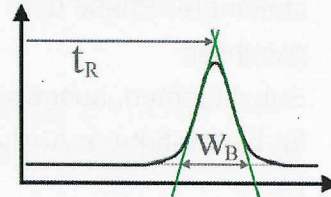


Trennmethoden Zusammenfassung

- LC

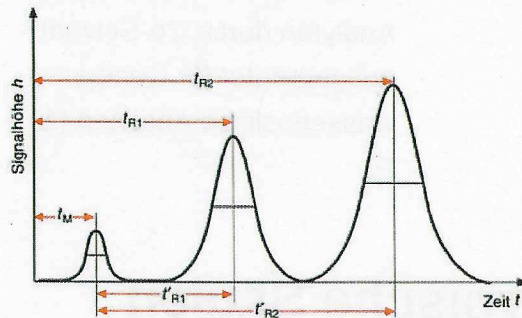
- Leistungsfähigkeit

- Höhere Peakintensität, Effizienz (mehr theoretische Platten) Mehr Auflösung (grössere Rs)



- Trennleistung

- Verbessern: anstatt voll porös Core shell oder superficially porous Partikeln. Sorgt für bessere Packung und Partikelgrößenverteilung \Rightarrow Besser Van Deemter Beziehung

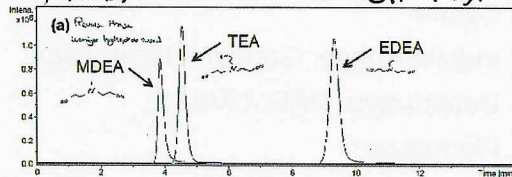


- Weiter verbessern: Kleinere Partikel, aber höherer Gegendruck und teurer Hardware

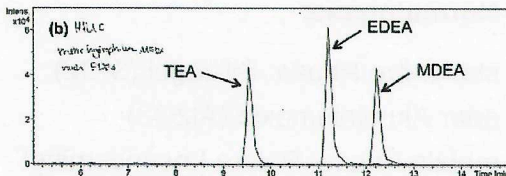
Elutionsreihenfolge EDEA $\text{HO} \sim \text{NH}_2$
 MEDA $\text{HO} \sim \text{NH}_2$ TEA $\text{HO} \sim \text{NH}_2$

- Rechnungen:

- Auflösung: $R = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_2 + w_1}$
- Boden Zahl: $N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$



- Gefahr bei Base: Lösen Trägermaterial auf



- IC

- IC: Analyse Ionen:

- Kapillarelektrophorese, HILIC, Elektrochromatographie,

- Aufgabe 2: Erklären Sie den (unterschiedlich ausgeprägten) Einfluss von Acetonitril auf die Trennung. (2 P)
 - Reduzierte hydrophobe Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und lipophilen Substituenten, ausgeprägter für hydrophobere Analyten (1 P)
 - Verbesserte Löslichkeit der Analyten durch Co-Solvent, ausgeprägter für weniger wasserlösliche Analyten (1 P)

Ionenchromatographie

- GC
 - Verbessern: Gradient anpassen (Langsamer chromatographieren), Säule verlängern, Durchmesser verkleinern, Filmdicke erhöhen
- Lerner
 - Zu basisch kann das Trägermaterial auflösen

Typische Säulen

- **HPLC:**

stationäre Phase: C18, Phenyl, Cyano

mobile Phase: Gradient, isokratisch
 Detektortyp: DAD, UV-Vis, Fluoreszenz

- **Normalphase:**

stationäre Phase: Silicagel (SiO₂) oder Aluminiumoxid (Al₂O₃)

mobile Phase: Polare Lösungsmittel wie Hexan, Ethylacetat, Dichlormethan in Kombination mit polaren Modifikatoren wie Methanol oder Ethanol

- **HILIC:**

stationäre Phase: Hydrophile Silicagelphasen, Diol, Amide oder andere polar-modifizierte Phasen
 mobile Phase: Polare Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol in Kombination mit wässrigen gepufferten Lösungen

- **Ionen-Austausch:**

stationäre Phase: Phasen mit ionogenen Gruppen wie Sulfonat (-SO₃⁻) oder Amin (-NH₂) ->Stichwort (Ionenchromatographie allg.): Ionenaustauschharze, Anionen-

- **Umkehrphase:**

stationäre Phase: C18 (Octadecylsilyl), C8 (Octylsilyl) oder C4 (Butylsilyl)

mobile Phase: Organische Lösungsmittel wie Acetonitril, Methanol oder Tetrahydrofuran in Kombination mit Wasser oder gepufferten Lösungen

- **Affinität:**

stationäre Phase: Affinitätsliganden, die spezifisch an die Zielmoleküle binden

mobile Phase: Pufferlösungen -
>Stichwort (Elutionsbedingungen): pH, Salzkonzentration
Detektortyp: UV-Vis, Fluoreszenz, MS

- **Supercritical fluid chromatography:**

stationäre Phase: modifiziertes Silicagel
mobile Phase: überkritischer CO₂ mit kleinem Anteil an Ethanol/Methanol -
>Stichwort: **CO₂**

- **Pufferlösungen (Bsp):**

Phosphatpuffer, Acetatpuffer, Citratpuffer, MES-Puffer
Wenn man nach den Liganden der stationäre Phase fragt ->zähle die verschiedenen Zusammensetzungen der stationären Phase auf

Kationen- Katalyse

mobile Phase: Salzlösungen mit variabler Konzentration, pH-Puffer
Detektor: Leitfähigkeitsdetektor, UV-Vis

- **Ausschluss:**

stationäre Phase: Gelmatrix mit Poren verschiedener Größen -
>Stichwort (Porengröße): 100 Å, 300 Å
mobile Phase: Pufferlösungen -
>Stichwort: THF, DMF, Dichlormethan
Detektortyp: RI, UV-Vis

- **Gaschromatographie:**

- 1. Kapillarsäule**

stationäre Phase: Polysiloxan Beschichtung ->Stichwort: **Siloxan, Kapillar**

mobile Phase: Trägergas (Helium oder Stickstoff)

- 2. Packed Säule ->Stichwort: Packed**

stationäre Phase: Silica gel
mobile Phase: Trägergas (Helium oder Stickstoff)

- **Injektionstyp:** Split, splitless, on-column

Detektortyp: FID (flame ionization detector), TCD (thermal conductivity detector), MS

Gelelektrophorese

- **SDS PAGE**
 - Gel-Typ: Polyacrylamidgel (oftmals Trenngele mit unterschiedlichem Prozentgehalt)
Laufpuffer: Tris-Glycin-SDS-Puffer
- **Isoelektronische Fokussierung**
 - Gel-Typ: IPG-Streifen (Immobilisierte pH-Gradienten)
Laufpuffer: Mischung aus sauren und basischen Puffern
- **2D Elektrophorese**
 - Kombination aus SDS-PAGE und Isoelektrischer Fokussierung
- **Capillary zone electrophoresis -**
>Stichwort: **mizellare elektrokinetische Chromatographie**
 - Kapillare: Quarzkapillare oder beschichtete Kapillare
Puffer: Laufpuffer mit geeignetem pH-Wert und Ionenstärke
- **Kapillargelelektrophorese**
 - Kapillare: Gel-gefüllte Kapillare mit Polyacrylamid oder Agarose
Puffer: Laufpuffer mit geeigneten Pufferkomponenten
- **Micellar electrokinetic capillary chromatography**
 - Kapillare: Unbeschichtete Kapillare
Puffer: Laufpuffer mit Elektrolyten und Mizellenbildnern
- **Trennung von Enantiomeren**
 - Chiralstationäre Phase: Chirale HPLC-Säulen oder chirale Gaschromatographie Säulen
Eluent: Chiraler Lösungsmittelzusatz
- **Kapillarelektrochromatographie**
 - **Warum erreicht man bei der Kapillar-Elektrophorese hohe Bodenzahlen?**
 - kleine Kapillarquerschnitte
 - hohe elektrische Feldstärke
 - geringe Diffusionswege (aufgrund der geringen Größe)
 - geringe Dispersionseffekte
 - gut Kontrolle über Trennbedingungen
- **Kapillarisolelektronische Fokussierung**
 - Kapillare: Beschichtete oder unbeschichtete Kapillare

Puffer: Laufpuffer mit geeigneten
pH-Wert-Gradienten

Cases

Wenn alkylierte polyzyklische Aromaten...

- Verwende Gaschromatographie v.a wenn bekannt ist dass man die gleiche...verwendet:
 - Technik
 - Dimension des Trennsystems
 - dieselbe mobile Phase
 - derselbe Temperatur-GradientWeil es darauf hinweist dass man eine kontinuierliche Methode verwendet (e.g GC) da alle Parameter gleich bleiben

Warum treten manchmal für ein Stoff mehrere Signale auf?

- wenn das Molekül ein chirales Zentrum besitzt bspw wenn zwei chirale Zentren vorhanden sind treten vier Enantiomere auf dh man sieht vier Signale

Class

Wann können wir die Klasse verwenden?

- Vererbung (Inheritance)
- wenn Klassen in Daten sind (z.B. Arrays, Strings, etc.)
- Objekte (Objects)
- Dimensionen der Programmierung
- Abstraktion (Abstraction)
- Polymorphie (Polymorphism)
- wenn es darum geht, Klassen zu erstellen
- wenn es darum geht, Klassen zu verwenden
- wenn es darum geht, Klassen zu erben
- wenn es darum geht, Klassen zu implementieren

Prüfungsaufgabe 3: Trennmethode

Naphthalendiole (Abbildung 1 und Tabelle 1) sind Zwischenprodukte von Azofarbstoffen und gelangen mit diesen als unerwünschte Nebenprodukte in Kosmetika und Haarpflegeprodukte. In zu hohen Konzentrationen führen sie aber zu Hautirritationen und Allergien. Einige Substanzen sind zudem teratogen und karzinogen. Die maximal zulässigen Gehalte sind deshalb durch den Gesetzgeber geregelt und müssen überwacht werden.

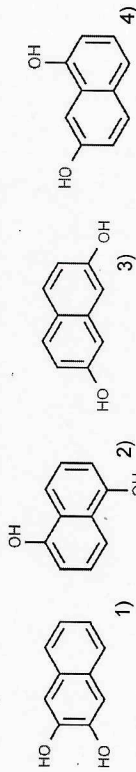


Abbildung 1: Chemische Strukturen von 1) 2,3-, 2) 1,5-, 3) 2,7- und 4) 1,7-Naphthalendiol.

Tabelle 1: Chemisch-physikalische Eigenschaften der Naphthalendiole

Name	pK _s ¹	log K _{ow} ²
1) 2,3-Naphthalendiol	9.10	2.11
2) 1,5-Naphthalendiol	9.28	1.96
3) 2,7-Naphthalendiol	9.14	1.98
4) 1,7-Naphthalendiol	9.58	1.94

¹abgeschätzt, <https://www.chemicalbook.com/>; ²abgeschätzt (ACD/LOGP), <http://www.chemspider.com>

Abbildung 2 zeigt zwei verschiedene Trennungen dieser Verbindungen. Folgende methodische Parameter wurden dabei angewendet:

- Verfahren 1) Flüssige Phase: Essigsäure (0.1%) mit einem stetig ansteigenden Anteil von Methanol, 1 mL/min Flussrate. Stationäre Phase: Octadecyl-modifizierte Silicapartikel (5 µm) in einer Kolonne mit 250 mm Länge und 4.6 mm Innendurchmesser. Injizierte Probenmenge: 10 µL.
- Verfahren 2) Flüssige Phase: 20 mM Na₂B₄O₇ / 50 mM Natrium Dodecylsulfat (pH 9.8). Stationäre Phase: Fused Silica Kapillare (Länge: 50 cm, Innendurchmesser 75 µm). Angelegte Spannung: 22 kV. Druckinjektion: 5 Sekunden mit 0.5 psi.

In beiden Fällen kam ein UV-Detektor bei 230 nm Wellenlänge zum Einsatz.

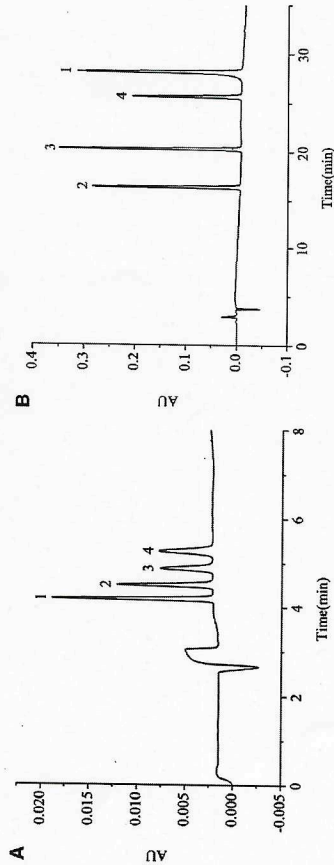


Abbildung 2: Trennung der Naphthalendiole mit zwei verschiedenen Verfahren (A, B). Peak-Zuordnung: 1) 2,3-Naphthalendiol, 2) 1,5-Naphthalendiol, 3) 2,7-Naphthalendiol, 4) 1,7-Naphthalendiol.

Frage 1: Welche generellen Separationstechniken und welche spezifischen Arten derselben kamen zum Einsatz (4 Punkte)? Begründen Sie Ihre Antworten.

- Flüssigchromatographie (1P), Reversed Phase (1P)
- Kapillarzonenelektrophorese (CE; 1P), Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC; 1 P)

Aufgabe 2: Ordnen Sie die verwendeten Verfahren den Abbildungen 2A und 2B zu und erklären Sie Ihren Entscheid. Argumentieren Sie einmal über die Dimensionen der Trennsysteme und einmal über die Wechselwirkungen der Analyten mit dem Trennsystem (3 Punkte).

- 1 Punkt für korrekte Zuordnung
- Je 1 Punkt für die jeweils korrekte Erklärung
- Abb. 2A: MEKC. Erklärung: Analytensignal deutlich geringer, kürzere Elutionszeit. Trennung in Abhängigkeit der Deprotonierung: stärker deprotonierte Spezies bewegen sich im elektrischen Feld schneller (insb. Analyt 1 vs. 4)
- Abb. 2B: RP-HPLC. Erklärung: höheres Analytensignal, da deutlich mehr eingespritzt, vollständig ungeladenen Spezies nach Hydrophobizität und insbesondere nach Interaktionsmöglichkeiten mit Octadecyl-Ketten (insb. Analyt 1 vs. 2)

Aufgabe 3: Nennen Sie zwei weitere Separationstechniken, bzw. Trennmechanismen, welche die Trennung von geladenen Analyten erlauben (1 Punkt).

- Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)
- Kapillar Elektrochromatographie
- Ionenchromatographie

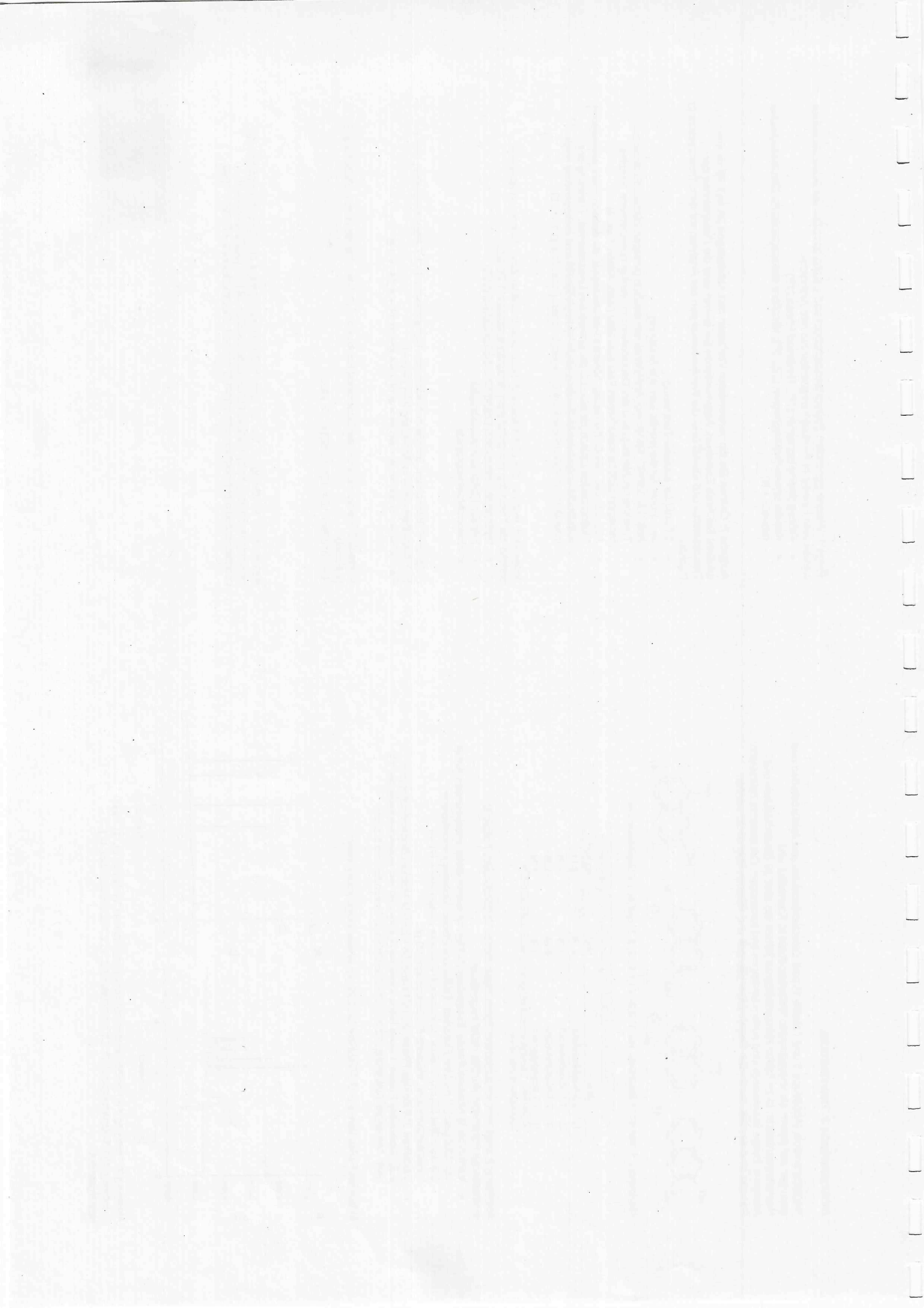
Aufgabe 4: Berechnen Sie die Auflösung des Signalpaares 3 (2,7-Naphthalendiol) und 4 (1,7-Naphthalendiol) in Abbildung 2A (1 Punkt).

$$R_s = 2 \cdot (t_{r,b} - t_{r,a}) / (w_{b,a} + w_{b,b}) = 2 \cdot (5.25 - 4.85) / (0.25 + 0.25) = 1.6$$

Aufgabe 5: Berechnen Sie die Bodenzahl für Analyt 1 (2,3-Naphthalendiol) in Abbildung 2A (1 Punkt).

$$N = 16 \cdot (t_r/w_b)^2 = 16 \cdot (4.2/0.2)^2 = 7056$$

Referenz: Li, X., Zheng, Z., Liu, Z., Gao, Y. 2020 Development of a micellar electrokinetic capillary chromatography method for the determination of four naphthalenediols in cosmetics and a comparison with a HPLC method. Electrophoresis 41, 1991-1999.



Analytik Trennmethode ZSF

GC
 Fused Silica Kapillarsäule (Siloxan) Apolare stationäre Phase *Temp.-gradient*
 Analysesubstanzen Duftstoffe, Organochlor-Pestizide, PCB's, Rohöl-Fraktionierung, *semi-volatil*

LC (allg.)
 Stationäre Phase Kieselgel (Silica, SiO₂), Partikelgrösse 1 - 300 µm (analytischer Bereich: 1 - 5 µm)
 Analysesubstanzen anorganische Ionen, Peptide, organische Säuren

NORMALPHASEN-Chromatographie

Stationäre Phase polar
 Mobile Phase unpolar + polare Co-Solvents
 Elutionsreihenfolge zuerst unpolar, dann polar *hydrophob vor hydrophil*
 Vorteil
 - kann auch 3D-Unterschiede in Molekülen separieren (z.B. Stereoisomere)
 - geringerer Flusswiderstand/Druck
 - gut bei stark unpolaren Analyten (schneller)
 Nachteil
 - Anfällig für Auswaschung
 - mobile Phase gesättigt mit stationärer Phase

Bsp.: Säule - XAmide (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm); mob. Phase - Isopropanol & n-Hexan Gradient: 0-50 min: 10-60% *+ Silica Interaktion*

HILIC (Hydrophilic Interaction (Liquid) Chromatography)

Stationäre Phase polar/neutral/geladen
 Mobile Phase überwiegend organisch; immer mit etwas Wasser
 Elutionsreihenfolge zuerst unpolar, dann polar *hydrophiler zuerst*
 Verwendung *kleine polare, hydrophile, ionisierbare Verbindungen* *Deprotomische Spezies*
 Bsp.: Säule - 150 x 2.1 mm i.D., 2.7 µm Partikeldiameter; mob. Phase - Acetonitril (ACN)/Ammoniumacetat (15 mM; pH = 4.8), Gradient von 90% auf 50% ACN

↳ Bei Aufbindung R_s = 1.5, Bodenzahl n = 276

UMKEHRPHASEN-Chromatographie

Stationäre Phase unpolar
 Mobile Phase polar: überwiegend wässrig, mit etwas org. Anteil *hydrophil vor hydrophob*
 Elutionsreihenfolge zuerst polar, dann unpolar *weniger hydrophobe zuerst*
 Säulen C8/C18. 0.1 log(K_{OW})-Einheiten reichen als Diff. Aus, um 2 Substanzen auf C18 zu trennen.

Bsp.: Säule - RP HPLC; 150 x 1.5 mm i.D., 5 µm Partikeldurchmesser; mob. Phase - Ammoniumhydroxid (3 mM; pH = 10.5)/Methanol, isokratisch 75:25 (v/v)

HPLC

normale Säule *Station C18*
 150 mm, 4.6 mm i.D., Silica-Partikel, vollporös, Partikelgrösse 5 µm, Porosität 0.7
 Fliessgeschw. 1 ml/min, T = 30°C

sonstiges
 - Mischung von mobilen Phasen möglich (Gradienten-Elution)
 - mobile Phase bringt Analyt zu Partikel hin aber nicht rein. Analyt diffundiert in Poren rein

V_{inj} 20 µm

UHPLC V_{inj}: 1.4 µm, 10x schneller, 10x empfindlicher. Probleme: schnelle Detektoren nötig, kleine t₀

IC (I-Austausch-C) Ionen

Anionen-Tauscher	Stark: -NR ₃ ⁺ OH ⁻	Schwach: -NH ₂ , -NRH, -NR ₂	$R^+OH^-_{(s)} + Cl^-_{(w)} \rightleftharpoons R^+Cl^-_{(s)} + OH^-_{(w)}$
Kationen-Tauscher	Stark: -SO ₃ ⁻ H ⁺	Schwach: -COOH, -PO ₃ H ₂ , -Phenol	$R^-H^+_{(s)} + Na^+_{(w)} \rightleftharpoons R^-Na^+_{(s)} + H^+_{(w)}$

Einflussf. Selektivität
 - Multivalente Ionen > Monovalente Ionen
 - Kleine Hydrathülle > grosse Hydrathülle
 - gute Polarisierbarkeit > schlechte Polarisierbarkeit

Elutionsreihenfolge eluiert später > eluiert früher

Suppressionskolonnen Tausch-Kolonnen der anderen Ladung, um LFK-Detektion zu verbessern

Semiperm. Membran besserer Suppressor als Anti-Kolonnen

Phasen z.B. stationär: Kieselgel mit Carboxylgruppen, Dim.: 250 mm x 4 mm I.D., 5 µm;
 mobil: 2.5 mM Salpetersäure & ACN; 0%, 1%, 4%

Ausschlusschromatographie

Modi - Gruppentrennung (z.B. Entsalzung) *z.B. AgNP (10, 20, 40 nm) unterschiedliche hydrodynamisch*
zugänglichkeit der Poren d. lassen Phase für Partikel
unterschiedlich gross

Mobile-Phase:

Stationäre Phase - Fraktionierung (Trennung nach Grösse) -> Separation von Makromolekülen
porös (vernetzte Polymere, deaktiv. Silica, poröse Partikel) -> manchmal variable Porenweite
Trennmechanismus +: bessere Auflösung | -: Gefahr irreversibler Sorption (Verluste, Verstopfung)
keine Interaktion mit st. Phase, sondern: Poren, welche nur für kleine Mol. zugänglich sind
-> Zusätzlicher Peak -> gelösten Metalle -> kleine Mol. später

Hydrodynamische Chromatographie -> Nano-Partikel / unterschiedliche Größen

Elutionsreihenfolge zuerst gross, später klein
Stationäre Phase nicht-porös
+: weniger Anfällig für Verluste | -: schlechtere Auflösung

Detektoren (HPLC)

UV-Absorptionsdet. - Variabler Wellenlängendet. empfindlich, unselektiv
- Diodenarray Det. unempfindlich, selektiv

Fluoreszenz-Det. selektiv & empfindlich

Massenspektrometer Ionisation nötig im Voraus
-> GC: e⁻-Ionisation (mit e⁻ bombardiert)
-> LC: Electrospray (ESI)

Ionensuppression LCMS | längst nicht alles an Analyt wird ionisiert, da störende (org.) Komponenten mit in Probe
=> reduziertes Analytsignal -> höhere NWG; Bias in Quantifizierung

-> Kompensation:
- Verdünnen (best!)
- Probenaufreinigung
- Kalibration d. Matrix
- interne, isotoopenmarkierte Standards

Festphasen-Extraktion (SPE)

Field-Flow Fraktionierung (FFF) Nano-Partikel


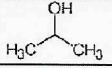
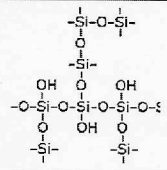
Trennmechanismus orthogonales Feld; kleine Partikel diffundieren schneller durchs Feld & gelangen zurück zu den schnellen Fließpfaden
Elutionsreihenfolge zuerst klein, später gross
Arten cross-Flow, thermisch, zentrifugal, elektrisch, SPLITT, Asymmetrische Fluss FFF (aF4)
Modi Brownsch (< 1 um), Sterisch (>1 um)
Vor-/Nachteile gute Wiederfindungsrate (theoretisch);
teuer, limitierte Trennleistung, Membran-Interaktionen
Detektor «Multi-Angle Light Scattering»

Kapillar-Elektrophorese (CE) -> Partikel unterschiedlicher Größe

Trennmechanismus fused Silica Kapillaren (unpolare stationäre Phase; neg. gel.; Vgl. GC),
verbindet Anode & Kathode; el. Feld anlegen. +-Ladgen legen sich an --Silica an
-> „Pfropfen“-Fluss (plug Flow; elektroosmotischer Fluss) und elektrophoretischer Fluss

Flüsse elektrophoretisch & elektroosmotisch
Analyten Anionen, Kationen, neutrale Vbdgen (simultan) Ionen
Vorteile geringe Probenmengen, kann alles gleichzeitig Separieren (s. Analyten)
Detektor Lichtmikroskop

Art der Analyten	mögliche Methoden
Geladen	IC HILIC (Kapillar)elektrophorese Elektrochromatographie
Neutral	Umkehrphasenchromatographie Normalphasenchromatographie

Mobile Phasen	
Acetonitril (ACN)	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$
Salpetersäure	
Ammoniumhydroxid	$\text{NH}_4^+ \text{OH}^-$
Ammoniumacetat	$\text{NH}_4^+ \text{CH}_3\text{COO}^-$
Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	$2\text{Na}^+ \left[\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{O}-\text{S}-\text{O} \\ \\ \text{O} \end{array} \right]^{2-}$
Isopropanol	
Stationäre Phasen	
Kieselgel = Silica	

Kapilarzonen Elektrophoresis, Mizellerelektrokinetische Chromatographie

Reaction	Reagents	Product
1	H_2SO_4	<chem>CC1=CC=CC=C1</chem>
2	HNO_3	<chem>O=[N+]([O-])c1ccccc1</chem>
3	$\text{H}_2\text{SO}_4, \text{HNO}_3$	<chem>O=[N+]([O-])c1ccc(O)cc1</chem>
4	$\text{H}_2\text{SO}_4, \text{HNO}_3, \text{H}_2\text{O}$	<chem>O=[N+]([O-])c1ccc(O)cc1</chem>
5	$\text{H}_2\text{SO}_4, \text{HNO}_3, \text{H}_2\text{O}$	<chem>O=[N+]([O-])c1ccc(O)cc1</chem>
6	$\text{H}_2\text{SO}_4, \text{HNO}_3, \text{H}_2\text{O}$	<chem>O=[N+]([O-])c1ccc(O)cc1</chem>
7	$\text{H}_2\text{SO}_4, \text{HNO}_3, \text{H}_2\text{O}$	<chem>O=[N+]([O-])c1ccc(O)cc1</chem>
8	$\text{H}_2\text{SO}_4, \text{HNO}_3, \text{H}_2\text{O}$	<chem>O=[N+]([O-])c1ccc(O)cc1</chem>

Reaction of benzene with H_2SO_4 and HNO_3 to form nitrobenzene and nitrobenzene sulfonic acid.

