

Dünnschicht und Säulenchromatographie

IM LABOR SIND SCHUTZBRILLEN ZU TRAGEN!

Allgemeines

Definition des Begriffes Chromatographie

Unter Chromatographie versteht man physikalische Methoden, bei denen eine Stofftrennung durch Verteilung von Substanzen zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase erfolgt.

Erklärung der Vorgänge bei der chromatographischen Trennung

Unter Adsorption versteht man die Aufnahme von Substanzen an der Oberfläche einer festen Phase. Unter Absorption versteht man die Aufnahme von Substanzen in eine flüssige Phase. Adsorptionschromatographie und Absorptionschromatographie werden für die Beschreibung der Prinzipien als äquivalent angenommen.

Die chromatographischen Methoden können nach Tab. 1 eingeteilt werden.

Tab.1 - Einteilung der chromatographischen Methoden

| | <i>Stationäre. Phase ist fest (S)</i> | <i>Stationäre Phase ist flüssig (L)</i> |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| <i>Mobile Phase ist flüssig (L)</i> | LSC | LLC |
| <i>Mobile Phase ist gasförmig (G)</i> | GSC | GLC |

Abkürzungen: Säulenchromatographie: (SC), Gaschromatographie: (GC), Dünnschichtchromatographie: (DC),

Es gibt auch noch andere Arten der Chromatographie, z. B. Ionenauschromatographie und Gelchromatographie

Adsorptions- bzw. Adsorptionsisotherme

Für die Beschreibung der Gleichgewichte (Adsorption oder Absorption) gilt für ideale und isotherme Bedingungen für jede Substanz X die Gleichung:

$$K_{T_x} = \frac{\text{Konzentration der Verbindung } x \text{ in der stationären Phase}}{\text{Konzentration der Verbindung } x \text{ in der mobilen Phase}} = \frac{C_{\text{stat}_x}}{C_{\text{mob}_x}}$$

Gleichung der idealen Adsorptionsisotherme

Für die entsprechenden Geraden erhält man verschiedene Steigungen je nach Größe von K_{T_x} .

Im Realfall liegen Adsorptionsisothermen vor, welche ab einer bestimmten Konzentration der gelösten bzw. adsorbierten Substanzen von der Linearität abweichen. Mittels dieser Isothermenformen können wir den chromatographischen Trennvorgang erklären.

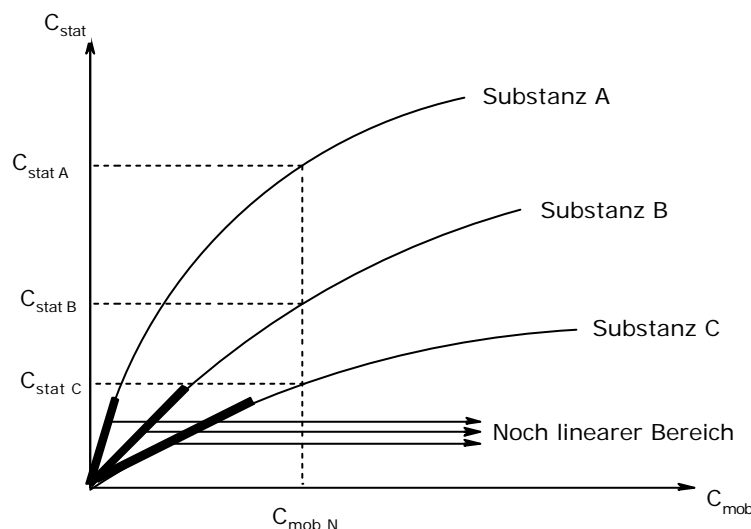


Abb. 1 - Reale Adsorptionsisothermen

Wir betrachten eine bestimmte Konzentration $C_{\text{mob } N}$, die für alle Substanzen gleich sein soll. Aus der Abbildung 1 folgt, dass bei $C_{\text{mob } N}$ die Konzentrationen $C_{\text{stat } A}$, $C_{\text{stat } B}$ und $C_{\text{stat } C}$ unterschiedlich sind. Dies gilt offenbar für alle Konzentrationen $C_{\text{mob } N}$. Dies bedeutet, dass die Substanz A die stärkste, die Substanz C die geringste Affinität zur stationären Phase hat.

Bewegen sich die Verbindungen A, B und C in gelöster Form mit der mobilen Phase an der stationären Phase vorbei, so sind bei Gleichgewichtsein-

stellung die Aufenthaltszeiten in der stationären Phase für die Verbindung A am längsten, für die Verbindung C am kürzesten. Die Aufenthaltszeiten in der mobilen Phase sind für alle Verbindungen (A, B und C) gleich.

Bewegt sich die mobile Phase mit A, B und C an der stationären Phase vorbei, bis A, B und C zu einem bestimmten Punkt gebracht sind, so sind dabei für A, B und C verschieden lange Zeiten vergangen. Man kann also an diesem Punkt die Verbindungen A, B und C nacheinander getrennt abnehmen. Diese Vorgangsweise entspricht der Ausführungsform der Säulenchromatographie (SC). Wird die Elution nach einer bestimmten Zeit abgebrochen, so sind A, B und C nacheinander in der Säule angeordnet. Diese Arbeitsweise entspricht der Ausführungsform der Dünnschichtchromatographie (DC). Das Ziel der Chromatographie ist es, diese Auftrennung in möglichst kurzer Zeit möglichst vollständig und ökonomisch zu erreichen.

Zusammenhang zwischen der Form der Adsorptionsisotherme und der Fleckenform in der DC bzw. der Zonenform in der SC

Der Einfluss der Form der Adsorptionsisotherme auf die Fleckenform im DC und die Peakform in der SC wird in Abb. 5 bildhaft dargestellt.

