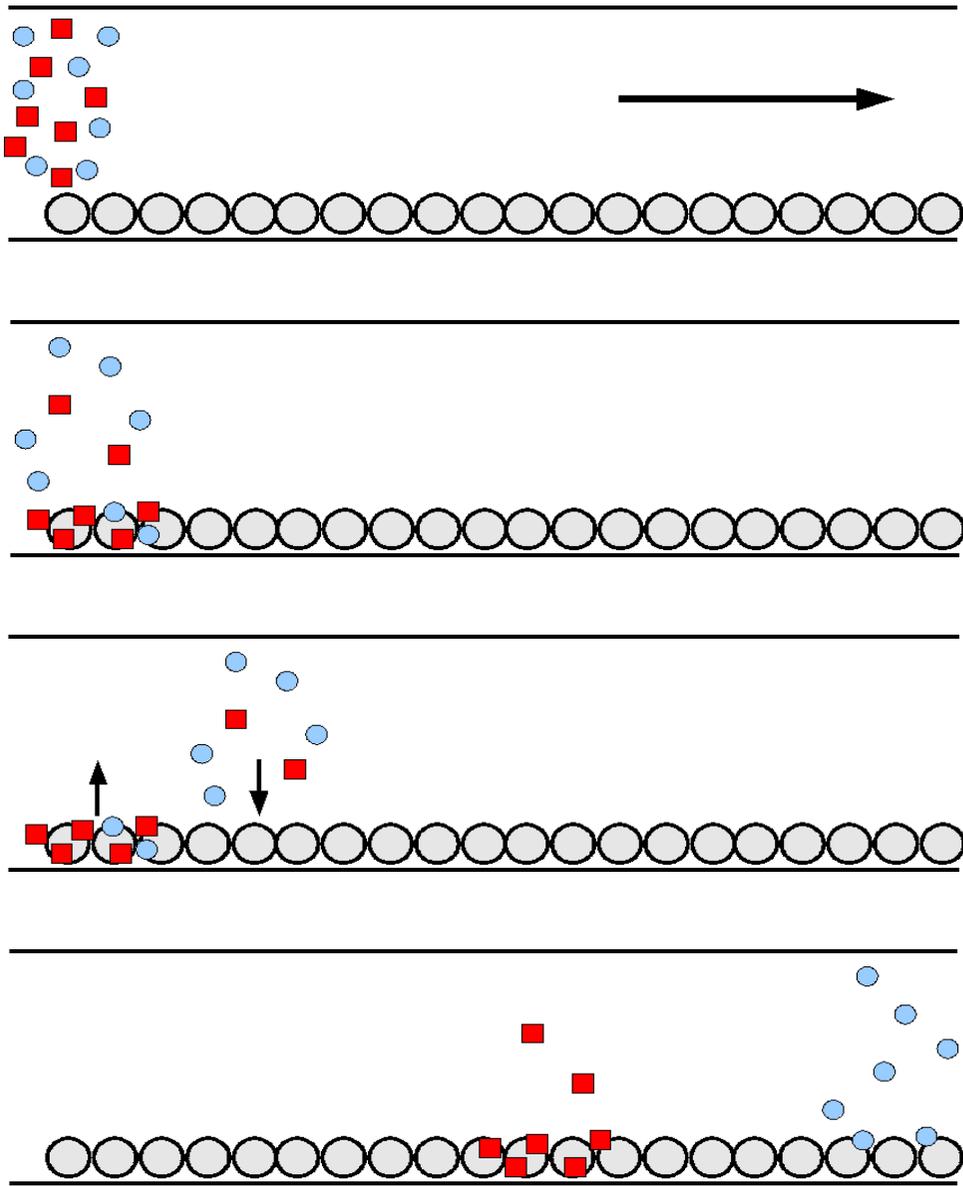


$t_0$  = Totzeit

$t_R(X)$  = Retentionszeit (hier 2, 3 und 5 min)

**Anmerkung:** Beispiele in Vorlesung sind meist isokratisch, um Effekte besser zu erklären

# Verlauf einer chromatographischen Trennung



mobile phase  $\longrightarrow$

X  $\longrightarrow$

Z  $\longrightarrow$

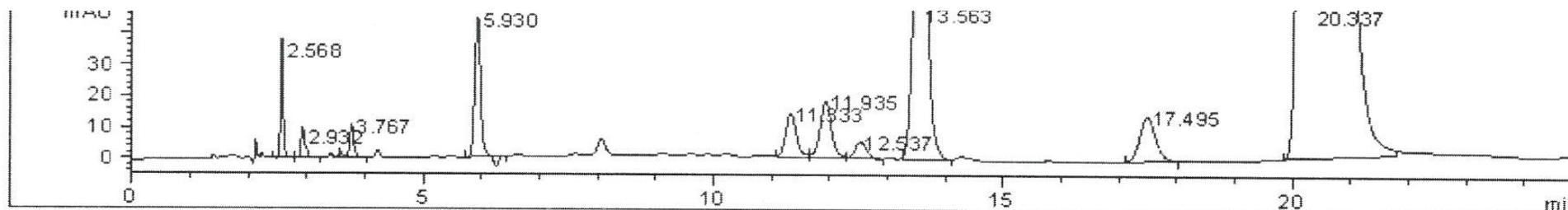
$$K = \text{Nernstscher Verteilungskoeffizient} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m}$$

$$K_{\text{rot}} = \quad K_{\text{blau}} =$$

$$K_X = \quad K_Z =$$

SP: Kreise = gepackte Kieselgelkugeln in der Säule  
 MP: Eluent = Lösungsmittel fließt in Pfeilrichtung

# Chromatographische Messgrößen



=====  
Area Percent Report with Performance  
=====

Multiplier: : 1.0000  
Dilution: : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=240,10 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
2.568	0.71	126.47984	33.98886	1.04	0.0533	12841	-	-
2.932	0.95	47.18009	6.90884	0.82	0.0842	6724	3.12	1.34
3.767	1.51	60.61774	9.94396	1.14	0.0750	13978	6.15	1.58
5.930	2.95	294.72192	43.82387	1.06	0.1050	17670	14.12	1.95
11.333	6.56	178.28558	13.84133	0.87	0.1917	19368	21.40	2.22

**k**

**A<sub>s</sub>**

**N**

**α**

# Überblick über Einflussgrößen auf Trennung

Condition	$k$	$\alpha$	$N$
%B	++	+	-
B-solvent (acetonitrile, methanol, etc.)	+	++	-
Temperature	+	+	+
Column type (C <sub>18</sub> , phenyl, cyano, etc.)	+	++	-
Mobile phase pH <sup>a</sup>	++	++	+
Buffer concentration <sup>a</sup>	+	+	-
Ion-pair-reagent concentration <sup>a</sup>	++	++	+
Column length	0	0	++
Particle size	0	0	++
Flow rate	0	0	+
Pressure	-	-	+ <sup>b</sup>

Der **Retentionsfaktor**: wichtige Kenngrösse in der Methodenentwicklung (k zwischen 1 und 10), k entspricht demnach der korrigierten (reduzierten) Retentionszeit ( $t_R - t_0$ ), gemessen in  $t_0$  Einheiten.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

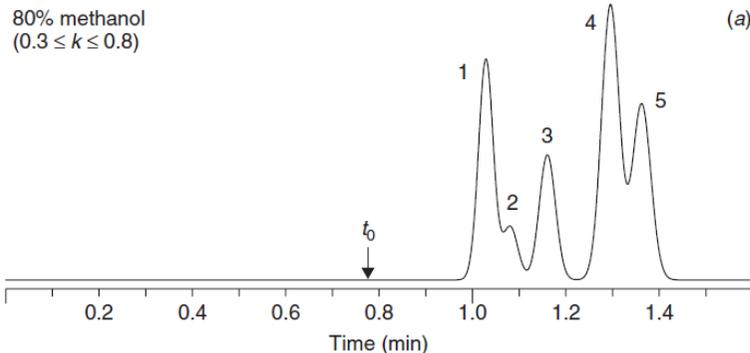
Totzeit  $t_0$  + Retentionszeit  $t_R$  kann man aus Chromatogramm herauslesen:

- a) erste Störung der Basislinie, typisch für Lösungsmittelpeak, RI ändert sich (Probenlösungsmittel  $\neq$  mobile Phase)
- b) Bei dreckiger Probe: grosser Peak gleich am Anfang,  $t_0$  am Anfang der Steigung
- c) Keine Totzeit erkennbar, entweder berechnen,  $F$  = Flussrate,  $d$  = innerer Säulendurchmesser (in mm):

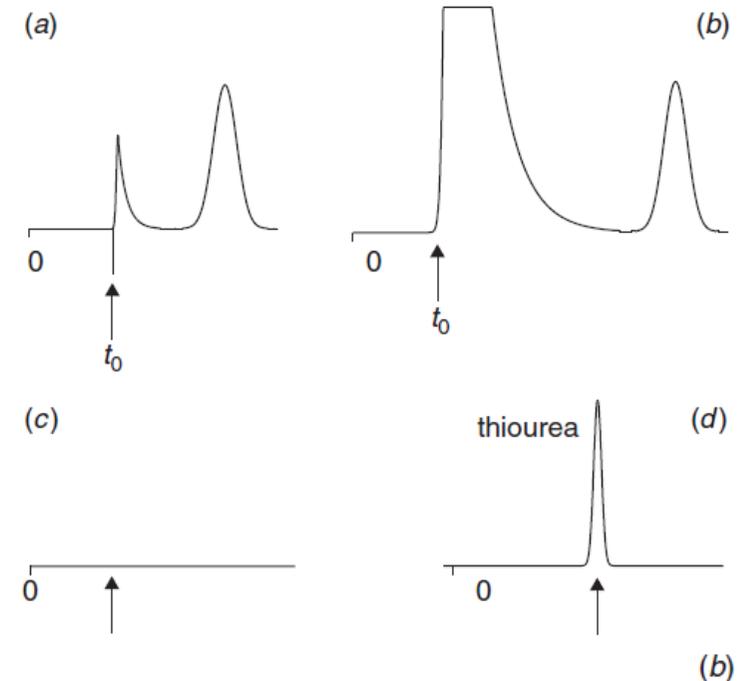
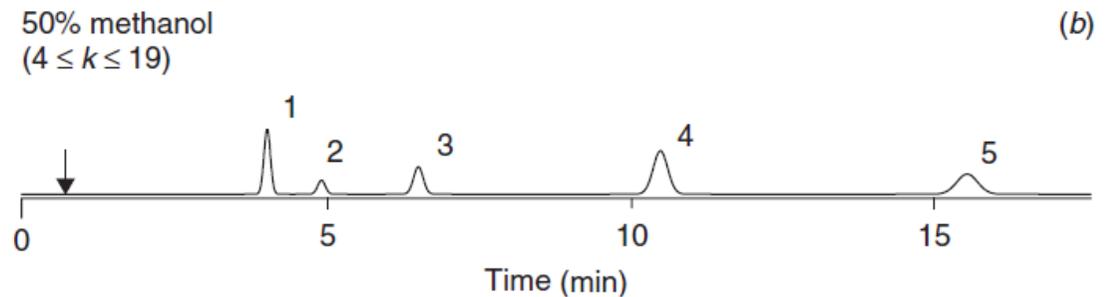
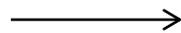
$$t_0 \approx 5 \times 10^{-4} \frac{Ld_c^2}{F} \quad (\pm 10 \%)$$

- d) oder selbst messen: Substanz injizieren, die von Säule nicht zurückgehalten wird ( $k=0$ ), bei  $C_{18}$  Säulen: Thioharnstoff, Uracil

Beispiel für Änderung von k:



- 30 % B



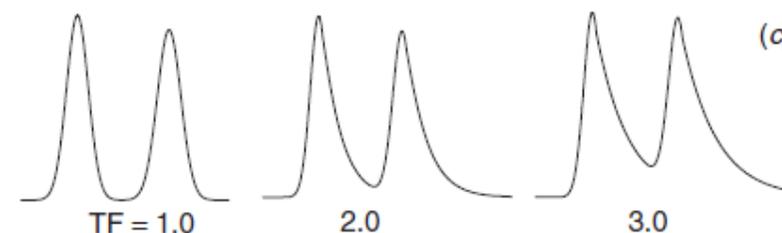
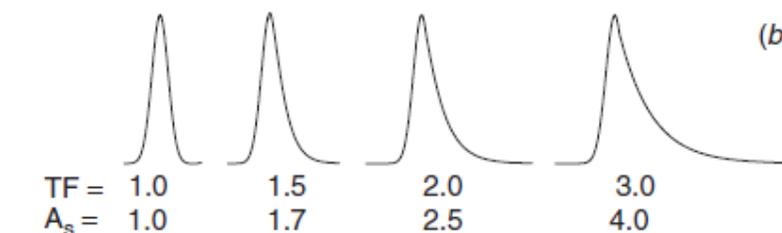
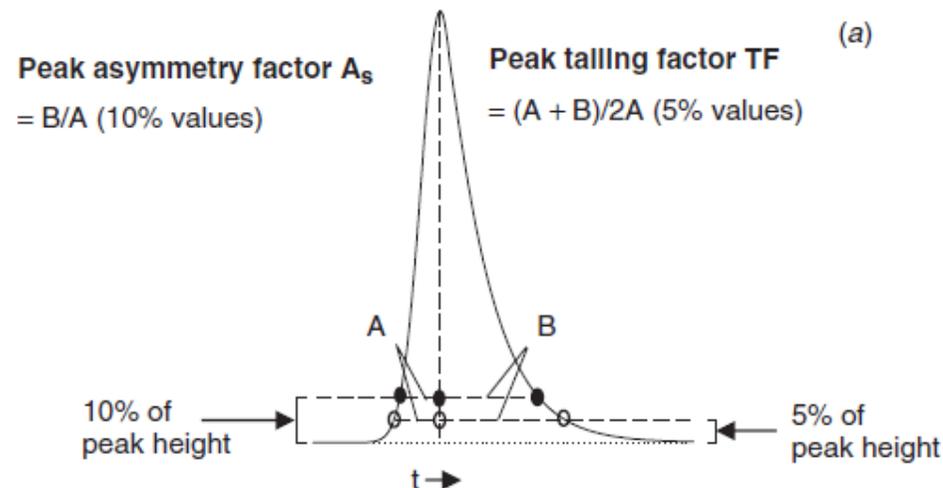
- Der **Asymmetrie-Faktor  $A_s$**  eines Peaks ist Mass für Abweichung von idealer Gauß-Kurve.
- **Tailing-Faktor TF** (wichtig bei automatischer Integration)

$$A_s \approx 1 + 1.5(TF - 1)$$

- Exakt symmetrischer Peak hat  $A_s = 1$  oder  $TF = 1$ .

## Abbildung

- Definitionen der Asymmetrie
- Wie verändert sich Peakform mit zunehmender Asymmetrie
- Effekt des Tailings auf Trennung
- Peak Fronting ( $A_s < 1$ )
- «Tailing» aufgrund von Überladung (extremes Fronting) (verglichen mit exponentiellem Tailing in a)

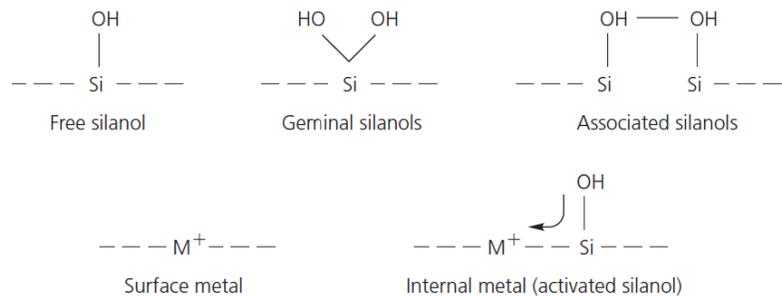


Oftmals ist Tailing venachlässigbar ( $TF < 1.2$ ) und kaum zu sehen, aber  $TF > 2$  nicht überschreiten

## Hauptursachen für Asymmetrie

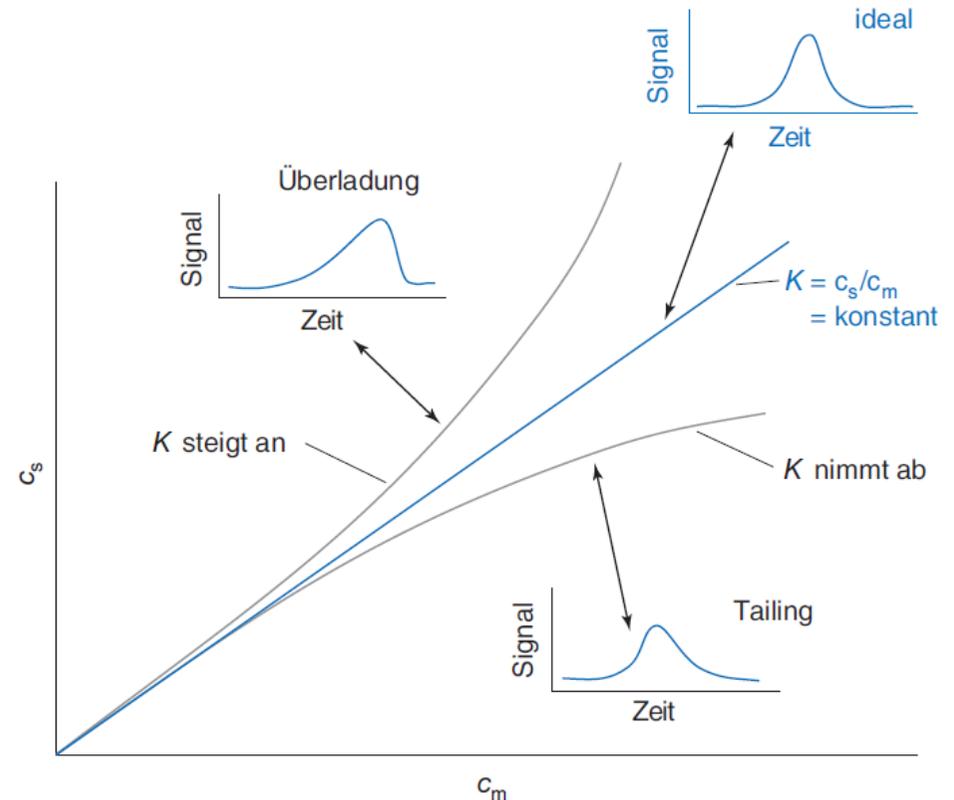
**Fronting:** Maximum des Peaks verschiebt sich nach hinten/rechts im Chromatogramm. Grund ist ein Überladen der mobilen Phase, bei der Probe nicht von Lösungsmittel aufgenommen werden kann und auf Säule kondensiert.

**Tailing:** Maximum des Peaks verschiebt sich nach vorne/links, da eine kleine Menge Analyt stark gebunden wird. Diese sekundären Wechselwirkungen mit der Säule führen zu ungewünschter Retention: z.B. ionische Wechselwirkungen zwischen basischen Substanzen und Silanolen, Metallverunreinigungen. Auch beim Überladen der stationären Phase und falschem, zu starkem Injektionslösungsmittel kommt es zu Tailing.