Prüfungsaufgabe 3: Trennmethode

Die Trennung von Polymeren unterschiedlicher Molekulargewichte ist analytisch herausfordernd. Zweidimensionale Trennverfahren können hier Vorteile bringen. Abbildung 1 zeigt die zweidimensionale Trennung dreier Polystyrol-Polymere mit unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen 72 und 277 kg/mol.

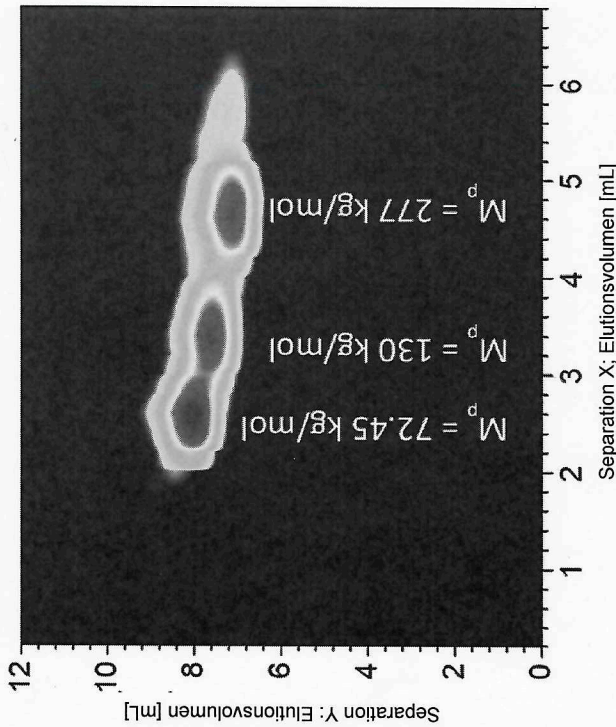


Abbildung 1: Trennung dreier Polystyrol-Polymere unterschiedlicher Molekulargewichte über zwei Dimensionen. Die Signalintensität ist als Farbcode in der dritten Dimension dargestellt (rot entspricht der höchsten Intensität, blau der geringsten).

Folgende methodische Parameter wurden dabei angewendet:

Verfahren A: Mobile Phase: Tetrahydrofuran 0.08 mL/min. Stationäre Phase: ein Kanal mit Länge x Breite x Höhe = 45,6 cm x 2,0 cm x 127 µm. Das Temperaturgefälle zwischen der Ober- und Unterseite des Kanals wurde über die Zeit wie folgt variiert: t = 0 min: ΔT = 50 °C, t = 40 min: ΔT = 50 °C, t = 60 min: ΔT = 0 °C, t = 75 min: ΔT = 0 °C.
 Verfahren B: Mobile Phase: Tetrahydrofuran 4,8 mL/min. Stationäre Phase: 5 µm Styrol-Divinylbenzol-Kopolymer Partikel mit variabler Porenweite in einer Kolonne mit 50 mm Länge und 20 mm Innendurchmesser.

Die beiden Verfahren wurden über ein Transfer-Ventil online gekoppelt. Das Eluat der ersten Trennung (X-Achse) wurde in Portionen von 0,2 mL der zweiten (Y-Achse) zugeführt.

In beiden Fällen kam ein Lichtstreuendetektor zum Einsatz.

Frage 1: Welche generellen Separationstechniken und welche spezifischen Arten derselben kamen zum Einsatz (2 Punkte)? Begründen Sie Ihre Antworten.

- Feld-Flow Fraktionierung (FFF; ½ P), Thermische FFF (½ P)
- Flüssigchromatographie (½ P), Ausschusschromatographie (½ P)

Aufgabe 2: Ordnen Sie die verwendeten Verfahren A und B den beiden Dimensionen X und Y zu und erklären Sie Ihren Entscheid (3 Punkte).

- 1 Punkt für korrekte Zuordnung
- Je 1 Punkt für die jeweils korrekte Erklärung
- Dimension X: Verfahren A (Thermische FFF). Erklärung: Das Polymer mit dem geringsten Molekulargewicht und damit dem geringsten hydrodynamischen Durchmesser, bzw. dem grössten Diffusionskoeffizienten (welcher dem orthogonalen Gradienten am stärksten entgegenwirkt) eluiert zuerst.
- Dimension Y: Verfahren B (Ausschlusschromatographie): Erklärung: Das Polymer mit dem grössten Molekulargewicht eluiert zuerst. Für dieses sind die kleineren Poren der stationären Phase am wenigsten zugänglich.

Frage 3: Welche der beiden Trennmethode zeigt unter den vorliegenden Bedingungen die bessere Trennleistung? Welches sind die Gründe für die beschränkte Trennleistung der schwächeren Methode (2 Punkte)?

- Die Thermische FFF. Entlang der X-Achse sind die beiden schwereren Polymere fast basisliniengetreunt. Entlang der Y-Achse herrscht praktisch Co-Elution.
- Die Ausschusschromatographie musste hier wegen der Online-Kopplung besonders schnell gefahren werden und wurde zudem mit Partikeln variabler Porosität betrieben.

Aufgabe 4: Nennen Sie zwei alternative orthogonale Gradienten für das Verfahren A (1 Punkt).

- Fluss FFF
- Zentrifugale FFF
- Elektrische FFF

Aufgabe 5: Nennen Sie zwei weitere Separationstechniken, bzw. Trennmechanismen, welche die Trennung von Analyten unterschiedlicher Grösse erlauben. Denken Sie dabei auch an präparative Ansätze (1 Punkt).

- Hydrodynamische Chromatographie
- Kapillar Gel Elektrophorese
- Zentrifugation
- Filtration

Referenz: Viktor, Z., Pasch, H. 2020 Two-dimensional fractionation of complex polymers by comprehensive online-coupled thermal field-flow fractionation and size exclusion chromatography. Analytica Chimica Acta 1107, 225-232.





Prüfungsfrage 3: Trennmethode

Atmosphärische Amine (Abbildung 1) tragen zur Keimbildung und Wachstum von Partikeln und sekundären Aerosolen in der Atmosphäre bei und beeinflussen das Strahlungsverhalten der Erdatmosphäre. Sie haben natürliche wie anthropogene Quellen und sind ubiquitär in Konzentrationen bis über 200 mg/m³ vorhanden. Unter Umweltbedingungen liegen sie protoniert vor, mit pK_a Werten zwischen 8 und 11.

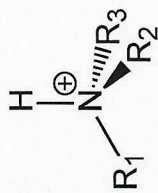


Abbildung 1: Chemische Struktur der Amine. R₁-R₃: siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Ausgewählte Amine und ihre Substituenten^a

Peak Nr. ^b	Name	R ₁	R ₂	R ₃
4	Methylamin	H	H	CH ₃
6	Dimethylamin	H	CH ₃	CH ₃
11	Trimethylamin	CH ₃	CH ₃	CH ₃
5	Ethylamin	H	H	CH ₂ CH ₃
10	Diethylamin	H	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃
8	Propylamin	H	H	(CH ₂) ₂ CH ₃
9	Butylamin	H	H	(CH ₂) ₃ CH ₃
3	Ethanolamin	H	H	(CH ₂) ₂ OH
7	Triethanolamin	(CH ₂) ₂ OH	(CH ₂) ₂ OH	(CH ₂) ₂ OH

^a chemische Struktur: siehe Abbildung 1. ^b siehe Abbildung 2.

Abbildung 2 zeigt verschiedene Trennungen dieser Verbindungen. Die verwendeten Phasen sind:

- Stationäre Phase: schwach saures Kieselgel mit Carboxylgruppen
- Mobile Phase: 2.5 mM Salpetersäure, mit unterschiedlichen Anteilen von Acetonitril (0%, 1%, 4%)

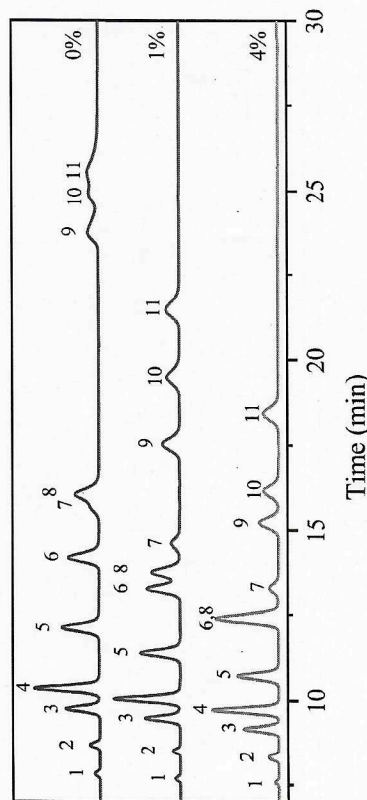


Abbildung 2: Trennung verschiedener atmosphärischer Amine. Die Peaknummern 3-11 beziehen sich auf die in Tabelle 1 bezeichneten Substanzen. Peak 1: Na⁺, 2: NH₄⁺

Frage 1: Welche Separationstechnik und welcher Verteilungsmechanismus/Trennmodus kamen zum Einsatz? Begründen Sie Ihre Antworten unter Einbezug der unterschiedlich retardierten Analyten. (3 Punkte)

- Chromatographie (1 P)
- Ionische Wechselwirkungen, Ionenchromatographie (1 P)
- Besser polarisierbare Analyten eluieren später (s.a. NH₄⁺ > Na⁺) (1 P)

Aufgabe 2: Erklären Sie den (unterschiedlich ausgeprägten) Einfluss von Acetonitril auf die Trennung. (2 P)

- Reduzierte hydrophobe Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und lipophilen Substituenten, ausgeprägter für hydrophobere Analyten (1 P)
- Verbesserte Löslichkeit der Analyten durch Co-Solvent, ausgeprägter für weniger wasserlösliche Analyten (1 P)

Frage 3: Welche weiteren Trennverfahren eignen sich für geladene Analyten? (2 Punkte)

- Chromatographisch: HILIC (1 P)
- Elektrophorese (1 P)

Aufgabe 4: Berechnen Sie die Auflösung des Signalpaares 6 & 8 in Abbildung 2 bei 1 % Acetonitril (mittlere Graphik). (1 Punkt)

$$R_s = 2 \cdot (t_{r,b} - t_{r,a}) / (w_{b,a} + w_{a,b}) = 2 \cdot (13.8 - 13.2) / (0.7 + 0.6) = 0.9$$

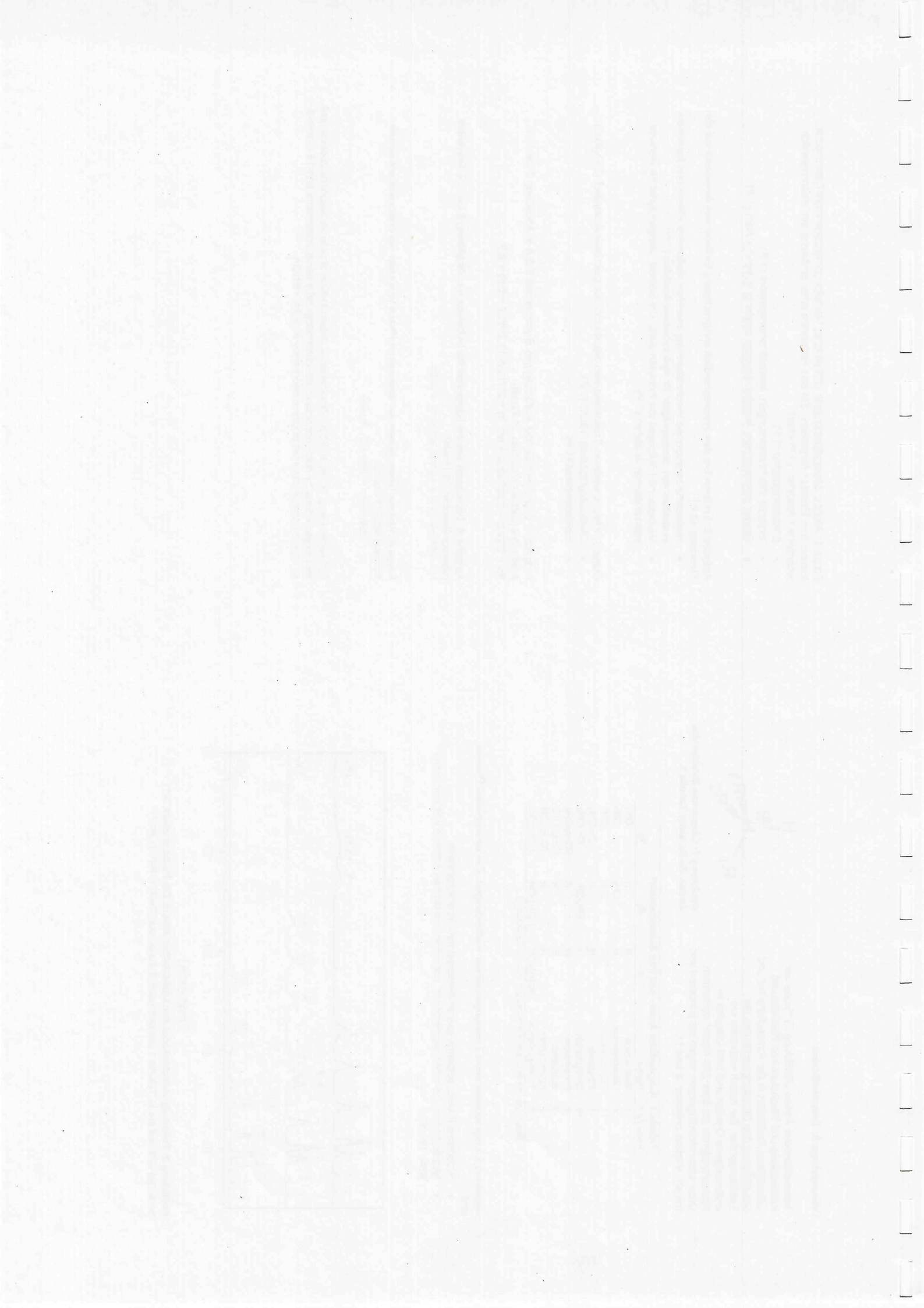
Aufgabe 5: Berechnen Sie die Bodenzahl für Substanz 4 in Abbildung 2 bei 0% Acetonitril (oberste Graphik). (1 Punkt)

$$N = 16 \cdot (t_r/w_b)^2 = 16 \cdot (10.4/0.5)^2 = 6900$$

Frage 6: Welche Dimensionen der stationären Phase vermuten Sie basierend auf diesen Kennzahlen? (1 Punkt)

- (250 mm x 4 mm I.D., 5 µm)

Referenz: Feng, H., et al. 2020 Simultaneous determination of nine atmospheric amines and six inorganic ions by non-suppressed ion chromatography using acetonitrile and 18-crown-6 as eluent additive. Journal of Chromatography A 1624, 461234.



