

HPLC – MAPPE

Kurze technische Einführung

Oktober 2009

BIOCHEMISCHE ÜBUNGEN I

Arbeitsunterlagen zum H P L C - BEISPIEL

INHALT

Allgemeines zum Ablauf

TEIL 1

1. Grundlagen	4
2. Bestandteile einer HPLC	4
2.1. Laufmittel	4
2.2. Mischung	5
2.3. Pumpe	8
2.4. Injektor	9
2.5. Säulen	9
2.6. Detektoren	11
3. Auswertung von Chromatogrammen	13

TEIL 2

Anhang:

A. Bedienungsanleitung für die Agilent-HPLC	14
---	----

Dr. Erika Staudacher & Dr. Friedrich Altmann im Dezember 1990

1. Neuauflage: Dr. Erika Staudacher im November 1996
2. Neuauflage: Dr. Erika Staudacher im August 1999
3. Neuauflage: Dr. Erika Staudacher im Februar 2003
4. Neuauflage: Dr. Erika Staudacher im März 2004
5. Neuauflage: Dr. Erika Staudacher im Juli 2007
6. Neuauflage: Dr. Erika Staudacher im Oktober 2009

Allgemeines zum Ablauf des Beispiels:

VORBEREITUNG:

In der Woche vor dem HPLC-Beispiel bitte unbedingt die HPLC-Mappe lesen. Zu Beginn des ersten HPLC-Arbeitstages müssen Sie die technischen Grundlagen der HPLC (HPLC-Mappe Teil 1) beherrschen!

ABLAUF:

Vor Beginn des Beispiels:

- HPLC-Mappe lesen
- Eintragen in den Arbeitsplan (klebt beim Drucker) des jeweiligen Kurses.

Beginn des Beispiels: 8.30 Uhr !

- Kurze Einführungsbesprechung, Ausgabe der Angabezettel, der Standards und der Proben (Anwesenheitspflicht für die ganze Gruppe).
- Selbständige Planung und Herstellung der Laufmittel (Anwesenheitspflicht für die ganze Gruppe);
- Überprüfung des Konzepts (Anwesenheitspflicht für die ganze Gruppe)
- Praktische Arbeit im „Schichtbetrieb“ (ca. 3 Tage),
- Wenn ALLE TeilnehmerInnen der Gruppe ihre praktische Arbeit abgeschlossen haben: gibt es eine **Abschlussbesprechung** (Anwesenheitspflicht für die ganze Gruppe); Für Kurse die am Dienstag beginnen: meist Freitag Vormittag der gleichen Woche; Für Kurse die am Mittwoch beginnen: meist am Montag der Folgewoche;
- **Bei der Abschlussbesprechung muss bereits das fertige Protokoll vorgelegt werden!**

DURCHFÜHRUNG :

Bitte planen Sie den Ablauf sorgfältig und informieren Sie KollegInnen in der Gruppe ausreichend. Das korrekte Herstellen der Verdünnungen und Mischungen entscheidet über den Erfolg Ihrer Arbeit!

Es muss immer mindestens eine Person bei der laufenden Apparatur anzutreffen sein. Diese muss dem Betreuersteam jederzeit über den Stand der Arbeit berichten können.

PROTOKOLL:

Während der Arbeit muss ein Laborprotokoll geführt werden in dem alle Arbeitsschritte und Ergebnisse übersichtlich (!!) dokumentiert werden.

Bei der Abschlussbesprechung muss das fertige Protokoll (Einleitung, Methoden, Ergebnisse, Diskussion) vorgelegt werden! Dort kommt der „Probe angenommen“-Stempel hinein.

Viel Erfolg !

