



Instrumentelle Bioanalytik

Trennverfahren

Prof. Dr. Mircea Tric

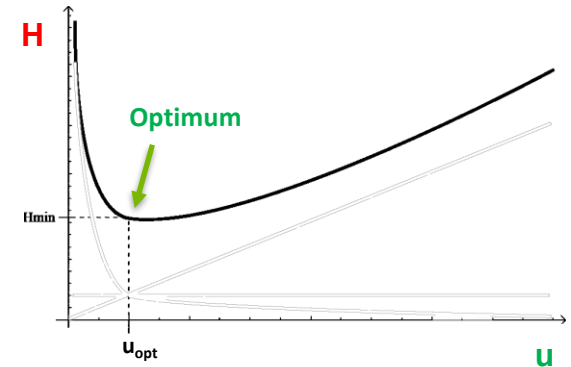
SS 2026

Dynamische Theorie

Das **Trennstufenmodell** berücksichtigt nicht die **Abhängigkeit** der **Trennstufenhöhe H** von der **Strömungsgeschwindigkeit u**

Erweiterung des Modells zur „dynamischen Theorie“

- Beschreibung des Trennprozesses in der Säule als **dynamischen Prozess**
- Betrachtung von **Massentransfer** und **Diffusionsvorgängen**
- Verknüpfung von **Trennstufenhöhe H** mit der **Strömungsgeschwindigkeit u** der mobilen Phase



Dynamische Theorie

Zusammenfassung aller **Effekte**, die zu einer **Peakverbreiterung (Dispersion)** führen:

van-Deemter-Gleichung:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

H: **Bodenhöhe (Trennstufenhöhe): Maß** für die **Effizienz** der **Trennung** (→ Maß für die Bandenverbreiterung)

A: Einfluss der **EDDY-Diffusion**

B: Einfluss der **Längsdiffusion**

C: Einfluss des **Stofftransports**

- Je größer die **A, B** und **C-Terme**, desto größer H → ineffizientere Trennung
- Je **kleiner H**, desto schmalere Peaks und umso **größer** die theoretische (Trennstufenzahl) **Bodenzahl N**

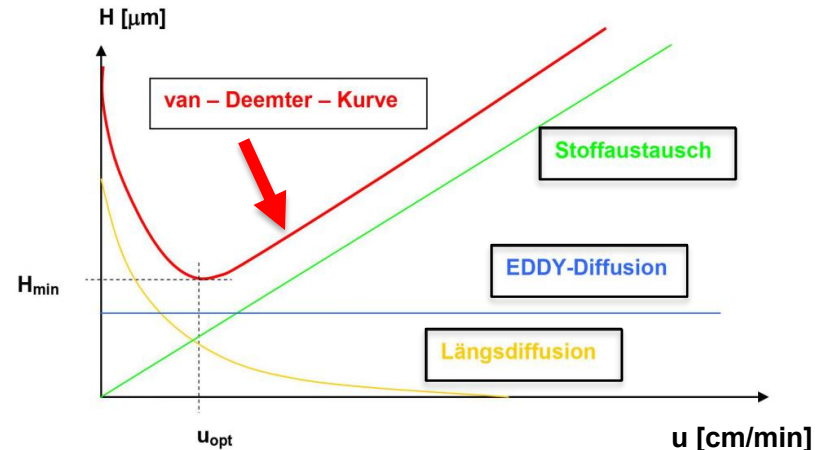
Van-Deemter-Kurve

Van-Deemter-Kurve:

Zusammenhang zwischen **Strömungsgeschwindigkeit u** und **Trennstufenhöhe H**

Aus der Grafik erkennbar:

- optimale Strömungsgeschwindigkeit u_{opt}
- minimal zu erreichende Höhe eines theoretischen Trennbodens H_{min}



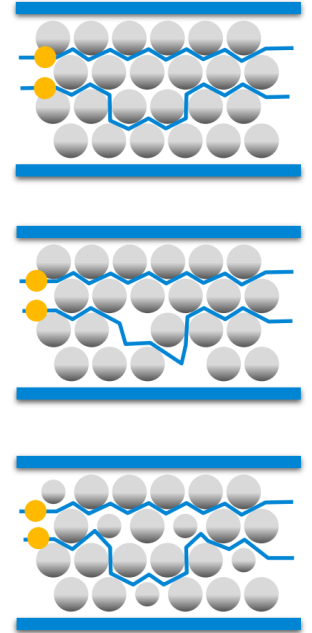
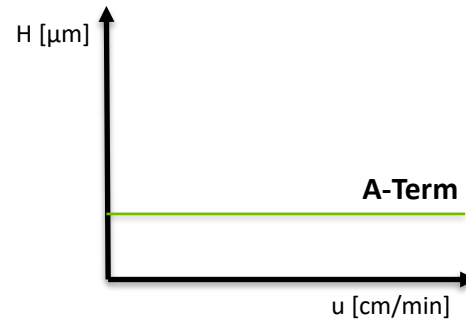
A-Term (Eddy-Diffusion)

Eddy-Diffusion beeinflusst durch:

- **Verwirbelung** → unterschiedliche **Weglängen**
- **Qualität** der Säulenpackung (Hydrolyse)
- Breite der **Partikelgrößenverteilung**
- **Partikelgröße** (Eddy-Diffusion $\sim d_p$)
kleinere Partikel → kleinere Umwege
- **Unabhängig** von der **Strömungsgeschwindigkeit u**

Moderne Säulen besitzen **kleine Innendurchmesser** (1-2 mm) und **kleine Partikelgrößen** ($\sim 1,7 \mu\text{m}$)

→ **geringe EDDY-Diffusion** (→ geringere Peakbreiten)

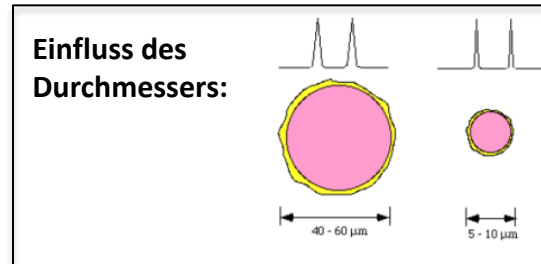
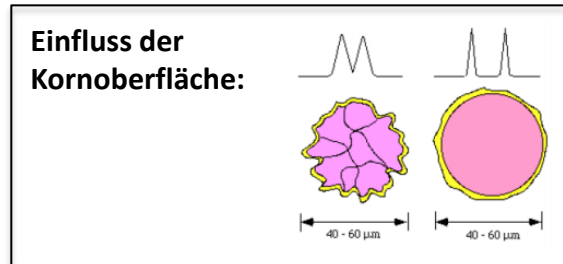


Strömungsprofil

Faktoren, die die **laminare Strömung** der mobilen Phase stören:

- Unregelmäßige **Packung** der stationären Phase oder **Risse**
- Unregelmäßige Kornoberfläche