Prüfungsfrage 3: Trennmethode

Arzneimittel wie Aspirin, Diclofenac und Ibuprofen (Tabelle 1) sind schmerzlindernd, fiebersenkend und/oder entzündungshemmend und gehören zu den am häufigsten eingesetzten Wirkstoffen. Ihr Nachweis in medizinischen Proben aber auch in der Umwelt ist damit von Relevanz.

Tabelle 1: Chemisch-physikalische Eigenschaften ausgewählter Arzneimittel.

Elutionsreihenfolge in Abbildung 1	Name	Log K _{ow} (Chemspider)	pK _s (Pubchem)
1	Acetaminophen (Paracetamol)	0.3	-4.4
2	Aspirin	1.1	3.5
3	Salicylic acid	2.2	3.0
4	Tolmetin	2.6	3.5
5	Ketoprofen	3.0	4.5
6	Naproxen	3.1	4.2
7	Fenoprofen	3.9	4.5
8	Diclofenac	4.0	4.2
9	Ibuprofen	3.8	5.3

Abbildung 1 zeigt zwei verschiedene Trennungen von Arzneimitteln mittels derselben Technik. Gleich sind auch die Dimensionen der Trennsysteme (4,6 mm x 150 mm, 5 µm Partikelgröße), die mobile Phase (isokratisches Laufmittel: 48% 20 mM Kaliumphosphat, pH 2.5, 52% Acetonitril/Methanol 50:50)), deren Fluss (2 mL/min), die verwendete Temperatur (35 °C) und das Injektionsvolumen.

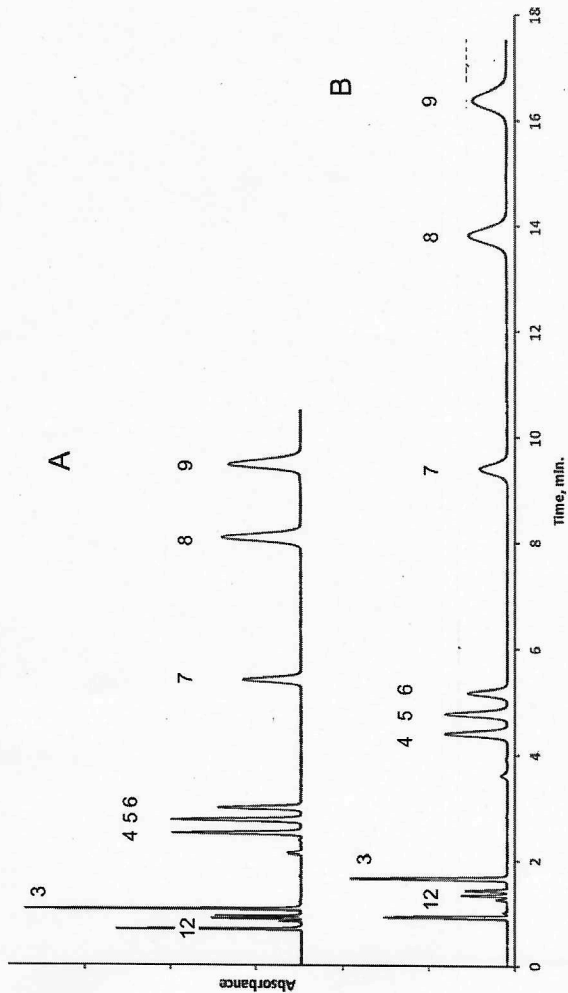


Abbildung 1: Trennung von Arzneimitteln mit zwei verschiedenen Systemen (A, B). Substanzen und deren Reihenfolge gemäss Tabelle 1 (der erste Peak entspricht der Totzeit).

Frage 1: Welche Separationstechnik und welcher Verteilungsmechanismus/Trennmodus kamen zum Einsatz? Begründen Sie Ihre Antwort. (2 Punkte)

- Chromatographie (1 P)
- Reversed Phase (wässrige Phase mit organischem Anteil) (1 P)
- Hydrophobere Verbindungen eluieren später

Frage 2: Unter den oben dargelegten Bedingungen und bei vergleichbarem Gegendruck ist eines der beiden Treffsysteme leistungsfähiger. Welches und weshalb? (2 Punkte)

- Das Obige (A)
- Höhere Peakkapazität
- Höhere Effizienz (mehr theoretische Platten, siehe unten)
- Höhere Auflösung (grössere Rs, siehe unten)

Frage 3: Wie wurde die höhere Trennleistung erreicht? (1 Punkt)

- Durch Verwendung von Core shell/superficially porous gegenüber voll porösen Partikeln. Dadurch bessere Packung und Partikelgrößenverteilung insgesamt verbesserte Terme der Van Deemter Beziehung.

Frage 4: Wie liess sich die Trennleistung unter den obigen Bedingungen weiter verbessern und welche Nachteile müsste man ggf. in Kauf nehmen? (1 Punkt)

- Kleinere Partikel verwenden
- Höherer Gegendruck und teurere Hardware

Aufgabe 5: Die meisten Analyten sind leicht sauer. Nennen Sie mindestens zwei Trennmethode, welche sich für die deprotonierten Spezies anbieten. (1 Punkt)

- HILIC
- Ionenchromatographie
- Kapillarelektrophorese

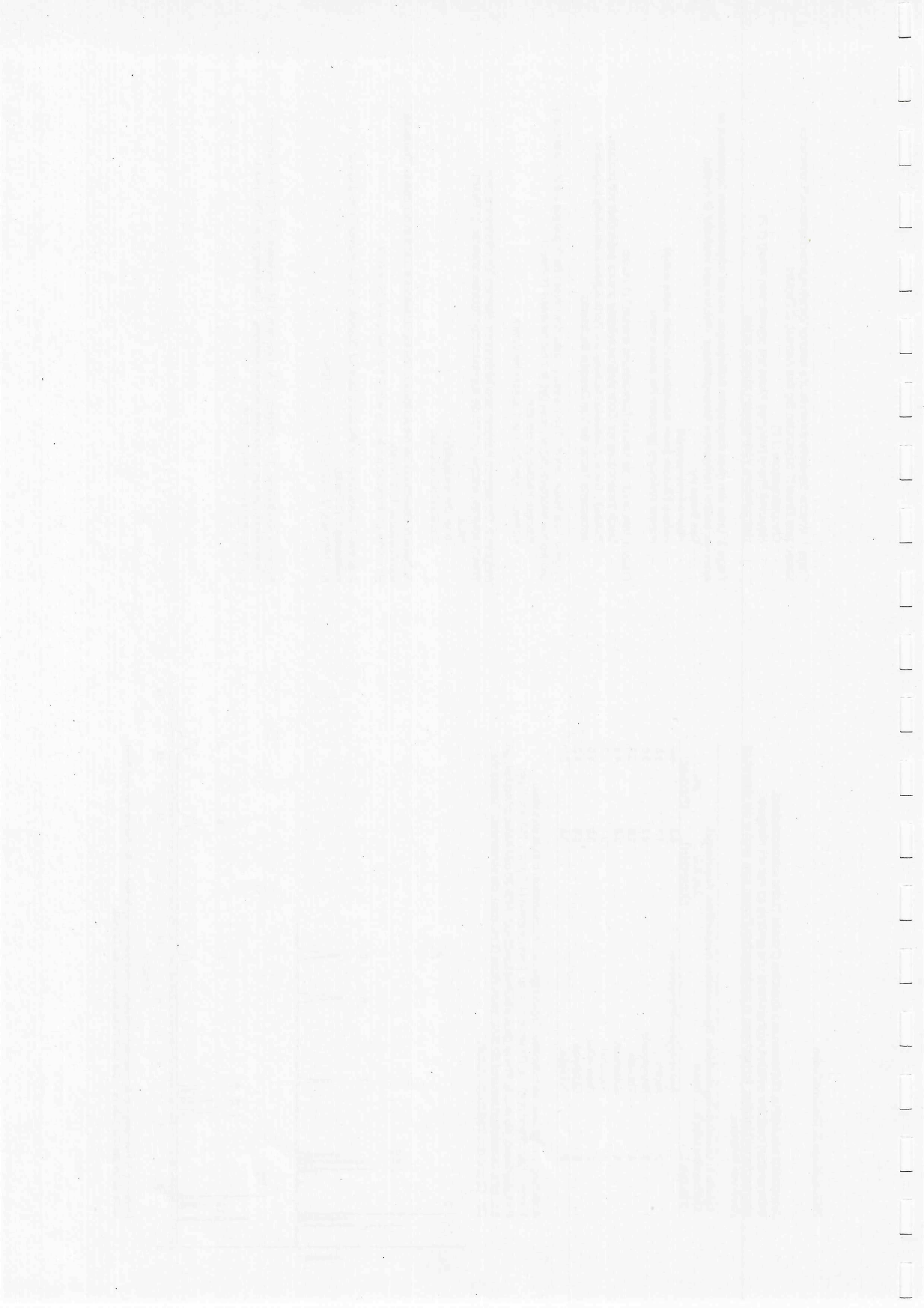
Aufgabe 6: Berechnen Sie die Auflösung des Signalpaares 8 und 9 in der oberen Trennung von Abbildung 1. (1 Punkt)

$$R_s = 2 \cdot (t_{r,b} - t_{r,a}) / (w_b + w_a) = 2 \cdot (9.5 - 8.0) / (0.2 + 0.25) = 6.67$$

Aufgabe 7: Berechnen Sie die Bodenzahl für Ibuprofen in der unteren Trennung von Abbildung 1. (1 Punkt)

$$N = 16 \cdot (t_r/w_b)^2 = 16 \cdot (16.4/0.6)^2 = 11954$$

Referenz: DeStefano, J.J., Schuster, S.A., Lawhorn, J.M., Kirkland, J.J. 2012 Performance characteristics of new superficially porous particles. J. Chromatogr. A 1258, 76-83. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.036



Prüfungsaufgabe 3: Trennmethode

Die Stoffgruppe der Lüste (benannt nach den Nachnamen der beiden deutschen Chemiker Wilhelm Lommel und Wilhelm Steinkopf) sind chemische Kampfstoffe und umfassen eine Reihe von chlorierten organischen Schwefel- und Stickstoffverbindungen. Eine der Ersteren erlangte im 1. Weltkrieg als Senfgas traurige Berühmtheit. Zur Gruppe der Stickstoffstoffe gehören drei tertiäre, mindestens zweifach terminal chlorierte Amine (HN1-3, Abbildung 1). Stickstoffstoffe sind labil und werden in der (biologischen) Umwelt gemäss Abbildung 1 hydrolysiert. Die tertiären Di- oder Triethanolamine sind basisch mit pK_a -Werten zwischen 7,8 und 8,7.

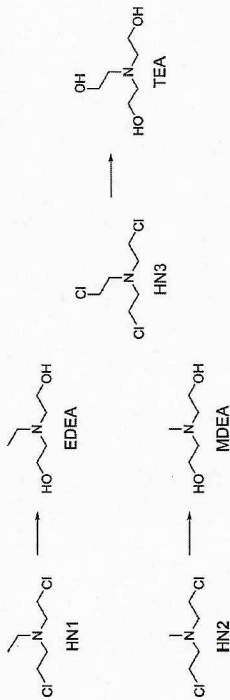


Abbildung 1: Abbauprodukte der Stickstoffstoffe HN1-3: Ethyl Diethanolamin (EDEA), Methyl Diethanolamin (MDEA) und Triethanolamin (TEA).

Abbildung 2 zeigt zwei verschiedene Trennungen der Abbauprodukte. Die verwendeten mobilen Phasen sind:

- Ammoniumhydroxid (3 mM; pH = 10.5)/Methanol, isokratisch 75:25 (v/v)
- Acetonitril (ACN)/Ammoniumacetat (15 mM; pH = 4.8), Gradient von 90% auf 50% ACN

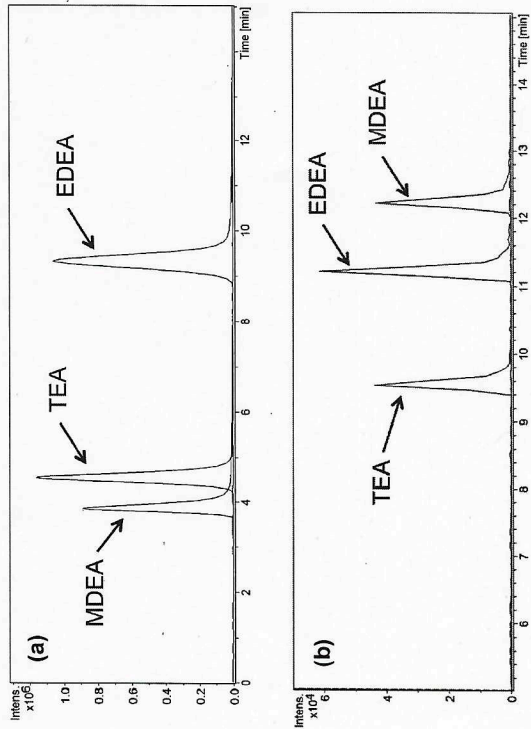


Abbildung 2: Trennung der Stickstoffstoffmetaboliten mit zwei verschiedenen Verfahren (a, b).

Frage 1: Welche Separationstechnik und welche Trennmechanismen kamen zum Einsatz (3 Punkte)? Begründen sie Ihre Antworten.

- Chromatographie (1 P)
- Reversed Phase (überwiegend wässrige Phase mit organischem Anteil) (1 P)
- HILIC (überwiegend organische Phase mit wässrigem Anteil) (1P)

Frage 2: Ordnen Sie die verwendeten mobilen Phasen den Abbildungen 2a und 2b zu und erklären Sie Ihren Entscheid (2 Punkte)?

- 1 Punkt für korrekte Zuordnung
- 1 Punkt für korrekte Erklärung
- Abb. 2a: (Reversed Phase) Ammoniumhydroxid (3 mM; pH = 10.5)/Methanol: isokratisch 75:25 (v/v). Erklärung: Analyten neutral, das weniger hydrophobe MDEA eluiert vor EDEA
- Abb. 2b: (HILIC) Acetonitril (ACN)/Ammoniumacetat (pH = 4.8), Gradient von 90% ACN auf 50%. Erklärung: Analyten positiv geladen. Das hydrophilere MDEA eluiert nach EDEA

Frage 3: Nennen Sie eine weitere Separationstechnik, bzw. einen Trennmechanismus, welche die Trennung von geladenen Analyten erlaubt (1 Punkt)?

