



# 1. Grundlagen des chromatographischen Prozesses

Chromatographie ist ein dynamischer Prozess in dem einzelne Substanzen, die in der „mobilen Phase“ gelöst sind, durch das chromatographische Bett transportiert werden. Wechselwirkungen der Analyt Moleküle mit der stationären Phase verursachen dabei eine substanzspezifische Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit der Analytmoleküle. Der fortschreitenden Auftrennung der Substanzen wirken Phänomene der Vermischung (Dispersion) entgegen, welche von Diffusion, Konvektion und der limitierten Geschwindigkeit des Stofftransportes herrühren.

## 1.1 Der Trennprozess

Als Maß für die Lage des Verteilungsgleichgewichtes zwischen stationärer und mobiler Phase, dient der Verteilungskoeffizient,  $K_i$ , der Substanz  $i$

$$K_i = \frac{C_i^{stat}}{C_i^{mob}}$$

$C_i^{stat}$  .....Konzentration des Stoffes  $i$  in der stationären Phase

$C_i^{mob}$  .....Konzentration des Stoffes  $i$  in der mobilen Phase

bzw. der Retentionsfaktor,  $k_i$ .

$$k_i = \frac{n_i^{stat}}{n_i^{mob}}$$

$n_i^{stat}$  .....Anzahl Mole des Stoffes  $i$  in der stationären Phase

$n_i^{mob}$  ..... Anzahl Mole des Stoffes  $i$  in der mobilen Phase

Stationäre und mobile Phase müssen in innigem Kontakt miteinander stehen, damit sich Gleichgewichte einstellen können. Damit sich ein Stoffgemisch trennt, müssen die verschiedenen Komponenten im betreffenden chromatographischen System verschiedene Verteilungskoeffizienten und daher auch verschiedene Retentionsfaktoren besitzen.

In Abb. 1.1 ist eine Trennung illustriert, bei der eine Mischung aus zwei Komponenten, ▲ und □, über das chromatographische Bett läuft. Die Moleküle des Typs ▲ (A) halten sich bevorzugt in der stationären Phase auf, jene des Typs □ (B) bevorzugt in der mobilen Phase. Folgende Retentionsfaktoren werden angenommen:

$$k_A = 5/2 = 2,5 \quad \text{und} \quad k_B = 2/5 = 0,4$$

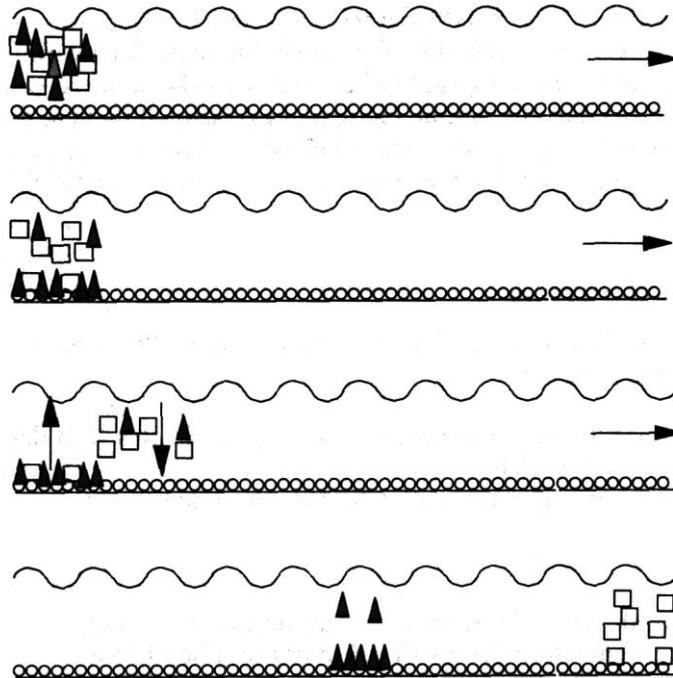


Abbildung 1.1: Verlauf einer chromatographischen Trennung

Wenn frische mobile Phase nachströmt, stellt sich immer wieder ein neues Gleichgewicht ein: Probemoleküle, die sich in der mobilen Phase befinden, werden von der „nackten“ Oberfläche der stationären Phase entsprechend ihrem Verteilungskoeffizienten adsorbiert, während zuvor adsorbierte Moleküle wieder in die mobile Phase übertreten.

Nach oftmaliger Wiederholung dieses Vorgangs sind die beiden Komponenten getrennt. Die Moleküle □ bevorzugen die mobile Phase und wandern schneller als die Moleküle ▲, die stärker an der stationären Phase adsorbiert werden.

Je länger ein chromatographisches Bett ist, desto mehr Schritte der neuen Gleichgewichtseinstellung können erfolgen, desto besser wird die Trennung eines Gemisches.

## 1.2 Peakverbreiterung (Dispersion)

Der Effekt der Trennung zweier Substanzen durch unterschiedlich rasche Migration durch das chromatographische Bett wird durch die Verbreiterung der Substanzzonen, die durch die Breite der Konzentrationsverteilungsfunktion (Peaks) beschrieben wird, zum Teil kompensiert.

Die Peakverbreiterung hat mehrere Ursachen, die in allgemeinen Phänomenen des Stofftransportes und des Impulstransportes liegen.

### (i) Diffusion der Analytmoleküle in der mobilen Phase

Diffusion ist ein Transportprozess von Teilchen, der durch ein Konzentrationsgefälle verursacht wird. Die thermodynamisch irreversible Diffusion wirkt der chromatographischen Trennung entgegen. Mit zunehmender Verweilzeit breiten sich die Probenmoleküle in der mobilen Phase ohne äußeres Zutun aus, indem sie einen Konzentrationsausgleich anstreben. Deshalb ist es günstig, wenn der Ablauf einer chromatographischen Trennung zeitlich nicht zu sehr ausgedehnt wird.

Dieser Effekt spielt eine umso größere Rolle, je größer die Diffusionskoeffizienten der Analyte in der mobilen Phase sind. Deshalb ist er in der Gaschromatographie (GC) von großer Bedeutung, während sein Einfluss in der Flüssigkeitschromatographie (HPLC) viel geringer ist, da Diffusionskoeffizienten in Flüssigkeiten etwa um den Faktor  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  kleiner sind als in Gasen.

### (ii) Eddy-Diffusion (Streudiffusion)

Das „gepackte“ chromatographische Bett besteht aus einem möglichst homogen angeordnetem Haufwerk kleiner Teilchen des Trägermaterials, welches die stationäre Phase ergibt. Die mobile Phase strömt daran vorbei und transportiert die Probemoleküle. Gewisse Moleküle haben «Glück» und kommen vor den meisten anderen durch die stationäre Phase, weil sie im chromatographischen Bett zufälligerweise einen ziemlich geradlinigen Weg zurücklegten. Andere Probemoleküle geraten auf mehr oder weniger großen Umwegen an das Ende der Trennstrecke und werden deshalb etwas später eluiert, wie in Bild 1.2 dargestellt. Die Homogenität der Packung eines chromatographischen Betts ist daher von sehr entscheidender Bedeutung für die Kontrolle der Dispersion.

Äußerst ungünstig für eine Trennung sind Hohlräume im chromatographischen Bett, da sich hier die Substanzen wieder vermischen können. Eine Packung des chromatographischen Bettes frei von Hohlräumen ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Trennung.

