

# Grundlagen der HPLC

---

**Def.:** Unter dem Begriff **Chromatographie** werden physikalische Methoden zusammengefasst, bei denen eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase erfolgt.



Die HPLC - high performance liquid chromatography - ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird.

Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und Probe unterscheidet man in der Flüssigkeitschromatographie folgende Trennmechanismen: Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Ausschluß- und Affinitätschromatographie.

Bei der HPLC finden hauptsächlich die Verfahren der Adsorptions- und Verteilungschromatographie Anwendung.

Bei der Adsorptionchromatographie werden die Probenmoleküle durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen reversibel an die stationäre Phase gebunden. Die Verweildauer der Substanzen an der stationären Phase ist aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkung mit der Oberfläche der stationären Phase unterschiedlich lang. So werden die Probesubstanzen voneinander getrennt.

Bei der Verteilungschromatographie nutzt man die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in den beiden Phasen aus. In der Normalphasen-Verteilungs-Chromatographie ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, in der Reversed-Phase (RP-Umkehrphase)-Chromatographie ist die mobile Phase polarer als die stationäre Phase. Die stationäre Phase kann an ein Trägermaterial chemisch gebunden werden oder das Trägermaterial wird einfach mit der stationären Phase belegt. Die Reversed-Phase-Chromatographie wird vorwiegend bei unpolaren oder wenig polaren Substanzen angewendet.

In der HPLC unterscheidet man zwei Arbeitsweisen:

1. isokratisch:

Dabei bleibt die Zusammensetzung des Eluenten und die Fließmittelstärke während des Trennvorganges konstant.

2. Gradientenelution:

Der Eluent wird während des Trennvorgangs variabel zusammengesetzt und die Fließmittelstärke erhöht.

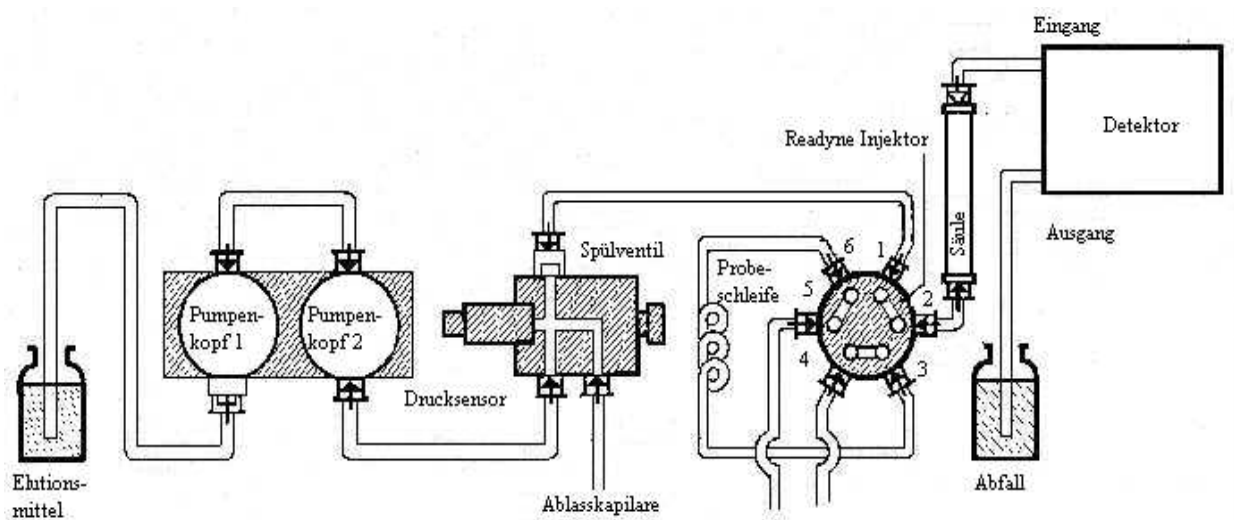


Abb. 1: Aufbau einer HPLC-Anlage

Ein HPLC-Gerät besteht aus 4 Hauptteilen: Pumpe, Einspritzsystem, Trennsäule und Detektor mit Auswertsystem. Die HPLC verwendet Trennpartikel mit Korngrößen von 3 bis 10  $\mu\text{m}$ ; sie erreicht damit hohe Trennstufenzahlen, erfordert aber gleichzeitig die Überwindung eines relativ hohen Gegendrucks beim Transport der mobilen Phase durch die dünne Trennsäule (2-6 mm Durchmesser). Alle Teile müssen möglichst totvolumenfrei miteinander verbunden werden und druckstabil sein (bis ca. 300 bar).

Bei der Probenaufgabe wird die Probe zunächst drucklos in eine Probenschleife injiziert, die sich in einem 4-Wege-Ventil befindet. Durch Umschalten wird der Elutionsmittelstrom dann durch die Probenschleife geführt, wodurch die Probe in die Säule gelangt. Die analytische Trennsäule, meist aus Edelstahl, sollte thermostatisierbar sein. Zur Detektion werden UV/VIS-, Fluoreszenz-Spektrometer, RI-amprometrische und Leitfähigkeits-Detektoren mit Durchfließzellen verwendet.

## Ergebnisdarstellung im Chromatogramm:

Die Darstellung des Ergebnisses der Stofftrennung erfolgt in Form eines Chromatogrammes, einer Elutionskurve. Sie stellt die Abhängigkeit für die Menge (Konzentration) der eluierten Substanzen von der Zeit dar. Die einzelnen Stoffe haben unterschiedliche Retentionszeiten. Die Gesamtretentionszeit  $t_R$  setzt sich aus der Nettoretentionszeit  $t_S$  (Aufenthalt in der stationären Phase) und der Durchflußzeit der mobilen Phase (ohne Retention)  $t_m$  zusammen.

Quelle: Schwedt, Georg: Taschenatlas der Analytik; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996