



# Instrumentelle Bioanalytik

Trennverfahren

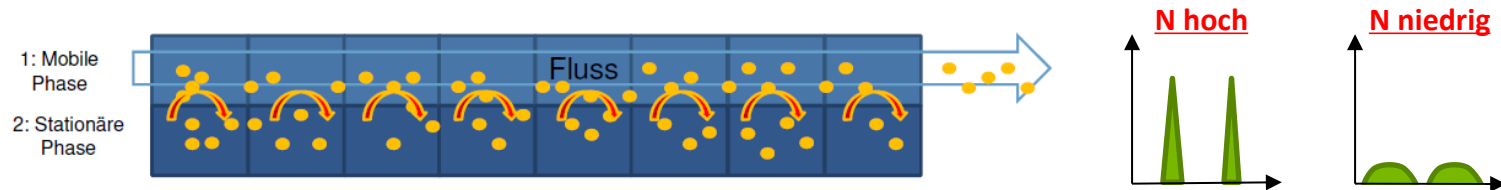
Prof. Dr. Mircea Tric

SS 2026

# Trennstufenmodell

Das **Trennstufenmodell** basiert auf folgende Annahmen:

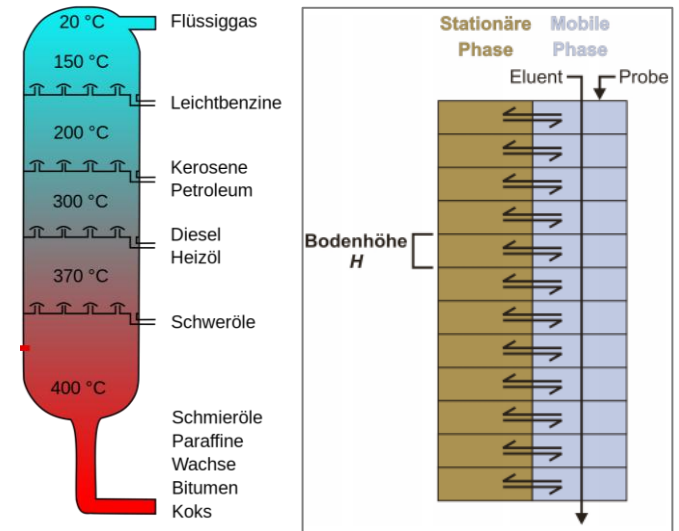
- Chromatographische Säule wird modellhaft als eine Aneinanderreihung schmaler, diskreter **Böden N** aufgefasst
- **Bodenhöhe H**: Säulenlänge in der sich **einmal** das **Gleichgewicht** des Analyten zwischen der mobilen und stationären Phase eingestellt hat
- Der schrittweise Übergang der mobilen Phase von einem Boden zum nächsten entspricht der Bewegung der mobilen Phase über die Säule
- Die **Säuleneffizienz** (Trennleistung) hängt von der **Bodenzahl N** bzw. von der **Bodenhöhe H** ab  
→ Eine effizientere Säule besitzt mehr theoretische Böden



# Beurteilung der Qualität einer Trennsäule

## Theoretische Böden (Trennstufenzahl N)

- Das Konzept der theoretischen Böden geht auf die Anzahl der Böden in der **fraktionierten Destillation** zurück
- Trennstufenzahl N (**Bodenzahl**) ist ein Maß für die **Qualität** einer **Säule** (→ dient dem Vergleich von Trennsäulen)
- Je **größer N**, desto **besser** die **Trennleistung** (schmalere Peaks), da mehr **Gleichgewichtseinstellungen!**
  - Besser für die Trennung komplexer Proben
  - Bessere Detektion der Peaks (höhere Empfindlichkeit)
- Je **kleiner** die **Bodenhöhe H** → desto **mehr theoretische Böden!**
- Berechnung der Trennstufenzahl aus dem **Chromatogramm** möglich



An jedem Boden kann eine bestimmte Fraktion abhängig von ihrem Siedepunkt abgetrennt werden.