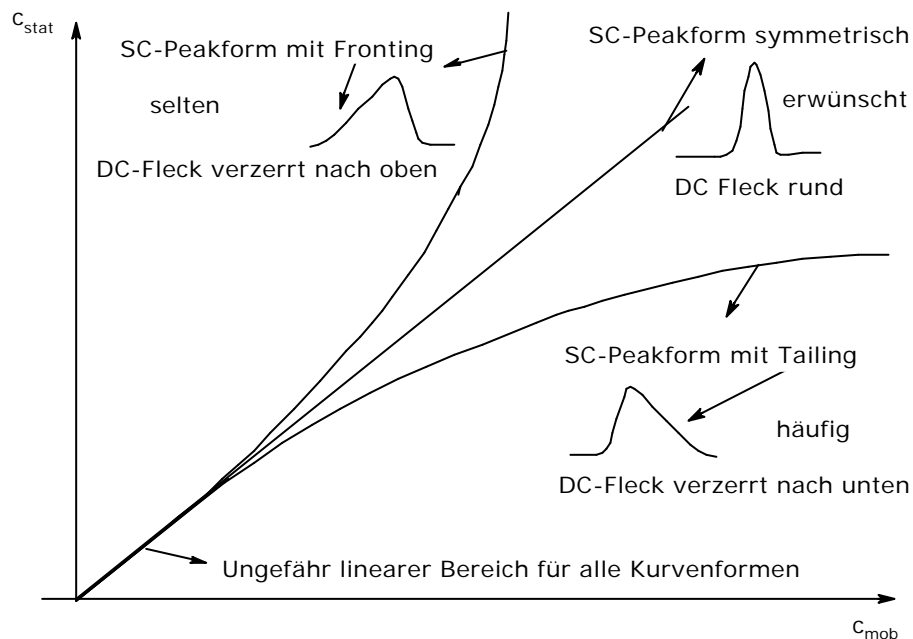


Abb. 5 - Isothermenform und Fleckenform in der DC und Peakform in der SC

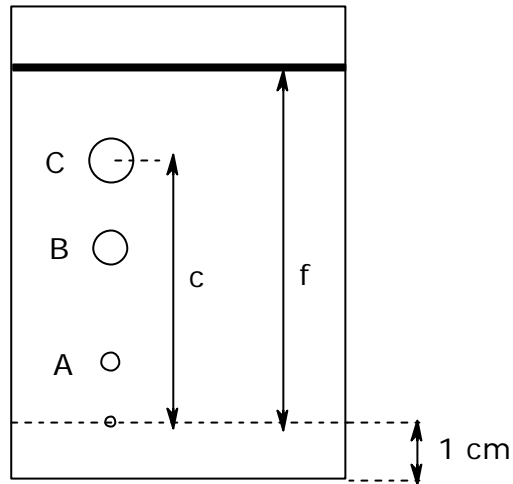
Trennung in Abhängigkeit von der aufgetragenen Substanzmenge und der Fleckengröße

Die wesentlichsten Faktoren sind die Größe des Startfleckes bzw. der Startzone, die Verbreiterung der Flecken bzw. Zonen durch Diffusion während der Wanderung der Substanzen, die Form der Adsorptionsisotherme und die Relation der Menge an dosierter Substanz zur Menge an stationärer Phase.

Größere Startflecken und höhere Startkonzentrationen führen, unter sonst gleichen Bedingungen, zu schlechteren Trennungen. Das Dosiervolumen bei der SC bzw. der Startfleckdurchmesser bei der DC sollen zwar möglichst klein sein, eine beliebige Verkleinerung ist jedoch nicht möglich, da ein Minimalvolumen immer aufgebracht werden muss. Eine Konzentrationsgrenze, abhängig von der Detektionsempfindlichkeit, kann ebenfalls nicht unterschritten werden. Während der chromatographischen Trennung (Elution) erfolgt eine Verbreiterung der Zonen bzw. der Flecke durch Diffusion. Auf diese Diffusionsverbreiterung haben viele Faktoren einen Einfluss. Sehr wichtig dafür ist die Gleichförmigkeit der Packung der Säule bzw. jene der Beschichtung der Dünnschichtplatte. Durch in Längs- und Querrichtung unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten, Randeffekte, Einflüsse der Inhomogenitäten in der stationären Phase und nichtlineare Verteilungsisothermen sind die Flecke nicht kreisrund, sondern mehr oder minder länglich verzogen. Man nennt diese Erscheinung „Tailing“. Im DC führt das Fronting zur Schwanzbildung nach oben; das Tailing führt zur Schwanzbildung nach unten.

Beschreibung der Lage eines Fleckes im DC (R_f -Werte)

Der R_f -Wert dient der zahlenmäßigen Beschreibung eines Dünnschichtchromatogramms.



$$R_{fc} = \frac{c}{f} = \frac{\text{Entfernung des Verbindungsfleckes vom Start}}{\text{Entfernung der Laufmittelfront vom Start}}$$

Abb. 2 - Definition des R_f -wertes

Zur Messung von c wird der optische Mittelpunkt des Fleckes (die Stelle der höchsten Intensität) angenommen. Zur Messung von f wird entweder vor Beginn des Chromatogramms mit Bleistift eine dünne Markierungslinie gezogen und das Chromatogramm bis zu dieser Linie entwickelt, oder es wird sofort nach Beendigung des Chromatogramms die Lösungsmittelfront markiert. Der R_f -Wert ist für jede Substanz in einem bestimmten Trennsystem charakteristisch.

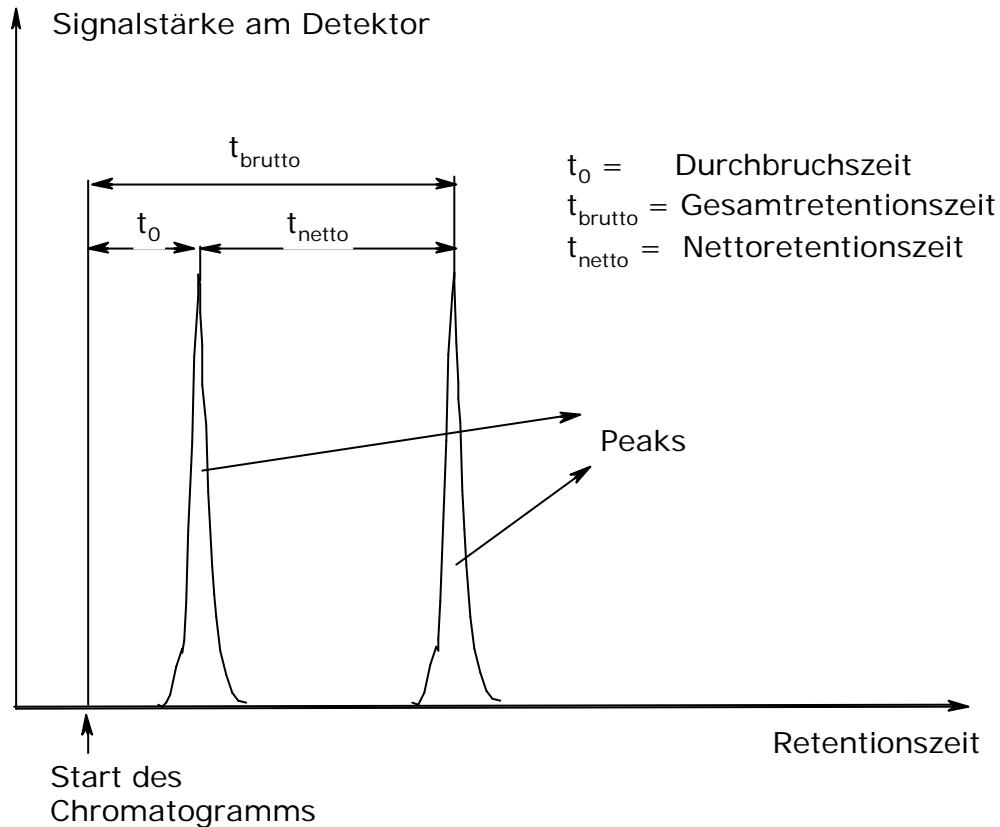
Beschreibung der Lage eines Signales in der Säulenchromatographie (Kapazitätsfaktor, k' -Wert)

Die Lage eines Signales im Säulenchromatogramm wird durch den Kapazitätsfaktor (k' -Wert) beschrieben. Dieser ist definiert nach Abb. 3. Für jeden getrennten Peak gibt es einen bestimmten k' -Wert. Diese Definition gilt genau nur für symmetrische Peaks.