## Weitere Ursachen für schlechte Peaks:

- Schlechte Säule: verstopfte Fritte oder Hohlräume, verkehrt herum spülen entfernt Verstopfung
- Verunreinigte Säule (stark zurückgehaltene Substanzen haben sich angehäuft)
- Säulenexterne Peakverbreiterung
- Unzureichendes/unpassendes Puffern der Lösungsmittel
- Höhere Säulentemperatur mit kälterer mobiler Phase
- Koelution zweier Peaks kann zu Asymmetrie führen



Aus Harris, Lehrbuch der quantitativen Analyse

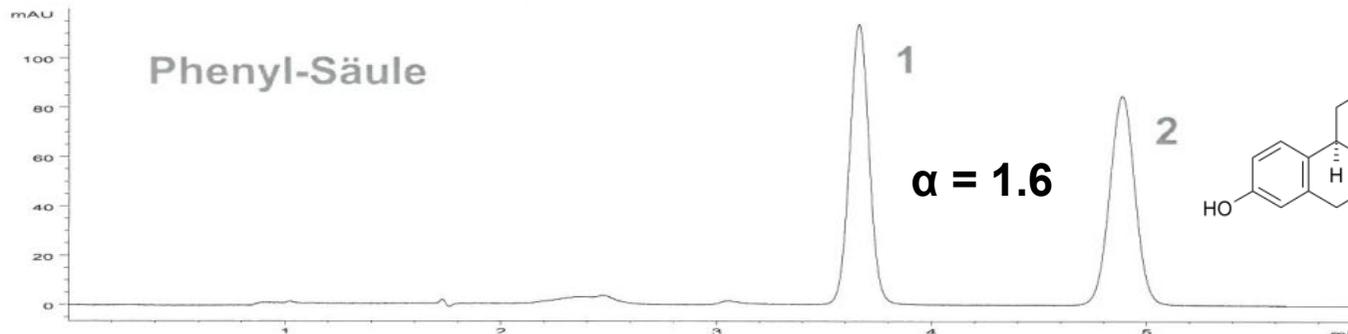
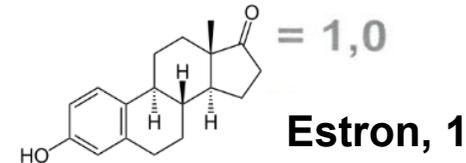
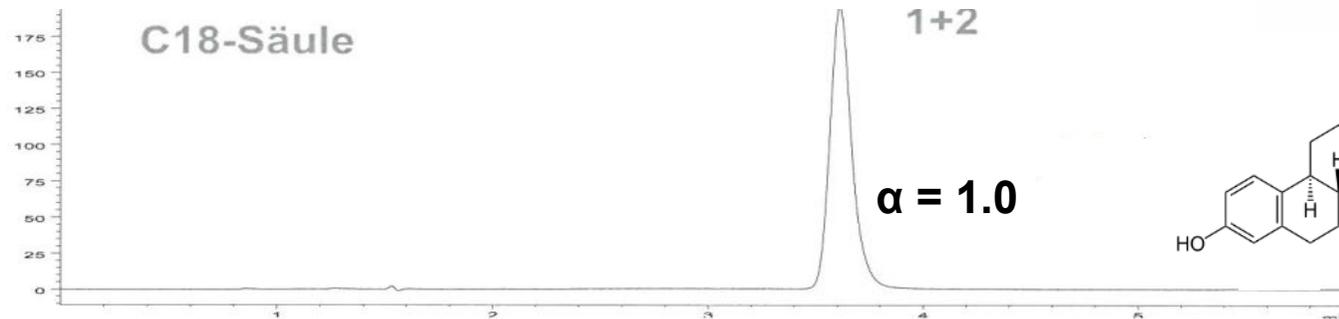
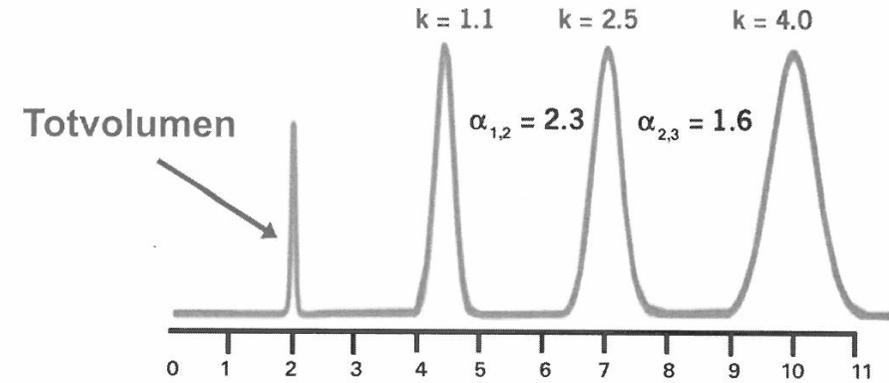
Der **Selektivitätsfaktor  $\alpha$**  ist ein Mass für die Trennbarkeit (basiert auf unterschiedlichen chemischen Wechselwirkungen zweier Analyten mit der stationären Phase).

$\alpha$  wird beeinflusst von:

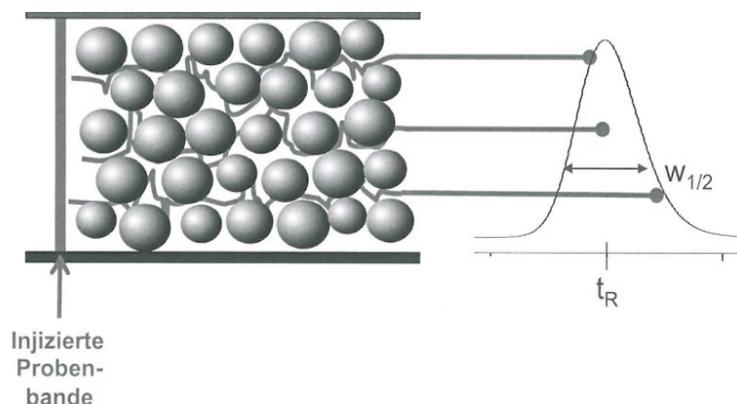
- Stationärer Phase
- Mobiler Phase

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

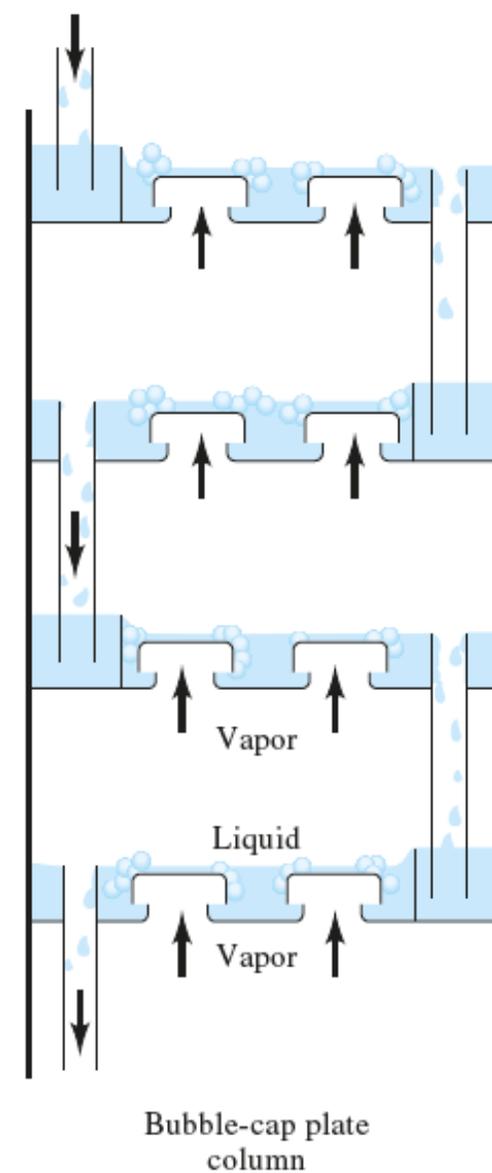
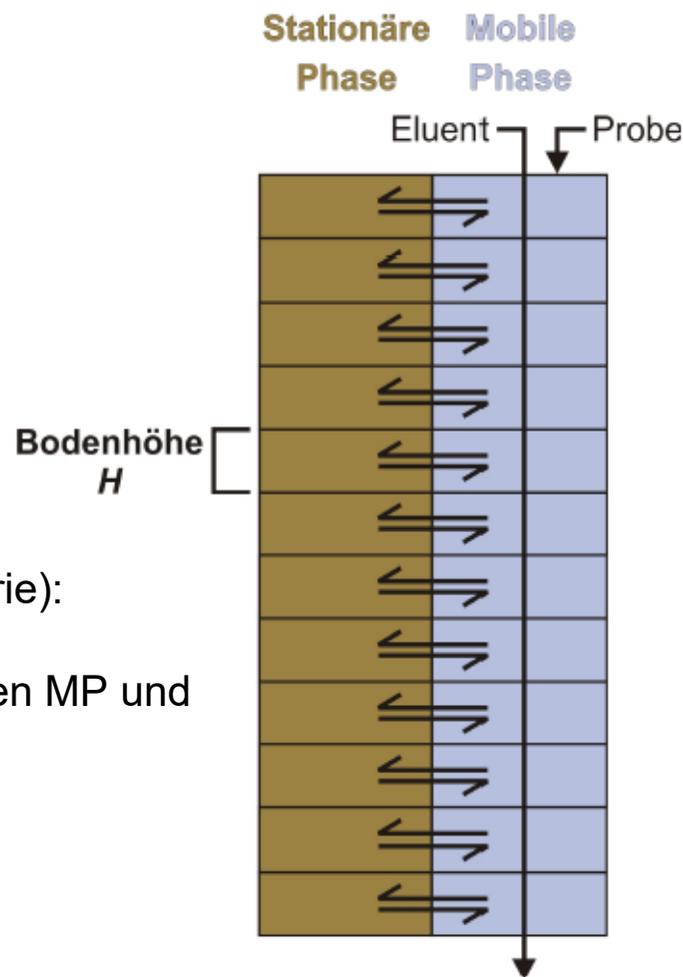
Häufig sind Werte von 1.x - 10



Probe wird als schmale Bande injiziert und kommt so auf das Säulenbett. In Abhängigkeit von verschiedenen Variablen verbreitern sich die Peaks auf der Säule (im Idealfall symmetrisch)



Modell der «**theoretischen Böden**» (Bodentheorie):  
Vielzahl an getrennten Schichten in der Säule (Bodenzahl N), in denen sich Equilibrium zwischen MP und SP einstellen kann.  
Kleine Stufenhöhe führt zu schmälere Peaks.



- Bedingungen für Gleichgewichtseinstellung verändern sich dauernd, da sich mobile Phase kontinuierlich durch Säule bewegt ( $c_m$  verändert sich durch nachkommendes «frisches» Lösungsmittel).
- Peaks werden breiter, wenn Gleichgewichtseinstellungen langsam ablaufen, Gleichgewichtseinstellung:  $LC < GC$ .
- Knackpunkt: geschwindigkeitsbegrenzender (kinetischer) Stofftransport (mass transfer)
- Grösse des Effekts hängt von Dauer möglicher Übergänge zwischen mobiler und stationärer Phase ab → direkt proportional zur Strömungs-(Linear-)geschwindigkeit  $u$  [cm/s]

**Van Deemter Gleichung** berücksichtigt kinetische Effekte des Stofftransports im Verlauf der Chromatographie

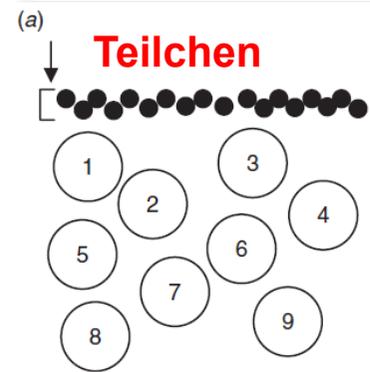
$$H = A + \frac{B}{F} + CF$$

eddy diffusion      longitudinal mass transfer      mobile-phase plus stationary-phase mass transfer

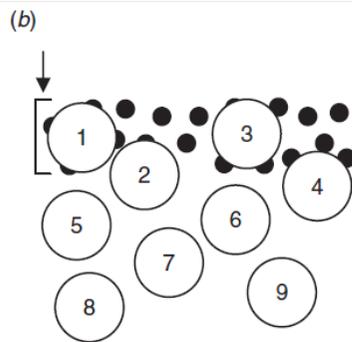
**Bodenhöhe H** (HETP– Höhen-äquivalent eines theoretischen Bodens (engl.: height equivalent to a theoretical plate)): beeinflusst durch A, B und C

Säuleneffizienz **N** = **L/H** (längere Säule hat mehr Böden, höheres N)

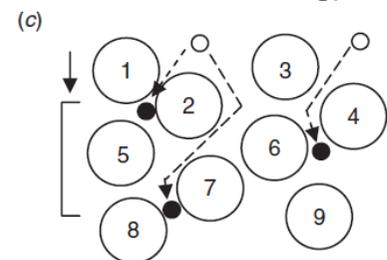
# Unerwünschte Peakverbreiterung



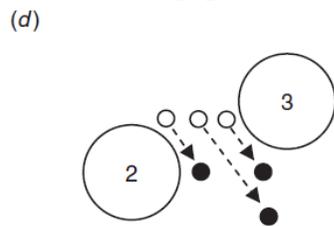
**Probeninjektion (säulen-externe Verbreiterung)**



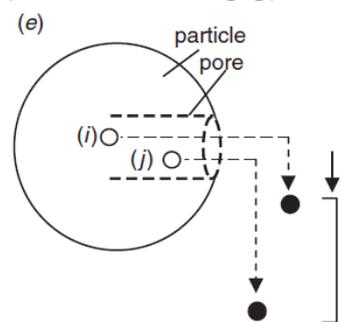
**Longitudinale Diffusion (zeitabhängig)**



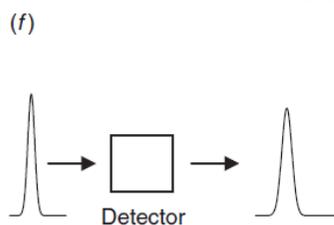
**Eddy Diffusion (flussunabhängig)**



**Stofftransport in der mobilen Phase (flussabhängig)**



**Stofftransport in der stationären Phase (flussabhängig)**



**Detektor und Kapillaren (säulenexterne Peakverbreiterung)**

**Ziel:** möglichst enge Banden erreichen!

Aber, je länger sich eine Substanz auf Säule befindet (je höher Retentionszeit), desto stärker ist Peakverbreiterung.

- a) Verbreiterung vor Säule meist vernachlässigbar (Säulenexterne Verbreiterung)
- b) **Longitudinale Diffusion (B)** (zeitabhängig und damit flussabhängig)
- c) **Eddy Diffusion (A)** (flussunabhängig)
- d) **Massentransport in der mobilen Phase (C)** (flussabhängig)
- e) **Massentransport in der stationären Phase (C)** (flussabhängig)
- f) Säulenexterne Bandenverbreiterung diesmal wichtig, da Trennung durch Diffusion wieder verwischt (Fluss durch Detektor und Kapillare)

# Van Deemter Gleichung genauer

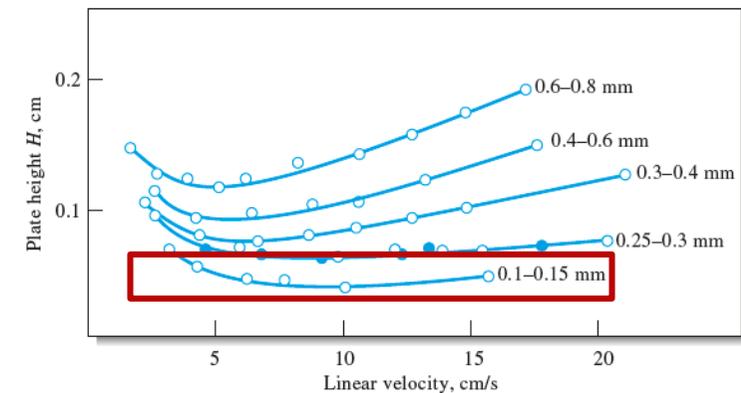
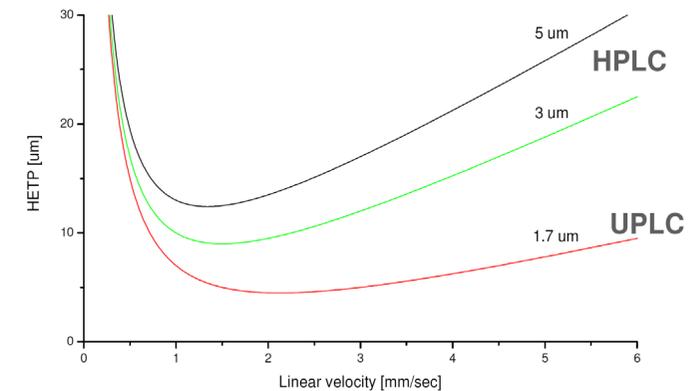
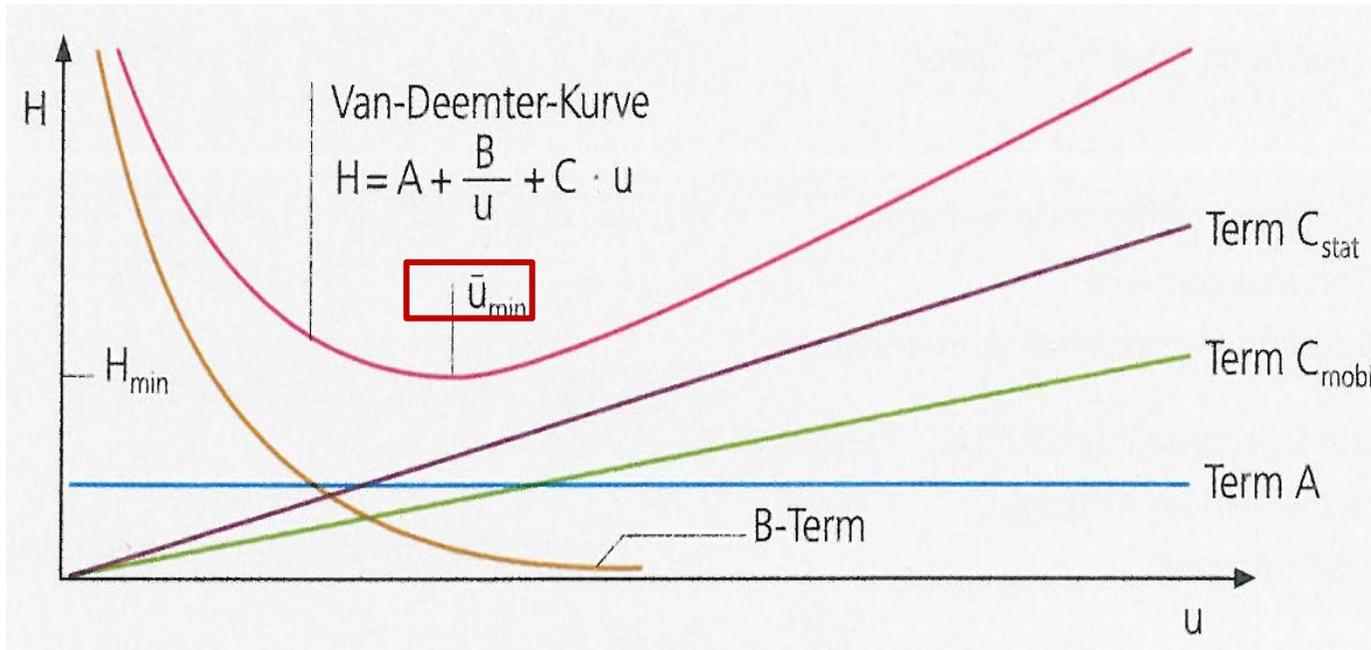
Longitudinale Diffusion

Massentransferterm der  
stationären Phase

$$H = 2\lambda d_p + 2GD_m/\mu + \omega(d_p)^2\mu/D_m + Rd_f^2\mu/D_s$$

Eddydiffusion

Massentransferterm der  
mobilen Phase



Zusammenhang zwischen Bodenhöhe H (y-Achse) und Fließgeschwindigkeit (x-Achse), je kleiner Teileffekte A, B und C, desto besser für Effizienz (Minimum, kein Nullpunkt)

Kleinere Partikelgröße führt zu kleinerem H, aber Rückdruck ist limitierender Faktor. Je kleiner die Dimensionen der Partikel, desto breiter wird auch das Optimum.

# Van Deemter Gleichung Schlussfolgerungen

- Faktor A und B wirken dem eigentlichen Trennungseffekt C entgegen. Es kommt zu einer teilweisen Rückvermischung durch Diffusionsprozesse.
- Der Stofftransport benötigt eine gewisse Zeit, weshalb geringe Flussraten diesen begünstigen, aber auf der anderen Seite sind auch die gegenläufigen Diffusionsprozesse sehr gross.

H wird **beeinflusst** durch

- ⇒ • Strömungsgeschwindigkeit u (Flussrate), diese hat Optimum (eventuell ein breites)
- ⇒ • Art der Teilchen, Packungshomogenität (Säulenwahl, Durchmesser)
- ⇒ • Partikelgrösse (= Säulenwahl)  
schlecht: grössere Partikel mit grösserem internen Volumen → Vielfältigkeit der Pfade, stagnierende Bereiche mobiler Phase ergibt höheres H
- ⇒ • Diffusionskoeffizienten in der mobilen Phase (abhängig von Viskosität der mobilen Phase und von Temperatur im Säulenofen/System); je höher, desto besser

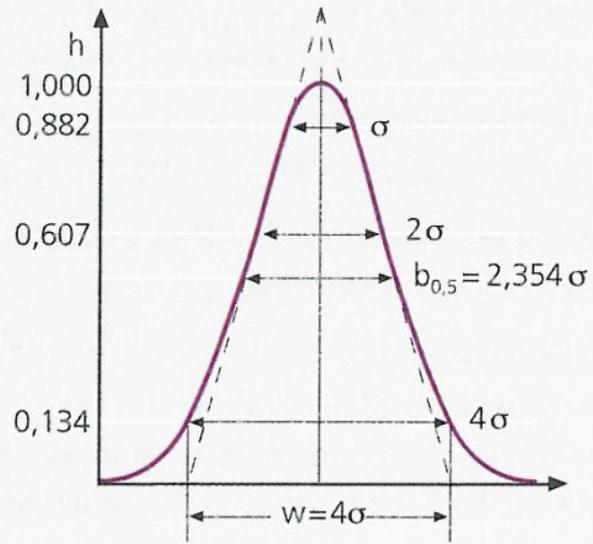
Bei mittleren Strömungsgeschwindigkeiten:

Funktion nähert sich dem Term A an, das heisst Güte der Packung und Teilchendurchmesser dominieren

Mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit:

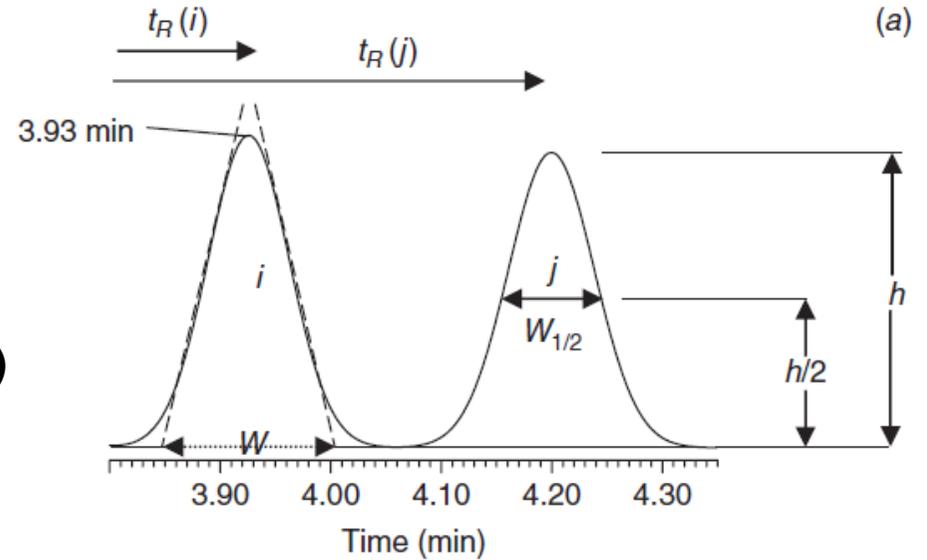
Einfluss von Term C nimmt zu. Ist diese lineare Kurve besonders steil, dann ist der Stofftransport (Massentransfer) behindert (hängt mit Partikelgrösse zusammen).

