

ISSN 0073-8433

# PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN

SEKTION  
**TECHNISCHE WISSENSCHAFTEN  
NATURWISSENSCHAFTEN**

SERIE 9 · NUMMER 13 · 1986

FILM C 1589

Chromatographie  
IV. Packen einer  
flüssigkeitschromatographischen  
Trennsäule



INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM · GÖTTINGEN

### *Angaben zum Film*

Tonfilm (Komm., deutsch), 16 mm, farbig, 52 m, 5 min (24 B/s). Hergestellt 1984/85, veröffentlicht 1985.

Der Film ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt. Veröffentlichung aus dem Institut für Lebensmittelchemie der Universität Stuttgart, Prof. Dr. G. SCHWEDT, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. G. GLATZER; Kamera: G. MATZDORF; Schnitt: E. FISCHER; Zeichentrickherstellung: G. MATZDORF.

Der Film wurde hergestellt mit Unterstützung durch die Firma E. Merck, Darmstadt.

### *Zitierform:*

SCHWEDT, G., und INST. WISS. FILM: Chromatographie—IV. Packen einer flüssigkeitschromatographischen Trennsäule. Film C 1589 des IWF, Göttingen 1985. Publikation von G. SCHWEDT, Publ. Wiss. Film., Sekt. Techn. Wiss./Naturw., Ser. 9, Nr. 13/C 1589 (1986), 8 S.

### *Anschrift des Verfassers der Publikation:*

Prof. Dr. G. SCHWEDT, Institut für Lebensmittelchemie und Analytische Chemie der Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 55, D-7000 Stuttgart.

---

### PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN

Sektion BIOLOGIE

Sektion ETHNOLOGIE

Sektion MEDIZIN

Sektion GESCHICHTE · PUBLIZISTIK

Sektion PSYCHOLOGIE · PÄDAGOGIK

Sektion TECHNISCHE WISSENSCHAFTEN

NATURWISSENSCHAFTEN

Herausgeber: H.-K. GALLE · Redaktion: E. BETZ, I. SIMON

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN sind die schriftliche Ergänzung zu den Filmen des Instituts für den Wissenschaftlichen Film und der Encyclopaedia Cinematographica. Sie enthalten jeweils eine Einführung in das im Film behandelte Thema und die Begleitumstände des Films sowie eine genaue Beschreibung des Filminhalts. Film und Publikation zusammen stellen die wissenschaftliche Veröffentlichung dar.

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN werden in deutscher, englischer oder französischer Sprache herausgegeben. Sie erscheinen als Einzelhefte, die in den fachlichen Sektionen zu Serien zusammengefaßt und im Abonnement bezogen werden können. Jede Serie besteht aus mehreren Lieferungen.

Bestellungen und Anfragen an: Institut für den Wissenschaftlichen Film  
Nonnenstieg 72 · D-3400 Göttingen  
Tel. (05 51) 20 22 02

## FILME FÜR FORSCHUNG UND HOCHSCHULUNTERRICHT

GEORG SCHWEDT, Stuttgart, und INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM, Göttingen:

Film C 1589

### **Chromatographie – IV. Packen einer flüssigkeitschromatographischen Trennsäule**

Verfasser der Publikation: GEORG SCHWEDT

*Inhalt des Films:*

**Chromatographie – IV. Packen einer flüssigkeits-chromatographischen Trennsäule.** Es werden die einzelnen Arbeitsschritte für das homogene Packen einer Trennsäule mit Kieselgel als stationärer Phase für die Niederdruck-Flüssigkeits-Chromatographie vorgestellt. Die Qualität bzw. Trennleistung dieser Säule wird anhand eines Farbstoffgemisches im Vergleich zu fertigen Trennsäulen getestet.

*Summary of the Film:*

**Chromatography – IV. Packing a Liquid Chromatographic Separation Column.** Each of the steps involved in the homogenous packing of a separation column with silica gel as a stationary phase for low pressure-hypotension liquid chromatography is described. A dye mix is used to test the quality, or efficiency, of separation of the column. This is done by comparing the column with columns which have already been completely separated.

*Résumé du Film:*

**Chromatographie – IV. Chargement d'une colonne de séparation chromatographique en phase liquide.** On présente les différentes opérations nécessaires au chargement homogène d'une colonne de séparation avec du gel de silice comme phase stationnaire pour la chromatographie liquide basse pression. La qualité et le pouvoir de séparation de cette colonne sont testés sur un mélange de colorants et comparés à ceux de colonnes de séparation finies.