- Kapillarelektrophorese
- Elektrophoretographie
- Ionenchromatographie

Frage 4: Welche Gefahr besteht bei der Verwendung von stark basischen Bedingungen für viele stationären Phasen (1 Punkt)?

- Auflösung des stationären Trägermaterials (Silica)

Aufgabe 5: Berechnen Sie die Auflösung des Signalpaares bei ≈ 4 min. in Abbildung 2a (1 Punkt).

$$R_s = 2 \cdot (t_{r,b} - t_{r,a}) / (w_b + w_a) = 2 \cdot (4.6 - 3.9) / (0.45 + 0.50) = 1.47$$

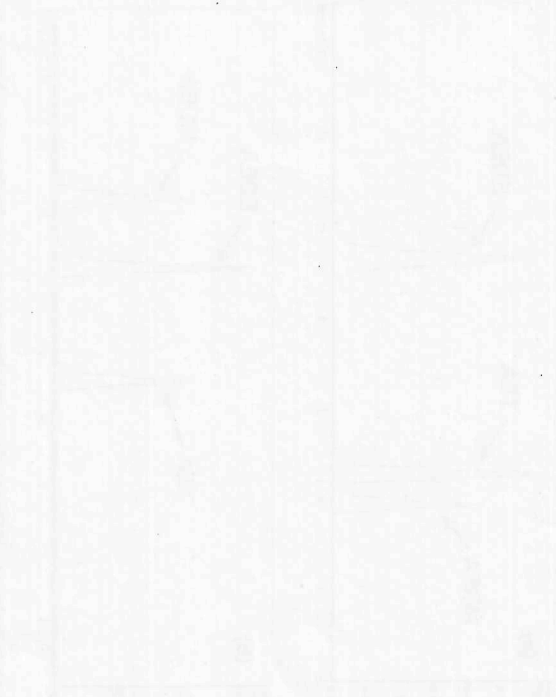
Aufgabe 6: Berechnen Sie die Bodenzahl für EDEA in Abbildung 2a (1 Punkt).

$$N = 16 \cdot (t_r/w_b)^2 = 16 \cdot (9.2/0.7)^2 = 2764$$

Frage 7: Welche Säulendimensionen vermuten Sie basierend auf diesen Kennzahlen (1 Punkt)?

HILIC: 150 x 2.1 mm i.D., 2.7 μ m Partikeldiameter
RP HPLC: 150 x 1.5 mm i.D., 5 μ m Partikeldurchmesser

Referenz: Otsuka, M., Miyaguchi, H., Uchiyama, M. 2019 Analysis of degradation products of nitrogen mustards via hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1602, 199-205



[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is too light to transcribe accurately.]



Prüfungsaufgabe 3: Trennmethode
 Silber Nanopartikel (AgNP) finden mannigfaltige Anwendungen zum Beispiel als Biozid in Produkten des täglichen Bedarfs. Damit können sie aber auch in die Umwelt und in die Nahrungskette gelangen und für Mensch und Tier ein Risiko darstellen. Dieses kann sowohl Konzentrations- als auch Partikelgrößen-abhängig sein, weshalb beide Eigenschaften analytisch erfasst werden müssen.

Abbildung 1 zeigt die Trennung von AgNP unterschiedlicher Grösse (10, 20, und 40 nm Durchmesser). Dabei kamen die folgenden Phasen zum Einsatz:

- Stationäre Phase: Venusil Durashell-NH₂ Kolonne (250 x 4.6 mm), Partikelporengrösse 1000 Å.
- Mobile Phase: Ein Gemisch aus neutralen und ionischen Tensiden (2% FL-70) und 2% Na₂S₂O₃ (pH = 9.5). Flussrate: 0.5 mL/min.

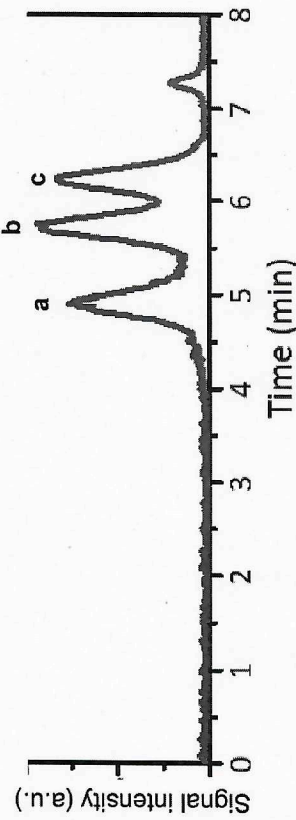


Abbildung 1: Trennung von Silber Nanopartikeln (AgNP) verschiedener Grösse (10, 20 und 40 nm Durchmesser).

Frage 1: Welche Separationstechnik kam zum Einsatz und welcher Trennmechanismus liegt dieser zu Grunde? Begründen Sie Ihre Antworten (2 Punkte).

- Ausschlusschromatographie (1 P)
- Unterschiedliche hydrodynamische Zugänglichkeit der Poren der festen Phase für Partikel unterschiedlicher Grösse (1P)

Frage 2: In welcher Reihenfolge eluieren die Partikel unterschiedlicher Grösse? Ordnen Sie diese den einzelnen Peaks (a-c) in Abbildung 1 zu (1 Punkt).

- a: 40 nm, b: 20 nm, c: 10 nm

Aufgabe 3: Erklären Sie den weiteren Peak bei t = 7.5 min (1 Punkt).

- Gelöstes Silber (Ag⁺)

Aufgabe 4: Nennen Sie zwei weitere geeignete Separationstechniken und die jeweils zu erwartende Elutionsreihenfolge für obige Nanopartikel (2 Punkte).

- Hydrodynamische Chromatographie (dieselbe Elutionsreihenfolge – grosse Partikel verbleiben in den schnellen Fließspfad) (1 Punkt)

- Feld-Fluss-Fraktionierung (umgekehrte Elutionsreihenfolge – kleine Partikel diffundieren schneller gegen das orthogonale Feld und gelangen zurück zu den schnellen Fließspfad)

Frage 5: Welche Nachteile hat die in Abbildung 1 verwendete Methode gegenüber den anderen Separationstechniken (1 Punkt):

- Gefahr der irreversiblen Interaktion mit der stationären Phase

Aufgabe 6: Berechnen Sie die Auflösung des Signalpaares b und c in Abbildung (1 Punkt).

- $R_s = 2 \cdot (t_r, b - t_r, a) / (w_b, a + w_b, b) = 2 \cdot (6.2 - 5.7) / (0.7 + 0.7) = 0.7$

Aufgabe 7: Berechnen Sie die Bodenzahl für Peak a in Abbildung 1 (1 Punkt).

- $N = 16 \cdot (t_r, b - t_r, a)^2 / (w_b, a)^2 = 16 \cdot (4.9 / 0.8)^2 = 600$

Referenz: Zhou, X.X., Liu, J.F., Jiang, G.B. 2017 Elemental Mass Size Distribution for Characterization, Quantification and Identification of Trace Nanoparticles in Serum and Environmental Waters. Environ. Sci. Technol. 51, 3892–3901

1998

MM

Prüfungsfrage 3: Trennmethode

(Alkylierte) polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) (Abb. 1) entstehen bei unvollständigen Verbrennungsprozessen und sind in der Umwelt allgegenwärtig. In die Gesetzgebung und Monitoring-Programme werden alkylierte PAK selten mit einbezogen, obwohl sie oft toxischer sind als ihre unsubstituierten Analoga. Dies beruht u.a. auf ihrer Vielfalt und der damit einhergehenden analytischen Herausforderungen, insbesondere bei der Separation. So ist es bis heute nicht möglich alle Isomere von alkylierten PAK in einem einzigen Run zu trennen.

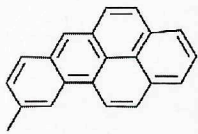


Abbildung 1: 9-Methyl-Benz[a]pyren (BaP9), ein Beispiel eines alkylierten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffs.

Abbildung 2 zeigt zwei verschiedene Trennungen von (alkylierten) PAK mittels derselben Technik, denselben Dimensionen des Trennsystems, derselben mobilen Phase und demselben Temperatur-Gradienten. Die verwendeten stationären Phasen sind in Abbildung 3 dargestellt.

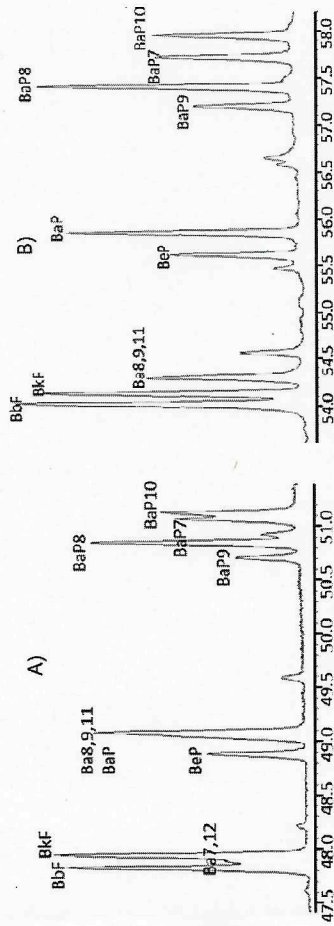


Abbildung 2: Trennung verschiedener (alkylierter) polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) mit zwei verschiedenen stationären Phasen (A, B). X-Achse in Minuten. BbF: Benzo[b]fluoranthene, Ba7,12: 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen, BbF: Benzo[k]fluoranthene, BeP: Benzo[e]pyren, BaP: Benzof[a]pyren, Ba8,9,11: 8,9,11-Trimethylbenz[a]anthracen, BaP8: X-Methylbenzof[a]pyren.

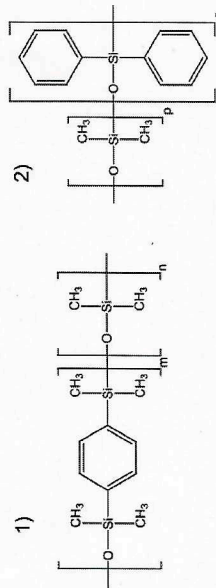


Abbildung 3: Stationäre Phasen der verwendeten Trennmethode. 1) (5% Phenyl)-Methylpolysiloxan (m=5%, n=95%). 2) 50% Phenyl-Dimethylpolysiloxan (p=50%, q=50%).

Frage 1: Welche Separationstechnik kam zum Einsatz? Begründen Sie Ihre Antwort. (2 Punkte)

- Gaschromatographie
- Stationäre Phasen entsprechen den in der Vorlesung für die GC vorgestellten. Es wird von einem Temperaturgradienten gesprochen. Die Bodenzahl ist vergleichsweise hoch. Die Substanzen sind semi-volatil und damit GC-gängig.

Aufgabe 2: Ordnen Sie die verwendeten stationären Phasen (Abb 3. 1 & 2) den Abbildungen 2a und 2b zu und erklären Sie Ihren Entscheid. (2 Punkte)

- 50% Phenyl → 2, 5% Phenyl → 1 (1 Punkt)
- Mehr Van der Waals und induzierte Dipol-Wechselwirkungsmöglichkeiten mit den kovalent gebundenen Phenylgruppen der stationären Phase. → Höhere Retentionszeiten bei gleichen Säulendimensionen und Temperaturprogramm. Verbesserte Separation von Isomeren.

Aufgabe 3: Nennen Sie drei Massnahmen, welche die Trennleistung der verwendeten Methoden weiter verbessern könnten. (1 Punkt)

- Gradient anpassen (langsamer chromatographieren)
- Säule verlängern
- Säulendurchmesser verkleinern
- Filmdicke erhöhen (für früh eluierende Verbindungen)

Aufgabe 4: Berechnen Sie die Auflösung des Signalpaares BbF und BbF in Abbildung 2b. (1 Punkt)

$$R_s = 2 * (t_{r,b} - t_{r,a}) / (w_{b,a} + w_{a,b}) = 2 * (54.12 - 54.02) / (0.2 + 0.15) = 0.6$$

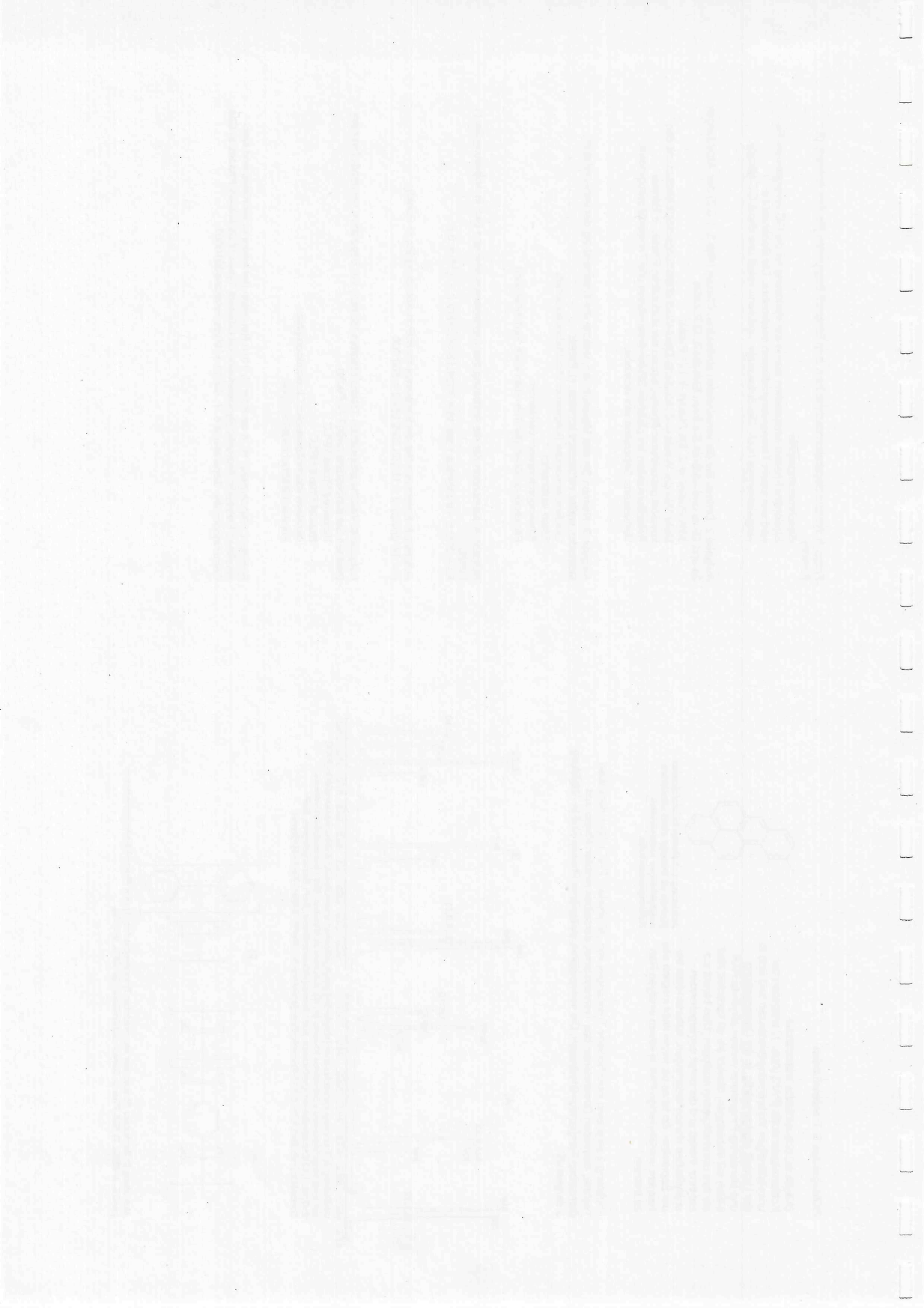
Aufgabe 5: Berechnen Sie die Bodenzahl für BaP in Abbildung 2b. (1 Punkt)

$$N = 16 * (t_r/w_b)^2 = 16 * (55.86/0.25)^2 = 800'000$$

Aufgabe 6: Welche alternativen Trennmethode könnten zur Separation verwendet werden (nennen Sie mindestens zwei)? (1 Punkt)

- Reversed Phase HPLC
- Normal Phase HPLC
- Mizellare elektrokinetische Chromatographie
- Kapillar Elektchromatographie

Referenz: Skoczynska, W. & de Boer, J. 2019 Retention Behaviour of Alkylated and Non-Alkylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Different Types of Stationary Phases in Gas Chromatography. Separations 6, 7, doi:10.3390/separations6010007.