1. GRUNDLAGEN

Die HPLC erfüllt einige wichtige Wünsche des Analytikers:

- * **hohe Auflösung** von vielen Substanzen (hohe Trennleistung, geringe Peakverbreiterung)
- * **Schnelligkeit**
- * **Reproduzierbarkeit** (Retentionszeiten auch an unterschiedlichen Tagen / in unterschiedlichen Labors gleich)
- * **Quantifizierbarkeit**
- * **hohe Empfindlichkeit** (Signal/Rauschverhältnis)
- * **hohe Flexibilität** (Modulbausystem unbegrenzt erweiterbar)
- * **Automatisierbarkeit** (Probenauftrag, Trennung, Detektion, Auswertung)

Die HPLC wird bei zwei grundlegend verschiedenen Problemstellungen angewandt:

- 1.) **Trennung komplexer Gemische** - wichtig ist die Qualität der Trennung, die Zeit ist dabei nur nebensächlich.
- 2.) **Schnelle Analyse** von Proben mit geringer Anforderung an die Trennleistung.

2. BESTANDTEILE EINER HPLC-ANLAGE

- * Laufmittelgefäße (+/- Begasungsanlage)
- * Mischungsvorrichtung (Hochdruck oder Niederdruck)
- * Pumpe(n)
- * Injektor (Autosampler)
- * Säule (+/- Säulenofen)
- * Detektor
- * (+/- Fraktionssammler)
- * Auswerteeinheit (Schreiber, Integrator, Computer)

Alle Bestandteile der Anlage sind aus inerten Materialien. Druckseitig wird meistens Edelstahl, manchmal auch Kunststoffe oder Titan eingesetzt. Auch Saphire (für Pumpenkolben) oder Rubine (im Ventil) kommen zum Einsatz. Für die Laufmittelvorratsflaschen kann Glas verwendet werden, da sie keiner hohen Druckbelastung ausgesetzt sind.

Die Kombination von hohem Druck und kleinsten Volumina macht eine HPLC-Anlage zu einer heiklen und teuren Apparatur. Die Stahlkapillaren, die Pumpen, Mischkammer, Injektor, Säule und Detektor verbinden, weisen einen Durchmesser von 0.2 bis maximal 0.5 mm auf.

2.1. Laufmittel

Alle Laufmittel müssen partikelfrei und entgast sein.

Wenn in einem Labor nur sehr selten mit HPLC gearbeitet wird, kann es von Vorteil sein alle Laufmittel fertig zu kaufen. Das ist aber eine relativ teure Lösung, wenn man häufiger damit arbeitet.

Selbst hergestellte Laufmittel müssen vor Gebrauch durch ein 0.45 µm-Filter filtriert werden um eine Verunreinigung der Säule zu verhindern. Vorsicht bei der Wahl des Filters. Werden auch organische Lösungsmittel filtriert, muss der Filter Lösungsmittel-resistent sein, sonst hat man dann Filterbestandteile auf der Säule! Wir haben uns entschlossen die wässrigen

Laufmittel selbst herzustellen und zu filtrieren und die organischen Laufmittel bereits HPLC-rein zu kaufen. Das ist zwar teurer beim Kauf der Laufmittel, aber die Filter sind billiger.

Um höchste Reinheit zu gewährleisten, müssen selbstverständlich auch die Vorratsflaschen und die Filtrationseinheit tadellos sauber sein. Auch die Fritten beim Eintritt des Laufmittels in den Pumpenschlauch müssen von Zeit zu Zeit gereinigt (Edelstahlfritten) oder ausgetauscht (Kunststofffritten) werden.

Bei der Mischung von wässrigem und organischem Laufmittel kann die gelöste Luft leicht frei werden und störende Luftblasen bilden. Diese verkürzen einerseits das Leben der Trennsäule, andererseits legen sie die Pumpen lahm. Eine mit Luft gefüllte Pumpe fördert nicht gegen Druck!

Man kann dieses Problem bei rein wässrigen Systemen einfach durch Entgasen der Eluenten im Vakuum oder im Ultraschallbad lösen. Organische Lösungsmittel sind aber zu flüchtig dafür und es wirkt auch nicht so gut. Die beste Lösung ist hier kräftiges Begasen (= Durchperlen) mit Helium oder einem anderen Edelgas. Manchmal verwendet man Anlagen, welche im Laufmittel-Behälter sogar etwas Helium-Druck aufbauen. Dies erleichtert der Pumpe das Ansaugen.