### Allgemeine Vorbemerkungen

Die Leistungsfähigkeit einer chromatographischen Trennsäule läßt sich anhand der Trennstufenzahl charakterisieren. Die Trennstufenzahl  $N$  kann aus einem Chromatogramm wie folgt berechnet werden:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{b_{0,5}} \right)^2$$

$t_R$ : Gesamtretentionszeit;  $w$ : Basisbreite der Elutionsbande (des Peaks);  $b_{0,5}$ : Peakbreite auf halber Höhe des Peaks.

Unter Berücksichtigung der Trennsäulenlänge  $L$  erhält man aus der Trennstufenzahl die Trennstufenhöhe  $H$ :

$$H = \frac{L}{N}$$

Diese theoretische Trennstufenhöhe  $H$  stellt den Abschnitt einer Trennsäule dar, in dem sich das chromatographische Gleichgewicht einmal eingestellt hat.

Die Trennstufenhöhe  $H$  ist von der linearen Strömungsgeschwindigkeit  $u$  der mobilen Phase abhängig. Diesen Zusammenhang beschreibt die van-Deemter-Gleichung:

$$H = A + \frac{B}{u} + C u$$

Eine Erhöhung der Trennstufenhöhe und damit eine Verschlechterung der Trennleistung bzw. eine Verbreiterung der Elutionsbande im Chromatogramm hat mehrere Ursachen, die in den Termen  $A$ ,  $B$  und  $C$  zum Ausdruck kommen.

Der Term  $A$  beinhaltet vor allem die Effekte der Streudiffusion, Eddy-Diffusion genannt. Er wird insbesondere durch die Qualität der Säulenpackung bestimmt. Eine einwandfreie Säulenfüllung, d.h. eine homogene Packung der Säule mit Teilchen möglichst geringer und vor allem einheitlicher Korngröße, gewährleistet einen kleinen Wert für  $A$ .

In einer Trennsäule mit kleinen Packungsteilchen gelangt ein Teil der Substanzmoleküle erst nach mehr oder weniger großen Umwegen (aufgrund der „Packung“) an das Säulende. Auch die unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten (zwischen und innerhalb poröser Teilchen) im chromatographischen Bett beeinflussen die Breite einer Elutionsbande und damit die Trennstufenhöhe. Beide Effekte sind umso geringer, je enger die Korngrößenverteilung der stationären Phase ist.

Im Term  $B$  macht sich die Longitudinaldiffusion der Substanzmoleküle in der mobilen Phase bemerkbar. Diese Diffusionseffekte in der Längsrichtung der Trennstrecke hängen von der Teilchenstruktur der stationären Phase, der Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase ( $u$ ) und dem Diffusionskoeffizienten der Probe ab. Durch kleine Diffusionskoeffizienten bei optimaler Strömungsgeschwindigkeit, das bedeutet in der Praxis durch weite und unverzweigte Poren der Packungsteilchen, kann dieser Term  $B$  klein gehalten werden. Die geringsten Effekte treten dann auf, wenn die lineare Strömungsgeschwindigkeit größer ist als der Quotient aus dem doppelten Diffusionskoeffizienten und dem einfachen Partikeldurchmesser:

$$u \text{ größer als } \frac{2 D_m}{d_p}$$

$D_m$ : Diffusionskoeffizient der Probe in der mobilen Phase;

$d_p$ : Partikeldurchmesser der stationären Phase.

Im dritten Term C, der auch Massenübergangsterm genannt wird, kommen Unregelmäßigkeiten in den Gleichgewichtseinstellungen zwischen mobiler und stationärer Phase zum Ausdruck. Niedrige Werte für den Term C erhält man bei kleinen Partikeldurchmessern und geringen Diffusionskoeffizienten in der stationären Phase.

Anstelle durch die Trennstufenzahl bzw. die Trennstufenhöhe läßt sich die Leistungsfähigkeit eines chromatographischen Trennsystems auch durch die Peakkapazität  $n$  veranschaulichen.

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln(1 + k'_{\max})$$

$k'$ : Kapazitätsfaktor als Quotient  $\frac{t_R - t_0}{t_0}$  mit  $t_0$ : Totzeit der Trennsäule; Zeit, welche die mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule zu wandern.

In der Beziehung für die Peakkapazität bedeutet die Zahl 1 eine Auflösung ( $R$ ) von 1 für zwei benachbarte Peaks.

