

Optimale Parameter in der schnellen Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Von István Halász* und Gerhard Görlitz

Professor Géza Schay zum 81. Geburtstag gewidmet

Nach einem Jahrzehnt scheint die stürmische Entwicklung der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie abzuflachen. Die meisten analytischen und (semi)präparativen Trennprobleme in der Routine erfordern Säulen mit 1000 bis 10000 theoretischen Böden, falls stationäre Phase und Eluens optimiert sind. Dem genügen heute kommerzielle Geräte und Trennsäulen vollauf. Bei vielen Trennproblemen übersteigt die Effizienz der angebotenen Säulen diese Anforderungen. Da in der Chromatographie optimale (nicht maximale) Auflösung bei kurzer Analysenzeit angestrebt wird, erhöht man den Eingangsdruck in der Säule, um größere Geschwindigkeiten der mobilen Phase zu erreichen und zugleich die Effizienz der Säule zu vermindern. Gleiche Ergebnisse könnte man mit kürzeren Säulen und niedrigen Drücken bekommen. In der Routine werden selten Eingangsdrücke über 100 bar gebraucht, daher ist die Bezeichnung „Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie“ unzutreffend. – Wahrscheinlich werden sich die nächsten Entwicklungsschritte schwierigen Trennproblemen zuwenden, bei denen einige 100000 theoretische Böden erforderlich sind. Anhand von Nomogrammen läßt sich zeigen, daß derartige Aufgaben innerhalb akzeptabler Zeiten mit Eingangsdrücken unter 500 bar lösbar sind. Weitere mögliche Entwicklungsrichtungen werden angedeutet.

1. Einleitung – Stand der Technik

Die theoretischen und experimentellen Grundlagen der schnellen Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography: HPLC) wurden in der zweiten Hälfte der 60er Jahre erarbeitet^[1-18]. Die Pioniere der Renaissance der klassischen Säulenchromatographie kamen fast alle von der Gaschromatographie (GC) her und versuchten, dort erworbene Kenntnisse in der Flüssigkeitschromatographie (LC) anzuwenden. Als Ziel galt es, Effizienz, Nachweisempfindlichkeit und Analysengeschwindigkeit um etwa einen Faktor 100 zu erhöhen. Da die Theorie der Bandenverbreiterung in der Chromatographie unabhängig davon ist, ob das Eluens ein Gas oder eine Flüssigkeit ist, sah man den Hauptunterschied zwischen GC und LC in den Diffusionskoeffizienten und Viskositäten. Als weiteres Hindernis für LC erschien das Löslichkeitsproblem. Bei GC ist das Eluens weitgehend inert, und es gibt praktisch keine Wechselwirkung zwischen Eluens und stationärer Phase. Bei LC müssen – aufgrund des Löslichkeitsproblems – Eluens und Probenkomponenten einander ähnlich sein, deshalb zeigen sie an der stationären Phase Sorptionswärmen gleicher Größenordnung. Man überschätzte zunächst auch die apparativen Probleme. Den Durchbruch zur Routineanwendung der HPLC leitete das 5. Internationale Symposium 1969 in Las Vegas ein^[19]. Hier wurden die ersten kommerziellen Geräte vorgestellt, wurde über wesentliche Fortschritte zur praktischen Benutzung der Methode berichtet. Danach folgte eine stürmische Entwicklung. Immer mehr setzte sich die Erkenntnis durch, daß das Eluens als zusätzlicher Parameter nicht nur

eine Einschränkung, sondern auch einen zusätzlichen Freiheitsgrad darstellt. Auch mit einer einzigen stationären Phase (Säule) können daher die Trennbedingungen, d. h. relative Retentionen, in einem weiten Bereich variiert werden. Für die Herstellung chemisch modifizierter Phasen (insbesondere der Umkehrphasen) wurden hinreichend reproduzierbare Verfahren entwickelt. Die Siebfractionen käuflicher stationärer Phasen wurden immer enger. Für die Packung der Säulen bewährten sich die „balanced density“-^[20-22] und die Viskositäts-Methoden^[23]. Als optimale und in der alltäglichen Praxis geeignete Teilchengrößen wurden Siebfractionen von ca. 5 µm und ca. 10 µm empfohlen. Einen Fortschritt im Apparatebau brachte die einfach handhabbare Schleifen-Probenaufgabe für variable Probenvolumina. Durch mit Schrittmotor betriebene und programmierbare Kolbenpumpen mit Ausgangsdrücken um 400 bar und Flußgeschwindigkeiten von 0.1 bis 10 mL/min konnten Programme für Gradientelution genau und reproduzierbar durch Mischung der Eluentskomponenten auf der Hochdruckseite verwirklicht werden. Bemerkenswerte Neuerungen bei den Geräten sind in den letzten Jahren kaum zu verzeichnen. Erwünscht wären auf neuartigen Prinzipien basierende Detektoren. Sämtliche bisher in der LC-Routine verwendeten Detektoren sind konzentrations- und nicht massengeschwindigkeitsempfindlich^[24], folglich bestimmt die Konstanz der Flußgeschwindigkeit des Eluens Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der quantitativen Analyse.

In moderne kommerzielle HPLC-Geräte werden überwiegend mit Schritt- oder mit Scheibenläufer-Motoren betriebene Kolbenpumpen eingebaut, da hierbei die Kurzzeit-Flußgeschwindigkeit annähernd konstant ($\pm 0.5\%$ bis $\pm 1.5\%$), die Förderung nahezu pulsationsfrei und die Steuerung einfach ist. Die Konstanz der Flußgeschwindigkeit ist aber bei geringen Geschwindigkeiten merklich

[*] Prof. Dr. I. Halász, Dr. G. Görlitz
Angewandte Physikalische Chemie der Universität
D-6600 Saarbrücken

schlechter als angegeben, was bei programmierter Analyse (Gradientelution) stören kann. Die pulsationsfreie Förderung des Eluens erhöht einerseits die Funktionsdauer der Trennsäule und andererseits die Empfindlichkeit der Detektion, insbesondere bei Verwendung eines Differentialrefraktometers. Nachteil der Kolbenpumpen ist es, daß die Kolben von apolaren Lösungsmitteln (z. B. von getrocknetem Heptan) schlecht benetzt werden und daß die Wartung nicht problemfrei ist. Membranpumpen sind wesentlich zuverlässiger und bedürfen weniger Wartung als die Kolbenpumpen, allerdings beträgt die Konstanz der Flußgeschwindigkeit nur $\pm 1.5\%$ bis $\pm 5\%$. Nachteil der Membranpumpen ist die pulsierende Förderung, die durch Pulsationsdämpfer geglättet werden muß, deren Totvolumen bei der Gradientelution störend wirkt. Die elektrische oder elektronische Steuerung dieser preiswerten und nicht mit Schrittmotoren betriebenen Pumpen ist aufwendig, was wiederum bei der Gradientelution negativ ins Gewicht fällt. Anscheinend wurde die optimale Pumpe für HPLC noch nicht gefunden.

Die Leistungsfähigkeit und allgemeine Anwendbarkeit der GC wurde durch Einführung des Flammenionisationsdetektors (FID) außerordentlich gesteigert. Dieser Detektor ist massengeschwindigkeitsempfindlich, sein Rauschpegel ist sehr niedrig (etwa 10^{-12} Ampere oder 10^{-10} g Kohlenstoff/s) und sein Ansprechen (response factor) ist in grober Näherung für Kohlenwasserstoffe unabhängig von deren Zusammensetzung und Struktur. Ein Detektionsprinzip ähnlicher Qualität wurde bisher für HPLC nicht gefunden.

In der HPLC werden überwiegend Differentialrefraktometer oder Spektrometer (IR, UV, Fluoreszenz) als Detektoren verwendet, die alle konzentrationsempfindlich sind und deren Ansprechen sehr weitgehend stoffabhängig ist. Der Rauschpegel dieser Detektoren entspricht – von Ausnahmefällen abgesehen – einer Probekonzentration von 10^{-6} bis 10^{-7} g/g im Eluens. Andererseits ist beim Peakmaximum die Konzentration der Probe im Eluens selten größer als 100 ppm.

Die absoluten und relativen Retentionen der Probesubstanzen sind eine Funktion der Säulentemperatur. Erfahrungsgemäß genügt es nahe Raumtemperatur meistens, die Säulentemperatur auf $\pm 1^\circ\text{C}$ konstant zu halten. Für Proben mit sehr großen Retentionen (großen Sorptionswärmen) mag dies nicht ausreichen. Da chromatographische Säulen mit wärmeisolierenden Materialien gepackt werden, ist der radiale Wärmetransport stark eingeschränkt. Es reicht also nicht aus, nur die Säule von außen zu „thermostatisieren“; eine Vorthermostatisierung des Eluens ist notwendig. Erfahrungsgemäß kann bereits mit ca. 30 cm einfach gewendelter Stahlkapillare (Innendurchmesser 0.25 mm, Außendurchmesser 1.6 mm) die oben geforderte Genauigkeit erreicht werden. Die Bandenverbreiterung in einer solchen Kapillare ist für analytische Arbeiten bei Säulenlängen > 15 cm, Teilchengrößen $> 5\ \mu\text{m}$ und Innendurchmesser > 4 mm meistens zu vernachlässigen. In solchen Fällen kann der Wärmeaustauscher zwischen Probenaufgabe und Trennsäule geschaltet werden. Legt man Wert auf maximale Trennleistung, so sollte der Wärmeaustauscher vor der Probenaufgabe angebracht sein. Allerdings muß dann der gesamte weitere Weg des Eluens (inklusive Probenaufgabe) bis zur Säule thermostatisiert werden.

2. Die Trennsäule

Im Zeitalter der Mikroprozessoren muß die Trivialität besonders betont werden, daß Komponenten eines Probegemisches, die in der Säule nicht getrennt wurden, auch mit elektronischen Mitteln nicht „aufgelöst“ werden können. Das Kernstück des chromatographischen Gerätes bleibt nach wie vor die Trennkolonne. Die chromatographische Trennung ist auf die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der Probekomponenten in der Säule zurückzuführen. Dabei werden die Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeiten – d. h. die relativen Retentionen α – durch die verschiedenen Verteilungskoeffizienten der einzelnen Spezies zwischen mobiler und stationärer Phase verursacht. Unter Ausnahme der Ausschlußchromatographie sind die Verteilungskoeffizienten thermodynamische Größen, die von der stofflichen Beschaffenheit von Probe, stationärer und mobiler Phase sowie von der Temperatur abhängig sind. (Bei Chromatographie unter überkritischen Bedingungen ist auch der Druck ein wesentlicher Parameter.) Das erste und wichtigste Problem in der Chromatographie ist daher das Auffinden eines geeigneten Trennsystems. Hierbei kommt es entscheidend auf die Erfahrung des Chemikers an.

Streng genommen ist die Elutions-Chromatographie kein Trennverfahren im üblichen Sinne der Thermodynamik^[25]. Die Komponenten eines Substanzgemisches werden zwar voneinander getrennt, aber im Eluens verdünnt. Diese Verdünnungseffekte (Entropiezunahme) werden in der kinetischen Theorie der Chromatographie anhand der relativen Bandenverbreiterung h oder der theoretischen Bodenzahl n beschrieben^[7].

Die Auflösung R zweier benachbarter Peaks beträgt in guter Näherung^[26]

$$R = \frac{\alpha - 1}{4\alpha} \cdot \frac{k'_2}{1 + k'_2} \cdot \sqrt{n_2} \quad (1)$$

Da α für zwei eng benachbarte Elutionsbanden unweit von 1 ist, und da R einerseits zu $(\alpha - 1)$, andererseits nur zu \sqrt{n} proportional ist, folgt aus Gl. (1), daß primär α zu optimieren ist. Im folgenden wird vorausgesetzt, daß die optimalen relativen Retentionen α schon gefunden wurden. In der HPLC wird dies zumeist über die Variation der Eluenszusammensetzung erzielt. Erfahrungsgemäß reichen für die Lösung vieler Probleme fünf (oder weniger) verschiedene stationäre Phasen aus.

