

ISSN 0073-8433

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN

SEKTION
**TECHNISCHE WISSENSCHAFTEN
NATURWISSENSCHAFTEN**

SERIE 9 · NUMMER 12 · 1986

FILM C 1568

**Chromatographie
II. Analystechniken**



INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM · GÖTTINGEN

Angaben zum Film

Tonfilm (Komm., deutsch), 16 mm, farbig, 173 m, 16 min (24 B/s). Hergestellt 1983/84, 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.

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

Zitierform:

SCHWEDT, G., und INST. WISS. FILM: Chromatographie – II. Analysetechniken. Film C 1568 des IWF, Göttingen 1984. Publikation von G. SCHWEDT, Publ. Wiss. Film., Sekt. Techn. Wiss./Naturw., Ser. 9, Nr. 12/C 1568 (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 PSYCHOLOGIE · PÄDAGOGIK

Sektion ETHNOLOGIE

Sektion TECHNISCHE WISSENSCHAFTEN

Sektion MEDIZIN

NATURWISSENSCHAFTEN

Sektion GESCHICHTE · PUBLIZISTIK

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 1568

Chromatographie – II. Analysetechniken

Verfasser der Publikation: GEORG SCHWEDT

Inhalt des Films:

Chromatographie – II. Analysetechniken. Die apparativen Techniken zur Durchführung flüssigkeits- und gas-chromatographischer Trennungen als Dünnschicht-, Hochleistungs-Säulen- und Gas-Chromatographie werden vorgestellt. Probenaufgabe, Förderung der mobilen Phase und die qualitative sowie quantitative Auswertung von Chromatogrammen erfordern je nach Art der chromatographischen Trenntechnik unterschiedliche apparative Ausstattungen, die insgesamt ein eigenständiges Analysensystem bilden. Die Gerätekombinationen für diese chromatographischen Analysetechniken werden im einzelnen vorgeführt.

Summary of the Film:

Chromatography – II. Techniques of Analysis. The equipment used in the techniques for making liquid and gaseous chromatographic separations as thin-layer chromatography, high-capacity column chromatography and gas chromatography are presented here. Deposit of samples, encouragement of the mobile phase and the qualitative as well as the quantitative evaluation of chromatograms all require different kinds of instrumentation, depending on the technique of chromatographic separation involved. Together, these different instruments form an independent system of analysis. The various combinations of appliances used in these techniques of chromatographic analysis are shown.

Résumé du Film:

Chromatographie – II. Techniques d'analyse. On présente les techniques et les appareillages servant à la réalisation de partages chromatographiques en phase liquide et en phase gazeuse sous forme de chromatographie en couche mince, de chromatographie haute capacité sur colonne échangeuse et de chromatographie gazeuse. Le chargement des échantillons, l'accélération de la phase mobile et l'exploitation qualitative et quantitative des chromatogrammes exigent, en fonction de la nature de la technique de séparation chromatographique, des équipements différents en appareillages, formant dans l'ensemble un système d'analyse autonome. On présente en détail les combinaisons d'appareils pour ces techniques d'analyse chromatographique.

Allgemeine Vorbemerkungen

Die Chromatographie hat sich in den letzten Jahren immer mehr zu einer instrumentellen Analyse­methode entwickelt, die Trennungen mit qualitativen und quantitativen Analysen, d.h. Auswertungen der Chromatogramme verbindet.

Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Die Geräteausstattung in der Dünnschicht-Chromatographie umfaßt Dosiergeräte zum Aufbringen des zu trennenden Substanzgemisches in flüssiger Form auf die stationäre Phase, verschiedenartige Trennkammern zur Chromatogramm-Entwicklung und Detektoren für eine quantitative (densitometrische) Auswertung.

Zum Probendosieren (-auftragen) werden einfache Kapillarpipetten, Mikroliterspritzen sowie schließlich automatische Probendosiergeräte (Probenautomaten) eingesetzt.

Die Entwicklung von Chromatogrammen kann in Flachboden- oder Doppeltrögkammern – auch mit einer Sandwich-Deckplatte zur Verhinderung der Wechselwirkung zwischen trockener Trennschicht und Fließmitteldampf –, in einer horizontalen Linear-Entwicklungskammer – die mobile Phase fließt von beiden gegenüberliegenden Seiten zur Mitte – sowie in einer apparativ aufwendigen U-Kammer in Form einer zirkularen oder antizirkularen Entwicklungstechnik erfolgen.