Wir haben bei jeder Anlage einen **Vakuum-Entgaser** integriert, müssen daher die Laufmittel nicht vorher mit Edelgas behandeln.

Vor der Herstellung eines Laufmittels sollte man sich gut überlegen, wie viel man davon benötigt. "Restln" zu entsorgen ist teuer, hebt man sie zu lange auf kann es zu mikrobiellem Wachstum kommen. Manchmal verändert sich sogar die Zusammensetzung, da die verschiedenen Komponenten einen unterschiedlichen Dampfdruck aufweisen. Daher: die Mengen eher knapp bemessen. Falls doch etwas übrig bleibt, bitte aussagekräftig beschriften: Zusammensetzung, pH-Wert, Datum, Name. Nur so kann eine Weiterverwertung ermöglicht werden. Achtung: die Laufmittel müssen bei Arbeitsbeginn Raumtemperatur haben, das heißt Laufmittel rechtzeitig (am besten am Abend vorher) aus dem Kühlraum nehmen.

2.2. Mischung

Viele HPLC-Applikationen verlangen eine Veränderung der Laufmittelzusammensetzung, um starke Unterschiede in der Affinität der Probenbestandteile zur Phase bewältigen zu können. Es werden daher Laufmittelgradienten zur Elution benötigt.

Arten von Gradienten:

- a) Stufengradient (bei der HPLC sehr selten eingesetzt)
- b) kontinuierlicher Gradient (fast immer linear)
- c) binärer Gradient (2 Laufmittel)
- d) ternärer Gradient (3 Laufmittel) etc.
- e) pH-Gradient (selten, nur bei Chromatofocussierung)
- f) Salzgradient (bei Ionenaustauschchromatographie und Hydrophober Interaktion)
- g) Organischer Modifier (bei Adsorptions- und Reversed-Phase-Chromatographie)

Erzeugung von Gradienten:

a) Hochdruck-Mischung: Zwei (oder mehr) HPLC Pumpen werden von einem Gradientenprogramm so gesteuert, dass ihr Pumpverhältnis die jeweils gewünschte Laufmittelzusammensetzung ergibt und sich ihre Flüsse zur gewünschte Flussrate addieren. Nach den Pumpen sorgt eine Mischkammer mit kleinem Volumen für Homogenität des Eluens.

Vorteil dieser Methode: sehr flexibel bei der Gradientenbildung (genau, schnell steuerbar).
Nachteil: für jedes Laufmittel ist eine eigene Pumpe erforderlich.

Unsere HPLC 1 hat eine Hochdruckmischung.

b) Niederdruck-Mischung: Es genügt eine Pumpe. Zwischen Pumpe und den Laufmittel-Vorratsgefäßen befindet sich ein durch den Programmgeber gesteuertes Umschaltventil, welches sehr rasch zwischen den Zuleitungen umschaltet. Die Eluens-Zusammensetzung ergibt sich aus der relativen Verweilzeit in einer Position. Dieses System erlaubt auch ternäre etc. Gradienten.

Vorteil: mit einer Pumpe bis zu vier verschiedene Laufmittel möglich.

Nachteil: verzögerte, schwerfälligere Gradientenentwicklung.

Unsere HPLC 2 und HPLC 3 haben eine Niederdruckmischung.

Bevor man zu mischen beginnt sollte man sich aber noch eine wichtige Frage stellen:

Sind die Laufmittel überhaupt mischbar ??