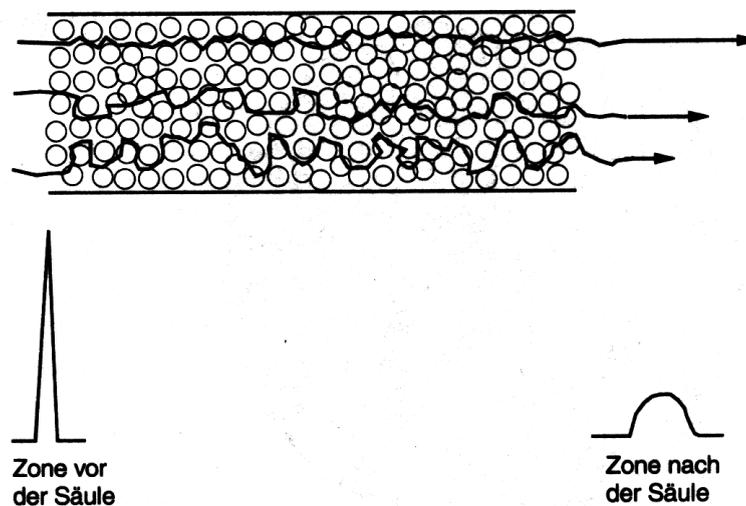


Abbildung 1.2: Eddy-Diffusion im chromatographischen Bett

### (iii) Strömungsprofil

Die mobile Phase strömt laminar zwischen den Körnern der stationären Phase. In der Mitte eines „Kanals“ ist die Strömung schneller als in der Nähe eines Kornes. Die Pfeile in Abb. 1.3 bedeuten Geschwindigkeitsvektoren der mobilen Phase. Je länger ein Pfeil ist, um so größer ist die lokale Strömungsgeschwindigkeit. Typisch für durch Druck angetriebene Flüsse ist das parabolische Strömungsprofil. Das bewirkt, dass Analyte, welche sich häufiger in der Mitte der Kanäle aufhalten als an deren Rändern, schneller durch das chromatographische Bett befördert werden.

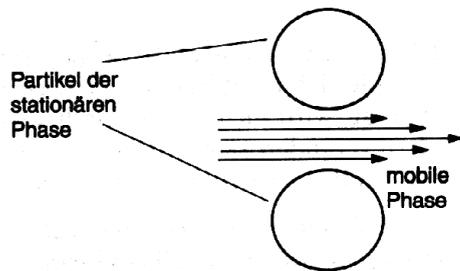


Abbildung 1.3: Strömungsverteilung im chromatographischen Bett

Alle bisher genannten Effekte (i) bis (iii) treten auch dann auf, wenn es im Rahmen des Durchgangs einer Verbindung durch das chromatographische Bett zu gar keiner Retention ( $k = 0$ ) dieser Verbindungen an der stationären Phase kommt. Sie sind also unabhängig von  $k$  vorhanden.

**(iv) Limitierte Geschwindigkeit des Stofftransportes (Austausches) zwischen mobiler und stationärer Phase.**

Der Großteil der für die Adsorption zur Verfügung stehenden Oberfläche der stationären Phase befindet sich in den Poren der Partikel. Diese Poren sind von mobiler Phase gefüllt, ein Stofftransport in diesen Poren kann nur durch Diffusion erfolgen. Abbildung 1.4 zeigt die Porenstruktur eines Teilchens der stationären Phase:

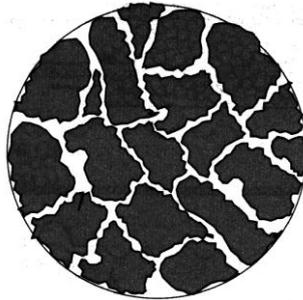


Abbildung 1.4 Poren in der stationären Phase

Ebenso kann der Stofftransport im durchströmten Teil des chromatographischen Bettes, das ist der Transport der Analyte aus Oberflächen-fernen Schichten der mobilen Phase an die Oberfläche in radialer Richtung, nur durch Diffusion erfolgen.

Der Effekt der Peakverbreiterung ist daher umso größer, je kleiner die Diffusionsgeschwindigkeit der Analyte relativ zur Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase ist. Des Weiteren spielt die Partikelgröße ( $d_p$ ) und die Größe der Retentionsfaktoren,  $k$ , eine Rolle.

Insgesamt lässt sich die Peakverbreiterung daher durch folgende Maßnahmen möglichst gering halten:

- Die stationäre Phase soll aus kleinen Teilchen oder Teilchen mit einer möglichst dünnen porösen Oberflächenschicht bestehen.
- Das Packungsmaterial eine möglichst enge Korngrößenverteilung aufweisen.
- Die Homogenität der Säulenpackung soll möglichst gut sein. Die Bildung von Kanälen im Bett wirkt sich negativ auf die Trennschärfe aus.
- Die Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase darf nicht zu groß und nicht zu klein sein, sondern soll in einem „optimalen“ Bereich liegen

## 2. Das Chromatogramm und seine Aussage

In einem Chromatogramm stellt ein Peak die Analytkonzentration als Funktion der Zeit dar. Diese Funktion läßt sich theoretisch in Form von normierten Verteilungsfunktionen beschreiben. Die am häufigsten eingesetzten Verteilungsfunktionen lassen sich auf Gauß-, Poisson- oder Binominalverteilungen zurückführen. Durch Hinzunahme von weiteren Funktionen kann zusätzlich eine bestimmte Asymmetrie in den Peaks beschrieben werden. Die Peaks liefern qualitative und quantitative Informationen über die untersuchte Mischung.

### 2.1. Identifizierung (qualitative Analyse)

Eine Identifizierung von Analyten wird über deren Retentionszeit,  $t_R$ , bzw. über deren Retentionsfaktoren,  $k_i$ , vorgenommen.

Die Retentionszeit,  $t_{Ri}$ , ist jene Zeit, die von der Aufgabe der Probe bis zum Erscheinen des Signalmaximums der Komponente  $i$  im Detektor verstreicht.

Die Zeit, welche die mobile Phase benötigt, um vom Ort der Probenaufgabe durch die Trennsäule bis zum Detektor zu wandern, nennt man die Totzeit der Trennsäule,  $t_0$ . Eine nicht retardierte Substanz, d.h. ein Stoff, der von der stationären Phase gar nicht festgehalten wird, erscheint am Säulenende bereits nach  $t_0$ .

Manchmal wird statt der Retentionszeit auch die Netto-Retentionszeit,  $t'_R$ , verwendet. Diese Zeit ist definiert als die Retentionszeit abzüglich der Totzeit.

$$t'_R = t_R - t_0$$

Die Retentionszeit ergibt sich aus folgendem einfachen aber wichtigen Zusammenhang

$$t_{Ri} = t_0(1 + k_i)$$

Die Totzeit ist dabei experimentell nicht ganz einfach richtig zu bestimmen. In vielen Fällen kann man sie daher besser aus den Dimensionen der Säule berechnen. Man verwendet dabei folgende Formel:



## Abbildung 2.1 Das Chromatogramm und seine Kenngrößen

Wird die Retentionszeit zur Identifizierung von Substanzen verwendet, so ist zu bedenken, dass sie bei gleichen chromatographischen Bedingungen (Fluss, Temperatur, Zusammensetzung der mobilen Phase etc.) für eine Substanz konstant ist, aber von folgenden Randbedingungen beeinflusst wird:

- Volumen der Trennsäule ( $\rightarrow t_0$ )
- Art und verfügbare Oberfläche der stationären Phase ( $\rightarrow k_i$ )
- Zusammensetzung der mobilen Phase ( $\rightarrow k_i$ )
- Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und ( $\rightarrow t_0$ )
- Temperatur ( $\rightarrow k_i$ )

Verwendet man den Retentionsfaktor,  $k_i$ , so ist dieser von der Säulenlänge und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase unabhängig.

Die Identifizierung eines Analyts kann über die Retentionszeit bzw. über den Retentionsfaktor nur dann erfolgen, wenn man die in Frage kommende Substanz als Standard-Verbindung besitzt und die Retentionszeit (k Wert) dieses Vergleichstandards mit der Retentionszeit (k Wert) der Probe vergleicht. Die chromatographischen Bedingungen für Standard und Probe müssen dabei natürlich gleich sein. Es besteht zudem ein gewisses Risiko, dass unter den gewählten Chromatographiebedingungen zwei völlig verschiedene Substanzen die gleiche Retentionszeit aufweisen. Um falsche qualitative Aussagen zu vermeiden, kann man folgende Strategien wählen:

- Man chromatographiert Probe und Standards unter mehreren verschiedenen Chromatographiebedingungen (z.B. anderer stationärer und mobiler Phase) und vergleicht die jeweiligen Retentionszeiten. Es wird dabei immer unwahrscheinlicher, dass unterschiedliche Substanzen auch unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen wiederum gleiche Retentionszeiten besitzen.
- Man wählt geeignete Detektoren, die weitere Informationen über die jeweilige Substanz liefern können.