Besser: kleine Partikel mit geringerer Porosität → schmälere Peaks

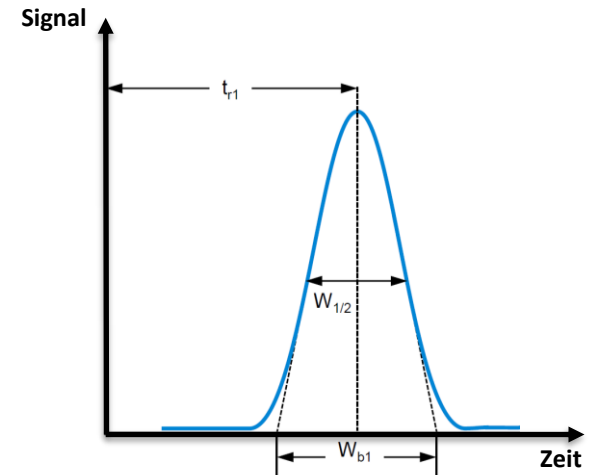
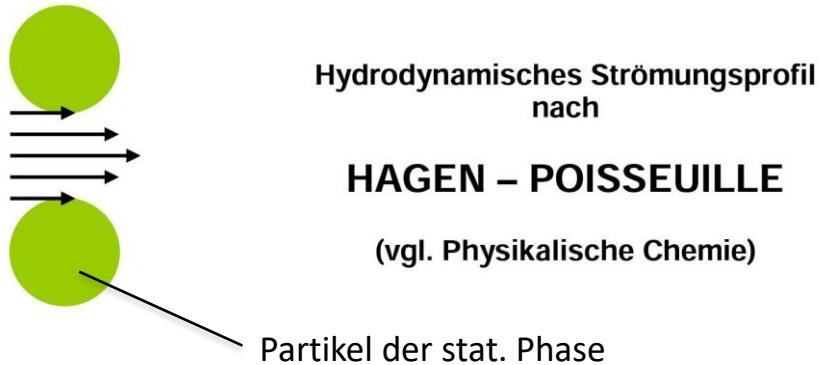


Strömungsprofil

Hydrodynamisches Strömungsprofil (Strömungsverteilung):

Unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeiten der einzelnen Moleküle durch die Trennsäule

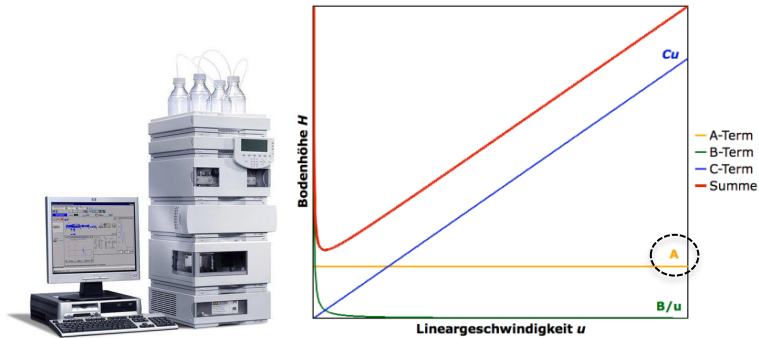
In der **Mitte** eines „Kanals“ ist die Strömung **schneller** als in der Nähe eines Korns → **Peakverbreiterung**



Van-Deemter-Kurve für LC und GC

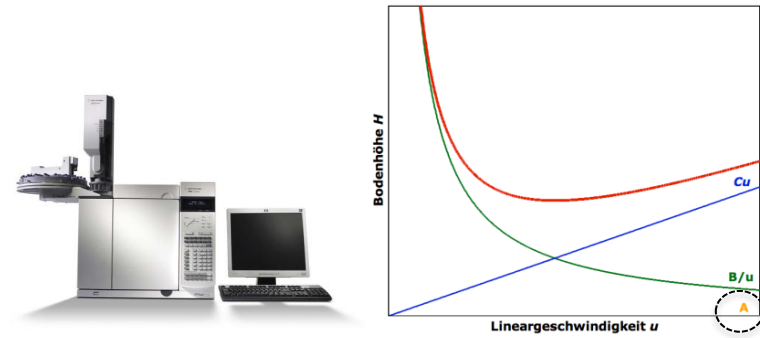
Liquid Chromatography (LC)

→ Mobile Phase: Flüssigkeit



Gas Chromatography (GC)

→ Mobile Phase: Gas



A-Term ist für gasförmige mobile Phasen
in Kapillaren **nicht relevant**

B-Term (Längsdiffusion)

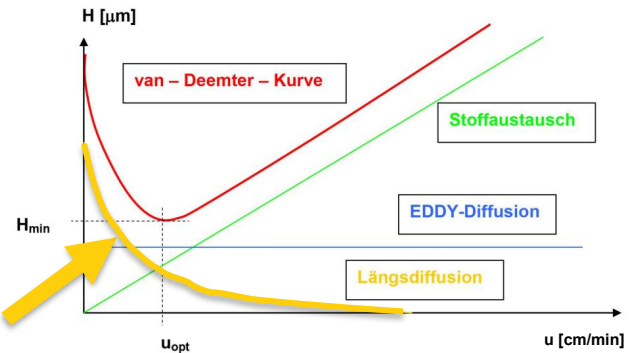
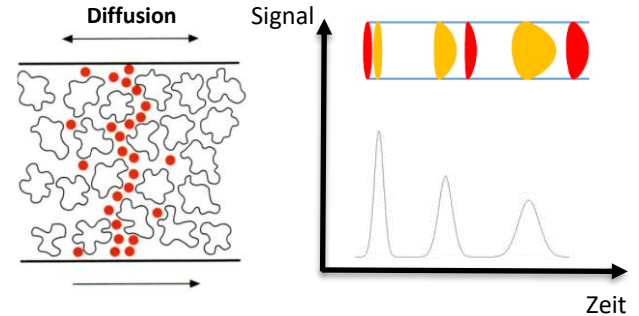
B-Term (Längs-, Longitudinal-, Axialdiffusion)

Analyt breitet sich in der **mobilen Phase** durch **Diffusion** aus

B-Term ist **umgekehrt proportional** zur **Strömungsgeschwindigkeit u**

- **Peakverbreiterung** hängt von der **Verweilzeit t** im System und dem **Diffusioskoeffizienten D** des Analyten in der mobilen Phase ab
- Peakbreite ist proportional zu \sqrt{t} und \sqrt{D} :

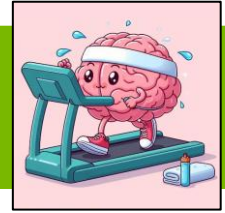
$$\sigma = \sqrt{2Dt}$$



Höhere Flussgeschwindigkeit reduziert den Einfluss der Längsdiffusion

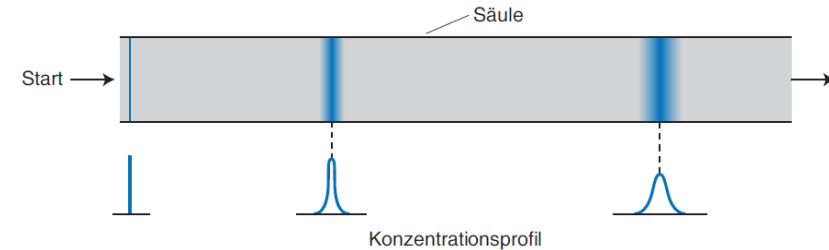
Diffusion

Warum kommt es zu Diffusionsprozessen?



