

4.35 Frühes Multielement-AAS-Gerät nach dem Prinzip des Mehrfachaufbaus.

nieder. Der Einsatz von Mehrelementlampen bringt demgegenüber zwar bereits einige Vorteile, diese sind jedoch wegen ihrer festgelegten Elementzusammensetzung wenig flexibel. Letztendlich hat sich die Verwendung von Kontinuumstrahlern oder Mehrelementlampen als Lichtquelle für die Multielement-AAS nicht durchsetzen können.

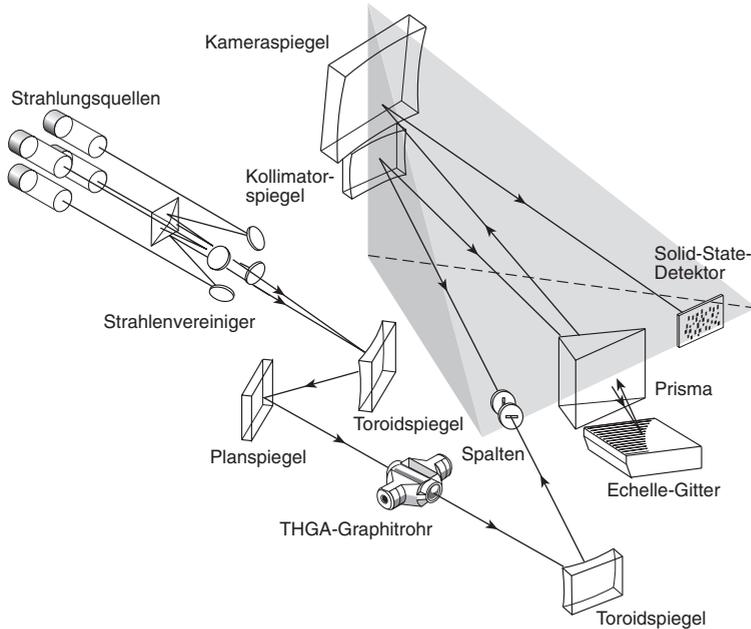
Es wurden daher Möglichkeiten gesucht, das Licht mehrerer Linienstrahler zu einem gemeinsamen Strahlengang zu vereinen und so durch die Atomisierungseinheit zu führen. Zu dieser Verfahrensweise sind sehr verschiedene technische Ansätze entwickelt worden. Die konsequenteste Umsetzung dieses Prinzips ist der ineinander verschachtelte Mehrfachaufbau eines Einelementgerätes. In einem solchen Gerät, wie es schon früh von der Fa. Hitachi für die simultane Bestimmung von vier Elementen konstruiert wurde (Z 9000), sind alle optischen Elemente, wie Lampen, Linsen, Spiegel und auch Monochromatoren vierfach vorhanden. Der Aufbau ist schematisch in Abb. 4.35 skizziert. Durch entsprechende Anordnung von Spiegeln gelingt es hier, die Strahlen von vier HKL durch den Mittelpunkt S1 einer Atomisierungseinheit zu fokussieren. Hinter der Atomisierungseinheit werden die Lichtstrahlen auf vier separate Gitter zur Wellenlängenauswahl abgebildet. Schließlich wird für jedes Element ein eigener Detektor genutzt.

In einem anderen Ansatz der Fa. Thermo Jarrel Ash wurden ebenfalls vier HKL als Lichtquellen eingesetzt.

Ihr Licht fällt auf einen drehbaren Spiegel, durch den die vier Messstrahlen in schneller Reihenfolge durch die Atomisierungseinheit und über weitere Spiegel auf ein ebenfalls drehbares Gitter abgebildet wird. Mit diesem Gitter kann ein Spektrum von 190 nm bis 800 nm in wenigen Millisekunden abgefahren werden. Die Strahlung wird von einem einzigen Photomultiplier detektiert. Das ganze Messsystem arbeitet also nicht im strengen Sinne simultan, sondern nach einem schnellen sequentiellen Prinzip. Da nach einer Messung aber alle Ergebnisse für vier Elemente vorliegen, wird es trotzdem als simultanes Multielement-AAS-Verfahren eingestuft.

Ein neueres, von der Fa. Perkin Elmer entwickeltes Gerät (SIMAA 6000) vereinigt die Strahlen von ebenfalls bis zu vier HKL (von denen einige auch Mehrelementlampen sein können) über ein pyramidales Prisma zu einem Strahlenbündel, das durch die Atomisierungseinheit auf einen Echelle-Polychromator geführt wird. Dort wird das Licht zweidimensional dispergiert und auf einen Array aus ca. 60 Photodioden abgebildet. Die Dioden sind so positioniert, dass sie jeweils an der Stelle der wichtigsten Elementlinien liegen. Das Gerät ist schematisch in Abb. 4.36 dargestellt.

In einem weiteren Ansatz der Autoren wurde das Licht mehrerer HKL über einen mehrarmigen Lichtleiter zusammengeführt und durch die Atomisierungseinheit auf einen zweiten mehrarmigen Lichtleiter abgebildet, um die komplizierten Spiegel- und Gittersysteme zu umge-

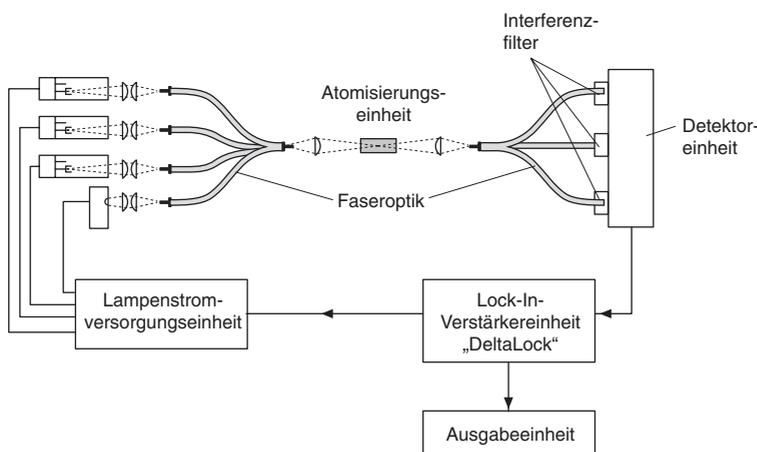


4.36 Schematischer Aufbau eines modernen Multielement-AAS-Gerätes mit Echelle-Polychromnator und Detektorarray.

hen. Die gemeinsamen Enden dieser Lichtleiter sind dabei nach Messkanälen segmentiert, sodass eine genaue Abbildung möglich ist. Mit dem zweiten Lichtleiter wird das Licht wieder aufgeteilt und zur Vorseparation durch schmalbandige Interferenzfilter geleitet, hinter denen sich je ein PMT als Detektor befindet. Um das Licht der einzelnen Kanäle voneinander und von Störlicht zu unterscheiden, wird jede Lichtquelle mit einer individuellen Modulationsfrequenz gepulst. Den Detektoren sind Lock-In-Verstärker nachgeschaltet, die diese Frequenzen selektiv erkennen und verstärken. Diese Technik ist sehr robust und einfach und in Abb. 4.37 vereinfacht dargestellt.

Es gibt außer den hier exemplarisch beschriebenen Methoden noch eine große Anzahl weiterer Ansätze zur simultanen AAS-Multielementanalyse. Die Leistungsfähigkeit

aller Ansätze wird jedoch dadurch begrenzt, dass es unumgänglich ist, für die simultane Atomisierung und Bestimmung mehrerer Elemente hinsichtlich der Atomisierungsbedingungen Kompromisse einzugehen. Daher muss gegenüber den Einelementbestimmungen immer mit Einbußen in der Nachweisstärke gerechnet werden. Diese Problematik tritt bei der Plasma-Emissionsspektrometrie nicht in gleichem Maße in Erscheinung. Außerdem sind dort die dynamischen Messbereiche mit in der Regel drei bis vier Konzentrationsdekaden erheblich größer als bei der AAS mit meist ein bis maximal zwei Dekaden. Wenn man sich jedoch auf die simultane Bestimmung von drei bis vier Elementen beschränkt, können Elementgruppen mit ähnlichen Atomisierungsbedingungen gebildet werden, sodass dieser Nachteil begrenzt werden kann. Unter dieser Voraussetzung wird die Spu-



4.37 Frequenzmodulierte simultane Multielement-AAS (Frem-AAS).

renalyse mit der AAS erheblich beschleunigt, sodass der Vorteil der emissionsspektrometrischen Methoden zumindest zum Teil wettgemacht wird.

4.4 Atomemissionsspektrometrie (AES)

Im letzten Kapitel, das sich mit der AAS beschäftigt, wurde gezeigt, dass Atome von *außen* zugeführte Strahlung selektiv absorbieren können und die Abschwächung dieser Strahlung gemessen werden kann. Atome in einem angeregten Zustand, also in einem Zustand, der energiereicher ist als der Grundzustand, senden bei ihrer Relaxation in einen weniger energetischen Zustand oder in den Grundzustand spontan die dabei freiwerdende Energie in Form von Licht aus. Die Messung dieser Strahlung ist die Grundlage der Atomemissionsspektrometrie (AES). Die Emission ist i. d. R. eine elementspezifische Linienstrahlung. Der Energiebedarf für Energieübergänge äußerer Elektronen ist dabei für die Alkali- und einige Erdalkalielemente so gering, dass die thermische Energie einer Propangasflamme (ca. 2000°C) zur Anregung ausreicht (Flammenphotometrie). Für alle anderen Elemente werden wesentlich energiereichere Anregungsquellen benötigt (z. B. bei der Plasmaemissionsspektrometrie).

4.4.1 Flammenphotometrie

Die erste Anwendung der Emissionsspektroskopie ist die Flammenphotometrie. Sie wurde bereits durch Bunsen mit dem nach ihm benannten Gasbrenner, der wegen einer verbesserten Luftzufuhr mit einer „nichtleuchtenden“ Flamme betrieben werden konnte, etabliert. Die Verwendung der Flamme als Anregungsquelle in der AES beschränkt sich heute aus Empfindlichkeitsgründen im Wesentlichen auf die Bestimmung der Alkali- und Erdalkalimetalle mit dem Schwerpunkt auf der Analyse von Flüssigkeiten.

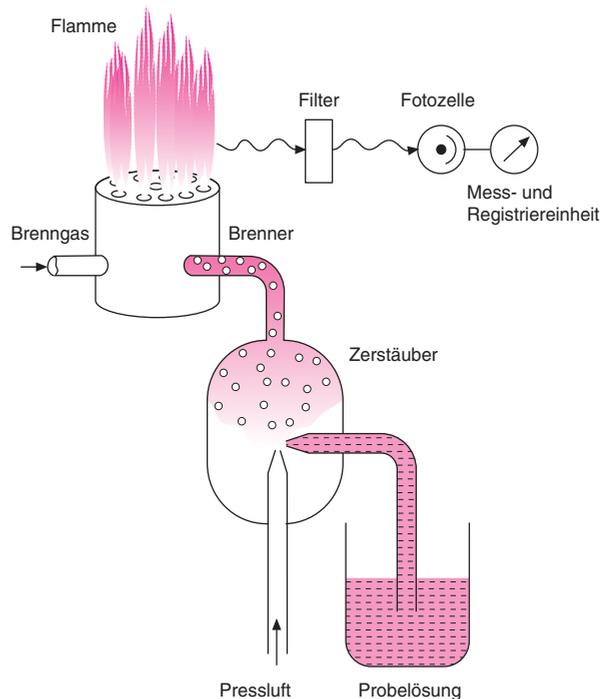
Die Flamme als Anregungsquelle

Mit den Aufgaben der Atomisierung einer gegebenen Analysenprobe und der Anregung der gasförmigen Atome zur Emission ihrer elementspezifischen Linienstrahlung stellt die Flamme die zentrale Einheit des Flammenphotometers dar. Als Brenner kommen der auch in der Flammen-AAS verwendete direkt zerstäubende Turbulenzbrenner und der laminare Mischkammerbrenner mit pneumatischer Zerstäubung in Frage. Die Arbeitsweise der beiden Brenner ist in Abschnitt 4.3.4 beschrieben worden. Als Flammengase werden verschie-

dene Kombinationen von Brenngas und Oxidans vorgeschlagen. Propan und Butan sind die gebräuchlichsten Brenngase. Werden sie mit Luft vermischt, erzeugen sie Flammentemperaturen zwischen 1700°C und 2000°C.

Spezielle apparative Anforderungen

Da in den relativ kalten Flammen der Flammenphotometrie nur wenige Elemente zur Strahlungsemission angeregt werden, entstehen besonders linienarme Emissionsspektren. Dieser Umstand macht es möglich, vergleichsweise simple Geräte für die optische Separation der Messwellenlängen zu verwenden. Routinemäßig wird aus Preisgründen i. d. R. auf dispergierende optische Bauteile verzichtet und stattdessen werden optische Filter eingesetzt. Bei den Filtern der preiswerten Flammenphotometer (z. B. für klinische Anwendungen wie die Bestimmung der Blutelektrolyte Na, K, Li, Ca, Mg) handelt es sich meist um einfache Farbfilter. Bei etwas anspruchsvolleren Geräten werden Interferenzfilter eingesetzt, die Durchlassbereiche mit Halbwertsbreiten um 1 nm aufweisen. Die zu detektierende Lichtintensität ist bei der Flammenphotometrie meist relativ groß. Daher genügt oft der Einsatz einfacher Photozellen als lichtelektrische Empfänger (Detektoren). Nur vereinzelt werden in Flammenphotometern auch Photomultiplier eingesetzt. In Abb. 4.38 ist der prinzipielle Aufbau eines gebräuchlichen Flammenphotometers dargestellt.



4.38 Schematischer Aufbau eines Flammenphotometers.

Arbeitsbereiche und Anwendungsbeispiele

In Tabelle 4.5 sind einige typische Anwendungsbeispiele für die Flammenphotometrie zusammengefasst.

Tabelle 4.5 Typische Anwendungsbeispiele für die Flammenphotometrie.

	untere Arbeitsbereichsgrenze in µg/mL	Probenart	Flammenart
Na	0,01	Blut, Glas, Leichtmetalle	Butan/Luft, Popan/Luft
Li	0,1	Glas, Zement	Butan/Luft, Popan/Luft
K	0,1	Blut, Glas, Zement	Butan/Luft, Popan/Luft
Ca	0,1	Glas, Keramik, Mineralien	Acetylen/Luft

Zusatzinformation

Flammen-AAS-Geräte lassen sich prinzipiell auch in Emission betreiben. Die Analyse der Alkalielemente wird teilweise heute noch empfindlicher in Emission als in Absorption durchgeführt. Die Flüssigkeiten werden dazu direkt in den Brenner zerstäubt und die Emissionsstrahlung durch den Monochromator des AAS-Spektrometers detektiert. Die Lichtquellen, HKL oder EDL, bleiben dazu natürlich ausgeschaltet!

Früher war eine derartige Emissionsmessung die einzige Möglichkeit, Metalle flammenphotometrisch zu bestimmen. Die Anregungseffizienz der verwendeten Flammen war allerdings sehr schlecht und die Nachweisgrenzen waren entsprechend hoch. Heute kommen als Anregungseinheiten für die Emissionsspektroskopie praktisch nur noch Plasmen zum Einsatz.

4.4.2 Theorie des Plasmazustandes

Bei der Flammenphotometrie reichen die Energien normaler Flammen zur Anregung von Alkali- und einiger Erdalkalimetallatome aus. Will man aber weitere Elemente mit der Atomemissionsspektrometrie bestimmen, werden energiereichere spektrale Anregungsquellen benötigt. Dies sind z. B. Plasmen. Als theoretische Grundlage soll daher zunächst der Begriff Plasma näher erläutert werden.

Der Plasmazustand

Man bezeichnet den Zustand gasförmiger Materie dann als Plasma, wenn seine physikalischen und chemischen Eigenschaften im Wesentlichen durch die Existenz von

geladenen Teilchen, freien Ionen und freien Elektronen, bestimmt werden. Gase im Plasmazustand sind demnach als elektrische Leiter anzusehen, was heute zum Beispiel in jeder Leuchtstoffröhre ausgenutzt wird. Die Natur benutzt ebenfalls diesen elektrischen Leiter, wenn Blitze die Ladungsverteilung zwischen Luftschichten oder zwischen Luft und Erde auszugleichen versuchen.

Mehr als 99% der Masse des gesamten Universums befindet sich im Plasmazustand, denn jeder leuchtende Stern ist so heiß, dass die Elektronen nahezu vollständig von den Atomkernen getrennt sind (z. B. auf unserer Sonne Wasserstoff und Helium).

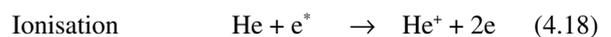
Plasmaprozesse und Anregungsmechanismen

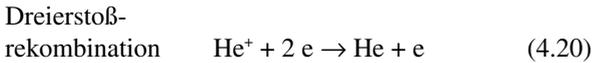
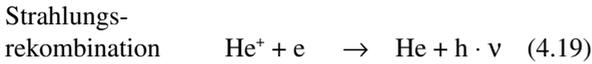
Um Plasmen künstlich zu erzeugen, muss bereits vorhandenen Ladungsträgern Energie zugeführt werden, damit ein chaotischer Prozess von Teilchenkollisionen und anderen Energietransfervorgängen einsetzen kann, der eine ständige Neubildung geladener Teilchen gewährleistet. Die dafür nötige Energie kann mittels magnetischer oder elektromagnetischer Felder auf die Ladungsträger (negative Elektronen und positiv geladener Kern der Atome) übertragen werden.

Für die Initialzündung eines Plasmas sind freie Ladungsträger nötig. Diese können beispielsweise einem Gas, das zum Plasma angeregt werden soll, in Form von Elektronen zugeführt werden. Dafür kommen entweder thermische Elektronen z. B. eines glühenden Drahtes oder der Funke einer piezoelektrischen Entladung oder Teslaspule in Frage.

Einmal gezündet bilden sich in einem geeigneten elektromagnetischen Wechselfeld durch Stoßionisation der oszillierend beschleunigten Elektronen immer wieder neue Ladungsträger (freie Elektronen sowie ionisierte Atome und Moleküle), welche ebenso dem magnetischen bzw. elektromagnetischen Wechselfeld ausgesetzt sind. Auf diese Weise steigt ihre Anzahl lawinenartig an, wobei die schwereren Kationen dem Wechselfeld nicht im gleichen Maße folgen können wie die Elektronen. Da gleichzeitig auch Rekombinationsprozesse ablaufen, baut sich ein dynamisches Ionisationsgleichgewicht auf. Insgesamt befindet sich ein Plasma im elektroneutralen Zustand.

Am Beispiel des Heliumplasmas, das in der instrumentellen Analytik vorzugsweise für die Anregung von Halogenatomen eingesetzt wird, sind im Folgenden einige wichtige Elementarprozesse aufgeführt, die für die Unterhaltung des Plasmas verantwortlich sind.