Die Durchbruchzeit t_0 entspricht der Aufenthaltszeit einer Substanz in der Säule, die von der stationären Phase nicht zurückgehalten wird.

Die Gesamtretentionszeit t_{brutto} entspricht der Gesamtzeit die sich die Substanz in der Säule befindet.

Daher ist die Nettoretentionszeit t_{netto} jene Zeit, die sich die Substanz nur in der stationären Phase aufhält. Diese Nettoretentionszeit ist für die Substanz in einem bestimmten Trennsystem charakteristisch.



$$k' = \frac{\text{Nettoretentionszeit}}{\text{Durchbruchzeit}} = \frac{t_{\text{netto}}}{t_0}$$

Abb. 3 - Ermittlung des k' -Wertes aus einem Säulenchromatogramm

Die Bestimmung der Durchbruchzeit t_0 erfolgt durch Messung der Retentionszeit einer Verbindung, die sicher gar nicht zurückgehalten wird.

Die stationäre Phase

Struktur und Eigenschaften von Kieselgel für die Chromatographie

Kieselgel ist die meistverwendete stationäre Phase. Das in diesen Übungen verwendete Kieselgel hat eine Korngröße von 0.04 mm - 0.063 mm.

An der Oberfläche des Kieselgels befinden sich freie OH-Gruppen.

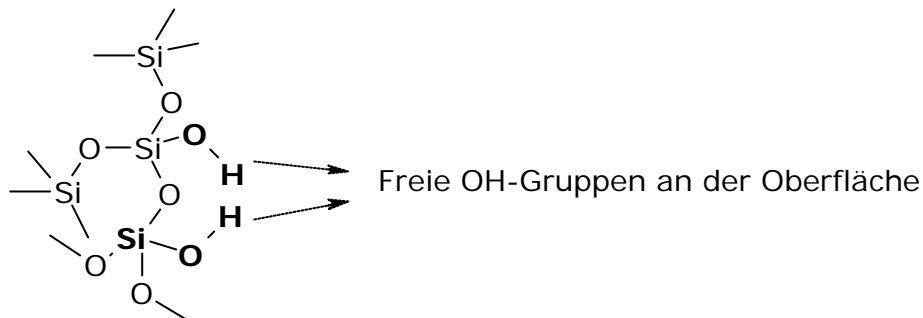


Abb. 4. Struktur von Kieselgel

An diesen freien OH-Gruppen an der Oberfläche der Kieselgelkörner können Adsorptions-Desorptionsgleichgewichte stattfinden. Dabei ist besonders die Bildung von Wasserstoffbrücken von Bedeutung. Unter diesen freien OH-Gruppen gibt es sehr unterschiedlich aktive Zentren. Manche können sehr starke Wechselwirkungen ausüben, andere wieder nur schwache. Um ein gutes Chromatogramm zu erhalten, müssen die zu stark aktiven Zentren deaktiviert werden. Dies erfolgt durch polare, wasserstoffbrückenbildende Anteile der mobilen Phase, meist Spuren an Wasser oder 1 - 3 % Ethanol. Völlig trockenes Kieselgel ist als stationäre Phase nicht geeignet. Diese freien OH-Gruppen können durch chemische Reaktionen mit organischen Resten verknüpft werden. Damit kann die Oberfläche des Kieselgels in weiten Bereichen modifiziert und die Selektivität der Wechselwirkungen verändert werden. Weiters kann dadurch die Art der Chromatographie von Adsorptionschromatographie zu Verteilungschromatographie verschoben werden. Man nennt diese stationären Phasen chemisch gebundene stationäre Phasen.

Dünnschichtplatten

Die verwendeten DC-Platten werden vom Institut bereitgestellt und bestehen aus einem Trägermaterial aus dünnem Aluminium mit einer Schichtdicke der stationären Phase von ca. 0.25 mm. Die Größe der Platten beträgt für Standarddünnschichtchromatogramme ca. 2.5 cm x 5 cm für das Auftragen von 1 bis 3 Startflecken. Für mehr als 3 Startflecke werden DC-Platten verwendet, welche die Breite der DC-Kammer ausnutzen. Die ge-

naue Größe der Platten ergibt sich aus der Auflage, dass möglichst viele Platten aus einer großen Platte erhalten werden. Die stationäre Phase besteht meist aus Kieselgel, es gibt aber auch andere Belegungen, z. B. Aluminiumoxid, Cellulose und chemisch modifizierte Kieselgele. Die Korngröße der Belegung beträgt ca. 15 µm.

Für spezielle Anwendungen gibt es auch Platten, bei denen das Trägermaterial aus Glas oder Polyester besteht.

Trennsäulen

Je nach Einsatzgebiet gibt es eine Vielzahl von Ausführungsformen von Trennsäulen. Material und Durchmesser hängen vom Einsatzgebiet ab. Abnehmende Korngrößen und zunehmende Viskositäten der mobilen Phase führen zu stark ansteigenden Säulenvordrücken bis zu 150 bar. Es werden daher für grobkörnige stationäre Phasen bei Drücken bis 10 bar Glas oder Kunststoffssäulen verwendet, bei Drücken darüber werden Stahlsäulen eingesetzt.

Das Durchpumpen der mobilen Phase kann durch Schwerkraft, Gasdruck oder mittels mechanischer Pumpen erfolgen.

Die Dosierung des Substanzgemisches kann entweder durch direkte Aufgabe an den Beginn der Säule oder über spezielle Dosiersysteme erfolgen. Die Detektion der getrennten Verbindungen im Eluat kann diskontinuierlich durch separate Chromatogramme (DC) oder kontinuierlich mittels eines in den Strömungsgang geschalteten Detektors erfolgen.

Die mobile Phase

Die Güte der chromatographischen Trennungen wird von der Art der stationären und der Art der mobilen Phase bestimmt.