Prüfungsfrage 3: Trennmethode

Die Haut der asiatischen Kröte (*Bufo bufo gargarizans*) wird in der traditionellen Chinesischen Medizin zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten angewendet. Als wichtige bioaktive Verbindungen mit positiven Effekten wurden dabei verschiedene Bufadienolide identifiziert (Abbildung 1, Tabelle 1).

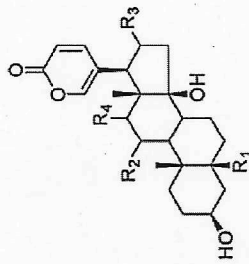


Abbildung 1: Chemische Struktur einiger Bufadienolide. R₁-R₄: siehe Tabelle 1.

Peak Nr. ^b	Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	log K _{ow} ^c
1	Bufoarenogin	H	=O	H	β-OH	1.45
3	Desacetylbufotalin	H	H	β-OH	H	1.88
5	Telocinobufagin	OH	H	H	H	1.91
8	Bufotalin	H	H	β-O-Acetyl	H	2.88
11	Bufalin	H	H	H	H	3.42

^a chemische Struktur: siehe Abbildung 1. ^b siehe Abbildung 2. ^c Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (EPI-Suite Modellabschätzung).

Abbildung 2 zeigt zwei verschiedene Trennungen dieser Verbindungen. Die verwendeten mobilen Phasen sind:

- Isopropanol (A) und n-Hexan (B) mit folgendem Gradient: 0-50 min: 10-60% A
- Acetonitril (C) und Wasser (D) mit folgendem Gradient: 0-10 min: 10-30% C; 10-30 min: 30-45% C, 30-40 min: 45-60% C

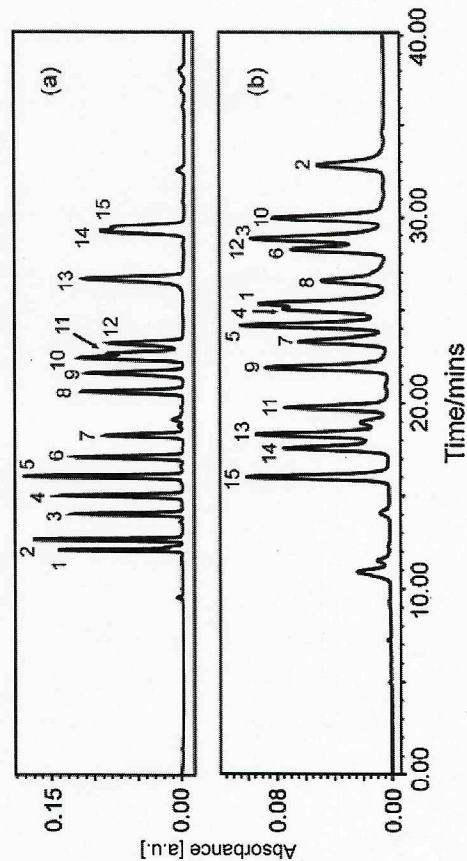


Abbildung 2: Trennung verschiedener Bufadienolide mit zwei verschiedenen Verfahren. Die Peaknummern beziehen sich auf die in Tabelle 1 bezeichneten Substanzen.

Frage 1: Welche Separationstechnik und welche Verteilungsmechanismen/Trennmodi kamen zum Einsatz? Begründen Sie Ihre Antworten. (3 Punkte)

- Chromatographie (1 P)
- Reversed Phase (überwiegend wässrige Phase mit organischem Anteil) (1 P)
- Normal Phase (ausschließlich organische Phase von unpolar zu polar) (1P)

Aufgabe 2: Ordnen Sie die verwendeten mobilen Phasen den Abbildungen 2a und 2b zu und erklären Sie Ihren Entscheid. (2 Punkte)

- 1 Punkt für korrekte Zuordnung
- 1 Punkt für korrekte Erklärung
- Abb. 2a: Reversed Phase (Acetonitril (C) und Wasser (D)) Erklärung: hydrophile Analyten eluieren vor hydrophoben
- Abb. 2b: Normal Phase (Isopropanol (A) und n-Hexan (B)). Erklärung: hydrophobe Analyten eluieren vor hydrophilen

Frage 3: Während die Elutionsreihenfolge beim einen Trennmechanismus weitgehend durch die Hydrophobizität der Analyten bestimmt wird ist dies beim anderen weniger ausgeprägt der Fall. Nennen Sie einen möglichen Grund? (1 Punkt)

- Zusätzliche sterische Wechselwirkungen mit stationären Silica-Phase

Aufgabe 4: Berechnen Sie die Auflösung des Signalpaares 7 & 5 in Abbildung 2b. (1 Punkt)
 $R_s = 2 \cdot (t_{r,b} - t_{r,a}) / (w_{b,a} + w_{a,b}) = 2 \cdot (24,25 - 23,50) / (1,0 + 1,0) = 0,75$

Aufgabe 5: Berechnen Sie die Bodenzahl für Substanz 9 in Abbildung 2a. (1 Punkt)
 $N = 16 \cdot (t_r/w_b)^2 = 16 \cdot (21,5/0,8)^2 = 11556$

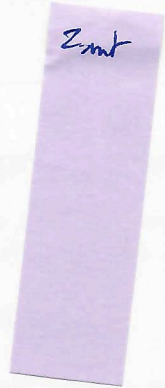
Frage 6: Welche Dimensionen der stationären Phase vermuten Sie basierend auf diesen Kennzahlen? (1 Punkt)

Normalphase: XAmide (150 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm)
 Reversed Phase: XUnion C18 (150 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm)

Referenz: Zhang, Y., et al. 2016 Separation and characterization of bufadienolides in toad skin using two-dimensional normal-phase liquid chromatography x reversed-phase liquid chromatography coupled with mass spectrometry. J. Chromatogr. B 1026, 67-74



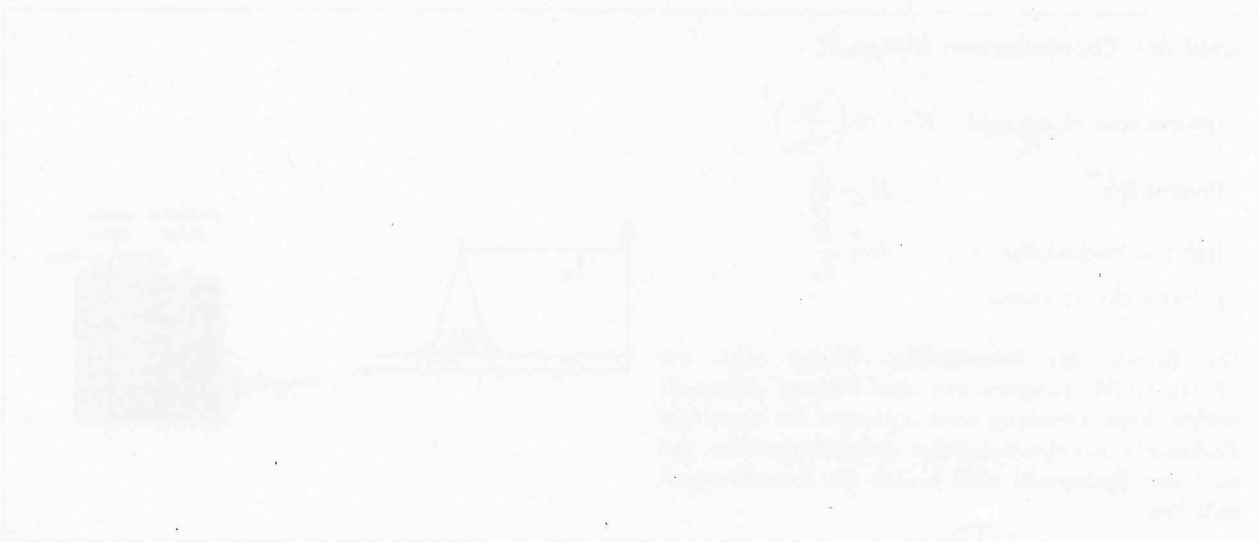
Small, faint text at the bottom right of the page, possibly a page number or footer.



Analytik: Trennmethoden

Prof. R. Looser

Zusammenfassung von Manuel Kober-Czerny
Zürich, 22. Juni 2015



1 Chromatographie - Allgemein

Ein Komponentengemisch wird mit Hilfe einer stationären Phase [(s) oder (l)] und einer mobilen Phase [(l) oder (g)] getrennt. Nach dem Nernst'schen Verteilungsgesetz definiert man einen Verteilungskoeffizient K:

$$K = \frac{c_S}{c_M} = \frac{\text{Konz. der Komponente in der stationären Phase}}{\text{Konz. der Komponente in der mobilen Phase}} \quad (1)$$

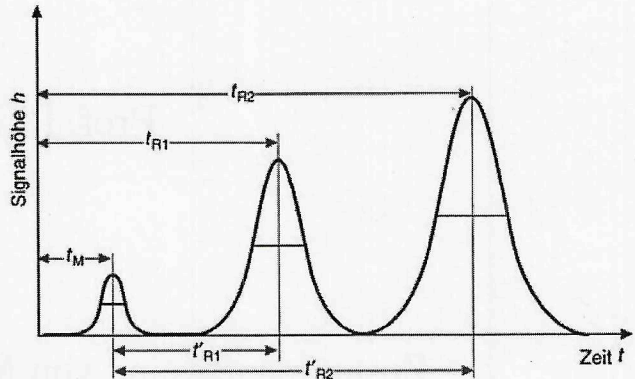
Es gibt zudem ein paar wichtige Kenngrößen zur Beschreibung und Bewertung einer chromatographischen Trennung:

- t_R : Gesamtretentionszeit
- t_S : Nettoretentionszeit -> Aufenthalt des Analyten an stationärer Phase
- t_M : Totzeit -> Aufenthalt des Analyten in der Säule
- t'_m : reduzierte Retentionszeit
- u_x : Lineare Geschwindigkeit
- V_r : Retentionsvolumen

$$t_s = t'_R = t_R - t_M$$

$$u_x = \frac{L}{t_x}$$

$$V_r = t_R \cdot F$$



Aus diesen Größen lässt sich der Kapazitätsfaktor k berechnen:

$$k = \frac{\text{Menge Komponente in stationärer Phase}}{\text{Menge Komponente in mobiler Phase}} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_r - V_M}{V_M} \quad (2)$$

Zahl der Theoretischen Böden N

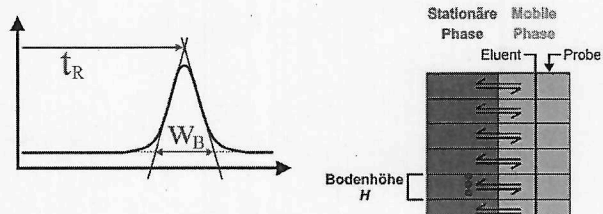
theoretische Bodenzahl $N = 16 \left(\frac{t_R}{w_B} \right)^2$

Bodenhöhe $H = \frac{L}{N}$

Relative Bodenhöhe $h = \frac{H}{d_p}$

d_p : Partikeldurchmesser

Die Anzahl der theoretischen Böden sagt, wie oft ein GGW zwischen den zwei Phasen eingestellt wurde. Eine Trennung wird optimiert für eine hohe Bodenzahl und eine möglichst kleine Bodenhöhe. Bei zu hoher Bodenzahl wird jedoch die Retentionszeit sehr lang.



1.1 Auflösung R

Es gibt einen Selektivitätskoeffizient $\alpha = \frac{t_{s2}}{t_{s1}} = \frac{k_2}{k_1}$. Er gibt an, wie weit zwei Peakmaxima auseinander liegen.

$$R = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (3)$$

Achtung: Selektivität und Effizienz sind zwei verschiedene Dinge!