Ein Hauptgrund für die **Bandenverbreiterung** ist die **Diffusion**

Diffusion: Stofftransport aus einem Gebiet **hoher Konzentration** → **niedriger Konzentration**



Lehrbuch der Quantitativen Analyse

1. Ficksches Gesetz:

$$J = -D \cdot \left(\frac{dc}{dx} \right)$$

J Diffusionsfluss [mol / m² / s]

D Diffusionskoeffizient [m²/s]

dc/dx Konzentrationsgradient

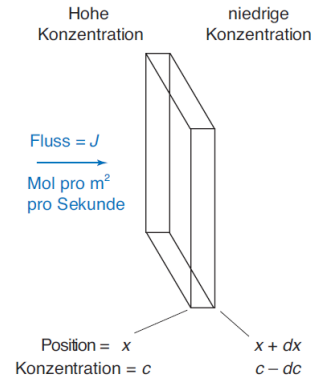
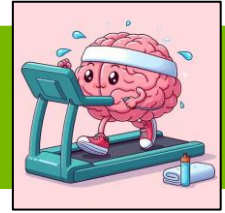


Abb. 22.13 Der Fluss von Molekülen, der durch eine Flächeneinheit diffundiert, ist zum Konzentrationsgradienten und zum Diffusionskoeffizienten proportional: $J = -D(dc/dx)$.

Lehrbuch der Quantitativen Analyse

Exkurs: Brownsche Bewegung

Warum kommt es zu Diffusionsprozessen?



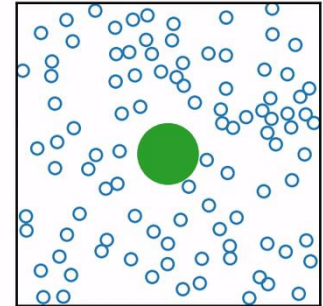
Robert Brown (1827)

Chaotische Bewegung von Pollenkörnern in wässriger Suspension unter dem Mikroskop

Einstein (1905)

Quantitative Beschreibung der Brownschen Bewegung und der Diffusion

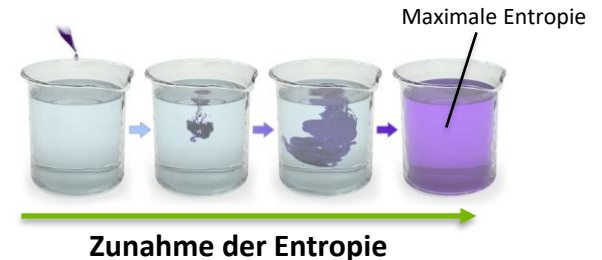
→ Bestätigung der Existenz von Atomen/Molekülen



www.wikipedia.org

Die **Brownsche Bewegung** (thermische Energie) führt zu einer **größeren Unordnung**

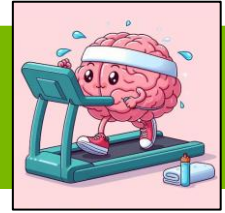
Die Diffusion ist thermodynamisch irreversibel



<https://de.serlo.org/biologie/77149/diffusion>

Entropie

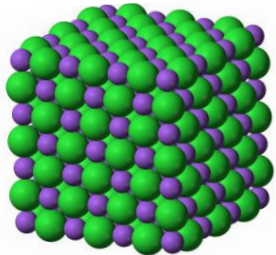
Warum bilden sich dann überhaupt Kristalle?



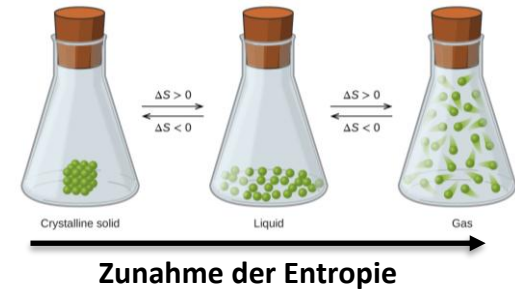
Entropie

vereinfacht: Entropie ist ein Maß für die Unordnung eines Systems

- Entropie steigt mit zunehmender „Unordnung“ (→ Diffusion)
- Auflösen eines Salzes → Entropiezunahme
- Reinstoffe < Stoffgemische
- Festkörper < Flüssigkeiten < Gase

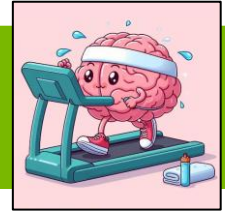


<https://www.u-helmich.de/che/0809/04-lonen/ionenbindung-03.html>



2. Hauptsatz der Thermodynamik

Warum nimmt die Entropie in Ihrem Zimmer zu?

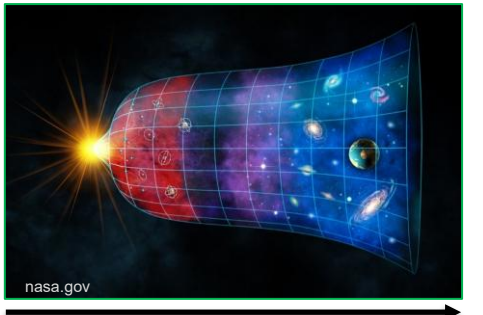


2. Hauptsatz der Thermodynamik:

„Die **Entropie** strebt einem **Maximum** entgegen“ Rudolf Clausius

$$\Delta S_{\text{total}} = \Delta S_{\text{Umgebung}} + \Delta S_{\text{System}} \geq 0$$

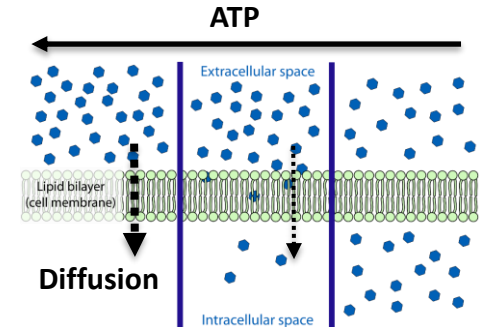
Einheit der Entropie: [J/K]



Zunahme der Entropie Zeit



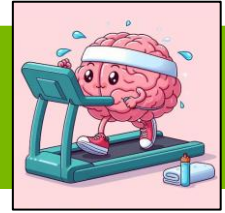
Zunahme der Entropie Zeit



Zunahme der Entropie Zeit

Entropie

Warum nimmt die Entropie
in Ihrem Zimmer zu?



Unordentlich

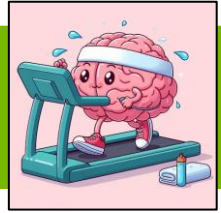


Copilot

Ordentlich

Entropie

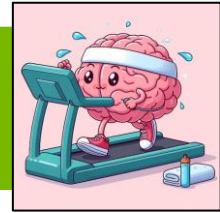
Warum nimmt die Entropie
in Ihrem Zimmer zu?



Copilot

Entropie

Warum nimmt die Entropie
in Ihrem Zimmer zu?



Copilot

Große Anzahl von
möglichen
Mikrozuständen, die
zum gleichen
makroskopischen
Zustand „**unordentlich**“
führen

Da es viel weniger
Mikrozustände gibt, die
zum makroskopischen
Zustand „**ordentlich**“
führen, ist der Zustand
„**unordentlich**“ viel
wahrscheinlicher!

$$P = \frac{5}{6}$$

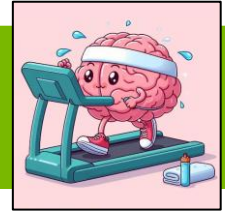


$$P = \frac{1}{6}$$



Entropie

Warum nimmt die Entropie
in Ihrem Zimmer zu?



Große Anzahl von
möglichen
Mikrozuständen, die
zum gleichen
makroskopischen
Zustand „**unordentlich**“
führen

Da es viel weniger
Mikrozustände gibt, die
zum makroskopischen
Zustand „**ordentlich**“
führen, ist der Zustand
„**unordentlich**“ viel
wahrscheinlicher!