Setzt man in der obigen Definitionsgleichung der Auflösung,  $R_S$ , für die Retentionszeit und die Standardabweichung die bereits zuvor abgeleiteten Ausdrücke ein, erhält man eine Gleichung, welche die Abhängigkeit der Auflösung von den operativen Parametern (Retentionsfaktor, Trennstufenzahl) angibt.

$$R_S = \frac{1}{4} (\alpha_{ji} - 1) \frac{k_i}{k_i + 1} \sqrt{N_i}$$

$\alpha_{ji}$  ist dabei der Selektivitätskoeffizient oder Trennfaktor, definiert als

$$\alpha_{ji} = \frac{k_j}{k_i}$$

Er charakterisiert die Fähigkeit eines Phasensystems zwei Substanzen zu trennen. Im Zähler stehen immer die Daten der zuletzt eluierenden Substanz, daher ist  $\alpha \geq 1$ .

Die bei einer gegebenen Trennung realisierte Zahl der theoretischen Trennstufen,  $N$ , lässt sich aus der Verbreiterung der Analytpeaks und der Retentionszeit nach folgender Formel berechnen:

$$N_i = \frac{t_{Ri}^2}{\sigma_{ii}^2}$$

Möchte man als Maß für die Peakverbreiterung nicht  $\sigma_i$  (Halbe Peakbreite in 0.607 der Peakhöhe) heranziehen, sondern die Peakbreite auf halber Peakhöhe,  $w_{1/2}$ , so verändert sich die obige Formel nur um einen konstanten Faktor.

$$N_i = 5.54 \frac{t_{Ri}^2}{w_{1/2i}^2}$$

Bei der Bestimmung der Peak-Asymmetrie wird eine senkrechte Linie vom Peakmaximum auf die Basislinie gezogen. Das Verhältnis der beiden Basisliniensegmente in 10% der Peakhöhe gibt den Asymmetriefaktor an.

$$A = \frac{b}{a}$$

- a.....Segment vor dem Peakmaximum
- b.....Segment nach dem Peakmaximum

### 2.3 Quantitative Analyse

Erst nach der qualitativen Analyse, bei der die Substanzen mit größtmöglicher Sicherheit identifiziert worden sind, ist eine Quantifizierung möglich. Zur richtigen Quantifizierung von Substanzen mittels Chromatographie sollte so weit wie möglich eine Basislinientrennung der entsprechenden Peaks erreicht werden. Für die quantitative Auswertung gibt es zwei Möglichkeiten: Zum einen ist die Fläche, zum anderen die Höhe des Peaks proportional der Stoffmenge. Wenn man verschiedene Standardlösungen mit genau bekannter Konzentration chromatographiert, die zugehörigen Peakflächen oder Peakhöhen bestimmt und eine Kalibrierkurve erstellt, kann man aus den Peakflächen oder Peakhöhen einer unbekannt Probe deren Konzentration bestimmen.

Schlechte Reproduzierbarkeit wird in der Chromatographie im allgemeinen auf fehlerhafte Injektion, Detektion oder Integration zurückgeführt. Bei konzentrationsabhängigen Detektoren (wie z.B. den optischen Detektoren in der HPLC) ist die Peakfläche umgekehrt proportional zur Flussrate.

### (i) **Detektionslimit (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)**

Das kleinste erfassbare Signal kann nicht kleiner sein als die doppelte Höhe des größten Rauschpeaks. In Abb. 2.2 ist das für 5 ng einer Substanz dargestellt. Würde noch weniger Probe aufgegeben, so könnte man das Signal nicht mehr vom Rauschen unterscheiden. Vorsicht ist geboten bei Angaben wie:

«Detektor X kann noch 1 ng einer Substanz erfassen». Diese Stoffmenge ist von vielen Einflussfaktoren abhängig, u.a. vom k-Wert und der Verweilzeit im Detektor. Die Bestimmungsgrenze oder LOD (Limit of Detection) ist von der Empfindlichkeit der Detektion und vom Rauschen des Detektors abhängig.

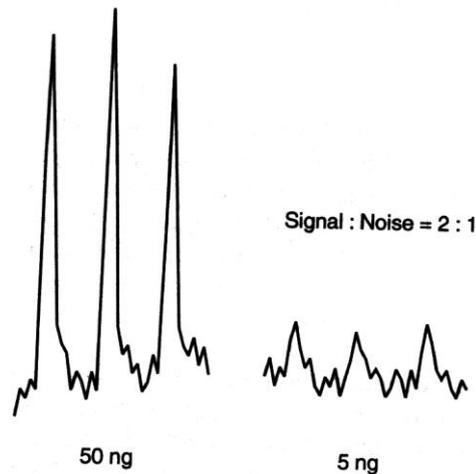


Abbildung 2.2 Kleinstes erfassbares Signal

Die **Bestimmungsgrenze** oder Limit of quantitation (LOQ) ist die geringste Menge eines Analyten in der Probe, die noch mit einer ausreichenden Präzision und Genauigkeit bestimmt werden kann.

### (ii) **Linearer und dynamischer Bereich**

Im idealen Fall gibt der Detektor ein der jeweiligen Stoffmenge (Konzentration) proportionales Signal, d.h., die Signal-vs.-Konzentration Kurve ist eine Gerade. Diese Linearität ist bei realen Detektoren natürlich nicht unendlich groß, sollte aber einen möglichst weiten Bereich umfassen (Abb. 2.3). Der lineare Arbeitsbereich erstreckt sich bei UV-Detektoren im allgemeinen über mehrere Zehnerpotenzen. Die Fluoreszenz-Detektion hat meist einen etwas kleineren linearen Bereich. Im allgemeinen hängt der Umfang des linearen Bereiches vom Detektionsprinzip ab. Befindet man sich mit der zu bestimmenden Konzentration außerhalb des linearen Bereiches, kann man bei zu hohen Konzentrationen durch Verkleinern der Probenaufgabemenge oder durch Verdünnen der Probe wieder in den linearen Bereich des Detektors gelangen. Jedenfalls sollte man prüfen, ob dieser Bereich verlassen wurde.

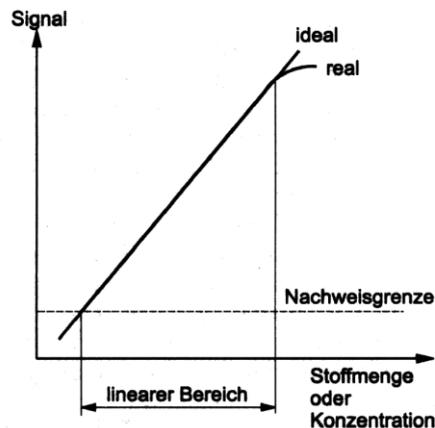


Abbildung 2.3 Linearer Bereich eines Detektors

Nach unten wird der dynamische Bereich durch die Nachweisgrenze (LOD), also durch das Rauschen bei minimalen Konzentrationen, limitiert. Hat man Proben mit Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze, muß entweder die Probenaufgabemenge erhöht oder ein empfindlicheres Detektionsverfahren angewendet werden. Führt beides nicht zum gewünschten Ziel, muß die Probe in einem vorhergehenden Schritt angereichert werden.

### (iii) Auswertalgorithmen

Jeder Datenpunkt im Chromatogramm wird mit dem vorherigen Wert verglichen und die Steigung (gegenüber der Zeitachse) ermittelt. Übersteigt die Steigung einen vorher gewählten Wert, der für das Rauschen der Basislinie charakteristisch ist, und sind mehrere Steigungen hintereinander positiv, so entdeckt das System einen Peakanfang. Auf die gleiche Weise mit entsprechend negativen Steigungen wird das Peakende gefunden. Peakanfang und Peakende werden in der graphischen Darstellung durch senkrechte Linien - sogenannte Integrationsmarken - gekennzeichnet.

Ein wichtiges Problem bei der Integration liegt aber in der Festlegung der Basislinie. Im einfachsten Fall werden dazu die Punkte des Peakanfangs und des Peakendes miteinander verbunden. Es ist einleuchtend, dass diese Methode bei freistehenden Peaks, d.h. bei Basislinientrennung, meist gute Ergebnisse liefert, bei überlappenden Peaks aber große Fehler auftreten können. Trotzdem liefert das automatische Integrationsverfahren auch für diese Peaks Flächenwerte, die durchaus reproduzierbar sein können. Wichtig ist aber, sich immer die Frage zu stellen, ob diese Flächen auch richtig sind. Dies ist schwierig zu beurteilen, da sowohl dem Datensystem wie auch dem Betrachter nur die Summen- oder Hüllkurve bekannt ist.