2. Gauß-Kurve



$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (6)$$

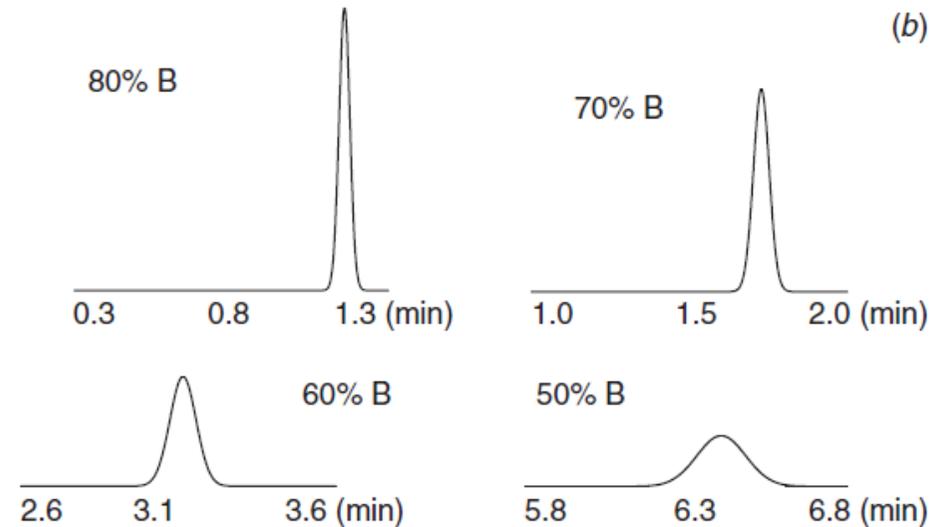
$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (6a)$$



Je höher die Säuleneffizienz N, desto schärfer der Peak und desto besser die Trennung

Peakbreite aus dem Chromatogramm lesen:  
An der Basislinie:  $N =$

Oder genauere Integration bei halber Höhe (Full width half maximum FWHM):  
 $N =$

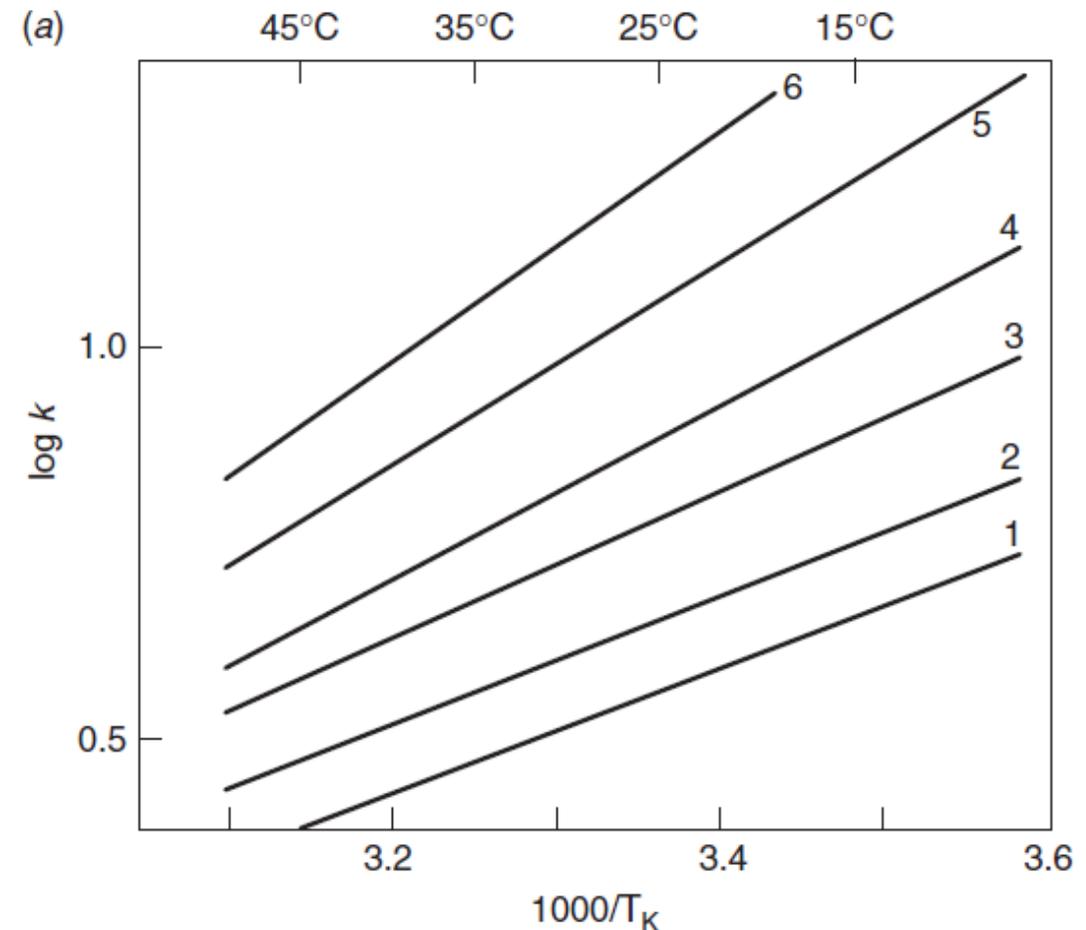


- Abnahme von  $k$  mit steigender Temperatur
- Temperatur bewirkt schnellere Diffusion: höheres  $N$  bei höherer Temperatur wegen höherem Diffusionskoeffizienten
- Druck sinkt mit steigender Temperatur  
höherer Fluss bei gleichem Druck
- Führt im Prinzip zu geringeren Laufzeiten
- Peaks eluieren aber auch früher – Trennung wird schlechter. Selektivität nimmt ab und wird irgendwann ungenügend (Peakkapazität).
- Säulenqualität (und Substanzempfindlichkeit) leiden bei höheren Temperaturen ( $> 60\text{ °C}$ ).

Beispiel Trennung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Lineare Abnahme von  $\log k$  mit steigender Temperatur

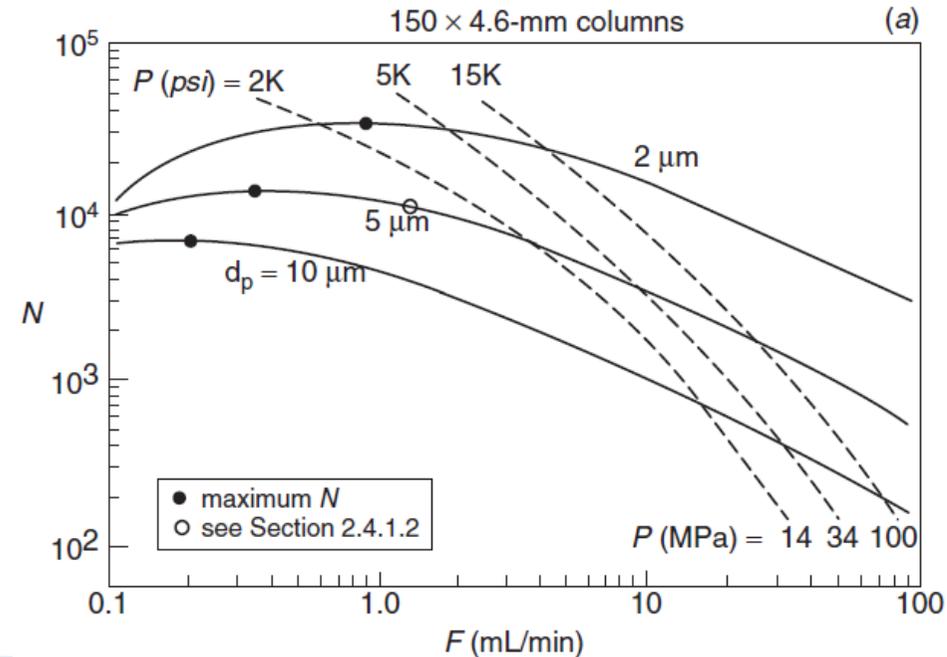
(1: Anthracen; 2: Fluoranthen; 3, Triphenylen;  
4: Chrysen; 5: 3,4-Benzofluoranthen;  
6: 1,2,5,6-Dibenzoanthracen)



# Flussrate und Partikelgrösse (und Druck) Einfluss auf Bodenzahl

- Optimum: N steigt erst an (Start bei 0.1 mL/min), fällt dann mit zunehmender Flussrate F ab.
- Maximale Werte bei 0.2 bis 1 mL/min, abhängig von  $d_p$  (Partikeldurchmesser, 2, 5 und 10  $\mu\text{m}$ )
- Flussrate um Faktor drei erhöhen:
  - N sinkt um 20 %
  - Analysenzeit sinkt auch um Faktor 3. (oft wird Flussrate  $> F_{\text{opt}}$  gewählt)
- Partikelgrösse verkleinern:
  - N steigt,
  - Druck steigt von 137 bar zu  $> 1000$  bar, abhängig von Qualität der Packung und Packungs-Morphologie.

Annahme: MP 50% ACN/H<sub>2</sub>O, 30 °C, 200 Da MW

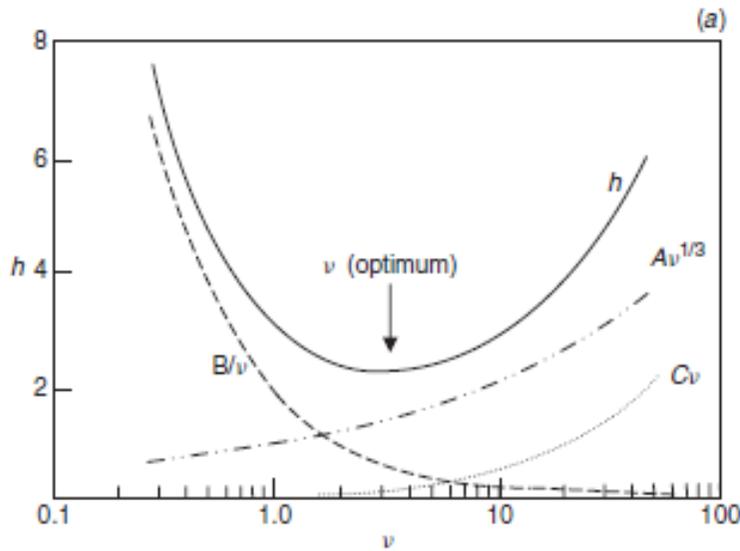


$$\text{Säulendruck } P = f \frac{u_x \eta L}{\pi r^2 d_p^2}$$

Tabelle 24.1 Trennleistung als Funktion des Teilchendurchmessers

Teilchengrösse, $d_p$ , $\mu\text{m}$	Retentionszeit (min)	Bodenzahl ( $N$ )	Erforderlicher Druck (bar)
5.0	30	25 000	19
3.0	18	42 000	87
1.5	9	83 000	700
1.0	6	125 000	2 300

Grösse	Effekt auf $F_{opt}$ (F für maximales N)	Effekt auf N und P, wenn Grösse $\uparrow$ (Annahme: $F_{opt}$ für maximales N)
Säulenlänge $L \uparrow$	Keinen	$N \uparrow$ und $P \uparrow$ proportional zum Anstieg von $L$
Säulendurchmesser $d_c \uparrow$	$F_{opt} \propto d_c^2$	Keinen, wenn $F$ proportional zu $d_c^2$ erhöht wird
Partikelgrösse $d_p$ der Säule $\uparrow$	$F_{opt} \propto 1 / d_p$	$N \downarrow$ und $P \downarrow$ (Abb. Folie 22)
Flussrate der mobilen Phase $\uparrow$	Keinen	$N \downarrow$ und $P \uparrow$ (Abb. Folie 22)
Viskosität der mobilen Phase $\eta \uparrow$	$F_{opt} \downarrow$ bei $\eta \uparrow$	$N \downarrow$ ( $D_m$ sinkt) und $P \uparrow$ (nur $P$ steigt proportional)
Temperatur $T$ (K) $\uparrow$	$F_{opt} \uparrow$ bei $T \uparrow$	$N \uparrow$ ( $D_m$ steigt) und $P \downarrow$ ( $\eta$ sinkt)
Molekulargewicht $M$ der Probe $\uparrow$	$F_{opt} \propto M^{-0.6}$	$N \downarrow$ , keinen Einfluss auf $P$

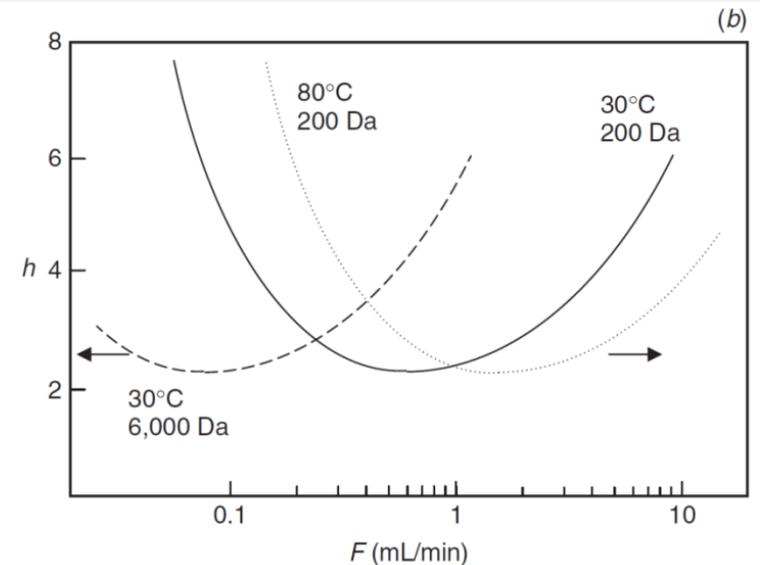


Knox-Gleichung:  
Formel für Praktiker

$$h = Av^{0.33} + \frac{B}{v} + Cv$$

$$v = \frac{u_e d_p}{D_m}$$

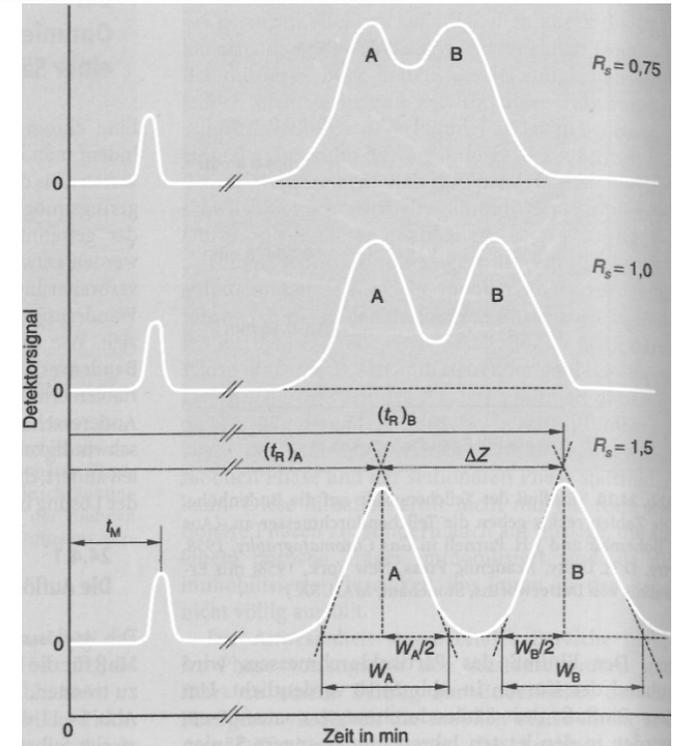
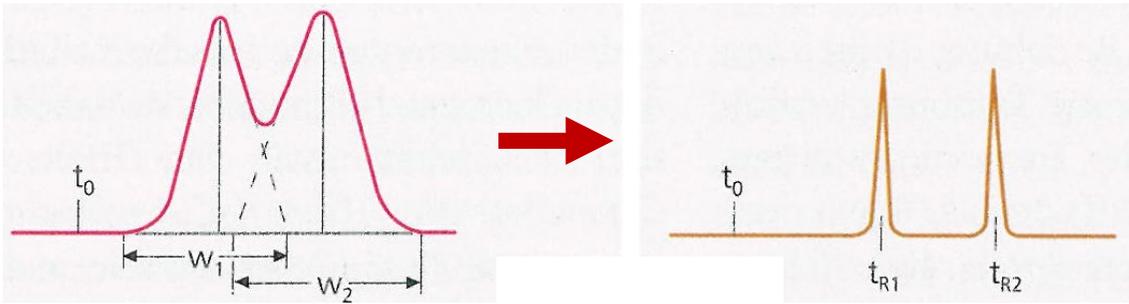
$$h = \frac{H}{d_p}$$



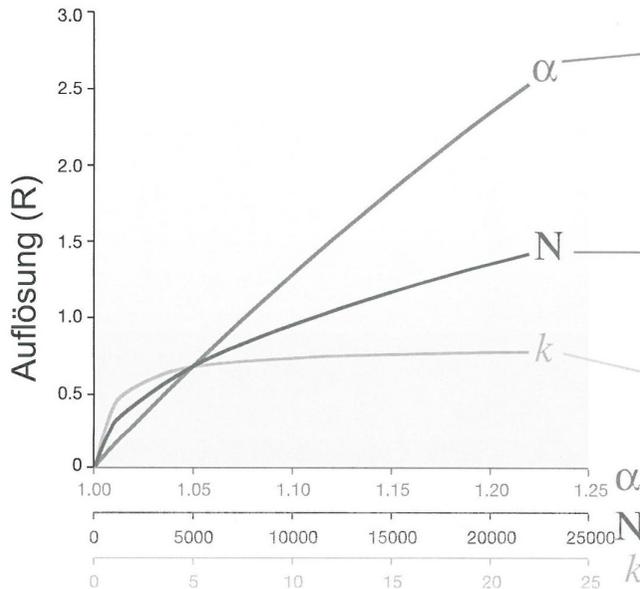
## Wichtigstes Kriterium!

