

Georg Schwedt

Einführung in die Chromatographie



Einführung in die Chromatographie

Einführung in die Chromatographie

Georg Schwedt

WILEY ■ **VCH**

Autor

Prof. Dr. Georg Schwedt

Lärchenstr. 21
53117 Bonn
Deutschland

Titelbild

Unter Verwendung einer Fotos von
Shutterstock (1860024652, Vladimka
production)

Alle Bücher von WILEY-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung.

**Bibliografische Information
der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2024 Wiley-VCH GmbH, Boschstraße 12, 69469
Weinheim, Germany

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

Print ISBN: 978-3-527-35249-4

ePDF ISBN: 978-3-527-84344-2

ePub ISBN: 978-3-527-84345-9

Umschlaggestaltung Wiley

Satz Newgen KnowledgeWorks (P) Ltd., Chennai, India

Druck und Bindung

Gedruckt auf säurefreiem Papier.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort *xi*

1 Einführung 1

- 1.1 Entwicklungen von den klassischen zu den instrumentellen Trennmethoden *1*
- 1.1.1 Vorläufer chromatographischer Trennmethoden *2*
- 1.1.2 Adsorptionschromatographie von Pflanzenfarbstoffen durch M. Tswett *3*
- 1.1.3 Verteilungschromatographie in Säulen *5*
- 1.1.4 Papierchromatographie *5*
- 1.1.5 Von der Dünnschicht- zur Planarchromatographie *6*
- 1.1.6 Vom Ionenaustausch zur Ionenchromatographie *7*
- 1.1.7 Gelchromatographie *8*
- 1.1.8 Affinitätschromatographie *8*
- 1.1.9 Gaschromatographie *8*
- 1.1.10 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) *10*
- 1.2 Systematik und Definitionen *11*

2 Theoretische Grundlagen 15

- 2.1 Allgemeine Theorien und Kenngrößen *15*
- 2.1.1 Kinetische Theorie *15*
- 2.1.2 Theoretisches Trennstufenmodell *19*
- 2.1.2.1 Diffusionseffekte – Vergleich offenes und gepacktes Rohr *23*
- 2.1.3 Die van-Deemter-Gleichung: $H = f(u)$ *25*
- 2.1.4 Spezielle chromatographische Kenngrößen *27*
- 2.2 Trennmechanismen – Prinzipien und Übersicht *31*
- 2.2.1 Adsorption *31*
- 2.2.2 Ionenaustausch und Ionenausschluss *33*
- 2.2.3 Flüssig-flüssig-Verteilung *34*
- 2.2.4 Reversed-phase-Mechanismen *39*
- 2.2.5 Gelpermeation *40*
- 2.2.6 Bioaffinität und Enantiomeren-Trennprinzipien *41*

3	Methoden und Verfahren zur Probenvorbereitung	45
3.1	Einführung	45
3.2	Filtration	46
3.3	Extraktion	46
3.3.1	Extraktion fester Proben	47
3.3.1.1	Soxhlet-Extraktion	47
3.3.1.2	Verfahren mit verstärkter Lösemittlextraktion	47
3.3.1.3	Mikrowellen- und ultraschallunterstützte Extraktionen	48
3.3.1.4	Verwendung superkritischer Flüssigkeiten (supercritical fluid extraction, SFE)	49
3.3.1.5	Extraktion mit überhitztem Wasser	51
3.3.2	Extraktion flüssiger Proben	51
3.3.2.1	Festphasenextraktionen (solid phase extraction, SPE)	52
3.3.2.2	Festphasen-Mikroextraktionen (solid phase microextraction, SPME)	53
3.3.2.3	Extraktion mit Rührfisch (stir-bar extraction)	57
3.3.2.4	Membranextraktion	57
3.3.2.5	Purge-and-trap-Verfahren	57
3.3.3	Extraktion gasförmiger Proben	59
3.3.3.1	Trapping aus gasförmigen Proben	59
3.3.3.2	Headspace-Analyse	59
3.4	Verfahren für schwierig aufzubereitende feste Proben	60
3.5	Direkte Kombination von Probenpräparation und Trennung	60
3.5.1	Injektionen großer Volumina in der GC	60
3.6	Methoden zur Erhöhung der Selektivität	61
3.6.1	Affinitätsmethoden	61
3.6.2	Molecular imprinting polymers (MIP)	61
3.6.3	Medien mit begrenztem Zugang	61
3.7	Probenvorbereitung mit Derivatisierung	62
3.7.1	Derivatisierung zur Erhöhung der Flüchtigkeit und Trennbarkeit	62
3.7.2	Derivatisierung zur Verbesserung der Detektierbarkeit	62
4	Planar- oder Dünnschichtchromatographie	65
4.1	Spezielle Parameter	65
4.2	Stationäre Phasen	70
4.2.1	Kieselgel	70
4.2.2	Aluminiumoxid	70
4.2.3	Magnesiumsilicat	71
4.2.4	Polyamide	71
4.2.5	Aktivität	71
4.2.6	Cellulose	72
4.3	Fließmittel	72
4.4	Verfahren und Techniken zur Durchführung	75
4.4.1	Charakteristika von Dünnschichtplatten	76
4.4.2	Probenaufgabe	77

- 4.4.3 Entwicklung der Trennung 79
- 4.4.4 Detektion 81
- 4.5 Anwendungen – instrumentelle Entwicklungen 88

- 5 Flüssigchromatographie in Säulen (LC – HPLC) 91**
 - 5.1 Gerätetechnik für die Normal- und Mitteldruck-Chromatographie 91
 - 5.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) 94
 - 5.2.1 Pumpen 94
 - 5.2.2 Gradientensysteme 97
 - 5.2.3 Probenaufgabesysteme 99
 - 5.2.4 Säulen 100
 - 5.2.5 Stationäre Phasen 101
 - 5.2.5.1 Kieselgel 101
 - 5.2.5.2 Chemisch modifizierte Kieselgele 105
 - 5.2.5.3 Styrol-Divinylbenzen 108
 - 5.2.6 Mobile Phasen 108
 - 5.2.7 Detektoren 112
 - 5.2.7.1 RI-Detektor 115
 - 5.2.7.2 UV/Vis-Spektralphotometer 116
 - 5.2.7.3 Fluoreszenzdetektor 117
 - 5.2.7.4 Lichtstreuendetektoren 118
 - 5.2.7.5 Elektrochemische (amperometrische) Detektoren 119
 - 5.2.7.6 Kopplungstechniken zur Detektion 120
 - 5.3 Ausschluss- bzw. Gelpermeationschromatographie 121
 - 5.3.1 Gelmaterialien 122
 - 5.3.1.1 Hydrophile Gele 123
 - 5.3.1.2 Organophile Gele 123
 - 5.3.1.3 Anorganische Gele 124
 - 5.3.2 Anwendungen 124
 - 5.4 Affinitäts- bzw. Bioaffinitätschromatographie 128
 - 5.4.1 Trennprinzipien und -materialien 128
 - 5.4.2 Anwendungen 130
 - 5.4.2.1 Adsorption und Elution von Makromolekülen 131
 - 5.4.2.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie 132
 - 5.4.2.3 Fließbettchromatographie 132