# Trennstufenmodell

## Berechnung der theoretischen Böden für symmetrische Peaks:

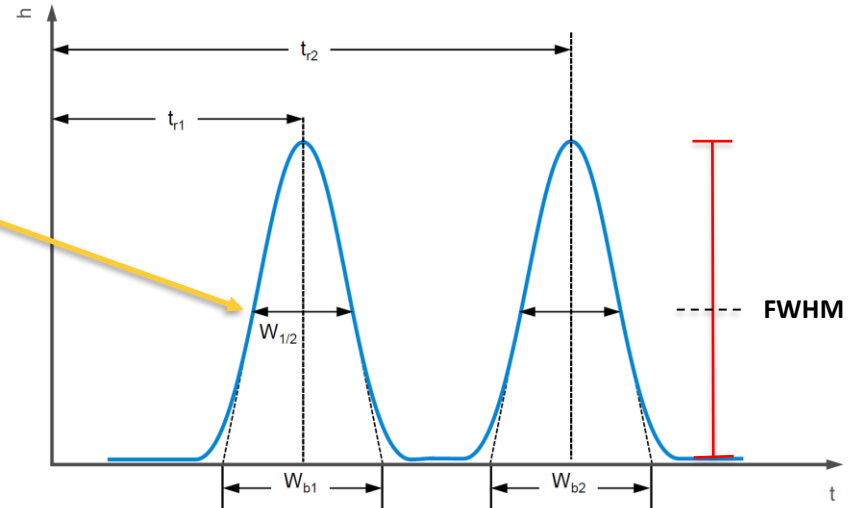
$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

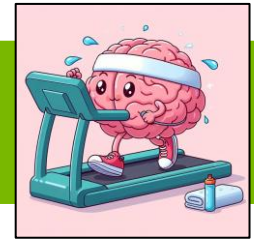
$t_R$  **Retentionszeit**

$W_h$  **FWHM = Full Width at Half Maximum**

$W_b$  **Basisbreite**

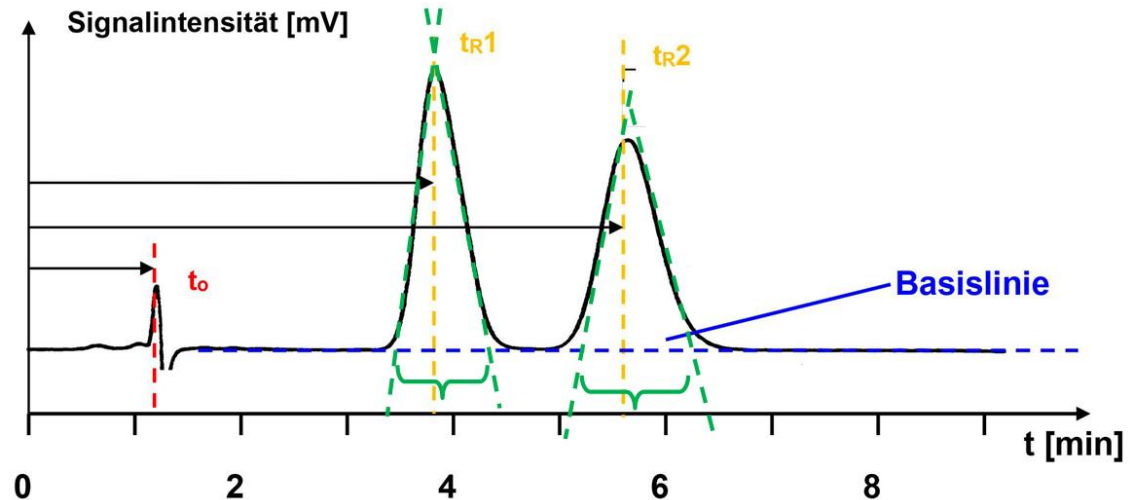


# Übung



## Aufgabe:

Berechnen Sie die theoretische Bodenzahl ( $N$ ) für den am stärksten retardierten Analyten (letzter Peak) unter Verwendung der Basispeakbreite ( $w_b$ ).