Bei teilweise überlappenden Peaks wählen die meisten automatischen Auswertverfahren eine Rechenvorschrift nach der Methode der «Lotfällung»: Man fällt das Lot vom Minimum zwischen den Peaks auf die Basislinie und integriert die beiden Peakabschnitte. Den linken Peakabschnitt ordnet man komplett dem linken Peak zu, und den rechten Abschnitt dem rechten Peak. Die dabei gemachten Fehler sind nur dann klein, wenn das Peakhöhenverhältnis nahe 1:1 ist. In Abb. 2.4 sind zwei symmetrische (gaußförmige) Peaks mit einem Flächenverhältnis von 1:3 dargestellt. Fällt man das Lot an der tiefsten Stelle der Summenkurve und teilt die Flächen nach dem obigen Verfahren, so wird die berechnete

Fläche des kleinen Peaks zu klein, diejenige des großen Peaks etwas zu groß. Das so durchgeführte Integrationsverfahren würde das Flächenverhältnis als 0,98:3,02 bestimmen.

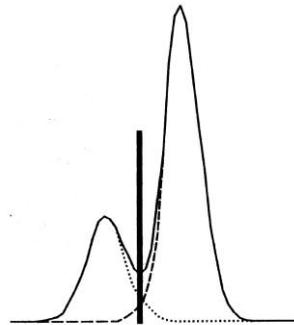


Abbildung 2.4 Peakflächenberechnung durch Lotfällung

Abbildung 2.5 zeigt, dass insbesondere der Fehler in der Quantifizierung des kleineren Peaks umso größer wird, je kleiner dieser Peak in Relation zum überlappenden größeren Peak wird.

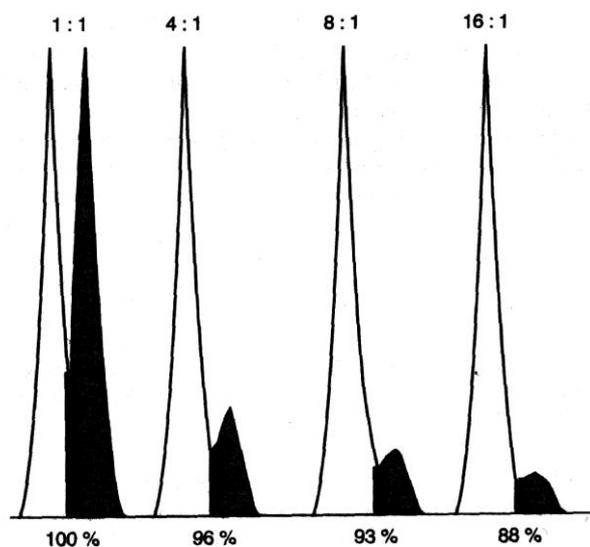


Abbildung 2.5 Fehler bei der Peakflächenberechnung durch Lotfällung

Die Diskussion macht deutlich, wie wesentlich es ist, die Auswertergebnisse von Integratoren oder Computersystemen an Hand der bildlich dargestellten Chromatogramme auf Plausibilität zu überprüfen.

Insbesondere müssen die markierten Integrationsgrenzen für die einzelnen Peaks und die Lage der berechneten Basislinie kontrolliert werden. Gegebenfalls kann es notwendig sein, eine Neu-Integration mit veränderten Integrationsparametern (Peakstart, Peakende, Basislinie, Lotfällung) durchzuführen. Dies ist leicht möglich, da die Rohdaten des Chromatogramms gespeichert sind.

### 3. Arbeitsweise der Säulenchromatographie

Bei der Säulenchromatographie befindet sich die stationäre Phase in einer Säule. Diese Technik wird in der Gas- und Flüssigkeitschromatographie angewandt. Zur Aufnahme eines Chromatogramms benötigt man einen Chromatographen, dessen Funktionsprinzip in Abb. 3.1 dargestellt ist. Dies gilt sowohl für die Gas- als auch für die Flüssigkeitschromatographie, wobei sich aber die Bauteile im einzelnen erheblich voneinander unterscheiden. Die mobile Phase wird in der GC als Trägergas, in der HPLC als Eluent bezeichnet.

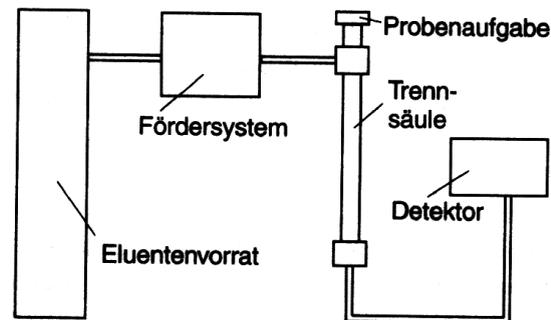


Abbildung 3.1 Prinzip eines Säulenchromatographen

Von einem Fördersystem wird die mobile Phase kontinuierlich aus einem Vorratsbehälter durch das Trennsystem, d.h. durch die Säule, gepumpt. Eine bestimmte Menge der Probe wird über ein Aufgabesystem am Anfang der Trennsäule in die mobile Phase eingebracht, ohne dass dabei der Fluss der mobilen Phase unterbrochen wird. Die mobile Phase befördert die Probe anschließend durch das chromatographische Bett in der Trennsäule. Alle Leitungen und Verbindungsstücke sollen möglichst kurz und eng sein und keinen Anlass für Wirbelbildung und eine damit verbundene Durchmischung geben.

Durch die Wechselwirkungen zwischen Probe und stationärer Phase erfolgt in der Trennsäule die Trennung der Probe in ihre einzelnen Komponenten. Die voneinander getrennten Substanzen verlassen nacheinander die Säule und werden von der mobilen Phase zum Detektor geleitet, der von jeder Komponente ein der Konzentration (bzw. Menge) entsprechendes elektrisches Signal erzeugt (zumeist ein Spannungssignal). Dieses Signal wird an ein angeschlossenes Registrierungssystem (zumeist elektronisches Datensystem) weitergegeben, welches das entsprechende Chromatogramm (Spannung gegen Zeit) aufzeichnet. Die registrierten Signale der einzelnen Substanzen nennt man Peaks. Zwischen den einzelnen Peaks durchströmt nur die mobile Phase den Detektor; das Chromatogramm befindet sich dann auf der Basislinie.

#### 3.1 Probenaufgabesystem

Die Probenaufgabe soll ermöglichen, dass ein exakt definiertes Volumen der Probenlösung unmittelbar und in reproduzierbarer Weise auf die Trennsäule aufgebracht wird, ohne dabei den Eluentenfluß zu unterbrechen.

Als Standard für die Probeninjektion hat sich in der HPLC die drucklose Dosierschleife über ein 6-Wege-Ventil direkt vor der Trennsäule durchgesetzt. Dieses Hochdruckventil besitzt zwei Stellungen – LOAD und INJECT. Wie in Abb. 3.2 dargestellt, sind je nach Stellung des Ventils immer zwei Kanäle miteinander verbunden.

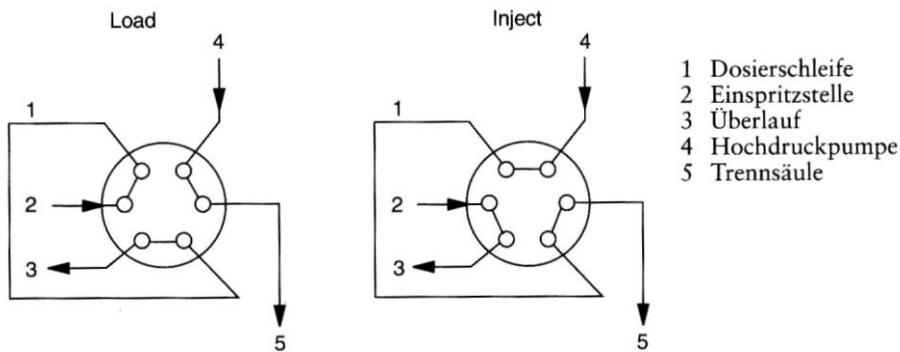


Abbildung 3.2 Probenaufgabe über Dosierschleife

**LOAD-Stellung:** Die Probe wird mit Hilfe einer Spritze drucklos in die Dosierschleife gespritzt (bei der manuellen Durchführung mit dem 3 – 5fachen Schleifenvolumen, um die Schleife homogen zu füllen) Der Eluent fließt währenddessen von der Pumpe durch das Ventil zur Säule und hält den Eluentenfluß zur Trennsäule aufrecht.