Selektivität: Abstand der Peakmaxima durch Trennung in der Säule

Effizienz: Breite der Peaks durch Diffusion in der Säule

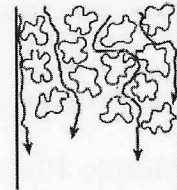
1.2 Van-Deemter-Gleichung

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \rightarrow \text{Flussgeschwindigkeit}$$
 (4)

Handwritten notes:
 - A : \uparrow *Partikelhöhe*
 - B : \rightarrow *longitudinale Diff in Flöme*
 - C : \rightarrow *Flussgeschwindigkeit*
 - C : \rightarrow *Massentransfereffekt*
 - C : \rightarrow *multiples Fließstrecke*

1.2.1 A: Eddy-Diffusion

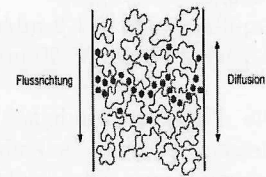
- unterschiedliche Flusswege einzelner Moleküle
- nimmt mit größerer Partikelgröße d_p und Packungsdichte λ zu
- optimal bei einheitlicher Partikelgröße und homogener Packung
- ist in der LC von Bedeutung; in der GC nicht
- $A = 2\lambda d_p$



A: Eddy-Diffusion

1.2.2 B: Longitudinaldiffusion

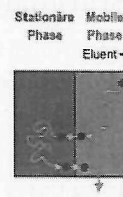
- Diffusion entgegen der Flussrichtung
- Abhängig von Viskosität des LSM und Temperatur
- Nimmt mit größerer Strömungsgeschwindigkeit ab
- ist in der GC wichtig; in der LC eher nicht



B: Longitudinal-Diffusion

1.2.3 C: Massenübertragungsterm

- Gibt den Übergang zwischen mobiler und stationärer Phase an
- Beeinflusst durch Art des Lösungsmittels, Art der stationären Phase, Dicke der Säule,...
- Spielt in GC und LC eine Rolle

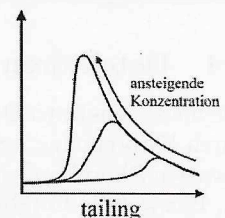


C: Massentransport-Effekte

1.3 Tailing and Fronting

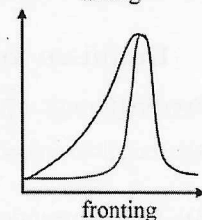
TAILING

Grund: Überladene Säule; die stationäre Phase wird übersättigt
 Folge: Teile der Probe kommen ohne Wechselwirkungen schneller durch \rightarrow Verlagerung zu kürzeren Retentionszeiten



FRONTING

Grund: Teile der Probe kondensieren in die stationäre Phase
 Folge: Die Verweildauer nimmt bei einem Teil der Probe zu und das Signal verschiebt sich zu längeren Retentionszeiten



1.4 Bestimmung von kleinen Mengen

Wird aus dem Signal S und dem Rauschen (Noise) N bestimmt:

Nachweisgrenze (LOD): $\frac{S}{N} = 3$; Grenze, ab der überhaupt ein als solches Signal zu erkennen ist

Bestimmungsgrenze (LOQ): $\frac{S}{N} = 10$; Grenze, ab der ein Signal zur quantitativen Messung verwendet werden kann

2 Gaschromatographie - GC

Wird verwendet für Analyten, die sich ohne Zersetzung verdampfen lassen.

2.1 Injektion

Es gibt allgemein zwei große Unterschiede in der Injektion auf eine Säule: mit split oder ohne. Mit split (ein Teil der Injektion wird verworfen) gibt es die filled-needle- (Probelösung direkt rein), die hot-needle- (Nadel erst aufheizen) und die solvent-flush- (Zuerst LSM dann Probe) -technique. Ohne Split wird das ganze Volumen verwendet und es gibt nur die on-column-technique. Am meisten wird die hot-needle-technique genutzt.

2.2 Mobile Phase

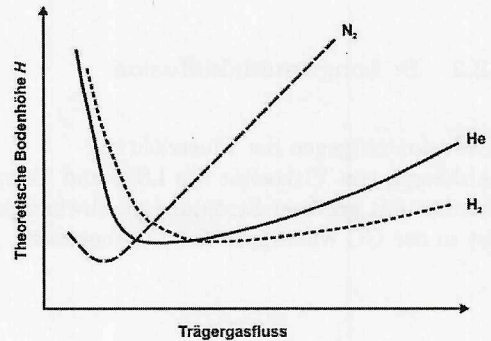
Für die Mobile Phase wird ein Trägergas verwendet, das keine Wechselwirkungen mit dem Analyt eingeht.

Fließgeschwindigkeit:

Kapillarsäulen: 0.1-2 ml/min.

Gepackte Säule: 25-30 ml/min.

Die Fließgeschwindigkeit kann über verschiedene Methoden gemessen werden: Seifenblasenzähler, elektronisch, mit Hilfe der Retentionszeit einer leicht flüchtigen Substanz wie Methan



2.3 Stationäre Phase

Sie kann fest oder flüssig sein und als gepackte oder Kapillarsäule vorliegen. Man wählt sie so, dass die dem Analyt in ihrer Polarität sehr ähnlich ist. Die Adsorption gelingt durch verschiedene Wechselwirkungen (Van-der-Waals, H-Brücken, Dipol, ...)

SÄULENBLUTEN

Wird die Säule überbelastet, lange nah an ihrem Maximum benutzt oder bei zu hohen Temperaturen gebraucht, kann es zu Ablösungen der stationären Phase kommen, die zu einem Anstieg der Basislinie im Chromatogram führt.

2.4 Detektoren

Die meist genutzten Detektoren sind FID (Flame Ionization Detector) und MS. Beim FID werden brennbare Stoffe durch Verbrennung ionisiert. Weitere sind:

Nitrogen Phosphorous D., Electron Capture D., Thermo Conductivity D., Photo Ionization D., Flame Photometric D., Electrolytic Conductivity D., Atomic Emission D.

2.5 Einflüsse auf das Chromatogram

Peakverbreiterung: $\sigma_L^2 = 2Dt_R$ mit D: Bruttodiffusionskoeffizient und σ_L : Peakbreite

Phasenverhältnis: $\beta = \frac{V_m}{V_s} = \frac{V(g)}{V(s)}$

Kováts Retentionsindex: $I_K = 200 \cdot \frac{\log V_R^0(X) - \log V_R^0(nP_Z)}{\log V_R^0(nP_{Z+2}) - \log V_R^0(nP_Z)}$ Zur Bestimmung des R.index einer unbekannt Substanz X, die zwischen zwei n-Alkanen (mit Z Atomen) liegt. V_R ist das Retentionsvolumen.

Säulendurchmesser: Je breiter die Säule, desto näher liegen die Peaks zusammen

Filmdicke: Je dicker der Film, desto weiter liegen die Peaks auseinander und desto länger die Retentionszeiten
je dicker der Film, desto tiefer die Temperatur vor dem Säulenbluten

Säulenlänge: Je länger die Säule, desto besser die Trennung und länger die Retentionszeiten

Temperatur: Je höher die Temperatur, desto kleiner die Retentionszeiten und näher die Peaks zusammen

Isotherme: Retentionszeiten nach hinten werden länger und Peaks immer breiter (Lösung: Temp.-Programm)

Fließgeschwindigkeit: Je höher, desto kleiner die Retentionszeiten

3 Dünnschichtchromatographie - DC

3.1 Grundlagen

Stationäre Phase: Kieselgel (Porengröße 10-15'000 Angström); kann mit funktionellen Gruppen ausgestattet werden.

mobile Phase: Lösungsmittelgemisch

Gasphase: Zusammensetzung sollte möglichst konstant gehalten werden (Luftfeuchtigkeitsänderungen können die Trennung beeinflussen)

Trennungsmechanismen: Adsorption (funktionelle Gruppen, Polarität), Verteilung (Länge von Alkanketten), Komplexbildung (Doppelbindungen,...)

3.2 Das Chromatogramm

Auf einer DC-Platte kann man eine Menge Größen ausmessen und daraus wichtige Faktoren berechnen, die dann für eine mögliche Optimierung genutzt werden können:

a: Laufmittelfront

b: Abstand von Analytpunkt

w_b : Dicke von Analytpunkt in Laufrichtung

Δz Abstand von 2 Analytpunkten

Retentionsfaktor $R_F = \frac{b}{a} < 1$

gibt die relative Position auf der Platte eines Analyten an

Selektivität $\alpha = \frac{R_{F2}(1 - R_{F1})}{R_{F1}(1 - R_{F2})}$

wie gehabt

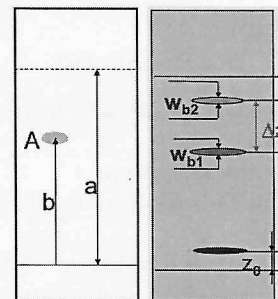
Auflösung $R_s = \frac{2\Delta z}{w_{b1} + w_{b2}}$

wie gehabt

Bodenzahl $N = 16 \left(\frac{b}{w_b} \right)^2$

wie gehabt

Effizienzterm $\sqrt{R_F N}$



Der **Retentionsfaktor** gibt die relative Position auf der Platte eines Analyten an.

$$R_F = \frac{b}{a} < 1$$

3.3 Optimierung einer DC-Messung

Allgemein sind alle Optimierungen bei der DC sehr abhängig von den Analyten. Daher sind nur die zu beachtenden Faktoren aufgelistet:

Fließmittel: Das Fließmittel kann die Auftrennung verbessern aber auch die Banden verbreitern (Abstand der Front: $z_f^2 = \kappa \cdot t$; κ : Fließkonstante)

R_F -Wert: optimal um die 0.3 (höchste Auflösung)

Laufstrecke: zu kurze Laufstrecken haben keine gute Auftrennung, zu lange bilden breite Banden

Fließmittelstärke: zu schwache Fließmittel bewegen den Analyten nicht, zu starke bewegen ihn zu weit; es gibt ein Optimum

3.4 Nachweis mit Markierung nach der Messung

Amine: mit Ninhydrin (wird lila)

Zucker: mit CAM - Cerammoniummolybdat (wird blau)

Alkene, Alkine: mit KMnO_4 : von weiß zu braun (Braunstein)

Phosphorhaltige: PME - Molybdat-Phosphorsäure in Ethan (wird lila)

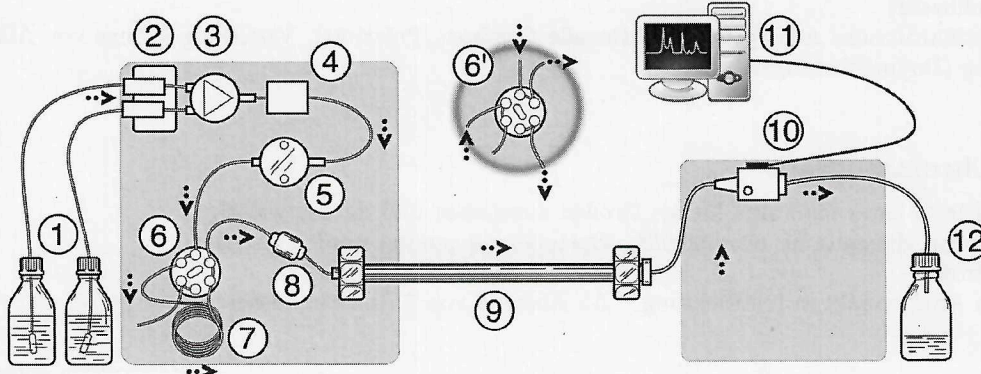
org. Verbindungen: Iodkammer (wird braun; aber reversibel)

alle org. Verb.: konz. Schwefelsäure (schwarz)

4 Flüssigkeitschromatographie - LC

4.1 Aufbau

Die Lösungsmittel (1) werden zu einem Degasser (2) geleitet und dort on-line entgast, damit das Rauschen im Absorbanzspektrum des UV-Detektors minimiert wird. Danach werden die Lösungsmittel im gewünschten Verhältnis von einem Ventil (3) in die Mischkammer (4) geleitet. Als nächstes folgt die Pumpe (5).



4.1.1 Die Pumpe (5)

Die wichtigsten Anforderungen an die Pumpe sind konstante Leistung ohne Pulsation, Druckstabilität und geringes Innenvolumen.

Hochdruck-System

Beim Hochdruck-System gibt es eine Pumpe pro Lösungsmittelflasche und einen Entgaser nach der Mischkammer.

Vorteile:

Niedriges Dwell Volumen (Totvolumen)

Sehr präzise über den gesamten Bereich (bei jeder Flussrate)

Nachteile:

Teuer und klemmen schneller

Niederdruck-System

Vor der Mischkammer werden die Lösungsmittel entgast. Die Pumpe befindet sich kurz vor der Säule.

Vorteile:

Preiswert und praktischer für Methodenentwicklung

Quarternäre Gradienten sind möglich

Nachteile:

Kleine Flussraten sind ein Problem

Größeres Dwell Volumen

4.1.2 Weiterer Aufbau

Nach der Pumpe folgt der Injector (6, 6'), der eine Inject- und eine Load-Stellung hat. Mit der Inject-Stellung wird der Analyt in eine Probenschleife (7) geleitet und von dort aus mit der Load-Stellung vom Eluent auf die Säule (9) gespült. Eine Vorsäule (8) dient zum Entfernen von größeren Verunreinigungen. Nach der Säule erreicht die aufgetrennte Analyt-Mischung den Detektor (10).

4.2 Die Säule

Die Säule besteht aus einer meist festen stationären Phase, welche entweder rundes oder gebrochenes Silicagel ist. Wie gehabt erhöhen eine kleinere Partikelgröße und eine längere Säule die Trennleistung aber auch die Retentionszeit. Je nach Anwendung kann das Silicagel mit funktionellen Gruppen versehen werden.

Typ	Normal-Phase	Reversed-Phase
stationäre Phase	polar	apolar
mobile Phase	apolar	polar
Chromatographie	Adsorption	Verteilung
Elution	isokratisch	isokratisch/Gradient (zum Durchspülen)

Häufig wird innerhalb der Säule ein Gradient an funktionellen Gruppen verwendet, um eine optimierte Trennung zu ermöglichen.

4.3 Der Detektor

Einige Detektor-Typen

Typ	LOD
UV Absorbance	100 pg-1 ng
Fluoreszenz	1-10 pg
Elektrochemisch	10 pg - 1 ng
Refractive Index	100 ng - 1 μ g
Konductivität	500 pg - 1 ng
MS	100 pg - 1 ng
FT-IR	1 μ g
Light Scattering	10 μ g

Die meist benutzen Detektoren sind ein UV-Detektor mit einem DAD-Detektor (Photodioden-Array Detektor). Sie werden in einem 3D-Spektrum zusammengefasst. ([DAD]=AU, [UV]=nm)

Achtung! haben zwei Signale fast dieselbe Retentionszeit und identisches Aussehen im 3D-Spektrum sind es wahrscheinlich Enantiomere.