- 6 Ionenchromatographie 135**
 - 6.1 Einführung 135
 - 6.2 Gerätetechnik 136
 - 6.2.1 Suppressortechnik 136
 - 6.2.2 Ionenchromatographie ohne Suppression (Einsäulen-Technik) 139
 - 6.2.3 Detektoren 139
 - 6.3 Ionenaustausch-Chromatographie 139
 - 6.3.1 Stationäre Phasen 139

- 6.3.1.1 Anionenaustauscher auf Basis organischer Polymere 140
- 6.3.1.2 Polymethacrylat- und Polyvinylharze 141
- 6.3.1.3 Latex-Anionenaustauscher 142
- 6.3.1.4 Anionenaustauscher auf Kieselgelbasis 144
- 6.3.1.5 Kronenether-Phasen 145
- 6.3.2 Elutionsmittel für spezielle Trennungen 146
 - 6.3.2.1 Ionenaustausch-Chromatographie anorganischer Anionen 148
 - 6.3.2.2 Systempeaks 149
 - 6.3.2.3 Ionenaustausch-Chromatographie organischer Anionen 150
 - 6.3.2.4 Kohlenhydrate 151
 - 6.3.2.5 Kationenaustausch-Chromatographie 152
 - 6.3.2.6 Trennung von Alkali- und Erdalkalitionen sowie aliphatischen Aminen 153
 - 6.3.2.7 Trennung von Übergangs- und Schwermetallionen 154
- 6.3.3 Detektoren 155
 - 6.3.3.1 Bestimmung mit Leitfähigkeitsdetektion 155
 - 6.3.3.2 Bestimmung mit spektralphotometrischer Detektion 156
- 6.4 Ionenausschluss-Chromatographie 157
 - 6.4.1 Suppressorsysteme 158
 - 6.4.2 Analyse anorganischer Säuren 159
 - 6.4.3 Analyse organischer Säuren 160
 - 6.4.4 Analyse von Alkoholen und Aldehyden 160
 - 6.4.5 Analyse von Aminosäuren 160
- 6.5 Ionenpaar-Chromatographie (MPIC) 162
 - 6.5.1 Experimentelle retentionsbestimmende Parameter 164
 - 6.5.2 Analyse oberflächeninaktiver Ionen 166
 - 6.5.3 Analyse oberflächenaktiver Ionen 167
 - 6.5.4 Anwendung der „ion-suppression-Technik“ 168
- 7 Gaschromatographie 171**
 - 7.1 Einführung 171
 - 7.1.1 Systematisierung der Gaschromatographie 172
 - 7.2 Spezielle gaschromatographische Parameter 172
 - 7.2.1 Retentionsindexsystem 174
 - 7.2.2 Rohrschneider/McReynolds-Konstanten für Trennflüssigkeiten 176
 - 7.3 Gerätetechnik 177
 - 7.3.1 Probenaufgabesysteme 178
 - 7.3.2 Pyrolyse-Gaschromatographie 182
 - 7.3.3 Headspace-Analyse 182
 - 7.3.4 Trägergase 184
 - 7.3.5 Trennsäulen 186
 - 7.3.5.1 Gepackte Säulen in der Gas-flüssig-Chromatographie (GLC) 186
 - 7.3.5.2 Kapillarsäulen in der Gas-flüssig-Chromatographie (GLC) 188
 - 7.3.5.3 Stationäre Phasen in der Gas-flüssig-Chromatographie (GLC) 189
 - 7.3.5.4 Stationäre Phasen in der Gas-fest-Chromatographie (GSC) 192

7.3.5.5	Temperaturprogrammierte Trennungen	194
7.3.6	Detektoren	195
7.3.6.1	Charakteristische Größen eines Detektors	196
7.3.6.2	Wärmeleitfähigkeitsdetektor	198
7.3.6.3	Flammenionisationsdetektor (flame ionization detector, FID)	200
7.3.6.4	Elektroneneinfangdetektor (electron capture detector, ECD)	201
7.3.6.5	Flammenphotometrischer Detektor (flame photometric detector, FPD)	203
7.3.6.6	Phosphor-Stickstoff-Detektor (phosphorous-nitrogen-detector, PND)	205
7.3.6.7	Atomemissionsdetektor (atomic emission detector, AED)	208
7.3.6.8	Massenselektiver Detektor (mass selective detector, MSD)	209
7.3.6.9	Quantitative Analysen	210
8	Chromatographie mit überkritischen Phasen	213
8.1	Einführung	213
8.2	Überkritische Fluide	213
8.2.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften überkritischer Fluide	215
8.3	Gerätetechnik	218
8.3.1	Mobile Phasen	219
8.3.2	Gradiententechnik	220
8.3.3	Trennsäulen	220
8.3.4	Injektorsysteme	222
8.3.5	Restriktoren	223
8.3.6	Detektoren	224
8.4	Anwendungen	224
Index		227

Vorwort

Unter dem Titel „Chromatographische Trennmethoden“ veröffentlichte der Autor 1979 erstmals ein Lehrbuch, in dem alle Methoden der Chromatographie beschrieben wurden. Es erschien mit dem Untertitel „Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen“ in 2. und 3. Auflage (1986 bzw. 1994) als Taschenbuch nochmals im Thieme-Verlag in Stuttgart und wurde dann vom Verlag Wiley-VCH in dessen Programm übernommen.

Eine Neuauflage wurde zunächst nicht geplant, da im 1995 erschienenen Lehrbuch des Autors „Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis“ (ab 2001 bei Wiley-VCH, 1. Nachdruck 2004, 3. Aufl. 2017) die Chromatographie ausführlich dargestellt wurde.

In der nun vorliegenden „Einführung in die Chromatographie“ wurde das Konzept des ersten Titels wieder aufgegriffen. Die wesentlichen Kapitel stammen aus dem Buch „Analytische Trennmethoden“ (2010) ohne „Elektrophoretische Trennmethoden“ und „Feld-Fluss-Fraktionierung“, die eigenständige Methoden darstellen.