Wegen der günstigen relativen Retentionen arbeitet man in der Routine meistens mit Säulen von maximal 30 cm Länge. Die schwierigen Trennprobleme – z. B. im Bereich der Biologie, Biochemie, Pharmazie, Petrochemie etc. – wo Bodenzahlen über 50000 erforderlich sind und Kapillar-GC nicht anwendbar ist, wurden bisher kaum angegangen. Hierbei sind entweder die α -Werte klein und/oder die Anzahl der zu trennenden Komponenten (und damit die erforderliche Peakkapazität) groß. Das Auffinden optimaler kinetischer Parameter wird in diesem Beitrag auch für

[*] Im Symbolverzeichnis auf S. 58 sind die häufig verwendeten Symbole zusammengestellt. Die wichtigsten Parameter der HPLC (z. B. Viskosität, Diffusionskoeffizient) sind noch in Einheiten des CGS-Systems tabelliert. Da diese Einheiten überwiegend auch bei der Routinearbeit und in der Literatur gebräuchlich sind, werden sie auch in diesem Beitrag verwendet.

derartig schwierige Trennungen diskutiert. Es wird vorausgesetzt, daß die h -Werte unabhängig von der Säulenlänge sind.

2.1. Säulenpackung

Ohne auf Einzelheiten dieses Problems einzugehen, soll nur darauf hingewiesen werden, daß genügend enge Siebfractionen zur Herstellung guter Säulen mit mittleren Teilchengrößen der stationären Phase zwischen 5 und 30 µm kommerziell erhältlich sind. Da diese Teilchengrößen von Festkörpern mit großer spezifischer Oberfläche sich dem kolloidalen Bereich nähern, sind die beschriebenen Packungsmethoden empirisch und nicht immer gut reproduzierbar. Dementsprechend streut die Effizienz kommerzieller Säulen in breitem Bereich; sie wird häufig in der Einheit Bodenzahl pro Meter angegeben, und dies kann irreführend sein. Koppelt man z. B. 25 cm lange Säulen zu längeren Kolonnen, so steigt die Bodenzahl oft nicht proportional an. Es läßt sich zeigen, daß dies nicht auf den Einfluß der Verbindungsstücke zurückgeführt werden kann. Eine Packungsmethode, die beliebiges Koppeln der Säulen erlaubt, wurde bisher noch nicht beschrieben. In diesem Beitrag soll auch gezeigt werden, wie eine einfache quantitative Beurteilung der gepackten Säulen möglich ist.

2.2. Asymmetriefaktor

In der Theorie der Chromatographie werden Elutionsbanden mit der Form einer Gauß-Verteilungskurve vorausgesetzt. Leider wurden solche Banden experimentell bisher nicht verifiziert. Allzuoft werden die Bodenzahlen aus dem „Mutterpeak“^[23] errechnet, wobei „leading“ und „tailing“ der Bande vernachlässigt werden. Sobald eine Basislinientrennung ($R=1.5$) – Voraussetzung einer einwandfreien quantitativen Analyse – gefordert wird, sind derartige Methoden verboten. Peak-Asymmetrie kann entweder auf starke Wechselwirkung zwischen Probe und stationärer Phase und/oder auf apparative oder packungsbedingte Fehler zurückgeführt werden. Treffen letztere Gründe zu, so nimmt der Asymmetriefaktor As ^[23] mit zunehmender Retention ab. In diesem Beitrag werden Asymmetriefaktoren von $As=0.9$ bis 1.2 vorausgesetzt, falls die Kapazitätsverhältnisse k' zwischen 1 und 2 liegen. Diese Voraussetzung wird von guten kommerziellen Säulen erfüllt.

2.3. Teilchengröße der Packung

Die mittlere Teilchengröße einer Siebfraction für HPLC-geeignete stationäre Phasen ist eine Funktion von: 1. Bestimmungsmethode (optisch, Sedimentation, Leitfähigkeit (Coulter Counter) etc.) und 2. Art der Mittelung (zahlen- oder gewichtsgemittelt). Die Methoden sind apparativ aufwendig und zeitraubend, alle können sie nur die Teilchengrößenverteilung außerhalb der Säule bestimmen. Über das bekannte Problem der Agglomeration während des Packungsvorganges – wodurch die Effizienz einer Trennsäule wesentlich vermindert werden kann – sagen diese Methoden nichts aus.

Wir ziehen es vor, die mittlere Teilchengröße in der gepackten Säule δ mit einer chromatographischen Methode zu definieren^[27]:

$$\delta = \sqrt{10^3 K'} = \sqrt{\frac{10^3 F \eta L}{r^2 \pi \Delta P}} \quad (2)$$

Mit dem empirischen Zahlenfaktor 1000 ist die Übereinstimmung von δ mit optisch bestimmten, zahlengemittelten mittleren Teilchengrößen für unregelmäßige Teilchen gut^[27]. Für runde Teilchen wäre erfahrungsgemäß ein Faktor um 700 (anstatt 1000) in Gl. (2) angebracht. Wir ziehen es vor, unabhängig von der Geometrie, die Teilchengröße mit Gl. (2) zu definieren, da dann δ mit dem „Preis“ (Druckabfall) definiert ist, den man für die Teilchengröße „bezahlen“ muß. Damit errechnet man für runde Teilchen um etwa 15 bis 20% größere δ -Werte als für unregelmäßige Teilchen. Erfahrungsgemäß ist die Übereinstimmung der δ -Werte mit den von den Herstellern angegebenen mittleren Teilchengrößen, \bar{d}_p , annehmbar und unabhängig von der Teilchenform^[28].

Oft charakterisiert man die Güte einer Säule mit der dimensionslosen reduzierten Bodenhöhe h/δ . Mit δ nach Gl. (2) sollten für runde Teilchen geringere (günstigere) reduzierte Bodenhöhen errechnet werden. Die Erfahrung zeigt überraschenderweise, daß die reduzierten Bodenhöhen h/δ von runden und unregelmäßigen Teilchen sich trotzdem nicht unterscheiden^[28, 29].

Die Frage nach den Vor- und Nachteilen der Verwendung von runden oder gebrochenen Teilchen wird oft und ausführlich diskutiert. Einige behaupten, daß die Qualität und die Reproduzierbarkeit der mit runden Teilchen gepackten Säulen besser wäre. Andere vertreten die entgegengesetzte Meinung: Die runden Teilchen verschoben sich im Laufe der Zeit leichter in der Packung. Möglicherweise hängen diese Effekte aber mehr von der Breite der Siebfraction als von der Geometrie der Teilchen ab. Die gegenwärtig kommerziell für HPLC angebotenen Fraktionen dürften den Anforderungen vollauf genügen. Dies bezieht sich nicht nur auf die Breite der Siebfractionen, sondern auch auf die Reproduzierbarkeit der spezifischen Oberfläche und der Porenverteilung. Zurückkommend auf die Diskussion der optimalen Teilchenform scheint nur eines sicher zu sein: Runde Teilchen sind wesentlich teurer.

Die reproduzierbare Herstellung von gepackten Säulen, deren stationäre Phasen Teilchengrößen über 4 µm (meistens unter 15 µm) haben, ist heute Stand der Technik. Dies gilt sowohl für Säulen, die mit Silicagel oder Aluminiumoxid gepackt werden, als auch für Säulen mit chemisch modifizierten Phasen. Für die häufig benutzten kurzen ($L=10$ cm), mit 5 µm-Teilchen gepackten Säulen – die den Vorteil einer kurzen Analysenzeit bieten – ist bei vielen kommerziellen Geräten die Bandenverbreiterung außerhalb der Säule ähnlich der innerhalb der Säule. Demzufolge werden die reduzierten Bodenhöhen für diese Säulen (5 µm) wesentlich ungünstiger (größer) als für Kolonnen, die mit 10 µm-Teilchen gepackt wurden. Anders ausgedrückt: Mit 5 µm ($L=10$ cm)-Säulen werden unter diesen Umständen niedrigere Bodenzahlen erzielt als mit 10 µm ($L=20$ cm)-Kolonnen. Allerdings sind Druckabfall und Analysengeschwindigkeit für die erstgenannten Säulen größer.

Säulenpackungen mit Teilchengrößen um 3 μm wurden schon vor fünf Jahren beschrieben^[30] und werden inzwischen auch kommerziell angeboten. Allerdings sind bei diesen Säulen außer den Analysengeschwindigkeiten auch die apparativen Schwierigkeiten, der Druckabfall und die reduzierte Bodenhöhe groß.

2.4. Einfache Trennprobleme

Im folgenden wird vorausgesetzt, daß die Teilchengrößen – wie heute üblich – zwischen 5 μm und 10 μm betragen und die HPLC-Trennung isokratisch durchgeführt wird. Mit den üblichen 30cm-Säulen lassen sich im Minimum der h, u -Kurve (also bei u_{min}) etwa 10000 Böden erzielen. Wie aus Gl. (1) hervorgeht, kann man so im Bereich um $k' = 1$ noch Substanzen mit einer relativen Retention größer als 1.14 an der Basislinie trennen. Für die meisten Trennprobleme in der Routine lassen sich auf einfache Weise Systeme finden, wo die α -Werte wesentlich größer sind als 1.14. Die Auflösung der Komponenten wird also besser als Basislinientrennung ($R > 1.5$). Arbeitet man, bei sonst unveränderten Parametern, mit einer kürzeren Säule, deren Trennvermögen für quantitative Analysen noch ausreicht ($R = 1.5$), so nimmt die Analysenzeit ab und die Nachweisempfindlichkeit zu.

Apparativ einfacher ist es, die Analysenzeit dadurch herabzusetzen, daß man die lineare Geschwindigkeit des Eluens erhöht, wobei die h -Werte zunehmen. Allerdings nimmt bei diesem Verfahren außer der Auflösung auch die Nachweisempfindlichkeit ab und der Druckabfall an der Säule zu. Diese Alternative zur Verkürzung der Analysenzeit ist sicherlich ein Hauptgrund für die häufige Verwendung teurer Hochdruckpumpen. Für die meisten Routineanalysen sind Pumpen mit Ausgangsdrücken von 400 bar und mehr nicht erforderlich.

Erfahrungsgemäß lassen sich die meisten Alltagsprobleme der HPLC mit zwei Säulenlängen (z. B. 10 und 30 cm) lösen. Allerdings müssen die kurzen Säulen allgemein einen größeren Innendurchmesser (z. B. 6 mm) haben als die längeren (z. B. 4 mm), um Bandenverbreiterung außerhalb der Säule vernachlässigen zu können.

Weitere wesentliche Vorteile des Arbeitens mit kurzen Säulen und kleineren Druckabfällen sind die Schonung der Apparatur und die verlängerte Funktionsdauer der Trennsäulen.

Die quantitative Berechnung optimaler Parameter für derartige kurze Säulen ($L \leq 30$ cm, $\delta \geq 5$ μm) erübrigt sich, da – wie zuvor diskutiert – die Druckreserven kommerzieller Pumpen ausreichen.

2.5. Schwierige Trennprobleme

Haben die zu trennenden Substanzen relative Retentionen um 1.06, so werden bei $k' = 1$ ungefähr 50000 Böden benötigt. Solche Bodenzahlen lassen sich nur mit langen Säulen und/oder sehr kleinen Teilchengrößen der stationären Phase erzielen. Auch für die Trennung von Gemischen mit sehr vielen Komponenten, die eine große Peakkapazität^[31] erfordert, gelten ähnliche Einschränkungen. Das Auffinden optimaler Parameter für den Betrieb derartiger Säulen ist eine vordringliche Aufgabe.

Während bei den kurzen Säulen Druckabfall und Analysenzeit (oder Analysengeschwindigkeit) von untergeordneter Bedeutung sind, werden diese Parameter für komplizierte Trennungen sehr wichtig. In solchen Fällen bemessen sich die Druckabfälle nach Hunderten von Bar, die Analysenzeiten nach Stunden. Beide sind *entgegengesetzte* Funktionen der linearen Geschwindigkeit u des Eluens. Wie findet man optimale Geschwindigkeiten u ? Um die Problematik zu verdeutlichen, sei zuerst ein kurzer Rückgriff auf die Gaschromatographie unternommen sowie ein Vergleich von GC und HPLC.