Copilot

$$P = \frac{19}{20}$$



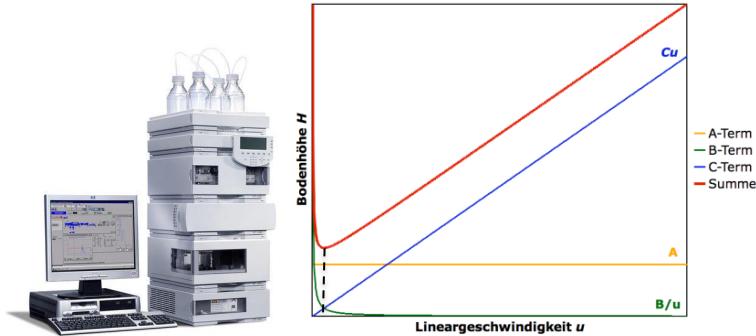
$$P = \frac{1}{20}$$



Van-Deemter-Kurve für LC und GC

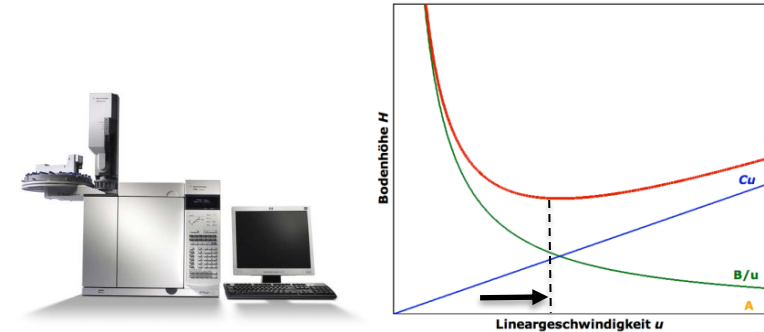
Liquid Chromatography (LC)

- Mobile Phase: Flüssigkeit
- **kleine** Diffusionskoeffizienten



Gas Chromatography (GC)

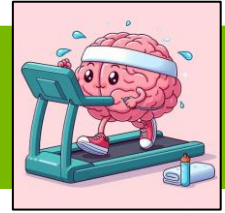
- Mobile Phase: Gas
- **große** Diffusionskoeffizienten (Faktor $10^4 - 10^5$ größer)



Die Longitudinaldiffusion verläuft in einem **Gas viel schneller** als in einer Flüssigkeit
→ **optimale lineare Strömungsgeschwindigkeit u_{opt}** in der GC deutlich **höher**

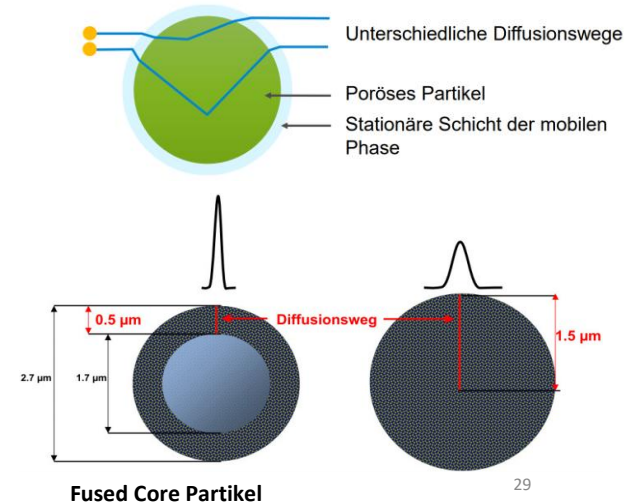
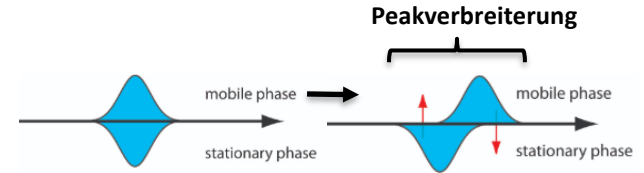
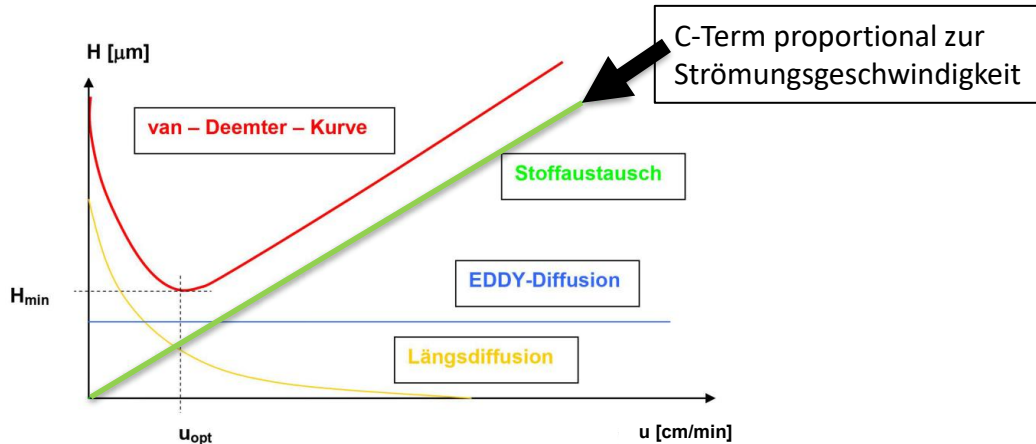
C-Term (Stofftransport)

Wie wirkt sich eine Temperaturerhöhung auf den C-Term aus?

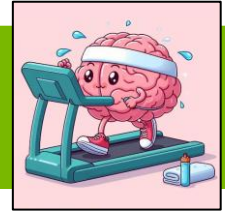


C-Term (Stofftransport):

- Gleichgewichtseinstellung mit der stationären Phase benötigt Zeit
- Ist in allen Chromatographie-Arten von Bedeutung
- Geringere Porosität → schnellere Gleichgewichtseinstellung!



Übung



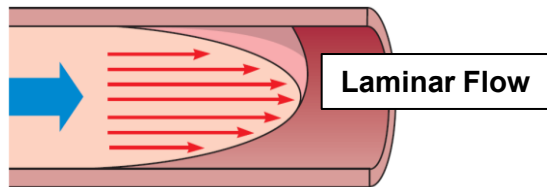
Übung:

Zeichnen Sie die **Van-Deemter-Kurve** für drei unterschiedliche Partikelgrößen der stationären Phase (1,8 μm ; 3,5 μm ; 5 μm)

Peakverbreiterung außerhalb der Säule

Peakverbreiterung außerhalb der Säule ("extra column effects"):

- Je größer das **Totvolumen** (Verbindungskapillaren zwischen Injektor und Säule bzw. Säule und Detektor und Detektorzelle selbst), desto breiter die Peaks
 - **Kleinere Innendurchmesser** der Verbindungskapillaren vorteilhaft (aber Problem der **Verstopfung** durch Verunreinigungen und Kristallbildung durch Salze)
 - Die Injektionsdauer verursacht auch eine Bandenverbreiterung
- **Strömung** in der **Mitte** des Kapillarraums **schneller** als am **Rand**