Eluotrope Reihe

Die eluotrope Reihe stellt eine Anordnung der als mobile Phasen üblichen Lösungsmittel dar. Dabei werden in absteigender oder in aufsteigender Reihenfolge die Lösungsmittel nach ihrer Elutionskraft bei Kieselgel oder

Aluminiumoxid als stationäre Phase angeordnet. Die in Tab. 2 angegebenen Zahlenwerte charakterisieren die jeweiligen Elutionsstärken.

Tab. 2 – Elutionsstärkeparameter (ϵ^0 -Werte) für einige Lösungsmittel

| Lösungsmittel | $\epsilon^0_{Al_2O_3}$ | $\epsilon^0_{SiO_2}$ |
|----------------------|------------------------|----------------------|
| Pentan | 0.00 | 0.00 |
| Diisopropylether | 0.28 | 0.21 |
| Dichlormethan | 0.42 | 0.32 |
| Essigsäureethylester | 0.58 | 0.38 |
| Acetonitril | 0.65 | 0.50 |
| Methanol | 0.95 | 0.73 |

Zur systematischen Entwicklung optimaler Trennungen für ein kritisches Stoffpaar wurde vielfach versucht mobilen Phasen, je nach deren eluierender Wirkung an einer bestimmten stationären Phase einen Zahlenwert zuzuordnen. Aus Tabellen bzw. Kurven kann dann der ϵ^0 -Wert für ein Lösungsmittelgemisch ermittelt werden. Man kann davon ausgehen, dass der k' -Wert bzw. der R_f -Wert bei gleichem ϵ^0 -Wert ungefähr gleich bleibt, auch dann wenn eine unterschiedliche Zusammensetzung der mobilen Phase vorliegt.

Die wichtigsten Kriterien für die Auswahl der mobilen Phasen in der LC

Lösungseigenschaften - In der analytischen Chromatographie sind wegen der nötigen sehr geringen Konzentrationen die Lösungseigenschaften nicht sehr bedeutend. Sehr entscheidend sind sie bei der präparativen Chromatographie, da in diesem Falle relativ sehr hohe Konzentrationen (5–10 %) verwendet werden.

Eluierende Wirkung - Diese korreliert ungefähr mit den Lösungseigenschaften. Erwünscht wäre eine hohes Lösungsvermögen, niedrige Viskosität und eine geringe eluierende Wirkung, besonders bei Verwendung von Kieselgel als stationäre Phase. Dies wäre für die präparative Chromatographie ganz besonders wichtig, es mangelt jedoch an solchen Lösungsmitteln in Relation zu den stationären Phasen

Detektorkompatibilität - 80 % Durchlässigkeit bei der Messwellenlänge reichen aus

Reinheit - Es kommen praktisch nur käufliche Lösungsmittel in Frage.

Siedepunkt.

Preis.

In der Praxis ist die Auswahl der Lösungsmittel als mobile Phasen eingeschränkt. Die Optimierung der Trennung wird durch Variation der stationären Phasen und durch aus höchstens 3 Komponenten bestehenden Lösungsmittelgemischen erreicht.

Gradientenelution

Bei der Gradientenelution wird die eluierende Wirkung der mobilen Phase während der Chromatographie erhöht und zwar durch kontinuierlichen Zusatz eines stärker eluierenden Lösungsmittels zu einem weniger stark eluierenden Anfangslösungsmittel. Stark zurückgehaltene Substanzen werden damit relativ zur unveränderten mobilen Phase schneller eluiert.

Vorteilhaft damit verbunden sind ein Zeitgewinn und eine Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit durch höhere und schärfere Peaks (Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses). Nachteilig ist, besonders bei der Adsorptionschromatographie, die Veränderung der Gleichgewichtseinstellung der stationären Phase. Vor dem nächsten Chromatogramm muss durch längeres Durchpumpen der Anfangsphase die anfängliche Gleichgewichtseinstellung wieder erreicht werden. Damit ist ein großer Teil des Zeitgewinnes bei einem Chromatogramm meist aufgehoben. Der Einfluss einer Gradientenelution auf die Trennung ist sehr schwer abzuschätzen. Dies besonders deshalb, weil während der Gradientenelution die stationäre Phase nicht im Gleichgewicht mit der mobilen Phase ist. Die Steilheit des Anstieges des Gradienten mit der Zeit ist sehr begrenzt und kann nur durch Versuche ermittelt werden.

Bei der Verwendung von protischen Lösungsmitteln wie CH_3OH oder $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ als zweite mobile Phase für den Gradienten bei der Adsorptionschromatographie wird die Gleichgewichtseinstellung mit der stationären Phase während des Chromatogramms meist nicht erreicht. Bei zu steilem Anstieg des Gradienten werden daher oft unreproduzierbare Ergebnisse erhalten.

Anwendungen

Typische Probleme und Fehlerquellen bei DC und SC

Der Gehalt an sehr polaren, wasserstoffbrückenbindenden Substanzen wie Wasser, Methanol, Ethanol und Essigsäure und basische Substanzen wie Triethylamin in der mobilen und in der stationären Phase hat einen großen Einfluss auf Fleckform und R_f -Wert, bzw. Zonenform und k' -Wert. Allgemein gilt, dass ein hoher Anteil an den obgenannten Verbindungen in der mobilen Phase die Retention vermindert und zu größeren R_f - bzw. zu kleineren k' -Werten führt. Da Kieselgel saure Eigenschaften hat und basische Analysesubstanzen sehr stark zurückhält, kann man versuchen diese unerwünschten Eigenschaften durch Zusatz von einigen Prozent Triethylamin zur mobilen Phase zu unterdrücken. Dabei werden durch das Triethylamin die stark sauren Zentren an der Kieselgeloberfläche abgesättigt und die Retention nimmt ab. Zur Adsorptionschromatographie von stark sauren Verbindungen, welche sehr hohe Retention aufweisen, kann man der mobilen Phase geringe Anteile (bis zu einigen Prozent) flüchtige Säuren (Essigsäure) zufügen, um die eluierende Wirkung der mobilen Phase zu erhöhen.

Bei Verwendung von mobilen Phasen sehr unterschiedlicher Elutionskraft (Toluol/Eisessig; Toluol/Triethylamin) kann es zur Ausbildung von Scheinchromatogrammen kommen. Dabei wird im unteren Teil der Laufstrecke der mobilen Phase die Komponente mit der hohen Polarität kontinuierlich entzogen. Die schwer eluierbaren Verbindungen werden dabei eine gewisse Strecke an der Front der mobilen Phase eluiert. Wenn nicht mehr genug von der polaren Komponente in der mobilen Phase ist, dann wird die schwer eluierbare Verbindung nur ganz wenig oder nicht mehr wandern. Die reale Front der mobilen Phase bewegt sich jedoch weiter nach oben. Das Ergebnis (Abb. 6) ähnelt einem wirklichen Chromatogramm, jedoch ist bezüglich der schwer eluierbaren Verbindung keine Trennung erfolgt.