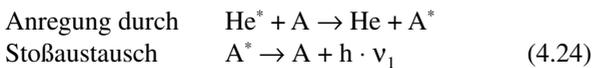
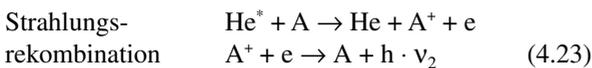
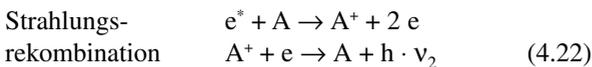
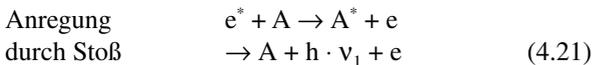




- mit e: Elektron
 e*: Elektron mit hoher kinetischer Energie
 He: Helium-Atom
 He*: Helium-Atom im angeregten Zustand
 He+: einfach positiv ionisiertes Helium-Ion
 h: Planck'sche Konstante
 ν: Frequenz der elektromagnetischen Welle

Werden Elektronen unterschiedlicher kinetischer Energie durch Stoß abgebremst, so kommt es wie bei den Röntgenstrahlen zu der Aussendung von Kontinuumsstrahlung, die bei energiereichen Plasmen (z. B. Sonne) sehr intensiv sein kann. Im Emissionsspektrum bedeutet das einen relativ hohen Untergrund, dessen Stabilität letztendlich die Nachweisgrenze bestimmt.

Gelangt eine Analytverbindung in ein Plasma, so wird sie zunächst durch die drastischen thermischen Bedingungen atomisiert, bevor die einzelnen Atome ein- oder mehrfach ionisiert oder in angeregte Elektronenzustände überführt werden. Für die Anregung von Analytatomen im Plasma spielen folgende Mechanismen eine Rolle:



- mit A: Analyt-Atom
 A*: Analyt-Atom im angeregten Energiezustand
 A+: einfach positiv ionisiertes Analyt-Ion

Die bei diesen Prozessen freigesetzte Strahlung enthält Informationen über Anzahl und Art der Atome (beteiligte Energieniveaus) im Plasma, sodass die qualitative Analyse durch Messung der Wellenlänge der emittierten Strahlung und eine quantitative Analyse durch Messung der Intensität dieser Strahlung ermöglicht wird. Die Häufigkeit der jeweiligen Prozesse hängt dabei stark von den Plasmabedingungen wie Druck und Temperatur sowie von den Anregungs- und Ionisierungsenergien der betreffenden Analyt-Atome ab.

Die Strahlungsintensität

Das Grundprinzip der Emissionsspektroskopie beruht auf der Möglichkeit spontaner Übergänge angeregter Atome des Zustandes *k* mit der Energie E_k in einen Zustand *i* mit niedrigerer Energie E_i unter Aussendung elektromagnetischer Strahlung gemäß Gleichung 4.7. Die Frequenz der emittierten Strahlung ist dabei proportional zur Energiedifferenz der beteiligten Zustände (vgl. Abschnitt 4.2). Im Falle der optischen Atomemissionsspektroskopie liegen die Wellenlängen der emittierten Strahlung im sichtbaren Bereich oder in den angrenzenden UV- bzw. IR-Regionen. Da die einzelnen Energiezustände charakteristisch für eine Atomsorte sind (bestimmt durch die Haupt-, Neben- sowie die magnetische Quantenzahl), gibt die Wellenlänge der emittierten Strahlung Auskunft über die Art des emittierenden Atoms. Ihre Intensität ist abhängig von der Anzahl der emittierenden Atome und liefert somit die Grundlage der quantitativen Emissionsspektroskopie.

Einstein hat mit der Übergangswahrscheinlichkeit eine Größe eingeführt, welche die Wahrscheinlichkeit eines spontanen Übergangs bezogen auf eine Sekunde angibt. Die Strahlungsleistung bei der entsprechenden charakteristischen Wellenlänge ist dann durch die folgende Gleichung gegeben:

$$P = h \cdot \nu_{ki} \cdot n_k \cdot V \cdot B_{ki} \tag{4.25}$$

- mit *P*: Strahlungsleistung in J
h: Planck'sche Konstante in Js
 ν_{ki} : Frequenz des Überganges aus dem Zustand *k* in den Zustand *i* in 1/s
n_k: Teilchenzahldichte angeregter Atome im Zustand *k* in 1/m³
V: betrachtetes Volumen des Plasmagases in m³
B_{ki}: Einstein'sche Übergangswahrscheinlichkeit

Will man die Strahlungsleistung messen, so gelingt dies nur für eine gewisse Beobachtungsfläche *F*, die durch die optische Apertur (analog zur Wirkung der Blende bei einem Photoapparat) bestimmt ist. Division von *V* durch *F* führt zu der so genannten spektralen Tiefe *L* der Strahlungsquelle entlang der Beobachtungslinie. Berücksichtigt man nun noch, dass die Strahlung gleichmäßig in alle Raumwinkel emittiert wird, so ergibt sich die messbare Strahlungsleistung *P_m* (Kugeloberflächensegment) wie folgt:

$$P_m = \frac{1}{4\pi} \cdot h \cdot \nu_{ki} \cdot n_k \cdot B_{ki} \cdot L \tag{4.26}$$

- mit *P_m*: messbare Strahlungsleistung in W

- L : spektrale Tiefe ($L = V/F$) in m
 V : betrachtetes Volumen des Plasmagases in m^3
 F : Beobachtungsfläche in m^2

Spektrallinien sind jedoch nicht streng monochromatisch, sondern weisen eine Intensitätsverteilung über einen gewissen, allerdings sehr kleinen Wellenlängenbereich um die Zentralwellenlänge λ_{ki} auf (vgl. Abschnitt 4.2.1). Die Strahlungsmessung sollte immer integrativ über das gesamte Profil der Linie erfolgen. Typische Linienbreiten in der Plasmaemission liegen in der Größenordnung von 10 pm, sodass im Allgemeinen bei einer spektralen Bandbreite eines guten Spektrometers von z. B. 100 pm die quantitative Erfassung der Atomemissionsintensität in jedem Falle gewährleistet ist. Jedoch kann dieser Spektralapparat das eigentliche Linienprofil nicht liefern, dazu müsste er eine Auflösung haben, die wesentlich kleinere Linienbreiten als 1 pm zu messen gestatten würde.

In Gleichung 4.26 ist die Strahlung nur über die Besetzungsdichte des angeregten Zustands n_k ausgedrückt. Sie soll nun noch in Bezug zur Gesamtteilchenzahldichte der betreffenden Atomsorte gesetzt werden. Mit Gleichung 4.6 ergibt sich nach mathematischen Umformungen für die messbare Strahlungsleistung folgender Zusammenhang:

$$P_m = \frac{1}{4\pi} \cdot h \cdot \nu_{ki} \cdot \frac{N}{Z(t)} \cdot g_k \cdot B_{ki} \cdot L \cdot e^{-\Delta E/ki} \quad (4.27)$$

- mit N : Gesamtteilchenzahldichte
 $Z(t)$: Zustandssumme aller möglichen Energiezustände der betrachteten Teilchen

Dieser theoretische Hintergrund bildet die Basis der Atomemissionsspektroskopie. Es ergibt sich demnach ein linearer Zusammenhang zwischen der spektralen Strahlungsdichte und der Zahl bestimmter Atome im Plasma. Damit ist gleichzeitig ein linearer Zusammenhang mit der Konzentration eines in die Anregungsquelle eingebrachten Analyten gegeben. Die Beziehung gilt jedoch nur für das ideale Modell, von dem bei der Herleitung ausgegangen wurde und bei dem das gesamte Plasma integral optisch spektroskopisch erfasst werden muss. Für reale Plasmavorgänge kann es lediglich als grobe Näherung angesehen werden. Eine Berechnung der Zusammenhänge zwischen der Intensität einer Spektrallinie und der Menge oder Konzentration eines Analyten ist für quantitative Analysen nicht hinreichend präzise, da bereits die Ermittlung der richtigen lokalen Temperatur in einem bestimmten Plasmaausschnitt (Plasmazone) nicht zuverlässig möglich ist. In der Praxis ist im aktuellen Beobachtungsfenster sogar immer ein

unvermeidbarer Temperaturgradient vorhanden. Atomemissionsspektrometrische Verfahren müssen daher durch Messung von Kalibrier- oder Bezugslösungen bekannter Konzentrationen kalibriert werden.

Der Temperaturbegriff

Da die Besetzungsdichte verschiedener Energieniveaus eines Atoms nach Boltzmann von der Temperatur abhängt (s. Gleichung 4.6), ist die Temperatur eines Plasmas für die spektroskopische Nutzung von entscheidender Bedeutung. Bei Diskussionen über die Plasmatemperatur ist weiterhin auch zu beachten, dass sich der Begriff „Temperatur“ zwar gemeinhin auf ein exakt definiertes thermodynamisches Gleichgewicht bezieht, ein Plasma als ganzes sich aber niemals in einem vollständigen thermodynamischen Gleichgewicht (CTE, *complete thermodynamic equilibrium*) befindet. Eine Annäherung findet durch die Definition kleiner, lokaler Gleichgewichte (LTE) in bestimmten Plasmabereichen statt. Den im Wechselfeld oszillierenden Ionen und Elektronen werden wegen ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeiten und zurückgelegter Wegstrecken (siehe oben: Massenträgheit der schwereren Ionen) unterschiedliche Temperaturen zugeordnet. Der Zustand eines beispielsweise einatomigen Gases im Plasmazustand lässt sich also über verschiedene Temperaturen charakterisieren:

- Die Anregungstemperatur T_a charakterisiert den Besetzungsgrad der verschiedenen Energiezustände.
- Die Elektronentemperatur T_e wird durch die kinetische Energie der Elektronen bestimmt.
- Die Gastemperatur T_g wird durch die kinetische Energie der Gasatome bestimmt.
- Die Ionisierungstemperatur T_i charakterisiert den Besetzungsgrad der verschiedenen Ionisationszustände.

Die Bestimmung dieser unterschiedlichen Temperaturen kann mit speziellen Messmethoden oder theoretischen Berechnungen durchgeführt werden, die im Folgenden kurz umrissen werden sollen.

a. Die Anregungstemperatur

Die Anregungstemperatur T_a ist durch den Besetzungsgrad der verschiedenen atomaren Energiezustände charakterisiert und liefert damit wichtige Informationen über die Anregungsbedingungen eines Plasmas. Zur Bestimmung der Anregungstemperatur können die Verhältnisse von Intensitäten geeigneter Linienpaare zueinander gemessen werden. In einem angenommenen lokalen thermodynamischen Gleichgewicht folgt die Besetzungsdichte – wie bereits beschrieben – der Boltzmannschen Verteilung. Mithilfe der Einstein'schen

Übergangswahrscheinlichkeit lässt sich auch ein Zusammenhang zur Emissionsintensität einer einzelnen Spektrallinie mit der Wellenlänge λ herstellen.

b. Die Elektronentemperatur

Bei der Definition der Elektronentemperatur T_e wird in erster Näherung eine Maxwell'sche Energieverteilung der Elektronen nach folgender Gleichung angenommen:

$$\frac{dn}{n} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{\frac{\varepsilon}{\bar{\varepsilon}}} \cdot \exp\left(-\frac{\varepsilon}{\bar{\varepsilon}}\right) d\left(\frac{\varepsilon}{\bar{\varepsilon}}\right) \quad (4.28)$$

mit ε : Energie der stoßenden Teilchen
 $\bar{\varepsilon}$: mittlere Energie der stoßenden Teilchen.

Damit erhält man für die Elektronentemperatur T_e

$$T_e = m_e \cdot \frac{\overline{v_e^2}}{3k} \quad (4.29)$$

mit m_e : Masse des Elektrons,
 $\overline{v_e^2}$: mittleres Geschwindigkeitsquadrat der Elektronen,
 k : Boltzmann-Konstante.

c. Die kinetische Gastemperatur

Für die Gastemperatur T_g ergibt sich analog:

$$T_g = m_g \cdot \frac{\overline{v_g^2}}{3k} \quad (4.30)$$

mit m_g : Masse des Gasatoms,
 $\overline{v_g^2}$: mittleres Geschwindigkeitsquadrat der Gasatome.

Die Gastemperatur eines Plasmas kann über die Doppler-Verbreiterung einer Atomemissionslinie, die von der Geschwindigkeit der emittierenden Atome abhängt, bestimmt werden. Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung von T_g ergibt sich aus der Anwendung des Wien'schen Gesetzes, wonach sich das Maximum der Kontinuumstrahlung eines als schwarzer Körper betrachteten Strahlers gemäß:

$$\lambda_{\max} \cdot T = 2,9 \cdot 10^{-3} m \cdot K \quad (4.31)$$

mit λ_{\max} : Wellenlänge am Maximum des Hintergrundkontinuums

linear mit der Temperatur verschiebt sowie die Anpassung der Planck'schen Strahlungskurve an ein beobachtetes Intensitätsprofil der Kontinuumstrahlung eines Plasmas.

d. Die Ionisationstemperatur

Die Ionisationstemperatur T_i ist über die Saha-Gleichung definiert:

$$\frac{n_e \cdot n_{k+1}}{n_k} = S_n(T_i) = 2 \cdot \frac{Z_{k+1}(T_i)}{Z_k(T_i)} \cdot \frac{\sqrt[3]{2\pi \cdot m_e \cdot kT_i}}{h^3} \cdot \exp\left(\frac{\chi_z - \Delta\chi_z}{kT_i}\right) \quad (4.32)$$

mit n_e : Teilchendichte der Elektronen
 n_k : Teilchendichte der Atome im Ionisationszustand k ($k = 0, 1, \dots$)
 n_{k+1} : Teilchendichte der Atome im Ionisationszustand $k + 1$
 χ_z : Ionisationsenergie von Ionisationszustand k nach $k + 1$
 $\Delta\chi_z$: Korrekturgröße zur Berücksichtigung der Dichte störender Teilchen.

Die Saha-Gleichung beschreibt die Besetzung der verschiedenen Ionisationsstufen.

4.4.3 Die Plasmaemissionsspektrometrie

Plasma-Anregungsquellen

Die Plasma-Anregungsquelle ist das zentrale Bauteil jedes Emissionsspektrometers. Hier erfolgt die Atomisierung eines Aerosols einer gegebenen Analysenprobe und die Anregung der gasförmigen Atomdampf Wolke zur Emission ihrer elementspezifischen Linienstrahlung.

Elektrische Bögen und Funken

In der Vergangenheit stellten elektrische Bögen und Funken wichtige Instrumentarien als Anregungsquellen zur qualitativen und halbquantitativen Analyse von Feststoffen dar. Es wurden verschiedene Anordnungen mit zwei oder drei Elektroden aus Kohle oder einem anderen elektrisch leitenden Material entwickelt, zwischen denen manchmal ein Inertgas (meist Ar) strömte, welches durch eine elektrische Entladung (Stromfluss zwischen den Elektroden) ionisiert wurde. Feststoffe, die direkt zwischen die Elektroden eingebracht werden konnten oder sich auf der Oberfläche einer Elektroden befanden, wurden so atomisiert und die Atome zur Strahlungsemission angeregt.

Charakteristisch für den elektrischen Lichtbogen ist eine hohe Stromstärke (üblicherweise > 5 A) bei relativ

geringer Spannung ($< 100\text{ V}$). Es wurden Gleich- und Wechselstrombögen angewandt. Der Bogen wird gezündet, indem die beiden Elektroden kurzzeitig kurzgeschlossen werden, um anschließend beim Entfernen einen Lichtbogen, geleitet von einem Plasma, zu erzeugen. Bogenspektren bestehen hauptsächlich aus den Spektrallinien neutraler Atome. Der elektrische Funken hingegen ist durch eine sehr hohe Spannung charakterisiert, die für den Funkenüberschlag verantwortlich ist, verbunden mit eher moderaten Stromstärken ($< 1\text{ A}$). Funkenspektren zeichnen sich durch die Spektrallinien positiver Ionen aus. Je nach Ionisierungsgrad spricht man auch vom „ersten“, „zweiten“, „dritten“ Funkenspektrum usw. (vgl. spektroskopischer Verschiebungssatz, Abschnitt 4.2).

Bei einer spektroskopischen Bogenanregung kommt es wegen der hohen Stromstärke zu einer starken Erwärmung der Elektroden. Dies fördert die Verdampfung von schwerschmelzbarem Material, führt aber bei leichter flüchtigen Elementen zu einer fraktionierten Verdampfung, d. h. die leichter verdampfbaren Elemente „destillieren“ aus dem Probenraum heraus und sind daher nur zu Beginn spektroskopisch nachweisbar. Für die leichter verdampfbaren Elemente wurde daher bevorzugt die Funkenanregung gewählt. Auch mit unterbrochenen Bögen oder Kombinationen aus Funken- und Bogenanregung oder auch mit Hochspannungsbögen wurde analytisch und matrixabhängig gearbeitet.

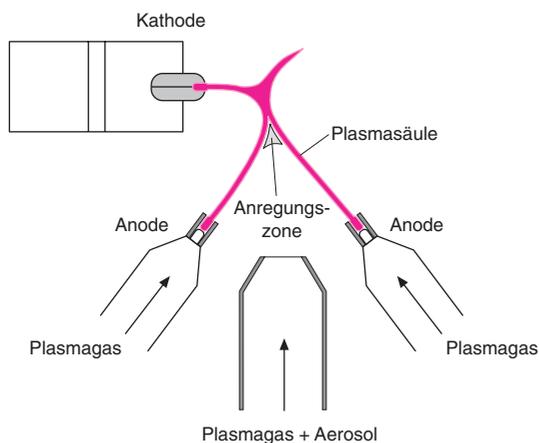
Leider waren alle Methoden, eine bestimmte Probenmenge reproduzierbar in eine solche Anregungsquelle zu bringen, wenig erfolgreich. Quantitatives Arbeiten mit solchen Anregungsquellen, die des öfteren auch mehr oder weniger „flackerten“, waren eigentlich nur mittels der integrierenden Auswertung über Photoplatten oder -filme möglich. Der Bezug auf einen zugesetzten, in der

Probe nicht vorhandenen inneren Standard war hier ein Muss. Durch Bezug des Analytsignals auf dieses Standardsignal wollte man die schwankenden Anregungsbedingungen kompensieren. Weiterentwicklungen der klassischen Spektralanalyse zwischen zwei Elektroden führten zu einem Drei-Elektroden-Gleichstromplasma, bei dem die Probelösung direkt in das Plasmazentrum „eingespritzt“ wurde. Modernere Ausführungen verwenden zwei Graphitanoden und eine Wolframkathode, mit deren Hilfe eine im Vergleich zur Zweielektrodenanordnung stabilere Bogenentladung zustande kommt. Dieses Plasma und auch alternative Ausführungsformen finden jedoch heute nur vereinzelt Anwendung. Die extrem kleine Anregungsregion erweist sich als problematisch für Multielementanalysen. Abbildung 4.39 zeigt eine schematische Darstellung eines Gleichstromplasmas, das mit Spannungen von $70\text{--}80\text{ V}$ und einer Stromstärke von jeweils 7 A betrieben wird.