**INJECT- Stellung:** Durch Verdrehen der Ventilscheiben wird das Ventil in die Injektionsstellung gebracht. Der Eluent fließt nun von der Pumpe durch die Dosierschleife und spült dabei die aufgebene Probe auf die Trennsäule.

Bei der automatischen Probenaufgabe übernimmt diese Aufgaben ein Autosampler. Die Dosierschleifen weisen meist ein Volumen zwischen 1 bis 1000µL auf.

### 3.2 Isokratische Elution und Gradientenelution

Bei der isokratischen Elutionsweise wird die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Analyse konstant gehalten. Dies kann dazu führen, dass möglicherweise

- die ersten Peaks schlecht aufgelöst sind,
- die letzten Peaks breit und flach eluieren; sie können im Rauschen untergehen.

Zur Lösung dieses Elutionsproblems gibt es die Möglichkeit, dass man mit einem Lösungsmittelgradienten chromatographiert. Diese Methode bewirkt, dass im Chromatogramm die ersten Peaks auseinandergezogen und die letzten schneller eluiert und somit zusammengedrückt werden. Der Lösungsmittelgradient muß also so gewählt werden, damit er die schnellsten Peaks eluieren kann und später auch die stark verzögerten Komponenten gut eluieren. Die Elutionskraft der mobilen Phase muß daher während der Elution zunehmen.

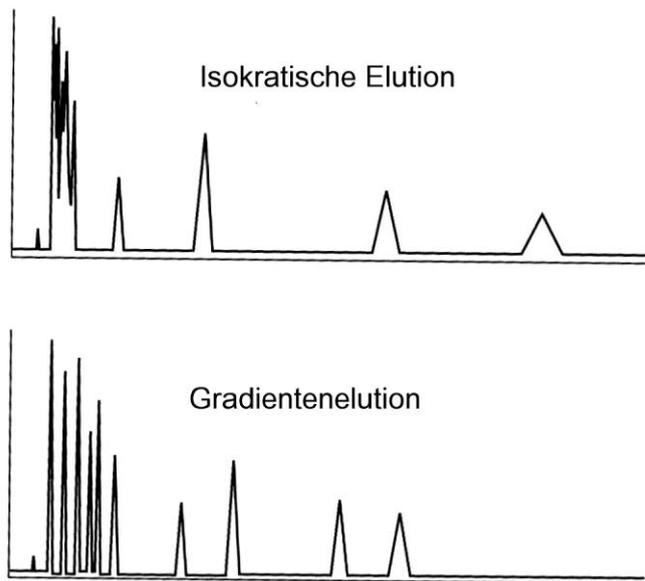


Abbildung 3.3 Auftrennung bei isokratischer Elution und Gradientenelution

Prinzipiell kann man bei der Gradiententechnik zwischen Niederdruck- und Hochdruckmischung unterscheiden. Beim Niederdruckgradienten werden die Eluentenkomponenten zeitgesteuert über Magnetventile im Niederdruckbereich gemischt, um dann von einer Hochdruckpumpe gefördert zu werden.

Bei einem Hochdruckgradienten benötigt man für jedes Lösungsmittel eine eigene Hochdruckpumpe. Für einen binären Gradienten benötigt man also zwei Hochdruckpumpen. In einer kleinen Mischkammer hinter den Pumpen werden die beiden Eluenten gemischt und gelangen danach auf die Trennsäule.

### 3.3 Detektion

Mit Hilfe eines Detektors kann man erkennen, wann eine Substanz aus der Säule eluiert wird und kann deren Konzentration (Menge) in Abhängigkeit von der Zeit messen. Ein Detektor muß also die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase feststellen, diese in ein elektrisches Signal umwandeln und das Signal an ein Datensystem weiterleiten. Dieses zeichnet dann einen „Peak“ als Abweichung von der Null- oder Basislinie auf.

Manche Detektoren zerstören die untersuchten Proben aufgrund der angewandten Technik, z.B. durch Verbrennung oder Elektronenbeschuss. Es gibt also **destruktive** und **nicht-destruktive** Detektoren. Diese Tatsache ist wichtig, falls man mehrere Detektoren in Reihe schalten möchte. Hierbei wird das Eluat nach Durchgang durch den ersten Detektor in einen zweiten Detektor, der nach einem anderen Messprinzip arbeitet, geleitet. Bei dieser Technik muß der erste Detektor nicht-destruktiv sein, damit der zweite Detektor die intakte Substanz registrieren kann.

Ein anderes wichtiges Charakteristikum von Detektoren ist die **Konzentrations-** oder **Massenabhängigkeit**. In einem konzentrationsabhängigen Detektor ist die Signalstärke proportional zur Probenkonzentration in der mobilen Phase. In einem massenstromabhängigen Detektoren ist die Signalstärke proportional zur durchlaufenden Probenmenge pro Zeit. Nahezu alle in der HPLC eingesetzten Detektoren sind konzentrationsabhängige Detektoren

### **3.3.1 Universelle Detektoren**

Sie sprechen auf alles an, was die Säule verlässt. Sie sind manchmal sicher sinnvoll, können aber auch Probleme aufwerfen. Eine schlechte chromatographische Trennung kann die Detektion der gesuchten Komponente stören, wenn der Detektor alles registriert, was die Säule verlässt. Universelle Detektoren sprechen auch auf kleine Fluktuationen im Fluss der mobilen Phase und der Temperatur an. Allgemein werden sie für Verbindungsklassen verwendet, die mit UV- oder Fluoreszenzdetektoren nicht oder nur sehr schwer erfassbar sind.

**Lichtstreuendetektor:** Das in einer Düse vernebelte Eluat wird in einer geheizten Driftkammer in ein Aerosol umgewandelt, dessen Partikelkonzentration über Streulichtmessungen gemessen wird.

**Brechungsindexdetektor:** Die optische Messzelle eines Brechungsindexdetektors besteht aus zwei Kompartimenten für Analyt und Referenz. Die Referenzzelle enthält den reinen Eluenten, die Analytzelle wird von dem Säuleneluat durchströmt. Es werden alle Substanzen registriert, die eine Änderung des Brechungsindex gegenüber dem reinen Eluenten in der Referenzzelle bewirken. Die Empfindlichkeit ist davon abhängig, wie stark sich die Brechungsindices von reinem Eluenten und gelöster Substanz unterscheiden. Aufgrund dieser generell eher kleinen Differenz ist die Detektorempfindlichkeit beispielsweise im Vergleich zur UV-Absorptionsdetektoren geringer.

### **3.3.2 Selektive Detektoren**

Sie können elementselektiv, strukturselektiv (z.B. Doppelbindung, fluoreszierende Strukturen, reduzierbare, oxidierbare Strukturen) oder selektiv auf andere Eigenschaften (z.B. Molekulare Masse) sein.

**UV-VIS-Absorptionsdetektor:** Das Meßprinzip beruht auf der Messung der Lichtintensität eines durch eine Messzelle durchgeschickten Lichtstrahls einer bestimmten Wellenlänge. Die Abschwächung des Lichts erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Es können nur Substanzen detektiert werden, die Licht der jeweiligen Meßwellenlänge auch absorbieren.

**Diodenarraydetektor:** Nach Durchgang durch eine Messzelle fällt das Licht auf ein sogenanntes Diodenarray. Dieses besteht aus einer großen Anzahl nahe beeinanderliegender, fest installierter Photodioden. Auf jedes dieser Dioden trifft Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs. Diese Photodioden werden in regelmäßigen und kurzen Abständen ausgelesen und man erhält ein vollständiges Absorptionsspektrum. Dies ermöglicht:

- Peak- Reinheitstest über den Spektrenvergleich
- Peak Identifizierung über Vergleichsspektren
- Wahl der optimalen Wellenlänge zur Detektion verschiedener Substanzen

**Fluoreszenzdetektor:** Mit einem Fluoreszenzdetektor können Substanzen im Säuleneluat nachgewiesen werden, die durch Bestrahlung zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Fluoreszenzlicht, das sich in alle Raumrichtungen ausbreitet, wird senkrecht zur Anregungsrichtung gemessen.