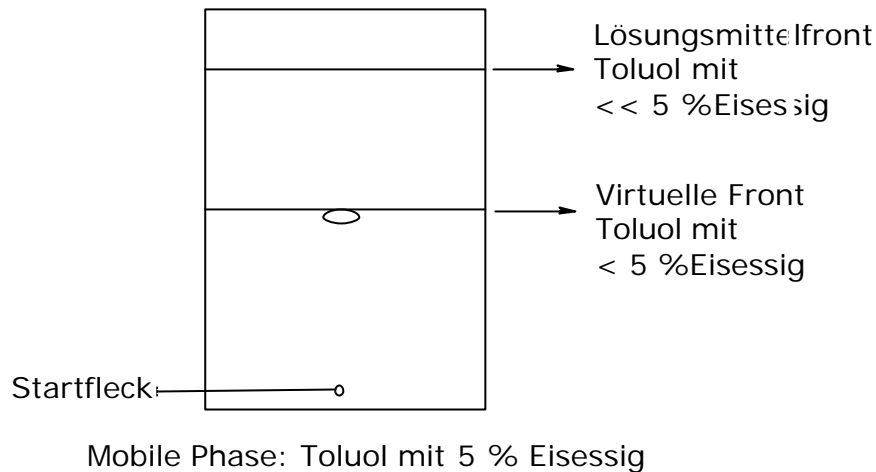


Abb. 6 - DC mit mangelnder Gleichgewichtseinstellung

Weitere häufige Fehlerquellen bestehen darin, dass zuviel oder zuwenig Substanz aufgetragen wird. Dies resultiert in extrem breiten und schlecht getrennten Flecken bzw. in zu geringer Stärke der Flecke. Es ist daher das Ergebnis des Auftrags des Startflecks durch Betrachtung unter der UV-Lampe zu kontrollieren bevor das Chromatogramm gestartet wird. Ein schiefes Chromatogramm ist entweder auf Fehler in der stationären Phase oder auf grobe Hantierungsfehler, wie schiefes Einstellen der Platte in die Kammer zurückzuführen. In diesem Falle ist das Chromatogramm zu wiederholen. Es kann auch vorkommen, dass Chromatogramme gebildet werden, bei denen die Front der mobilen Phase gebogen ist. Dies ist auf den Randeffekt zurückzuführen. Dieser Randeffekt stammt meist von einer nicht ausreichenden Äquilibrierung der Dampfphase in der Kammer mit der mobilen Phase. Abhilfe kann dadurch erhalten werden, dass nach Einfüllen der mobilen Phase in die Kammer längere Zeit bei geschlossenem Deckel gewartet wird, bis Äquilibrierung erfolgt ist. Dies dauert ca. 5 - 10 Minuten.

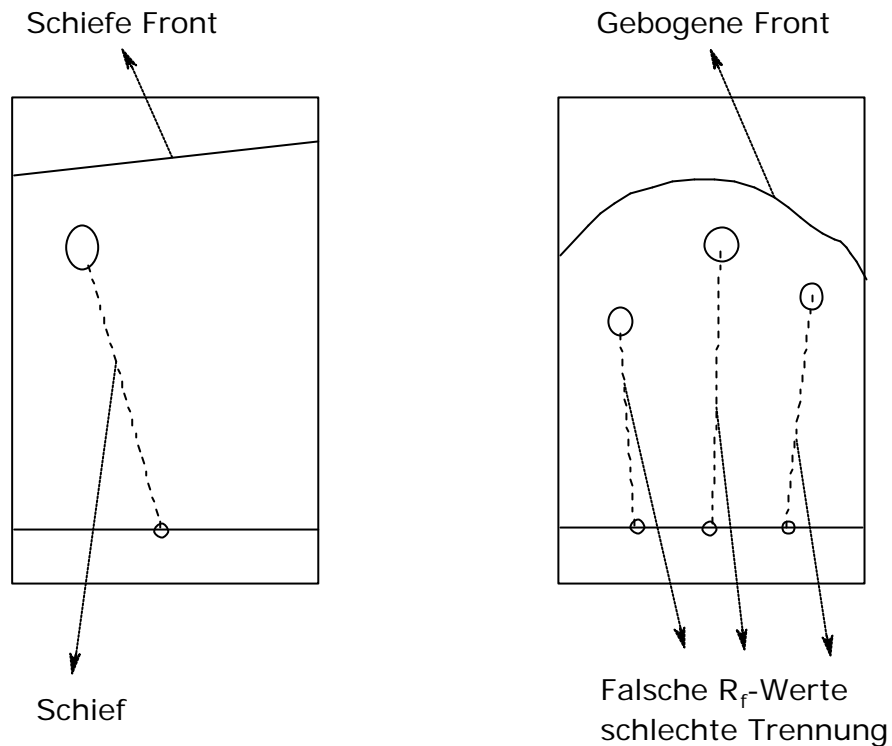


Abb. 7 - DC mit Randeffekten

Die Erreichung passender k' - bzw. R_f -Werte kann nur durch Versuche ermittelt werden. Voraussetzung für die methodische Optimierung der Trennung ist wenigstens ein einziges Chromatogramm in dem das kritische Stoffpaar wenigstens geringfügig getrennt ist.

An Adsorptionsphasen werden meist die Trennungen mit Lösungsmittelmischungen aus viel von einem schwach eluierenden Lösungsmittel (meist Hexan, Petrolether, oder CCl_4) und wenig von einem stark eluierenden Lösungsmittel (meist Ethanol oder Essigsäureethylester) erhalten. Konzentrationen von $> 5\%$ Ethanol sind zu vermeiden, da die Adsorptionsphase dabei leidet. Konzentrationen $> 10\%$ Ethanol führen meist zur starken Schädigung der Adsorptionsphase. Bei der Adsorptionschromatographie, ganz besonders an Al_2O_3 haben H_2O und andere protische Substanzen (Alkohole, Essigsäure) sowie der pH -Wert einen extrem starken Einfluss auf die Retentionseigenschaften der stationären Phase. Geringe Konzentrationen von H_2O oder Ethanol sind aber notwendig um ein Austrocknen der stationären Phase zu verhindern. Die Adsorptionsphase muss stets im Gleichgewicht mit Wasser oder anderen protischen Lösungsmittel stehen um die sehr aktiven Adsorptionszentren abzudecken. Das Austrocknen der

stationären Phase führt zu irreversibler Retention und zu starkem Tailing sowie zu schlecht reproduzierbaren Chromatogrammen.