Mit Hilfe von Sprühgeräten bzw. einer Tauchkammer können die getrennten Substanzen durch Umsetzung mit einem Reagenz in farbige oder fluoreszierende Derivate umgewandelt werden (post-chromatographische Derivatisierung).

Die quantitative Direktauswertung der Chromatogramme erfolgt mit Hilfe eines DC-Scanners, der die chromatographische Schicht mit einem Lichtstrahl abtastet, in Verbindung mit einem Integrator. Es können Absorptions-, Remissions-, Transmissions- und Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden.

Hochleistungs-Flüssigkeits-(Säulen-)Chromatographie (HPLC)

Die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie in Säulen (HPLC: „High performance liquid chromatography“) besteht aus vier Hauptteilen: der Präzisionshochdruck-Pumpe zur Förderung der mobilen Phase, dem Einspritzsystem zur Probenaufnahme, der Trennsäule mit der stationären (festen) Phase und dem Detektor.

Die Pumpen müssen für eine konstante und pulsationsfreie Strömung der mobilen Phase sorgen. Die flüssige Probe wird aus einer Probenschleife durch Umschalten eines Mehrwegeventils mit dem Lösungsmittelstrom in die Trennsäule gespült. Die stationäre Phase befindet sich in druckstabilen Säulen aus Glas oder Edelstahl. Der Ausgang (Kapillar-) der Trennsäule ist mit einem Detektor (z.B. Spektralphotometer, Fluoreszenz-, Leitfähigkeits- oder Brechungsindex-Detektor) gekoppelt. Auch in der HPLC lassen sich nicht-detektierbare Stoffe nach der Trennung in sog. Reaktionsdetektoren durch Zumischen von Reagentien in detektierbare Derivate umwandeln.

Gas-Chromatographie (GC)

Der Aufbau eines Gas-Chromatographen ist durch das Gasversorgungssystem (für die Zufuhr der mobilen Phase und auch der Brenngase beim Flammenionisations-Detektor) und die elektronischen Einheiten zur Versorgung und Steuerung von Thermostaten und

Detektor gekennzeichnet. Das Probenaufgabensystem (der Injektorblock) wird beheizt, um eine sofortige und vollständige Überführung der Probe in den Gaszustand zu erreichen.

Die Trennsäule mit einem inerten Trägermaterial und der darauf befindlichen Trennflüssigkeit befindet sich in einem Säulenofen. Auch der Detektorraum ist beheizbar, damit die getrennten Stoffe nicht vorzeitig kondensieren.

Als Trennsäulen werden sowohl gepackte als auch Kapillarsäulen (mit einem dünnen Film an flüssiger Phase und höherer Trennleistung) verwendet.

Anstelle eines Flammenionisations-Detektors (FID) lassen sich wahlweise auch der Elektroneneinfang (ECD) – oder auch der Wärmeleitfähigkeits-Detektor (WLD; für höhere Stoffkonzentrationen) einsetzen. Die Auswertung der Gas-Chromatogramme erfolgt wie in der instrumentellen DC und in der HPLC mit Hilfe eines elektronischen Integrators.

Erläuterungen zum Film

Wortlaut des gesprochenen Kommentars¹

Chromatographische Trennungen werden mit verschiedenen Techniken durchgeführt. Hier zunächst eine Apparatur zur Gas-Chromatographie für adsorptions- oder verteilungs-chromatographische Trennungen in der Gasphase.

Für flüssigkeits-chromatographische Trennungen in Säulen werden unterschiedliche Trennmechanismen benutzt.

Besteht die stationäre Phase aus größeren Trennpartikeln, so kann die flüssige, mobile Phase mit Hilfe einer peristaltischen Schlauchpumpe gefördert werden.

Eine Präzisionshochdruckpumpe wird dagegen benötigt, um die mobile Phase mit optimaler Durchflußgeschwindigkeit durch eine dünne Säule zu pumpen, die sehr kleine Trennpartikel enthält.

Die moderne Technik der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie in Säulen ermöglicht sehr rasche Trennungen.

In der Dünnschicht-Chromatographie werden vergleichbare Trennergebnisse ohne aufwendige apparative Hilfsmittel erzielt. Dafür werden jedoch längere Trennzeiten benötigt.

Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Hier dienen Aluminiumfolien, Kunststoff-Folien oder Glasplatten in verschiedenen Formaten als Träger für die stationäre Phase. Auf den Platten befinden sich die unterschiedlichen Adsorbentien, Gele oder Ionenaustauscher als dünne Schichten von etwa 0,1 mm Dicke.

Bei qualitativen Analysen kann die Probelösung, welche die zu trennenden Stoffe im Gemisch enthält, am einfachsten mit Mikrokapillaren aus Glas aufgebracht werden.

In der Dünnschicht-Chromatographie erzielt man präzisere, quantitative Ergebnisse, indem man sämtliche Schritte vor Beginn einer Trennung automatisiert. Für quantitative Analysen bis in den Spurenbereich stehen Analysen-Geräte zur Verfügung, die exaktes Dosieren bis herab zu Nanoliter-Volumina ermöglichen.

¹ Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

Vor der Probenahme wird die Dosierkapillare zunächst gespült. Dann erfolgt die Entnahme eines festgelegten Volumens aus den Probefläschchen. Die Probevolumina werden präzise und in vorher programmierten Abständen auf die Startlinie der Dünnschichtplatte aufgetragen.

Auch das strichförmige Auftragen läßt sich unter Verwendung von Mikroliterspritzen mit Hilfe dieses Gerätes optimal durchführen. Zur dünn-schicht-chromatographischen Trennung werden die mobilen Phasen in Trennkammern unterschiedlicher Form eingefüllt – hier in eine Flachbodenkammer mit einer relativ großen Gasphase. Für den Erfolg und die Reproduzierbarkeit einer Trennung sind auch die Gleichgewichtseinstellungen zwischen Fließmittel und Gasphase sowie zwischen Gasphase, dem Fließmitteldampf und der trockenen Trennschicht von Bedeutung.

Hier wird die Dünnschichtplatte zwischen zwei Glasplatten gelegt. Es handelt sich um eine sog. Sandwich-Kammer. Darin wird eine Wechselwirkung zwischen trockener Schicht und der Gasphase unterbunden; man erhält gut reproduzierbare Trennungen. Das nächste Beispiel zeigt eine sog. Linear-Entwicklungskammer. Von dem Fließmittel wird nur das benötigte Volumen eingesetzt. Die chromatographische Trennung kann von zwei Seiten erfolgen. Dieses System ermöglicht eine weitgehende Kontrolle der Chromatographie-Bedingungen.

In der Zirkular-Chromatographie wird diese sog. U-Kammer eingesetzt. Das Fließmittel gelangt über die Spritze direkt auf die Schicht. An der Peripherie lassen sich zahlreiche Proben auftragen.

Bei der Antizirkular-Entwicklung wird das Fließmittel an der Kreisperipherie zugeführt. Dadurch werden Querdiffusionen unterdrückt, die zu verbreiterten Substanzflecken führen würden. Die Flußrate ist anders als bei den bisherigen Trennkammern regelbar und während einer Trennung konstant.

Bei der zuvor gezeigten linearen Entwicklung verringert sich dagegen die Flußrate mit der fortschreitenden Wanderung der Fließmittelfront.

Bei der Zirkular-Entwicklung wird das Fließmittel in der Mitte zugeführt. Vor allem in der Nähe des Startpunktes werden hier schärfere Trennungen als mit der linearen Entwicklung erreicht. Der Übergang vom punkt- zum strichförmigen Auftragen bringt selbst in der linearen Entwicklung eine zusätzliche Verbesserung der Trennungen.

Auch nicht gefärbte Substanzen lassen sich durch Besprühen mit Reagentien chromatographisch analysieren. Die Umwandlung in farbige Stoffe erfolgt dabei direkt auf der Schicht. Das gleiche Ergebnis ist schneller und besser durch Eintauchen in die Reagenzlösung zu erreichen.

Mengen bzw. Konzentrationen werden anschließend beispielsweise photometrisch bestimmt. Mit Hilfe dieses speziellen DC-Scanners können photo- oder auch fluorimetrische Messungen direkt auf der Schicht vorgenommen werden.

Die Größe der Substanzflecken und deren Lage auf der Schicht werden in ein geplottetes Chromatogramm umgesetzt – wie wir es aus der Säulen-Chromatographie gewohnt sind. Damit wird auch die gleiche numerische Auswertung möglich wie bei der Gas- oder Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie in Säulen, kurz HPLC genannt, erzielt vergleichbare Trennleistungen wie die instrumentelle Dünnschicht-Chromatographie.