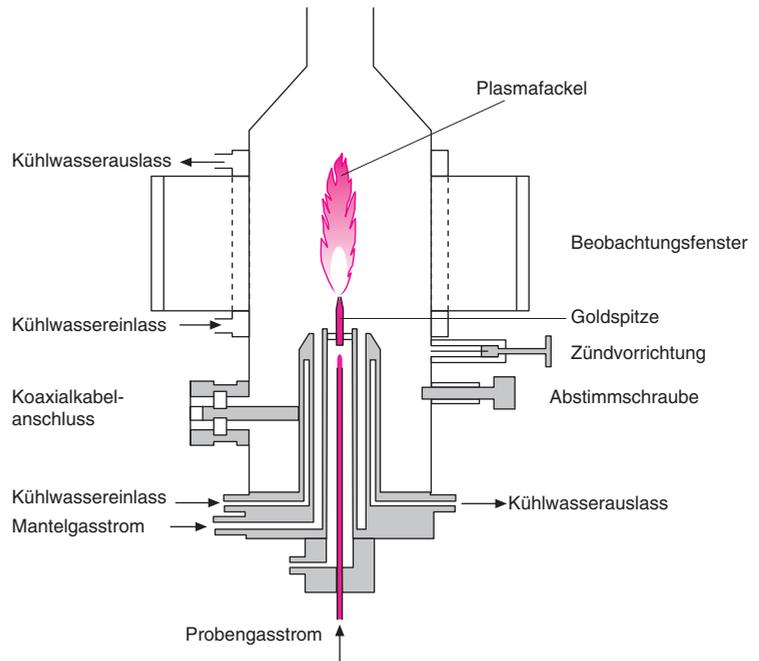
Kapazitiv gekoppelte Plasmen (CMP)

Kapazitiv gekoppelte Plasmen (engl. *capacitively coupled (microwave) plasma* – CC(M)P oder CMP) wurden bereits 1941 erstmals beschrieben. Die Funktionsweise basiert auf der Erzeugung von Mikrowellen ($2,45\text{ GHz}$) durch ein Magnetron mit einer Leistung von $0,3\text{--}2\text{ kW}$, die durch einen Koaxial- oder Rechteckhohlleiter zu einer Elektrodenspitze geführt werden, die sich in einem metallischen Rohr befindet. Betrachtet man die Elektrodenspitze, die im Prinzip das Ende des Innenleiters des Koaxialleiters bildet, und die Rohrwandung als elektrischen Kondensator, so kann man von kapazitiver Einkoppelung der Mikrowellenenergie sprechen. An der feinen Spitze der zentralen Elektrode aus Gold oder Tantal entlädt sich die Mikrowellenenergie, sodass ein vorbeiströmendes Gas (Plasmagas) ionisiert werden und entsprechend ein Plasma durch das hochfrequente Feld aufrechterhalten werden kann, welches sich zwischen Elektrodenspitze und äußerem Rohr bildet. Oberhalb der Elektrodenspitze „brennt“ eine Plasmafackel als stromführendes Plasma mit einer Höhe bis zu 3 cm . Abbildung 4.40 zeigt schematisch einen solchen Aufbau.

Die Anregungstemperaturen in einem CMP liegen bei $5000\text{--}9000\text{ K}$, die Gastemperaturen bei $3000\text{--}5000\text{ K}$. Ein entscheidender Nachteil des CMP besteht darin, dass die Elektrode mit dem Plasma sowie mit der Probe in Kontakt kommt. Darüber hinaus neigt die innere Rohrwandung dazu, zu korrodieren. Es ergeben sich Memory-Effekte z. B. durch Amalgambildung bei Goldelektroden oder Wiederverflüchtigungen niedergeschlagener Ablagerungen an den Wandungen. In der Routineanalytik konnte sich dieser Plasmotyp daher nie durchsetzen, obwohl einige Applikationen ihm gute Einsetzbarkeit bezeugten. Prinzipiell ist das CMP besser für



4.39 Schematischer Aufbau einer Dreielektroden-Gleichstromplasmaquelle (DCP).



4.40 Schematischer Querschnitt durch eine kapazitiv gekoppelte Mikrowellenplasmaquelle (CPM).

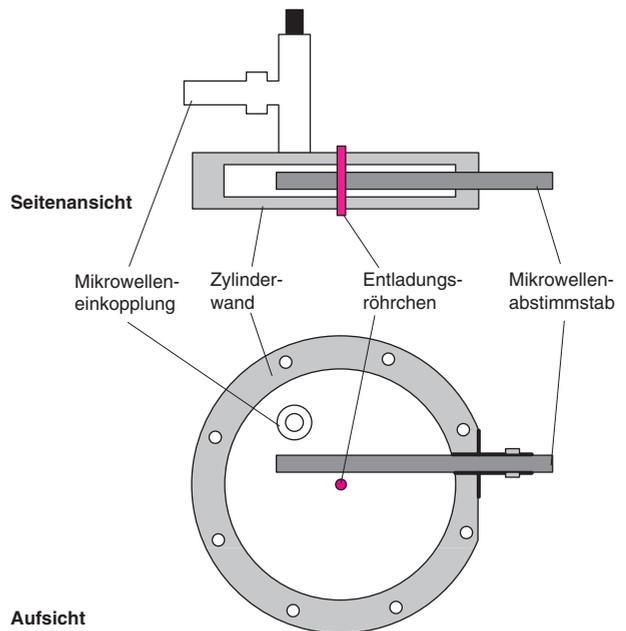
gasförmige Proben als für Aerosole geeignet. Als Atomemissionsdetektor in der Gaschromatographie bzw. Gasanalytik verträgt dieses Plasma beispielsweise eine erheblich höhere Fremdgaskonzentration als das im Folgenden beschriebene Mikrowellenplasma.

Mikrowelleninduzierte Plasmen (MIP)

Mikrowelleninduzierte Plasmen (engl. *microwave induced plasma* – (MIP) werden wie das CMP von Mikrowellen (2,45 GHz), erzeugt durch ein Magnetron, unterhalten. Allerdings werden die Mikrowellen mit einer wesentlich niedrigeren Leistung (50 – 200 W) in einen speziell geformten Hohlraumresonator (engl. *cavity*) eingekoppelt, in dem, bedingt durch die inneren Abmessungen eine stehende Welle entsteht. Bei 2,45 GHz liegt die Wellenlänge beispielsweise bei 12,2 cm. Im Zentrum eines Resonators mit einem Durchmesser von 12,2 cm existiert die höchste Energiedichte aller zirkular stehenden Wellen. An dieser Stelle ist ein Keramik-, Quarz- oder Bornitridröhrchen plaziert, durch das das Plasmagas (He oder Ar) strömt. Eine weit verbreitete Ausführung, deren Aufbau in Abbildung 4.41 wiedergegeben ist, ist die sog. TM_{010} -Cavity nach Beenakker. Sie zeichnet sich bei Verwendung von Helium unter Normaldruck als Plasmagas als effiziente und in ihren Abmessungen eher kleine Anregungsquelle für Metalle sowie Nichtmetalle aus.

Nachteilig bei diesem miniaturisierten Plasmatyp (Plasma ca. $< 1 \text{ cm}^3$) ist die geringe Lösungsmitteltoleranz. Das Plasma wird durch Flüssigkeitseintrag stark

beeinträchtigt und kann sogar erlöschen, sodass das Hauptanwendungsgebiet in der Verwendung als elementselektiver Detektor für die Gaschromatographie liegt. Eine kommerzielle Umsetzung mit entsprechenden Modifikationen wurde von der Fa. Hewlett-Packard im Atom-Emissions-Detektor (AED) durchgeführt.



4.41 Schematische Darstellung einer mikrowelleninduzierten Plasmaquelle (MIP) nach Beenakker.

matographie aufgrund der dort auftretenden Kapillarkräfte. Die moderne Analytik bedient sich heute einer großen Zahl gasförmiger, überkritischer und flüssiger mobiler Phasen, deren Anwendungsmöglichkeiten in den entsprechenden Abschnitten explizit behandelt werden. In Tabelle 6.1 sind beispielhaft nur einige wenige Stoffe aufgeführt, die in der Praxis eingesetzt werden.

Tabelle 6.1 Beispiele für mobile Phasen in der Chromatographie.

Verfahren	mobile Phase
GC	H ₂ , He, N ₂
SFC	CO ₂ , N ₂ O, SF ₆ , NH ₃ , n-Butan
LC	Acetonitril, Wasser, Methanol, Tetrahydrofuran, Pentan, Diethylether, Toluol, Chloroform, Ethanol

Die mobile Phase wird in Abhängigkeit vom chromatographischen Verfahren unterschiedlich benannt: In der GC spricht man vom Trägergas, während man in der Säulenflüssigchromatographie den Begriff Eluent und in der TLC den Ausdruck Fließmittel verwendet.

6.1.4 Der Retentionsvorgang

Während die mobile Phase das Bett der stationären Phase durchströmt, trägt sie die einzelnen Komponenten des zu trennenden Substanzgemisches mit sich (Abbildung 6.2).

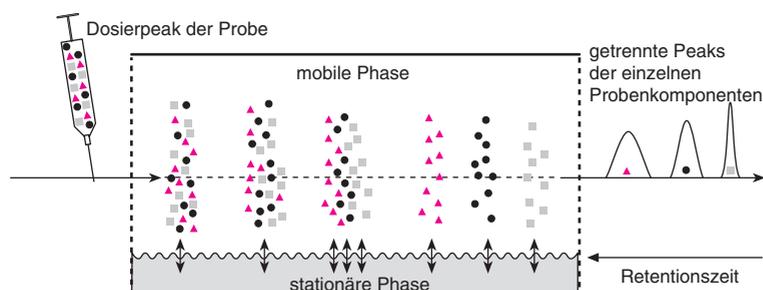
Im Gegensatz zum Eluenten, der, nachdem die stationäre Phase einmal mit diesem gesättigt ist, ohne jegliche Verzögerung aus der Säule eluiert wird, unterliegen die zu separierenden Verbindungen einer oder mehreren reversiblen Gleichgewichtseinstellungen zwischen der mobilen und der stationären Phase. Dies führt dazu, dass sich die Analytmoleküle zeitweise in oder an der stationären Phase aufhalten. Als Folge hiervon werden sie nun

nicht mehr mit der Geschwindigkeit des Eluenten sondern deutlich langsamer in Richtung des Säulenausganges transportiert – die einzelnen Substanzen werden retardiert. Da die zu trennenden Verbindungen in der Regel verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften besitzen, ist die Stärke der Wechselwirkungen mit der stationären Phase unterschiedlich. Während einzelne Komponenten des Gemisches nur schwach mit der stationären Phase wechselwirken und damit nur wenig retardiert werden, ist die Retention für andere Analyten um so größer. Im Idealfall unterscheiden sich die Wechselwirkungen der verschiedenen Substanzen in einem solchen Maße, dass während der Wanderung durch die Säule eine vollständige Auftrennung in einzelne Banden stattfindet (Abb. 6.2). Verbindungen, die eine geringe Verzögerung erfahren, werden zuerst eluiert und gelangen dann in den Detektor. Komponenten, die stark retardiert werden, erzeugen dementsprechend erst später ein Signal. Den getrennten Analyten können so individuelle Retentionszeiten zugeordnet werden. Man sollte beachten, dass es sich hierbei jedoch nicht um Stoffkonstanten sondern um geräteabhängige Größen handelt.

Chromatographische Verfahren lassen sich anhand der jeweils zu Grunde liegenden Retentionsmechanismen klassifizieren. Dabei ist zu beachten, dass nur sehr selten ein einzelner Mechanismus für die Stofftrennung verantwortlich ist; fast immer beeinflussen mehrere Faktoren die Leistung der verwendeten Methoden. Verteilungsgleichgewichte spielen hierbei eine herausragende Rolle. Für einen Analyten in einem Trennsystem lässt sich das folgende dynamische Gleichgewicht formulieren:



Hierbei ist A_M der Analyt in der mobilen und A_S der Analyt in der stationären Phase. Gemäß dem Nernst'schen Verteilungssatz ist das Verhältnis der Konzentrationen eines Stoffes in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen bei gegebener Temperatur eine Konstante. Somit lässt sich für jede Komponente eines zu separierenden Gemisches eine *Verteilungskonstante* K_C



6.2 Trennung eines Substanzgemisches aufgrund der unterschiedlichen Retention einzelner Analyten während des Transportes durch das chromatographische Bett.

(oft auch Verteilungskoeffizient genannt) angeben:

$$K_C = \frac{c_S}{c_M} \quad (6.1)$$

Mit c_S wird hier die Konzentration des Analyten in der stationären und mit c_M seine Konzentration in der mobilen Phase bezeichnet. Sind nun die Verteilungskonstanten der Analyten hinreichend verschieden, führt der chromatographische Prozess zu einer Auftrennung der einzelnen Verbindungen. Bei der Verteilungschromatographie beruht die Trennung somit auf Differenzen der Löslichkeiten der Probenkomponenten in der stationären und der mobilen Phase.

Ein weiterer Retentionsmechanismus in der Chromatographie beruht auf der Adsorption der Analyten an einer festen stationären Phase. Auch hier liegt wieder ein dynamisches Gleichgewicht vor. Während des Transportes zum Säulenausgang wechseln die Substanzmoleküle reversibel von der mobilen Phase an die Oberfläche des Sorbens und zurück in die mobile Phase. Wegen der abweichenden Adsorptionsaffinitäten der Einzelverbindungen werden diese unterschiedlich lange retardiert und unter idealen Bedingungen vollständig getrennt.

Basiert das Trennprinzip eines chromatographischen Verfahrens im Wesentlichen auf dem Ausschluss der Analyten vom Inneren der porösen stationären Phase, so spricht man von Ausschlusschromatographie. Der Vorgang der Retention lässt sich mit der Wirkungsweise eines Filters oder eines Siebes vergleichen. Als Ausschlusskriterien können Faktoren wie Größe, Form oder Ladung bestimmend sein.

Zum Schluss seien hier noch zwei Retentionsmechanismen genannt, die nur für eine sehr begrenzte Zahl von Analyten bedeutsam sind und selten in Kombination mit den drei bisher genannten Mechanismen auftreten.

In der Ionenaustauschchromatographie wird die unterschiedliche Austauschaffinität einzelner Ionen zu den aktiven Zentren der stationären Phase (Ionenaustauscherharze) für die Trennung ausgenutzt. Auch hier liegt beim Transport durch das chromatographische Bett wieder ein dynamisches Gleichgewicht vor.

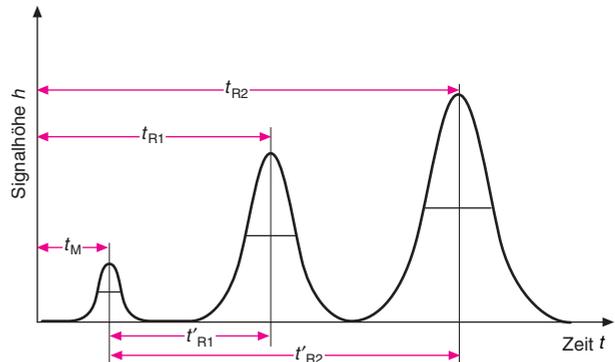
Der Retentionsmechanismus der Affinitätschromatographie beruht auf der hohen Selektivität von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen. Man kann sich die Trennung hier anschaulich vorstellen, geht man modellhaft von einem Schlüssel-Schloss-Mechanismus aus. Den auf der Oberfläche der stationären Phase immobilisierten Rezeptoren lässt sich die Rolle des Schlosses und den Analytmolekülen die des Schlüssels (oder auch umgekehrt) zuweisen. Ein Schlüssel kann nun nicht oder exakt zu dem vorhandenen Schloss passen. In der Praxis

bedeutet dies, dass die einzelnen Probenkomponenten verschieden stark retardiert werden und somit eine Trennung der Substanzen erreicht werden kann. Vielfach werden die Substanzen auch gar nicht mehr eluiert, sondern müssen mit speziellen Eluentien nach dem chromatographischen Prozess von der stationären Phase gewaschen werden.

6.1.5 Wichtige Parameter

Das Chromatogramm

Die Dokumentation einer chromatographischen Trennung erfolgt in der Regel dadurch, dass man das Detektorsignal gegen die Zeit aufträgt. Die hierbei erhaltene grafische Darstellung wird als Chromatogramm bezeichnet. In Abhängigkeit von der Art des Detektors erhält man nun entweder die differentielle oder die integrale Form eines Chromatogramms. Hierbei ist jedoch nur die differentielle Auftragung von Bedeutung, bei der man für die getrennten Analyten Signale in Form einer Gaußkurve erhält – sie werden als *Peaks* bezeichnet (Abb. 6.3).



6.3 Differentielle Auftragung eines Chromatogramms mit der charakteristischen gaußförmigen Signalform; (t_M = Durchflusszeit, t_{Ri} = Retentionszeit der Komponente i , t'_{Ri} = reduzierte Retentionszeit der Komponente i).

Im Gegensatz hierzu liefern integral arbeitende Detektorsysteme stufenförmige Signale.

Aussagen eines Chromatogramms

Chromatogramme liefern qualitative und quantitative Informationen über die getrennten Komponenten eines Gemisches. Zur Quantifizierung können sowohl die Peakflächen als auch die Peakhöhen herangezogen werden. Beide Parameter sind proportional zur Konzentration der Analyten in der Probe. Kommt es aufgrund der Schwan-

kung eines Parameters wie z. B. der Temperatur oder der Geschwindigkeit der mobilen Phase zu bandenverbreiternden Effekten, wie sie später in Abschnitt 6.1.6 diskutiert werden, so bleibt zwar die Fläche eines Peaks konstant, seine Höhe nimmt jedoch ab. Wegen dieser Abweichungen wird eine Quantifizierung in der Regel nur anhand der Peakflächen durchgeführt.

Retentionszeiten und Lineargeschwindigkeiten

Die Retentionszeit t_R , die am Peakmaximum bestimmt wird (Abb. 6.3), kann bei der Identifizierung eines Analyten genutzt werden. Dies geschieht meist durch den Vergleich mit Standardsubstanzen, deren Retentionszeiten in dem gegebenen Trennsystem bekannt sind. Die Zeit, die das Trägergas in der GC oder der Eluent in der LC benötigt, um vom Injektor zum Detektor zu gelangen, wird als Durchflusszeit t_M (früher Totzeit) bezeichnet. Da die mobile Phase in der Regel kein Signal erzeugt, werden zur Bestimmung der Durchflusszeit so genannte Inertsubstanzen injiziert. Diese unterliegen während ihres Transportes durch das chromatographische Bett keinerlei retardierenden Gleichgewichten und wandern so mit der Lineargeschwindigkeit u der mobilen Phase. Sie kann aus der Länge der Trennsäule L und der Durchflusszeit ermittelt werden:

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (6.2)$$

In der Gaschromatographie ändert sich die Lineargeschwindigkeit entlang der Säulenachse. Ursache hierfür ist die Kompressibilität der Gase. Deshalb spricht man in diesem Fall von der mittleren Lineargeschwindigkeit.

Die um die Durchflusszeit t_M verminderte Retentionszeit t'_R eines Analyten wird als reduzierte Retentionszeit bezeichnet:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (6.3)$$

Während t'_R in der Theorie der GC mit einem Kompressionskorrekturfaktor j multipliziert werden muss, um so die Nettoretentionszeit t_N zu erhalten, sind die beiden Größen in der Flüssigchromatographie identisch:

$$t_N = j \cdot t'_R \quad (\text{GC}) \quad (6.4)$$

$$t_N = t'_R \quad (\text{LC}) \quad (6.5)$$

Der Retentionsfaktor k

Der Retentionsfaktor k wird in der älteren Literatur zu meist Kapazitätsfaktor k' genannt. Man sollte sich unbedingt beide Ausdrücke merken, um so Verständnispro-

bleme beim Studium weiterführender Lehrbücher zum Thema Chromatographie zu vermeiden.