2.6. Analysengeschwindigkeit und Druckaufwand bei GC und LC

In der Chromatographie kann – unabhängig vom Aggregatzustand des Eluens – die Analysengeschwindigkeit mit der Zahl der pro Zeiteinheit erzeugten theoretischen Böden ($n/t \sim u/h$) charakterisiert werden^[32]. Andererseits ist der dazu notwendige Druckabfall zum Produkt $h \cdot u$ proportional, solange eine konstante Trennleistung (Bodenzahl) gefordert wird. Es ist sinnvoll, die Analysengeschwindigkeit als Funktion des Druckaufwandes ($\sim h \cdot u$) aufzutragen. Eine solche Auftragung für Peaks mit ähnlichen Kapazitätsverhältnissen in einer typischen GC- und einer HPLC-Säule zeigt Fig. 1. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden beide Achsen auf die Werte

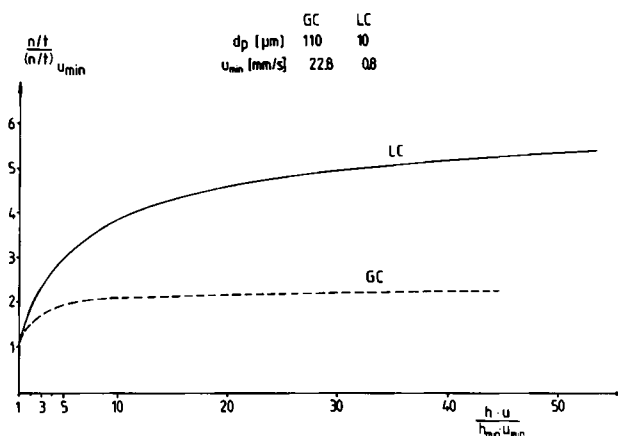


Fig. 1. Normierte Analysengeschwindigkeit als Funktion des Analysenaufwandes ($\sim \Delta P$). Normierung: n/t und $h \cdot u$ werden auf die Werte im Minimum der h, u -Kurven normiert. Säulendaten für GC [33]: Konventionell gepackte Säule, $L = 200$ cm, Innendurchmesser = 4 mm, 5% Squalan auf Chromosorb W, Siebfraktion 100–120 μm , Trägergas N_2 , 75°C, Probe: n -Hexan; $k' = 1.51$, $h = 1.26 \cdot 10^{-2} + 8.3 \cdot 10^{-2}/u + 1.6 \cdot 10^{-2} u$ (h in cm, u in cm/s). – Säulendaten für LC: $L = 10$ cm, Innendurchmesser = 4.6 mm, Lichrosorb SI 100 (Merck), $\delta = 10$ μm , Eluens n -Heptan, 25°C, Probe: Chrysen; $k' = 1.15$, $h = 23 + 4/u + 6.3 u$ (h in μm , u in mm/s).

im Minimum der h, u -Kurve normiert. Es ist ersichtlich, daß für GC die Analysengeschwindigkeit schon bei relativ niedrigem Druckaufwand einen Grenzwert erreicht. Bereits bei relativ niedrigen Drücken ($\sim h \cdot u$) werden Analysengeschwindigkeiten erreicht, die sich mit großem Druckaufwand kaum noch steigern lassen. Daher gilt für die optimale Geschwindigkeit u_{opt} die Faustregel:

$$u_{\text{opt}} \approx 2 u_{\text{min}} \quad (3)$$

Aus Fig. 1 ist auch ersichtlich, daß die LC-Kurve nicht einmal beim 20fachen u_{min} einen Grenzwert erreicht. Deshalb

kann man im praktischen HPLC-Bereich ($\Delta P < 600$ bar) auf diese Weise keine optimale Geschwindigkeit bestimmen: Mit zunehmendem Druck nimmt die Analysengeschwindigkeit erheblich zu.

War es bei GC durchaus angebracht, mit Siebfractionen zwischen 100 und 200 μm zu arbeiten, so lehrte die Erfahrung bald, daß es bei HPLC sinnvoller ist, die Analysengeschwindigkeit durch Verwendung geringerer Teilchengrößen zu steigern, als dies über zunehmende Flußgeschwindigkeit und Säulenlänge anzustreben.

Es gibt bereits einige Untersuchungen, die sich das Auffinden optimaler experimenteller HPLC-Parameter zum Ziel gesetzt haben^[34-40]. Die vorgeschlagenen Verfahren sind mathematisch aufwendig und für den Praktiker nicht einfach handhabbar.

Die Grundlagen eines einfachen Verfahrens, das eine graphische Bestimmung optimaler experimenteller Parameter ermöglicht, wurden 1977 abgeleitet und vorgetragen^[41]. Seine Weiterentwicklung wird hier vorgestellt.

2.7. Semiempirische Beschreibung der Bodenhöhe bei HPLC als Funktion von Teilchengröße und linearer Eluengeschwindigkeit

Die relative Bandenverbreiterung h ist eine komplizierte Funktion zahlreicher Parameter. Die wichtigsten und im folgenden zu diskutierenden Faktoren sind: Geschwindigkeit der mobilen Phase (u), Teilchengröße der stationären Phase (δ), Diffusionskoeffizient der Probe im Eluens (D_m) und das Kapazitätsverhältnis der Probe (k'). Die beiden letztgenannten sind auch von der Temperatur abhängig. Haben die Probesubstanzen relative Molekulmassen zwischen 75 und 300 (typisch für die Trennung organischer Substanzen), so können in erster Näherung für gegebene Viskositätsbereiche des Eluens Standardwerte für D_m angenommen werden (z. B. $\eta = 0.4$ cP; $D_m = 3 \cdot 10^{-5}$ cm²/s). Daher führen wir statt des zumeist unbekannten Diffusionskoeffizienten der Probe die Viskosität des Eluens als Parameter ein.

In der Regel nehmen die h -Werte mit wachsendem k' zu. Zur Vereinfachung wird ein für den praktisch interessierenden Bereich gemittelter Wert $k' = 2$ angenommen.

Mit diesen Randbedingungen kann der h -Wert in der HPLC mit folgender semiempirischer Funktion von u und δ beschrieben werden^[42]:

$$h = a\delta + \frac{b}{u} + c\delta^2 u \quad (4)$$

wobei die Konstanten a , b und c von der Qualität der Säulenpackung und der Viskosität des Eluens η (respektive D_m) abhängen. Mit der Verbesserung der Packungsmethoden^[43-45] wurden die Werte der empirischen Konstanten in Gl. (4) im Laufe der Zeit immer niedriger. Es zeigte sich auch, daß die numerischen Werte dieser Konstanten in guter Näherung unabhängig davon sind, ob Silicagele, Aluminiumoxide oder chemisch modifizierte Umkehrphasen als Packungsmaterial verwendet werden.

Entsprechend dem Stand der Technik des Säulenpackens werden nun zwei Standardsysteme numerisch behandelt. Für ein „niederviskoses“ Eluens wie n -Heptan, Dichlormethan, Acetonitril, Methanol etc. (η zwischen 0.4 und 0.6 cP) gilt:

$$h = 1.5\delta + \frac{6}{u} + \frac{\delta^2}{16} u \quad \text{„Formel I“} \quad (5)$$

wobei die in der HPLC üblichen Maßeinheiten verwendet, d. h. die Werte von h und δ in μm , die von u in mm/s angegeben werden; selbstverständlich haben die Konstanten 1.5, 6 und 16 entsprechende Dimensionen.

Für ein „hochviskoses“ Eluens wie Wasser-Acetonitril- oder Wasser-Methanol-Gemische (η zwischen 0.7 und 1.5 cP) gilt analog:

$$h = 2\delta + \frac{3}{u} + \frac{\delta^2}{8} u \quad \text{„Formel II“} \quad (6)$$

Die Gleichungen (5) und (6) entsprechen der experimentellen Erfahrung, falls

- 1) die Teilchengröße δ der stationären Phase zwischen 3 und 30 μm beträgt;
- 2) die lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase kleiner ist als 20 u_{min} ;
- 3) die relative Molekülmasse der Probe kleiner als 300 ist und das Kapazitätsverhältnis k' etwa 2 beträgt.

Diese beiden Formeln sind zwar eine Näherung, aber sie lassen sich einfach handhaben und greifen nur auf direkt zugängliche Größen zurück. Damit ermöglichen sie z. B. auch die Beurteilung der Güte von Säulen, die mit unterschiedlichen Materialien gepackt wurden. Verwendet man Gl. (2) zur Bestimmung der Teilchengröße in Gl. (5, 6), so bleibt man auch unabhängig von Herstellerangaben. Es sei noch darauf hingewiesen, daß auch für gute Säulen Übereinstimmung von experimentellen mit berechneten Werten nur dann erwartet werden kann, wenn die Bandenverbreiterung außerhalb der Säule zu vernachlässigen ist.

3. HPLC-Optimierung

Die wichtigsten Parameter bei der Optimierung einer HPLC-Analyse sind: α , D_m , k' , η , L , n , t_0 , ΔP und δ ; aus diesen Größen lassen sich weitere Parameter (z. B. u , R , h , n/t_0 etc.) ableiten. Setzen wir optimale relative Retentionen α voraus. In den Gleichungen (5) und (6) wurden der Diffusionskoeffizient D_m , die Viskosität des Eluens η sowie das Kapazitätsverhältnis k' auf Standardwerte festgelegt. Die restlichen fünf Parameter sind voneinander nicht unabhängig. So kann man vorerst die Säulenlänge L eliminieren: Aus Gl. (2) und

$$u = \frac{L}{t_0} = \frac{F}{r^2 \pi \varepsilon_T} \quad (7)$$

worin ε_T die totale Porosität bedeutet, folgt

$$L = \delta \sqrt{\frac{t_0 \Delta P}{10^3 \eta \varepsilon_T}} \quad (8)$$

so daß sich Gl. (4) mit $h = L/n$ auf die verbleibenden vier Parameter umformen läßt:

$$n = \left[a \sqrt{\frac{10^3 \eta \varepsilon_T}{t_0 \Delta P}} + \frac{10^3 b \eta \varepsilon_T}{\delta^2 \Delta P} + \frac{c \delta^2}{t_0} \right]^{-1} \quad (9)$$

In den Abbildungen 2 und 3 ist die Bodenzahl als Funktion der Teilchengröße, bei vorgegebenem t_0 bzw. ΔP , nach Formel I [Gl. (5)] und nach Formel II [Gl. (6)] aufgetragen. Dies ist sinnvoll, da bei schwierigen Trennungen – wie schon diskutiert – Analysenzeit und Druckabfall an der Säule die begrenzenden Größen sind.

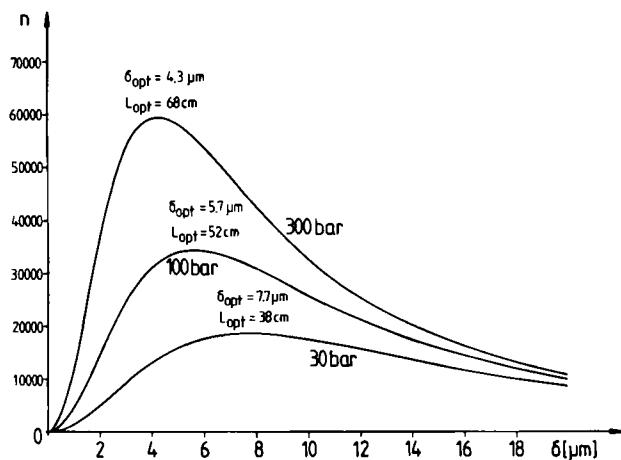


Fig. 2. Bodenzahl als Funktion der Teilchengröße für „niederviskose“ Eluentsmittel bei $t_0 = 300$ s und konstantem ΔP .
 $h = 1.5 \delta + 6/u + \delta^2 u/16$, $\eta = 0.44$ cP, $\epsilon_T = 0.82$.