Die einzelnen Abschnitte wurden überarbeitet, zum Teil neu verfasst, und die Literaturangaben wurden ergänzt bzw. aktualisiert. Eine umfassende Suche nach spezieller Fachliteratur ist in den OPAC-Katalogen der Universitätsbibliotheken, insbesondere der Technischen Informationsbibliothek (TIB) in Hannover, möglich.

Das nun vorliegende Buch soll auch die Grundlagen für eine erfolgreiche praktische Anwendung der heute weitgehend automatisierten chromatographischen Trennverfahren zur Lösung analytischer Problemstellungen vermitteln.

Bonn, im Mai 2023

Georg Schwedt

1

Einführung

1.1 Entwicklungen von den klassischen zu den instrumentellen Trennmethode

Chromatographische Methoden haben heute einen hohen Stellenwert und eine weite Verbreitung in all jenen Laboratorien gefunden, die sich mit der Analytik komplexer Substanzgemische beschäftigen. Trennungen chemischer Stoffe, die nach unserem heutigen Verständnis in den Bereich der Chromatographie gehören, wurden mit ersten systematischen Ansätzen bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben. Die eigentliche, sehr stürmisch fortschreitende Entwicklung zu einer Trenn- und Bestimmungsmethode und damit sowohl zu einer qualitativen als auch quantitativen Analysenmethode begann aber erst in den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts und hat zu den Fortschritten in den gesamten Naturwissenschaften und auch in der Medizin einen wesentlichen Beitrag geleistet.

Der Begriff Chromatographie umfasst heute alle physikalisch-chemischen Trennmethode, bei denen eine Trennung von Stoffen infolge unterschiedlicher Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase zustande kommt. Ein chromatographisches System besteht demnach aus einem nicht mischbaren Phasenpaar, dessen eine Phase sich an der anderen vorbei bewegt. Noch 1950 wurde von *Zechmeister* (1889–1972) eine Definition in folgendem, weitaus engerem Sinn gegeben: „Die Chromatographie umfasst diejenigen Prozesse, welche die Trennung von Substanzen aus einem Stoffgemisch und ihre selektive Fixierung auf der festen Oberfläche eines Trägers gestatten“ (Weil 1954). Zu diesem Zeitpunkt gab es noch keine Gas-Flüssigkeits-Chromatographie. Flüssigkeits-chromatographische Trennungen beruhten in erster Linie auf Adsorptionseffekten und wurden in Säulen oder an dünnen Schichten durchgeführt.

In den vergangenen 50 Jahren sind Methoden und Techniken entwickelt worden, bei denen außer der Adsorption auch andere Vorgänge wie Flüssig-flüssig-Verteilung, Ionenaustausch und Gelpermeation den Trenneffekt bestimmen. Die Bezeichnung „Chromatographie“ wurde bereits 1835 im Angelsächsischen als Fachausdruck zur Beschreibung von Farben, in der analytischen Chemie erstmalig von dem Botaniker *M. Tswett* (1872–1919) verwendet. Tswett gebrauchte in seinen historischen Arbeiten von 1903 (siehe unten) zunächst noch den Begriff der

Adsorptionsanalyse, 1906 für sein Verfahren zur Trennung von Pflanzenfarbstoffen die Bezeichnung „chromatographische Adsorptionsanalyse“. Die wörtliche Übersetzung des Wortes Chromatographie aus den griechischen Wörtern *chroma*: Farbe und *graphein*: schreiben lautet demnach „Farbschreiben“. Die ersten von Tswett getrennten Substanzen waren Farbstoffe (Chlorophylle, Xanthophylle, Carotine) und erst mit den erweiterten Möglichkeiten apparativer Detektion können heute auch farblose Stoffe chromatographisch analysiert werden.

1.1.1 Vorläufer chromatographischer Trennmethode

Bei der Auswertung der wissenschaftlichen Arbeiten, die nach heutiger Definition in den Bereich der Chromatographie gehören, lassen sich nach *Weil* und *Williams* (1953) drei historische Perioden unterscheiden: 1. die empirische, 2. die wissenschaftliche (theoretische) und 3. die technologische Periode.

Innerhalb der ersten Periode beschäftigten sich mehrere Wissenschaftler auf verschiedenen Gebieten der Naturwissenschaften mit den experimentellen Möglichkeiten zur Trennung von Stoffen.

Von Friedlieb Ferdinand *Runge* (1794–1867), der sich vorwiegend mit Farbstoffen beschäftigte, stammen die recht ästhetischen Bilder, die er nach dem Auftragen gefärbter Flüssigkeiten auf Druck- und Löschpapier erhielt. Auch chemische Reaktionen führte er auf Löschpapier durch und beschrieb die Ergebnisse dieser Form von Tüpfelanalyse in seinen Werken „Der Bildungstrieb der Stoffe. Veranschaulicht in selbständig gewachsenen Bildern“ (1855) und „Zur Farbenchemie, Musterbilder für Freunde des Schönen und zum Gebrauch für Zeichner, Maler, Verzierer und Zeugdrucker“ (1850). *Runge* wird aufgrund dieser Arbeiten die Priorität in der Entdeckung der Papierchromatographie zugeschrieben (*Weil* und *Williams* 1953). Eine analytisch-chemische Absicht oder gar Problemstellung ist diesen Arbeiten jedoch nicht zu entnehmen.

Zur teilweisen Trennung von Stoffen wurde ab 1861 von Christian Friedrich *Schönbein* (1799–1868), Professor in Basel, Entdecker des Ozons und der Schießbaumwolle, und von seinem Schüler Friedrich *Goppelsröder* (1837–1919) die Kapillarwirkung des Papiers systematisch untersucht und über das Verhalten verschiedenster Stoffe berichtet. Bei dieser Technik wird ein Papierstreifen direkt in die zu untersuchende Lösung getaucht. Fließmittelgemische waren noch nicht bekannt, so dass erst durch mehrfache Wiederholung dieses Kapillarovorganges eine teilweise Trennung erreicht wurde (*Grüne* 1953). 1901 erschien von *Goppelsröder* die erste Monographie über die Ergebnisse dieser Arbeiten unter dem Titel „Capillaranalyse“, in der vor allem auch Anwendungen zur Arzneimittelprüfung beschrieben werden. Bereits 1850 berichteten die englischen Chemiker *Thompson* und *Way* über einen Ionenaustausch an Feststoffen. Sie beobachteten nach der Behandlung von Bodenproben mit Ammoniumsalzen, dass Ammoniumionen sorbiert werden und Calciumionen dafür in Lösung gelangen. Die Reversibilität und Stöchiometrie des Ionenaustausches wurde 1858 bzw. 1876 von *Eichhorn* an Tonmaterialien bzw. von *Lemberg* an Aluminiumsilicaten beobachtet und beschrieben. An analytische Anwendungen dachte zu dieser Zeit niemand, der technische Gebrauch stand zunächst

im Vordergrund – z. B. die Entfernung von Natrium- und Kaliumionen aus Zucker-
rübensaft (1896).