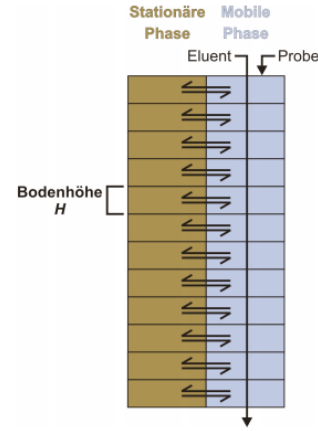
# Trennstufenhöhe (Bodenhöhe, theoretischer Boden)

## Trennstufenhöhe H (= Bodenhöhe)

(engl. HETP = height equivalent to a theoretical plate)

$$H = \frac{L}{N}$$

- H Trennstufenhöhe
- L Länge der Trennsäule
- N Trennstufenzahl



## Werte aus der Praxis

Säulentyp	N (pro Säule)	H [mm]
<b>HPLC</b>		
C18-RP-Phase mit L = 25 cm		
10 µm Partikel	2500 – 5000	0,05 – 0,1
3 µm Partikel	8000 - 18000	0,02 – 0,05

Säulentyp	N (pro Säule)	H [mm]
<b>GC</b>		
Gepackte Säule (1-3 m)	500 – 2000	1-6
Kapillarsäule 25 m, 0,1 mm I.D.	30000 – 100000	0,2 - 0,6
Kapillarsäule 25 m, 0,5 mm I.D.	20000 – 50000	0,5 – 1,3

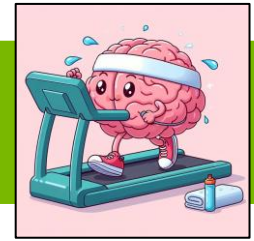


HPLC-Säule



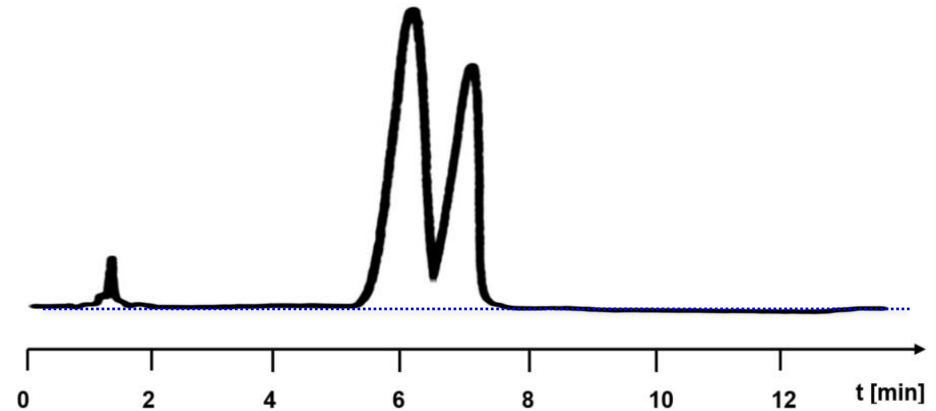
Kapillarsäule

# Übung

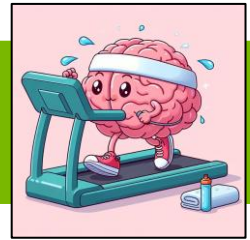


## Berechnen Sie die folgenden Größen:

- Retentionsfaktoren  $k$
- Relative Retention  $\alpha$
- Auflösung  $R$
- Bodenzahl  $N$  für beide Peaks
- Trennstufenhöhe  $H$  für  $L_{\text{Säule}} = 15 \text{ cm}$



# Übung



## Gegeben:

Säulenlänge: 25 cm

2 Peaks mit Retentionszeiten:  $t_{R1} = 18$  min,  $t_{R2} = 20$  min

Totzeit: 4 min

$N = 10^4$

## Berechnen Sie die:

- Theoretische Bodenhöhe
- Auflösung  $R$
- Retentionsfaktoren  $k$

# Auflösung

Für die Trennung mit isokratischer Elution ist die Auflösung wie folgt definiert (Purnell-Gleichung):

## Zielgröße für die Auflösung bei quantitativen Analysen:

$R = 1,5$  (Basislinientrennung)