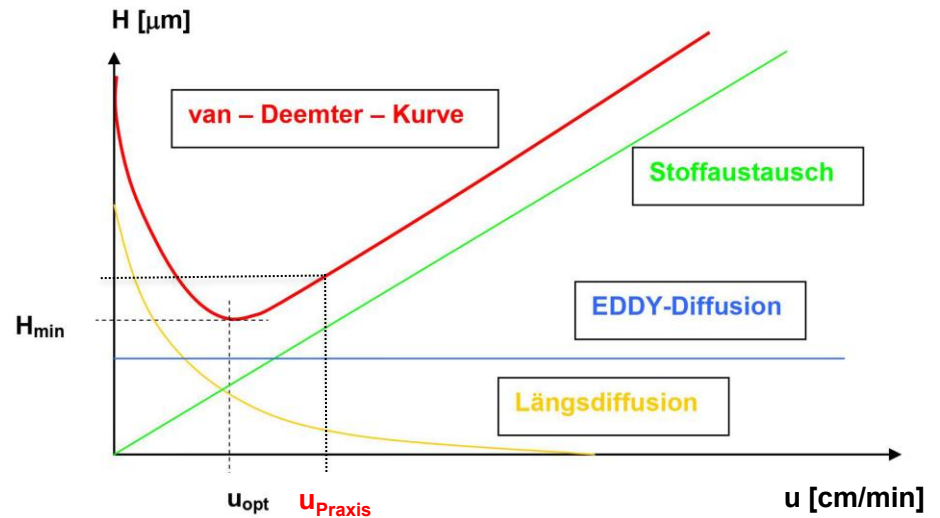


Lineargeschwindigkeiten in der Praxis

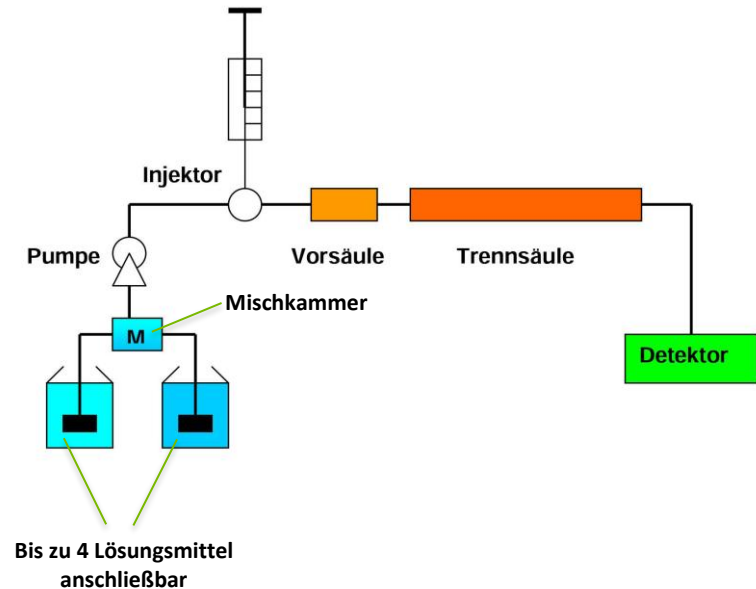
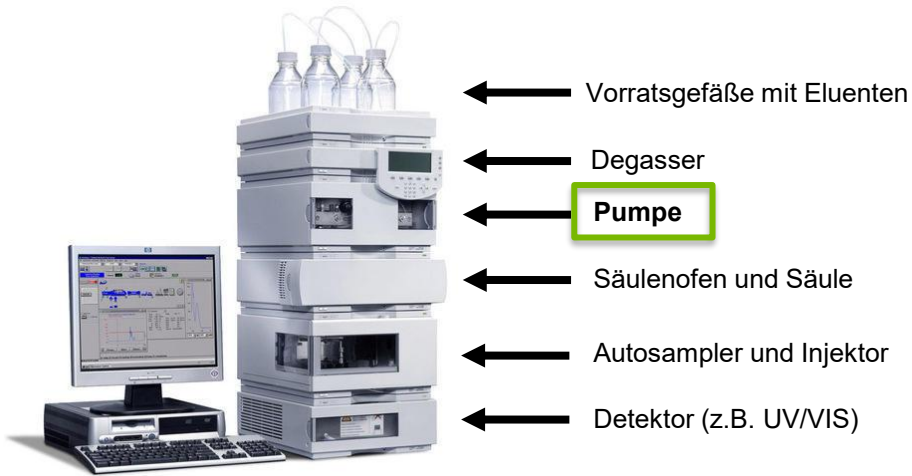
Lineargeschwindigkeiten in der Praxis

- Zu lange Analysenzeiten unerwünscht!

Technik / Säule	Lineargeschwindigkeit [cm s ⁻¹]	
	Optimum	In der Praxis
GC		
Kapillarsäule (0.25 mm Innendurchmesser)	30-40	60-80
gepackte Säule (4 mm Innendurchmesser)	2-4	4-8
HPLC		
gepackte Säule (4.6 mm Innendurchmesser)	0.05-0.1	0.1-0.2



Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)



HPLC-Pumpen

Grundvoraussetzungen für Pumpen:

- Förderung gegen **hohen Strömungswiderstand** (HPLC: 400 bar ; **UHPLC: 1000 - 1500 bar**)
- Gleichmäßige (= **pulsationsarme**) Förderung des Lösemittels → stabile Detektion
- **Reproduzierbare** Fördermenge (HPLC: 0,2 - 2 mL/min ; **UHPLC: 10 – 300 µL/min**)
- Stabilität der Dichtungen gegenüber Lösungsmitteln
- Lange Lebensdauer

HPLC-Pumpen sind empfindliche **Präzisionsinstrumente!** (**Verschleißanfällig!**)

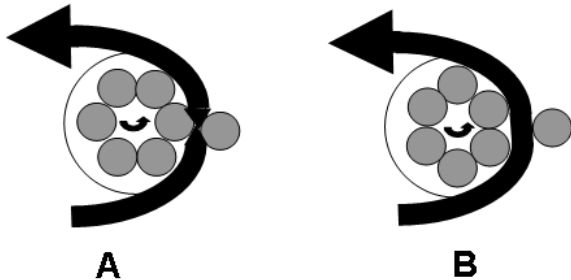
- Nicht trocken laufen lassen! (→ Überhitzung beim Anlaufen, Auskristallisation)
 - Keine Pufferlösungen in der Pumpe stehen lassen (Korrosion, Auskristallisation, Mikroorganismen)
- Bei **langen Standzeiten**: Puffer zuerst mit Wasser rausspülen und danach **organisches LM** (z.B. 80 % Isopropanol oder 70 % Acetonitril) (→ Säule ausbauen und Bedingungen aufschreiben)
- Bei kurzen Standzeiten: geringen Fluss (0,05 – 0,1 mL/min) im Kreis pumpen
(→ Auslasskapillare des Detektors in das Vorratsgefäß)

Peristaltische Pumpen (Schlauchpumpen)

Peristaltische Pumpen (Schlauchpumpen)

Mit Pumpen dieser Art arbeitet man im **Niederdruckbereich** (1 - 2 bar). Sie werden daher ausschließlich in der **Gelchromatographie** eingesetzt.