Die ersten adsorptions-chromatographischen Trennungen in einer gefüllten Säule wurden 1893 von dem britischen Chemiker L. *Reed* an Kaolin durchgeführt – z. B. von FeCl_3 und CuSO_4 . Der amerikanische Chemiker und Geologe D. T. *Day* (1859–1925) berichtete in den Jahren 1897 bis 1903 in mehreren Arbeiten über das Verhalten von Petroleumproben an verschiedenen Feststoffen (Bodenproben wie z. B. Kalkstein). Er selbst bezeichnete sein Verfahren als fraktionierte Filtration, womit er verschiedene gefärbte Fraktionen erhielt (Abb. 1.1). Diese Technik würden wir heute als (erste chromatographische) Frontalanalyse bezeichnen. Day verglich seine Experimente zur Fraktionierung von Petroleum mit den Ergebnissen durch Destillation. Zur gleichen Zeit erschien auch ein Bericht der deutschen Chemiker *Albrecht* und *Engler* (Carl Oswald Viktor E., 1842–1925, Karlsruhe) in der Zeitschrift „Angewandte Chemie“ über den Vorgang der Filtration von Petroleum (Erdöl) durch Florida-Erde.

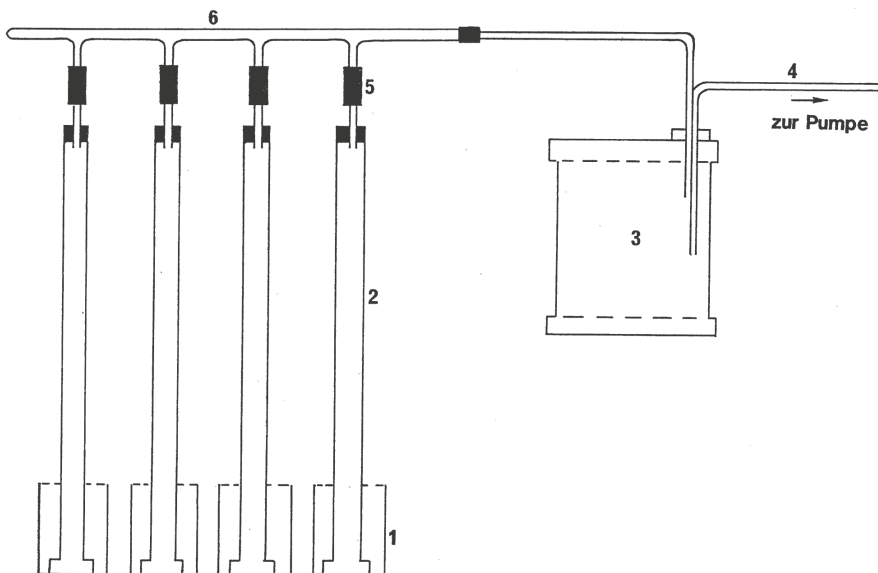


Abb. 1.1 Apparatur zur Technik der „fraktionierten Filtration“ mit mehreren Säulen für Petroleum nach der Methode von Day, um 1900. 1: Vorratsgefäße für Petroleumproben, 2: Säulen mit Adsorbentien, 3: Kammer zum Auffangen der Fraktionen, 4: Glasrohr zur Pumpe, 5 und 6: Verbindungssteile. Quelle: Schwedt (1982).

1.1.2 Adsorptionschromatographie von Pflanzenfarbstoffen durch M. Tswett

Michael *Tswett* wurde als Sohn einer italienisch-türkischen Mutter und eines ukrainischen Vaters am 14. Mai 1872 in Asti/Italien geboren. Er wuchs in der Schweiz auf, wo er in Genf und Lausanne Botanik, Physik und Chemie studierte. Sein

akademischer Werdegang führte ihn von Genf (Promotion 1896) über St. Petersburg nach Warschau (Privat-Dozent 1902), wo er an der Veterinärmedizinischen Fakultät 1907 zum Professor der Botanik ernannt wurde und 1908 eine Professur an der Technischen Hochschule übernahm. In Warschau entstanden seine grundlegenden Arbeiten zur Adsorptionschromatographie von Pflanzenfarbstoffen. In einem Vortrag am 21. März 1903 vor der biologischen Sektion der Warschauer Naturforschenden Gesellschaft berichtete er „Über eine neue Kategorie von Adsorptionserscheinungen und ihre Anwendung in der biochemischen Analyse“. Er stellte systematische Studien zu den Adsorptionseigenschaften einer großen Zahl anorganischer und organischer Farbstoffe vor, die mit der erfolgreichen Trennung (Adsorptionsanalyse) der Chlorophyllpigmente aus einer Ligroinlösung an gepulvertem Calciumcarbonat abschlossen.

1906 veröffentlichte Tswett in den „Berichten der deutschen botanischen Gesellschaft“ die grundlegende Arbeit zur „Adsorptionsanalyse und chromatographischen Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls“. In dieser Arbeit wurde noch nicht die Säulenteknik allgemein verwendet, sondern die fraktionierte Adsorption: Außer Calciumcarbonat erwies sich auch das Kohlenhydrat Inulin als geeignetes Adsorbens, um die Blattfarbstoffe im Reagenzglas voneinander zu trennen. Die Elution der adsorbierten Substanzen erfolgte mit Ethanol. Die Adsorptionssäule wurde aber bereits in dieser Arbeit eingesetzt (Abb. 1.2).

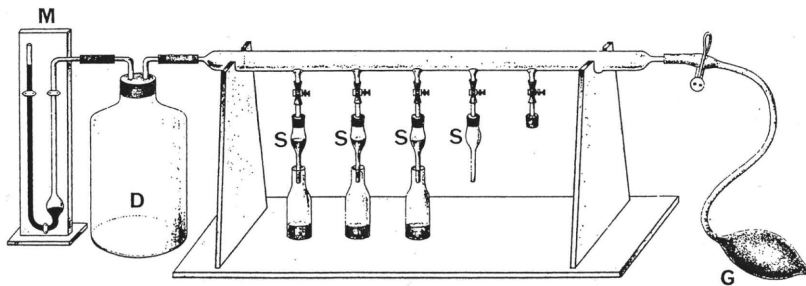


Abb. 1.2 Säulenchromatographie von Tswett (1906). S: Säulen, G: Gummiball zum Pumpen, M: Manometer, D: Druckgefäß. Quelle: Schwedt (1982).