Dieser Parameter ist ein Maß dafür, um wie viel länger sich die Probenmoleküle an oder in der stationären Phase als in der mobilen Phase aufhalten. Der Retentionsfaktor lässt sich mit der folgenden Beziehung einfach berechnen:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (6.6)$$

Als Verhältnis zweier Zeiten ist k eine dimensionslose Größe. Für ideale Trennungen werden Retentionsfaktoren zwischen 1 und 5 angestrebt. Ist k deutlich kleiner als 1, eluieren diese Verbindungen so schnell, dass eine genaue Bestimmung der Retentionszeiten schwierig wird. In diesen Fällen ist der Einfluss der Bedingungen außerhalb der Säule (*Extra-Column-Effects*, vgl. Abschnitt 6.1.6) auf die verschiedenen Peakparameter besonders groß. Bei Werten größer als 20 werden die Elutionszeiten im Allgemeinen sehr lang.

Der Trennfaktor α

Der Trennfaktor α gibt die relative Retention zweier benachbarter Peaks an. Er ist ebenfalls eine dimensionslose chromatographische Variable. Definitiongemäß ist α immer größer oder gleich 1.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} \quad (6.7)$$

Bei $\alpha = 1$ coeluierten die beiden betrachteten Analyten, das heißt, sie erscheinen ungetrennt am Säulenausgang. Der Trennfaktor wird in vielen Publikationen zum Thema Chromatographie auch als Selektivität bezeichnet. Dieser Ausdruck ist aber nur sinnvoll, wenn man die Trenneigenschaften verschiedener stationärer Phasen für ein definiertes Substanzpaar miteinander vergleichen möchte.

Das Phasenverhältnis β

Als Phasenverhältnis β bezeichnet man in der Chromatographie das Volumenverhältnis der mobilen zur stationären Phase. Insbesondere in der Kapillar-GC ist β ein geeigneter Parameter, um Säulen unterschiedlicher Dimensionen zu vergleichen. Das Phasenverhältnis wird wie folgt berechnet:

$$\text{GC: } \beta = \frac{V_G}{V_S} = \frac{d_c}{4d_f} \quad (6.8)$$

$$LC: \quad \beta = \frac{V_M}{V_S} \quad (6.9)$$

- V_G = Volumen der Gasphase
- V_S = Volumen der stationären Phase
- V_M = Durchflussvolumen
- d_c = Innendurchmesser der Kapillarsäule
- d_f = Filmdicke der stationären Phase

Je kleiner der Wert für β ist, desto größer ist der Anteil der stationären Phase am Volumen der Trennsäule. Die Retention der Analyten wird so erhöht. Die Kenntnis des Phasenverhältnisses ist besonders bei der Auswahl einer GC-Kapillarsäule für ein gegebenes analytisches Trennproblem eine wichtige Entscheidungshilfe (Abschnitt 6.3.2).

6.1.6 Peakform und Peakverbreiterung

Peakparameter und daraus ableitbare Größen

Unter der Voraussetzung, dass man einen differentiell arbeitenden Detektor einsetzt, haben die bei allen chromatographischen Verfahren auftretenden Peaks annähernd die Form einer Gaußfunktion (Abb. 6.4).

Diese kann mathematisch wie folgt formuliert werden:

$$y = y_0 \cdot e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad (6.10)$$

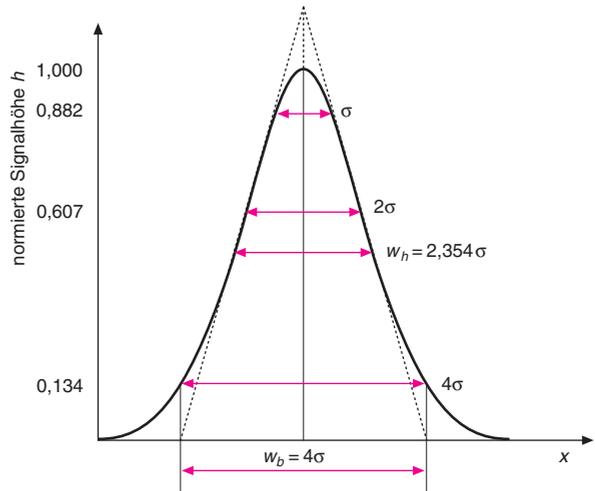
- y = Peakhöhe an jeder beliebigen Stelle des Peaks
- y_0 = Höhe am Peakmaximum
- x = Abstand von der Ordinate (hierbei gilt: für $x = 0$ ist $y = y_0$)
- σ = Standardabweichung der Verteilung
- σ^2 = Varianz der Verteilung

An einem Peak lassen sich drei verschiedene Peakbreiten ablesen. Der Abstand, den die Schnittpunkte der Wendetangenten mit der Grundlinie bilden, wird auch als Basisbreite w_b bezeichnet. Sie steht mit der Standardabweichung σ in folgendem Zusammenhang:

$$w_b = 4 \cdot \sigma \quad (6.11)$$

Die Peakbreite in halber Peakhöhe w_h wird oftmals irreführend auch Halbwertsbreite genannt. Man sollte diesen Ausdruck möglichst nicht mehr verwenden. Für w_h gilt die folgende Beziehung:

$$w_h = 2 \cdot \sigma \cdot \sqrt{2 \cdot \ln 2} = 2,354 \cdot \sigma \quad (6.12)$$



6.4 Idealer gaußförmiger Peak und daraus ableitbare Parameter; (w_b = Basisbreite, w_h = Peakbreite in halber Peakhöhe, σ = Standardabweichung).

Da w_h ohne größeren Aufwand zu ermitteln ist, wird dieser Peakparameter in der Regel zur Berechnung von σ herangezogen.

Bei 60,7% der maximalen Peakhöhe wird die Peakbreite w_i zwischen den beiden Wendepunkten bestimmt:

$$w_i = 2 \cdot \sigma \quad (6.13)$$

Man sollte hier jedoch immer beachten, dass diese drei Möglichkeiten zur Berechnung des Wertes für die Standardabweichung σ nur gelten, wenn die jeweiligen Peaks nicht signifikant von einem gaußförmigen Funktionsverlauf abweichen.

In der Praxis kommt es häufig vor, dass Peaks eine deutlich erkennbare Asymmetrie aufweisen. Bei diesem asymmetrischen Verhalten unterscheidet man zwei Fälle: Ist der Anstieg des Signals flacher als der Abfall zurück auf die Basislinie, spricht man vom so genannten *Fronting*. Häufiger kommt es jedoch zum umgekehrten Fall, bei dem der Abfall auf die Grundlinie sehr viel flacher verläuft als der Anstieg des Peaks. Man bezeichnet dies dann als *Tailing*.

Anfang der 40er Jahre wurden von Martin und Syngue die ersten theoretischen Arbeiten zur Chromatographie verfasst. Von ihnen stammt das Konzept der theoretischen Böden, das lange Zeit als geeignetes Modell zur Erklärung des chromatographischen Prozesses galt. Mit der Bodentheorie schlugen Martin und Syngue vor, eine Trennsäule als Aneinanderreihung zahlreicher diskreter, schmaler Lagen aufzufassen, die sie theoretische Böden

nannten. Ähnlich wie bei der fraktionierten Destillation nahm man hierbei an, dass sich auf jedem Boden ein Gleichgewicht der Analyten zwischen der mobilen und der stationären Phase einstellt. Der Transport der zu trennenden Verbindungen durch das chromatographische Bett wurde dann als schrittweiser Übergang von im Gleichgewicht befindlicher mobiler Phase von einem Boden zum darauffolgenden beschrieben. Weil die Bodentheorie jedoch einige wesentliche Erscheinungen wie zum Beispiel die Peakverbreiterung nicht erklären konnte, ist sie inzwischen von anderen Konzepten weitgehend abgelöst worden. Dennoch gelten die Zahl der theoretischen Böden N und die damit einhergehende *Bodenhöhe* H auch heute noch als unverzichtbare Parameter zur Beschreibung der Effizienz einer chromatographischen Säule. Die beiden Größen sind durch die folgende Beziehung miteinander verknüpft:

$$H = \frac{L}{N} \quad (6.14)$$

Wie bereits erläutert wurde, kann die Standardabweichung σ aus der Peakbreite bei halber Höhe berechnet werden. Mit der bekannten Retentionszeit t_R eines Analytpeaks und der Varianz σ^2 ergibt sich für die Bodenzahl N ein einfacher Zusammenhang gemäß:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad (6.15)$$

Experimentell werden H und N anhand der Peakbreiten ermittelt. Durch Substitution von σ^2 lassen sich für die Berechnung von N die folgenden Gleichungen formulieren:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \quad (6.16)$$

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 \quad (6.17)$$

Neben der Bodenzahl N findet man in der Literatur auch sehr oft die effektive Bodenzahl N_{eff} . Durch die Einführung von N_{eff} werden früh eluierende Peaks, deren Bodenzahlen N sonst sehr groß erscheinen, angemessen berücksichtigt. Sie wird analog zu N ermittelt; allerdings wird die Retentionszeit t_R durch die reduzierte Retentionszeit ersetzt. Mit dem Retentionsfaktor k ergibt sich ein einfacher Zusammenhang zwischen N und N_{eff} :

$$N = N_{eff} \cdot \left(\frac{k+1}{k}\right)^2 = \left(\frac{t'_R}{\sigma}\right)^2 \cdot \left(\frac{k+1}{k}\right)^2 \quad (6.18)$$

Während sich die beiden Bodenzahlen bei kleinen k -Werten deutlich unterscheiden, nähern sie sich bei wachsenden Retentionsfaktoren asymptotisch.

In Tabelle 6.2 sind zum Vergleich die Bodenzahlen und -höhen von in der GC und der HPLC eingesetzten Säulen gegenübergestellt. Je größer dabei die Zahl der theoretischen Böden ist, desto mehr Gleichgewichtseinstellungen sind während der Wanderung entlang der Trennstrecke möglich und desto größer wird die Trennleistung. Da hier die absoluten Bodenzahlen pro Säule angegeben sind, könnte man voreilig zu dem Schluss kommen, dass die Gaschromatographie die Flüssigchromatographie in ihrer Effizienz bei weitem übertrifft. Berechnet man aber die Bodenzahlen pro Meter Säulenmaterial, und vergleicht man die Bodenhöhen, so wird die große Leistungsfähigkeit der HPLC ersichtlich.

Tabelle 6.2 Bodenzahlen und -höhen für gängige GC- und HPLC-Säulen.

Säulentyp	N (pro Säule)	H (mm)
<i>GC</i>		
gepackte Säulen, 1–3 m	500–2000	1–6
Kapillarsäulen, 25 m		
0,1 mm Innendurchmesser	30000–100000	0,2–0,6
0,5 mm Innendurchmesser	20000–50000	0,5–1,3
<i>HPLC</i>		
C18-RP-Phasen, 25 cm		
10 µm-Partikel	2500–5000	0,05–0,1
3 µm-Partikel	8000–18000	0,02–0,05
Kieselgel, 25 cm (10 µm-Partikel)	2500–5000	0,05–0,1

Sowohl die Zahl der theoretischen Böden als auch die Bodenhöhen werden in der Literatur und in Herstellerkatalogen gerne zur Demonstration der Effizienz einer Trennsäule angegeben. Man sollte beim Vergleich zweier Säulen jedoch immer darauf achten, ob die Werte für N und H bzw. N_{eff} und H_{eff} mit ein und demselben Analyten bestimmt wurden.

Peakverbreiternde Prozesse

Bei allen chromatographischen Verfahren, sei es in der GC, der HPLC oder der DC versucht man, möglichst scharfe Peaks zu erhalten. Hierdurch wird die Auswertung der Chromatogramme erleichtert und die Auflösung, die in Abschnitt 6.1.7 diskutiert wird, verbessert. Dabei ist insbesondere darauf zu achten, dass das zu trennende Substanzgemisch als schmale Bande auf die Trennsäule gelangt. Werden die Analyten bei der Probenaufgabe zu langsam injiziert, so resultiert daraus bereits vor der Säule eine breite Substanzzone. Diese vor-

gegebene Bandenverbreiterung kann durch den chromatographischen Prozess nicht rückgängig gemacht werden, sondern wird durch die im Folgenden diskutierten Mechanismen, die während der Wanderung durch die Säule auftreten, noch verstärkt. Die richtige Injektion erfordert bei allen Techniken Übung und Geschick. Bei großen Probendurchsätzen wird diese Aufgabe in der Regel automatisiert durchgeführt; hierbei erhält man eine gut reproduzierbare Startbandbreite.

Betrachten wir nun den Gang der Analyten durch das chromatographische Bett einer Trennsäule: Während ihrer Wanderung wechseln die einzelnen Moleküle einer Komponente ständig zwischen der mobilen und der stationären Phase. Die Zeit, die sie in einer der beiden Phasen verweilen, hängt im Wesentlichen davon ab, ob ihnen für den Phasenübergang zufällig genug Energie zur Verfügung steht. Dadurch können sich die Aufenthaltszeiten der Analytmoleküle einer Komponente in der stationären und der mobilen Phase deutlich voneinander unterscheiden. Für Moleküle, die sich länger in der mobilen Phase befinden, ergibt sich eine größere und für solche, die länger in der stationären Phase verweilen, eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit als für den Durchschnitt der Teilchen. Aufgrund dieser individuellen Zufallsprozesse resultiert eine symmetrische Verteilung der Geschwindigkeiten um einen Mittelwert. Im Chromatogramm äußert sich dieses Verhalten in der bekannten Peakform, die annähernd der einer Gaußfunktion entspricht. Bei der Wanderung der einzelnen Substanzzonen durch die Säule nimmt deren Breite im Fall einer isokratischen (LC) oder isothermen (GC) Trennung stetig zu, weil sich die Unterschiede in den Wanderungsgeschwindigkeiten mit fortschreitender Zeit zunehmend vergrößern – die Verteilung wird flacher. Je später ein Peak im Chromatogramm erscheint, das heißt, je größer der Retentionsfaktor k ist, desto breiter erscheint ein Peak. Die Bandenverbreiterung korreliert direkt mit der Aufenthaltszeit in der Säule und ist somit umgekehrt proportional zur Lineargeschwindigkeit u der mobilen Phase.

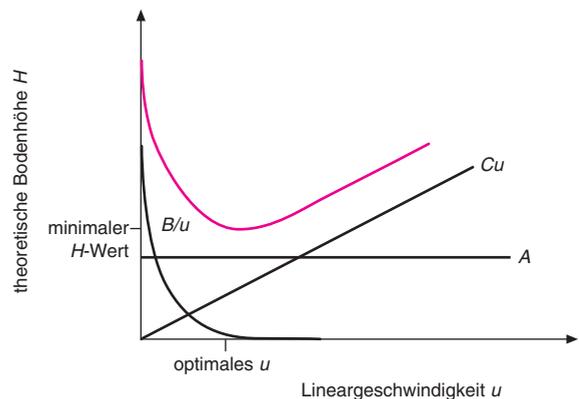
Mit der Variation der Lineargeschwindigkeit u lässt sich die Effizienz eines Trennsystems wesentlich beeinflussen. In den 50er Jahren wurde von den Niederländern van Deemter, Zuiderweg und Klinkenberg eine Gleichung formuliert, die einen quantitativen Zusammenhang zwischen der Bodenhöhe H und der Geschwindigkeit der mobilen Phase liefert. Sie ist heute als *van-Deemter-Gleichung* bekannt und findet sowohl in der GC als auch in der LC Anwendung:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \tag{6.19}$$

In dieser sehr allgemeinen Formulierung steht der Term A für den Beitrag, den die Eddy-Diffusion zur Bandenverbreiterung liefert. Der Anteil der Longitudinaldiffusion wird durch B beschrieben, während der C -Term die Verzögerung des Stoffaustausches zwischen mobiler und stationärer Phase berücksichtigt; $C \cdot u$ wird oft auch als Massentransfer- oder Massentransportterm bezeichnet. Die Mechanismen dieser einzelnen Beiträge zur Bandenverbreiterung werden im Folgenden noch detailliert diskutiert werden. Das klassische Modell von van Deemter ist heute in Teilen überholt, und in den letzten Jahrzehnten sind viele Modifikationen und Verbesserungen dieser Theorie publiziert worden, die zu erwähnen den Rahmen dieses Lehrbuches sprengen würde. Wegen ihrer didaktischen Klarheit ist die van-Deemter-Gleichung jedoch durchaus geeignet, Einsteigern ein einfaches theoretisches Werkzeug zur Optimierung der Effizienz einer Trennung an die Hand zu geben.

Der Kurvenverlauf der van-Deemter-Funktion ist in Abb. 6.5 qualitativ dargestellt.

Wie man sieht, erreicht die Bodenhöhe H bei einer optimalen Lineargeschwindigkeit u ihren minimalen Wert, das heißt, die Effizienz der Trennung erreicht hier ihren maximalen Wert. Bei einem gegebenen Trennsystem wird man somit stets versuchen, die Geschwindigkeit der mobilen Phase auf das Minimum der van-Deemter-Funktion einzustellen. Obwohl sich die Kurvenverläufe in der Gas- und der Flüssigchromatographie stark ähneln, bestehen aber einige quantitative Unterschiede. Während man für die Gaschromatographie van-Deemter-Kurven mit einem breiten Minimum beobachtet, erhält man in der Flüssigchromatographie meist sehr schmale Minima, deren zugehörige Lineargeschwindigkeiten deutlich kleiner sind als in der Gaschromatogra-



6.5 Beiträge der Eddy-Diffusion (A -Term), der Longitudinaldiffusion (B -Term) und der Stoffaustauschverzögerung (C -Term) zum Kurvenverlauf der van-Deemter-Funktion (rote Kurve).

Tabelle 6.3 Lineargeschwindigkeiten und Flussraten in der GC und der HPLC.

Technik	Lineargeschwindigkeit [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]		Flussrate [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]	
	Optimum	in der Praxis	Optimum	in der Praxis
<i>GC</i>				
4 mm Innendurchmesser (gepackte Säule)	2–4	4–8	40–50	40–80
0,25 mm Innendurchmesser (Kapillarsäule, Trägergas: H_2)	30–40	60–80	1–2	1–4
<i>HPLC</i>				
4,6 mm Innendurchmesser (gepackte Säule)	0,05–0,1	0,1–0,2	0,2–0,5	1–2

phie. Als Faustregel sollte man sich merken, dass die minimalen Bodenhöhen in der LC um etwa einen Faktor 10 kleiner sind als in der GC. Einen Überblick über die in der Praxis verwendeten Lineargeschwindigkeiten und die damit korrespondierenden Flussraten gibt Tabelle 6.3.

Eddy-Diffusion

Der A-Term der van-Deemter-Gleichung berücksichtigt die so genannte Eddy-Diffusion. Weil diese nur bei gepackten Säulen auftritt, kann man den Koeffizienten A in der Kapillargaschromatographie vollständig vernachlässigen. Wenn eine Substanzzone durch das chromatographische Bett transportiert wird, müssen die Moleküle die Partikel des Packungsmaterials umwandern. Hierbei legen die Analyten unterschiedliche Weglängen zurück (Abb. 6.6a).

Dieser Vorgang führt zu einer Bandenverbreiterung, deren Ausmaß von der Partikelgröße sowie der Homogenität und Dichte der Säulenpackung abhängt. Je kleiner und sphärischer die eingesetzten Partikel der stationären Phase sind, desto geringer ist der Effekt, den die Eddy-Diffusion auf die resultierende Peakbreite ausübt.