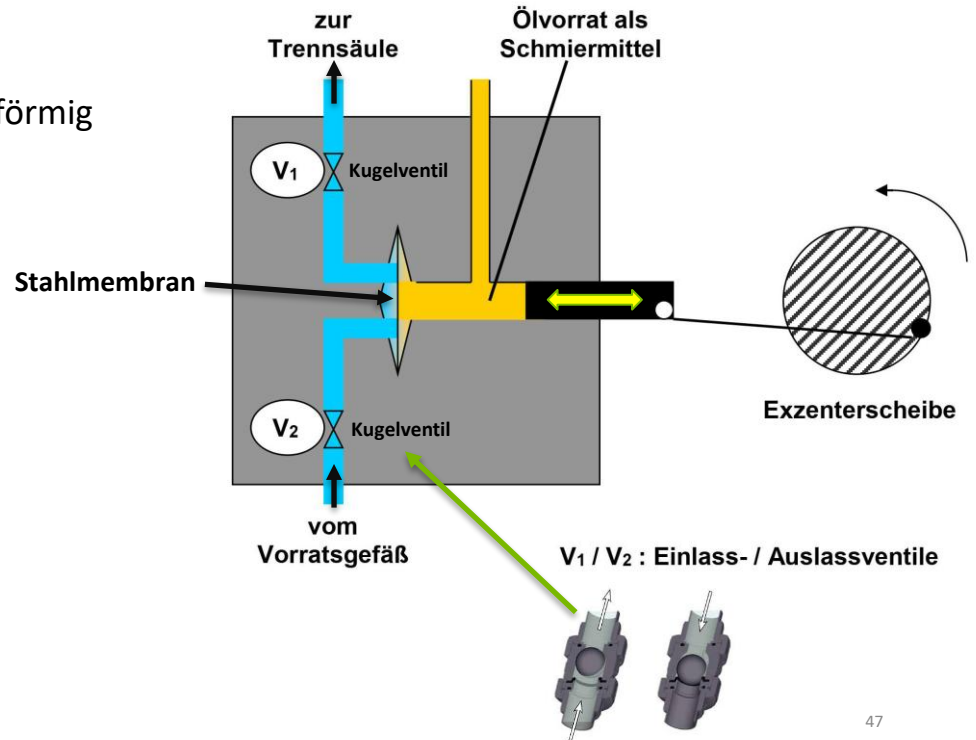
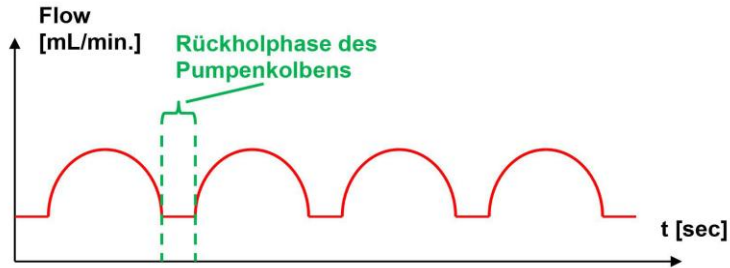
- A) Quetschung
- B) Entspannung im Zwischenraum



Membranpumpen

Membranpumpen:

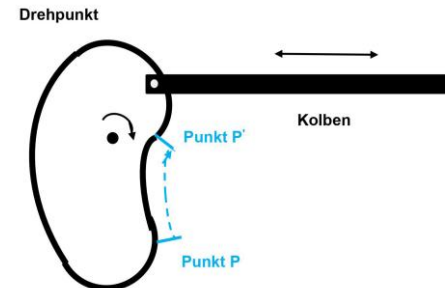
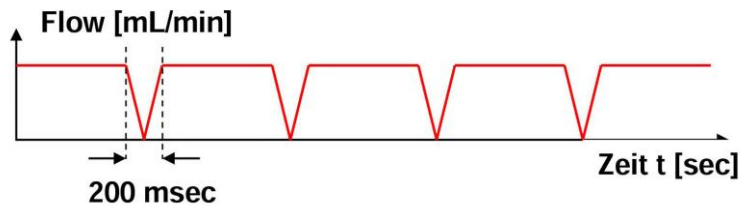
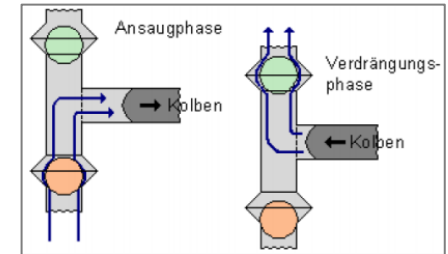
Förderleistung der Membranpumpe verläuft wellenförmig
(Pulsation)



Kurzhub-Kolbenpumpe

Kurzhub-Kolbenpumpe

- Kolben verdrängt das geförderte Lösemittel direkt (ohne Membran)
- Nierenförmige **Exzentrerscheibe** („Cam“) dreht sich unregelmäßig schnell und dadurch **Pulsationsarm**



Kurzhub-Kolbenpumpe

Hohe mechanische Belastung der Pumpe:

- Die Pumpe ist das **verschleißanfälligste** Bauteil einer HPLC
- **Pumpenkolben** i.d.R. aus **Saphir** (Al_2O_3) → resistent gegenüber chemischen und mechanischen Einflüssen
- **Pumpenköpfe** aus **rostfreiem Edelstahl** (sonst Lochfraß durch Halogenverbindungen, z.B. NaCl)



Doppelkolbenpumpe

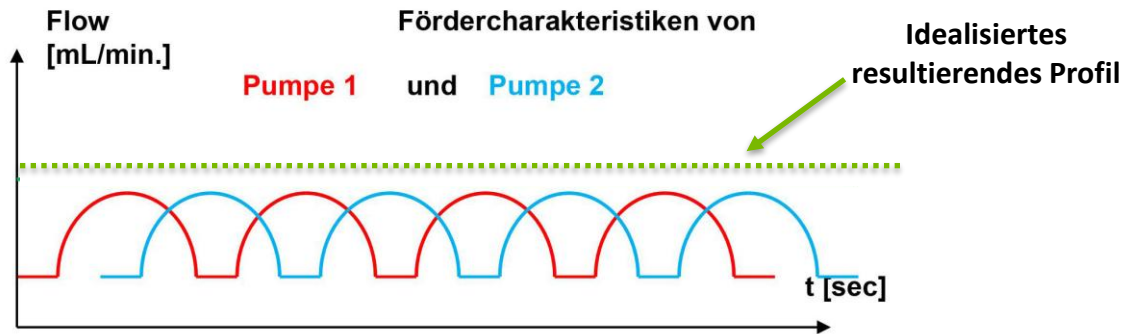
Pumpenkolben:

Sollte ganz **glatt** sein und ohne erkennbare **Ablagerungen** (sonst austauschen → **HPLC-Kits**)



Membranpumpen

Pulsationsfrei mit zwei gegenläufigen Pumpen:



Doppelkolbenpumpe



Mobile Phase

Anforderungen an die [mobile Phase](#)

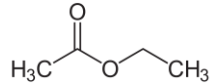
- Gutes **Lösungsvermögen** für die Probe
- Gute **Mischbarkeit** mit anderen Lösungsmitteln
- Niedrige **Viskosität** (schnellerer Stoffaustausch
→ kleinerer C-Term → kleinere Trennstufenhöhe H → höhere Trennstufenzahl N)
- **Ungiftig**/wenig giftig (besser Toluol als Benzol)
- Nicht brennbar bzw. hoher Flammpunkt
- Keine Peroxidbildung (THF, Ether neigen dazu)
- **Inert**: Keine Reaktion mit der Probe
- Hohe Flüchtigkeit (Eindampfen, MS-Detektion)
- UV-Durchlässigkeit: wichtig für Detektion von UV-aktiven Substanzen (z.B: Nucleinbasen)
- Hochrein (HPLC grade)
- Verfügbarkeit & Preis sollten stimmen



Typische Eluenten-Gemische

Typische Eluenten für Normalphasentrennungen:

- Heptan, Hexan
- Methylenchlorid (CH_2Cl_2)
- Ethylacetat

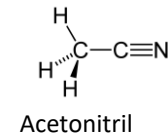


} Unpolar – mäßig polar

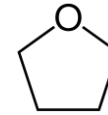
Typische Gemische für Umkehrphasentrennungen:

- Acetonitril / Methanol
- Tetrahydrofuran (THF) / Wasser
- Wässrige Pufferlösungen
- Methanol / Wasser
- Acetonitril / Wasser

} polar



Acetonitril



Tetrahydrofuran (THF)

Mobile Phase

Mobile Phase:

- Ausschließlich Reinheitsstufe "HPLC-grade,,
- Feinste **Abriebpartikel** (Kolloide) können das System **verstopfen** und **Schäden** an den **Pumpenventilen** verursachen
- Verunreinigungen können im **UV absorbieren** (z.B. Nitrate, Nitrite, Sulfate, etc.)
- Unmittelbar vor Gebrauch müssen Lösemittel **filtriert** werden
→ gesinterte **Metallfritten**
- **Equilibrierung:** Vor der Probenmessung sollte die Säule mit dem **Eluenten gespült** werden (abgeschlossen, wenn die **Basislinie keinen Drift** mehr aufweist (mind. 10 Säulenvolumina)
- **Nicht-mischbare Eluenten** niemals direkt nacheinander durch die Säule Pumpen
- Unmittelbar vor Gebrauch müssen Lösemittel **entgast** werden

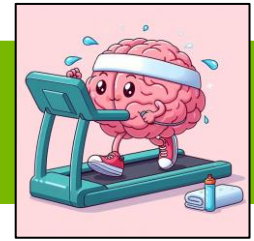


Reinheit

Qualitätsbezeichnung	Bedeutung
technisch/ technical grade	Chemikalien mit diversen Verunreinigungen; zumeist großtechnisch hergestellt. Einsatz für technische Zwecke (Reinigungsmittel; Lösemittel)
zur Synthese/ synthesis grade	Chemikalien mit kleineren Verunreinigungen. Da das Produkt im Anschluss an die Synthese sowieso gereinigt wird, müssen die Ausgangsstoffe nicht hochrein sein.
reinst/ pure	Stoffe von hoher Reinheit mit einem Gehalt von mindestens 95 %
Pharma-Qualität; reinst EP/ USP/ BP/...	Stoffe von sehr hoher Reinheit mit einem Gehalt von meistens 98 %. Chemikalien, die gemäß der angegebenen Pharmacopöen geprüft wurden, sind tatsächlich bei allen Anbietern identisch!
zur Analyse/ p.A./ pro analysis	Hochreine Chemikalien mit einem Gehalt von mindestens 99 %. Die enthaltenen Verunreinigungen (z.B. Metalle) werden bei Analysequalitäten spezifiziert; d.h. der zulässige Konzentrationsbereich wird genau definiert.
Ultrapure/ für die HPLC/ für die Kristallographie/ für die LC-MS	Extremreine Chemikalien mit einem Gehalt von typischerweise 99,9% und der spezifizierten Eignung für bestimmte analytische Methoden.

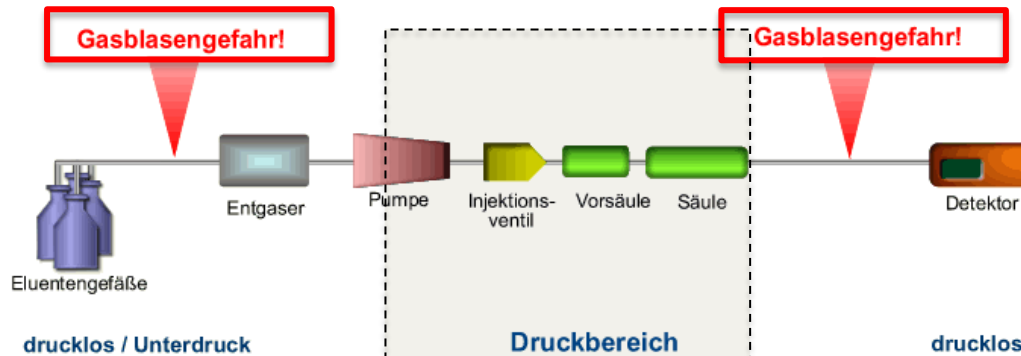
Gelöste Gase

Warum kommt es zum Ausgasen im Unterdruck/Niedrigdruckbereich?



Gelöste Gase im Lösungsmittel:

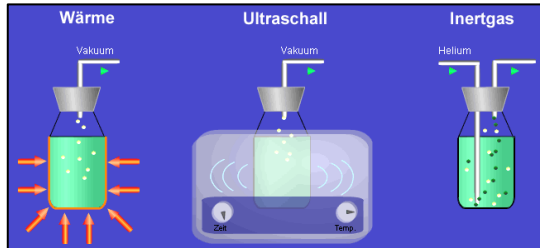
- **Beschädigt Packung** in der Trennsäule (durch **Gasblasenbildung**)
- Erzeugt "**Geisterpeaks**" (durch Streuung) am **Detektor**
- Erhöhte **UV-Absorption** ($\lambda(\text{O}_2) < 250 \text{ nm}$)
- Schwächung der Fluoreszenz (\rightarrow **dynamische Fluoreszenzlöschung** durch O_2)
- Komprimierbar \rightarrow beeinflusst **Reproduzierbarkeit** durch unregelmäßigen Eluentenfluss



Offline und Online-Entgasung

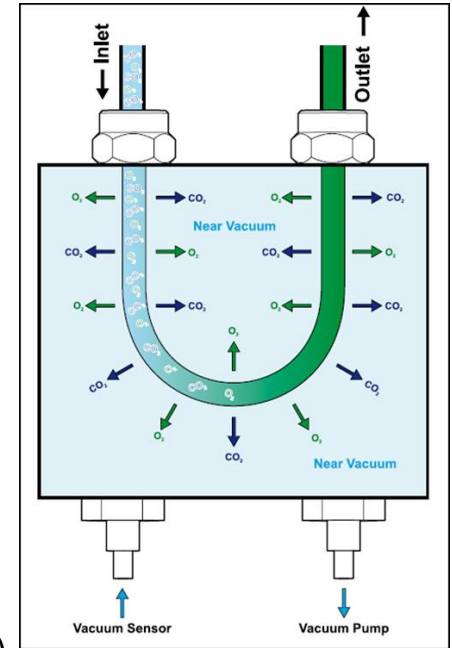
Austreiben störender Gase (N_2 , O_2 , CO_2) möglich durch:

- Thermische Entgasung: Erwärmen des Eluenten mit Unterdruck
- Ultraschallbad (ggfs. mit Unterdruck)
- Sparging: Sättigung mit einem Inertgas (Helium)



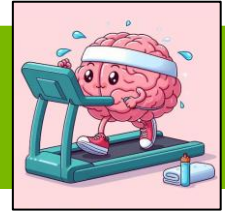
Online-Entgasung

Membran-Vakuum-Entgaser (Vakuumkammer mit gasdurchlässigen PTFE-Schläuchen)



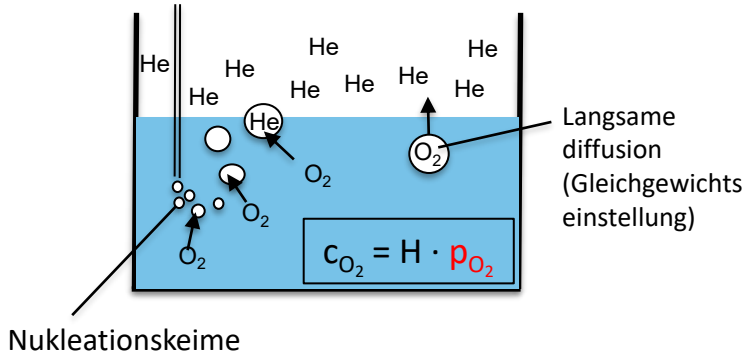
Sparging mit Helium

Warum ist die Löslichkeit von He so gering?