Ganz wesentlich für die analytische Anwendung der Chromatographie ist die Tatsache, dass Tswett bereits in den ersten Arbeiten die Detektion in Form der Fluoreszenzanalyse mit den Trennungen verbindet; seine ersten wissenschaftlichen Arbeiten handeln von der Fluoreszenz der Pflanzenfarbstoffe. Durch die Ereignisse des Ersten Weltkrieges wurden diese erfolgreichen Arbeiten unterbrochen: Tswett musste nach Gorki (seit 1990 Nischni Nowgorod, russ. Gebietshauptstadt an der Mündung der Oka in die Wolga) fliehen, wurde 1918 Dozent in Dorpat (Estland), musste infolge der Kriegereignisse (Einmarsch deutscher Truppen) aber auch von dort wieder flüchten und starb am 29. Juni 1919 in Woronek, wohin die Universität Dorpat verlegt worden war. Sein erster Bericht über die Adsorptionsanalyse des Chlorophylls zeigt bereits in der Zusammenfassung, dass er die Möglichkeiten der

analytischen Anwendung auf die verschiedensten Probleme der Praxis erkannt hatte. Jedoch sollten noch über 20 Jahre vergehen, bevor im Arbeitskreis von Richard *Kuhn* (1900–1967, Nobelpreis 1938) diese Methodik zu einem erheblichen Fortschritt in der Chemie der Naturstoffe beitragen konnte.

1.1.3 Verteilungschromatographie in Säulen

Der nächste Meilenstein in der Geschichte der Säulenchromatographie wurde 1941 von Archer John Porter *Martin* (1910–2002) und Richard Laurence Millington *Synge* (1914–1994) gesetzt. Beide Wissenschaftler hatten in Cambridge/England Chemie studiert und arbeiteten zur Zeit ihrer historischen Experimente im Forschungsinstitut der Textilindustrie in Leeds. 1952 erhielten sie gemeinsam den Nobelpreis. Der von ihnen geschaffenen Methode der Verteilungs-(Flüssig-flüssig-) Chromatographie sind zunächst Untersuchungen zur Isolierung acetylierter Aminosäuren in Proteinhydrolysaten durch Extraktion in einer speziellen Apparatur aus der wässrigen in eine organische Phase (Chloroform) aufgrund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten vorausgegangen. Dieses Prinzip der Gegenstromverteilung wurde noch im selben Jahr von ihnen auf eine chromatographische Säule, gefüllt mit Kieselgel, übertragen: Von dem trockenen Kieselgel wird eine erhebliche Menge an Wasser aufgenommen, Chloroform wird als mobile Phase durch die Säule bewegt.

Mit *Martin* und *Synge* begann auch die zweite historische Phase der Chromatographie – nach der *empirischen Phase* wurde nun die *wissenschaftliche Epoche* eingeleitet. Beide Wissenschaftler haben auch die theoretischen Grundlagen der Flüssig-flüssig-Verteilung, auf denen die Verteilungschromatographie beruht, beschrieben und zur Trennung einer Reihe acetylierter Aminosäuren systematisch genutzt.

Einen weiteren Schritt zur heutigen breiten Anwendung der Säulenchromatographie stellt die Entwicklung der *Gradientenelutionstechnik* durch Arne Wilhelm Kaurin *Tiselius* (1902–1971) in Uppsala dar. 1952 erschien die erste grundlegende und systematische Arbeit, in der die stufenweise, diskontinuierliche Elution durch eine kontinuierliche Gradientenelution abgelöst wurde und die Anwendung auf die Trennung von Zuckern aus einem Dextrinhydrolysat gezeigt wird.

1.1.4 Papierchromatographie

Die erste verteilungschromatographische Trennung in Säulen von acetylierten Aminosäuren ermöglichte keine Trennung basischer und Dicarboxylaminosäuren. Weitere Versuche mit Cellulose anstelle von Kieselgel und mit *n*-Butanol in der mobilen Phase lösten dieses Trennproblem und führten direkt zur Anwendung von geeignetem Filterpapier in Form der *Papierchromatographie*. Für die Trennung von Aminosäuren mit diesem chromatographischen System ist keine vorherige Acetylierung mehr erforderlich.

Der Ursprung der Papierchromatographie ist zwar bereits in den Arbeiten von *Runge* zu sehen, ein analytisch brauchbares Verfahren wurde aber erst mit der Herstellung von Papier mit gleichmäßiger Stärke 1943/44 möglich. *Consden*, *Gordon*

und *Martin* beschrieben außerdem das Prinzip der zweidimensionalen Papierchromatographie (Abb. 1.3).

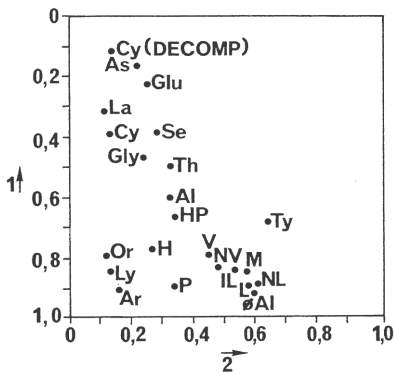


Abb. 1.3 Zweidimensionale Papierchromatographie von Aminosäuren nach Consden. 1. Fließmittel: 0,3 % Phenol in Ammoniak, 2. Fließmittel: Collidin (2,4,6-Trimethylpyridin), Al: Alanin, Ar: Arginin, As: Asparagin, Cy: Cystin, Glu: Glutaminsäure, Gly: Glycin, H: Histidin, HP: Hydroxyprolin, IL: Isoleucin, La: Lanthionin, L: Leucin, Ly: Lysin, M: Methionin, NL: Norleucin, NV: Norvalin, Or: Ornithin, ØAl: Phenylalanin, P: Prolin, Se: Serin, Th: Threonin, Ty: Tyrosin, V: Valin. Verändert nach Gordon und Martin 1944; Schwedt, 1982.

Mit diesen Arbeiten begannen systematische theoretische und praktische Untersuchungen, die der Papierchromatographie auch aufgrund der einfachen Durchführungstechnik ein weites Feld an Anwendungen eröffneten. Die Anzahl der Arbeiten, die auf der Papierchromatographie beruhen, wuchs in den Jahren von 1943 bis 1949 in geometrischer Reihe.