Longitudinaldiffusion

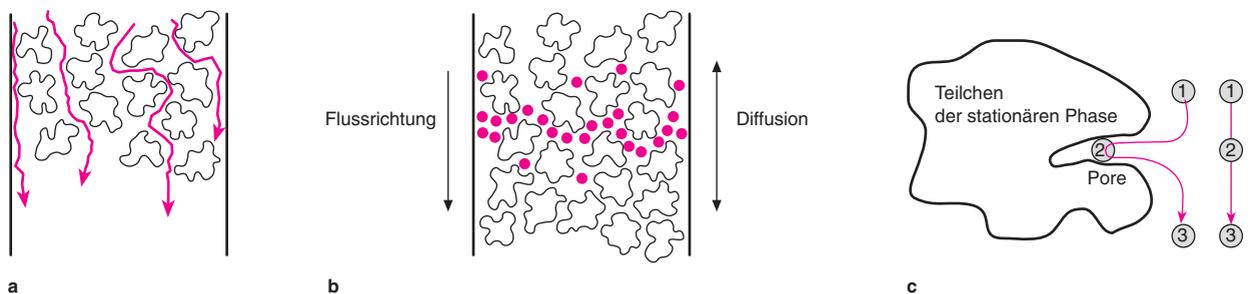
Die so genannte Longitudinaldiffusion wird durch den zweiten Term der van-Deemter-Beziehung ausgedrückt.

Sie beruht auf der zufälligen Molekularbewegung der Analyten in der mobilen Phase. Während sich letztere mit der Lineargeschwindigkeit u durch die Säule bewegt, diffundieren die Substanzmoleküle in alle Richtungen (Abb. 6.6b).

Die longitudinale Komponente dieser Diffusion, das heißt in Richtung der Säulenachse, führt wieder zu einem bandenverbreiternden Effekt. Der Betrag der Longitudinaldiffusion ist proportional zur Aufenthaltszeit der Probe in der Säule und zum Diffusionskoeffizienten D_M des Analyten in der mobilen Phase. In der Flüssigchromatographie kann der B-Term wegen der sehr kleinen D_M -Werte normalerweise vernachlässigt werden (Tab. 6.4). Dadurch kann es sogar vorkommen, dass das Minimum der van-Deemter-Funktion (vgl. Abb. 6.5) oft gar nicht beobachtet wird. Da die Diffusionskoeffizienten in Gasen bedeutend größer sind (Tab. 6.4), leistet die Longitudinaldiffusion in der Gaschromatographie insbe-

Tabelle 6.4 Betrag der Diffusionskoeffizienten in verschiedenen mobilen Phasen.

	Gas	Überkritisches Fluid	Flüssigkeit
Diffusionskoeffizient [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	10^{-1}	10^{-3} – 10^{-4}	$< 10^{-5}$

**6.6** a) Schematische Darstellung der Eddy-Diffusion b) Peakverbreiterung durch Longitudinaldiffusion c) Stoffaustauschverzögerung durch Porendiffusion.

Verzögerungsfaktor oder auch als R_F -Wert bezeichnet. Da der R_F -Wert in der Regel auf zwei Dezimalstellen genau angegeben wird, multipliziert man ihn oftmals mit dem Faktor 100 und erhält so den hR_F -Wert:

$$R_F = \frac{z_s}{z_f} \quad (6.32)$$

$$hR_F = 100 \cdot R_F \quad (6.33)$$

z_s = Entfernung des Probenflecks
(Fleckmittelpunkt) von der Startlinie
 z_f = Entfernung der Fließmittelfront
von der Startlinie.

Der Verzögerungsfaktor R_F ist eine dimensionslose Größe und ist stets kleiner als eins. Die wichtigsten Parameter, die R_F beeinflussen, sind die Schichtdicke der stationären Phase, die Temperatur, bei der die Trennung durchgeführt wird, die Sättigung des Kammervolumens mit den Lösemitteldämpfen der mobilen Phase und die Menge der aufgegebenen Probe. Der R_F -Wert eines Analyten lässt sich auch auf den einer Standardsubstanz beziehen, und man erhält so relative Retentionswerte:

$$R_{rel} = \frac{R_{F(i)}}{R_{F(st)}} \quad (6.34)$$

$R_{F(i)}$ = Verzögerungsfaktor einer bestimmten Komponente

$R_{F(st)}$ = Verzögerungsfaktor der Standard-
verbindung

In Analogie zu Gleichung 6.6 können auch für die Dünnschichtchromatographie Retentionsfaktoren k bestimmt werden:

$$k = \frac{z_f - z_s}{z_s} = \frac{1 - z_s/z_f}{z_s/z_f} = \frac{1 - R_F}{R_F} \quad (6.35)$$

Mit Hilfe der DC-Technik können auch ungefähre Bodenhöhen für eine gegebene stationäre Phase bestimmt werden. Mit der Strecke W , die ein Probefleck in Fließrichtung einnimmt, ergibt sich für die Zahl der theoretischen Böden N die folgende Beziehung:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{z_s}{W} \right)^2 \quad (6.36)$$

Die Höhe eines theoretischen Bodens folgt aus Gleichung 6.36:

$$H = \frac{z_s}{N} \quad (6.37)$$

Im Gegensatz zu GC und HPLC lässt sich die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase in der DC bei einem vorgegebenen chromatographischen System kaum variieren. Deshalb wird zur Erhöhung der Bodenzahl N meist die Teilchengröße der stationären Phase verringert.

Guter Start ist halb gewonnen

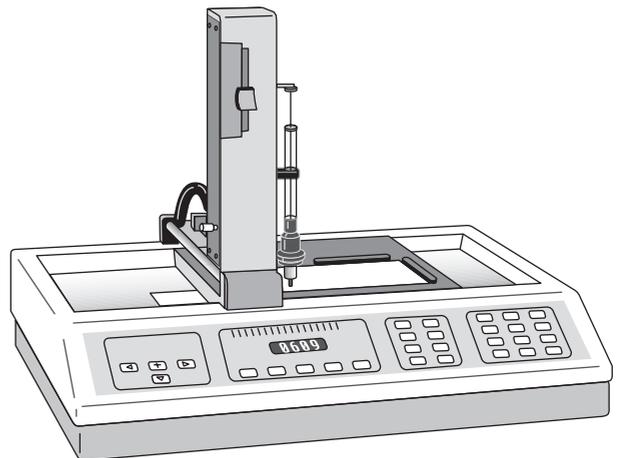
Die Probenaufgabe ist einer der wichtigsten Schritte bei allen dünn-schichtchromatographischen Techniken. Unsachgemäßes Arbeiten führt hier zu mangelhaften Chromatogrammen und somit zu einer erschwerten Auswertung. Hauptfehlerquellen sind zum einen das Aufbringen zu großer Substanzflecken aber auch das Überladen der Platte. Für die qualitative Analyse eines Gemisches, wie man sie zum Beispiel zur Reaktionskontrolle während einer chemischen Synthese durchführt, genügt in der Regel die manuelle Auftragung der Probe. Diese wird hierbei mithilfe einer Glaskapillare, die man sich leicht aus Pasteur-Pipetten selbst herstellen kann, oder einer Mikro-Pipette in Form einer verdünnten Lösung auf die DC-Platte aufgebracht. Die Startlinie sollte sich idealerweise in einem Abstand von 1,5 bis 2,0 cm von einer Kante der Platte befinden, sodass die Substanzflecken (Spots) bei der anschließenden Entwick-

lung in der DC-Kammer nicht in die mobile Phase eintauchen. Um eine möglichst kleine Startbandbreite vorzugeben, muss bei diesem Tüpfelvorgang darauf geachtet werden, dass der Durchmesser des entstehenden Substanzflecks sehr gering bleibt. Nach dem Auftragen der Proben, wird die Platte so lange getrocknet, bis das gesamte Lösemittel, in dem die Analyten gelöst waren, verdampft ist.

Heute bieten mehrere kommerzielle Anbieter eine Reihe von automatisierten Probenaufgabesystemen an, die sich wegen ihrer besseren Reproduzierbarkeit insbesondere für die quantitative Analytik eignen (Abb. 6.8).

Die gelöste Probe wird dabei meistens mit einer Mikroliter-Dosierspritze aufgezogen, die in das Gerät eingespannt ist. Die Dosierung kann variabel auf Volumina von 5 μL bis 100 μL eingestellt werden, die strichförmig oder als Spot sehr gleichmäßig auf die

in das System eingelegte Platte aufgetragen werden. Einige Hersteller bieten heute Geräte an, mit denen bis zu 20 verschiedene Proben simultan aufgetragen werden können. Im Gegensatz zur klassischen Dünnschichtchromatographie muss sich das Probenvolumen für die HPTLC im Nanoliterbereich bewegen, um so einen hinreichend kleinen Spot-Durchmesser ($< 1,5 \text{ mm}$) zu erhalten. Zu diesem Zweck sind ebenfalls verschiedene Verfahren wie der Gebrauch von Mikro-Spritzen, Dosimetern oder Sprühtechniken entwickelt worden. Mit handelsüblichen Probeaufgabesystemen für die HPTLC lassen sich Volumina im Bereich zwischen 100 nL und 200 nL dosieren.



6.8 Kommerziell erhältliches automatisiertes Probeaufgabesystem für die Dünnschichtchromatographie.

Entwicklung

Als Entwicklung bezeichnet man in der Dünnschichtchromatographie den Prozess, bei dem die mobile Phase durch das chromatographische Bett auf der DC- oder HPTLC-Platte strömt. Dieser Vorgang kann in verschiedener Weise durchgeführt werden; man unterscheidet hier im Wesentlichen zwischen linearer und radialer Entwicklung, wobei sich letztere in die zirkulare (zentrifugale) und die antizirkulare (zentripetale) Technik unterteilen lässt.

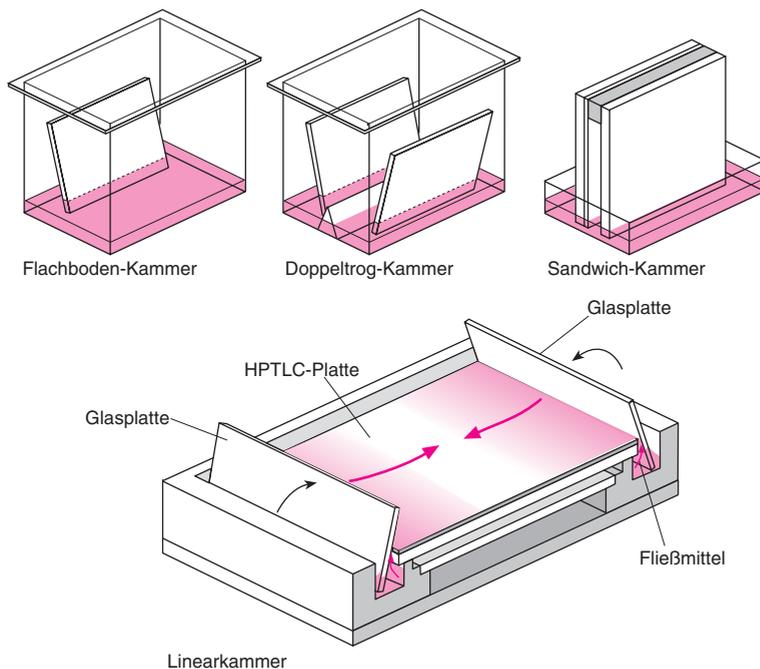
Am weitesten verbreitet ist die lineare Entwicklung, die mehrheitlich in aufsteigender Form durchgeführt wird. Hierbei werden die Substanzen als Flecken oder schmale Streifen auf die Startlinie gegeben.

Nach der Trocknung der Platte wird diese dann in eine der verschiedenen Entwicklungskammern (Abb. 6.9) gestellt (Flachbodenkammer, Doppeltrogkammer, Sandwichkammer) oder eingelegt (Linearkammer). Im Gegensatz zur Lineartechnik wird der DC-Platte das Fließmittel bei der zirkularen Entwicklung über einen Docht zugeführt, der sich in einer Bohrung in der Plattenmitte befindet. Die zu trennenden Spots sind kreisförmig um die Fließmittelzufuhr angebracht. Die mobile Phase strömt dann während der Entwicklung vom Kreismittepunkt (Docht) nach außen. Bei der Zirkulartechnik strömt das Lösungsmittel nicht nur vom Docht zum Plattenrand sondern auch senkrecht dazu. Dadurch werden die getrennten Spots quer zur Fließrichtung verbreitert und überlagern sich auch bei geringen Unterschieden in den Verzögerungsfaktoren R_f nicht. Bei der antizirkularen Entwicklung befinden sich die Substanzflecken auf einem äußeren Kreis; das Fließmittel wird hier von außen kreisförmig zugeführt und strömt nach innen. Durch

den Transport der mobilen Phase in Richtung des Kreismittepunktes wird die durch Querdiffusion auftretende Fleckenvergrößerung bei Analyten mit großen R_f -Werten verringert.

In einer Vielzahl von Fällen erhält man nach der Entwicklung der DC-Karte keine ausreichende Trennung des aufgegebenen Substanzgemisches. Verschiedene Methoden der Mehrfachentwicklung einer Platte können jedoch die Separation wesentlich verbessern:

1. Durch die wiederholte Entwicklung mit demselben Fließmittelgemisch in die gleiche Richtung soll die Trennung zweier benachbarter Peaks verbessert werden.
2. Durch die wiederholte Entwicklung mit verschiedenen Fließmittelgemischen in die gleiche Richtung lassen sich auf einer Platte Substanzen über einen breiten Polaritätsbereich trennen. Oftmals geht man hierbei so vor, dass man in einem ersten Entwicklungsschritt eine mobile Phase mit hoher Elutionskraft einsetzt und diese nur bis zur halben Plattenhöhe wandern lässt. Stark retardierende Substanzen werden dabei bereits gut separiert, während wenig retardierende Verbindungen mit der Fließmittelfront wandern. Nach der Trocknung der DC-Karte wird die Entwicklung mit einem Fließmittelgemisch niedriger Elutionskraft wiederholt. Diesmal wird die Karte jedoch vollständig entwickelt. Die während des ersten Laufes getrennten Spots verändern ihre Lage jetzt nur noch wenig, während die zuvor coeluiierenden Komponenten nun im Idealfall auf der zweiten Hälfte der DC-Karte getrennt werden. Diese Technik der Mehrfachentwicklung ist mit der Gradientenelution in der



6.9 Entwicklungskammern für die DC und die HPTLC.

HPLC vergleichbar (vgl. Abschnitt 6.2.3, Gradientenelution). Im Gegensatz zur HPLC ist die DC-Methode jedoch mit einem ungleich höheren Zeitaufwand verbunden.

Heute sind für diesen Entwicklungsmodus jedoch bereits automatisierte Systeme erhältlich. Mit so genannten AMD-(*automated multiple development*-)Geräten wird jedes Chromatogramm ähnlich wie oben beschrieben mehrfach in derselben Richtung entwickelt. Dabei führt jeder Einzellauf über eine größere Strecke als der vorangegangene Lauf. Mit jedem nachfolgenden Lauf wird die Elutionskraft der mobilen Phase automatisch herabgesetzt, sodass schließlich ein Stufengradient entsteht.

- Bei der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie wird die Platte in einem ersten Schritt mit einem Fließmittelgemisch komplett entwickelt. Nach der Trocknung wird die Karte um 90° gedreht. Nun wird mit einer veränderten mobilen Phase erneut ein Chromatogramm aufgenommen, wobei das Fließmittel jetzt senkrecht zur Trennstrecke des ersten Laufs wandert. Mit der 2D-DC lassen sich Mehrkomponentensysteme zunächst nach einer Gruppeneigenschaft trennen, während man in einem zweiten Lauf die separierten Gruppen weiter auflösen kann.

In der Praxis sucht man zumeist einen Kompromiss zwischen kurzen Analysenzeiten, die man mit der Einfachentwicklung problemlos erreichen kann, und einer ver-

besserten chromatographischen Auflösung, wie sie die Techniken der Mehrfachentwicklung bieten.

Detektion

Nach der Entwicklung und der Trocknung müssen die getrennten Substanzbanden auf der DC-Platte detektiert werden. Hierbei ist die direkte visuelle Auswertung in der Regel nicht geeignet, weil nur wenige Substanzklassen eine Eigenfärbung besitzen. Ausnahmen sind Pflanzenpigmente, Lebensmittelfarben und Farbstoffe. Wenn die Analyten fluoreszieren, wie z. B. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), Aflatoxine oder Riboflavin, können diese unter Einstrahlung der passenden Anregungswellenlänge lokalisiert werden. Wie bereits in Abschnitt 6.2.2 „Allgemeines“ erwähnt wurde, sind viele kommerziell erhältliche Platten für die Dünnschichtchromatographie mit UV-Indikatoren markiert, sodass Verbindungen mit geeigneten Absorptionsmaxima bei 254 nm oder 366 nm als dunkle Spots detektierbar werden.

Wenn die Analyten auf der Platte nicht direkt-spektroskopisch oder mithilfe der Markierung der stationären Phase lokalisierbar sind, kann die Plattenoberfläche chemisch derart behandelt werden, dass hieraus farbige oder fluoreszierende Substanzflecken resultieren. Die Reagenzien können dabei entweder als Sprühlösung in einem Zerstäuber oder in Form eines Tauchbades, das sich in speziellen Tauchkammern befindet, angewendet werden. Während man mit dem Einsatz von Tauchkammern eine sehr gleichmäßige Verteilung der Reagenzlösung

Tabelle 6.9 Universelle Sprühreagenzien für die DC.

	Zusammensetzung des Sprühreagenzes	Durchführung	Ergebnis
Schwefelsäure	konzentriert oder als 50%ige Lösung	sprühen, für einige Minuten auf 110–120°C erhitzen	braun-schwarze verkohlte Flecken
Schwefelsäure/ Essigsäureanhydrid	1 Teil Säure / 3 Teile Anhydrid	sprühen, für einige Minuten auf 110–120°C erhitzen	braun-schwarze verkohlte Flecken
Schwefelsäure/ Natriumdichromat	3 g Dichromat in 20 mL Wasser lösen, mit 10 mL konz. Schwefelsäure verdünnen	sprühen, erhitzen auf 110°C	braun-schwarze verkohlte Flecken
Schwefelsäure/ Salpetersäure	1 Teil Schwefelsäure/ 1 Teil Salpetersäure	sprühen, erhitzen auf 110°C	braun-schwarze verkohlte Flecken

erreicht, die insbesondere für die quantitative Analytik wichtig ist, wird die Sprühtechnik in der Mehrzahl der Fälle angewendet.

Es gibt einige Reagenzien, die sich allgemein zur Detektion organischer Verbindungen eignen. Hierbei werden zumeist Schwefelsäure oder deren Mischungen mit Essigsäureanhydrid, Natriumdichromat oder Salpetersäure verwendet (vgl. Tabelle 6.9). Nach dem Sprühvorgang werden die Analyten entweder sofort oder nach dem Erhitzen als braune bzw. schwarze verkohlte Flecken sichtbar. Die Verwendung dieser Sprühreagenzien bietet sich dann an, wenn eine Probe unbekannter Zusammensetzung mithilfe der DC getrennt wurde.