Falls das gewünschte Elutionsmittel mit dem Startlaufmittel nicht mischbar ist, entweder umdisponieren oder es muss ein Zwischenschritt eingeschoben werden. z.B.: Hexan ist mit wässrigen Puffern nicht mischbar. Isopropylalkohol ist mit beiden mischbar. Vorgangsweise in diesem Fall: starten mit dem wässrigen Puffer, mit einem langsamen Gradienten auf 100 % Isopropanol wechseln, dann mit einem langsamen Gradienten auf Hexan der gewünschten Konzentration wechseln. Zum Rückspülen der Säule muss man alles genauso in der Gegenrichtung durchführen. Dieses Verfahren ist sehr mühsam und zeitaufwändig - daher sollte man versuchen einen mit dem Startpuffer mischbaren Eluenten zu finden.

2.3. Pumpe

Die Pumpe muss kleine Volumina gegen hohe Drücke möglichst **genau, reproduzierbar** und **pulsationsfrei** fördern. Bei Gradientensystemen besteht zusätzlich die Forderung nach möglichst **kleinen Totvolumina** zwischen Pumpe und Säule.

Es gibt:

Einkolbenpumpe: Am Umkehrpunkt wird der Kolben so schnell zurückgezogen, dass die Elastizität der Laufmittelsäule zwischen Pumpe und Säule die kurze Unterbrechung ausgleicht.

Zweikolbenpumpe: (engl.: dual piston pump) Ein Kolben drückt, der zweite saugt Laufmittel an. Am Umkehrpunkt schaltet ein Ventil blitzschnell um, so dass permanent gefördert wird. Das ist die am meisten verbreitete Pumpenart.

Die Arbeitsdrücke können etwa zwischen 100 und 300 bar liegen. Die meisten Pumpen könnten noch höhere Drücke erzeugen. Man vermeidet dies aber im Allgemeinen, da sonst zusehends Probleme z.B. mit der Stabilität der Säulenfüllungen und der Dichtigkeit aller Schraubverbindungen auftreten.

Der Druck ist abhängig von:

- **Flussrate:** über einen gewissen Bereich linear, darüber hinaus Kompression des Füllmaterials und überproportionaler Druckanstieg.
- **Säulenfüllmaterial:** je kleiner die Partikel sind, desto größer der Gegendruck. Wichtiger Parameter ist hier die Größenverteilung; je enger die Gaußkurve der Partikelgröße ist, desto weniger Gegendruck bei gleichem mittleren Körnchendurchmesser.
- **Laufmittelzusammensetzung:** Die Viskosität von Lösungsmitteln und ihren Mischungen muss beachtet werden. Z.B. besitzen Alkohol/Wasser Gemische höhere Viskosität als Wasser alleine, bzw. als Acetonitril/Wasser Gemische.
- **Temperatur:** Wirkt ebenfalls über die Viskosität.
- **Qualität der Packung:** Das Packen (Füllen) von HPLC-Säulen ist ein äußerst sensibler Prozess, von dessen Güte Trennleistung, Fließeigenschaften und Lebensdauer einer Säule kaum weniger stark abhängen als vom verwendeten Füllmaterial. Da überdies zum richtigen Füllen teure Geräte erforderlich sind, empfiehlt es sich, HPLC-Säulen aus kommerziellen Quellen zu beziehen.
- **Probenmatrix:** Viele Proben enthalten Bestandteile, die sich am Säulenkopf ablagern (entspricht Startfleck der DC). Dies können feine Partikel, aber auch Stoffe mit starker Wechselwirkung mit der stationären Phase sein. Gute Probenvorbereitung hilft dieses Problem zu minimieren.

HPLC-Pumpen müssen eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Lösungsmittelförderung aufweisen. Das ist sowohl für den isokratischen Betrieb, aber noch mehr bei Gradientenbetrieb von Bedeutung um vergleichbare Retentionszeiten und eine hohe Stabilität der Trennung zu erhalten.