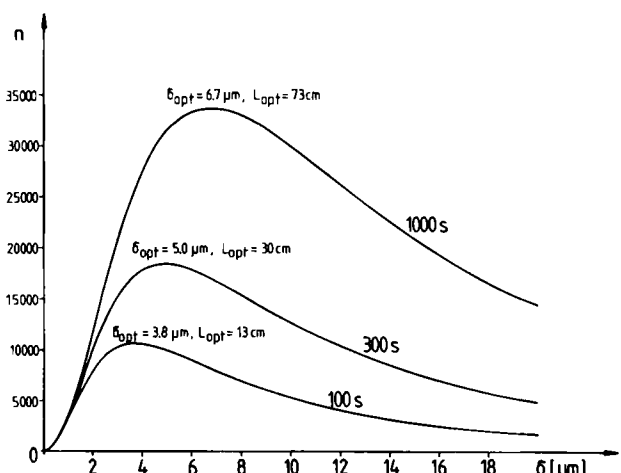


Fig. 3. Bodenzahl als Funktion der Teilchengröße für „hochviskose“ Eluentsmittel bei $\Delta P = 100$ bar und konstantem t_0 .
 $h = 2\delta + 3/u + \delta^2 u/8$, $\eta = 1.2$ cP, $\epsilon_T = 0.70$.

In Fig. 2 wird ein „niederviskoses“ Eluens ($\eta = 0.44$ cP), eine für Silicagelsäulen typische Porosität ($\epsilon_T = 0.82$) sowie die Gültigkeit von Formel I vorausgesetzt; die Durchbruchzeit des Inertpeaks bleibt in allen drei Fällen konstant (5 min). Fig. 3 gilt für ein „hochviskoses“ Eluens ($\eta = 1.2$ cP) und eine für chemisch modifizierte Phasen typische Porosität ($\epsilon_T = 0.70$); dabei wird Formel II angewendet und in allen gezeigten Fällen $\Delta P = 100$ bar angenommen. In beiden Abbildungen durchlaufen sämtliche Kurven ein Maximum, d. h. die maximale Bodenzahl läßt sich unter diesen Bedingungen nur mit einer ganz bestimmten Teilchengröße erzielen. Die zu diesem Optimum gehörende Säulenlänge kann nach Gl. (8) errechnet werden.

Wie aus Fig. 3 ersichtlich, sind mit einem für Umkehrphasen typischen System etwa 35000 Böden, innerhalb von 1000 s für t_0 , mit nur 100 bar Druckabfall zu erreichen. Die optimale Teilchengröße beträgt ca. 7 μm , und die

Säule ist 73 cm lang. Da die Bodenzahl nur mit der Wurzel in das Auflösungsvermögen eingeht [Gl. (1)] und dieses den Analytiker eigentlich interessiert, können erfahrungsgemäß Verluste an n von 10 bis 20% in Kauf genommen werden. Läßt man derartige Abweichungen zu, so darf δ zwischen 4 und 10 μm variieren. Ändert man δ , so ändert sich die dazugehörige Säulenlänge nach Gl. (8) ebenfalls. Wie aus diesem Beispiel deutlich wird (vgl. auch Abschnitt 4), erfordert diese Art von Optimierung nur eine grobe Abstufung von Teilchengrößen und Säulenlängen. Das bedeutet für den Anwender, daß er bereits mit sehr wenigen Säulentypen unter verschiedensten Bedingungen optimal arbeiten kann.

Wie im Anhang gezeigt wird, läßt sich das Maximum der n, δ -Kurve (ΔP und t_0 konstant) auch mathematisch explizit errechnen. Alle Parameter, die für dieses Maximum gelten, werden im folgenden mit dem Index „opt“ bezeichnet. Die Bestimmungsgleichungen für δ_{opt} , L_{opt} und n_{opt} sind dem Anhang zu entnehmen [Gl. (A6) bis (A8)]. Dividiert man in Gl. (A7) L_{opt} durch t_0 und eliminiert t_0 und ΔP mittels der Gleichung für δ_{opt} (A6), so erhält man für die lineare Geschwindigkeit des Eluens einen Wert, der dem Maximum der n, δ -Kurve entspricht:

$$u_{\text{opt}} = \frac{1}{\delta} \sqrt{\frac{b}{c}} \quad (10)$$

Diese Geschwindigkeit ist identisch mit der im Minimum der h, u -Kurve, wie sie sich nach Gl. (4) errechnen läßt. Diese Geschwindigkeit, $u_{\text{opt}} = u_{\text{min}}$, resultiert für ein „niederviskoses“ Eluens aus Formel I zu

$$\delta u_{\text{min}} \approx 10 \left[\mu\text{m} \frac{\text{mm}}{\text{s}} \right] \quad (11)$$

und für ein „hochviskoses“ Eluens aus Formel II zu

$$\delta u_{\text{min}} \approx 5 \left[\mu\text{m} \frac{\text{mm}}{\text{s}} \right] \quad (12)$$

Als Ergebnis unserer Überlegungen halten wir also fest:

- 1) Maximale Effizienzen lassen sich bei gegebenem Druck und gegebener Analysenzeit nur dann erzielen, wenn man L und δ so wählt, daß man bei $u_{\text{min}} = u_{\text{opt}}$ arbeitet.
- 2) Die maximale Bodenzahl n_{opt} ist zur Wurzel von Druck und Analysenzeit proportional.
- 3) Die optimale Teilchengröße nimmt mit steigendem Druck ab [$\delta \sim (\Delta P)^{-0.25}$] und bei längeren Analysenzeiten zu [$\delta \sim t_0^{+0.25}$].

Das Arbeiten bei u_{min} hat weitere Vorteile:

- a) Die relative Bandenverbreiterung h ist bei u_{min} kaum noch eine Funktion des K' -Wertes. Hingegen nehmen bei Eluengeschwindigkeiten, die wesentlich größer als u_{min} sind (z. B. $u > 5 u_{\text{min}}$), die h -Werte mit steigenden K' -Werten sehr schnell zu.
- b) Da die relative Bandenverbreiterung bei u_{min} minimal ist, wird hier auch die maximale Peakhöhe erreicht. Dies ist besonders bei Spurenanalysen wichtig.

- c) Aufgrund der niedrigen Drücke, die bei u_{\min} erforderlich sind, wächst die Funktionsdauer der Säule.
- d) Bei konstanter Teilchengröße der stationären Phase wächst die Analysengeschwindigkeit mit zunehmender linearer Geschwindigkeit des Eluens (vgl. Fig. 1). Überraschenderweise ist aber die maximale Analysengeschwindigkeit bei $u_{\min} = u_{\text{opt}}$ zu erzielen, falls L und δ frei wählbare Parameter sind. Scheinbar bedeutet dies einen unzumutbar großen Aufwand an verschiedenen Säulen. Daß für die Praxis jedoch wenige Säulen ausreichen, wird anhand der Nomogramme gezeigt (siehe Abschnitt 4).

Optimale Analysengeschwindigkeit

Die Analysengeschwindigkeit nimmt mit zunehmenden Retentionen ab. Sie soll hier immer auf die der Inertprobe, n/t_0 , bezogen werden. Außerdem sollen ΔP und n als geforderte Randbedingungen angenommen werden. Löst man Gl. (9) nach t_0 [Gl. (A 10) bis (A 13)], so läßt sich n/t_0 als Funktion von δ errechnen [Gl. (A 15)]. Die Kurven in Fig. 4 und 5 sind Beispiele dafür.

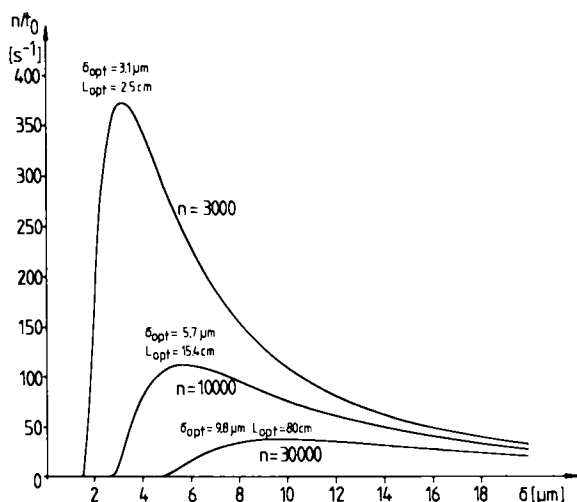


Fig. 4. Analysengeschwindigkeit als Funktion der Teilchengröße für „niederviskose“ Elutionsmittel bei $\Delta P = 30$ bar.
 $h = 1.5\delta + 6/u + \delta^2 u/16$, $\eta = 0.44$ cP, $\varepsilon_T = 0.82$.

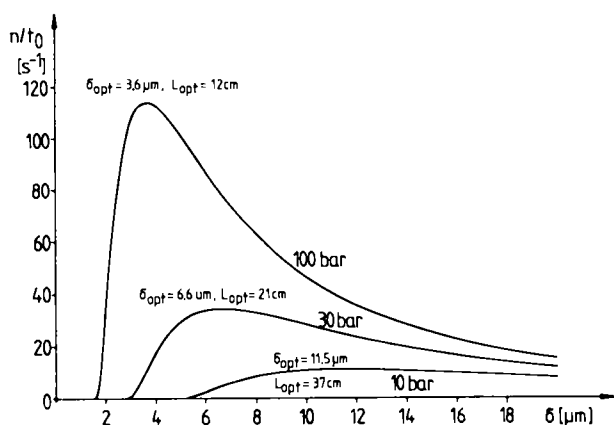


Fig. 5. Analysengeschwindigkeit als Funktion der Teilchengröße für „hochviskose“ Elutionsmittel bei $n = 10000$.
 $h = 2\delta + 3/u + \delta^2 u/8$, $\eta = 1.2$ cP, $\varepsilon_T = 0.70$.

Wiederum zeigt sich, daß optimale Arbeitsbedingungen – d. h. hier eine maximale Analysengeschwindigkeit – nur bei einer ganz bestimmten Teilchengröße und Säulenlänge

erreichbar sind. Diese werden durch die geforderte Bodenzahl und ΔP bestimmt.

Aus den Diagrammen 4 und 5 ist außerdem ersichtlich, daß unterhalb einer minimalen Teilchengröße die gewünschte Bodenzahl, mit vorgegebenem ΔP , ungeachtet der Analysengeschwindigkeit überhaupt nicht erreichbar ist. Die steile Abnahme von n/t_0 zu kleinen δ läßt sich einerseits dadurch erklären, daß u_{\min} nach Gl. (11) mit kleiner werdendem δ zunimmt; andererseits folgt aus Gl. (4):

$$h_{\min} = \delta(a + 1.22) \approx \delta(a + 1) \quad (13)$$

also ist h_{\min} eine lineare Funktion von δ . Zugleich nimmt aber die Permeabilität K mit dem Quadrat von δ ab. Zusammen bewirken diese Effekte, daß eine bestimmte Bodenzahl bei einem gegebenen ΔP unterhalb einer minimalen Teilchengröße nicht mehr erreichbar ist.

Auch aus Fig. 5 wird deutlich, daß in der Routineanalyse geforderte Bodenzahlen bereits mit relativ niedrigen Drücken bei guter Analysengeschwindigkeit erzielt werden können. Nimmt man z. B. eine C_{18} -Umkehrphase und ein H_2O/CH_3OH -Gemisch mit der hohen Viskosität von 1.2 cP und fordert 10000 theoretische Böden, so bricht mit $\Delta P = 30$ bar der Inertpeak nach 5 min durch. Dabei ist die Säule ca. 21 cm lang und mit $6.6 \mu m$ -Teilchen gepackt. Weiterhin ist ersichtlich, daß sich diese optimalen Analysenbedingungen mit Teilchengrößen von 5 bis 10 μm annähern lassen, wobei mit zunehmendem δ die Säule entsprechend verlängert werden muß. Auch dieses Beispiel mag illustrieren, daß häufig allzu hohe Anforderungen an den Ausgangsdruck der Pumpe gestellt werden. Arbeitet man bei hohen Drücken, so erhöhen sich die Kosten der Apparatur und die Funktionsdauer der Säulen nimmt ab.

Gl. (A 15), womit die $n/t_0 \delta$ -Kurve beschrieben wird, ist explizit schwer handhabbar. Numerisch läßt sich jedoch zeigen, daß das Maximum von n/t_0 – mit gegebenem n und ΔP – bei u_{\min} erreicht wird. Bedenkt man den Verlauf der $n/t_0 \cdot h \cdot u (\sim \Delta P)$ -Kurven in Fig. 1, so erscheint dieses Ergebnis angesichts der großen Steigung bei h_{\min} und u_{\min} recht unwahrscheinlich. Dieser scheinbare Widerspruch soll anhand eines einfachen Modells aufgelöst werden.