Ein HPLC-Gerät besteht aus einem Probeaufgabeteil, einer Hochdruckpumpe, einer dünnen Säule mit Teilchen von wenigen Mikrometern Durchmesser und einem Durchflußdetektor mit Schreiber oder Integrator.

Eine Lösung des zu trennenden Substanzgemisches wird mittels einer Spritze in die Probenschleife des Probeaufgabesystems überführt. Durch Umschalten des Ventils wird die mobile Phase über die Probenschleife in die HPLC-Säule geleitet.

Dieses Säulensystem benutzt eine speziell gesicherte Einspannvorrichtung für Glaskartuschen, die auch bei hohen Drucken stabil sind.

Hier der normale zeitliche Ablauf eines Trennprozesses.

Bei der Gradientenelution wird die Mischung zweier unterschiedlicher Lösungsmittel in der mobilen Phase kontinuierlich verändert. Dadurch wird die benötigte Elutionszeit erheblich verkürzt. Die hier getrennten Stoffe werden nach der Elution aus der Säule im Durchflußphotometer detektiert.

Chemische Reaktionen, wie sie beim Besprühen von Dünnschichtplatten eintreten, lassen sich in Verbindung mit der HPLC auch in chemischen Reaktionsdetektoren durchführen. Nach der üblichen HPLC-Trennung werden dem Eluentenstrom über Schläuche direkt hinter der Säule Reagenzlösungen zugeführt. Eine Luftsegmentierung verhindert die Vermischung vorher getrennter Stoffe. Die Durchmischung erfolgt in Glasspiralen.

Ein Farbumschlag zeigt die vorher farblosen Stoffe an. Die Lösung wird durch eine Durchflußküvette gepumpt. Bei einer fest eingestellten Wellenlänge wird die Konzentration des Farbstoffes mit Hilfe der Lichtabsorption photometrisch erfaßt. Zum Nachweis UV-absorbierender Stoffe dient ein UV-Detektor. Bei fluoreszierenden Stoffen wird ein Fluoreszenzdetektor und bei Ionen ein Leitfähigkeitsdetektor eingesetzt.

Gas-Chromatographie (GC)

In der Gas-Chromatographie ist die Trennsäule in einen Ofen eingebaut. Die Trennsäule enthält eine bei der Ofentemperatur flüssige Phase auf einem Trägermaterial.

Hier ein Blick in den Detektorraum am Ende der Trennsäule bzw. des Ofens. Im Flammenionisations-Detektor werden getrennte flüchtige organische Stoffe in einer Wasserstoff-Luft-Flamme verbrannt. Die gebildeten Ionen werden als Stromstärke registriert.

Werden anstelle einer gepackten Trennsäule Trennkapillaren benutzt, die kein Trägermaterial enthalten, so lassen sich höhere Trennleistungen erzielen.

Die flüssige Probe wird mit einer Mikroliterspritze durch ein Septum in den Probeneinlaß gespritzt. Dort verdampft die Probe bei höherer Temperatur als in der Trennsäule.

Mit Hilfe des Trägergasstromes werden die getrennten Stoffe durch die Säule transportiert und gelangen so nacheinander in den Detektor.

Die Auswertung der Chromatogramme kann zusätzlich mit Hilfe eines elektronischen Integrators erfolgen.

Literatur

- [1] BERTSCH, HARA, KAISER (Hrsg.): Instrumentelle HPTLC. Heidelberg 1982.
- [2] SCHWEDT, G.: Chemische Reaktionsdetektoren für die schnelle Flüssigkeits-Chromatographie. Grundlagen und Anwendungen in der Spurenanalyse. Heidelberg 1981.
- [3] KAISER, OELRICH: Optimierung in der HPLC. Heidelberg 1979.
- [4] LEIBNITZ, STRUPPE (Hrsg.): Handbuch der Gaschromatographie. 3. Aufl., Leipzig 1984.
- [5] MEYER, V.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 3. Aufl., Frankfurt, Aarau 1984.
- [6] OEHME, M.: Gas-chromatographische Detektoren. Heidelberg 1982.
- [7] SCHULTE, E.: Praxis der Kapillar-Gas-Chromatographie. Mit Beispielen aus Lebensmittel- und Umweltchemie. Heidelberg, Berlin 1983.
- [8] SCHWEDT, G.: Chromatographische Trennmethode. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen. 2. Aufl., Stuttgart 1986.