Die **Pulsation** einer Pumpe hängt mit der Kompressibilität von Flüssigkeiten zusammen. Denkt man sich eine ruhende Wassersäule in einer Leitung, an deren einem Ende eine Kolbenpumpe mit konstanter Geschwindigkeit zu pumpen beginnt, so überträgt sich die Pumpgeschwindigkeit erst mit einer gewissen Verzögerung bis ans andere Ende der Leitung. Eben weil durch den Druckanstieg eine, wenn auch geringe, Kompression der Flüssigkeit eintritt. Aufgrund der geringen Totvolumina eines HPLC-Systems werden solche Pulsationen kaum ausgeglichen und können bis in die Detektor-Messzelle dringen. Strömende Flüssigkeiten bilden je nach Geschwindigkeit und Rohrgeometrie Wirbel, die z.B. in einem UV-Detektor ein konstantes Hintergrundsignal bewirken. Ändert sich die

Fließgeschwindigkeit, so ändert sich auch dieser Hintergrund. **Pulsationsdämpfung** in irgendeiner Form ist daher eine wesentliche Funktion jeder guten Pumpe.

2.4. Injektor

Die Aufgabe der Probe erfolgt NACH der Pumpe, also hochdruckseitig mittels eines Injektionsventils (engl. valve).

Der für den Benutzer wichtigster Teil davon ist die Probenschleife, eine Stahlkapillare, welche z.B. 20 oder 50 µl Probe fassen kann. Durch einen Umschalthebel kann die Schleife (engl.: loop) in zwei Positionen gestellt werden. In der Ladeposition (load) liegt die Schleife nicht im Lösungsmittelstrom. Sie ist somit drucklos und man kann sie mittels einer Spritze mit Probe befüllen. Das andere Ende der Schleife ist jetzt mit einer Abflussleitung verbunden (engl.: waste). (Zieht man jetzt die Injektionsnadel heraus, so könnte aufgrund des hydrostatischen Druckes die Probe dort ausfließen. Deshalb: Nadel stecken lassen bis der Lauf gestartet ist!)

In der "Inject"-Position ist die Schleife in die Leitung zwischen Pumpe und Säule integriert. Die Probe wird somit als schmale Zone auf den Säulenkopf gepumpt. Beim Umlegen des Hebels wird der Weg zwischen Pumpe und Säule unterbrochen, sodass sich sehr rasch Druck aufbaut. **Das Umschalten muss daher zügig vor sich gehen.**

2.5. Säule

Die Säule kann - so wie die gesamte HPLC-Anlage - aus Edelstahl oder auch aus Kunststoff bestehen, abhängig von den zu erwartenden Maximaldrücken und den verwendeten Laufmitteln.

Es werden sowohl ganze Säulen als auch Kartuschen am Markt angeboten, für die man eigene Kartuschenstecksysteme benötigt. Arbeitet man immer mit der gleichen Säulendimension, ist diese Variante kostengünstiger.

Anforderungen an die stationären Phase:

- hohe mechanische Festigkeit (Druck !)
- chemische Stabilität (saurer, basischer pH)
- homogene Korngröße (Größenverteilung: Streuung um den Mittelwert)
- Biokompatibilität (nicht toxisch)
- Resistenz gegen Mikroorganismen
- keine unspezifischen Wechselwirkungen
- hohe Selektivität
- Verfügbarkeit in konstanter Qualität

Trennmechanismen:

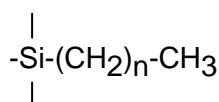
a.) Gelfiltrations-Chromatographie (GFC)

b.) Adsorptions-Chromatographie

c.) Reversed-Phase-Chromatographie

Die Matrix besteht aus chemisch an Silikagel gebundenen Alkylketten definierter Länge. Üblicherweise werden C₁₈-, oder C₄- Materialien verwendet, aber auch andere apolare Substituenten sind im Handel.

Alkyl-Silika:



Die Probe bindet an die Phase aufgrund sogenannter "hydrophober Wechselwirkungen". Polare Verbindungen werden daher schwächer retardiert als hydrophobe.

Die Wahl der Kettenlänge richtet sich nach den zu trennenden Probenbestandteilen. Eine gegebene Probe bindet umso fester je länger die Alkylketten der stationären Phase sind. Bei Proben mit hohem Molekulargewicht (Proteine) gibt es eventuell sehr viele hydrophobe Stellen, deren Bindung an die Phase sich addiert, sodass eine Elution von Säulen mit länger-kettigen Alkylen nicht möglich ist.