Im Gegensatz zu den universellen Reagenzien reagieren selektive Derivatisierungsreagenzien nur mit einer begrenzten Zahl verwendeter funktioneller Gruppen. Die Sprühlösungen zeigen dabei einen unterschiedlichen Grad an Selektivität. Aldehyde und Ketone werden zum Beispiel als orange-rote Spots lokalisiert, nachdem sie mit einer schwefelsauren 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung besprüht wurden. Saure und basische Analyten werden mithilfe von Säure-Base-Indikatoren wie etwa Bromkresolgrün (3',3'',5',5''-Tetrabrom-m-kresolsulfonphthalein) detektiert. Ninhydrin (2,2-Dihydroxy-1,3-dioxhydrinden) wird als selektives Reagenz für Amine und Aminosäuren eingesetzt. Reduzierende Verbindungen, z. B. Ascorbinsäure, zeigen mit diesem Reagenz aber ebenfalls eine Farbreaktion. Man sollte beim Einsatz von Derivatisierungsreagenzien in der Dünnschichtchromatographie immer die chemischen Hintergründe kennen, um Querempfindlichkeiten und Störungen richtig bewerten zu können. Einen kleinen Ausschnitt aus der Vielzahl der gängigen Derivatisierungsreagenzien gibt Tabelle 6.10.

Mit dem Einsatz von Derivatisierungsreagenzien ist immer eine chemische Umwandlung der zu untersuchenden Analyten verbunden. Solche so genannten destruktiven Methoden sind denkbar ungeeignet, wenn die ge-

trennten Verbindungen in einem weiteren Schritt wieder verwendet werden sollen; dies ist zum Beispiel in der präparativen DC der Fall. Eine verbreitete nicht-destruktive Methode ist die Lokalisierung der Substanzflecken mit Iod. Hierzu werden einige Iodkristalle in einen geschlossenen Behälter gegeben, wobei sich dieser bereits

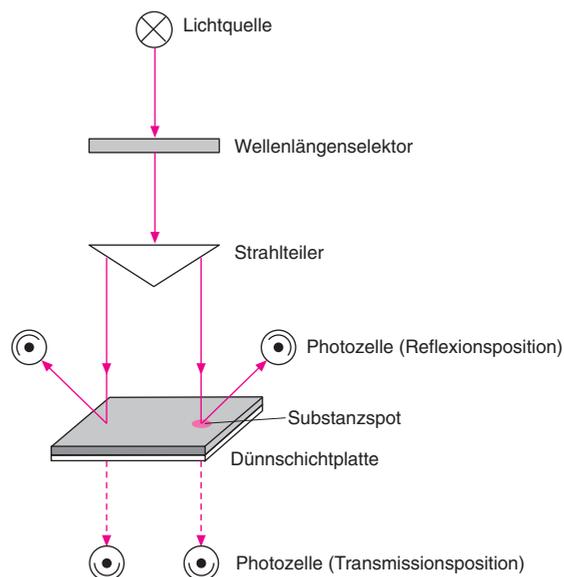
Tabelle 6.10 Selektive Derivatisierungsreagenzien für ausgewählte Verbindungsklassen.

Substanzklasse	Reagenz
Alkohole	1. 2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl 2. 4,4'-Methylen-bis-(N,N-dimethylanilin)
Aldehyde und Ketone	1. 2,4-Dinitrophenylhydrazin 2. 2,2'-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl 3. Hydrazinsulfat
Alkaloide	1. Bromkresolgrün 2. Cinnamylaldehyd / Säure 3. Dimethylaminobenzaldehyd
Amine, Amide	1. Alizarin 2. p-Dimethylaminobenzaldehyd 3. Pikrinsäure (Jaffe-Reagenz) 4. p-Chinon 5. Sulfanilsäure (Paulys Reagenz)
Aminosäuren, Peptide, Proteine	1. Dehydroascorbinsäure 2. N-Ethylmaleinimid 3. Fluoresceinamin 4. Ninhydrin
Barbiturate	1. Diethylamin / Kupfersulfat
Kohlenhydrate	1. 4-Amino-hippursäure 2. Aminophenol 3. p-Anisaldehyd 4. Benzidin 5. 3,5-Dinitrosalicylsäure 6. Hydroxylamin-hydrochlorid
Carbonsäuren	1. Glucose / Anilin (Schweppe-Reagenz) 2. Methylrot / Bromthymolblau 3. o-Phenylendiamin / Trichloressigsäure

bei Raumtemperatur genügend mit Ioddampf füllt. Die entwickelte DC-Karte wird nun in den Ioddampf gebracht. Das Iod löst sich in den Analytspots, die dann als braune Flecken unterschiedlicher Intensität auf einem blass gelb-braunen Hintergrund sichtbar werden. Mit Ausnahme einiger gesättigter Alkane werden auf diese Weise fast alle organischen Verbindungen durch Iod angefärbt. Der Vorteil hierbei ist, dass die Anfärbung reversibel ist. Nach dem Markieren der Substanzflecken kann das Iod wieder abgedampft werden.

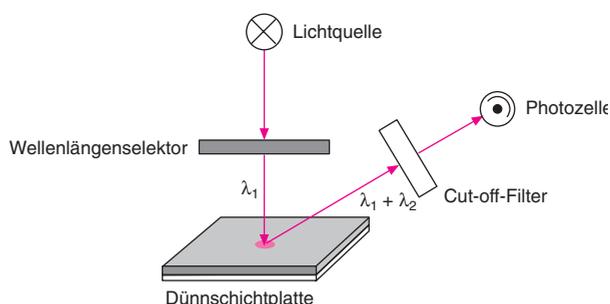
Kommerzielle Geräte für die quantitative Auswertung von DC-Chromatogrammen kamen erstmals 1967 auf den Markt. Die Entwicklung der modernen Dünnschichtchromatographie wurde wesentlich von den Fortschritten auf dem Gebiet der automatisierten Detektion geprägt. Ohne geeignete Hilfsmittel für die quantitative DC-Analytik wäre die hohe Auflösung, die sich mit der HPTLC erreichen lässt, nur von geringem Nutzen. Die visuelle Auswertung von entwickelten DC-Platten erreicht nur eine geringe Genauigkeit mit Fehlern im Bereich zwischen 10% und 30%; die Nachweisgrenzen liegen hier typischerweise im Mikrogrammbereich. In ähnlicher Weise sind die zeit- und arbeitsintensiven Methoden zu bewerten, bei denen die getrennten Analyten mechanisch von der stationären Phase gelöst und in einem anschließenden Schritt bestimmt werden. Darüber hinaus existieren kleine Glasapparaturen, mit deren Hilfe die Verbindungen gelöst und abgesaugt werden können. Die In-situ-Quantifizierungen mit optischen Scannern ist heute die sinnvollste Methode für alle modernen High-Performance Systeme. Zwar ist der Einsatz solcher DC-Scanner mit vergleichsweise hohen Anschaffungskosten verbunden; diese rentieren sich jedoch aufgrund des hohen Probendurchsatzes und der erzielten Präzision der Geräte schon nach kurzer Zeit.

Densitometer (Farbdichte-Messgeräte) für die quantitative Dünnschichtchromatographie bestehen aus einem Spektralphotometer, einer mechanischen Transportvorrichtung für die DC-Platte und der elektronischen Datenauswertung. Die Oberfläche der stationären Phase wird mit monochromatischem Licht bestrahlt. Ein Strahlteiler sorgt dafür, dass ein Teil des Strahles die eigentliche Trennstrecke, auf der sich die getrennten Analyten befinden, bestrahlt, während der Referenzstrahl substanzfreie Schicht abtastet (Abb. 6.10). Durch den Transport der Platte kann die gesamte Trennstrecke ausgewertet werden. Die photometrische Messung kann sowohl im Durchstrahlverfahren als auch im Reflexionsmodus erfolgen (Abb. 6.10). Die letztgenannte Methode wird auch als Remissionsmessung (Remission = diffuse Reflexion von Licht) bezeichnet. Während die substanzfreie Oberfläche der DC-Karte das aufgestrahlte Licht nahezu vollständig reflektiert, absorbieren die Substanz-



6.10 Schematischer Aufbau eines Densitometers mit der Möglichkeit zur Detektion im Reflexions- oder Transmissionsmodus.

flecken in Abhängigkeit von der Konzentration einen Teil der Strahlung, die hierdurch geschwächt wird. Voraussetzung hierfür ist natürlich, dass die eingestrahlte Wellenlänge mit einem Absorptionsmaximum der Analyten übereinstimmt. In der Datenauswertung wird dadurch ein Signal erzeugt, und man erhält so genannte Remissions-Orts-Kurven, die den Chromatogrammen der GC und der HPLC ähneln, mit dem Unterschied, dass die Zeit- durch eine Ortsachse ersetzt ist. Transmissionsmessungen lassen sich nur durchführen, wenn der Support für die stationäre Phase aus Glas besteht. Variationen in der Schichtdicke und Inhomogenitäten der Partikelgrößen beeinträchtigen das detektierte Signal jedoch wesentlich. Zudem ist der wählbare Wellenlängenbereich durch die Eigenabsorption des Glases stark eingeschränkt.



6.11 Aufbau eines Densitometers mit fluoreszenzspektroskopischer Detektion.

Abbildung 6.11 zeigt den Aufbau eines Densitometers für die fluoreszenzspektroskopische Auswertung einer DC-Platte.

Die Substanzspots werden mit einer geeigneten Anregungswellenlänge bestrahlt, und das emittierte Fluoreszenzlicht wird hinter einem Cut-off-Filter, der die Streustrahlung der Anregung ausblendet, von einer Photozelle detektiert. Wenn die Eigenfluoreszenz der Analyten nicht gemessen werden kann, bietet sich alternativ die Messung der Fluoreszenzlöschung (Quenching) auf markierten Platten an. Das Prinzip dieser Quenching-Technik wurde bereits in Abschnitt 6.2.2 „Allgemeines“ erläutert.

Neben diesen spektroskopischen Verfahren lassen sich isotoopenmarkierte Analyten auch mit Scannern, die mit Geiger-Müller-Zählrohren ausgerüstet sind, bestimmen. Der Vorteil dieser Detektionsmethode sind ein geringeres Grundsignal als bei der Fluoreszenz und daher sehr niedrige Nachweisgrenzen. Nachteilig ist der Umgang mit radioaktiven Substanzen, der in der Regel vermieden werden sollte, aber insbesondere bei einer Vielzahl medizinischer und biologischer Applikationen unumgänglich ist.

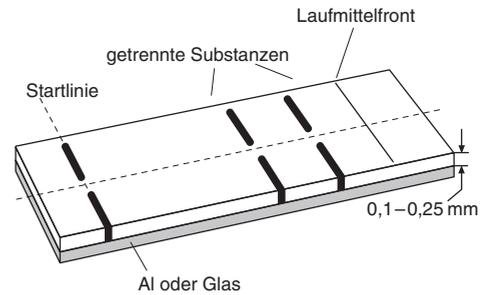
Anwendungen

Mit der modernen Dünnschichtchromatographie besitzt der Analytiker eine leistungsfähige Trenntechnik, die sich aufgrund ihrer niedrigen Kosten insbesondere für industrielle Laboratorien eignet. Im Gegensatz zu allen anderen chromatographischen Verfahren erlaubt die DC die simultane Trennung mehrerer Proben auf einer einzigen Platte und öffnet somit die Möglichkeit zu einem effizienten *High-Throughput-Screening*, das in den letzten Jahren insbesondere aufgrund der rasanten Entwicklungen auf dem Gebiet der kombinatorischen Chemie zunehmend an Bedeutung gewann. In der pharmazeutischen Industrie ist die Dünnschichtchromatographie das Mittel der Wahl bei der Analyse komplexer und verschmutzter Proben, die nur mäßige Detektionseigenschaften zeigen. Oftmals können Verunreinigungen schon allein dadurch entfernt werden, dass sie während der Entwicklung einer DC-Platte auf der stationären Phase adsorbiert bleiben und nicht mit der mobilen Phase transportiert werden. Die Probenvorbereitung für DC-Trennungen ist vielfach deutlich weniger umfangreich als bei anderen chromatographischen Verfahren, wo sie einen Großteil der Analysenzeit beansprucht. Typische Anwendungen der Dünnschichtchromatographie sind die Überprüfung der Chargenhomogenität pharmazeutischer Produkte oder die Reinheitskontrolle von Pflanzenextrakten (Phytopharmazeutika).

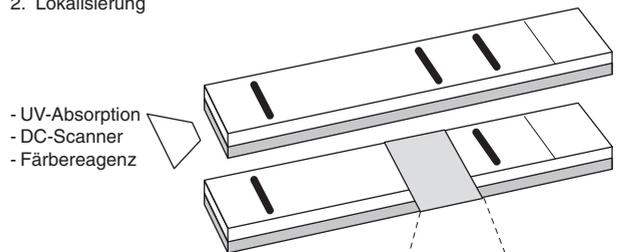
DC-Verfahren haben sich darüber hinaus in der Umweltanalytik etabliert. In Europa ist der Einsatz der AMD-DC-Technik als Screening-Methode zur Bestimmung

von Pflanzenschutzmitteln in Trinkwasser inzwischen ein etabliertes Verfahren und hat in Deutschland den Status einer DIN-Vorschrift (DIN 38407) erlangt.

1. Trennung



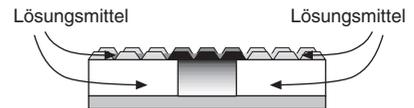
2. Lokalisierung



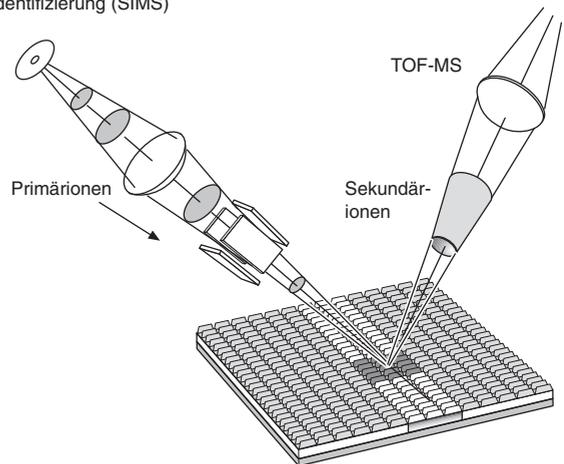
3. Aufbringen einer Metallschicht



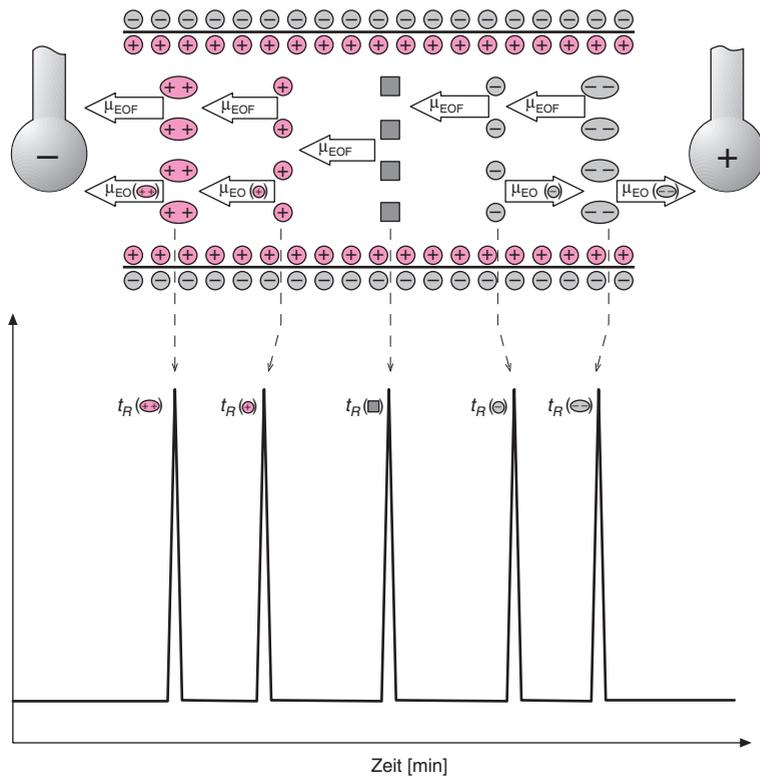
4. Anreicherung



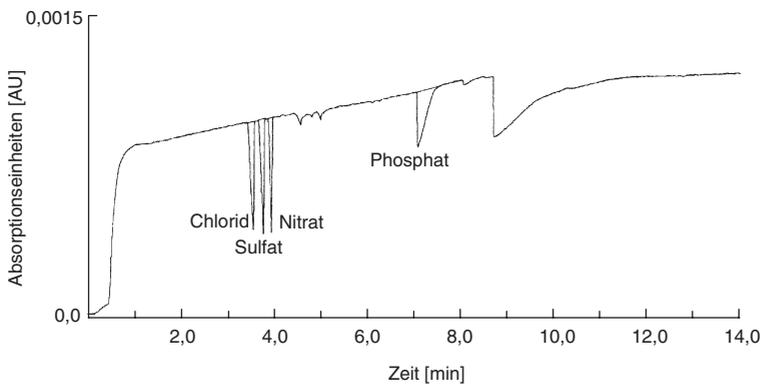
5. Identifizierung (SIMS)



6.12 Kopplung der Dünnschichtchromatographie mit der Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS). Als Detektor wird ein Time-of-Flight-Massenspektrometer (TOF-MS) eingesetzt (L. Merschel, Dissertation, Universität Münster, 1997).



6.48 Differentielle Wanderung von Anionen und Kationen unter Überlagerung des elektroosmotischen Flusses.



6.49 Direkte Analyse von anorganischen Anionen in einem Abwasser ohne Probenvorbereitung.

ben eine sichere Methode zur Peakidentifizierung. Die Quantifizierung erfolgt anhand der Peakflächen und einer externen Kalibrationskurve.

Auch anorganische Kationen lassen sich mithilfe der Kapillarelektrophorese trennen. Da eine Modifizierung des elektroosmotischen Flusses nicht notwendig ist, kann der normale apparative Aufbau verwendet werden. Eine Trennung von Anionen und Kationen im gleichen Lauf ist mit der beschriebenen Technik nicht möglich.

Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC)

Das Verfahren der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie, das 1984 von Terabe eingeführt wurde, stellt eine Erweiterung der elektrophoretischen Trenntechniken auf ungeladene Analyten dar. Daneben ermöglicht es aber zusätzlich die Analytik ionischer Verbindungen, wie z. B. von Aminosäurederivaten, substituierten Phenolen oder sogar Metallkomplexen. Die Durchführung der MEKC ist auf allen üblichen Elektrophoresesystemen möglich, lediglich ein ausreichender Zusatz geladener Tenside zum Elektrolytpuffer ist erforderlich.

derlich. Tenside sind nieder- bis mittelmolekulare amphiphile, grenzflächenaktive Verbindungen, die als hydrophoben Molekülteil mindestens einen Kohlenwasserstoffrest mit 8 bis 20 Kohlenstoffatomen und als hydrophilen Molekülteil geladene oder ungeladene polare Gruppen enthalten.

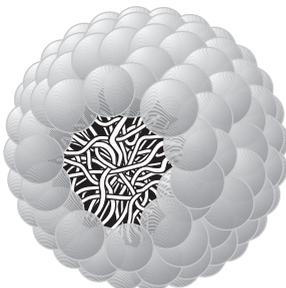


6.50 Schema polar/unpolar am Beispiel von SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat).

Die für die mizellare elektrokinetische Chromatographie entscheidende Stoffeigenschaft der Tenside ist die Amphiphilie, aufgrund der sie Mizellen bilden. Durch die asymmetrische Molekülstruktur bilden Tenside oberhalb einer bestimmten Konzentration Assoziationskolloide mit einem Durchmesser von 3–6 nm, die Mizellen genannt werden (Abb. 6.51).