Ziel: Substanzen einer Probe voneinander trennen.

$$R_s = \frac{2[t_{R(j)} - t_{R(i)}]}{W_i + W_j}$$



## Auflösung: Retentionszeitdifferenz/Peakbreite



Wichtigster Faktor mit grössten Effekten

Stetige Zunahme

Ab einem k von 10 ist Trennung ineffektiv, nur noch unerwünschte Bandenverbreiterung durch Diffusionseffekte

- $R_s = 0.75$  andeutungsweise Trennung
- $R_s = 1$  Peak A enthält etwa 4 % von B
- $R_s = 1.5$  Basislinientrennung, nur 0.3 % Überlappung (bei gleich grossen Peaks)

# Auflösung Peakgrösse, Tailing

Zur Verbesserung der Auflösung entweder:

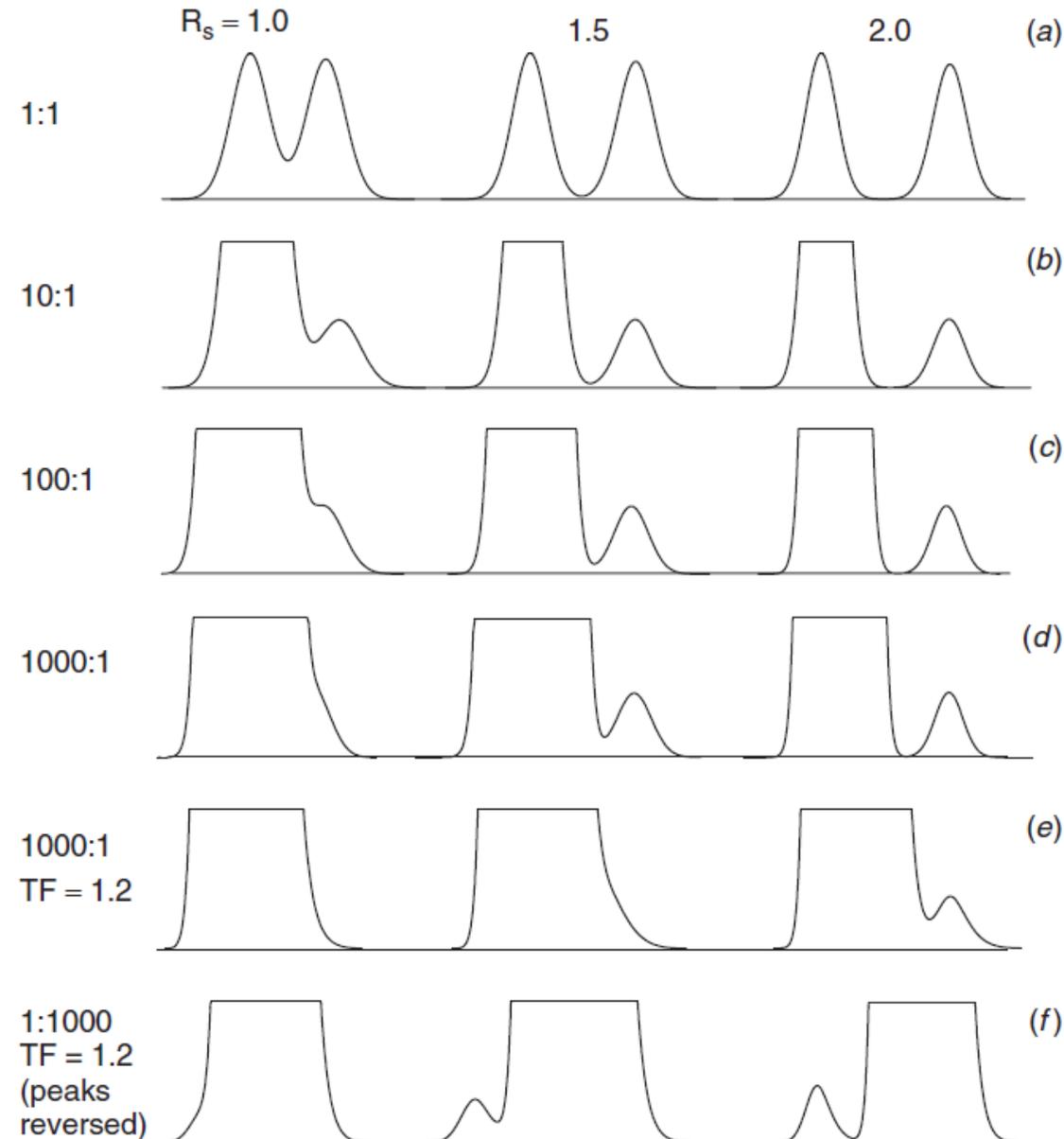
- Unterschied in RT erhöhen
- Schmälere Peaks

Bild: Trennung als Funktion der Auflösung bei unterschiedlichen Grössenverhältnissen der Peaks

a-d) Peakbreite variiert von 1 : 1 bis 1000 : 1,  
Bei  $R_s > 1.5$  und  $TF = 1$ :  
immer relativ wenig Überlappung  
(unabhängig von der relativen  
Peakgrösse)

e) Peaktailing ( $TF = 1.2$ ),  $R_s > 2$  nötig.

f) Da  $TF = 1$  fast unmöglich ist:  
versuchen den kleinen Peak  
vor den grossen zu kriegen.

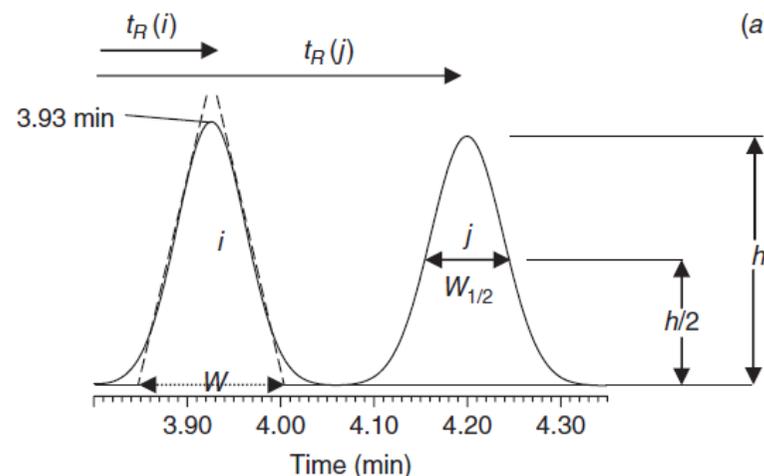


Auflösung ausgedrückt als Funktion des Retentionsfaktors bezogen auf den zweiten Peak (a), den Selektivitätsfaktor (b) und die Säuleneffizienz oder Bodenzahl N (c).

$$R_s = \frac{1}{4} \left[ \frac{k}{1+k} \right] \left[ \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] N^{0.5}$$

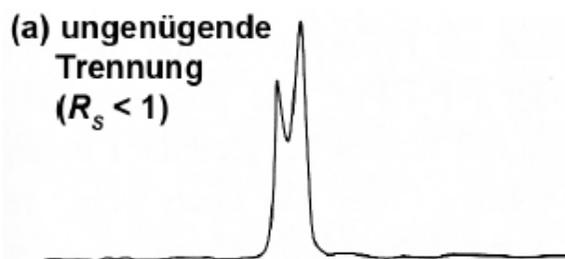
(a)            (b)            (c)

Beispiel: Berechnen Sie die Auflösung ( $t_{R2} = 4.19$  min) wenn  $k \equiv k_2 = ?$ ,  $\alpha = 1.12$ ,  $N = ?$   
 $t_0 = 1.1$  min



## Beispiele

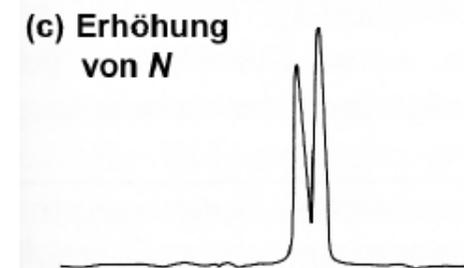
a) Ausgangslage:  
Keine Trennung



b)  $k \propto t_R$   
längere Methode fahren:  
Peaks getrennt, werden aber breiter.

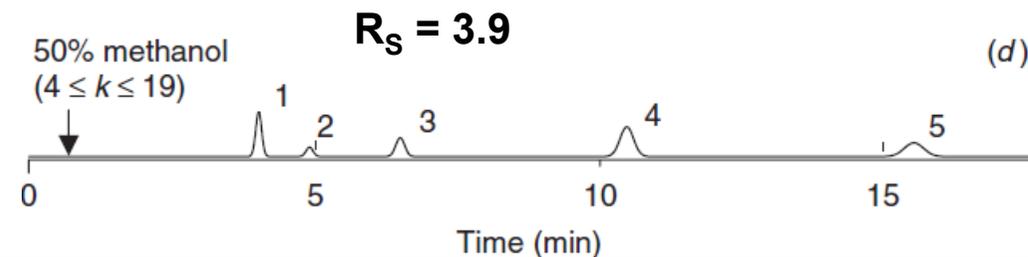
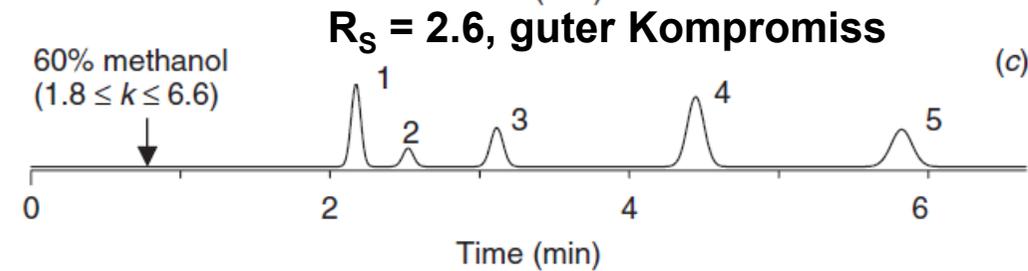
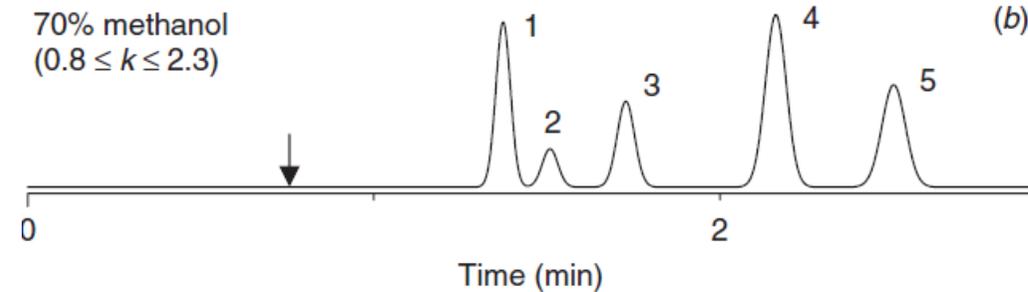
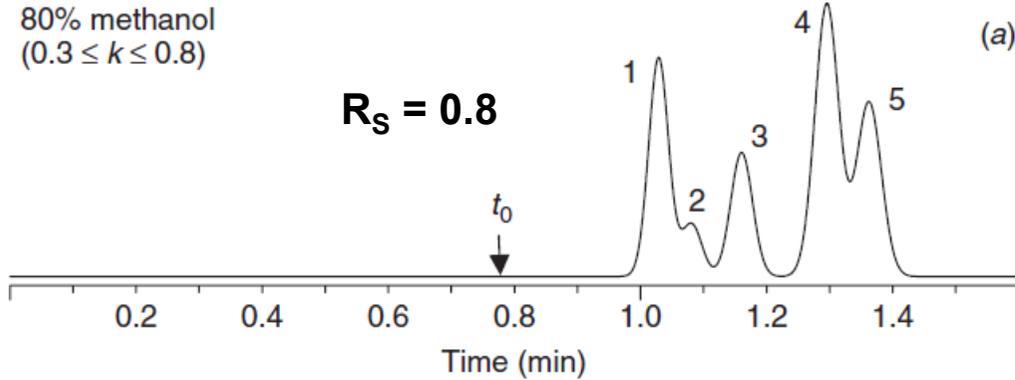
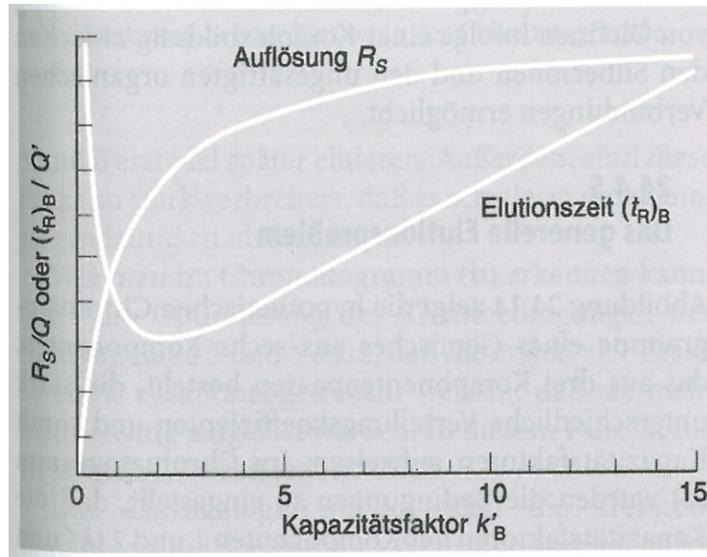
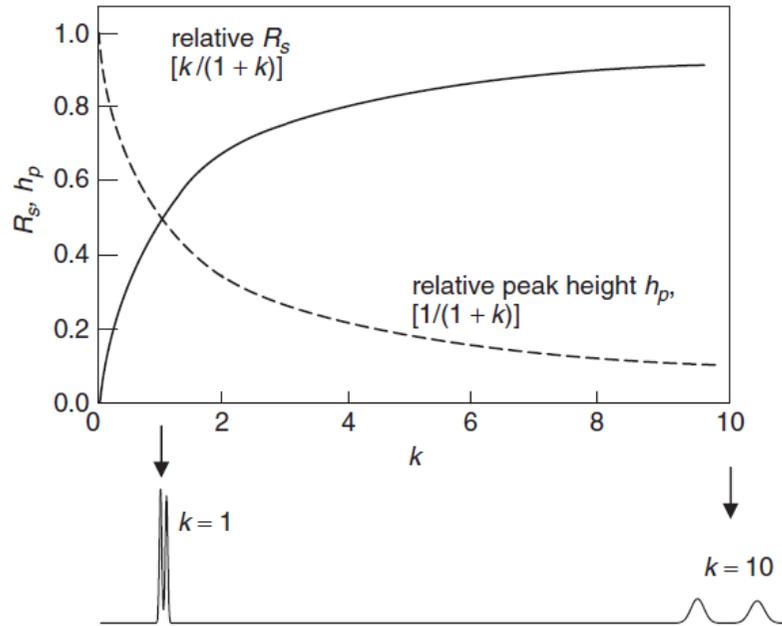


c)  $N \propto \frac{1}{d_p}$   
Säule mit kleineren Partikeln: bessere Trennung und Retention bleibt gleich



d)  $\alpha \propto \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$   
andere Säule einbauen





## Warum **isokratische Methoden**?

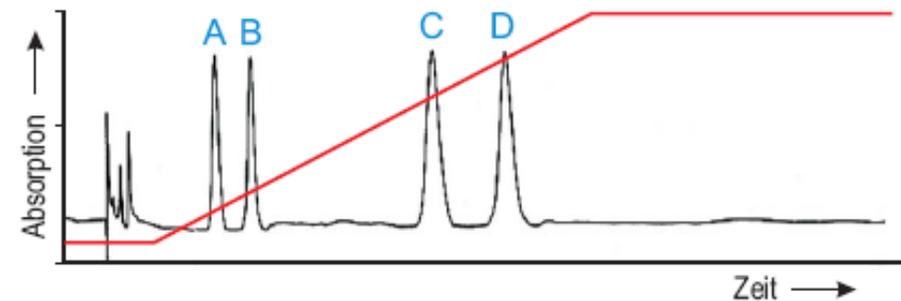
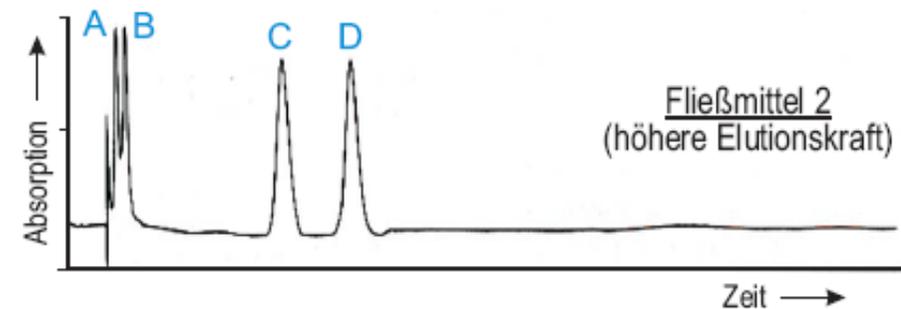
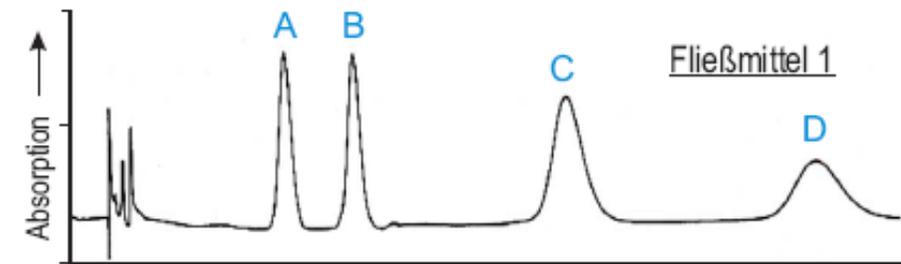
- Sind die einfachsten Anwendungen von HPLC
- Für einige Probleme absolut ausreichend
- Stabiler und leichter auf andere Geräte übertragbar
- Geringste Anforderungen ans Gerät

## Vorgehensweise Optimierung isokratischer Methoden

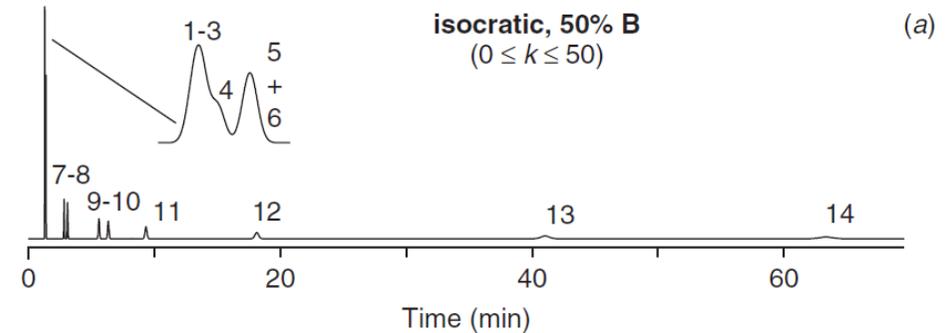
- Geeignete Säule wählen mit genügend grosser Bodenzahl ( $N \approx 10000 \triangleq$  Säulenlänge  $L = 100$  mm,  $d_p = 3$   $\mu$ m)
- Anpassen von %B, um einen passenden Bereich für die Retentionsfaktoren zu finden ( $1 \leq k \leq 10$ ).
- Optimieren der Selektivitätsfaktoren
- Anpassen von N, um höhere Auflösung gegen kürzere Laufzeit abzuwägen

**Gradientenelution** weil isokratische Methoden ihr Limit haben, Speziell bei  $k > 20$  ist eine Trennung nicht mehr möglich

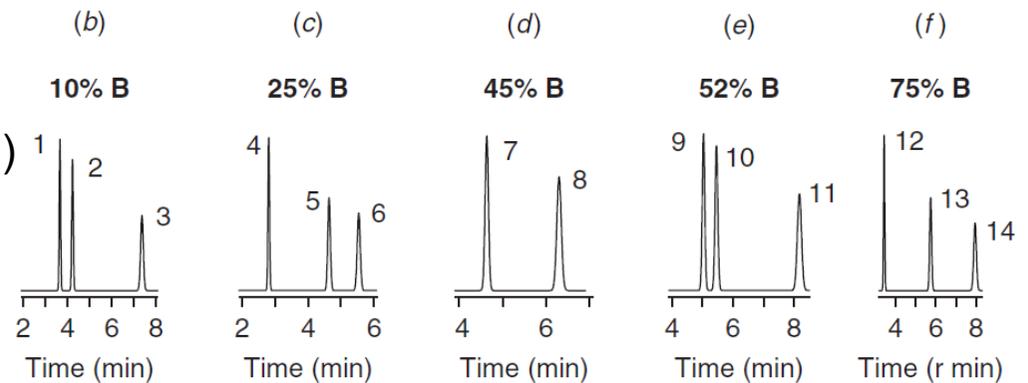
- beinhaltet eine fortlaufende Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase.
- Elutionskraft wird kontinuierlich erhöht, führt zu Basislinientrennung (Auflösung) der 9 Substanzen. Ist Standard in Chromatographie



a) Keine Trennung möglich bei  $k = 50$ , 14 Substanzen in einem Lauf mit schlechtem Signal (13 und 14).

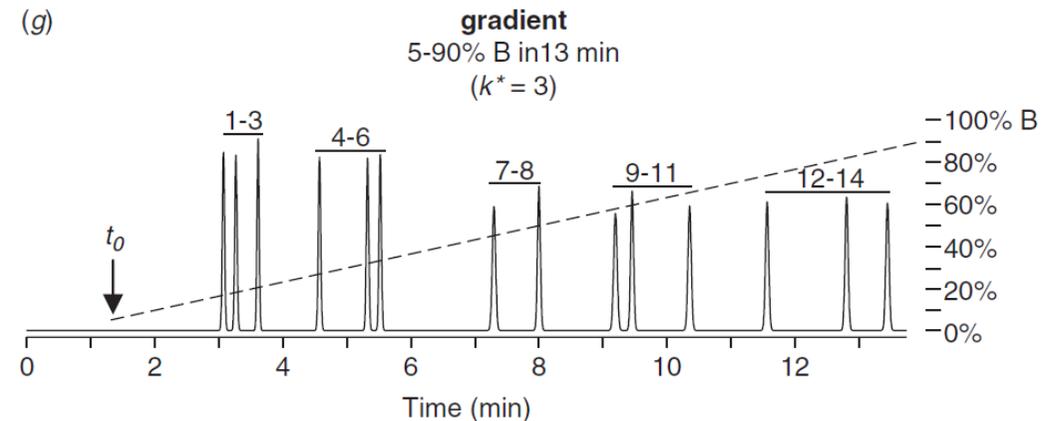


b) bis f) Trennung von benachbarten Gruppen bei unterschiedlichen Lösungsmittelzusammensetzungen führt zu einer guten Auflösung. Für alle Peaks beträgt der  $k$ -Wert bis zu 3.



Demnach führt die separate Betrachtung von nur einem Bruchteil der Substanzen zu einer guten Trennung ( $R_S > 2$ ) in einer angemessenen Elutionszeit (8 Minuten).

g) Die Gradientenelution ist ein Möglichkeit, die Vorteile der isokratischen Separationen (b-f) in einem einzigen Durchgang zu realisieren.



Peakhöhe und  $k$ -Werte in der Gradientenelution sind tendenziell für alle Peaks im Chromatogramm ähnlich.

Andere Gründe für die Gradientenmethode:

Analyt hat hohes Molekulargewicht: Die Retention von Peptiden oder Proteinen kann extrem empfindlich auf kleine Veränderungen in %B reagieren. Oft auch über weiten Bereich von  $k$  verteilt, bleiben manchmal sogar ganz auf der Säule.