RP-Phasen lassen sich gut re-äquilibrieren, d.h. sie stellen sich rasch auf ein geändertes Verhältnis der Elutionsmittelkomponenten ein (Wasser + organischer Modifier). Diese Eigenschaft lässt ein reproduzierbares Arbeiten mit Gradienten zu. Die Umstellung auf andere Modifier (also z.B. von Wasser/Methanol auf Wasser/Acetonitril) dauert aber auch hier etwas länger.

Elution

Hydrophobe Wechselwirkungen sind nicht eigentlich Wechselwirkungen zwischen den beiden hydrophoben Partnern, sondern ergeben sich viel eher daraus, dass die hydrophoben Regionen nicht mit den polaren Wassermolekülen interagieren können (Siehe Biochemie/L. Stryer, Bildung der Tertiärstruktur von Proteinen).

Je hydrophober ein Probenmolekül ist, desto stärker wird es retardiert. Die Elutionszeit wird durch die Zusammensetzung der mobilen Phase stark beeinflusst. Fast alle Anwendungen beginnen die Elution mit wässrigen Puffern - auch der pH-Wert spielt natürlich bei Ampholyten eine große Rolle - und arbeiten dann mit steigender Konzentration eines apolaren organischen Lösungsmittels, des "organic modifiers" (Methanol, iso-Propanol, Acetonitril). Wichtig ist auch die Temperatur, daher arbeitet man hier oft mit Säulenöfen.

Die Zugabe spezifischer Zusätze zur mobilen Phase (z.B. Metallionen, Chelatbildner) bietet die Möglichkeit spezieller Selektivität durch Veränderung struktureller oder sterischer Zugänglichkeit von Proteinen.

d.) Ionenaustausch-Chromatographie (IEX)

e.) Affinitäts-Chromatographie

Lebensdauer einer Säule:

Die Haltbarkeit einer HPLC-Säule ist von der **Matrix abhängig**. Die Bindung der aliphatischen Ketten bei reversed phase-Säulen ist durch äußere Einflüsse nicht leicht zu beeinträchtigen, manche modifizierte Adsorbtionssäulen geben ihre funktionelle Gruppe aber sehr schnell an das Laufmittel ab. Die Säule verliert dadurch an Trennleistung. Matrixabhängige Alterungen sind nur schwer zu beeinflussen und müssen akzeptiert werden.

Probenabhängige Verschleißerscheinungen können leichter kontrolliert werden. So ist unbedingt darauf zu achten, dass die Probe keine Partikel aufweist (vor dem Auftragen zentrifugieren!). Auch sollte die Probe frei sein von Molekülen, die auf Grund ihrer Größe, oder auf Grund irreversibler Wechselwirkungen nicht mehr von der Säule eluiert werden können. Bei einer sehr komplexen Probe kann nach jedem Lauf ein Reinigungsprotokoll nötig sein!

Bedienungsfehler bei der Arbeit, wie zum Beispiel Trockenlaufen der Pumpen weil kein Laufmittel nachgefüllt wurde, oder die Verwendung eines für die jeweilige Säule ungeeigneten Laufmittels führen fast immer zum irreversiblen Verlust der Trennkapazität und sollten daher eigentlich nicht vorkommen.

Wirklich kaputt machen kann man eine Säule auch durch **unsachgemäße Lagerung**. Die größten Gefahren dabei sind austrocknen (die Säule wurde nicht dicht verschraubt), verschimmeln (mind. 20 % ige alkoholische Lösung bei der Lagerung verwenden) oder die Bildung von Salzkristallen (keine salzhaltigen Puffer in der Säule lassen).