Die treibende Kraft für diese Aggregatbildung ist der Gewinn an freier Enthalpie durch van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Gruppen bzw. die Vermeidung hydrophober Wechselwirkungen dieser Gruppen mit polarem Lösungsmittel. Daraus resultiert die positive Entropiebilanz bei der Bildung von Mizellen durch Entropievermehrung infolge des Zusammenbruchs der geordneten Wasserstruktur, um den hydrophoben Rest des Monomeren bei der Aggregation. Dem wirkt bei ionischen Tensiden die elektrostatische Abstoßung der polaren Gruppen entgegen.

Der innere Teil der Mizelle wird durch die zusammengepackten Alkylketten bestimmt, die sich in einem quasi flüssigen Zustand befinden. Die Oberfläche der Mizellen, gebildet durch die polaren Gruppen der Tenside, wird durch das sie umgebende wässrige Medium solubilisiert.



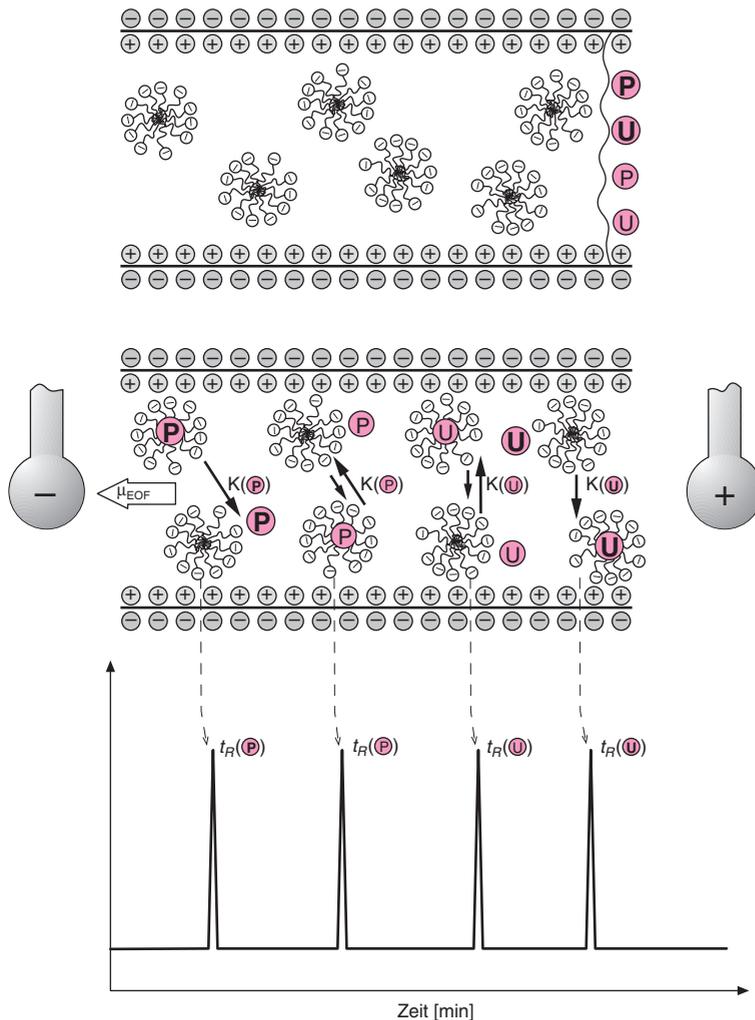
6.51 Schematische Darstellung einer kugelförmigen Mizelle.

Die Mizellen bilden im Puffer mit ihrem ausgeprägten lipophilen Innenraum eine Phase, die in ihren Eigenschaften mit einer stationären Phase aus der HPLC vergleichbar ist. Aufgrund ihrer Eigenbeweglichkeit im elektrischen Feld wird sie als pseudo-stationäre Phase bezeichnet.

Die Trennung ungeladener Analyten erfolgt in der MEKC (Abb. 6.52) generell durch die stoffspezifische polaritätsabhängige Verteilung zwischen der polaren wässrigen Phase und dem unpolaren Inneren der Mizelle, sodass es sich in diesem Fall um ein echtes chromatographisches Verfahren handelt. Neben der Lipophilie ist die Eigenladung dieser Aggregate als zweite Grundvoraussetzung an den Einsatz als pseudo-stationäre Phase geknüpft. Häufig wird Natriumdodecylsulfat (SDS, Abb. 6.50) eingesetzt. Die hierbei entstehenden negativ geladenen Mizellen besitzen eine elektrophoretische Mobilität in Richtung der Anode. Die neutralen Analytmoleküle verteilen sich zwischen dem Puffer (Transport durch EOF in Richtung Kathode) und dem Inneren der Mizelle. Wie in der CZE ergibt sich die effektive Wanderungsgeschwindigkeit der Analytmoleküle sowie der Mizellen aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Wanderung und der elektroosmotischen Geschwindigkeit. Die elektrophoretische Mobilität der Mizelle in Richtung Anode ist gering, sodass bei Überlagerung mit dem elektroosmotischen Fluss eine Nettobewegung in Richtung der Kathode resultiert.

Unter diesen Bedingungen werden sehr polare Stoffe (**P**), die keinerlei Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Mizelle besitzen, zuerst eluiert (t_0). Eine Abnahme der Polarität des Analyten korreliert mit einem Anstieg der Wechselwirkung mit der mizellaren Phase und damit mit einer Verschiebung des Verteilungsgleichgewichtes. Stoffe, deren ausgeprägte Lipophilie ihre Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Puffer gegen Null gehen lässt, werden demnach am längsten retardiert und wandern mit der Geschwindigkeit der Mizelle (t_{MC}). Andere retardierte aber weniger lipophile Moleküle erscheinen somit zwischen t_0 und t_{MC} am Detektor. Die beiden Kenngrößen t_0 und t_{MC} bilden das so genannte Retentionsfenster, in dem die Analyten nach abnehmender Polarität, d. h. mit steigender Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Mizelle getrennt werden.

Ein Beispiel aus dem Bereich der Umweltanalytik ist die Bestimmung von Sprengstoffrückständen, wie Nitroaromaten und Nitraminen, in Böden. Die Trennung eines Testgemisches aus 17 verschiedenen Explosivstoffen wurde zum Vergleich sowohl mit der HPLC als auch mit der MEKC unter den jeweils optimalen Bedingungen durchgeführt. Das resultierende HPLC-Chromatogramm ist dem entsprechenden Elektropherogramm in Abb. 6.53 gegenübergestellt. Betrachtet man den Zeit-



6.52 Der Trennprozeß der MEKC unter Verwendung anionischer Tenside ($S = \text{Analyt}$) sowie schematische Darstellung eines Elektropherogrammes der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie.
P = sehr polare Stoffe
p = polare Stoffe
U = unpolare Stoffe
u = sehr unpolare Stoffe

Wie sicher sind Identifizierungen in der CE

Während bei der Untersuchung von Bodenproben mit der HPLC lediglich eine leichte Verschlechterung der Standardabweichungen bezüglich der Retentionszeiten und Peakflächen beobachtet werden konnte, ergaben die MEKC-Messungen eine Verschiebung der Migrationszeiten und einen deutlichen

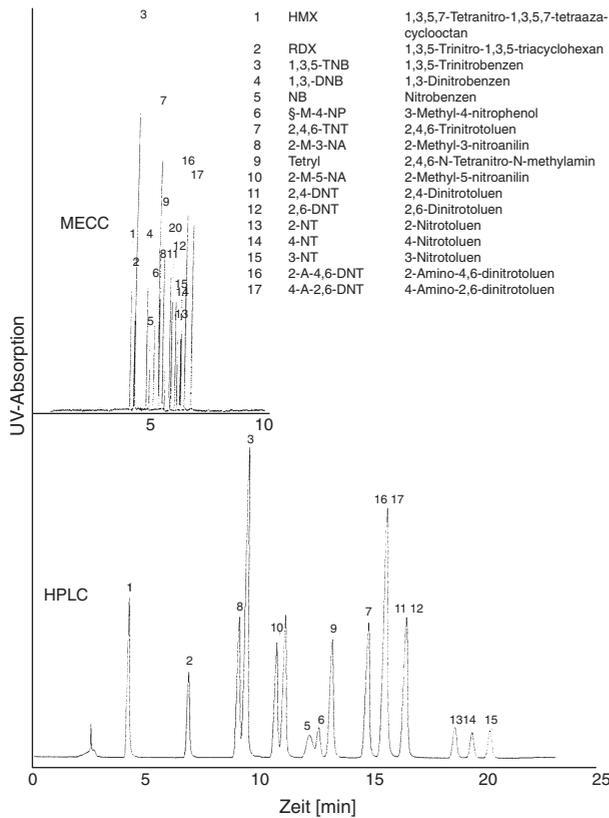
Anstieg der Standardabweichungen für die Elutionszeiten und Peakflächen. Dies ist ein großes und bisher nicht vollständig gelöstes Problem der MEKC. Bei der Analyse von Realproben wird so eine Identifizierung und Zuordnung der Peaks durch Vergleich der Migrationszeiten schwierig oder gar unmöglich.

aufwand für diese Trennungen, ist dieser für die MEKC deutlich geringer. Im Vergleich zur HPLC zeichnen sich die elektrophoretischen Signale durch eine deutlich höhere theoretische Trennstufenzahl aus. Beide Verfahren zeigen keine Veränderung in der Elutionsreihenfolge bei der Übertragung der Methode von Standardlösungen auf Bodenextrakte.

Gelelektrophorese

Die CZE ist zur Trennung sehr großer geladener Moleküle wenig geeignet, da mit zunehmender Molekülgröße die Ladungsunterschiede und damit die Unterschiede in den elektrophoretischen Mobilitäten stark abnehmen.

Die Gelelektrophorese auf Platten ist eine der meist verwendeten Trennmethode in der Biochemie. Sie ermöglicht die Trennung von Gemischen, die eine große

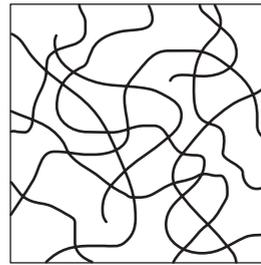


6.53 MEKC und HPLC-Trennung einer aus 17 Komponenten bestehenden Lösung (Dissertation E. Mussenbrock, Universität Münster 1994).

Zahl verschiedener Makromoleküle enthalten. Die Gele beeinflussen die Mobilität der Makromoleküle, sodass es zu einer Trennung nach der Molekülgröße, d. h. nach steigendem Molekulargewicht, wie in Abb. 6.54 dargestellt, kommt.

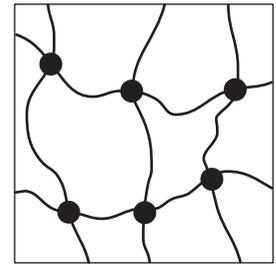
Die Beweglichkeit der Moleküle im Gel hängt von der Molekülgröße und dem Vernetzungsgrad des Gels ab.

Die Kapillargelelektrophorese (CGE) ist absolut vergleichbar mit der klassischen Platten- oder Röhren-Gelelektrophorese, da sowohl der Trennmechanismus als auch die Art der verwendeten Gele identisch sind. Die Anwendung der Kapillargelelektrophorese hat gegenüber den klassischen Verfahren den Vorteil, das 10- bis



lineares Polyacrylamid

lose Anordnung der Gelfasern:



quervernetztes Polyacrylamid

chemische Verknüpfung der Gelfasern:

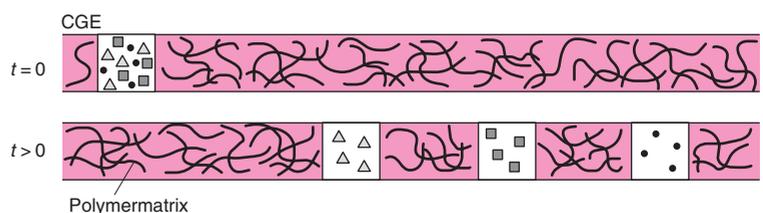
6.55 Schema der Struktur eines linearen und eines quervernetzten Polyacrylamides.

100-mal stärkere elektrische Felder eingesetzt werden können, ohne dass es zu störenden Effekten durch Erwärmung kommt. Weiterhin erlaubt die CGE die direkte Detektion in der Kapillare und die Automatisierung des Verfahrens.

Hauptsächlich werden Gele auf Acrylamid-Basis sowie Agarosegele eingesetzt. Diese Gele sind antikonvektive Medien mit sehr geringer Diffusion von Analytmolekülen und daher für elektrophoretische Trennungen von besonderem Interesse. Die Gele unterscheiden sich in ihrer Viskosität und Stabilität im elektrischen Feld sowie in der Porenstruktur und der Porengröße.

Gele auf Acrylamid-Basis können in Gele mit unterschiedlichem Grad an Quervernetzung und Gele, die nur aus Monomerbausteinen (lineare Gele) aufgebaut sind, unterteilt werden. Lineare Polyacrylamide (LPA) unterscheiden sich bei gleichem Gesamtmonomergehalt stark von quervernetzten Gelen (Abb. 6.55). Der Zusammenhalt von LPA basiert auf physikalischen Wechselwirkungen, sie sind flüssig und können nach jeder Trennung durch Spülen der Kapillare ausgetauscht werden.

Quervernetzte Polyacrylamid-Gele werden durch Copolymerisation von Acrylamiden und einem „Vernetzer“ hergestellt. Durch Variation des Reagenzes kann der Vernetzungsgrad und damit die Trenneigenschaft bestimmt werden. Diese Gele werden in der Kapillare mit dem benötigten Trennpuffer polymerisiert, ein nachträglicher Pufferwechsel ist schwierig.



6.54 Schematische Darstellung der Trennung von ionischen Biopolymeren nach der Molekülgröße.

Neben diesen Polyacrylamid-Gelen werden auch Aga-rosegele, Cellulosegele sowie Dextrane und Polyethylenglykole als Trennmedien eingesetzt.

Haupt Einsatzgebiete der Kapillargelelektrophorese sind die Trennung von DNA-Molekülen sowie die Trennung von mit SDS denaturierten Proteinen.

Isoelektrische Fokussierung

Auch dieses in der Flachbett-Elektrophorese wegen seiner hohen Trennschärfe eingesetzte Verfahren ist ebenfalls in Kapillaren möglich. Die isoelektrische Fokussierung IEF ist ein hochauflösendes elektrophoretisches Trennverfahren für zwitterionische und amphotere Proben, wie Proteine und Peptide, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt (pI-Wert) unterscheiden. Der isoelektrische Punkt gibt an, bei welchem pH-Wert eine amphotere Substanz nach außen hin elektrisch neutral ist und somit im elektrischen Feld nicht mehr wandert. Der pI-Wert ist eine stoffspezifische Größe und zur Trennung nach pI-Werten benötigt man einen pH-Gradienten entlang der Trennstrecke, der den gewünschten Bereich der pI-Werte überstreicht.

Diese pH-Gradienten in der Kapillare werden erzeugt, in dem man dem Puffer amphotere Substanzen, z. B. Aminocarbonsäuren mit unterschiedlichen Verhältnissen an Amino- und Carbonsäuregruppen, zugibt. Je nach Art der verwendeten Ampholyte können unterschiedlich große pH-Wert-Bereiche abgedeckt und der pH-Gradient so dem Trennproblem angepasst werden. Nach Anlegen einer Spannung ordnen sich die Ampholyte aufgrund des Protonen- und Hydroxidionenflusses entsprechend ihrer pI-Werte an, und es bildet sich ein stabiler pH-Gradient über die gesamte Trennstrecke aus.

Die Ausbildung des pH-Gradienten in Folge des Protonen- bzw. Hydroxidionenflusses ist in Abb. 6.56 dargestellt.

Die aufgegebenen amphoterer Probenbestandteile wandern im elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung bis zu dem Punkt, an dem der sich einstellende pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Nachdem dort ihre Nettoladung gleich null ist, wandern sie nicht mehr weiter, sondern bilden eine schmale, stabile Zone. Dies beruht auf der fokussierenden Eigenschaft des pH-Gradienten, der keine Bandenverbreiterung durch Diffusion

zulässt. Nach der Fokussierung befinden sich Ampholyte und Probenbestandteile über die Kapillare verteilt. In der Flachbett-IEF muss die Detektion durch Anfärben der getrennten Zonen erfolgen. In der Kapillare können die getrennten Zonen entweder elektrokinetisch durch den EOF oder durch Anlegen einer Druckdifferenz am Detektor vorbeigeführt werden.

Bei einem idealen pH-Gradienten können zwei Substanzen nur dann vollständig aufgelöst werden, wenn der Unterschied in ihren pI-Werten folgender Beziehung folgt:

$$\Delta pI = 3[(dpH/dx)/E(-d\mu/dpH)]^{1/2} \tag{6.54}$$

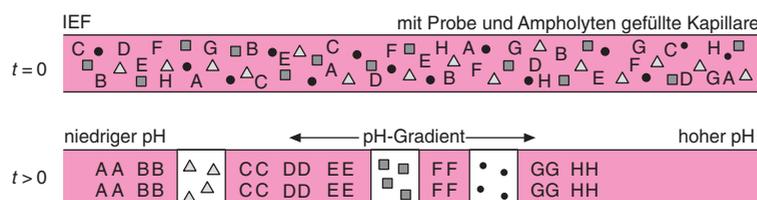
Die Mindestbreite *s* einer fokussierten Bande ergibt sich somit aus folgender Gleichung.

$$\sigma = [D/(d\mu/dpH)(dpH/dx)]^{1/2} \tag{6.55}$$

- D* = Diffusionskoeffizient (cm²/s)
- E* = elektrische Feld (V/cm)
- dpH/dx* = pH-Gradient der Bande
- dμ/dpH* = Änderung der Mobilität am pI-Punkt

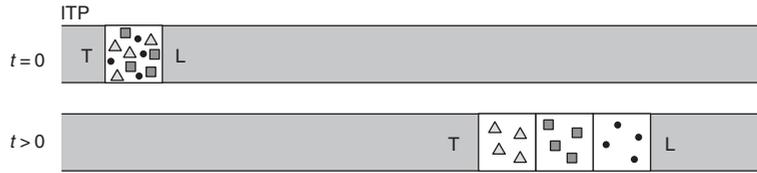
Isotachophorese

Die Isotachophorese (ITP) oder „Gleichgeschwindigkeits-Gelelektrophorese“ verwendet ein diskontinuierliches Puffersystem mit einem gemeinsamen Gegenion, einem Leitton (L), z. B. Chlorid, mit hoher Mobilität und einem Folgeion (T), z. B. Glycin, mit niedriger Mobilität. Das Substanzgemisch mit Mobilitäten zwischen L und T wird an der Grenze zwischen Leit- und Folgeion aufgegeben. Im elektrischen Feld werden alle Ionen gezwungen mit gleicher Geschwindigkeit zu wandern, da sonst eine Ionenlücke entstehen würde. In diesem Fall müsste in einer solchen Stelle eine unendlich hohe Feldstärke existieren. Da sich bei gleicher Geschwindigkeit im Bereich der Leitonen automatisch eine niedrige Feldstärke und im Bereich der Folgeionen eine hohe Feldstärke einstellt, bewegen sich die Probensubstanzen in einem Feldstärkegradienten, der sich während des Laufes zu einem stufenförmigen Feldstärkeverlauf ent-



6.56 Schematische Darstellung der IEF.

6.57 Schematische Darstellung der ITP.



wickelt. Dabei werden die Substanzkomponenten getrennt, es entsteht ein Stapel der Substanzen in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten. Die Methode hat einen aufkonzentrierenden Effekt und wirkt der Diffusion entgegen; allerdings wandern die getrennten Substanzen ohne Zwischenräume direkt hintereinander, und man erhält ein Stufendiagramm und keine getrennten Peaks.