Durch Fluoreszenzdetektion kann die Empfindlichkeit gegenüber der Absorptionsmethode um etwa den Faktor 1000 gesteigert werden bei gleichzeitiger Erhöhung der Selektivität.

**Elektrochemischer Detektor:** Der elektrochemische Detektor ist selektiv für Substanzen, die elektrochemisch oxidierbar oder reduzierbar sind. Er weist eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit auf (pg-Bereich) und basiert auf dem Dreielektrodensystem. Als Vergleichselektrode dient meist eine Ag/AgCl-Elektrode. Für die Arbeits- und Hilfelektrode wird meist glassy carbon verwendet. Man kann grundsätzlich zwischen zwei Funktionsprinzipien unterscheiden. Bei einem coulometrischen Detektor findet ein vollständiger Umsatz an der Arbeitselektrode statt. Werden hingegen nur 5 bis 10% umgesetzt, handelt es sich um einen amperometrischen Detektor.

**Leitfähigkeitsdetektor:** Er ist prädestiniert für die Detektion von Ionen in wässrigen Lösungen. Es wird eine pulsformige Wechselfspannung an die beiden Meßelektroden angelegt und der ohmsche Widerstand wird zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen. Da die Leitfähigkeit einer Elektrolytlösung temperaturabhängig ist, ist die Thermostatisierung der Meßzelle bzw. die elektronische Kompensation eines auftretenden Temperaturgradienten sehr wichtig. Zusätzlich wurden zur Unterdrückung des Hintergrundrauschens verschiedene Verfahren entwickelt.

### **3.3.3 Spezifische Detektoren**

Sie sind so selektiv, dass sie bestimmte Strukturen oder Elemente mit einem hohen Grad an Zuverlässigkeit nachweisen können. Manchmal werden diese Detektoren sogar für qualitative Analysen einer Substanz eingesetzt. Z.B. haben Massenspektrometrie und Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) eine hohe Spezifität.

## 4. Trennmethode

### 4.1 Normalphasenchromatographie

Als Säulenfüllmaterialien verwendet man Silikagele oder Aluminiumoxid. Bei einer Kieselgel Phase enthält das Trägermaterial freie Silanolgruppen an seiner Oberfläche. Es ist also polar. Die Silanolgruppen sind „aktiv“ und treten mit den zu trennenden Komponenten in Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Da die stationäre Phase polar ist, muß die mobile Phase unpolare sein. Besitzt der Analyt polare und gleichzeitig unpolare Anteile, so richtet es sich so aus, dass die polaren Molekülgruppen bevorzugt zur polaren stationären Phase gerichtet sind und dort in Wechselwirkung treten (Abb. 4.1). Als Eluenten werden Hexan, Heptan, Methylchlorid, Essigester oder auch Mischungen davon verwendet. Die zu analysierende Probe muß wiederum in dem unpolaren Eluenten löslich sein.

Ein typischer Nachteil der Normalphasenchromatographie ist der starke Einfluß von Spuren von Wasser im Eluenten, welches auf der Silikaoberfläche adsorbiert wird und die Silanolgruppen deaktiviert.

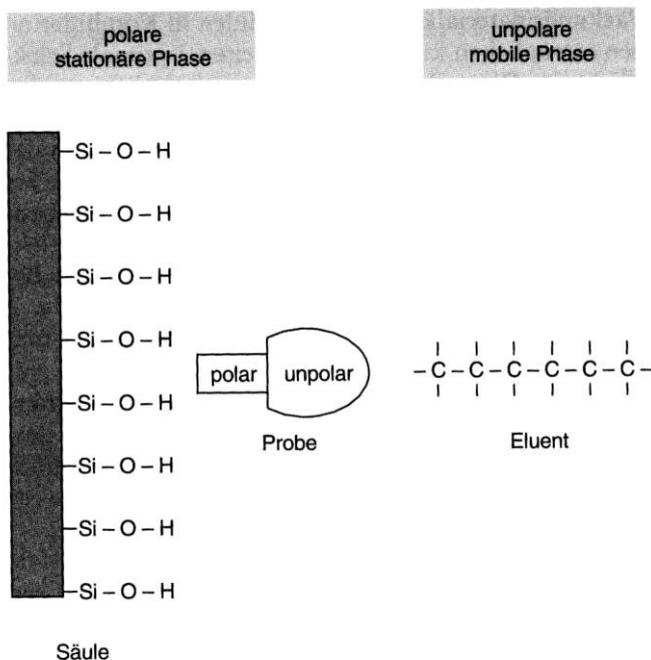


Abbildung 4.1 Normalphasenchromatographie

Bei polar gebundenen Phasen wurde die Silikatoberfläche mit polaren funktionellen Gruppen derivatisiert, wodurch sie weniger empfindlich gegen Spuren von Wasser sind.

Als Beispiel sind die Diol-Phase ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CHOR-CH}_2\text{-OH}$ ) und die Cyano- oder Nitril-Phase ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$ ) zu erwähnen.

Betrachtet man die Retentionsreihfolge, so wird die Substanz mit der höchsten Polarität am stärksten und die mit der geringsten Polarität am schwächsten retentiert.

## 4.2 Reversed-phase-Chromatographie

Wie der Name schon sagt, arbeitet man hier mit umgekehrten Verhältnissen, d.h. die stationäre Phase ist unpolar, die mobile Phase polar.

Hierbei wird das Kieselgel chemisch modifiziert. Umkehrphasen (RP-Phasen) erhält man, wenn man die Silikatoberfläche mit hydrophoben funktionellen Gruppen bedeckt. Hauptsächlich sind dies C<sub>8</sub>- (Octyl), C<sub>18</sub>- (Octadecyl) oder Phenyl-Phasen.

Das chemisch mit Alkylgruppen modifizierte Kieselgel bildet die unpolare stationäre Phase, die mobile Phase ist polar. Unpolare Moleküle bzw. die unpolaren Anteile in einem Molekül halten sich bevorzugt an der unpolaren stationären Phase auf (Abb. 4.2).

Probensubstanzen werden von der reversed-phase Oberfläche umso stärker festgehalten, je unpolarer bzw. je weniger wasserlöslich sie sind. An Umkehrphasen kann man sowohl polare, mittelpolare wie auch sehr unpolare und Stoffe trennen. Als mobile Phasen werden am häufigsten Methanol-Wasser-Mischungen und Acetonitril-Wasser-Mischungen verwendet. Nahezu alle Probenmoleküle werden mit einem Anteil an organischem Modifer von 10 bis 90 % eluiert.

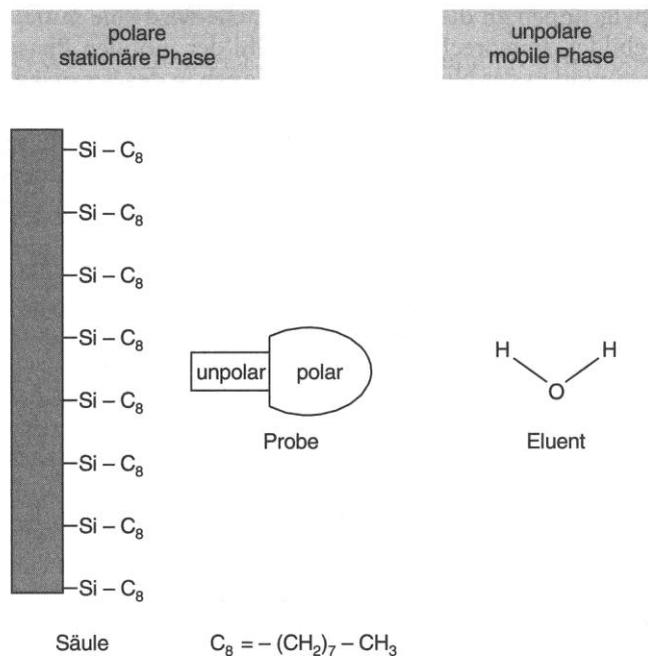


Abbildung 4.2 Reversed-phase Chromatographie

Ionische Probensubstanzen werden nicht retardiert, sie werden am besten mit Ionenaustausch- oder Ionenpaar-Chromatographie getrennt.