In einer hypothetischen HPLC-Säule soll der h -Wert keine Funktion der Geschwindigkeit und gleich h_{\min} sein, wie in Gl. (13) beschrieben und in Fig. 6 mit gestrichelter Linie eingezeichnet. Der Zusammenhang von Analysengeschwindigkeit und Teilchengröße läßt sich dann in folgenden Schritten ableiten:

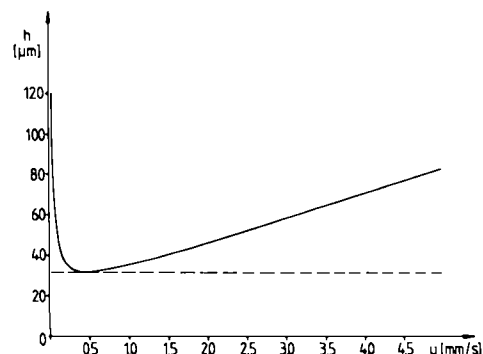


Fig. 6. h, u -Kurven für eine reale und eine hypothetische (gestrichelte Linie) HPLC-Säule.
Reale Säule: $\delta = 10 \mu m$, $\eta = 1.2$ cP. Die ausgezogene Kurve wurde nach Formel II [Gl. (6)] berechnet.

1) Da die Bodenzahl n konstant bleiben soll und $h = h_{\min}$ proportional zu δ ist [Gl. (13)], muß die Säulenlänge ebenfalls zu δ proportional bleiben ($L \sim \delta$).

2) Bei konstantem ΔP ist u proportional zu δ^2 und umgekehrt proportional zu L ($u \sim \delta^2/L$). Wegen $L \sim \delta$ bleibt also auch $u \sim \delta$.

3) Die Durchbruchzeit des Inertpeaks ($t_0 = L/u$) ist somit unabhängig von der Teilchengröße.

Da n als Konstante vorgegeben wurde, muß daher auch die Analysengeschwindigkeit n/t_0 von δ unabhängig und konstant bleiben.

In dieser hypothetischen Säule ist also die Analysengeschwindigkeit von der Teilchengröße der stationären Phase und der linearen Geschwindigkeit der mobilen Phase (n und ΔP sind konstant) unabhängig. In einer realen Säule ist h , außer bei u_{\min} , immer größer als h_{\min} . Da $n/t_0 \sim u/h$ ist, bedeuten größere h -Werte kleinere Analysengeschwindigkeiten.

Sind Bodenzahl und Druckabfall an der Säule als Grenzbedingungen vorgegeben, so wird die maximale Analysengeschwindigkeit bei u_{\min} erzielt. Selbstverständlich müssen Säulenlänge und Teilchengröße frei wählbare Parameter sein.

4. Graphische Bestimmung optimaler Parameter

Die Gleichungen für δ_{opt} , L_{opt} und n_{opt} [Gl. (A6)–(A8)] können so umgeformt werden, daß n_{opt} jeweils als Funktion von δ_{opt} und einem weiteren Parameter (ΔP_{opt} oder L_{opt} oder $t_{0,\text{opt}}$) erscheint. Mit diesen Beziehungen [Gl. (A16)–(A18)] kann man Nomogramme mit den Skalen δ , n , ΔP , t_0 und L konstruieren. Weitere Parameter, die sich aus diesen Größen ableiten lassen, sind u_{opt} , h_{\min} und n/t_0 . Sie sind nur eine Funktion von δ und mit den Gleichungen (10), (5) bzw. (6) und (A 18) zu berechnen. Dementsprechend können sie auf zur δ -Skala parallelen Achsen dargestellt werden und sind unterhalb der Nomogramme eingetragen. Dabei wird vorausgesetzt, daß 1) die Teilchengröße mit Gl. (2) definiert ist, 2) die h, u -Kurve nach Gl. (4) gilt und mit Gl. (5) oder Gl. (6) explizit beschrieben wird, 3) für die Viskosität des Eluens η und für die totale Porosität ε_T Standardwerte angenommen werden.

Mit Gl. (5, 6) wird eine gute Packungstechnik vorausgesetzt, wie sie heute für Säulen mit Innendurchmessern von ca. 2 bis 8 mm und Längen von 10 bis 50 cm sowie für Teilchengrößen von ca. 3 bis 30 μm reproduzierbar ist. Auch sollen die Säulen ohne Verlust bei den h -Werten miteinander koppelbar sein.

Die Nomogramme für „niederviskose“ bzw. „hochviskose“ Elutionsmittel zeigen Fig. 7 und Fig. 8. Diese Nomogramme umfassen einen weiten Bereich, z. B. Teilchengrößen bis 100 μm und Bodenzahlen bis zu 10^6 . Ausschnitte aus diesen Abbildungen, die den derzeit interessanten HPLC-Arbeitsbereich zeigen, sind in Fig. 9 bzw. Fig. 10 wiedergegeben. Die bei der Konstruktion der Nomogramme konstant gehaltenen Standardwerte sind aus den Abbildungen zu entnehmen.

Von den im Nomogramm eingetragenen fünf Parametern (Koordinatenachsen) sind zwei beliebige frei wählbar. Für die übrigen kann dann eine optimale Kombination abgelesen werden.

Das Trennproblem (die relativen Retentionen) soll beispielsweise ein Trennsystem – Silicagel/Dichlormethan – mit einer Trennleistung von 100 000 theoretischen Böden erfordern. Seine Bewältigung soll zuerst mit einer 50 cm langen Säule (oder mit einer Kombination von zwei 25 cm langen Säulen) versucht werden. Aus dem Nomogramm in Fig. 7 ist abzulesen, daß hierzu eine Packung von ca. 2 μm (1.84 μm)-Teilchen und ein Druckabfall von fast 3000 bar (2850 bar) notwendig sind. Die in Klammern angeführten exakten Werte wurden mit den entsprechenden Gleichungen [(A 17) und (A 16)] errechnet. Diese Bedingungen sind weder nach dem heutigen Stand der Technik realisierbar, noch aus prinzipiellen Gründen^[42] empfehlenswert. Die sonst vorzüglichen Werte von $t_0 \approx 1.5$ min [93.8 s aus Gl. (A 18)] und damit $n/t_0 = 1070/\text{s}$ sind deshalb nur noch von theoretischem Interesse.

Da beim hier erörterten Trennproblem die erforderliche Bodenzahl mit $n = 100\,000$ vorgegeben ist, erscheint es zweckmäßig, die apparative Beschränkung im Druckabfall als zweiten frei wählbaren Parameter zu berücksichtigen. ΔP -Werte von 300 bar sind für moderne kommerzielle Geräte kein Hindernis. Mit den beiden Annahmen $n = 10^5$ und $\Delta P = 300$ bar führt das Nomogramm zu $\delta \approx 5.7$ μm , $L \approx 150$ cm, $t_0 \approx 900$ s und $n/t_0 = 110/\text{s}$. Diese Parameter scheinen akzeptabel zu sein. Ob unter solchen Bedingungen allerdings die Nachweisgrenze für die getrennten Peaks noch ausreichend ist, kann man experimentell am schnellsten beurteilen. Mit zunehmenden t_0 und K' nehmen die Peakhöhen ab und die Empfindlichkeit der Analyse sinkt. Die Folge kann sein, daß ein kleineres t_0 neben $n = \text{const.}$ als frei wählbarer Parameter im Nomogramm herangezogen werden muß.

Der große Vorteil der graphischen Darstellung zeigt sich darin, daß sehr schnell deutlich wird, ob ein Problem nach dem Stand der Technik lösbar ist, wo die kritischen Punkte liegen und welche Kompromisse man eingehen muß.

Anhand von Fig. 10 sollen einige Probleme aus dem Bereich der alltäglichen Analytik diskutiert werden. Vorausgesetzt wird hierbei eine chemisch modifizierte Phase, z. B. eine C_{18} -Umkehrphase als stationäre Phase, und ein relativ „hochviskoses“ Eluens ($\eta = 1.2$ cP), z. B. $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$. Es kann wiederum demonstriert werden, daß im allgemeinen wesentlich geringere Drücke erforderlich sind, als üblicherweise vermutet und verwendet werden.

Nimmt man als frei wählbare Parameter eine erforderliche Bodenzahl von 10 000 und eine Säulenlänge von 15 cm an, so läßt sich aus dem Nomogramm in Fig. 10 ablesen, daß $\delta \approx 5$ μm und $\Delta P \approx 60$ bar notwendig sind. Mit einer Analysengeschwindigkeit $n/t_0 = 70/\text{s}$ wird der Inertpeak nach etwa 2.5 min durchbrechen.

Ist das Trennproblem einfacher und $n = 5000$ ausreichend, so kann man für $\delta = 10$ μm aus Fig. 10 folgende Werte entnehmen: Die Säulenlänge bleibt fast unverändert ($L \approx 16$ cm), die Analysenzeit steigt auf etwa das Doppelte ($t_0 \approx 5.5$ min, $n/t_0 \approx 15/\text{s}$), allerdings sinkt der Druckabfall auf nur noch 7 bar.

Wie diese Beispiele zeigen, sind unsere Nomogramme (Fig. 7–10) ein grobes Raster zur Bestimmung optimaler Parameter. Für die Mehrzahl der Trennprobleme sollten zwei Säulenlängen von 10 und 25 cm sowie zwei Siebfraktionen mit $\delta = 5$ bzw. 10 μm ausreichen. Dabei sollten die Säulen ohne Erhöhung der h -Werte koppelbar sein.

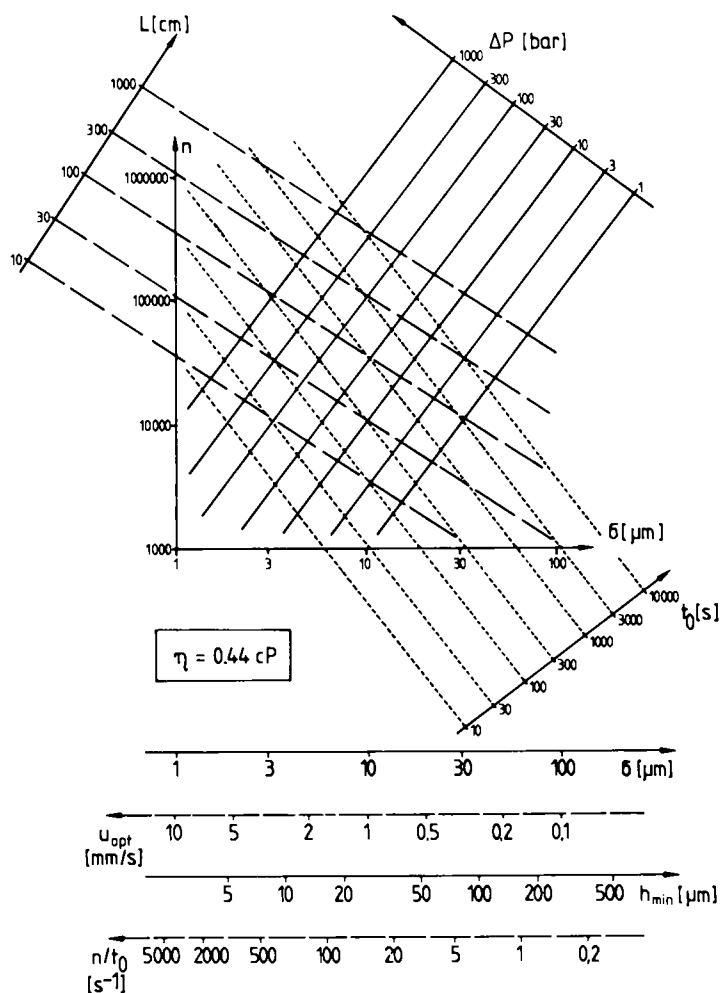


Fig. 7. Nomogramm: Optimale Parameter für „niederviskose“ Elutionsmittel, z. B. für das System Silicagel/Dichlormethan.
 $h = 1.5\delta + 6/u + \delta^2 u/16$ [Gl. (5)], $\eta = 0.44$ cP, $D_m \approx 3 \cdot 10^{-5}$ cm²/s, $\epsilon_T = 0.82$.