Die Tswett'sche Chromatographie, die Gegenstromverteilung und auch die Kapillaranalyse werden als die Pfeiler dieser speziellen Methode angesehen. Infolge der langen Trennzeiten (verursacht durch geringe Fließgeschwindigkeiten der mobilen Phase) und einer weniger guten Reproduzierbarkeit als bei anderen chromatographischen Methoden hat die Papierchromatographie heute jedoch keine Bedeutung mehr. Sie ist durch die Verwendung von dünnen Schichten aus Cellulose-Materialien in die Dünnschicht- bzw. Planarchromatographie integriert. In der Entwicklung der Chromatographie hat sie jedoch wesentlich zu unseren heutigen Kenntnissen beigetragen.

1.1.5 Von der Dünnschicht- zur Planarchromatographie

1938 erschien die erste Veröffentlichung zur Dünnschichtchromatographie von *Izmailov* und *Shraiber* unter dem Titel „A spot chromatographic method of analysis and its application in pharmacy“, in der die Tswett'sche Methode in Form loser Schichten aus Aluminiumoxid als Zirkularmethode angewandt wurde. Die Detektion zahlreicher pharmazeutisch wichtiger Substanzen erfolgte aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften unter einer UV-Lampe. Bindemittel (Stärke) setzten erstmals *Meinhard* und *Hall* 1949 ein und erhielten so eine mechanische Stabilität der Schichten, wodurch auch andere Entwicklungstechniken außer der Zirkularmethode möglich wurden. Die Unterlage für die Adsorbentien stellen in beiden Arbeiten Glasplatten dar.

Aber erst die zahlreichen Arbeiten von Egon Stahl (Saarbrücken) seit 1956 trugen zur schnellen Entwicklung der Dünnschichtchromatographie (DC) bis zu einer Hochleistungs-Planarchromatographie bei. Zunächst dominierte die Adsorptionschromatographie, heute lassen sich die verschiedensten chromatographischen Trennprinzipien – Verteilungs-, Ionenaustausch-, Umkehrphasen- und Gelchromatographie – an zahlreichen Materialien sowie Fertigplatten und -folien durchführen.

Seit 1973 werden mit sehr eng fraktioniertem Kieselgel mit Teilchendurchmessern unter 5 µm hohe Trennschärfen (Trennleistungen) auch in der Planarchromatographie, vergleichbar mit denen in der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie in Säulen (HPLC), erreicht. Von L. V. Andreev wurden zuerst mit diesen Materialien sehr schnelle Trennungen beschrieben, vom Institut für Chromatographie in Bad Dürkheim (R. E. Kaiser) kamen weitere Impulse zur Weiterentwicklung dieser speziellen DC-Technik, die zunächst als *micro thin layer chromatography*, später als *high-performance thin-layer chromatography* (HPTLC) oder wegen der eingesetzten geringen Substanzmengen auch als *Nano-DC* bezeichnet wurde. Damit hatte sich auch in der DC eine ähnliche technologische Entwicklung vollzogen wie in der Säulenchromatographie (siehe weiter unten).

1.1.6 Vom Ionenaustausch zur Ionenchromatographie

Nach den Beobachtungen von Ionenaustauschvorgängen im Boden und an einzelnen anorganischen Materialien begann die analytische Anwendung in Säulen mit der ersten Synthese eines organischen Austauschermaterials durch Adams und Holmes 1935: Durch die Kondensation von Phenolsulfonsäuren mit Methanal (Formaldehyd) erhielten sie Ionenaustauscher, die im Gegensatz zu den bereits bekannten anorganischen Ionenaustauschern auf Zeolith-Basis aus wässrigen Lösungen nicht nur Metallionen sondern auch Wasserstoffionen (Hydroniumionen) austauschen können. Als Anionenaustauscher werden Kondensationsprodukte aus Polyaminen mit Methanal hergestellt. Ebenso wie die grundlegenden Arbeiten zur Verteilungschromatographie wurden auch diese Arbeiten in einem Forschungsinstitut außerhalb einer Universität durchgeführt (British Department of Scientific and Industrial Research). Die erste Monographie zum Thema *Ionenaustauscher* erschien 1951 von O. Samuelson, Göteborg. In den sechziger und siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurde eine Reihe spezieller Ionenaustauscher synthetisiert, die u. a. über chelatbildende Gruppen verfügen (auch auf Cellulosebasis). Bereits in den 1950er Jahren wurden auch Ionenaustauscherpapiere (M. Lederer) hergestellt und erfolgreich eingesetzt. Ionenaustauschermaterialien haben sich auch für DC-Trennungen auf Fertigplatten bewährt.

Nach der zunächst überwiegenden Anwendung für die Analytik anorganischer Substanzen wurde 1949 die Ionenaustausch-Chromatographie von W. E. Cohn in der Biochemie und 1951 von S. Moore und W. H. Stein mit großem Erfolg in die Aminosäureanalytik eingeführt. Die damit beginnende Entwicklung im Bereich der Chemie und vor allem Biochemie von Aminosäuren, Proteinen und Peptiden ist mit auf die erfolgreiche Anwendung dieser chromatographischen Methoden zurückzuführen.

Eine der ersten Arbeiten zur Anwendung der HPLC in der Ionenchromatographie anorganischer Substanzen von J. F. K. Huber und A. M. van Urk-Schoen (1972) beschreibt die schnelle Trennung der Alkaliionen mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie. Die Autoren verwendeten Salze der radioaktiven Isotope, um eine

radiometrische Detektion durchführen zu können. Der Begriff *Ionenchromatographie* wurde drei Jahre später durch die Arbeit von *Small, Stevens* und *Bauman* geprägt – zunächst als „*novel ion-exchange chromatographic method*“. Ihre neue Technik bestand darin, dass sie eine Ionenaustauscher-Trennsäule mit einer sogenannten „*Suppressorsäule*“ (Ionenaustauscher), welche den Elektrolyten im Eluenten neutralisiert, und mit einem Durchfluss-Konduktometer zu einem Analysensystem verbanden. Seit 1979 lassen sich Ionentrennungen auch ohne Suppressor konduktometrisch detektieren: *Gjerde, Fritz* und *Schmuckler* setzten Anionenaustauscher mit niedriger Austauschkapazität und Eluenten geringer Leitfähigkeit ein (1985).

1.1.7 Gelchromatographie

Die praktische Anwendung der Gelpermeation oder Gelfiltration begann erst 1959, als *Porath* und *Flodin* die ersten vernetzten Dextran- Gele synthetisierten, denen sie den Namen *Sephadex* aus *Separation* – *Pharmacia* (Pharmazeutische Fabrik in Uppsala) – *Dextran* gaben. Die Bezeichnung Gelfiltration wurde zunächst auf Vorschlag ihres Lehrers *Tiselius* gewählt. Mit Hilfe dieser Methode ließen sich in der folgenden Zeit zahlreiche Trennprobleme in der Biochemie lösen. Bereits wenige Jahre später wurden von *Moore* makroporöse Styrol- Divinylbenzen-Gele in den Laboratorien der Dow Chemical Company in Freeport/ Texas zur Trennung von Substanzen über einen breiten Molmassenbereich eingesetzt. Beide Materialien haben sich bis heute in einer Reihe von Varianten sowohl in der Analytik nieder- und hochmolekularer Substanzen in der Naturstoff- und Biochemie als auch in der Analytik synthetischer Polymere bewährt. Begrifflich spricht man jedoch heute eher von Größenausschluss-Chromatographie in Anlehnung an die für die Trennung entscheidenden Prozesse.