Die Auflösung  $R$  berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

Die Peakkapazität ist proportional zur Wurzel aus der Trennstufenzahl  $N$ , sie gibt an, wieviele Stoffe (oder Peaks in einem Chromatogramm) mit der Auflösung  $R = 1$  bis zu einem maximalen  $k'$ -Wert ( $k'_{\max}$ ) (bzw. bis zu einer vorgegebenen maximalen Gesamtretentionszeit  $t_R$ ) theoretisch getrennt werden können.

Außer den bisher genannten Faktoren bewirken vor allem sogenannte Totvolumina im chromatographischen System (bestehend aus Probeaufgabeteil, Trennsäule und Durchflußdetektor) eine allgemeine Bandenverbreiterung. Unter Totvolumina versteht man alle Volumina (Teile) einer chromatographischen Apparatur, die keine homogene Packung an Partikeln der stationären Phase enthalten – also vor allem die Verbindungsteile im chromatographischen System.

Eine weitere Größe (neben der Trennstufenzahl bzw. -höhe und der Peakkapazität) zur Gütecharakterisierung einer Säulenpackung ist die Permeabilität  $K$  oder Durchlässigkeit einer Säule.

$$K = \frac{uL}{\Delta p} \text{ mit } u = \frac{L}{t_0} \text{ als } K = \frac{L^2}{\Delta p t_0} \text{ in } \text{mm}^2/\text{s} \cdot \text{bar}$$

$\Delta p$ : Druckdifferenz zwischen Säulenanfang und -ende.

Bei porösen Packungsteilchen von 5  $\mu\text{m}$  Durchmesser (für die Hochdruck- oder Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie: HPLC) soll ein optimaler Wert für  $K$  bei 6 liegen. Wird ein größerer Wert errechnet, so liegt eine schlechte Säulenpackung vor, ein kleinerer Wert deutet auf eine Verstopfung im System (beispielsweise in den Verbindungsteilen).

Zur Bestimmung der Totzeit  $t_0$  wird in der Praxis die Retentionszeit des ersten Peaks in

einem Chromatogramm eingesetzt. Die Totzeit  $t_0$  lässt sich auch anhand der sog. Porosität  $\epsilon$  einer Säule berechnen:

$$t_0 = \frac{\epsilon d_i^2 \pi L}{4 V'}$$

$d_i$ : Innendurchmesser der Säule,  $V'$ : Volumenstrom (Fließgeschwindigkeit) der mobilen Phase in ml/min

Die Porosität gibt den Teil eines Trennsäulenquerschnittes an, welcher der mobilen Phase zur Verfügung steht. Der übrige Teil wird vom Material der stationären Phase beansprucht. Für total poröse Packungsmaterialien beträgt die Porosität etwa 0,7 bis 0,8. Eine weitere Bewertungsgröße für die Leistungsfähigkeit einer gepackten Trennsäule stellt die „Säulenqualität“  $Q$  dar. Der Druckabfall  $\Delta p$  in einer Trennsäule, die Retentionszeit einer Substanz  $t_R$  und die Trennstufenzahl  $N$  werden dabei berücksichtigt:

$$Q = \frac{N}{t_R} \cdot \frac{N}{\Delta p} \quad (\text{mit } t_R \text{ in s, } \Delta p \text{ in bar})$$

Eine hohe Leistungsfähigkeit (engl. „performance“), d.h. gute Säulenqualität liegt dann vor, wenn eine hohe Trennstufenzahl  $N$  mit geringer Retentionszeit  $t_R$  und kleinem Druckabfall in der Säule verbunden ist (bei HPLC-Säulen zwischen  $10^3$  und  $10^5$  für  $Q$ ). Bei Vergleichen der Leistungsfähigkeiten von Trennsäulen müssen immer Länge und Innendurchmesser der Säulen, Art der Probe und deren  $k'$ -Wert, Art der mobilen und der stationären Phase, die Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase, das Probenvolumen und auch die Temperatur berücksichtigt werden.