## Die Auflösung R wird beeinflusst durch:

- **Relative Retention  $\alpha$**  (Selektivität)
- **Trennstufenzahl N** (Trennleistung = Effizienz)
- **Retentionsfaktor k** (Verteilung zwischen stat./mob. Phase)

$$R = \underbrace{\frac{1}{4}}_{\text{Effizienz}} \cdot \underbrace{\sqrt{N}}_{\text{Selektivität}} \cdot (\alpha - 1) \cdot \underbrace{\frac{k}{k+1}}_{\text{Retention}}$$

# Auflösung

## Die Auflösung R wird beeinflusst durch:

- **Relative Retention  $\alpha$**  (Selektivität des Trennsystems)

$$R = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \underbrace{(\alpha - 1)}_{\text{Selektivität}} \cdot \frac{k}{k + 1}$$

## Selektivität:

- Maß für den **Abstand zweier Peaks** (je größer  $\alpha$  desto größer der Abstand)
- Die **Selektivität** hat den **größten Einfluss** auf die Auflösung
- Kann über die chemische Zusammensetzung des **Eluenten** beeinflusst werden
- Die **Selektivität** ist besonders **groß**, wenn die **Wechselwirkungen** der **Komponenten** mit der **mobilen/stationären Phase sehr unterschiedlich** sind

# Auflösung

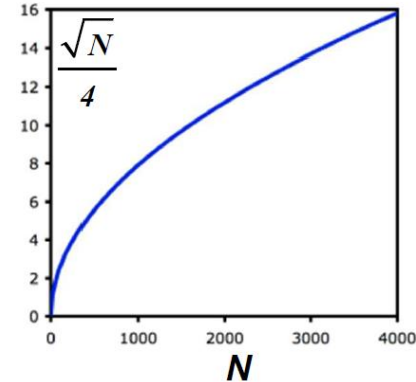
## Die Auflösung R wird beeinflusst durch:

- **Trennstufenzahl N** (Trennleistung der Säule = Effizienz)  
→ Erhöhung von N liefert schmalere Peaks

## Trennstufenzahl N wird beeinflusst durch:

- Länge der Säule
- **Gleichmäßige Packung** der Säule
- Lineare **Strömungsgeschwindigkeit** u
- Partikelgröße
- Diffusionskoeffizient des Anylaten

$$R = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot (\alpha - 1) \cdot \frac{k}{k + 1}$$



# Auflösung

## Die Auflösung R wird beeinflusst durch:

- **Retentionsfaktor k** (Verteilung zwischen stat./mob.)

$$k = \frac{n_{stat.}}{n_{mob.}}$$

$$k = \frac{t'_R}{t_0}$$

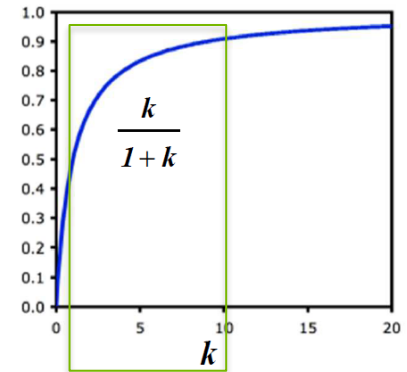
Der **Retentionsfaktor** ist ein **Maß** für die **Zeit**, die ein Analyt in einer **stationären Phase verweilt**, im **Verhältnis** zu der Zeit, die er in der **mobilen Phase verweilt**

Der **Retentionsfaktor** kann durch die Änderung der **Elutropie** der **mobilen Phase** stark verändert werden

Eine **Erhöhung** von **k verbessert** die **Auflösung**, aber **erhöht** die **Retentionszeit**

Retentionsfaktoren zwischen 1 – 10 (k > 10 führt fast nur noch zur Erhöhung der Analysenzeit → **breitere Peaks**)

$$R = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot (\alpha - 1) \cdot \underbrace{\frac{k}{k+1}}$$



# Verbesserung der Auflösung

## Praktische Möglichkeiten zur Verbesserung der Auflösung

### a) Veränderung des Retentionsfaktors $k$

Variation in der **Zusammensetzung** des Eluenten (**Polarität** der verwendeten Lösemittel)