1.1.8 Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie wurde erstmals von *Campbell et al.* 1951 beschrieben: Sie isolierten Antikörper im Säulenverfahren an einer Cellulose mit kovalent gebundenem Antigen. Ein wesentlicher Fortschritt wurde durch *Porath* und *Axén* 1967 erzielt: Sie führten die durch Bromcyan aktivierte *Sepharose* in die Affinitätschromatographie ein.

1.1.9 Gaschromatographie

1941 publizierten *G. Hesse* und Mitarbeiter die erste Arbeit zur präparativen Anwendung der Gas-Adsorptions-Chromatographie. Hesses Doktorand *H. Eilbracht* hatte an Kieselgel mit Kohlenstoffdioxid als mobiler Phase Brom und Iod sowie einige Carbonsäureester getrennt, die durch Destillation vorher nicht trennbar waren. Sie bezeichneten ihre Methode als Adsorptions-Destillation. Der erste vollständige Gaschromatograph zur analytischen Anwendung wurde im Laboratorium von *Erika Cremer* von ihrem Doktoranden *F. Prior* 1946 zur Trennung von Luft und Kohlenstoffdioxid entwickelt. Außer in dieser Dissertation wurde erstmals 1949 in Form eines Versammlungsberichtes des Vereins Österreichischer Chemiker über diesen Gaschromatographen mit Wärmeleitfähigkeitszelle und Oszilloskop berichtet (Abb. 1.4a).

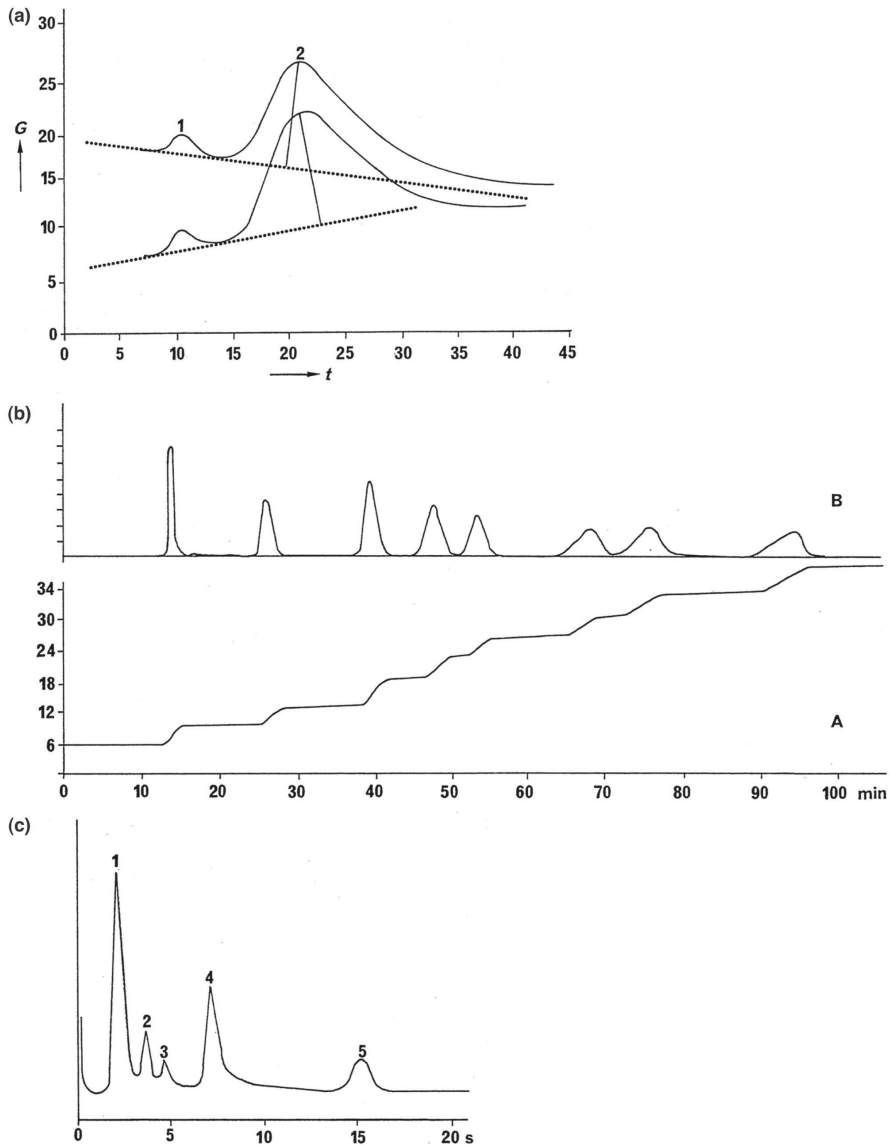


Abb. 1.4 Meilensteine der Gaschromatographie. (a) Das erste analytische Gaschromatogramm – Dissertation Prior, Innsbruck (bei E. Cremer): Trennung von Luft (1) und Kohlendioxid (2) an Kohle. (b) Erste Gas-Flüssig-Chromatographie von Fettsäuren. Säule (11 ft), flüssige Phase: Stearinsäure (10 %) in Silicon DC 550; Durchflussrate: $18,2 \text{ mL min}^{-1}$ Stickstoff; Temperatur: $137 \text{ }^\circ\text{C}$. Verändert nach James und Martin, 1952. A: Elutionskurve (ermittelt durch Mikrotitration), B: differentielle Kurve (berechnet). (c) Eines der ersten Kapillar-Gaschromatogramme von Golay (1958). Säule: $16 \text{ ft} \times 0,25 \text{ mm I.D.}$, belegt mit Carbowax 1540; 1: Luft, 2: Aceton, 3: Schwefelkohlenstoff, 4: Chloroform, 5: Dichlormethan; Detektor: Wärmeleitfähigkeitszelle mit Oszilloskop.