Bei jeder Veränderung der mobilen Phase muss die Gleichgewichtseinstellung abgewartet werden, da sonst unreproduzierbare k' -Werte, bzw. R_f -Werte erhalten werden. Dies erfolgt durch ausreichend langes Durchleiten der neuen mobilen Phase (bei der SC Äquilibrierung). Bei der Dünnschichtchromatographie (DC) in ungesättigten Kammern ist die stationäre Phase nie völlig im Gleichgewicht. Man gibt zuerst die mobile Phase in die Kammer, wartet dann 5 - 10 Minuten und stellt erst dann die Dünnschichtplatte ein. Dies ist bei Verwendung von Lösungsmittelgemischen sehr unterschiedlicher Elutionswirkung (z. B. Toluol-Eisessig oder Petrol-ether-Ethanol), oder sehr unterschiedlicher Flüchtigkeit (Ether-Toluol), besonders bedeutsam. Abb. 6 soll ein typisches fehlerhaftes Chromatogramm mit mangelnder Gleichgewichtseinstellung darstellen.

Nötige Angaben bei der Beschreibung eines Chromatogrammes

Analysenthema, Gerät, stationäre Phase (Hersteller, Typ, Korngröße, Belegung), Säulendimensionen, mobile Phase, Dosiervolumen und ungefähre Konzentration, Temperatur, Probenlösungsmittel, Fluss, Gradient, Vor- druck, allgemeine Angaben zur Quantifizierung und Identifizierung der Substanzen, Vergleichsverbindungen.

Detektionsmöglichkeiten für farblose Verbindungen

Während farbige Substanzen direkt visuell erkannt werden können, sind für UV-absorbierende, jedoch farblose Verbindungen Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzzusatz im Gebrauch. Befindet sich ein Substanzfleck am Kieselgel, welcher das UV-Licht absorbiert, so gelangt an dieser Stelle das ultraviolette Erregerlicht nicht an die Oberfläche der stationären Phase und der Fluoreszenzindikator wird daher dort auch nicht angeregt. Die Substanz erscheint somit als dunkler Fleck auf hellem Untergrund. Die folgenden Indikatoren sind üblich: F254 ist ein manganaktiviertes Zinksilikat, das bei 254 nm zu grüner Fluoreszenz angeregt wird. F254S ist ein säurestabiles Erdalkaliwolframat, das bei 254 nm zu blassblauer Fluoreszenz angeregt wird. F366 ist ein optischer Aufheller, der bei 366 nm zu blauer Fluoreszenz angeregt wird.

Eine andere allgemein anwendbare Methode besteht darin, Anfärbereagenzien zu verwenden. Dabei erfolgt Farbstoffbildung mittels chemischer Reaktionen an der Oberfläche der Dünnschichtplatte. Dazu kann die Dünnschichtplatte mit einer Lösung des Reagenzes besprüht, oder in diese Lösung eingetaucht werden. Es gibt viele Reagenzien für diesen Zweck, auch für spezielle Anfärbungen, z. B. bei Naturstoffen.

Häufig verwendete, allgemein anwendbare Anfärbereagenzien sind:

Molybdatophosphorsäure, Phosphomolybdic acid (PMA) $(\text{MoO}_3)_{12} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$
- Allgemein für oxidierbare Substanzen, besonders für Alkohole. Gibt blaugrüne Flecke.

Saure Molybdatophosphorsäure - Oft besser als die Molybdatophosphorsäure. Färbt Alkohole, auch geschützte Alkohole, Aldehyde und Ester an. Gibt blaue bis purpurne Flecke.

Cer-Molybdatophosphorsäure - Allgemein anwendbar, gibt unterschiedlich blaue Flecke.

Anisaldehyd - Ebenfalls allgemein anwendbar, ergibt verschiedene Farben. Die Flecke verschwinden schneller, als jene die mit PMA gebildet werden.

Weiters können spezifische oder selektive Reagenzien für die Anfärbung verwendet werden. Mit derartigen Reagenzien können Verbindungen mit bestimmten funktionellen Gruppen angefärbt und damit selektiv sichtbar gemacht werden. Beispiele dafür sind:

2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNP) - Gibt mit Aldehyden und Ketonen gelbe Flecke. Ketone reagieren langsamer.

Kaliumpermanganat - Färbt die meisten Alkene und Alkine sofort zu einem braunen Fleck an. Auch Aldehyde und Ketone geben einen gelben Fleck. Ketone und viele Ester geben Flecke erst nach Erwärmung oder nach einigen Minuten bei Raumtemperatur.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, bereits vor der Chromatographie eine Derivatisierung durchzuführen und die Derivate zu trennen.

Mit allen Derivatisierungen sind jedoch auch Nachteile besonders bei der quantitativen Auswertung verbunden.

Übungen zur Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Übungen zur Dünnschichtchromatographie:

Generell: Vor Anfertigen eines Dünnschichtchromatogramms (DC) wird eine DC-Kammer mit dem Laufmittelgemisch beschickt und bei geschlossenem Deckel ca. 5-10 min stehen gelassen, um eine Konditionierung zu ermöglichen. Vor Auftragen der Probe wird in 1 cm Entfernung vom Rand der DC-Platte eine Startlinie mit Bleistift gezogen. Auf die selbe Art wird ca. 0.5 cm vom oberen Rand eine Linie gezogen, die die Lösungsmittelfront markiert. Punkte auf der Startlinie kennzeichnen den genauen Ort der Probenaufgabe. Die Aufgabe des Substanzgemisches erfolgt mittels Mikropipette (Aufgabemenge 1-5 µl), sie ist mit Aceton sauber zu halten. Feststoffe wie auch Flüssigkeiten werden immer in Form von Lösungen auf die DC-Platte aufgebracht. Bevor eine Platte zur Entwicklung in die DC-Kammer gestellt wird, wird das Lösungsmittel entweder abgeföhnt (kühl) oder es wird das Abtrocknen abgewartet (bei leicht flüchtigen Lösungsmitteln).

Die so vorbereitete DC-Platte wird senkrecht in die konditionierte DC-Kammer gestellt, der Deckel der Kammer wird geschlossen und das Aufsteigen der mobilen Phase bis zur oberen Bleistiftlinie abgewartet. Nach Entnehmen der DC-Platte aus der Kammer wird das Laufmittel abgeföhnt, nicht färbige Substanzflecken unter der UV-Lampe sichtbar gemacht und mit Bleistift markiert.

Anfertigen eines Dünnschichtchromatogramms eines Testfarbstoffgemisches - Ein bereits in Toluol gelöstes Gemisch aus Dimethylgelb, Oracetblau 2R und Oracetrot G wird in unterschiedlichen Konzentrationen (1-5 µl übereinander) auf eine DC-Platte aufgetragen und Dünnschichtchromatogramme jeweils in Petrolether, Toluol, Dichlormethan, Diethylether und Essigsäureethylester entwickelt. Die R_f -Werte sind im Laborjournal zu protokollieren.