Standardmethode: Reaktionskontrolle oder Probe unbekannter Zusammensetzung. Anwendung von Standardgradient, um zu sehen, was sich in der Probe befindet. Oft kombiniert mit Massenspektrometrie zur Identifikation.

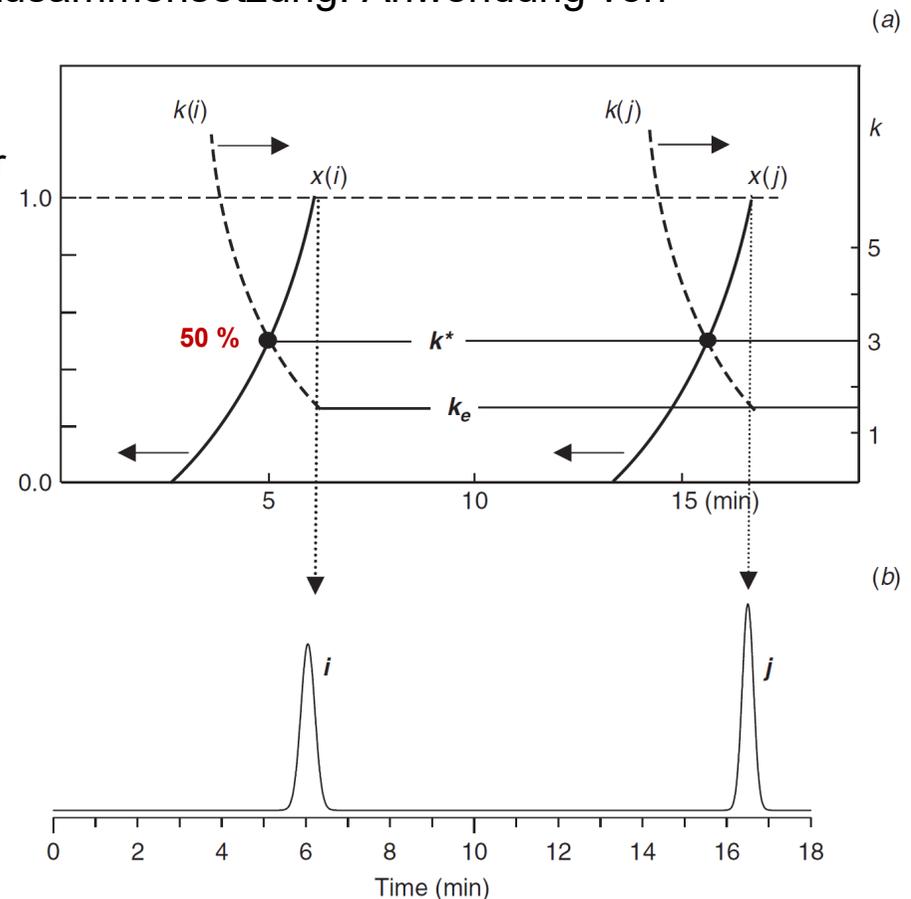
Effizientere HPLC-Methodenentwicklung: weniger Trial-and-Error bei der Suche nach einer geeigneten Methode

Weniger Probenvorbereitung: Verschmutzte Proben direkt auf Säule, keine Notwendigkeit störende Substanzen zu entfernen (carry over).

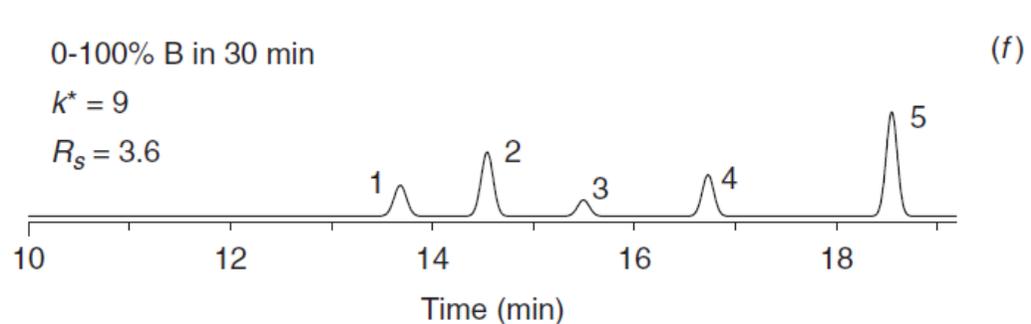
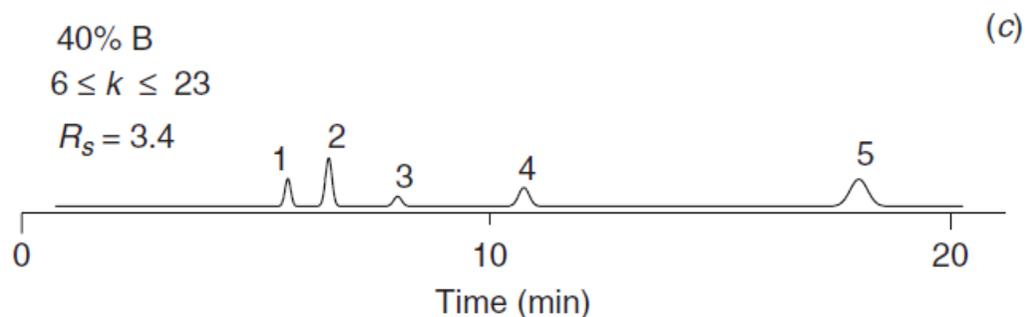
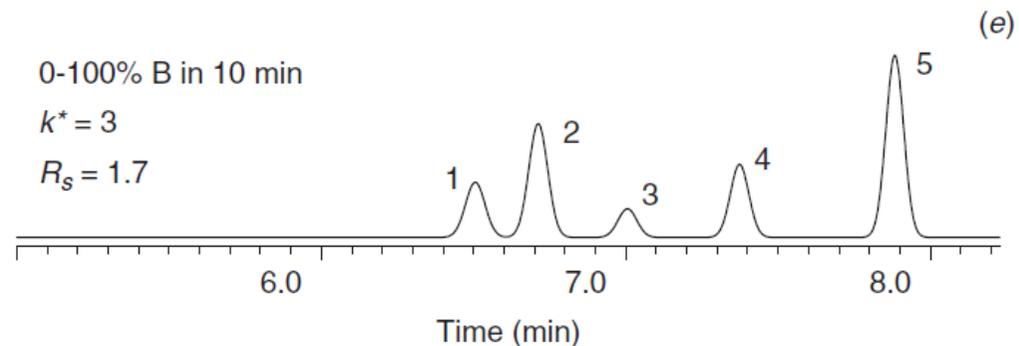
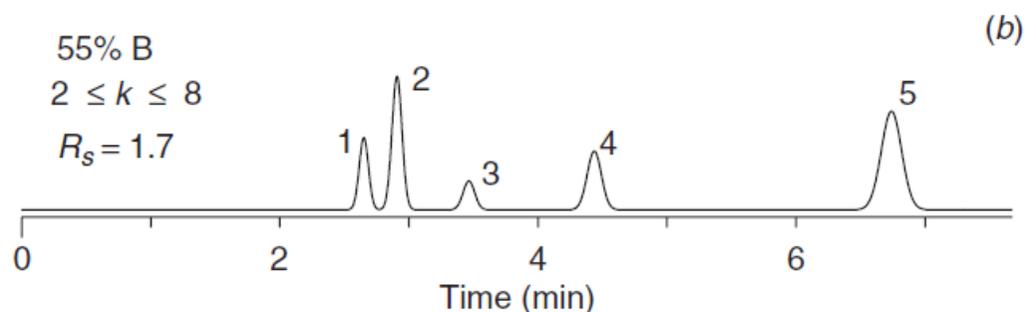
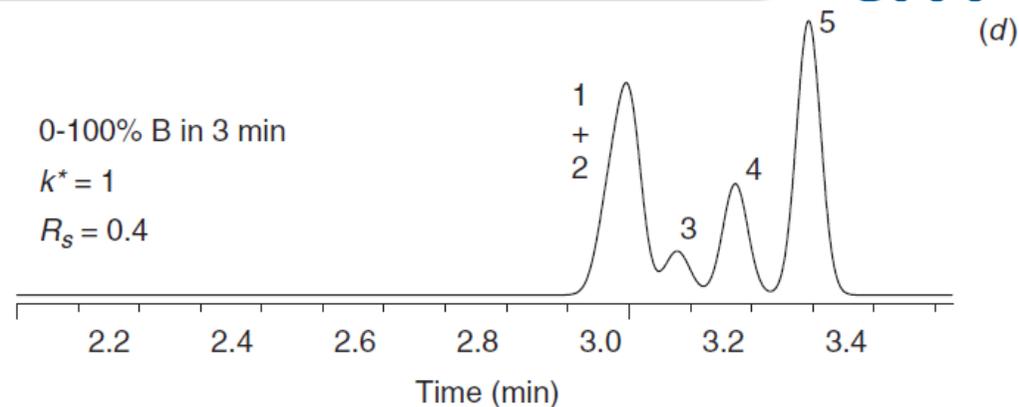
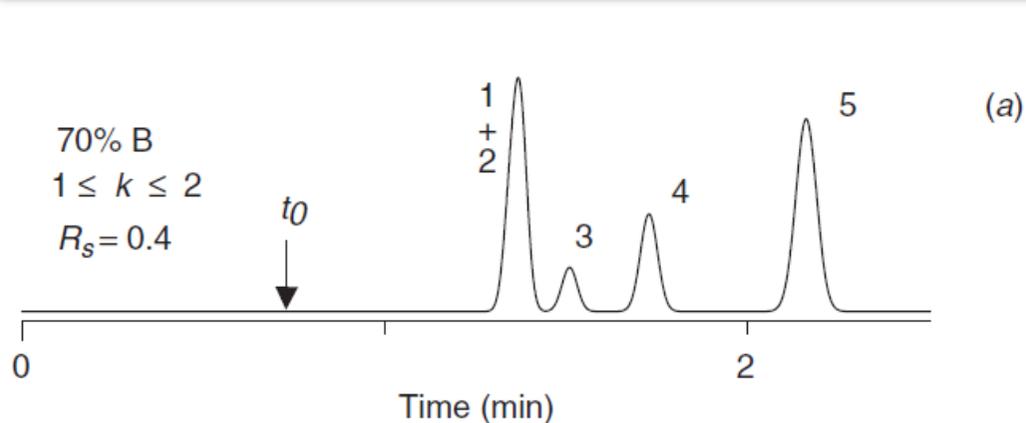
Peak Tailing: Die Elutionskraft der MP nimmt mit der Zeit zu. Dadurch bewegt sich der Tail des Peaks schneller als die Front, was zu einer Verringerung des Peaks und der Peakbreite führt: peak compression.

Gradienten-retention factor:  $k^*$  ist der Medianwert von  $k$  während der Gradienten-Elution auf halbem Weg durch Säule, ähnlich wie  $k$  bei der isokratischen Elution.

$$k^* = \frac{0.87t_{GF}}{V_m \Delta \phi S}$$



# Gradientenelution

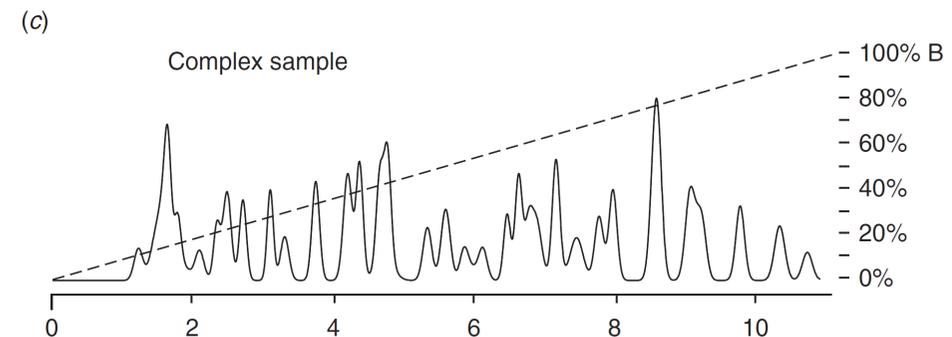
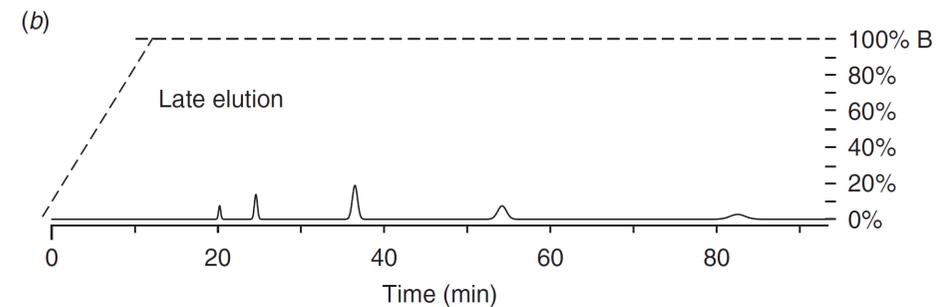
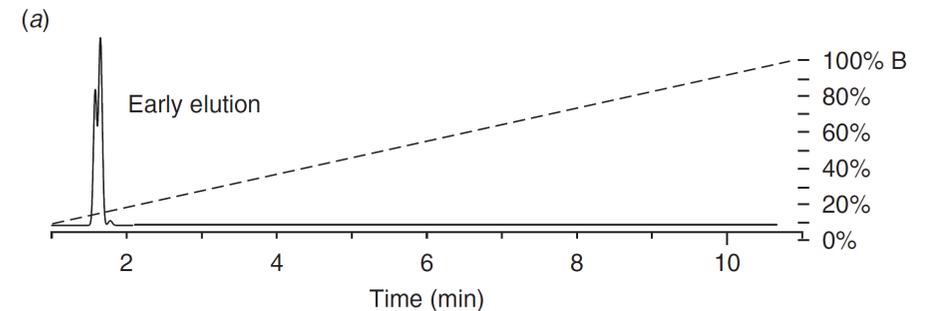


Die Auflösung steigt mit niedrigeren Werten von % B bei isokratischer Elution sowie mit flacheren Gradienten.

- Nicht-zurückhaltende Probe: Substanzen eluieren bereits zu Beginn des Gradienten, sehr polare Verbindungen in RPC. Reduzieren Sie % B oder isokratischen Halt beim Start. Besser go for HILIC.
- Übermäßig zurückgehaltene Probe: Späte Elution bei 100 % B. Ersetzen Sie B durch stärkeres Elutionsmittel. Besser go for nichtwässrige RPC.
- Stark verschmutzte Probe: Komplexe Proben mit >15 Komponenten können zu überfüllten Chromatogrammen führen. Für solche Proben ist es unwahrscheinlich, dass eine einzige Umkehrphasentrennung in der Lage sein wird, alle Peaks zu trennen. Besser go for 2D.

## Weitere Probleme:

- Lösungsmittelentmischung: bei der das B-Lösungsmittel auf SP bleibt, nur geringes Problem in RPC
- Ghost Peaks: können Verunreinigungen in MP-Lösungsmitteln, Puffern oder Additiven sein. Kann auch eine carry-over bedeuten.
- Baseline Drift: die sich aus Unterschieden in der Detektorreaktion für das A- und B-Lösungsmittel ergibt.



# Vergleich mobiler Phase Methanol gegen Acetonitril

## UV Absorption:

geringere Absorption bei Acetonitril

Solvents	Absorbance at Indicated Wavelength (nm)								
	200	205	210	215	220	230	240	250	260
Acetonitrile	0.06	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methanol	1.0+	1.0	0.53	0.35	0.23	0.10	0.04	0.02	0.01

## Viskosität:

Beim Methanol steigt Viskosität (und damit Druck) durch Mischen mit Wasser erst an, bevor bei noch höherem Methanolanteil eine Abnahme eintritt.

Durch veränderten Druck wird auch der Spray zum MS beeinflusst.

T °C	%B										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MeOH	0.79	1.04	1.23	1.36	1.43	1.43	1.36	1.21	1.01	0.76	0.51
ACN	0.79	0.90	0.87	0.86	0.80	0.74	0.65	0.52	0.45	0.43	0.32

## Dichte:

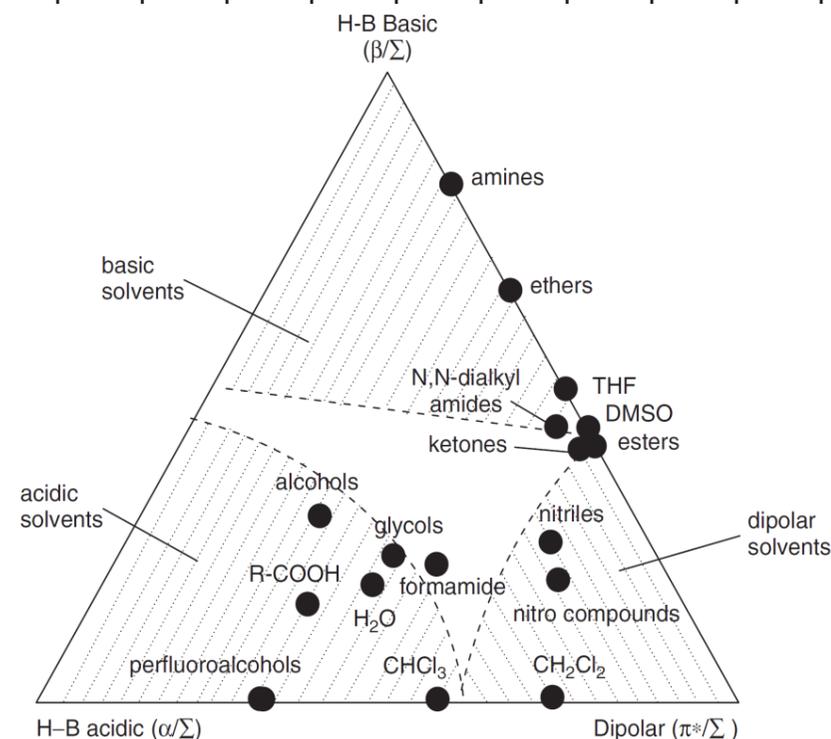
Solvent	Density at Temperature (g/mL)		
	20°C	22°C	25°C
Acetonitrile	0.7822	0.7800	0.7766
Methanol	0.7913	0.7894	0.7866

## Lösungsmittelstärke (gegenüber Silica):

Acetonitril  $\epsilon = 0.52$ , Methanol  $\epsilon = 0.7$

## Polarity and Selectivity:

Solvent	Normalized Selectivity <sup>a</sup>				$P'^b$	$\epsilon^c$
	H-B Acidity	H-B Basicity	Dipolarity			
	$\alpha_2^H / \Sigma$	$\beta_2 / \Sigma$	$\pi^* / \Sigma$			
Acetonitrile	0.15	0.25	0.60		5.8	37.5
Methanol	0.43	0.29	0.28		5.1	32.7



Solvent	UV Cutoff (nm) <sup>a</sup> [2]	RI <sup>b</sup> [3]	Viscosity (cP) [3]	Boiling Point (°C) <sup>c</sup> [3]	$\epsilon$ (silica) <sup>d</sup>
Acetone	330	1.359	0.36	56	0.53
Acetonitrile	190	1.344	0.38	82	0.52
1-Butanol	215	1.399	2.98	118	0.40
1-Chlorobutane	220	1.402	0.45	78	0.20
Chloroform	245	1.446	0.57	61	0.26
Cyclohexane	200	1.424	1.00	81	0.00
Dimethyl formamide	268	1.430	0.92	153	—
Dimethylsulfoxide	268	1.478	2.24	189	0.50
1,4-Dioxane	215	1.422	1.37	101	0.51
Ethyl acetate	256	1.372	0.45	77	0.48
Heptane	200	1.388	0.40	98	0.00
Hexane	195	1.375	0.31	69	0.00
Isooctane	215	1.391	0.50	99	0.00
Methanol	205	1.328	0.55	65	0.70
Methyl- <i>t</i> -butyl ether	210	1.369	0.27	55	0.48
Methylethyl ketone	329	1.379	0.43	80	0.40
Methylene chloride	233	1.424	0.44	40	0.30
<i>i</i> -Propanol	205	1.377	2.40	82	0.60
<i>n</i> -Propanol	210	1.386	2.30	97	0.60
Tetrahydrofuran	212	1.407	0.55	66	0.53
Toluene	284	1.497	0.59	111	0.22
Water	190	1.333	1.00	100	

a) Wellenlänge, bei der Lösungsmittel 1.0 AU in 10 mm Flusszelle absorbiert

b) RI: refractive index

c) Boiling point

d)  $\epsilon$ : relative Lösungsmittelstärke gegenüber Silica

# Optimierung $\alpha$ , Effekt von %B und T

a)  $2 \leq k \leq 4$  wurden voreingestellt

b) Abnahme von %B:

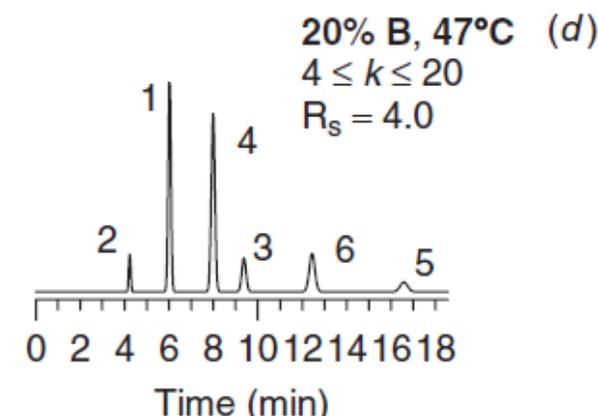
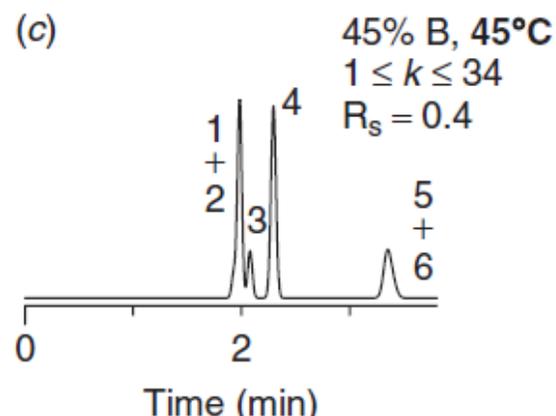
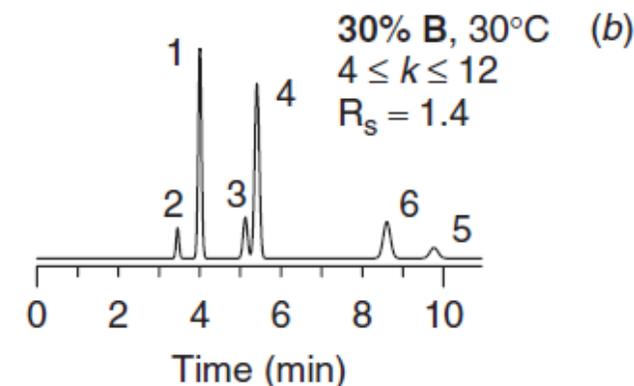
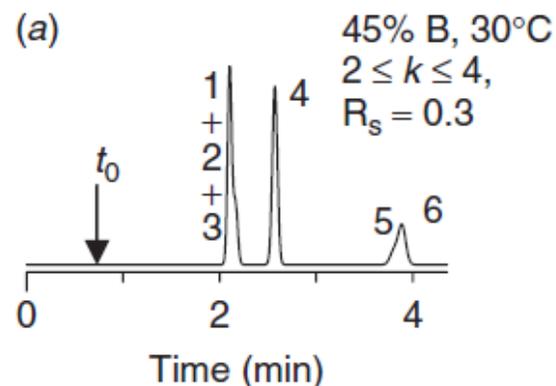
- bessere Trennung (ausser 3 and 4)
- optimale Anpassung der mobilen Phase: 33 % B führt zu  $R_S = 2.1$  bei 30 °C

c) Höhere Temperatur:

- kleiner Shift der RT,
- immer noch schlechte Auflösung

d) Optimierung von Temperatur und %B:

- führt zur besten Auflösung  $R_S = 4.0$



Mobile Phase ACN/Wasser, 2 mL/min,  $C_{18}$  150 x 4.6 mm; 5  $\mu$ m  
1: 3-Phenylpropanol, 2: 1-Nitropropan, 3: Oxazepam, 4: p-Chlorophenol, 5: Eugenol, 6: Methylbenzoat

**Ziel:** Nach maximaler Auflösung streben, diese kann immer noch gegen RT «eingetauscht» werden

Nach Optimierung von  $k$  und  $\alpha$  können auch Säulenparameter (z.B. Grösse) angepasst werden. Siehe Säulenparameter in kleinem Bild.

a) Säulenlänge erhöhen (x 2):

- $N$  (und  $R_S$ ) werden grösser
- aber Lauf wird länger (x 2)
- Druck steigt (x 2)

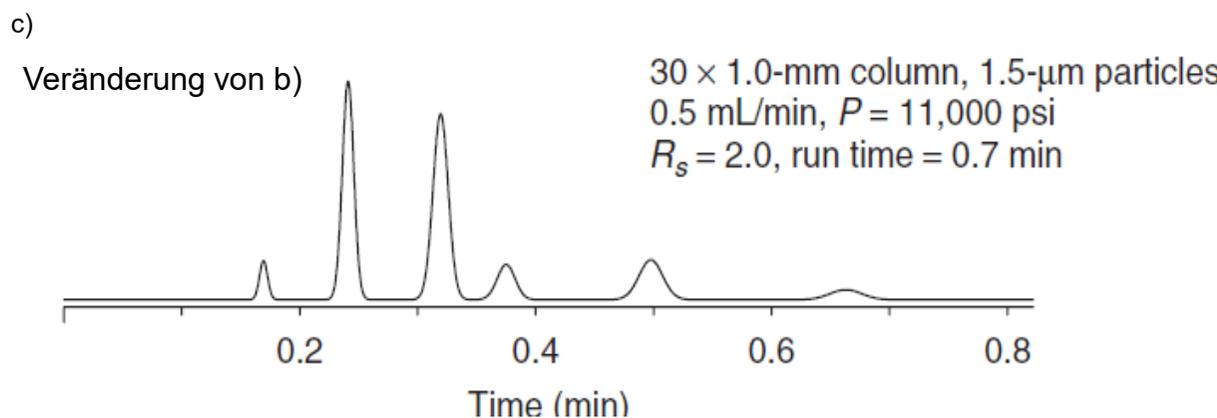
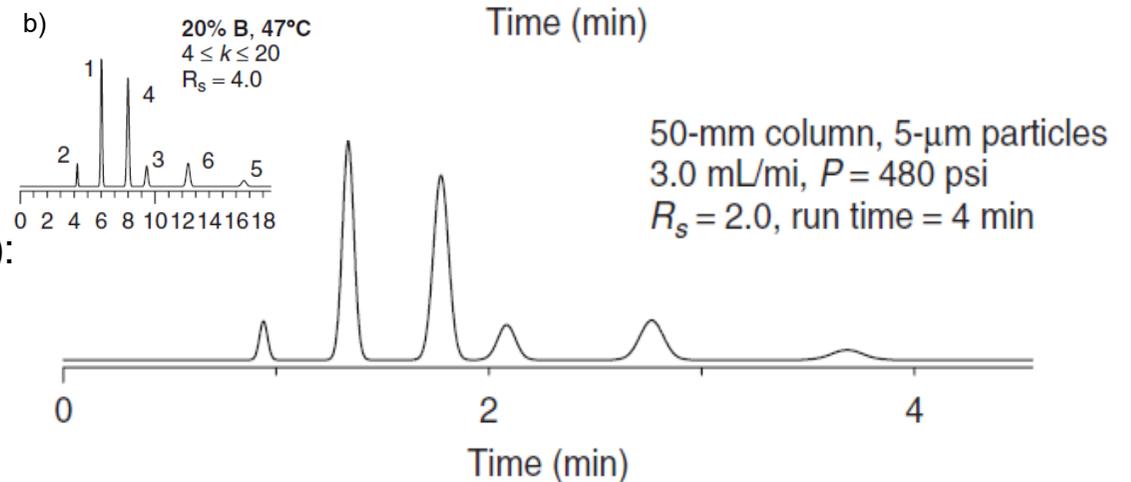
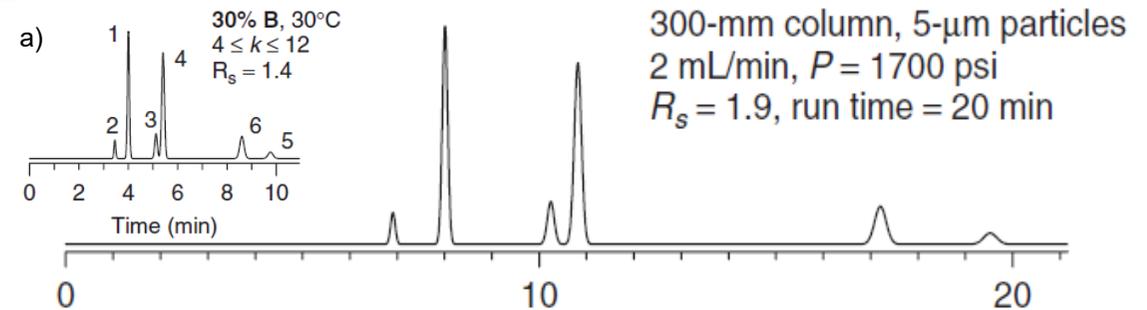
b) Flussrate erhöhen (x 1.5), Säule verkürzen (1/3):

- $R_S$  sinkt von 4 auf 2
- RT sinkt (1/4.5)
- Druck sinkt

c) Kleinere Säule und Partikelgrösse herabsetzen (1/3):

- $N$  wird grösser
- aber Druck steigt enorm
- sehr schnelle Laufzeit

Ziel: **Balance** aus Laufzeit, Auflösung und Druck



Entwicklung geht zu schnellen Trennungen, wenige Minuten für komplexe Proben

- $k$  Wert für den letzten Peak
- $\alpha$  Wert für das am schlechtesten getrennte Peak-Paar

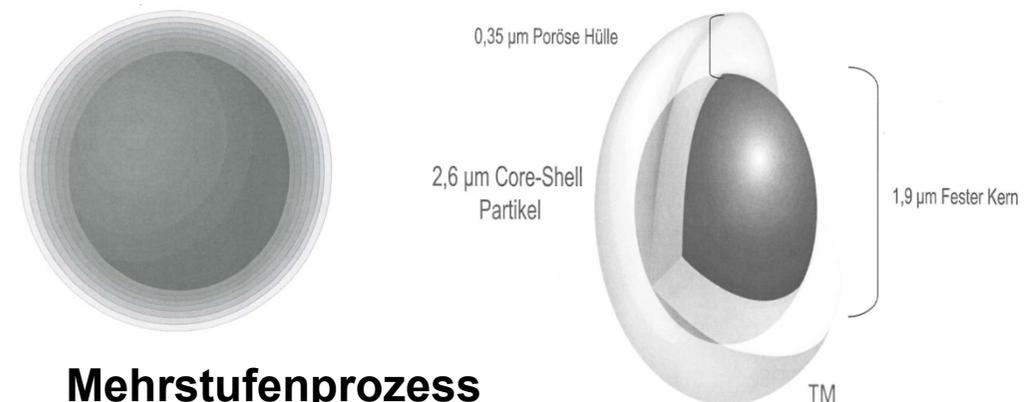
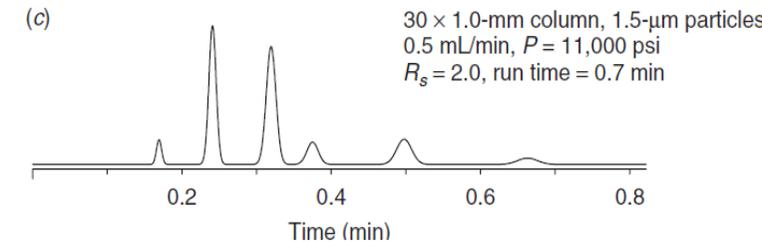
**UPLC:** schnelle Trennung (0.7 min statt 17 min bei herkömmlicher Trennung)

- bei kurzen Säulen mit kleinen Partikeln und hoher Flussrate.
- sehr hoher Druck > 400 bar
- höhere Temperatur empfohlen
- Dünnere Säulen führen zu höheren linearen Geschwindigkeiten (verglichen mit eigentlicher Flussrate)

**ABER: Core Shell** Technologie:

- 2.6  $\mu\text{m}$  Gesamtpartikeldurchmesser
- Rückdruck ~50 % weniger als vollporöse < 2  $\mu\text{m}$  Partikel
- Effizienz = 260 – 300.000 p/m

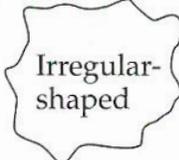
UPLC Effizienz auf konventionellen HPLC Systemen!



**Mehrstuufenprozess  
der Aufbringung**

# Entwicklung der Säulenmaterialien über die Zeit

**TABLE 22.1** Change in Liquid Chromatography Supports Over the Last 50 Years\*

Year(s) of Acceptance	Particle Size	Most Popular Nominal Size ( $\mu\text{m}$ )	Plates/15 cm (approx.)
1950s		100	200
1967		50 (pellicular) <sup>a</sup>	1,000
1972		10	6,000
1985		5	12,000
1992		3–3.5	22,000
1998 <sup>b</sup>		1.5 (pellicular) <sup>a, b</sup>	30,000
1999		5.0 (Poroshell)	8,000 <sup>c</sup>
2000		2.5	25,000
2003		1.8	32,500

\*Reproduced with permission from R. E. Majors, *American Laboratory*, October (2003) 46–54.

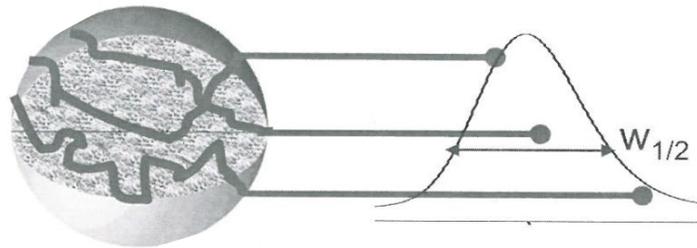
<sup>a</sup>The term “pellicular” refers to a particle that has a solid core and porous outer layer.

<sup>b</sup>Nonporous silica or resins.

<sup>c</sup>For protein MW 5700.

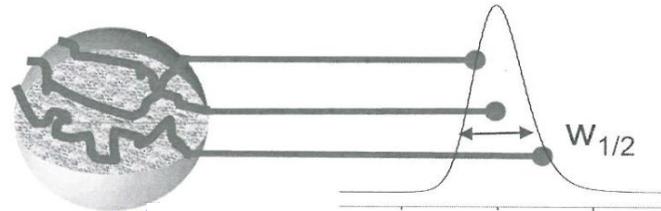
- Stofftransport direkt proportional zur Partikelgrösse  $d_p$ .
- Kleinere Partikel resultieren in höherer Trennleistung (höheres N, kleineres H)
- Daraus resultieren schärfere Peaks,  $V_m$  zu  $V_s$  wird kleiner, aber Druck steigt.

Vollporös  
5  $\mu\text{m}$  Partikel  
Poren: 100  $\text{\AA} \pm 20$



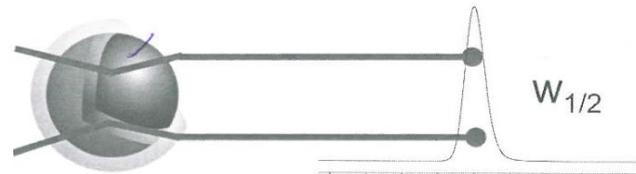
$N = \sim 100\,000$  Böden/m  
Relativer Rückdruck = 1  
Substanz wandert durch Kanäle in Poren

Vollporös  
3  $\mu\text{m}$



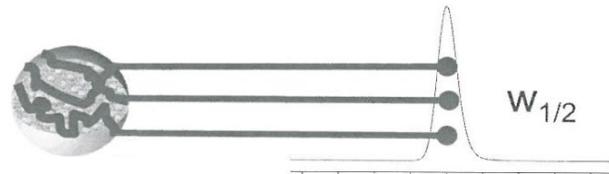
$N = \sim 150\,000$  Böden/m  
Relativer Rückdruck  $\sim 2x$   
Kleinere Weglänge in Poren

Kern massiv  
3  $\mu\text{m}$



$N = \sim 300\,000$  Böden/m  
Relativer Rückdruck  $\sim 3x$   
Auf HPLC messbar

Vollporös  
Sub 2  $\mu\text{m}$



$N = \sim 300\,000$  Böden/m  
Relativer Rückdruck  $> 5x$   
Nur auf UPLC messbar

# Säulendimension Flussrate - Downscaling

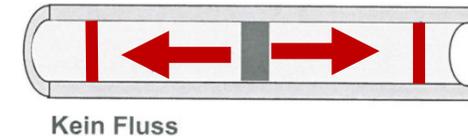
- Optimaler Fluss → kaum Peakverbreiterung
- Innendurchmesser klein halten → schmalere Peaks, aber Probenvolumen reduzieren, da SP kleiner

Lineargeschwindigkeit u wichtig ( $d_p \downarrow$  über  $F \downarrow$  spart Ressourcen):

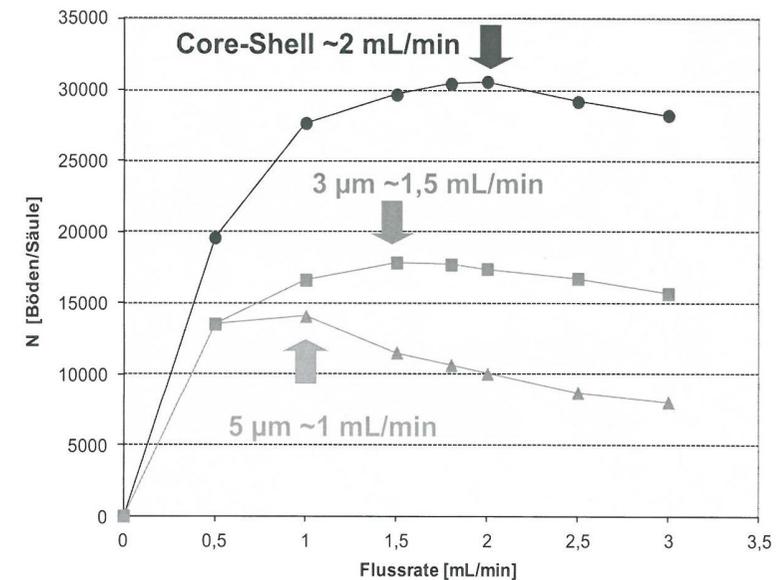
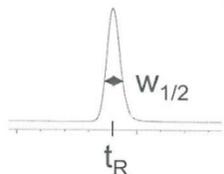
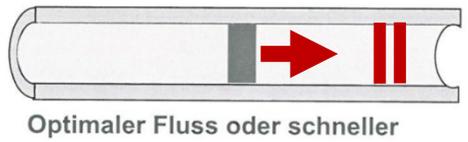
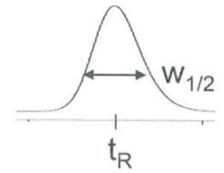
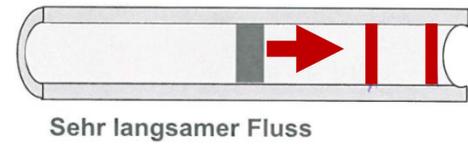
Säulen ID [mm]	0.1 cm/sec	0.3 cm/sec	0.5 cm/sec	0.7 cm/sec
4.6 mm	0.99 mL/min	2.98 mL/min	4.98 mL/min	6.98 mL/min
4.0 mm	0.75 mL/min	2.26 mL/min	3.77 mL/min	5.28 mL/min
2.0 mm	0.19 mL/min	0.56 mL/min	0.94 mL/min	1.32 mL/min

Säulen ID [mm]	Fluss [ $\mu\text{L min}^{-1}$ ]	Verbrauch [ $\text{mL h}^{-1}$ ]	Säulenvolumen [ $\mu\text{L}$ ]
4.6	1.500	90	2.493
4.0	1.000	60	1.880
3.0	563	34	1.060
2.0	250	15	471

Säulenlänge [mm]	Effizienz $d_p$ 5 $\mu\text{m}$	Effizienz $d_p$ 3 $\mu\text{m}$	Effizienz sub-2 $\mu\text{m}$ / Core-shell	Verkürzung der Analysezeit [%]
250	25.000	37.500	150 ist max Länge	
150	15.000	22.500	45.000	33
100	10.000	15.000	30.000	60
50	5.000	7.500	15.000	80



Nur Diffusion



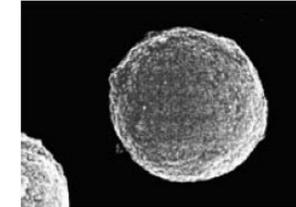
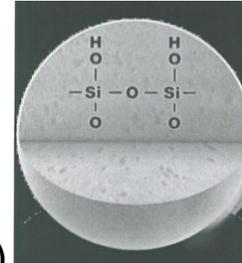
Säule: 4.6 x 100 mm

## Vorteile Kieselgel

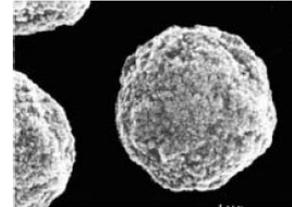
- Kieselgel ist der ideale Träger für HPLC Phasen
- Hohe mechanische Stabilität
- Viele verschiedene Säulentypen

## Nachteile Kieselgel

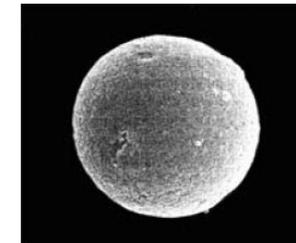
- Auflösung des Kieselgels pH >7.5 (Standardkieselgel)
- Hydrolyse des Liganden bei pH < 2.5



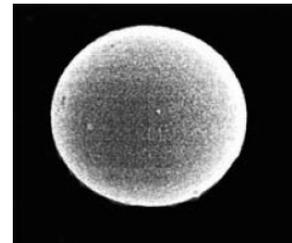
Zorbax 3.5 µm



Halo 2.7 µm



Atlantis 3 µm



Luna 3 µm

## Vorteile Organo-Kieselgel

- Erweiterter pH Bereich von 1-12
- Leistung und mechanische Stabilität wie Kieselgel
- Einzigartige Selektivität