Obwohl bereits 1941 von *Martin* und *Synge* für die Verteilungschromatographie auch eine gasförmige mobile Phase als einsetzbar postuliert wurde, werden die ersten Trennungen von Carbonsäuren (*n*-Alkansäuren) erst 1952 von *James* und *Martin* beschrieben (Abb. 1.4b). Ein ganz wesentlicher Fortschritt für die quantitative Analyse bestand in der Kombination der Trennsäule mit einer Mikrotitrationszelle. Die analytische Anwendung der GC weitete sich jedoch erst durch die nachfolgende Entwicklung von Detektoren wie des Flammenionisationsdetektors und Elektroneneinfangdetektors (z. B. durch *E. Lovelock* 1958) in wachsendem Umfang aus. Der Flammenionisationsdetektor wurde auf der Tagung des Institute of Petroleum in Amsterdam vorgestellt, wo zugleich auch das Prinzip des Elektroneneinfangdetektors beschrieben wurde. Als ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der Chromatographie ist die Entwicklung von Kapillarsäulen nach dem Konzept und den ersten Arbeiten von *Golay* 1957 zu verzeichnen, der damit einen entscheidenden Beitrag zur heutigen Leistungsfähigkeit der GC in vielen Bereichen der Naturwissenschaften und der Medizin geleistet hat (Abb. 1.4c).

1.1.10 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

An der Entwicklung der modernen, schnellen Flüssig(keits)chromatographie in Säulen, der *high-performance liquid chromatography*, ist eine Reihe von Wissenschaftlern beteiligt. Die Basis dieser Säulentechnik bilden die Theorien von *van Deemter* u. a. zur Gaschromatographie sowie vor allem von *J. C. Giddings* (1965) und *P. D. Hamilton* (1966). Ergebnis ihrer Arbeiten ist der Einsatz von Teilchen geringer Durchmesser (3 bis 30 μm) in dünnen Trennsäulen von 2 bis 6 mm Innendurchmesser, wobei für Durchflussraten in gleichen Bereichen wie der klassischen, meist hydrostatisch betriebenen Säulenchromatographie Drücke bis zu 300 bar erforderlich wurden.

Mit Abschluss der empirischen Phase (klassische Säulenchromatographie) und der wissenschaftlichen Phase (Theorien der Chromatographie) begann mit der HPLC (und auch Kapillar-GC) die dritte historische Periode, die *technologische Phase*. Sie ist von den Fortschritten in der Technologie zur Herstellung von Trennmaterialien zur weiteren Verbesserung der Trennleistungen (Verkürzung der Trennzeiten) und vor allem durch Entwicklungen im Bereich der Detektoren, Kopplungstechniken, Automatisierung und des Computereinsatzes geprägt. Eines der ersten Chromatogramme mittels HPLC hatte 1964 *J. F. K. Huber* (damals TH Eindhoven, später Universität Wien) erhalten (Abb. 1.5). Die erste instrumentelle HPLC-Analyse wurde 1966 in Rom durch *C. Horváth* vorgestellt. Auf einem Chromatographie-Symposium in Miami wurden bereits 1969 die ersten HPLC-Geräte vorgestellt.

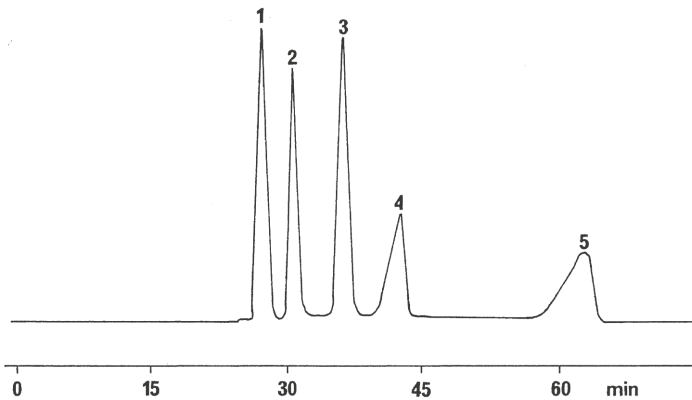


Abb. 1.5 Erstes Chromatogramm mit der HPLC (1964) nach J. F. K. Huber mit 4000 theoretischen Trennstufen, entsprechend einer Trennstufenhöhe von 0,19 mm. Säule: $770 \times 1,5$ mm aus Glas, gepackt mit Diatomit (Teilchendurchmesser $37\text{--}50\ \mu\text{m}$), belegt mit 1,2,3-Tris(cyanoethoxy)propan; mobile Phase: 2,2,4-Trimethylpentan; 1: Butylbenzen, 2: Nitrobenzen, 3: 2-Aminobenzoesäuremethylester, 4: 3-Phenyl-1-propanol, 5: $\alpha\alpha$ -Hydroxytoluen (1-Methyl-2-hydroxybenzen), Schwedt (1982).

1.2 Systematik und Definitionen

Eine Einteilung der *chromatographischen Trennmethode*n erfolgt allgemein nach der Art der stationären Phase bzw. der Kombination von stationärer und mobiler Phase. Einfache Trennmethode wie Filtration, Zentrifugation, Extraktion, Destillation u. ä. nutzen zur Stofftrennung meistens nur Unterschiede in einer Substanz-eigenschaft, so bei der Destillation die unterschiedlichen Dampfdrücke der Komponenten eines Gemisches. In diesem Fall ist die Wahrscheinlichkeit relativ groß, dass bei Gemischen mit vielen Komponenten die gewählte Eigenschaft zur Trennung nicht ausreicht – weil sie bei mehreren Komponenten identisch ist oder nur geringfügige Unterschiede bestehen. Der Trenneffekt lässt sich bereits wesentlich erhöhen, wenn mehrere Eigenschaften genutzt werden – so z. B. bei der Extraktion in Form der Flüssig-flüssig-Verteilung die Löslichkeiten der Komponenten in zwei Phasen. Eine ganz wesentliche Steigerung der Trennleistung wird erreicht, wenn der Trenneffekt der wiederholten Einstellung der Phasengleichgewichte zusätzlich mit den Trenneffekten kinetischer Vorgänge gekoppelt wird – wie es bei chromatographischen Trennverfahren der Fall ist.

Aufgrund der großen Zahl der bis heute entwickelten analytischen Trennmethode ist es nicht einfach, sie alle in ein umfassendes und zugleich einprägsames System einzuordnen. Die Klassifizierung kann anhand der zugrunde liegenden Trennmechanismen, der verwendeten apparativen Ausstattung und der Art der mobilen und stationären Phasen erfolgen. Eine Einteilung nach der Art der zu trennenden Substanzen – z. B. als Proteinchromatographie oder Ionenchromatographie – ist im Allgemeinen nicht üblich und auch nicht sinnvoll. Ein geeignetes Schema ergibt sich dann, wenn man zunächst einmal die *chromatographischen Verfahren* nach der