→ **Erhöhung der Selektivität  $\alpha$**

### b) Erhöhung der Trennstufenzahl $N$ (engl.: „efficiency“)

- **Strömungsgeschwindigkeit**  $u$  der mobilen Phase optimieren
- Eine Trennsäule mit kleineren **Partikelgrößen** einsetzen
- **Längere Säule** einsetzen (oder zwei Säulen koppeln)

# Verbesserung der Auflösung

## Kopplung von Säulen:

Es gilt:  $R$  ist proportional zu  $\sqrt{N}$  !

→ **doppelte Auflösung** erzielbar durch **vierfach** längere Säule!

## Bei der Kopplung zu beachten:

- Längere Säule → höherer **Strömungswiderstand!** (Leistungsfähigkeit der HPLC-Pumpen ausreichend?)
- Nur zwei „**gute**“ Säulen ergeben eine verlängerte „gute“ Säule
- Neue Säulen brauchen etwas Zeit zum **Equilibrieren** (d.h. erreichen eines Gleichgewichts → ruhige Basislinie)

# Gaußpeak

Die Retentionszeiten der Einzelmoleküle sind um eine mittlere Retentionszeit verteilt, da **individuelle Wanderungsgeschwindigkeiten** variieren

Die **ideale Peakform** lässt sich mit einer **Gauß-Funktion** beschreiben:

$$y = y_0 \cdot e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}}$$

$y$ : Peakhöhe an beliebiger Stelle des Peaks

$y_0$ : Maximale Peakhöhe

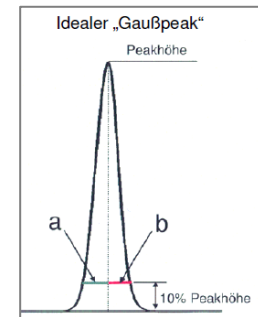
$x$ : Zeit

$\sigma$ : Standardabweichung (beschreibt die Peakbreite)

## Praxis:

Vollständige **Gleichgewichtseinstellung** praktisch **nie erreicht**

→ langsame **Kinetik** der **Gleichgewichtseinstellung** → Peakdeformation

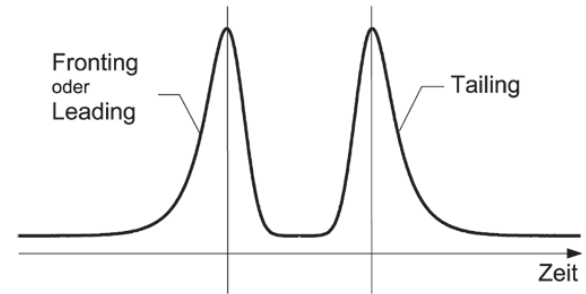


Idealer Peak:  $a = b$

# Peaksymmetrie

## Asymmetrische Peak-Form:

- Verkleinert die Zahl der **theoretischen Böden N**
- Verschlechtert die **Auflösung R**
- **Peakflächenermittlung** wird **unsicherer**
- **Peakfläche** ist verlässlicher als **Peakhöhe!**



# Ursachen für Peakdeformation

## Peak-Tailing:

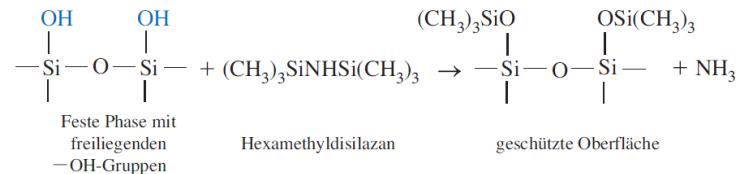
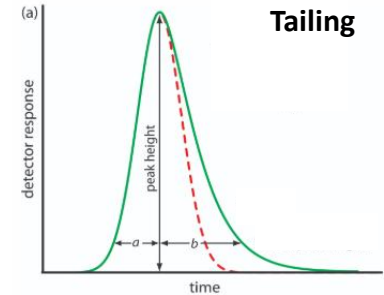
Bindungsstellen, die den Analyten besonders fest binden, verursachen Tailing  
→ Moleküle **eluierten später** als erwartet