Optimierungsversuch - Für ein 3-Komponentengemisch aus Biphenyl/4-Nitrotoluol/Benzophenon soll die mobile Phase optimiert werden. Die 3 Komponenten werden als 30%ige Lösung in Essigsäureethylester bereitge-

stellt, zum Auftragen auf die DC-Platte wird mit Diethylether verdünnt, die richtige Verdünnung wird mittels DC bestimmt.

Für die Optimierung der mobilen Phase soll als Laufmittel ein Gemisch aus Petrolether (PE) und Essigsäureethylester (EE) verwendet werden, wobei die Anteile der beiden Laufmittelkomponenten verändert werden. Im Idealfall sollte der oberste Substanzfleck einen R_f -Wert von ca. 0.5 haben und einen R_f -Wertunterschied von 0.2-0.3 zum nächsten Fleck aufweisen. Eine mögliche Vorgehensweise wäre zum Beispiel zuerst eine relativ polare Mischung, etwa Petrolether/Ethylacetat = 3:1 auszuprobieren und entsprechend den erhaltenen R_f -Werten die mobile Phase zu verändern. Bei zu großen R_f -Werten weniger Ethylacetat, bei zu kleinen R_f -Werten mehr Ethylacetat.

Im Laborjournal ist die (geschätzte) Verdünnung der Probenlösung zu notieren und die R_f -Werte der 3 Substanzen in Abhängigkeit vom Laufmittelgemisch (Tabelle) festzuhalten.

Aufgabe Säulenchromatographie (Flashchromatographie)

In Abb. 8 ist die verwendete Apparatur zur Flashchromatographie abgebildet. Die besten Ergebnisse werden mit mobilen Phasen erzielt, die in einem als Vergleich herangezogenen DC für den obersten Substanzfleck einen R_f -Wert von ca. 0.5 ergeben und die 2. Substanz einen R_f -Wertunterschied von ca. 0.2-0.3 aufweist. Die Güte der Trennung ist nicht nur von der mobilen Phase, sondern auch von der verwendeten Kieselgelmenge abhängig. Als Faustregel gilt ein Mengenverhältnis Probe:Kieselgel = 1:30-1:100, in der folgenden Übung wird ein Verhältnis von 1:70 verwendet. Bei zu wenig Kieselgel reicht mitunter die Kapazität des Kieselgels für die verwendete Probemenge nicht aus, die Säule ist dann überladen. Aber auch eine zu große Menge an stationärer Phase ist von Nachteil, da dabei Substanz irreversibel zurückgehalten werden und eine zu starke Verdünnung bei der Elution stattfinden kann.

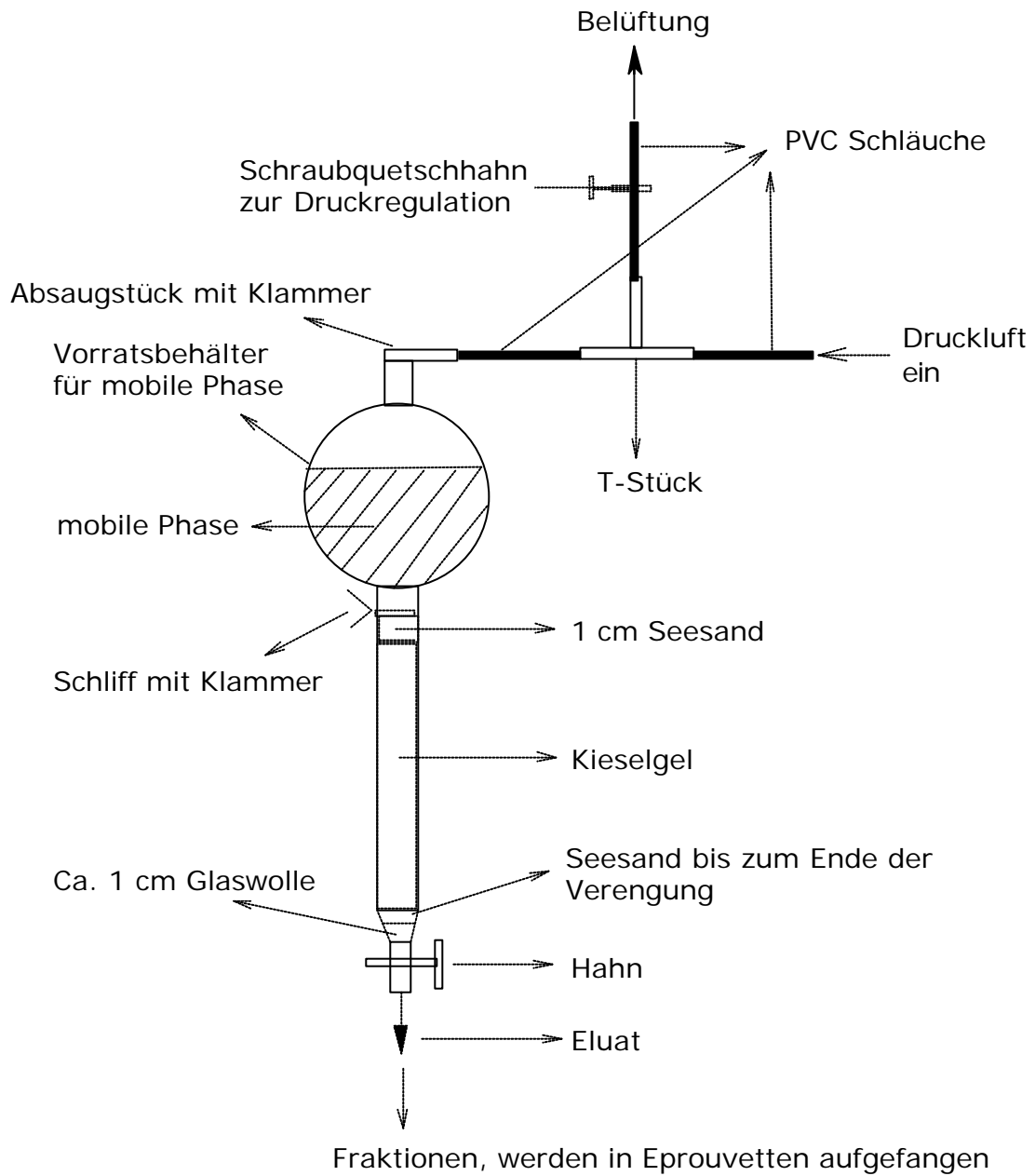


Abb. 8 - Schema einer Flashchromatographiesäule

Auszuführende Arbeiten

1. *Bestimmung der optimalen mobilen Phase* – In dieser Übung entfällt der 1. Schritt, er wurde in der DC-Übung „Optimierungsversuch“ simuliert. Die mobile Phase ist mit einem Gemisch von Petrolether/Essigester 30:1 bereits vorgegeben.