## Nachteile Organo-Kieselgel

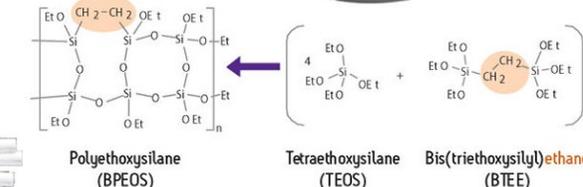
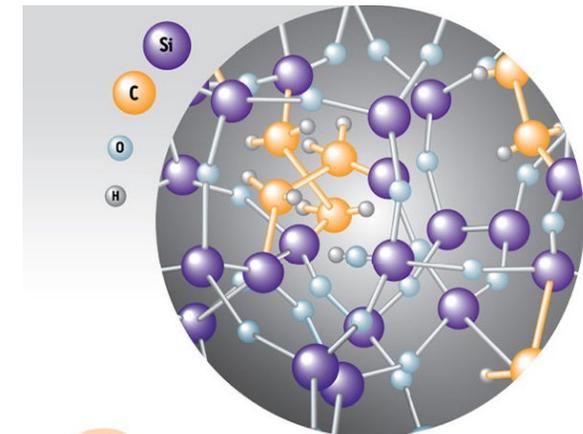
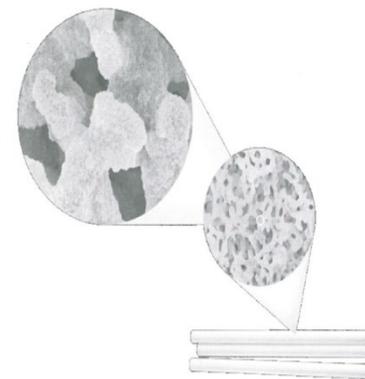
- Bis jetzt nur wenige funktionelle Liganden (kein Cyano, Amino)

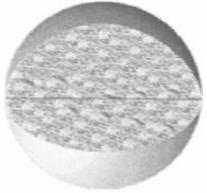
## Vorteile monolithischer Kieselgel-Stab

- Extrem niedriger Rückdruck
- Makroporen erlauben Injektion dreckiger Proben, Proteine
- Keine Kanalbildung / Abnahme der Packungsqualität

## Nachteile monolithischer Kieselgel-Stab

- Nur wenige funktionelle Liganden erhältlich
- Effizienz oft geringer als konventionelle Partikel





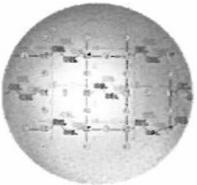
## Vollporöse Kieselgel-Partikel

- Allgemeines Arbeitspferd
- Viele Partikelgrößen und funktionelle Liganden
- Unempfindlich gegenüber Systemtotvolumen



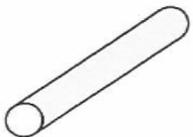
## Core-Shell Partikel:

- UPLC Leistung auf konventionellen HPLC Systemen
- Sollte erste Wahl bei der Methodenentwicklung sein



## Organokieselgel-Partikel

- Erweiterter pH Bereich, höhere Stabilität und Lebensdauer
- Identische Leistungsmerkmale wie vollporöses Kieselgel
- Optimal für Applikationen bei hohem pH, bis pH ~12



## Monolithischer Kieselgelstab

- Geringer Rückdruck, geringe physikalische Verstopfungsneigung
- Ideal für die Analyse von dreckigen Proben (z.B. Plasma)
- Effizienz ähnlich einen vollporösen, sphärischen 4  $\mu\text{m}$  Partikels

## RPC im Vergleich zu NPC, IEC

- RPC zielführender, robuster und vielseitiger
- RPC Säulen effizienter und reproduzierbarer
- Grösserer Umfang an Wahlmöglichkeiten: Säulendimension, Partikelgrösse und stationäre Phasen (C1 – C30, Phenyl, Cyano, etc.).
- Lösungsmittel weniger entzündlich oder toxisch, kompatibler zur UV-Detektion (transparent auch < 230 nm für erhöhte Sensitivität, B-Solvent: wassermischbar, wenig viskos, stabil)
- generell schnelle Kalibration nach einem Säulenwechsel, Wechsel der mobilen Phase oder Gradientenelution
- Weniger Probleme (z.B. wenig Retention polarer Substanzen (ionisch) und Peaktailing), dennoch können ionisierte Substanzen auch durch RPC getrennt werden (neben IEC und ion pair chromatography)

## Geeignete Standardbedingungen:

Säule: C8 oder C18 (Typ-B), Dimensionen: 100 × 4.6-mm, Partikelgrösse: 3 µm,

Porendurchmesser: 8–12 nm, MP: Acetonitril/Wasser, Flussrate: 2.0 mL/min, Temperatur 30 bis 35 °C, %B im Gradienten, Probenvolumen ≤ 25 µL, Masse ≤ 50 µg, Retentionsfaktor  $1 \leq k \leq 10$ .

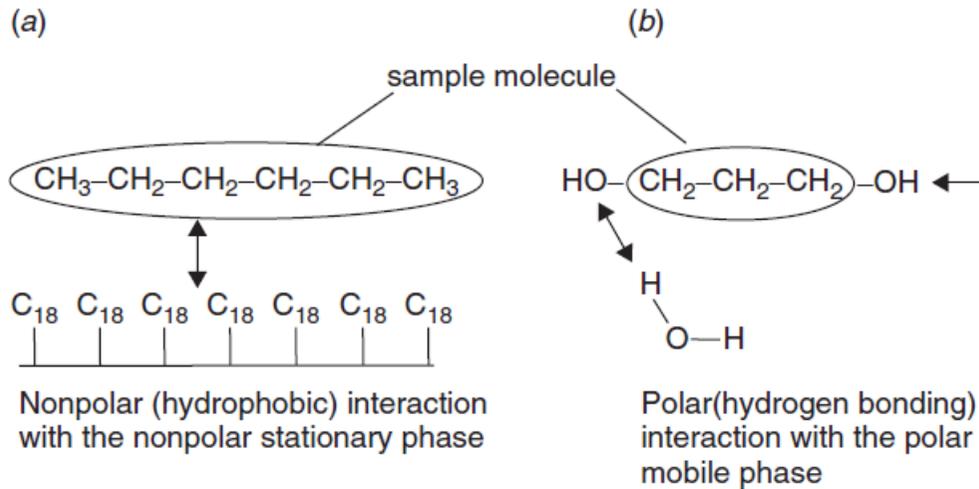
Properties of Some Commercial C<sub>18</sub> Particles

Packing Material	Pore Diameter (nm)	Surface Area (m <sup>2</sup> /g)	Carbon Load (%)
Ace C <sub>18</sub>	10	300	15.5
Ascentis C <sub>18</sub>	10	450	25
Halo C <sub>18</sub> <sup>a</sup> core shell	9	150	8
Hypersil Gold C <sub>18</sub>	17.5	220	10
Luna C <sub>18</sub> (2)	10	400	17.5
Sunfire C <sub>18</sub>	10	340	16
TSK-GEL ODS-100V	10	450	15
XBridge C <sub>18</sub> <sup>b</sup>	13.5	185	na
Zorbax XDB-C <sub>18</sub> Plus	9.5	160	8

Oberfläche ist wichtig für die Wechselwirkung, Carbon Load gibt an, wieviel Ligand auf die Säule gebracht werden konnte.

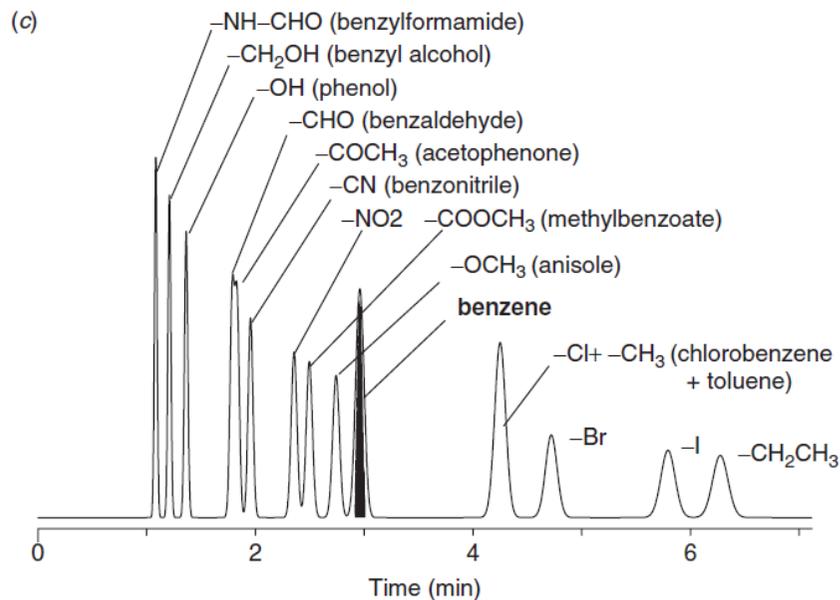
Andere Bezeichnungen

- spher (round), -sorb (irregular), -WP (wide pore),  
-NPB, NPR (non porous beads/resins),  
100, 120, 300, 1000, 4000 (pore diameter),  
3, 5, 10 (particle size)



a) unpolare Substanz wechselwirkt (hält sich eher auf) mit unpolarer stationärer Phase

b) Polarere Substanz wechselwirkt eher mit mobiler Phase, geringere Retention

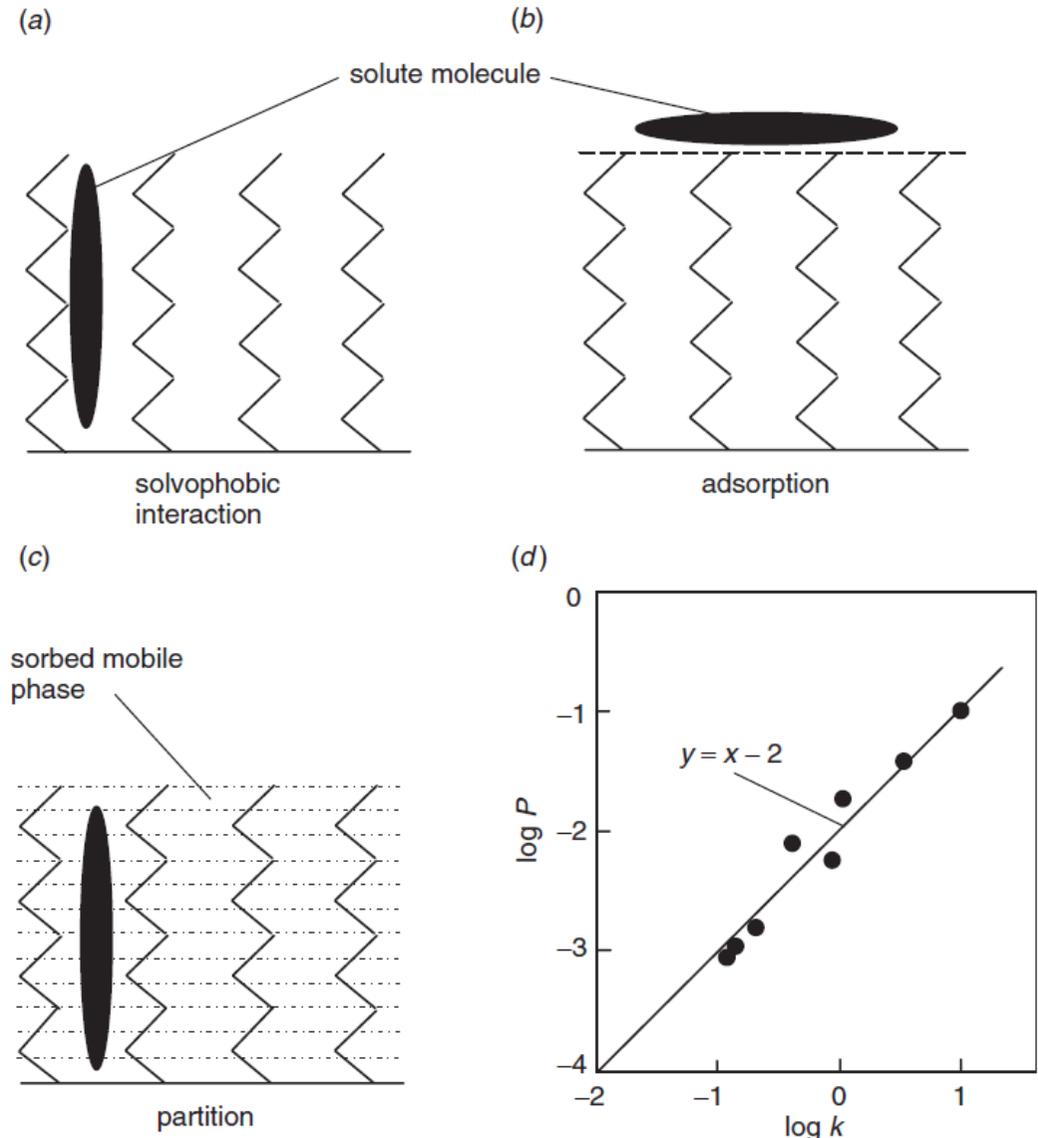


c) Monosubstituierte Benzole auf 150 × 4.6-mm Hypersil C18 Säule, 50% Acetonitril/Wasser als mobile Phase, 25 °C, 2 mL/min

Polarere Gruppen werden weniger zurückgehalten und eluieren schneller

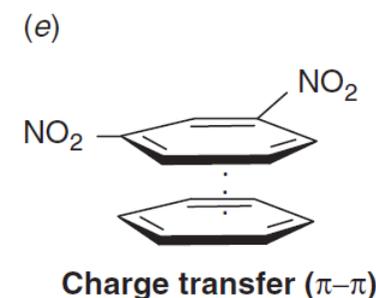
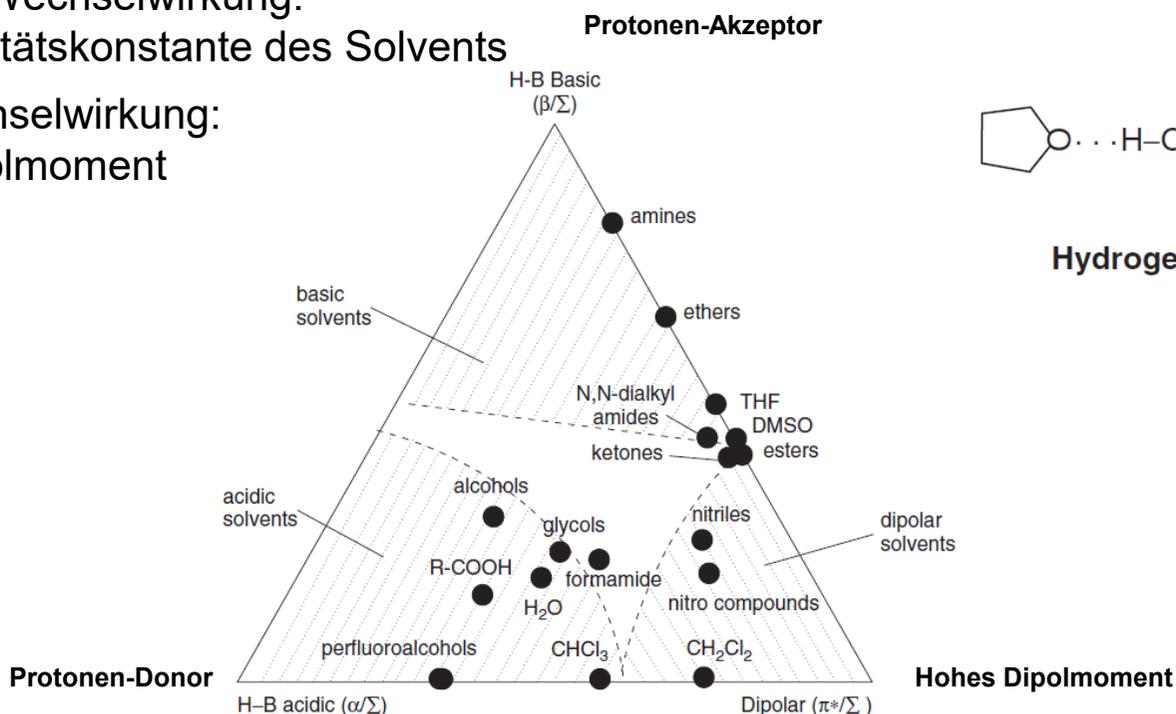
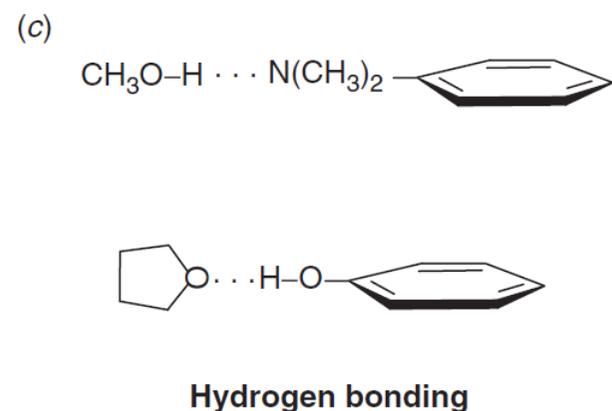
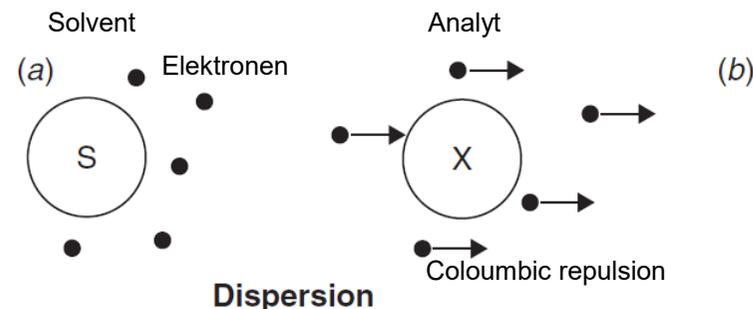
- a) Solvophobe Interaktion, hydrophober Analyt hängt an Ligand in SP, meidet MP
- b) Adsorption: Analyt geht nicht in SP, sondern wird an der Oberfläche zurückgehalten
- c) Verteilung: SP ähnelt einer Flüssigkeit, in der sich Analyt löst. Dort reichert sich auch das organische Lösungsmittel der MP an (Mischbarkeit wichtig).
- d) Log P (Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient) gegen log k aufgetragen (8 Aminosäuren auf C8 Säule, wässriger Puffer bei pH 6.7 und 70 °C):

**Verteilung** ist vorherrschender Prozess:  
log P (je negativer, desto polarer) korreliert mit log k (Retention)



# Interaktionen zwischen Analyt und SP/MP

- a) Londonsche Dispersionswechselwirkung: induziertes Dipolmoment zwischen polarisierbaren Molekülen
- b) Dipol-Dipol Wechselwirkung: permanentes Dipolmoment sorgt für elektrostatische Wechselwirkung
- c) Wasserstoffbrückenbildung: Protonendonor und Protonenakzeptor
- d) ionische Wechselwirkung: Dielektrizitätskonstante des Solvents
- e)  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkung: Quadrupolmoment



Verschiedene Arten der Reaktion von Silica mit Silanen

(a) Vertikale Polymerisation



(b) Horizontale Polymerisation, erhöhte Stabilität bei extremen pH Werten

(c) Monomerische Phase (weitesten verbreitet), auch mit anderen Liganden. Hohe Effizienz durch hohe Diffusionsgeschwindigkeiten des Analyten

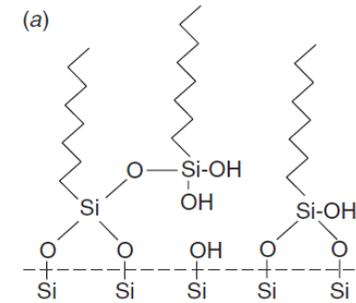


(d) Sterische Hinderung durch i-propyl, i-butyl Gruppen. Vor allem werden bei niedrigem pH die Liganden geschützt; ähnlich endcapping mit TMS

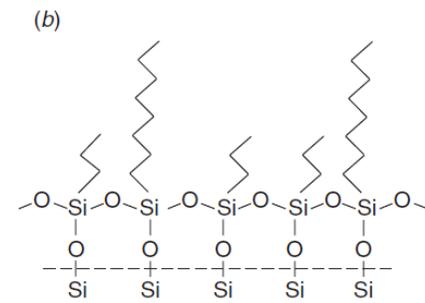
Neu: Typ C Silika

a) Silanoloberfläche → Silika-Hydride, verwendbar für NPC und RPC (100% Wasser, pH 1-10)

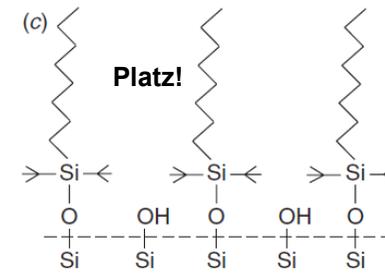
b) Modifikation für RPC



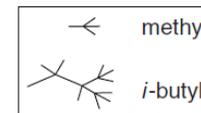
**Polymeric**  
Vertical polymerization



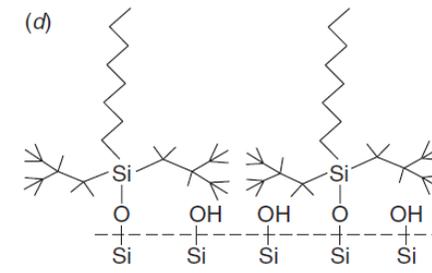
**Polymeric**  
Horizontal polymerization