2.6. Detektoren

Die bei der HPLC erreichten Trennleistungen und Vorteile hinsichtlich Analysengeschwindigkeit lassen sich nur realisieren, wenn unmittelbar nach der Säule eine kontinuierliche Erfassung der eluierenden Substanzen möglich ist (on-line Detektion). Die Messzellen der entsprechenden Detektoren müssen sehr **kleine Volumina** aufweisen (ca. 3 - 5 μl), um dem kleinen Flüssigkeitsvolumen, das ein HPLC-Peak einnimmt, gerecht zu werden. Die **Empfindlichkeit** der Geräte muss sehr hoch sein, da sich natürlich immer nur sehr wenig Probe in der Messzelle befindet und je nach Flussrate auch nur für sehr kurze Zeit. Deshalb müssen die Geräte auch eine sehr **hohe Geschwindigkeit** bei der Detektion aufweisen (Signale/Zeiteinheit).

a) Photometrie - UV oder VIS

Die Absorption des Säuleneluats wird im Durchflussphotometer gemessen. Während die Detektion im sichtbaren Licht eher ein Spezialfall ist, da nur wenige Substanzen Eigenfarbe aufweisen, ist die UV-Detektion universell einsetzbar. Moleküle mit aromatischen Gruppen sind ideal, da sie bei relativ hohen Wellenlängen erfassbar sind - z.B. Proteine bei 280 nm. Bei niederen Wellenlängen lassen sich so ziemlich alle Substanzen detektieren. Genau das wird dabei aber zum Problem, denn sowohl uninteressante Probenbestandteile (Nebenpeaks) als auch organische Laufmittel und Puffersalze (hohe Grundlinie, Basisliniendrift) beginnen zusehends zu absorbieren.

Eine Möglichkeit, nicht direkt messbare Verbindungen zu detektieren, besteht darin, sie mit einem Reagens zu derivatisieren.

b) Fluoreszenz

Falls Proben eine natürliche Fluoreszenz aufweisen (z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe = PAH's) oder in fluorogene Derivate überführt werden können (OPA-Aminosäuren) ist die Benützung eines Durchfluss-Fluorimeters eine besonders empfindliche Nachweismethode.

Da sowohl die Fähigkeit zur Fluoreszenz als auch die Anregungs- und Emissionswellenlängen substanzspezifisch sind, ist die Methode wesentlich selektiver als die UV/VIS Photometrie. Da es messtechnisch günstiger ist, ein Positiv-Signal gegen ein sehr kleines Grundsignal zu messen, als, wie bei der Photometrie, ein Negativ-Signal gegen ein hohes Grundsignal (Absorption!), ist dies auch eine besonders empfindliche Methode. Die Detektion von weniger als 1pmol Substanz ist damit möglich geworden!

c) Brechungsindex (RI)

Da der Refraktionsindex eines Lösungsmittels durch JEDE (!) gelöste Substanz verändert wird, stellt der RI-Detektor eine scheinbar universelle Methode dar. Abgesehen von der mittelmäßigen Empfindlichkeit hat er aber einen gravierenden Nachteil: Gradientensysteme sind nicht möglich, da der Anstieg der Basislinie die Peakhöhen weit übertreffen würde.

d) Amperometrische (Elektrochemische) Detektion

Beim Anlegen einer Spannung zwischen zwei Elektroden, welche in eine Lösung des Stoffes A eintauchen, kommt es bei Erreichen eines bestimmten Potentials (hängt von Redox-Potential des Systems A/B ab) zur Oxidation oder Reduktion von A zu B. Dabei werden Elektronen aufgenommen oder abgegeben - dies bewirkt einen messbaren Stromfluss.

e) Leitfähigkeits-Messung

Der Widerstand bzw. die Leitfähigkeit einer Lösung hängen von der Art und der Konzentration der darin gelösten Elektrolyte ab. Die Messung erfolgt hier ohne Stromfluss und somit ohne Stoffumsatz. Konduktivitätsdetektion wird in der Ionenchromatographie, also bei der Bestimmung von anorganischen und organischen Anionen und Kationen durch Ionenaustausch-chromatographie, eingesetzt.

f) Massenspektroskopie (LC-MS)