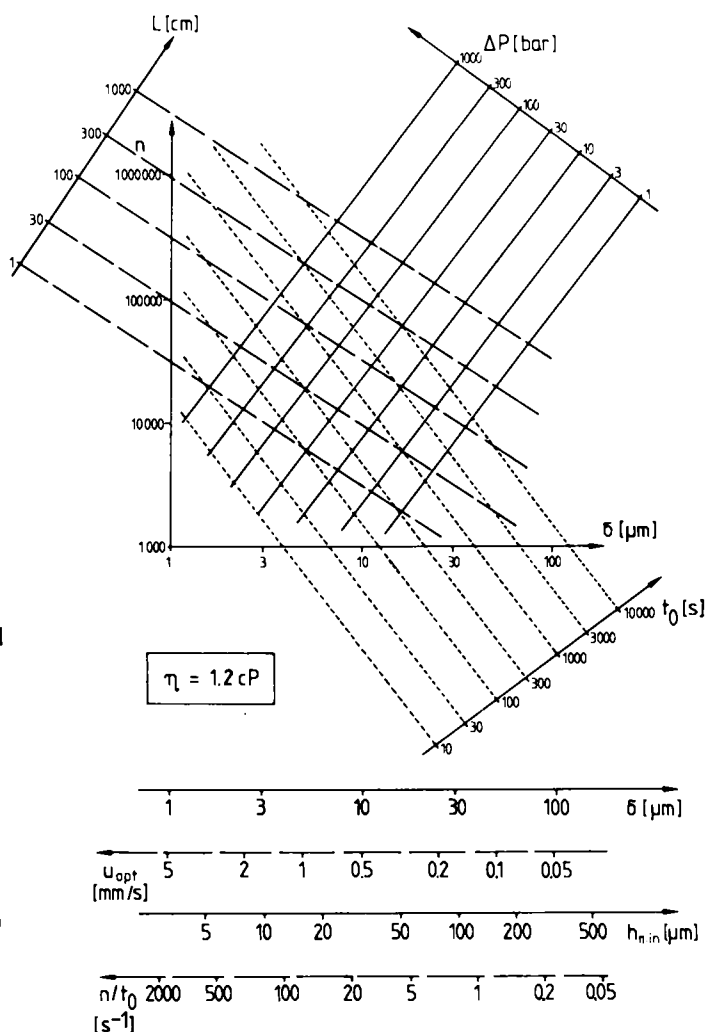


Fig. 8. Nomogramm: Optimale Parameter für „hochviskose“ Elutionsmittel, z. B. für das System C₁₈-Umkehrphase/Methanol-Wasser.
 $h = 2.6\delta + 3/u + \delta^2 u/8$ [Gl. (6)], $\eta = 1.2$ cP, $D_m \approx 1.5 \cdot 10^{-5}$ cm²/s, $\epsilon_T = 0.70$.

Folgt man unseren Überlegungen, so wird eventuell eine Vorratshaltung von etwa doppelt soviel Säulen wie bisher üblich nicht zu umgehen sein. Mit diesem geringen Aufwand erwirbt man jedoch die Vorteile der Optimierung:

Symbolverzeichnis:

a, b, c	Konstanten in Gl. (4)
As	Asymmetriefaktor [23]
D_m	Diffusionskoeffizient der Probe im Eluens
F	Flußgeschwindigkeit
$h = L/n$	Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens
h_{min}	h beim Minimum der h, u -Kurve
K_f	mit der Leerkolonnengeschwindigkeit definierte Permeabilität [Gl. (2)]
$K' = (t_R - t_0)/t_0 = t_R/t_0 - 1$	Kapazitätsverhältnis
L	Säulenlänge
n	Anzahl der theoretischen Böden
n/t	Analysengeschwindigkeit (Bodenzahl pro Zeiteinheit)
ΔP	Druckabfall an einer Säule
$R = (t_{R2} - t_{R1})/w$	Auflösung
r	Innenradius einer Kolonne
t_0	Elutionszeit einer Inert-Probe
t_R	Elutionszeit einer retardierten Probe
u	lineare Geschwindigkeit des Eluens
u_{min}	u beim Minimum der h, u -Kurve
V_i	Kolonnenleervolumen
V_m	Volumen des Eluens in der Säule
w	Zeitachsenabschnitt der Wendetangenten
$\alpha = k_2/k_1$	relative Retention
δ	chromatographisch definierte Teilchengröße [Gl. (2)]
ϵ_T	totale Porosität
η	Viskosität des Eluens

Mit optimierten Parametern sind nur selten Drücke über 150 bar erforderlich. Somit können billigere, einfachere und zuverlässigere Geräte für Routinearbeiten verwendet werden. Dies betrifft nicht nur die Pumpen, sondern auch in gleicher Weise die Probenaufgabe etc. Die Hersteller chromatographischer Geräte sind durchaus fähig und willens, derartige preiswerte Bauelemente anzubieten. Zur Zeit scheint jedoch – aus Prestigegegründen? – noch kein Bedarf dafür zu bestehen. Das mag verwundern, denn bekanntlich ist die Funktionsdauer der Säulen und damit die Reproduzierbarkeit der Analysen bei schonendem Betrieb wesentlich größer.

Um Mißverständnisse zu vermeiden, sei betont, daß die letzten Anmerkungen nicht auf Großgeräte zielen, wie sie für Methodenentwicklung, Forschung und zur Lösung komplizierter Probleme unentbehrlich sind. Hat man so anspruchsvolle Probleme zu lösen, so kann man die Grenzen des Erreichbaren ebenfalls anhand der Nomogramme in Fig. 7 und Fig. 8 sehr schnell abschätzen.

Randbedingung für die Ableitung der Nomogramme war die isokratische Arbeitsweise (konstante Temperatur, konstanter Druck, konstante Eluenszusammensetzung). Es sei noch darauf hingewiesen, daß einige Trennprobleme, die zur Zeit durch Gradientelution gelöst werden, auch unter isokratischen Bedingungen gelöst werden könnten. Bei der Berechnung der Analysenzeiten für die Gradientelu-

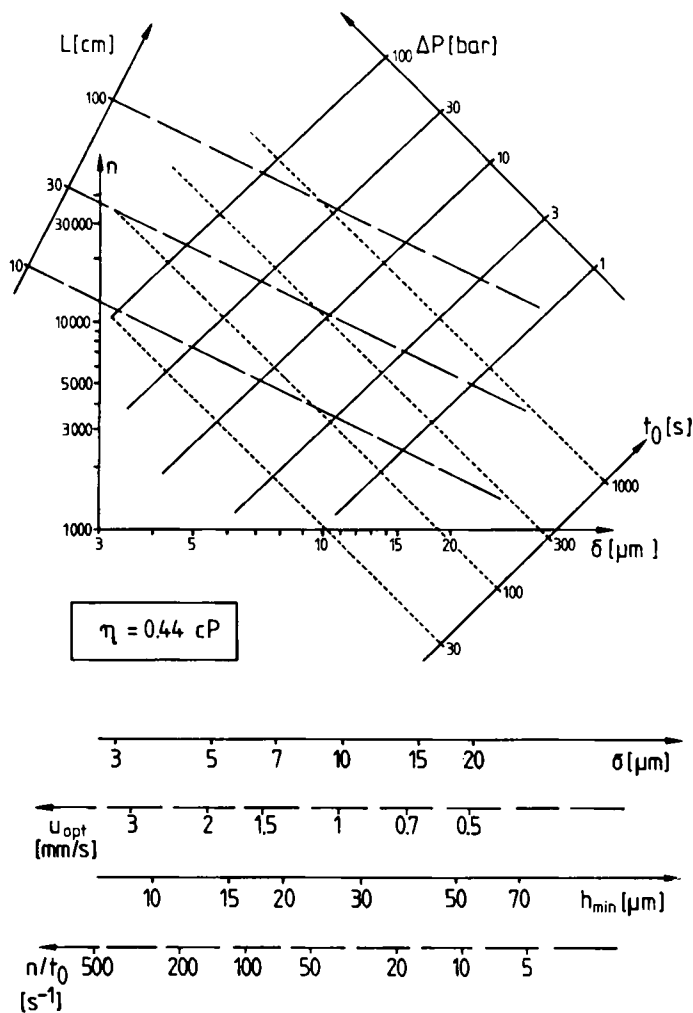


Fig. 9. Ausschnitt aus dem Nomogramm in Fig. 7 („niederviskoses“ Eluens).

tion sollte man die zur Regenerierung der Säule erforderliche Zeit nicht außer acht lassen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Nach einem kurzen Überblick über den gegenwärtigen Stand der Technik der schnellen Flüssigkeitschromatographie wurde das Auffinden optimaler Analysenbedingungen bei Gas- und bei Flüssigkeitschromatographie verglichen. Hierbei hat sich gezeigt, daß die optimale lineare Geschwindigkeit im Minimum der h, u -Kurve erzielt wird – und zwar sowohl dann, wenn die maximale Bodenzahl mit begrenzten ΔP und t_0 erreicht werden soll, als auch dann, wenn mit gegebener Bodenzahl und begrenztem Druck die maximale Analysengeschwindigkeit erreicht werden soll. Weitere Vorteile des Arbeitens bei u_{\min} wurden diskutiert. Bei von uns entwickelten Nomogrammen mit den Parametern: Bodenzahl (n), Teilchengröße (δ), Druckabfall an der Säule (ΔP), Durchbruchzeit des Inertpeaks (t_0) und Säulenlänge (L) sind zwei beliebige Parameter frei wählbar und eine optimale Kombination der übrigen Größen ablesbar. Da die Werte für u_{opt} , h_{\min} und n/t_0 mit δ festgelegt sind, können diese Werte als zusätzliche Achsen unterhalb der Nomogramme eingetragen werden. Wesentlichen Einfluß auf die optimalen Parameter hat die Viskosität des Eluens (Diffusionskoeffizient der Probe), sehr viel weniger

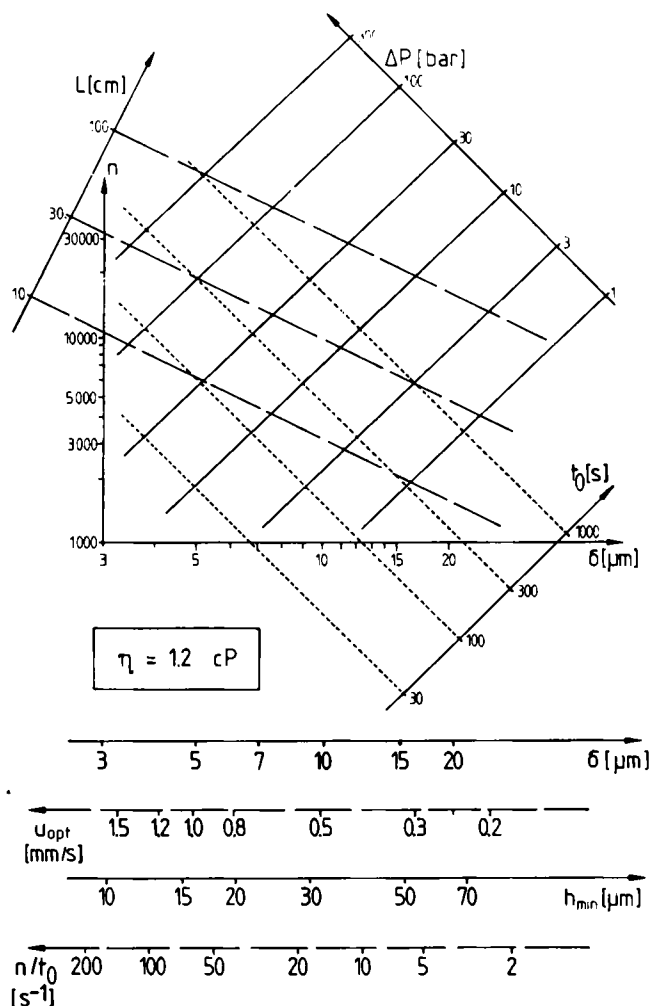


Fig. 10. Ausschnitt aus dem Nomogramm in Fig. 8 („hochviskoses“ Eluens).

dagegen die Art der stationären Phase. Die Nomogramme wurden für zwei typische Systeme konstruiert. Ihre Anwendungsmöglichkeiten versuchten wir an einigen Beispielen für einfache und komplizierte Trennprobleme zu demonstrieren. Dabei stellte sich heraus, daß zur Bewältigung von Routineproblemen wesentlich niedrigere Drücke genügen als häufig angenommen wird.