## Ursachen für Peakdeformation (Tailing)

- **Löcher** oder **Risse** in der **stationären Phase**  
→ **Alterung** der Säule durch aggressive Probenbestandteile (**Hydrolyse**)  
→ Schlecht gepackte Säule (→ **Säulenpackung** rutscht zum Säulenausgang)
- **Chemisorption:**
  - Adsorption an Oberflächen im System allgemein
  - Unerwünschte Adsorption an stationärer Phase (besonders polare Analyten z.B. Carbonsäuren, Aminosäuren → **H-Brücken** mit Silanolgruppen.

→ Silanisierung reduziert Tailing:

- **Totvolumina**



# Ursachen für Peakdeformation

## Totvolumina (tragen nicht zur Trennung bei)

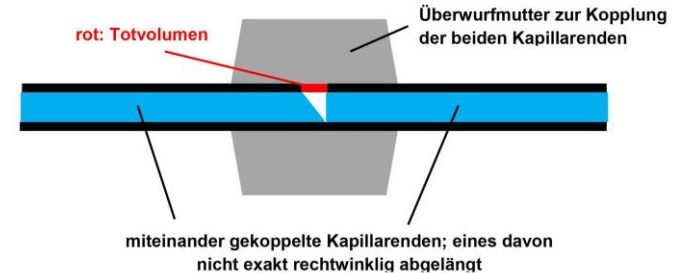
Kapillaren, Ventile und Verbindungselemente zwischen den einzelnen Gerätekomponenten

**Diffusion** z.B. in Verbindungskapillaren → **Peakverbreiterung**

Totvolumen der Anlage so klein wie möglich halten  
→ dünne Kapillaren, kleine Detektorzelle

**Rückvermischung** in Toträumen durch **Verwirbelung**  
(z.B. zwischen Verschraubungen)

→ **zusätzlichen Retardierung** von **Analyten** → **Peaktailing** / **Peakverbreiterung**



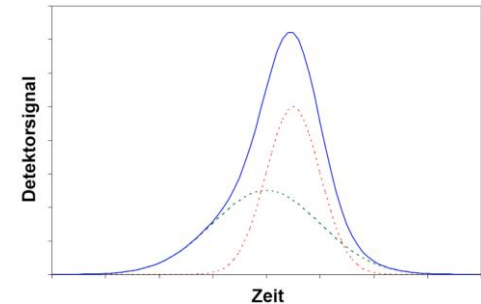
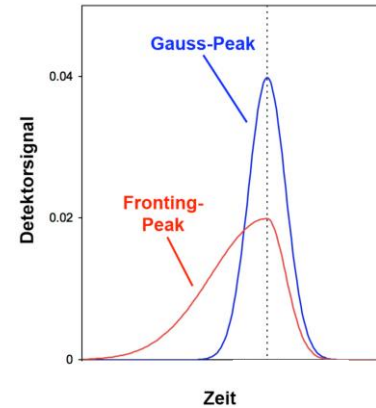
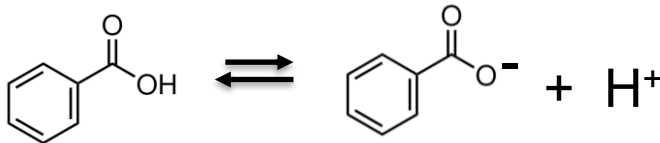
# Ursachen für Peakdeformation

## Peak-Fronting

Moleküle **eluierten früher** als erwartet

## Typische Ursachen für Peak-Fronting:

- **Überladung** der stationären Phase
- **Co-elution** zweier Peaks (→ testen durch Änderung der mobilen Phase)



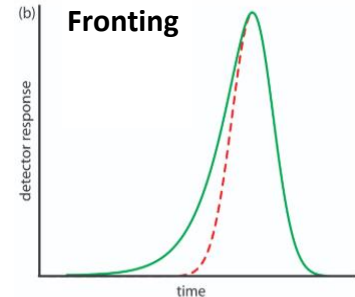
# Ursachen für Peakdeformation

## Häufigste Ursache für Fronting ist die Überladung der Trennsäule:

Die Partikel der **stationären Phase** besitzen eine **endliche Oberfläche**. Analyten, die **keinen „freien Platz“** mehr auf dieser Oberfläche finden, **eluierten schneller**.