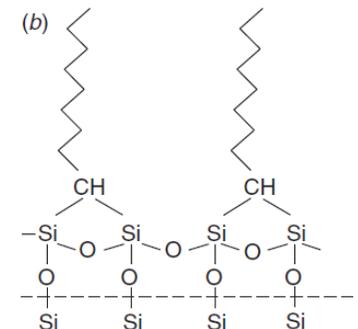
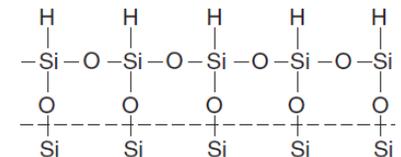
**Monomeric**  
(dimethyl-substituted)



(a)

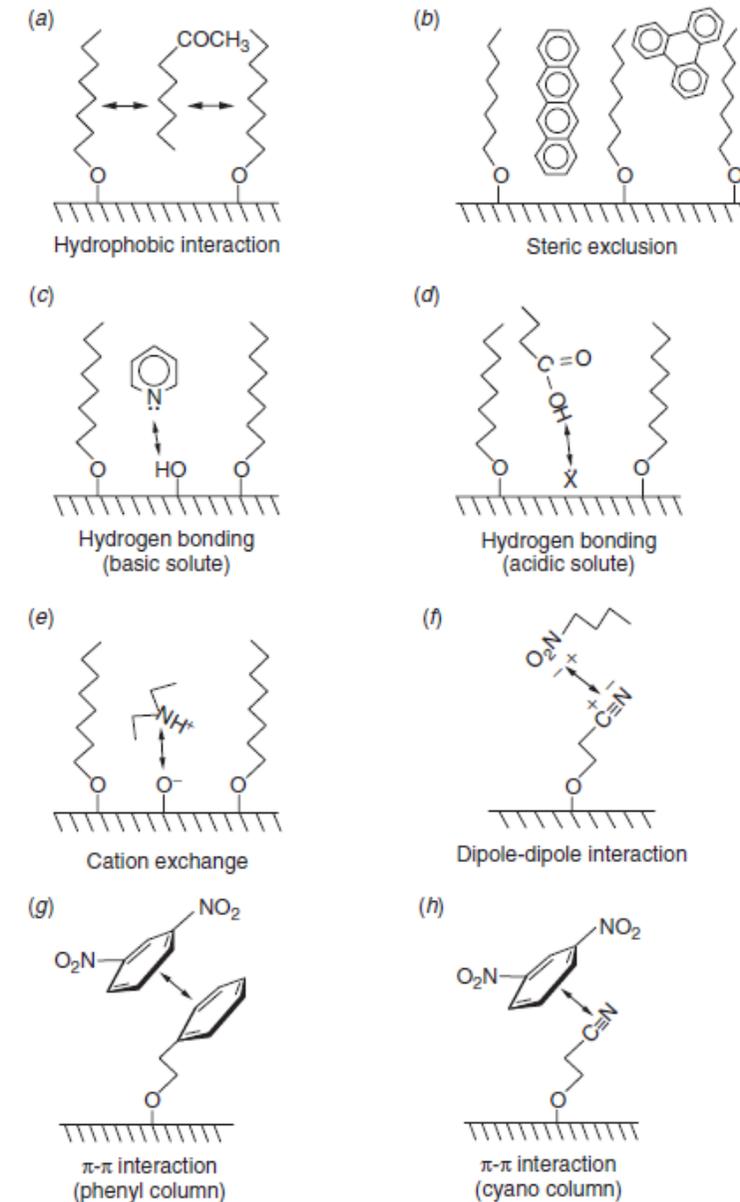


**Monomeric**  
(steric protected)

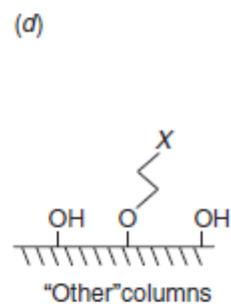
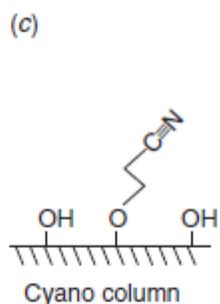
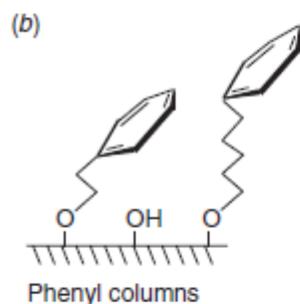
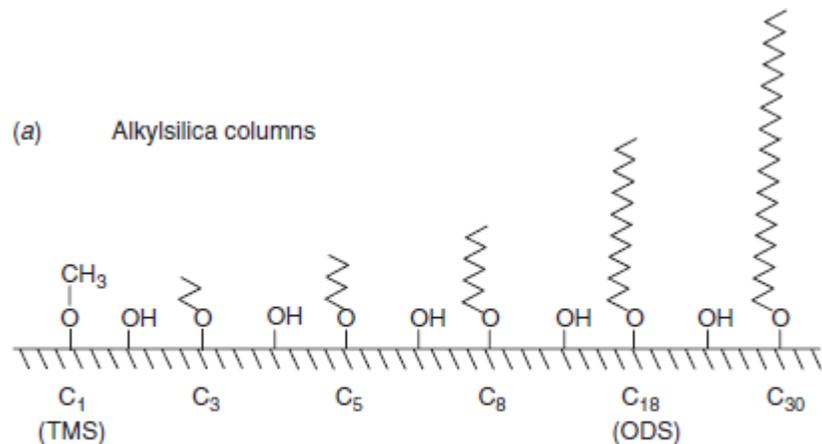


# Reversed Phase Varianten Interaktionen

- (a) Hydrophobe Interaktion (verschiedene Kettenlängen)
- (b) Sterischer Ausschluss grösserer Moleküle von der stationären Phase (sterische Wechselwirkung)
- (c) Wasserstoffbrückenbildung eines gelösten Akzeptors (basisch) mit einem Donor (sauer) in der stationären Phase (typischerweise eine Silanolgruppe SiOH)
- (d) Wasserstoffbrückenbildung eines gelösten Donors in der flüssigen Phase mit einem Akzeptor in der stationären Phase (mit "X" gekennzeichnet)
- (e) Kationenaustausch oder elektrostatische Interaktion zwischen gelöstem Kation und geladener Silanolgruppe ( $-\text{SiO}^-$ ); Abstossung geladener Säure (z.B.  $\text{R}-\text{COO}^-$ )
- (f) Dipol–Dipol Interaktion zwischen gelöster dipolarer Substanz (Nitro Gruppe) und dipolarer Substanz in stationärer Phase (Nitril Gruppe einer Cyano Säule)
- (g, h)  $\pi-\pi$  Wechselwirkung zwischen Aromat und Phenylgruppe oder Nitrilgruppe

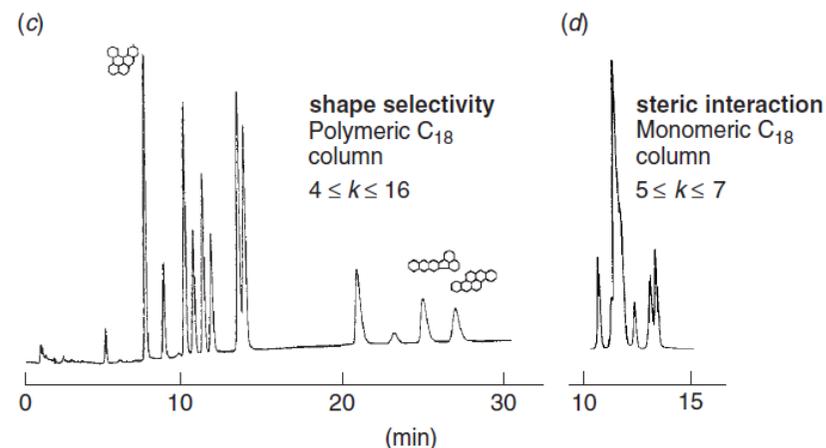
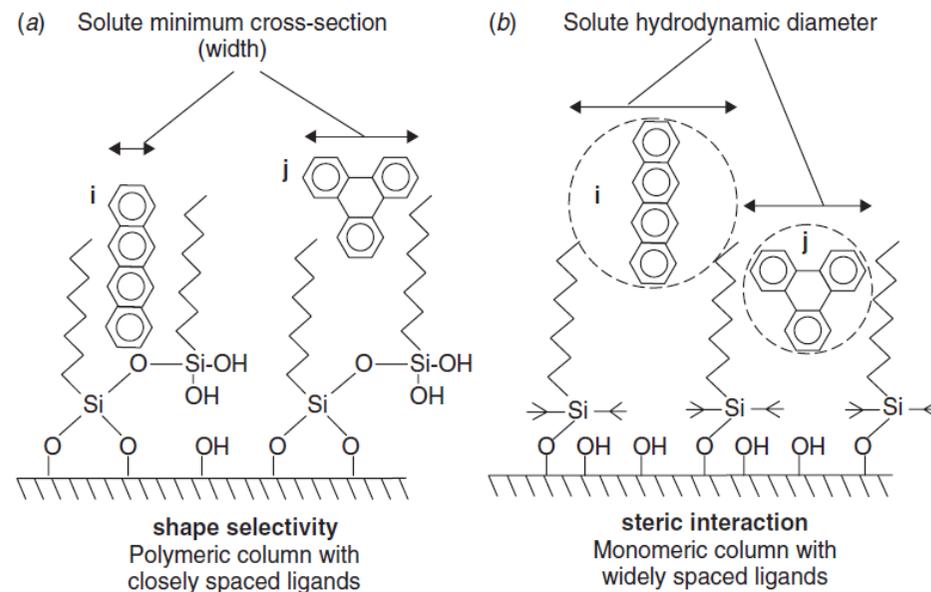


# Reversed Phase Varianten Liganden



Column type	X	Sub-type
Embedded-polar-group	R-NH-(C=O)-O-	Carbamate
	R-NH-(C=O)-NH-	Urea
	R-(C=O)-NH-	Amide
Fluoro columns		Perfluorophenyl (PFP)
	-CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	Fluoroalkyl

## Beispiel für sterischen Ausschluss Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe



## Sieben Schritte:

1. Wie ist die Probe zusammengesetzt und was ist mein Trennungsziel (Grad der Auflösung)
2. Probenaufbereitung
3. Chromatographieart bestimmen (meistens RPC)
4. Detektor wählen
5. Trennungsbedingungen wählen
6. Antizipieren, Identifizieren und Lösen von möglichen Problemen
7. Methodvalidierung und Eignung des Systems

## Trennungsbedingungen wählen

- Anfangstrennung:
- a. Variieren von %B um  $1 \leq k \leq 10$  zu erreichen
  - b. Gradienten fahren

## Trennungsprobleme?

- Anfangsbedingungen in Frage stellen: RPC, IPC, IEC, NPC
- Peaks als Säuren, Basen oder Neutralteilchen bestätigen
- Selektivität optimieren ( $\alpha$ )
- Säulenbedingungen anpassen ( $N$ )

Drei Methoden zur **Erhöhung der Auflösung** (= Güte der Trennung)  
Änderung von  $k$ ,  $\alpha$  oder  $N / H$  mehr oder weniger unabhängig voneinander.

# Methodenentwicklung

## Polaritätsindex

Numerisches Mass der relativen Polarität, durch Mischen zweier Phasen kann beliebiger Polaritätsindex hergestellt werden

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B$$

P': Polaritätsindices

Φ: Volumenanteile

### Faustregel:

Ändern von P' um 2 Einheiten führt zu k Änderung um Faktor 10

Für Normalphase gilt annäherungsweise

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_1 - P'_2)/2}$$

Für Umkehrphase gilt annäherungsweise

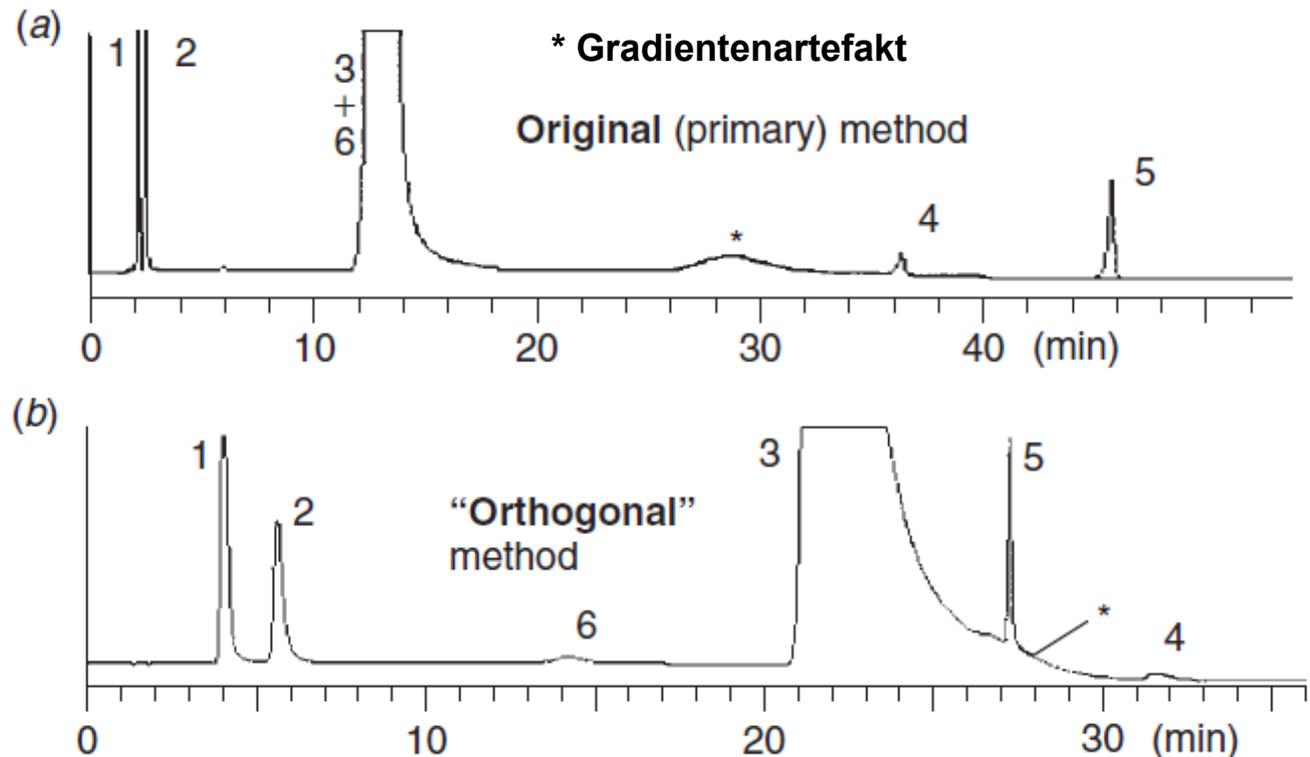
$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_2 - P'_1)/2}$$

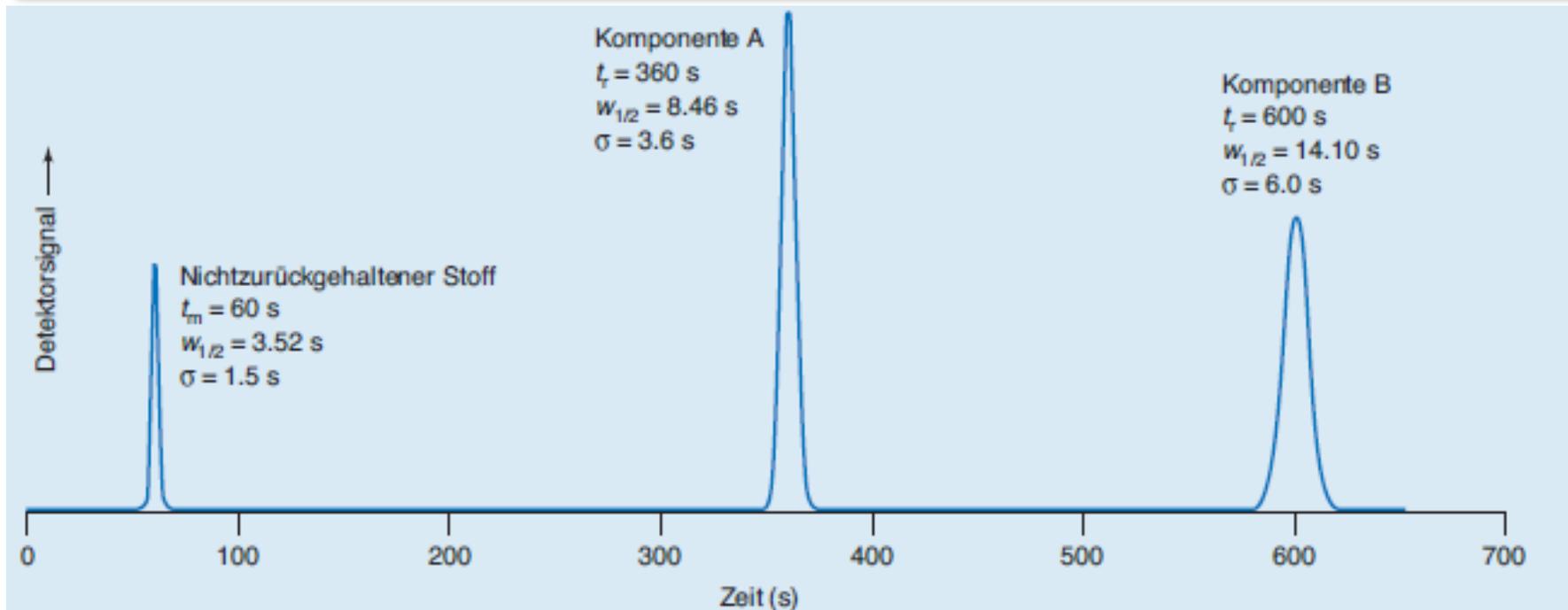
Solvent	Normalized Selectivity <sup>a</sup>			P' <sup>b</sup>	ε <sup>c</sup>
	H-B Acidity α/Σ	H-B Basicity β/Σ	Dipolarity π*/Σ		
Acetic acid	0.54	0.15	0.31	6.0	6.2
Acetonitrile	0.15	0.25	0.60	5.8	37.5
Alkanes	0.00	0.00	0.00	0.1	1.9
Chloroform	0.43	0.00	0.57	4.1	4.8
Dimethylsulfoxide	0.00	0.43	0.57	7.2	4.7
Ethanol	0.39	0.36	0.25	4.3	24.6
Ethylacetate	0.00	0.45	0.55	4.4	6.0
Ethylene chloride	0.00	0.00	1.00	3.5	10.4
Methanol	0.43	0.29	0.28	5.1	32.7
Methylene chloride	0.27	0.00	0.73	3.1	8.9
Methyl- <i>t</i> -butylether	0.00	≈0.6	≈0.4	≈2.4	≈4
Nitromethane	0.17	0.19	0.64	6.0	35.9
Propanol ( <i>n</i> - or <i>iso</i> )	0.36	0.40	0.24	3.9	6.0
Tetrahydrofuran	0.00	0.49	0.51	4.0	7.6
Triethylamine	0.00	0.84	0.16	1.9	2.4
Water	0.43	0.18	0.45	10.2	80

- Trennung mit unterschiedlicher Selektivität reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass Substanzen nicht detektiert werden (in Verbindung mit MS)
- Übliche Methoden zur z.B. Eingangs- oder Prozesskontrolle sind mit UV-Detektion
- Um keine Substanzen zu übersehen, sollten auch orthogonale Methoden verfügbar sein (speziell wenn bei der Entwicklung der Methode keine repräsentative Stichprobe vorlag)
- Wechsel der Säule (siehe Charakteristika)

- column hydrophobicity  $H$
- column steric resistance  $S^*$
- column hydrogen-bond acidity  $A$
- column hydrogen-bond basicity  $B$
- column cation-exchange capacity  $C$

- Wechsel von B (ACN zu MeOH)
- Gradienten für optimale Auflösung anpassen
- Beispiel: Substanz 6 als zusätzliche Verunreinigung detektiert





Idealisierte flüssigchromatographische Trennung von drei Komponenten.

$$n = 2 \left( \frac{t'_r}{\sigma} \right)^2 \quad \tau_s = \frac{\sigma^2}{2t'_r}$$

$$\tau_m = t_m/n.$$

- Jedes Analytmolekül wird beim Durchgang durch die Säule  $n \sim 17\,000$  Mal adsorbiert
- A bleibt bei jeder Adsorption durchschnittlich  $\tau_s = 17.8 \text{ ms}$  an die SP gebunden, während B im Durchschnitt  $\tau_s = 31.2 \text{ ms}$  darin verbleibt.
- Adsorptionsstrecken und durchschnittliche Verweildauer in mobiler Phase unterscheidet sich nicht gross

	Komponente A	Komponente B
$n$	16 800	17 300
$\tau_s$	17,8 ms	31.2 ms
$\tau_m$	3.6 ms	3.5 ms
Strecke zwischen den Adsorptionen (= $u_x \tau_m$ )	8.6 $\mu\text{m}$	8.4 $\mu\text{m}$