Schließlich wagen wir einen Ausblick auf einige interessant erscheinende Forschungsrichtungen.

Arbeitet man bei optimalen Bedingungen ($u = u_{\min}$), so nimmt die Analysengeschwindigkeit (d. h. die Anzahl der pro Zeiteinheit produzierten theoretischen Böden) mit abnehmender Teilchengröße ungefähr quadratisch zu. In der alltäglichen Praxis werden zur Zeit Säulen verwendet, die mit 10 μm - oder 5 μm -Teilchen gepackt sind. Neuerdings werden auch Säulen mit 3 μm -Teilchen angeboten. Hierbei muß die zunehmende Analysengeschwindigkeit mit der Lösung neu auftretender Probleme bezahlt werden. Mit abnehmender Teilchengröße nähert man sich immer mehr dem kolloidalen Bereich. Folglich wird die Koagulationswahrscheinlichkeit größer, die Packung der Säulen schwieriger und deren Reproduzierbarkeit und Funktionsdauer geringer. Mit abnehmender Teilchengröße werden die Säulen kürzer, falls konstante Bodenzahl gefordert wird. Arbeitet man mit unverändertem Kolonnendurchmesser, so werden die Peakvolumina kleiner und die Zellenvolumina der Detektoren müssen kleiner (etwa 1 μL) werden. Solche

Zellen mit unveränderter Empfindlichkeit zu bauen, ist zum Teil schwierig. Bemerkenswert erscheint, daß bei Verwendung von 5- μ m-Teilchen (Säule: $L = 10$ cm, Innendurchmesser 4 mm) mit den meisten kommerziellen Geräten wegen der Bandenverbreiterung außerhalb der Säule nur ein Bruchteil der möglichen Effizienz erreicht wird.

Das Packen von Säulen mit 1 mm Innendurchmesser ist schwierig, wird aber mehr oder weniger beherrscht. Die zuvor geschilderten apparativen Probleme (Probenaufgabe, Zellenvolumen) treten hier auch auf. Empfehlenswert sind derartige Säulen nur, falls entweder die zur Verfügung stehende Probemenge außergewöhnlich klein oder das optimale Eluens sehr teuer ist.

In der Gaschromatographie erwiesen sich die gepackten Kapillarkolonnen als vorteilhaft, da sie – verglichen mit den „klassisch“ gepackten Säulen – für gleiche Teilchengrößen der stationären Phase ähnliche Effizienz, aber eine etwa 10mal größere spezifische Permeabilität haben. Da in der Flüssigkeitschromatographie wesentlich größere Scherkräfte auftreten, ist die reproduzierbare Herstellung derartiger Trennsäulen anspruchsvoller und deren Funktionsdauer kürzer. Nach unseren Erfahrungen ist der Gewinn an Permeabilität, falls überhaupt erreichbar, wesentlich geringer als in der Gaschromatographie. Wegen der kleinen Peakvolumina lassen sich die schon erwähnten apparativen Probleme nicht vermeiden.

Es ist theoretisch zu zeigen (und experimentell zu beweisen), daß offene Röhren – auch Kapillarkolonnen genannt – nur dann in ihrer Effizienz mit den konventionell gepackten Säulen konkurrieren können, wenn ihr Innendurchmesser ca. 10 μ m beträgt. In der Literatur wird hauptsächlich die Bandenverbreiterung eines Inertpeaks diskutiert. Es ist aber bekannt, daß einerseits die reproduzierbare Aufbringung der stationären Phase aufgrund der Scherkräfte außergewöhnlich schwierig ist und andererseits die Bandenverbreiterung der retardierten Substanzen, verglichen mit dem Inertpeak, stärker zunimmt als bei den gepackten Säulen. Wegen der sehr geringen Probevolumina sind Zellenvolumina der Größenordnung Nanoliter und verlässliche Pumpen mit geringen Förderleistungen notwendig. Vorteilhaft sind die Kapillarkolonnen bei kleiner Probemenge und teurem Eluens. Wegen der technischen Schwierigkeiten erscheint es unwahrscheinlich, daß derartige Säulentypen schon bald in die alltägliche Praxis Eingang finden könnten.

Mit den heute verfügbaren Methoden kann man konventionelle Säulen bis zu etwa 50 cm Länge einwandfrei packen. Werden für schwierige Trennungen lange, gekoppelte Säulen gefordert ($n > 100\,000$), so verschieben sich die Minima der h, u -Kurven zu kleineren Geschwindigkeiten und der ansteigende Ast dieser Kurven wird steiler. Da die Werte für u_{min} mit zunehmenden Kapazitätsverhältnissen kleiner werden, nimmt die Analysengeschwindigkeit aus diesen beiden Gründen steil ab. In solchen Fällen wird die Analysenzeit bald untolerierbar lang. Will man gekoppelte Säulen mit etlichen Metern Länge einsetzen, so muß eine neue Packungstechnik entwickelt werden.

Die Auftrennung von Erdölfractionen, Naturstoffextrakten etc. ist oft schwierig, weil die Polaritätsskala der einzelnen Komponenten breit ist. Derartige komplizierte Gemische können mit der extrographischen Methode^[46] nach Polarität vorgetrennt werden (Probemengen von 30

bis 250 g innerhalb ca. 3 h). Die dabei erhaltenen Fraktionen lassen sich mit retentiver Chromatographie oder Ausschlußchromatographie weiter auftrennen.

Ist nur ein Bruchteil der Komponenten eines komplexen Gemisches zu erfassen, so bietet sich das Verfahren der Säulenschaltung (mit mehreren stationären Phasen und verschiedenen Elutionsmitteln) an, das als eine in-situ-Probenvorbereitung aufgefaßt werden kann. Bei Serienanalysen, z. B. im Bereich der Biochemie und Pharmazie, läßt sich damit die Analysenzeit wesentlich verkürzen.

In der Flüssigkeitschromatographie kann man praktisch ohne Verlust an Effizienz den Innendurchmesser der gepackten Säulen auf 50 mm und mehr erweitern. Bei präparativen Trennungen wird sehr oft die Probemenge pro Masseneinheit der stationären Phase sehr stark erhöht, und man arbeitet meistens nach den Prinzipien der Verdrängungs- und nicht nach denen der Elutions-Chromatographie. Bei entsprechender Arbeitsweise lassen sich so bemerkenswerte Reinheitsgrade und Ausbeuten erzielen.

Über quantitative Trennungen von Enantiomeren wird neuerdings des öfteren berichtet. Hierbei enthält entweder die chemisch modifizierte stationäre Phase optisch aktive Gruppen, oder dem Eluens werden optisch aktive Verbindungen zugesetzt. Selbstverständlich ist die erstgenannte Alternative für präparative Zwecke zu bevorzugen.

Die Aufnahme des gesamten UV/VIS-Spektrums als Funktion der Zeit ermöglichen die in den letzten Jahren angebotenen „diode array“-Detektoren. Die Absorption bei mehr als 500 Wellenlängen kann gleichzeitig und kontinuierlich mit 5 Hz und mehr aufgenommen und abgespeichert werden. Die notwendige Datenverarbeitung macht diese Geräte teuer, die angebotene „software“ ist noch nicht optimal. Das Auffinden der optimalen Wellenlängen für Routineanalysen ist schnell durchführbar. Verbergen sich mehrere Komponenten mit verschiedenen und bekannten Spektren unter einem Peak, so sind sie quantitativ erfassbar. Die Identifizierung getrennter Peaks ist sehr rasch möglich, da man das Spektrum zu einer gegebenen Zeit abrufen kann. Beträgt die Analysenzeit außergewöhnlich komplizierter Gemische einige Stunden und liegen die Absorptionsmaxima der Komponenten bei verschiedenen Wellenlängen, so ist ein derartiger Detektor fast unersetzlich.

Mit der Ausschlußchromatographie werden meistens Verbindungen mit hohem Molekulargewicht getrennt. Wegen deren kleinen Interdiffusionskoeffizienten sind die Bandenbreiten wesentlich größer als in der retentiven Chromatographie üblich. Hier wären ohne apparative Schwierigkeiten wesentlich bessere Auflösungen dadurch zu erzielen, daß man die heute gebräuchliche Teilchengröße von etwa 10 μ m wesentlich verringert.

Die Trennung und/oder Identifizierung der einzelnen Komponenten (oder Gruppen) erfordert oft mehrdimensionale Analysen. In zunehmendem Maße wird die schnelle Flüssigkeitschromatographie mit Massen-, Infrarot- und Kernresonanz-Spektroskopie gekoppelt. Zweifellos ist die „on line“-Kopplung schneller, eleganter, aber auch apparativ schwieriger. Da das Sammeln von HPLC-Fractionen einfach ist, wird es von Fall zu Fall zu entscheiden sein, ob „off line“- oder „on line“-Kopplung der Methoden vorzuziehen ist.

Nicht diskutiert wurde der langjährige Wunschtraum der Anwender der modernen Flüssigkeitschromatographie: Es sollte eine relativ einfache, verlässliche und stoffunspezifische Detektionsmethode gefunden werden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Anhang

Wie vorher gezeigt, sind die empirischen Basisgleichungen:

$$\delta = \sqrt{10^3 K_t} = \sqrt{\frac{10^3 \epsilon_T \eta u L}{\Delta P}} \quad (2)$$

$$h = a\delta + \frac{b}{u} + c\delta^2 u \quad (4)$$

Hierbei sollen a , b , c , ϵ_T und η als systemabhängige Konstanten behandelt werden. Die Größen h bzw. u werden durch L/n bzw. L/t_0 ersetzt, so daß die fünf Variablen n , t_0 , ΔP , L und δ auftreten. Mit den Definitionen

$$n = L/h \quad (A1)$$

$$u = L/t_0 \quad (7)$$

ergeben sich folgende zwei Gleichungen

$$L = \delta \sqrt{\frac{t_0 \Delta P}{10^3 \eta \epsilon_T}} \quad (8)$$

$$n = \frac{L}{a\delta + \frac{b t_0}{L} + \frac{c \delta^2 L}{t_0}} \quad (A2)$$

Damit läßt sich L als unabhängige Variable eliminieren.

$$n = \left[\frac{a \sqrt{10^3 \eta \epsilon_T}}{\sqrt{t_0 \Delta P}} + \frac{10^3 b \eta \epsilon_T}{\delta^2 \Delta P} + \frac{c \delta^2}{t_0} \right]^{-1} \quad (9)$$

Die Bestimmung des Maximums der n, δ -Kurve erfolgt durch Differenzieren:

$$\left(\frac{\partial n}{\partial \delta} \right)_{t_0, \Delta P} = 0 \quad (A3)$$

$$\left(\frac{\partial n}{\partial \delta} \right)_{t_0, \Delta P} = \frac{\frac{2c\delta}{t_0} - \frac{2 \cdot 10^3 b \eta \epsilon_T}{\delta^3 \Delta P}}{((\text{Gl. 9}))^2} \quad (A4)$$

Solange Gl. (9) $\neq 0$ bleibt – das gilt für den gesamten chromatographisch sinnvollen Bereich – ergibt sich für das Maximum

$$\frac{2c\delta}{t_0} - \frac{2 \cdot 10^3 b \eta \epsilon_T}{\delta^3 \Delta P} = 0 \quad (A5)$$

mit der physikalisch sinnvollen Lösung:

$$\delta_{\text{opt}} = \left[\frac{10^3 b \eta \epsilon_T}{c} \cdot \frac{t_0}{\Delta P} \right]^{1/4} \quad (A6)$$

Da für das Maximum ein weiterer Freiheitsgrad verlorengeht, erhält man folgende Gleichungen zweier Variabler:

$$L_{\text{opt}} = \left(\frac{b}{10^3 c \eta \epsilon_T} \Delta P t_0 \right)^{1/4} \quad (A7)$$

$$n_{\text{opt}} = \frac{1}{a + 2\sqrt{bc}} \sqrt{\frac{\Delta P t_0}{10^3 \eta \epsilon_T}} \quad (A8)$$

Aus Gl. (A7) folgt mit Gl. (7) für die lineare Geschwindigkeit im Maximum der n, δ -Kurve

$$u_{\text{opt}} = \left(\frac{b}{10^3 c \eta \epsilon_T} \cdot \frac{\Delta P}{t_0} \right)^{1/4} \quad (A9)$$

Löst man Gl. (A6) nach $\Delta P/t_0$ auf und setzt in Gl. (A9) ein, so erhält man:

$$u_{\text{opt}} = \frac{1}{\delta} \cdot \sqrt{\frac{b}{c}} = u_{\text{min}} \quad (10)$$

wie es in Abschnitt 3 diskutiert wurde.