Anhaltspunkte für die Beladung der Trennsäule (Silicagel):

- **1 µg Analyt** pro **g stationärer Phase** → Säule sicher **nicht überladen**  
→ Zur **Bestimmung der Bodenzahl** verwenden
- **10 µg/g**: Säule wahrscheinlich **nicht überladen** (maximale Trennwirkung gewährleistet)
- **> 100 µg/g**: Säule wahrscheinlich **überladen**

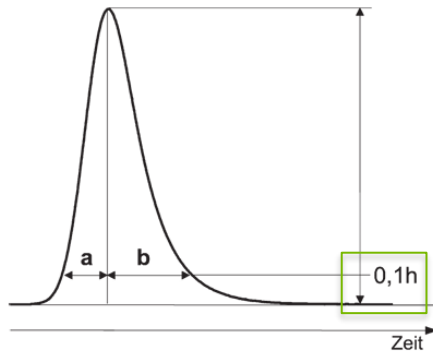


# Quantitative Bestimmung der Peaksymmetrie

## Quantitative Bestimmung der Peaksymmetrie

Asymmetriefaktor T (EU)

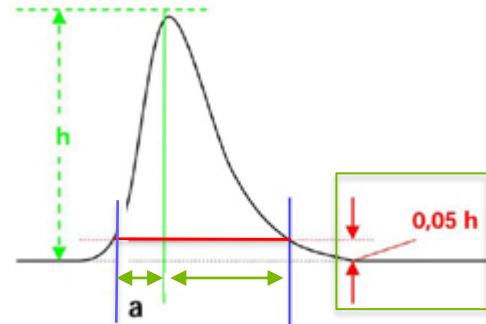
$$T = \frac{b}{a}$$



10 % der Peakhöhe

Peak Tailing Factor PTF (USA)

$$PTF = \frac{(a + b)}{2a}$$

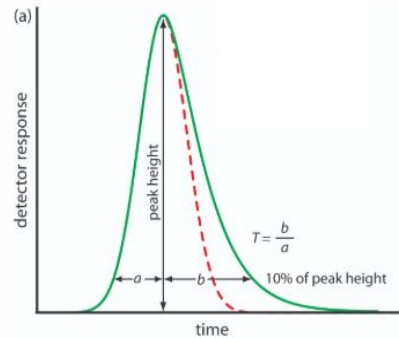


5 % der Peakhöhe

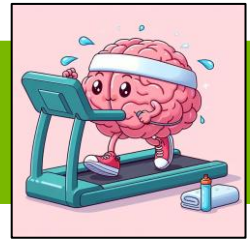
# Peaksymmetrie

- Asymmetriefaktor  $T = 1 \rightarrow$  Gaußpeak
- $T$  (bzw. PTF) = 1 – 1,2 wird in der Praxis toleriert

**$T > 1 \rightarrow$  Tailing**



# Verständnisfragen



## Verständnisfragen

1. Der Retentionsfaktor  $k$  beschreibt ....
2. Die relative Retention  $\alpha$  ist ein Maß für ....
3. Die Auflösung  $R$  ist ein Maß für ...
4. Eine Basispeaktrennung erreicht man ab einer Auflösung von ....
5. Die Bodenzahl bzw. Bodenhöhe wird verwendet, um ....
6. Eine Trennmethode ist selektiv, wenn ...
7. Eine Detektionsmethode ist spezifisch, wenn ...

# Wichtiger Hinweis

Dieses Skript ist als unterstützende Lernhilfe nur zum persönlichen Gebrauch von Studierenden des Studienganges Biotechnologie (Bachelor) an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf freigegeben.

Jede unbefugte Vervielfältigung und **Verbreitung**, sei es in Papierform oder in elektronischer Form, ist urheberrechtlich **verboten**.