4.4 Verschiedene LC Arten

4.4.1 Liquid Solid Chromatography - LSC

Fakten:

Gehört zur Adsorptionschromatographie

stationäre Phase: Silicagel, Aluminiumoxid oder Cellulose (polar)

mobile Phase: organische Lösungsmittel (elutrope Reihe); polare LSM verkürzen die Retentionszeit enorm

Trennung nach: langsamer mit zunehmender Polarität, Konkurrenz zwischen Analyt- und LSM-Molekülen sorgt für die Trennung

4.4.2 Liquid Liquid Chromatography - LLC

Fakten:

Gehört zur HPLC; als Normal-Phase oder reversed-phase

stationäre Phase: Kieselgele (schnelle Diffusion, hohes N, pH-stabil); Hybridphasen (sehr pH-stabil, geringe Silanoaktivität); Monolithische Säulen (geringer Druck, hohe Flussraten, hohes N); Fused core/ Core shell (geringer Druck, hohe Flussraten, hohes N)

Porenvolumen: 0.6 - 1.8 ml/g

Porengröße: kleinere Poren ergeben größere Oberfläche und damit höhere sterische Selektivität

Übergang zu UHPLC: höherer Druck, kürzere Messzeit, weniger Lösungsmittel

4.4.3 HILIC und RPC

Fakten:

	Hydrophilic Interaction Chromatography	Reversed Phase Chromatography
Problem		geladene und stark polare Verbindungen
stationäre Phase	hydrophil NEUTRAL: kaum ionische WW; wenig selektiv GELADEN: mehr Selektivität; stark ionische WW; Puffer notwendig ZWITTERIONISCH: gute Selektivität, schwach-ionische WW, geringe Puffer benötigt	unpolar
mobile Phase	hoher Anteil an org. LSM (optimal: Acetonitril)	polar
Trennung	je polarere desto langsamer	je polarer desto schneller
Vorteil	trennt Substanzen, die bei RP nahe dem Totvolumen sind	

4.4.4 Supercritical Fluid Chromatography - SFC

Fakten:

stationäre Phase: verschiedene Phasen möglich (alle mit sehr kleiner Porengröße)

mobile Phase: Gasgemisch; wenig polar, am kritischen Punkt, mischbar mit CO₂

Supercritical beschreibt den Bereich im Druck-Temperatur-Diagramm oberhalb des kritischen Punktes. Eine superkritische Substanz hat eine geringe Viskosität, wie ein Gas, aber eine hohe Dichte, wie eine Flüssigkeit. Daher kann sie leicht durch die Säule gepresst werden aber interagiert genug mit der Säule. Höhere Flussraten sind leicht realisierbar.

Aufrüstung zu UHPSFC ist möglich, um die Messzeiten entscheidend zu verkürzen

5 Trennung von Proteinen

Proteine sind Makromoleküle, die viele funktionelle Gruppen und interne Wechselwirkungen haben und dadurch schwer zu trennen sind. Effekte wie Größe, Löslichkeit, Form, elektrische Ladung, Adsorption an eine Matrix und biologische Affinität werden für eine Trennung genutzt. In den meisten Fällen sollen die Proteine nur gereinigt werden und müssen daher in ihrer Quartär-Struktur erhalten bleiben. Es gibt verschiedene Methoden, die spezifisch Gruppen von Proteinen trennen können:

5.1 Size Exclusion Chromatography - SEC

Die Trennung erfolgt durch ein Gel mit großen Poren in einem Gelbett mit Volumen V_c . Zwischen den Poren und den Proteinen sollte keine WW stattfinden. Zu große Moleküle können nicht in die Poren eingelagert werden und werden vom Laufmittel mitgezogen. Sie haben die kürzeste Retentionszeit (mit V_0). Mit zunehmender Größe ist die Einlagerung in die Poren schwieriger und die Retentionszeit kürzer. Die kleinsten Moleküle kommen zum Schluss. Proteine mit einem Größenunterschied von 20% können getrennt werden. Für den Peak e gilt der Koeffizient $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$ (zwischen 0 und 1). Durch die Größe des Gelbetts ist die Anzahl der Peaks limitiert. Daher gibt es verschiedene Gelmatrizen:

Sephacryl S-300: für große Proteine

Sephacryl S-200: für spezifische Proteine

Sephacryl S-100: für kleine Proteine

Im Gegensatz zu anderen Chromatographie-Methoden führt eine Änderung der Partikelgröße nicht einfach zu einer Änderung der Retentionszeit aller Stoffe, sondern zu einer Umverteilung der Proteingrößen, die getrennt werden sollen (zu große und zu kleine Proteine werden damit festgelegt). Die Säulenlänge verbessert wie gehabt die Trennung aber erhöht auch die Messzeit.

5.2 Ionexchange Chromatography - IEC

Die Trennung erfolgt aufgrund pH-abhängiger, unterschiedlicher Ladung der Proteine. An die stationäre Phase werden Anionentauscher ((+), DEAE, QA, Q) oder Kationentauscher ((-), CM, S, SE, SP) angebracht, die geladene Spezies adsorbieren (Kationentauscher ziehen Kationen an). Dadurch erlangt man eine hohe Selektivität der Trennung und diese ist sehr gut kontrollierbar. Durch die Änderung der Salzkonzentration in der mobilen Phase kann die Trennung gesteuert werden. Auch mit dem pH kann die gesteuert werden (schnellere Messung bei Anionen, wenn der pH sinkt).

5.3 Hydrophobic Interaction Chromatography - HIC

Trennung aufgrund von unterschiedlicher Hydrophobizität von Proteinen. Die stationäre Phase erhält Hydrophobie Liganden. Die mobile Phase beinhaltet Salze. Sind diese iyotrop (salting out), werden sie von den Proteinen ausgeschlossen und die Bindung vom Protein ans Medium wird verstärkt. Sind sie chaotrop, werden sie sich an Proteine anlagern, die Hydrathülle vergrößern und so die Affinität von Protein und Medium verschlechtern. iyotrop: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , H_4K^{++} ; chaotrop: SCN^- , I^- , Ba_2^+ , Ca_2^+
Je nach hydrophoben Liganden kann der Fokus auf einen anderen hydrophoben Rest am Protein gelegt werden.

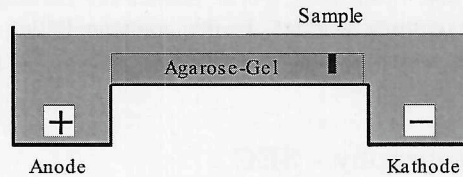
5.4 Affinitätschromatographie

Zu Trennung wird das Schlüssel-Schloss-Prinzip genutzt. Dadurch ist diese Methode sehr spezifisch. Zum Trennen eines bestimmten Proteins wird der passende Ligand an der stationären Phase angebracht. Diese Methode wird verwendet zur Trennung von:

Antikörpern und Antigen; Enzymen und Cofaktor/Substrat; Rezeptor und Hormon; ... (eher biologische Liganden)

6 Elektrophorese

6.1 Aufbau und Theorie



In der Theorie gibt es als stationäre Phase ein Gel, Polymer, o.Ä. auf dem ein geladenes Teilchen mittels einer außen angelegten Spannung bewegt wird. Durch das Gel bewegen sich kleine Teilchen schneller als große, was zu einer Auftrennung nach Größe führt. Die Migrationsgeschwindigkeit durch das Gel ist

$$v = \frac{Q \cdot E}{6\pi \cdot r \cdot \eta} = \mu \cdot E \quad (5)$$

mit Q (Ladung), E (elektrische Feldstärke), r (Radius des Teilchens), η (Viskosität des Mediums) und μ (Konstante für elektrophoretische Mobilität)

Als Trägermaterial dienen häufig Agarose oder Polyacrylamid (PAGE, SDS-PAGE oder Gradient-PAGE). Zusätzlich befindet sich in der Gelmischung Wasser mit H_3O^+ und OH^- Ionen.

6.2 Agarose

- wird für große Moleküle über 10 nm verwendet
- Porengröße 150 nm - 500 nm
- Anwendungen: klinische Routine-Analytik, Proteinnachweis, DNA-Tests

6.3 PAGE - Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

- PAGE-Gel wird aus Acrylamid und Methylenbisacrylamid hergestellt
- geringe Elektroosmose
- durchsichtig und gut haltbar
- chemisch und physikalisch stabil
- Porengröße ist sehr gut einstellbar und einfach zu reproduzieren
- Anwendungen: Horizontaltechnik für DNA und Oligonukleotide, Nachweis mit Silberfärbung und Ethidiumbromid
- hat eine bessere Nachweisempfindlichkeit als die Agarose

6.4 Techniken

6.4.1 SDS-PAGE

Die Sekundär- und Tertiärstruktur vom Protein wird aufgelöst. Man belädt die langen Aminosäureketten mit Natriumdodecylsulfat (SDS), damit alle Moleküle eine etwa gleiche Ladung besitzen und nur die Größe der Proteine für die Trennung wichtig wird.

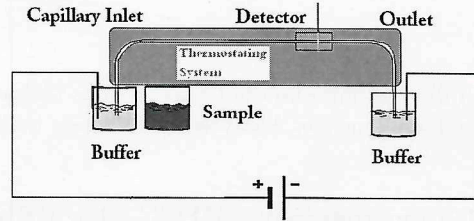
6.4.2 Isoelektronische Fokussierung - IEF

Es werden mit dieser Methode nur amphotere Teilchen betrachtet. Zusätzlich zur Spannung gibt es einen gepufferten pH-Gradienten im Gel. Die Teilchen werden sich am jeweiligen isoelektrischen Punkt anreichern. Für ihn gilt: $pH = \frac{pk_{a1} + pk_{a2}}{2}$

6.4.3 2D Elektrophorese

Ein SDS-PAGE und z.B. ein IEF werden kombiniert (in zwei Dimensionen nacheinander), um eine Auftrennung nach Größe und isoelektrischem Punkt zu erreichen.

6.5 Kapillar-Elektrophorese - CE



Bei der CE wird ein Analyt durch die elektroosmotische Kraft (EOF) durch eine Kapillare gezogen, wo die Trennung erfolgt. Am Ende der Kapillare sitzt ein UV-Detektor und der Ausgang der Kapillare ist ein Auffangbehälter mit einer Pufferlösung.

6.5.1 Die Kapillare

Die Kapillare besteht meistens aus Quarzglas, da dieses kein UV absorbiert und der Detektor hindurchscheitern kann. Eine Kapillare hat einen Innendurchmesser von 20 - 200 µm. Mit den kleinsten sind Bodenzahlen N von bis zu 1'000'000 möglich.

Electroosmotische Geschwindigkeit

$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \frac{\mu_{ep} \cdot Voltage}{L_{detector}} = \frac{L_{detector}}{t_{neutralmarker}}$, wobei dann $\mu_{ep} = \frac{Q}{6\pi \cdot r \cdot \eta} = \frac{L_{detector} \cdot L_{total}}{Voltage \cdot t}$ die elektroosmotische Mobilität ist.

auch: $\mu_{ep} = \frac{\zeta \cdot \epsilon}{4\pi\eta}$

Zeta-Potential ζ : Die OH-Gruppen (Silanol) am Rand des Quarzglases sind für eine pH-Abhängigkeit der Oberflächenladung verantwortlich. Bei niedrigem pH sind sie protoniert, bei hohem pH deprotoniert. Mit steigender Oberflächenspannung steigt auch das Zeta-Potential. Um den Fluss möglichst gleichmäßig zu halten gibt es verschiedene Puffer, die den pH konstant halten.

6.5.2 Electroosmotic Force - EOF

Sie ist die Bewegung einer geladenen Flüssigkeit relativ zu einer geladenen Oberfläche unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes (Elektroosmose). Je stärker die EOF, desto schneller die Flüssigkeit in der Kapillare. Der Vorteil ist, dass es kaum gebremste Lösung in Oberflächennähe gibt und die Fließfront daher gleichmäßig gerade ist.

Parameter	Einfluss	Bemerkung
Feldstärke E	proportional zu EOF	Effizienz steigt beim Erhöhen
Temperatur T	EOF steigt um 2% pro Kelvin	Zu hohe Temperatur kann die Auflösung verringern
pH-Wert	EOF ist klein bei niedrigem pH; ab 7-8 konstant	Einfluss auf Selektivität
Ionenstärke des Puffers	reziprok zum Zeta-Potential und zur EOF	Einfluss auf das Trennsystem
kathodische Tenside	erniedrigt EOF oder kehrt sie um	Adsorbiert an der Kapillaroberfläche
organische Modifier	Änderung des Zeta-Potentials und der Viskosität	viele Einflüsse
neutrale hydrophile Polymere	erniedrigt EOF durch Schirmung der Oberflächenladung	adsorbiert an der Oberfläche
Kapillar-Coating	meist Unterdrückung der EOF	Stabilität eingeschränkt

6.5.3 Methoden

Capillary Zone Electrophoresis - CZE

KAPILLARE: Quarzglas; manchmal beschichtet (Kapillar-Coating)

MECHANISMUS: Die Kapillare und die zwei Pufferreservoirs sind am Anfang mit einer Grundelektrolytlösung gefüllt. Diese ist sehr hoch konzentriert, damit pH und Leitfähigkeit fest definiert sind. Ein kleiner Teil von Pufferlösung wird eingebracht (einige nL) und durch die angelegte Spannung aufgetrennt: Anionen bewegen sich zu Anode, Kationen zu Kathode und neutrale Teilchen mit der EOF.

TRENNUNG: Trennung von Kationen und/oder Anionen je nach angelegter Spannungsrichtung. Anionen werden auch von der EOF mitgezogen und kommen später an. Neutrale Teilchen können nicht getrennt werden.

Kapillargelelektrophorese - CGE

KAPILLARE: mit Gel gefüllt

MECHANISMUS: Vorgehen wie bei CZE

TRENNUNG: Die Trennung erfolgt durch die Ladung und die Größe, da das Gel wie eine Art Molekularsieb dient. Daher ist diese Methode nützlich für die Trennung von Analyten mit kleinen Unterschieden in der Ladungsdichte (Verhältnis Ladung : Masse)

Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography - MECC oder MEKC

KAPILLARE: mit oberflächenaktiven Substanzen (Tensiden) in der Lösung

MECHANISMUS: Die Mizellen haben den geladenen Teil außen und werden so von der EOF zur Kathode mitgezogen, auch wenn sie nach ihrer Ladung Richtung Anode gezogen werden. Dabei können sich Analytmoleküle entweder zeitweise oder dauerhaft in der hydrophoben Mizell-Phase lösen

TRENNUNG: Die Trennung erfolgt zum einen wie bei CZE, aber durch die zusätzliche Phase der Mizellen wird auch nach der Löslichkeit in hydrophoben LSM getrennt. Auch neutrale Komponenten können so getrennt werden. Sie haben alle eine ähnliche Retentionszeit

Trennung von Enantiomeren

In der CE kann die Komplexbildung zur Trennung von Enantiomeren genutzt werden. Verwendete Liganden sind z.B. Cyclodextrine (Wirtsmolekül), Ringe aus Glucoseeinheiten, die einen Zylinder mit hydrophobem Innenraum und hydrophiler Schale bilden. Im Innern können hydrophobe Teilchen Komplexe bilden. Unterschiedliche Enantiomere haben andere Komplexbildungskonstanten und daher eine unterschiedliche Retentionszeit. Ähnliches ist auch mit Kronenthern möglich. Cyclodextrine können auch als Pufferzusatz dienen und die Auflösung von Peaks verbessern.

Kapillarisoelektronische Fokussierung - CIEF

Funktioniert wie normale IEF, aber in einer Kapillare.