Die Gleichung für die $n/t_0, \delta$ -Kurve in den Abbildungen 4 und 5 ergibt sich, wenn man Gl. (9) nach t_0 auflöst:

$$\sqrt{t_0} = -\frac{e}{2f} \pm \sqrt{\left(\frac{e}{2f}\right)^2 - \frac{g}{f}} \quad (A10)$$

mit

$$e = a n \sqrt{\frac{10^3 \eta \epsilon_T}{\Delta P}} \quad (A11)$$

$$f = \frac{10^3 b n \eta \epsilon_T}{\delta^2 \Delta P} - 1 \quad (A12)$$

$$g = c n \delta^2 \quad (A13)$$

Von den beiden Lösungen von Gl. (A10) ist nur die positive physikalisch sinnvoll. Auch diese zeigt zwei Äste mit einer Polstelle bei

$$\delta_{\text{pol}} = \sqrt{\frac{10^3 b n \eta \epsilon_T}{\Delta P}} \quad (A14)$$

Der Ast bei $\delta \leq \delta_{\text{pol}}$ ist physikalisch sinnlos.

Statt mit Gl. (A10) t_0 als Funktion von $n, \Delta P$ und δ darzustellen, kann der Kehrwert von dieser Gleichung gebildet und mit n multipliziert werden, so daß die Analysengeschwindigkeit n/t_0 als Funktion von $n, \Delta P$ und δ erhalten wird:

$$\frac{n}{t_0} = n \left[\frac{1}{2} \left(\frac{e}{f} \right)^2 - \frac{e}{f} \sqrt{\left(\frac{e}{2f} \right)^2 - \frac{g}{f} - \frac{g}{f}} \right]^{-1} \quad (A15)$$

Zur Berechnung der Nomogramme wurden die Gleichungen (A6), (A7) und (A8) so umgeformt, daß n_{opt} jeweils als Funktion von δ_{opt} und einem weiteren Parameter (ΔP_{opt} oder L_{opt} oder $t_{0, \text{opt}}$) erscheint:

$$n_{\text{opt}} = \frac{\sqrt{c/b}}{10^3 \eta \epsilon_T (a + 2\sqrt{bc})} \cdot \delta_{\text{opt}}^2 \Delta P_{\text{opt}} \quad (A16)$$

$$n_{\text{opt}} = \frac{1}{a + 2\sqrt{bc}} \cdot \frac{L_{\text{opt}}}{\delta_{\text{opt}}} \quad (A17)$$

$$n_{\text{opt}} = \frac{\sqrt{b/c}}{a + 2\sqrt{bc}} \cdot \frac{t_{0, \text{opt}}}{\delta_{\text{opt}}^2} \quad (A18)$$

Eingegangen am 26. März 1981 [A 393]

- [1] J. C. Giddings, *Anal. Chem.* 35 (1963) 2215.
- [2] J. C. Giddings: *Dynamics of Chromatography*, Vol. 1: Principles and Theory, Marcel Dekker, New York 1965.
- [3] J. F. K. Huber, G. van Vught, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 69 (1965) 821.
- [4] J. R. Parrish, *Nature* 207 (1965) 402.
- [5] D. S. Horne, J. H. Knox, L. McLaren, *Sep. Sci.* 1 (1966) 53.
- [6] J. H. Knox, *Anal. Chem.* 38 (1966) 253.
- [7] C. G. Horvath, S. R. Lipsky, *Nature* 211 (1966) 748.
- [8] C. G. Horvath, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1422.
- [9] J. F. K. Huber, J. A. R. Hulsman, *Anal. Chim. Acta* 38 (1967) 305.
- [10] K. P. Hupe, E. Bayer, *J. Gas Chromatogr.* 5 (1967) 197.
- [11] D. C. Locke, *J. Gas Chromatogr.* 5 (1967) 202.
- [12] R. P. W. Scott, D. W. J. Blackburn, T. Wilkins, *J. Gas Chromatogr.* 5 (1967) 183.
- [13] L. R. Snyder, *Anal. Chem.* 39 (1967) 698, 705.
- [14] T. W. Smuts, F. A. van Niekerk, V. Pretorius, *J. Gas Chromatogr.* 5 (1967) 190.
- [15] K. J. Bombaugh, W. A. Dark, R. F. Levangic, *Z. Anal. Chem.* 236 (1968) 443.
- [16] I. Halász, A. Kroneisen, H. O. Gerlach, P. Walking, *Z. Anal. Chem.* 234 (1968) 81, 97.
- [17] R. E. Jentoft, T. H. Gouci, *Anal. Chem.* 40 (1968) 1787.
- [18] J. J. Kirkland, *Anal. Chem.* 40 (1968) 391.
- [19] A. Zlatkis: *Advances in Chromatography*, Las Vegas 1969, Preston Technical Abstract Comp., Evanston, Ill. 1969; *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 7.

- [20] J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.* 10 (1972) 593.
 [21] R. E. Majors, *Anal. Chem.* 44 (1972) 1722.
 [22] W. Strubert, *Chromatographia* 6 (1973) 50.
 [23] J. Asshauer, I. Halász, *J. Chromatogr. Sci.* 12 (1974) 139.
 [24] I. Halász, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1428.
 [25] E. Wicke, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 69 (1965) 761.
 [26] I. Halász, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 77 (1973) 140.
 [27] R. Ende, I. Halász, K. Unger, *J. Chromatogr.* 99 (1974) 377.
 [28] R. Ohmacht, I. Halász, *Chromatographia*, im Druck.
 [29] R. Ohmacht, I. Halász, *Chromatographia*, im Druck.
 [30] I. Halász, H. Schmidt, P. Vogel, *J. Chromatogr.* 126 (1976) 19.
 [31] J. C. Giddings, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1027.
 [32] I. Halász, E. Heine in J. H. Purnell: *Progress in GC*, Wiley, New York 1968, S. 153.
 [33] H. D. Papendick, Dissertation, Universität Frankfurt am Main 1966.
 [34] T. W. Smuts, V. Pretorius, *Anal. Chem.* 44 (1972) 121.
 [35] M. Martin, G. Blu, G. Guiochon, *J. Chromatogr. Sci.* 11 (1973) 641.
 [36] M. Martin, C. Eon, G. Guiochon, *J. Chromatogr.* 99 (1974) 357; 108 (1975) 229; 110 (1975) 213.
 [37] M. Martin, C. Eon, G. Guiochon, *Res./Dev.* 26 (1975) 24.
 [38] J. H. Knox, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 352.
 [39] L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 441.
 [40] G. Guiochon in C. G. Horvath: *High-Performance Liquid Chromatography*, Academic Press, New York 1980, S. 1.
 [41] G. Görlitz, Diplomarbeit, Universität Saarbrücken 1977; I. Halász, Vortrag 12th Int. Symp. Advances in Chromatography, Amsterdam 1977.
 [42] I. Halász, R. Ende, J. Asshauer, *J. Chromatogr.* 112 (1975) 37.
 [43] I. Halász, *Z. Anal. Chem.* 277 (1975) 257.
 [44] H. Elgass, H. Engelhardt, I. Halász, *Z. Anal. Chem.* 294 (1979) 97.
 [45] G. Görlitz, I. Halász, *Talanta* 26 (1979) 773.
 [46] I. Halász, *Erdoel Kohle* 31 (1978) 485; B. Bogdoll, I. Halász, *ibid.* 34 (1981) Dezember-Heft.

ZUSCHRIFTEN

Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einsendung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vorzügliche Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

Wie ähnlich sind sich Tropochinone und Benzochinone?*

Von Rolf Gleiter*, Walter Dobler und Mirjana Eckert-Maksić

4,6-Cycloheptadien-1,2,3-trion **1**^[1] und 3,6-Cycloheptadien-1,2,5-trion **2**^[2] werden wegen der formalen Analogie mit *o*-Benzochinon **3** bzw. *p*-Benzochinon **4** auch als *o*-Tropochinon bzw. *p*-Tropochinon bezeichnet. Um festzustellen, wie weit die Ähnlichkeit de facto geht, haben wir die He(I)-Photoelektronen-(PE)-Spektren von **1** und **2** aufgenommen und sie mit den PE-Spektren von **3**^[3] und **4**^[4] verglichen (vgl. Fig. 1).

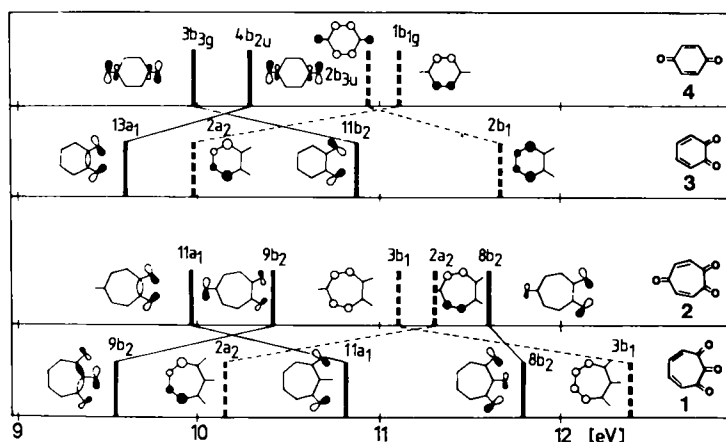


Fig. 1. Vergleich der ersten PE-Banden von 1-4.

Bei den *p*-Chinonen **4** und **2** findet man im PE-Spektrum (vgl. Fig. 1) dicht beieinander liegende Banden, die Ionisationen aus den n-Orbitalen ($3b_{3g}$, $4b_{2u}$ bei **4** und $11a_1$, $9b_2$ bei **2**) und den π -Orbitalen ($2b_{3u}$, $1b_{1g}$ bei **4** und $3b_1$, $2a_2$ bei **2**) entsprechen. Dagegen sind bei den *o*-Chinonen **3** und **1** die Banden, die Ionisationen aus n-Orbitalen ($13a_1$, $11b_2$ bei **3** und $9b_2$, $11a_1$ bei **1**) und π -Orbitalen ($2a_2$, $2b_1$ bei **3** und $2a_2$, $3b_1$ bei **1**) entsprechen, weit voneinander getrennt. Die große Ähnlichkeit zwischen Benzochinonen und Tropochinonen bezüglich der Lage der Kationenzustände (Fig. 1) beruht darauf, daß die relative Lage und die Wellenfunktionen der n- und π -Orbitale in beiden Systemen vergleichbar sind.

Der Vergleich der ersten angeregten Zustände fällt ähnlich aus: Man beobachtet zwischen der 1. Bande der Absorptionsspektren von **3** (16400 cm^{-1})^[8] und **4** (21800 cm^{-1})^[8] eine ähnliche hypsochrome Verschiebung wie bei den entsprechenden Banden von **1** (17800 cm^{-1})^[1] und **2** (22700 cm^{-1})^[2].

Eingegangen am 12. Juni 1981 [Z 949]
Angew. Chem. Suppl. 1982, 13

[*] Prof. Dr. R. Gleiter, W. Dobler, Dr. M. Eckert-Maksić
 Institut für Organische Chemie der Universität
 Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg 1

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der BASF AG unterstützt. Wir danken Prof. Shō Itō für Hinweise zur Synthese von **1** und **2**.

[1] M. Hirama, S. Itō, *Tetrahedron Lett.* 1975, 1071; M. Hirama, Y. Fukurawa, S. Itō, *ibid.* 1978, 1299.

[2] S. Itō, Y. Shoji, H. Takeshita, M. Hirama, K. Takahashi, *Tetrahedron Lett.* 1975, 1075; S. Itō, persönliche Mitteilung.