Bei der Massenspektroskopie werden die Probenmoleküle ionisiert und nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis getrennt. Hauptproblem: die anfallende Menge an Laufmittel. Das Laufmittel muss vor der Ionisierung der Probe selektiv und rückstandslos entfernt werden. Daher wird hier mit einer sehr geringen Flussrate gearbeitet (ca. 100 µl/min, eigene Pumpen und Säulen erforderlich !) und das Laufmittel muss verdampfbar sein (Wasser, Methanol, Acetonitril, KEINE salzhaltigen Puffer). Nur für leicht flüchtige Probenmoleküle geeignet !

3. AUSWERTUNG VON CHROMATOGRAMMEN

Qualitative Analyse:

Substanzen werden aufgrund ihrer Retentionszeit identifiziert. Diese muss zunächst in einem sogenannten Standardlauf ermittelt werden. Da die absolute Retentionszeit von Lauf zu Lauf kleinen Schwankungen unterliegt, ist es sicherer relative Retentionszeiten zu verwenden. Am besten setzt man sowohl dem Standard-Gemisch als auch der Probe einen **Internen Standard** (IS) zu, auf dessen Peak alle Retentionszeiten bezogen werden. Der IS sollte eine chemisch ähnliche und gut abtrennbare Substanz sein.

Ein wenig Vorsicht bei der Identifizierung eines Peaks ist immer angebracht, da ein Peak an einer bestimmten Stelle des Chromatogramms auch irgendeine andere, unbekannte Substanz sein könnte.

Je unspezifischer die Detektionsmethode, desto höher ist das Risiko einer Fehlinterpretation.

Quantitative Analyse:

Die quantitative Bestimmung einer Substanz mittels Chromatographie beruht darauf, dass (innerhalb bestimmter Grenzen) eine lineare Beziehung zwischen aufgetragener Substanzmenge und Peakfläche besteht. Die Integration des Peaks = die Ermittlung der Peakfläche erfolgt durch den Computer oder Integrator mit Hilfe der eingegebenen Integrationsparameter.

Zwei Probleme tauchen jedoch auf, die Beachtung verdienen:

*) Die kleinen Proben- und Injektionsvolumina erlauben kein genaues maßanalytisches Arbeiten. Das injizierte Volumen = der analysierte Anteil der Probe ist nicht genau messbar. Ein großes Problem bei Chromatographiearten, bei denen direkt injiziert wird. In der HPLC gibt es daher eine genau definierte Probenschleife. Weiß man die Konzentration der aufgetragenen Probe und das Volumen der Probenschleife, ist eine exakte Berechnung möglich (zum Beispiel bei der Erstellung von Eichgeraden). Umgekehrt kann man von der erhaltenen Peakfläche und dem bekannten Probenschleifenvolumen exakt auf die ursprüngliche Probe zurück schließen. Daher: die Probenschleife immer vollständig füllen. z.B. Bei einer Probenschleife mit einem Volumen von 20 µl mit der Injektionsspritze 23 - 25 µl einbringen, exakt 20 µl kommen auf die Säule, der Rest wird ausgespült.

*) Gleiche Mengen verschiedener Substanzen erzeugen meist nicht genau die gleiche Peakfläche (unterschiedlicher Detektor-Response). Für eine genaue Quantifizierung ist eine Eichgerade/kurve für jede einzelne Substanz zu erstellen.

Eine große Hilfe bei der qualitativen und quantitativen Analyse ist die Zugabe eines **Internen Standards** (IS). Egal ob nun 18 oder 23 µl der Probe injiziert wurden, das Verhältnis der Flächen der Peaks des IS und der Probe-Komponenten bleibt gleich.

Den unterschiedlichen Detektor-Response berücksichtigt man, indem man zunächst Gemische von IS und Substanz(en) bekannter Konzentration analysiert. Arbeitet man mit Stoffmengen- Konzentrationen (im Gegensatz zur Massenkonzentration) so erhält man den molaren Response.