## 4.3 Ausschlußchromatographie

Die Ausschlußchromatographie (size exclusion chromatography (SEC)) ist eine flüssigchromatographische Trennmethode, die eine Analyse von Molekülen im Oligomer- und Polymerbereich erlaubt. Bei Verwendung von organischen Eluenten wird das Verfahren auch Gel-Permeationschromatographie (GPC) genannt. Dabei

werden große Probenmoleküle durch ihre effektive Größe in einer Lösung getrennt. Der Hauptvorteil besteht in der Möglichkeit, Molekulargewichtsverteilungen im Bereich von etwa  $10^2$  bis  $10^7$  mit vorhersagbaren Retentionszeiten bestimmen zu können.

Bei der Ausschluß-Chromatographie soll keine Wechselwirkung zwischen Probenmoleküle und stationärer Phase stattfinden. Es werden poröse Säulenmaterialien mit definierter Porengröße verwendet. Die Probenmoleküle dringen in diese Poren ein, wobei kleine Moleküle weiter hineingelangen als große Moleküle Große Moelküle verlassen deshalb zuerst die Trennsäule, danach Moleküle mit mittlererer Größe und am Ende kommen die kleinen Moleküle mit der größten Verweildauer in der Trennsäule.

Alle injizierten Moeküle werden innerhalb des Säulentotvolumens eluiert und es tritt keine Peakverbreiterung mit zunehmender Retentionszeit auf.

#### 4.4 Ionenaustausch-Chromatographie

Zur Trennung von anorganischen Kationen und Anionen, die sich mit der Ionenpaar-Chromatographie nicht trennen lassen, kommt die Ionenaustauschchromatographie zum Einsatz. Als stationäre Phase wird eine polymere Matrix aus Harz oder Kieselgel eingesetzt, an deren Oberfläche saure oder basische Gruppen gebunden sind.

Häufig werden organische Ionenaustauscher auf Basis von Styrol-Divinilbenzol verwendet (Abb 4.4), an die in weiterer Folge durch chemische Reaktion austauschaktive Liganden angebracht werden.

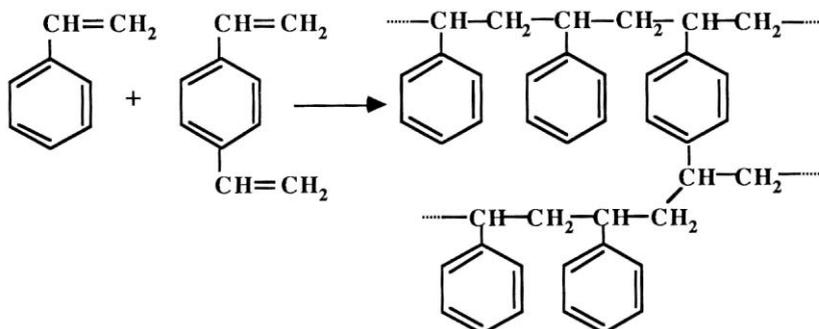


Abbildung 4.4 Reaktion von Styrol mit Divinylbenzol zu einem Styrol-Divinylbenzolcopolymer

In Bezug auf die Ionenaustauschaktiven Liganden können Ionenaustauscher in starke und schwache Ionenaustauscher eingeteilt werden.

Starke Ionenaustauscher tragen über den gesamten pH-Bereich eine Ladung, während schwache Ionenaustauscher nur in einem eingeschränkten pH-Bereich ionisch vorliegen.

Austauschaktive Gruppen für starke Ionenaustauscher sind Sulfonsäuregruppen bzw. quarternäre Ammoniumgruppen, für schwache Ionenaustauscher Carboxylgruppen bzw. primäre bis tertiäre Aminogruppen.

Der Trennmechanismus einer Ionenaustauschtrennung wird am Beispiel einer Anionentrennung näher erläutert. Die Säule ist mit einem stark basischen Ionenaustauscherharz gefüllt. Als mobile Phase dient eine verdünnte wässrige Salzlösung, deren Anionen das Gegenion zur basischen Ionenaustauschgruppe bilden. Nach Injektion der Probenlösung adsorbieren die Anionen aus der Probe an der stationären Phase, die dort befindlichen Gegenionen aus dem Laufmittel werden freigesetzt und verlassen ohne weitere

Verzögerung des Trennsystems. Es bildet sich ein erster Peak, der ein positives oder negatives Signal ergeben kann.

Die adsorbierten Anionen werden nun durch die kontinuierlich vorbeiströmenden Anionen der mobilen Phase ausgetauscht und es findet ein laufender Gleichgewichtsprozeß statt. Die Trennung der Anionen wird dabei durch deren unterschiedliche Affinität zur stationären Phase bestimmt. Damit werden die Anionen in der Reihenfolge ihrer Ladungszahl, ihres Durchmessers und ihrer Polarisierbarkeit eluiert.

Als Detektor wird meist ein Leitfähigkeitsdetektor verwendet, wobei die Nachweisempfindlichkeit von der Leitfähigkeitsdifferenz zwischen den Ionen der Probe und des Puffers abhängt. Wenn deren Äquivalenzleitfähigkeiten ähnlich sind, ergibt sich eine geringe Nachweisempfindlichkeit als Folge der geringen Leitfähigkeitsänderung.

Zur Unterdrückung der Eluentenleitfähigkeit existieren zwei Möglichkeiten:

- Systeme mit chemischer Suppression
- Systeme mit elektronischer Suppression

#### 4.4.1 Suppressorsysteme

Ionenchromatographie mit chemischer Suppression der Eluentleitfähigkeit bedeutet, dass vor dem Leitfähigkeitsdetektor der Eluent mit sehr hoher Ionenstärke in ein schwach leitendes Medium umgewandelt wird. Dieses Suppressormodul befindet sich unmittelbar vor dem Detektor und kann eine **zweite Ionenaustauschersäule** sein.

Bei der Anionenchromatographie mit Hydrogencarbonat-Natriumcarbonat im Eluenten werden diese in ihre Säureform bzw.  $\text{CO}_2$  umgewandelt. Gleichzeitig werden auch alle Anionen der Probe in die Säureform umgewandelt (siehe Abb. 4.5). Die stark leitenden Mineralsäuren ( $\text{H}^+$ -Ionen haben die größte Ionenbeweglichkeit) gelangen nun in Gegenwart der nur schwach leitenden Kohlensäure in den Leitfähigkeitsdetektor und können daher sehr empfindlich nachgewiesen werden.

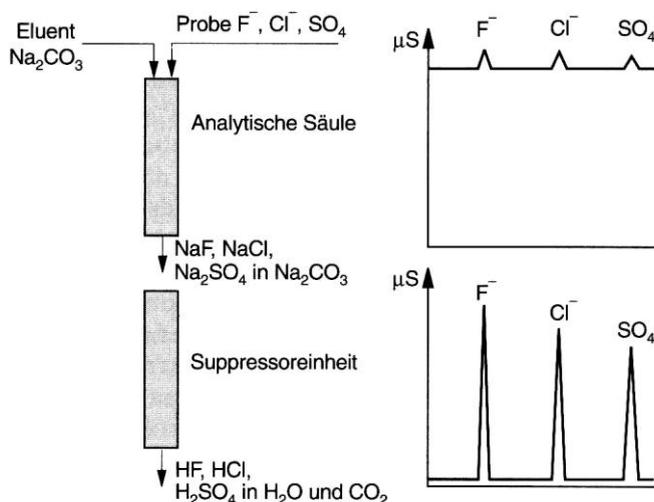


Abbildung 4.5 Ionenchromatographie mit und ohne Suppression

Bei der Kationenchromatographie erfolgt die Suppressorreaktion für die Kationen mit HCl als Eluenten. In diesem Fall enthält die Suppressorsäule einen stark basischen Ionenaustauscher in der Hydroxidform, so dass die Proben zu Hydroxiden und der Eluent zu nichtleitendem Wasser umgewandelt wird.