Die ITP wurde vornehmlich für die Trennung anorganischer Ionen und organischer Carbonsäuren eingesetzt. Wegen der Detektionsprobleme und der Schwierigkeit bei Proben unbekannter Zusammensetzung geeignete Elektrolyten zu finden, konnte sich die ITP bisher nicht weiter durchsetzen.

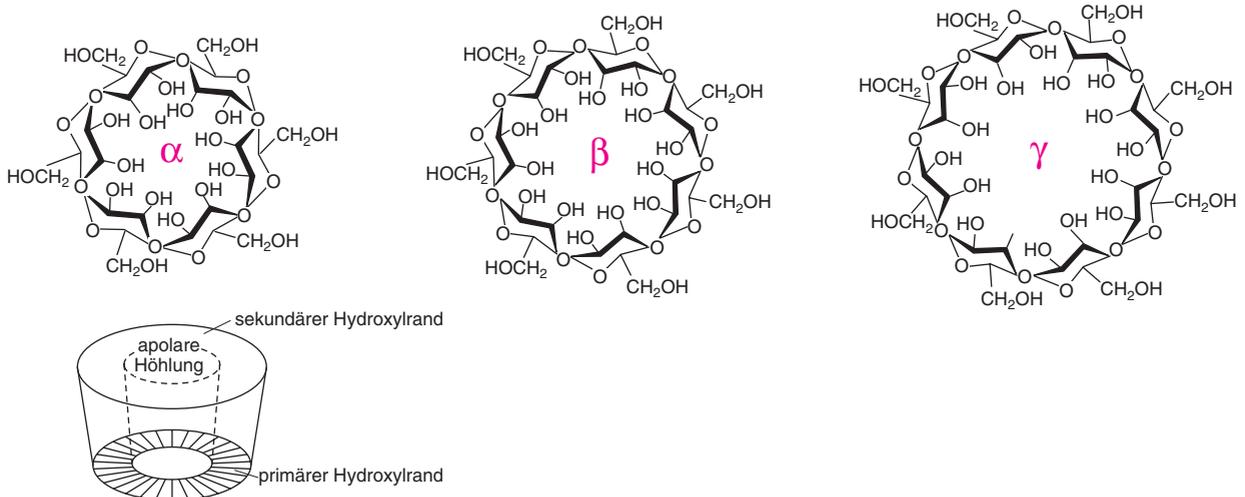
Trennung von Enantiomeren mittels Kapillarelektrophorese

In der Kapillarelektrophorese können Racemate unter optimierten Bedingungen mit sehr hoher Effizienz getrennt werden. Da sich Enantiomere wie Bild und Spiegelbild verhalten und sie sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht unterscheiden, müssen dem Puffersystem geeignete chirale Selektoren zugesetzt werden. Die meisten in der Kapillarelektrophorese verwendeten chiralen Selektoren sind wasserlöslich und lassen sich einfach dem Puffer zusetzen. Universell einsetzbare Selektoren stehen jedoch nicht zur Verfügung,

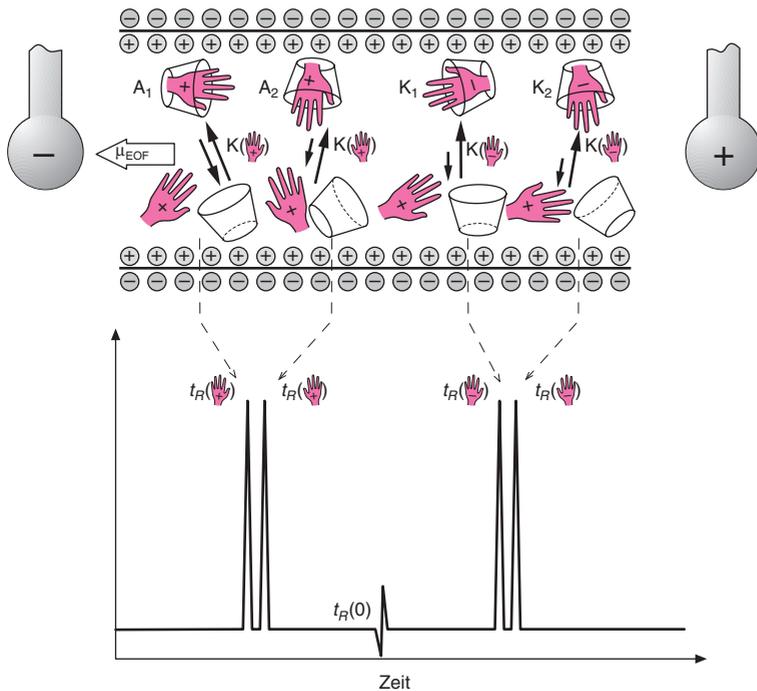
vielmehr müssen die Trennsysteme für jedes Problem entsprechend optimiert werden. Dadurch ergibt sich jedoch auf der anderen Seite die Möglichkeit, die Trenncharakteristika für eine chirale Trennung sehr flexibel anpassen zu können. Hingegen ist der Anwender in der HPLC auf teure käuflich erhältliche stationäre chirale Phasen angewiesen, die sein Trennproblem unter Umständen nicht lösen können. Als chirale Selektoren werden Cyclodextrine (Cds, Abb. 6.58), Proteine sowie chirale Kronenether und Mizellenbildner eingesetzt. Besonders häufig werden Cyclodextrine und deren Derivate eingesetzt.

Die unterderivatisierten α -, β - und γ -Cyclodextrine unterscheiden sich in der Anzahl der zu einem Ring verknüpften (6-, 7-, 8-) Glukoseeinheiten und damit in der Größe des Hohlraums. Eine dynamische Inklusion der Analyten im Sinne eines Wirt-Gast-Komplexes, aufgrund von hydrophoben und ionischen sowie sterischen Effekten und Wasserstoff-Brückenbindungen, wird für die chirale Erkennung optisch aktiver Moleküle verantwortlich gemacht (Abb. 6.59).

Neben der Auswahl und der Konzentration des geeigneten chiralen Selektors müssen auch die anderen Systemparameter wie pH-Wert, Art des verwendeten Puffersystems, Kapillarlänge und Feldstärke sorgfältig und meist sehr zeitaufwendig optimiert werden.



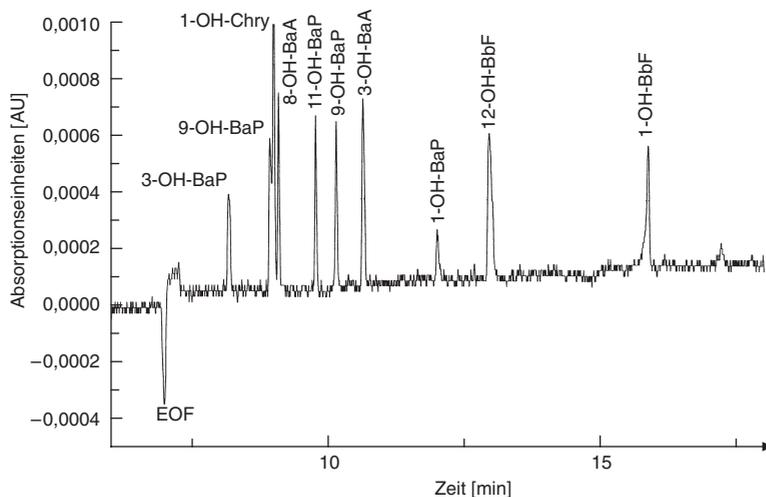
6.58 Struktur der Cyclodextrine.



6.59 Cyclodextrine als pseudostationäre Phase. A₁, A₂: Anionen unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität bzw. verschiedener Affinität zum Cyclodextrinmolekül, K₁, K₂: Kationen unterschiedlicher Mobilität, bzw. verschiedener Affinität zum Cyclodextrinmolekül.

Neutrale Teilchen müssen durch Änderung des pH-Wertes in eine ionische Form überführt werden, um unter den beschriebenen Bedingungen getrennt zu werden. Eine andere Möglichkeit ist, dem Puffer eine mizellenbildende Substanz zu zusetzen. Das mizellare System sorgt in diesem Fall für die Auftrennung in die einzelnen Probenkomponenten und das Cyclodextrin als chiraler Selektor für die Auftrennung der Probenkomponenten in die reinen Enantiomere (Abb. 6.60). Ein Beispiel für das Trennvermögen eines entsprechenden Systems ist in Ab-

bildung 6.60 gezeigt. Hier wurden mögliche Abbauprodukte der ployzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) aufgetrennt. Es handelt sich hierbei um 10 verschiedene Monohydroxy-Verbindungen, die auf den vier Grundkörpern Chrysen, Benz[a]pyren, Benz[a]anthrazen und Benzo[b]fluoranthen basieren.



6.60 Mizellare elektrokinetische Chromatographie mit Zusatz von γ -Cyclodextrinen als chiralem Selektor zur Trennung von 10 Monohydroxy-Verbindungen. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 270 nm (Dissertation U. Krismann, Münster 1999).

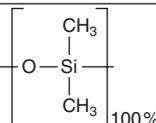
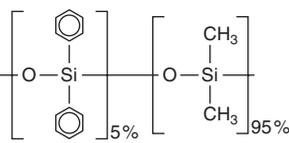
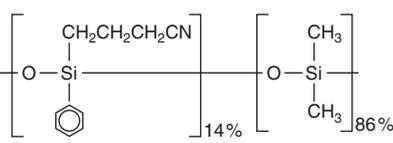
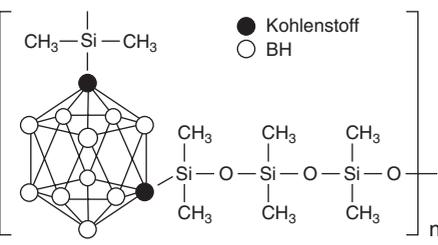
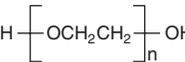
baren Temperaturbereich und sind auch sehr empfindlich gegenüber Spuren von Sauerstoff im Trägergas. Sie zählen zu den polaren stationären Phasen.

Die Anforderungen an die stationäre Phase in GLC sind vielfältig: Sie muss den Träger im ganzen verwendeten Temperaturbereich gleichmäßig benetzen, über einen großen Bereich thermisch stabil sein, chemisch homogen sein und eine niedrige Viskosität und niedrige Flüchtigkeit besitzen. Auch wenn es Phasen gibt, die diesen Vorgaben nahe kommen, existiert die ideale Phase nicht. Dass eine niedrige Flüchtigkeit verlangt wird, ist selbstverständlich, da sonst dem thermisch nutzbaren Bereich durch die Flüchtigkeit der stationären Phase zu enge Grenzen gesetzt werden. Heute werden fast nur Polymere verwendet, deren Flüchtigkeit so klein ist, dass andere Faktoren begrenzend auf den Einsatzbereich wirken.

Für gepackte Säulen ist eine verwirrende Vielzahl (mehrere hundert) stationärer Phasen erhältlich; aller-

dings genügen einige wenige für die Mehrzahl aller Trennungen. In vielen Herstellerkatalogen gibt es zahlreiche Trennbeispiele, die – in der Regel – nützliche Hinweise auf die für ein gewisses Trennproblem zu wählende Phase geben.

Meist haben Kapillarsäulen je nach Phase eine obere Temperaturgrenze zwischen 250 und 350°C. Neue Hochtemperaturphasen können sogar bis 460°C benutzt werden, ohne allzu starke thermische Belastung zu erleiden. Sie bestehen häufig aus einem Dimethylpolysiloxangerüst mit eingebauten Carboran-Sphären (Abb. 6.64). Die oberen Temperaturgrenzen von Trennsäulen werden weniger durch die Flüchtigkeit des Phasenmaterials als durch seine thermische Stabilität gesetzt, denn selbst die sonst so stabilen Polysiloxanphasen zerfallen bei zu hohen Temperaturen. In vielen Fällen kann die Abspaltung ringförmiger Produkte mit drei oder vier Siloxaneinheiten beobachtet werden, z. B. wenn ein massenselektiver Detektor mit dem Gaschromatogra-

Struktur	Name	Kürzel ^{a)}	Temperaturbereich (°C)	Beispiele für geeignete Trennungen
	Poly(dimethylsiloxan)	X-1	-60° bis +320°	Standardphase
	Poly(5%-phenyl-95%-methylsiloxan)	X-5	-60° bis +320°	Standardphase
	Poly(14%-cyanopropyl-phenyl-86%-dimethylsiloxan)	X-1701	+20° bis +280°	Pestizide, Pharmazeutika, Umweltproben
	Polycarboransiloxan	HT-5	+10° bis +460° ^{b)}	simulierte Destillation in der Erdölanalytik, Hochtemperaturanalysen
	Polyethylenglykol	X-Wax	+35° bis +260°	Lösemittel, Alkohole, Fettsäuren, ätherische Öle

^{a)} X steht hier für herstellereigene Kürzel; auch andere Zahlen werden gelegentlich verwendet

^{b)} aluminiumbeschichtete Säule

6.64 Beispiele für häufig verwendete stationäre Phasen in der Gas-Flüssig-Chromatographie mit Kapillarsäulen.

phen gekoppelt ist. Das Problem kann auch mit anderen Detektoren leicht erkannt werden, denn die Zersetzung erzeugt organische Moleküle, die vom Detektor erfasst werden. Die Grundlinie des Chromatogramms steigt also ab einer gewissen Temperatur an. Man sagt, dass die *Säule blutet*. In Abb. 6.65 ist dies ab einer Temperatur von 280°C deutlich zu erkennen. Die von der Polydimethylsiloxan thermisch abgespalteten cyclischen Oligomere sind auch abgebildet.

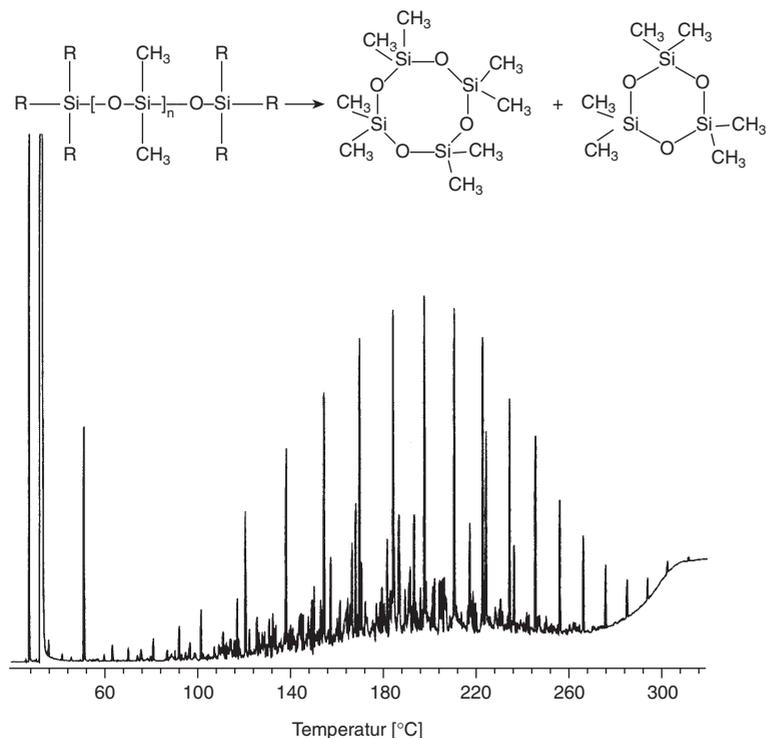
Die obere Temperaturgrenze kann auch von anderen Faktoren gesetzt werden. Beispielsweise greifen Spuren von Sauerstoff im Trägergas die stationäre Phase stärker an, je heißer die Säule ist. Besonders empfindlich gegenüber Sauerstoff sind polare Phasen, z. B. solche auf Polyethylenglykol- und Cyanopropylbasis. Schließlich können Phasen, die nicht quervernetzt (s. unten) sind, sich unter dem Einfluss höherer Temperaturen von der Kapillarwand lösen und Tröpfchen bilden, sodass Teile der Kapillarwand ohne Belegung und andere Teile mit dicken Tröpfchen belegt sind. Wenn dies passiert, geht die Trennleistung der Säule unwiderruflich verloren, und sie muss verworfen werden.

Besonders bei polaren Phasen sollte man auf die untere Temperaturgrenze achten, die doch so hoch wie 60°C liegen kann. Darunter ist die Trenneffizienz sehr niedrig, da die stationäre Phase noch nicht flüssig ist und deswegen keine gute Diffusion in die Phase erlaubt. Liegt der Schmelzpunkt (oder in gewissen Fällen andere Phasen-

umwandlungstemperaturen) so hoch, dass er im Bereich der in der Gaschromatographie üblicherweise verwendeten Temperaturen liegt, kann es passieren, dass die untere Temperaturgrenze unterschritten wird und eine gute Säule für untauglich erklärt wird. Für Anwendungen bei Raumtemperatur oder darunter sollte unbedingt eine Phase, die über eine ausreichend tiefe Minimaltemperatur verfügt, gewählt werden. Es gibt Phasen, die auch noch bei -80°C einsatzfähig sind.

Um die Stabilität der stationären Phase zu erhöhen, werden die Polymermoleküle nach der Belegung in der Säule häufig chemisch miteinander verknüpft (Quervernetzung, *cross-linking*). Da die so entstandenen Polymerketten noch wesentlich größer und damit schwerer löslich sind, nennt man diesen Prozess auch Immobilisierung. Besonders bei unpolaren Phasen, z. B. Dimethylpolysiloxanen, kann dies einfach durch eine radikalische Reaktion, die mit zugesetzten Radikalinitiatoren thermisch eingeleitet wird, durchgeführt werden. Vorteilhaft für die Immobilisierung sind Vinylgruppen, die für diesen Zweck bei der Synthese in das polymere Gerüst eingebaut werden. Polare Phasen sind schwieriger umzusetzen, und folglich sind besonders Cyanopropylphasen nicht quervernetzt (oder nur zum kleinen Teil, „stabilisiert“).

Nicht nur wird die Stabilität der Phase durch die Quervernetzung und die chemische Bindung an die Kapillarwand erhöht, sondern es ergeben sich auch andere Vor-



6.65 Flammenionisationsdetektion. Das Chromatogramm eines Dieselmotorkraftstoffes auf einer 30 m, 0,32 mm, 1,5 µm Poly(dimethylsiloxan)phase. Temperatur 40°C/5 min, 4°C/min auf 300°C/5 min. Injektor 275°C, Detektor 300°C. Helium 30 cm/s (40°C). Splitverhältnis 30:1. Die großen Peaks stammen von den n-Alkanen mit n-C₁₅H₃₂ als dominierender Komponente.