Zum absoluten Vergleich von Trennsäulen sind anstelle der bisher vorgestellten Größen daher dimensionslose Größen günstiger:

1. anstelle der Trennstufenhöhe  $H$  die reduzierte Trennstufenhöhe  $h$

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (d_p: \text{mittlerer Teilchendurchmesser})$$

2. anstelle der Permeabilität  $K$  der dimensionslose Strömungswiderstand  $\Phi$

$$\Phi = \frac{\Delta p d^2 p}{L \eta u} \quad (\eta: \text{Viskosität der mobilen Phase})$$

Mit der Permeabilität  $K$  ergibt sich für die dimensionslose Strömungsgeschwindigkeit  $\Phi$ :

$$\Phi = \frac{d^2 p}{K}$$

3. anstelle der Säulenqualität  $Q$  die dimensionslose Größe der Effizienz  $E$

$$E = \frac{t_R \Delta p}{N^2 \eta (1 + k')} = h^2 \cdot \Phi$$

Je größer der Wert für die Effizienz  $E$  ist, um so schlechter ist die Säule. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die optimalen dimensionslosen Größen für die HPLC:

- $h$  zwischen 2 und 10
- $\Phi$  bei total porösen Teilchen 500 (für runde Teilchen) bis höchstens 1000 (irreguläre Teilchen) (Bei größeren Werten liegt eine Verstopfung der Säule vor.)
- $E$  zwischen 2000 und 20 000 für die „High-performance“-Flüssigkeits-Chromatographie

Aus Testchromatogrammen anhand von Testsubstanzen lassen sich die vorgestellten Größen zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit einer flüssigkeits-chromatographischen Trennsäule ermitteln.

## Erläuterungen zum Film

### Wortlaut des gesprochenen Kommentars

Die Trennleistung einer chromatographischen Säule hängt ab von der Qualität der Säulenpackung.

Zwischen zwei handelsüblichen Fertigsäulen ein leeres Glasrohr zur Herstellung einer Trennsäule für die Niederdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Ein kleiner Wattebausch wird mit einem Glasstab über dem Abflußhahn festgedrückt. Nach dem Anfeuchten mit etwas Lösungsmittel wird die Luft aus der Watte entfernt.

Trockenes Trennmateriale, hier Kieselgel, wird im Lösungsmittel aufgeschlämmt und bildet später die stationäre Phase. Ein Trichter erleichtert das Einfüllen in das Trennrohr. Die stationäre Phase bildet allmählich eine homogene Packung aus Kieselgelteilchen. Das über der Schicht stehende Lösungsmittel wird bis auf wenige Millimeter Höhe abgelassen. Der Wattebausch vor dem Hahn hält die Trennteilchen zurück. Schließlich ist die gewünschte Trennsäulen-Länge erreicht. Klopfen mit Korkringen verdichtet die Säulenpackung und verbessert ihre Homogenität. Eine dünne Scheibe aus Glasfaservlies schützt später die oberste Schicht der Trennsäule vor einer Aufwirbelung. Vorsichtig wird mit einem Glasstab die eingeschlossene Luft entfernt.

Die Trennleistung der gepackten Säule wird mit einer Farbstoffmischung getestet.

Optimale Trennungen erhält man nur, wenn am Startpunkt der chromatographischen Säule das Farbstoffgemisch in einer gleichmäßig konzentrierten Schicht auf die Glasfaserabdeckung aufgetragen wird. Am einfachsten läßt man die Probe ringsum an der Wandung des Rohres zulaufen.

Kurz darauf dringen die Farbstoffe in das Kieselgel ein.

Die aufgegebene Probe wird sorgfältig mit der mobilen Phase überschichtet. Nur so läßt sich verhindern, daß die Farbstoffzone schon zu Beginn der Trennung deformiert wird. Die mobile Phase muß rasch aufgefüllt werden, um ein Trockenlaufen der obersten Schicht zu verhindern. Schließlich wird ein größeres Vorratsgefäß mit mobiler Phase aufgesetzt. So läuft das Lösungsmittel während des darauffolgenden Trennprozesses kontinuierlich nach, hier etwa 70fach zeitlich gerafft.

Die Trennleistungen der einzelnen Säulen hängen von der Packungshomogenität und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase ab.

### Literatur

#### Monographien:

- [1] EPPERT, G.: Einführung in die schnelle Flüssigchromatographie (Hochdruckflüssigchromatographie). Wiesbaden 1979.

- [2] MEYER, V.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 3. Aufl., Frankfurt, Aarau 1984.
- [3] SCHWEDT, G.: Chromatographische Trennmethoden. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen. 2. Aufl., Stuttgart 1986.

*Originalarbeiten:*

- [4] BRISTOW, P.A., and J.H. KNOX: Standardization of test conditions for high performance liquid chromatography columns. *Chromatographia* 10 (1977), 279.
- [5] ROHRSCHEIDER, L.: Leistungsvergleich chromatographischer Trennverfahren. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 277 (1975), 335.