2. *Befüllen der Säule mit stationärer Phase* - Das Umfüllen des Kieselgels erfolgt im Abzug, da Kieselgel lungengängig und gesundheitsschädlich ist. Unnötige Staubentwicklung ist zu vermeiden. Vor Beginn der Arbeiten muss kontrolliert werden, ob alle Teile vorhanden und in einwandfreiem Zustand und trocken sind. Der Ablaufhahn muss geschlossen und vorsichtig geschmiert sein, wobei die Öffnung frei von Siliconfetten bleiben muss. Zuerst wird ein Stück Glaswolle oder Watte mittels Glasstab in die Verengung der Säule oberhalb des Hahnes gedrückt, um so den Austrag von Kieselgel und Seesand zu verhindern. Anschließend wird über einen Feststofftrichter Seesand bis zum Ende der Verengung der Säule zugegeben. Eine ebene, waagrechte Oberfläche des Seesandes ist durch vorsichtiges Rütteln der Säule erreichbar. Die Säule wird nun senkrecht am Gestänge befestigt, darunter platziert man für die Dauer des Befüllens einen Erlenmeyerkolben.

Dann wird das Kieselgel (70g) und langsam soviel von der mobilen Phase (Petrolether/Essigester 30:1; ist in Vorratsgefäßen vorhanden) in ein 250ml Becherglas gegeben, dass eine umfüllbare Aufschlammung entsteht. Durch vorsichtiges Schwenken und Rühren mit einem Glasstab können Luftblasen entfernt werden. Die Aufschlammung wird solange stehengelassen bis keine Wärmeentwicklung mehr stattfindet. Es sind die Vorratsgefäße der mobilen Phase verschlossen zu halten, da die leichter flüchtige Komponente bei längerem Stehen verdampft und sich damit die Zusammensetzung der mobilen Phase mit der Zeit ändert.

Nun befüllt man die Säule vorsichtig bei geschlossenem Hahn ca. 10 cm hoch mit dem Laufmittelgemisch. Luftblasen werden durch Klopfen und saches Schütteln entfernt. Nun wird das aufgeschlammte Kieselgel in die Säule eingebracht und der Ablaufhahn wird geöffnet. Wenn die Kieselgel-Laufmittel-Suspension beim Einfüllen zu dickflüssig wird, kann mit weite-

rem Laufmittel verdünnt werden. Kieselgelreste an der Glaswand werden mittels Pasteurpipette mit Laufmittel von der Glaswand gespült. Es sollte über dem sich setzenden Kieselgel nun ein deutlicher Lösungsmittelüberstand (mind. 2 cm) zu erkennen sein. Sollte das nicht der Fall sein wird mittels Pasteurpipette vorsichtig (um die stationäre Phase nicht aufzuwirbeln) Lösungsmittel zugegeben.

Achtung: Von nun an darf die Säule nicht mehr „Trockenlaufen“, d.h. das Kieselgel muss immer von Laufmittel bedeckt sein!

Nun wird durch Anlegen von Druckluft (Vordruck wird auf 1 bar eingestellt, bei vollständig geöffnetem Schlauchquetschhahn wird das Ausgangsventil der Pressluft vorsichtig geöffnet, die Regulierung des Drucks erfolgt über den Schlauchquetschhahn, s. Abb.8) das Kieselgel zusammengepackt, bis es sich nicht weiter absetzt. Nach Entfernen des Drucks wird das Packen der Säule vervollständigt, indem man an die Säulenwand klopft, Laufmittel ca. 20-25 cm über Kieselgelniveau auffüllt und das Laufmittel erneut mit Druck durch die Säule presst, bis es ca. 5 cm über dem Kieselgel in der Säule steht.

Abschließend wird ein ca. 1 cm hohes Seesandbett aufgebracht, um das Aufwirbeln von Kieselgel während späterer Arbeitsschritte zu verhindern. Das Einfüllen des Seesandes muss in kleinen Portionen mit einer Spatel erfolgen um eine zu starke Vermischung mit dem Kieselgel zu vermeiden.

3. *Probeaufgabe* - Ca. 1 g der Probe, welche Biphenyl und 4-Nitrotoluol enthält, wird in möglichst wenig mobiler Phase gelöst (5 bis max. 10 ml). Die mobile Phase in der Säule wird bis auf Höhe des oberen Seesandbettes abgelassen, und der Hahn geschlossen. Die gelöste Probe wird mittels Pasteurpipette auf den Seesand gleichmäßig aufgebracht. Man öffnet den Hahn und wartet bis die Probelösung wieder das Niveau des Seesandbettes erreicht hat. Mit einer weiteren kleinen Menge mobiler Phase (Pasteurpipette!) wird das zu trennende Gemisch vollständig ins Kieselgel eingetragen (mindestes 2x wiederholen). Dann wird die Säule vorsichtig (zuerst mit der Pasteurpipette, dann unter zu Hilfenahme eines Glastrichters) mit Laufmittel befüllt (bis ca. 5 cm unter den Rand), das Vorratsgefäß aufge-

setzt, die mobile Phase bis zum Vorratsgefäß aufgefüllt, Druck angelegt und mit dem Sammeln der Fraktionen begonnen.

4. *Eluieren* – Das Sammeln der Fraktionen erfolgt in Eprovetten ($V = 20$ ml). Zu Anfang des Eluierens wird noch ein größeres Volumen reiner mobiler Phase aus der Säule austreten. Das Durchbrechen der ersten Substanz wird durch den sogenannten Tüpfeltest bestimmt. Dazu unterteilt man eine DC-Platte mit Bleistift in kleine Rechtecke und trägt darin das in einer Eprovette aufgefangene Eluens mittels Mikropipette auf. Beim Betrachten unter der UV-Lampe kann so festgestellt werden, ob das Eluat bereits Substanz enthält oder nicht. Erst beim Auftreten der ersten Substanzanteile wird das Eluat aufbewahrt, die gesammelten noch reinen mobilen Phasen werden wieder zur Chromatographie verwendet.

Um festzustellen, in welchen Fraktionen die gewünschten Produkte enthalten sind, werden Dünnschichtchromatogramme von allen gesammelten Fraktionen (breite DC-Platten verwenden) ausgeführt, wobei auch das Ausgangsgemisch mit aufgetragen wird. Die Bewertung des Ergebnisses erfolgt durch Beurteilung dieses Chromatogramms. Es ist das Ziel möglichst keine Mischfraktionen zu erhalten, sondern beide Substanzen in chromatographisch reiner Form.

5. *Entsorgung* - Die Entsorgung des gebrauchten Kieselgels erfolgt in dem Entsorgungsbehälter für Feststoffe, der im Praktikum aufgestellt ist. Die Lösungsmittel werden ebenfalls in den dafür vorgesehenen Behältern gesammelt.