Dieses Zweisäulensystem verbessert zwar die Meßempfindlichkeit, ist jedoch auch die Ursache neuer Probleme (Regeneration der Suppressorsäule, zusätzliche Peakverbreiterung). Dieser Nachteil konnte durch die Entwicklung von **Hohlfasermembransuppressoren** eliminiert werden, mit der ein kontinuierliches Arbeiten gewährleistet ist. Der Suppressor besteht aus einer Ionenaustauschermembran in Form eines langen dünnen Schlauches. Das Säuleneluat wird durch das Innere der Hohlfasermembran geleitet, die Regenerierlösung (z. B. verdünnte Schwefelsäure) nach dem Gegenstromprinzip an der Außenseite der Membran vorbeigeführt. Die Kapazität für die chemische Unterdrückung ist allerdings bei dieser Methode begrenzt.

Eine absolute wartungsfreie, kontinuierliche Regenerierung wurde durch die Entwicklung des **elektrochemischen Suppressors** möglich. Elektrochemische Suppressoren regenerieren sich selbst mit Wasser und elektrischem Strom. Das Wasser wird aus dem Eluenten nach dem Durchgang durch die Leitfähigkeitszelle bezogen. Dieses Verfahren ermöglicht die Verwendung von hochkapazitiven Trennsäulen und die Bestimmung hoher Elektrolytkonzentrationen durch drastische Erweiterung des dynamischen Bereichs. Der elektrochemische Suppressor ist vom Aufbau her dem Membransuppressor ähnlich, enthält aber zusätzlich zwei Elektroden für die Elektrolyse. Insgesamt sind drei Reaktionszonen zu betrachten: der Anodenraum, der Kathodenraum und der Raum innerhalb der Ionenaustauschermembran.

**Elektrochemische Suppression für Anionen (Abb. 4.6):** Als Eluent wird Natronlauge oder ein Gemisch von Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat verwendet. Bei Anlegen einer Spannung erfolgt die elektrolytische Zersetzung von Wasser. An der Anode werden Hydroniumionen und Sauerstoff gebildet, an der Kathode Wasserstoffgas und Hydroxidionen. Die Hydroniumionen des Anodenraumes wandern durch die Kationenaustauschermembran und kombinieren mit den Elutionen – in diesem Beispiel mit den Hydroxidionen – zu Wasser. Von den Probenbestandteilen werden die korrespondierenden Säuren gebildet. Gleichzeitig wandern Natriumionen durch die Membran in den Kathodenraum und kombinieren mit den an der Kathode gebildeten Hydroxidionen, um die Elektroneutralität zu erhalten. Die Hydroxidionen werden durch Donnan-Ausschluß<sup>1</sup> an der Kationenaustauschermembran am Eintritt in den Eluatraum gehindert.

---

<sup>1</sup> Ionenaustauschermembranen bestehen aus Wasser – gequollenen Polymernetzwerken, an denen über kovalente Bindungen elektrisch geladene chemische Gruppen (z. B. COO<sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, NR<sub>4</sub><sup>+</sup>) fixiert sind. Die Gesamtladung der Membran wird durch mobile Gegenionen ausgeglichen, die in der wässrigen Phase gelöst sind. Diese mobilen Gegenionen können durch andere mobile Ionen mit gleichem Ladungsvorzeichen ausgetauscht werden, sobald die Membran in Kontakt mit einer Salzlösung gebracht wird. Folglich können alle Ionen mit dem gleichen Ladungsvorzeichen wie die mobilen Gegenionen diese Membran passieren, während entgegengesetzt geladene Ionen – mit dem gleichen Ladungsvorzeichen wie die fixierten Ionen (funktionelle Gruppe) des Membrannetzwerkes (Polymermatrix) – abgewiesen werden.

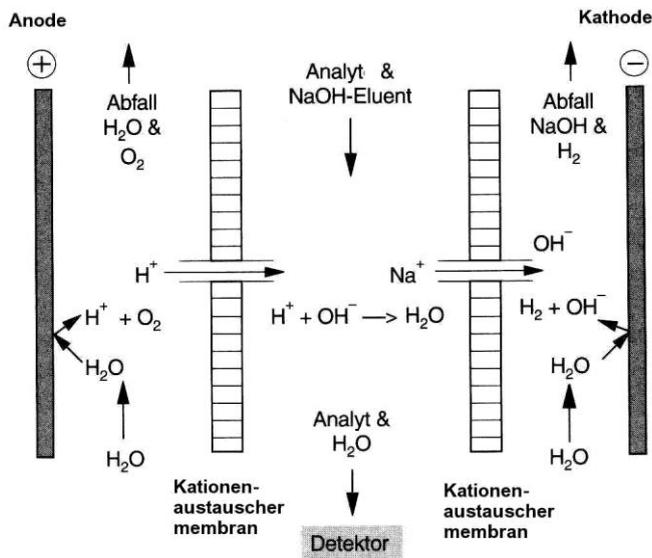


Abbildung 4.6 Elektrochemische Suppression für Anionen

#### 4.5 Ionenpaar-Chromatographie

Die Ionenpaar-Chromatographie ist eine Alternative zur Ionenaustauschchromatographie. Mischungen von Säuren, Basen und Neutralstoffen lassen sich häufig nicht gut mit Ionenaustausch-Methoden trennen. In diesen Fällen wendet man die Ionenpaar-Chromatographie an. Dabei werden die für die reversed-phase Chromatographie entwickelten Umkehrphasen als stationäre Phase verwendet. Der mobilen Phase wird ein organischer ionogener Stoff zugesetzt, der mit einer entgegengesetzt geladenen Probenkomponente ein Ionenpaar bildet. Dieses ist chemisch gesehen ein Salz, verhält sich aber wie ein nicht-ionisches organische Molekül, das sich mittels reversed-phase Chromatographie trennen lässt. Als Ionenpaar-Reagenzien zur Verzögerung von Säureanionen werden im allgemeinen Tetraalkyl-Ammonium-Verbindungen verwendet. Zur Verzögerung von Basekationen haben sich Alkylsulfonate oder Alkylsulfate bewährt.

Abbildung 4.7 zeigt den Mechanismus der Ionenpaarchromatographie am Beispiel einer organischen Sulfonsäure in der Probe. Die Anionen der Sulfonsäure bilden mit den in der mobilen Phase im Überschuss zugesetzten Tetraalkylammoniumionen ein nach außen elektrisch neutrales Ionenpaar, das sich an die hydrophobe Oberfläche der stationäre Phase anlagern kann. Andere Ionen (z.B. Pufferionen) und ungeladene Verbindungen (Lösungsmittelmoleküle) in der mobilen Phase treten mit diesen Ionenpaaren um die verfügbaren aktiven Zentren auf der stationäre Phase in Konkurrenz. Bei der freien Säure tritt wegen der elektrischen Ladung eine viel geringere oder keine Wechselwirkung mit der stationären Phase auf, das Gleichgewicht ist weitgehend zur Lösung hin verschoben.

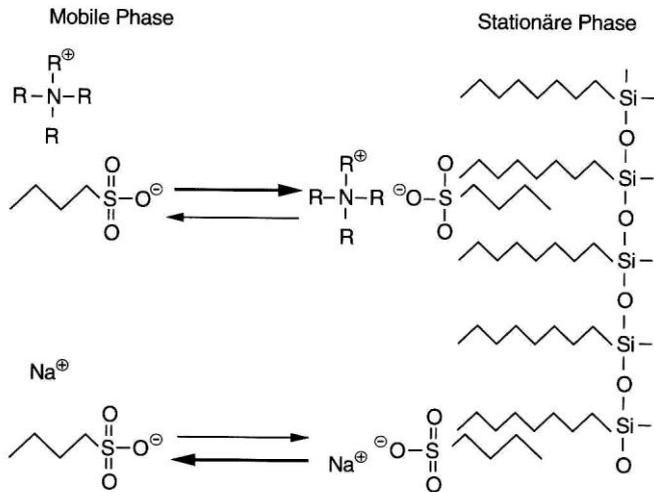


Abbildung 4.7 Mechanismus der Ionenpaarchromatographie

Literatur:

- L.R. Snyder, J.J. Kirkland – Introduction to modern liquid chromatography
- V.R. Meyer – Praxis der Hochleistungs- Flüssigchromatographie
- J. Böcker – Chromatographie
- J. Weiß - Ionenchromatographie