Sparging: Sättigung mit einem Inertgas (Helium)

Die Löslichkeit von Helium in Wasser ist geringer als bei jedem anderen Gas ($L = 2,5 \text{ mg/L}$ bei $T = 21 \text{ °C}$)



He-Sparging:

- **Neubildung** von Gasblasen ist **energetisch ungünstig**
bereits vorhandene Blasen wachsen jedoch leicht.
- vergrößert die **Gas-Flüssig-Grenzfläche**
- verkürzt **Diffusionswege** beschleunigt die Einstellung des Henry-Gleichgewichts

Betriebsart der mobilen Phase

Eluenten:

- Binär: zwei Lösungsmittel
- Tertiär: drei Lösungsmittel
- Quaternär: vier Lösungsmittel

Isokratisches System:

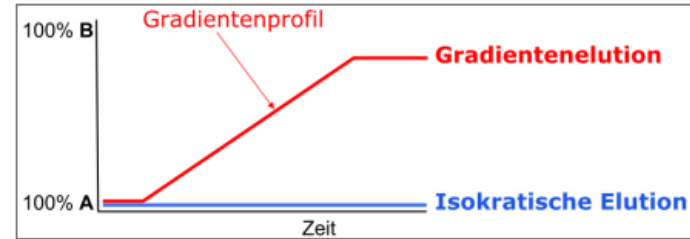
Zusammensetzung des Eluenten bleibt **konstant**

Gradientensystem:

Erhöhung der **Elutionskraft** der mobilen Phase während der Trennung

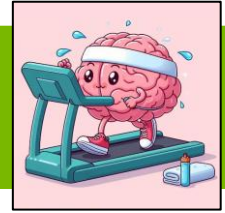
→ **Laufzeit** von Peaks **beschleunigt**, die sehr spät oder überhaupt nicht von der Säule eluieren würden

→ Höhere Peakkapazität (hohe Anzahl von getrennten Peaks)



Gradientensysteme

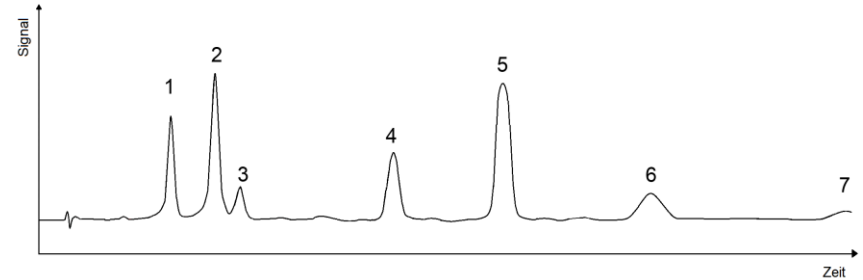
Warum werden die
Peaks 4-7 schmaler?



Isokratischer Betrieb:

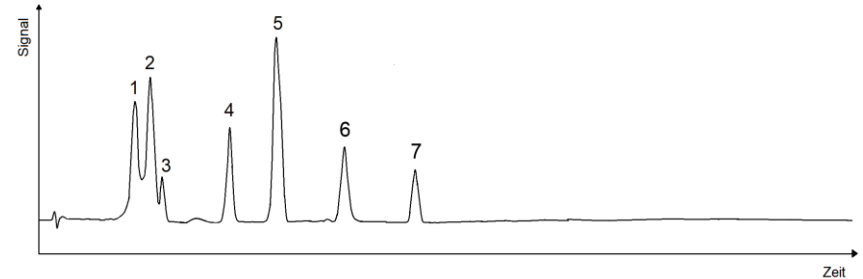
HPLC - Analyse von 7 Analyten aus Hopfenextrakt:

(A. Deutschmann - HSWT)



Gradientenbetrieb:

Kontinuierliche Veränderung der Zusammensetzung
der mobilen Phase:

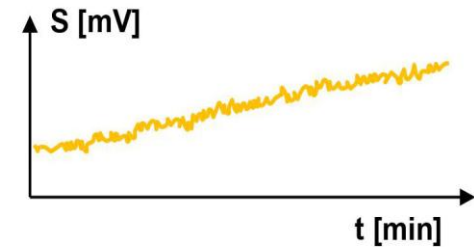


Drift

Drift (→ Reproduzierbarkeit)

Unmittelbar nach dem **Einschalten** ist das Auftreten einer Drift normal.

Elektronik und **Detektorlampen** müssen erst einmal auf ihre normale **Betriebstemperatur** kommen (mind. 15 min Warm-up).



Ursachen für einen bestehenden, deutlichen Drift:

- **Gradientenelution** (z.B. **Brechungsindex** der mobilen Phase **ändert sich** ständig)
- **Lösemittelwechsel** (Einstellung der Gleichgewichte braucht Zeit)
- Ausbluten der stationären Phase (z.B. **chemischer Abbau** durch aggressive Proben)
- **Umgebungstemperatur** schwankt

Gradientensysteme

Isokratische Elution:

Vorteil:

- Weniger Aufwand

Nachteil:

- Lange Laufzeiten
 - **Peakverbreiterung** durch Diffusion
 - schlechtere **Nachweisgrenzen**

Gradientenelution

Vorteile:

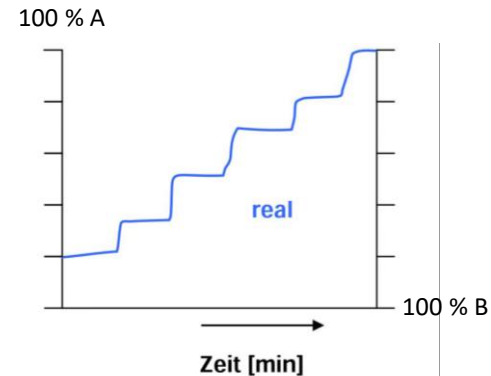
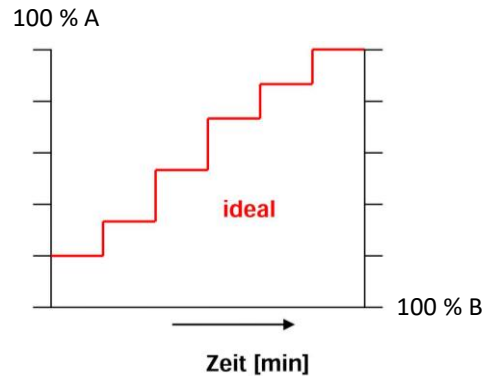
- Schnellere Analysenzeiten
 - Geringere Peakverbreiterung
 - Bessere Nachweisgrenzen
- Trennung komplexer Proben mit hohen **Polaritätsunterschieden**

Nachteil:

- **Reproduzierbarkeit** kann darunter leiden (→ Zusammenmischen von kleinsten Volumenanteilen ($\mu\text{L}/\text{min}$ - Bereich))

Gradientensysteme

Feinmechanische Grenzen eines HPLC-Gerätes:



Kleinste **Schwankungen** im **Ventilschließzyklus** bewirken kleine **Polaritäts-Unschärfen** in der mobilen Phase
→ **Retentionszeitschwankungen** (Δt_R)

Hoch- und Niederdruckgradientensysteme

Kontinuierliche Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase:

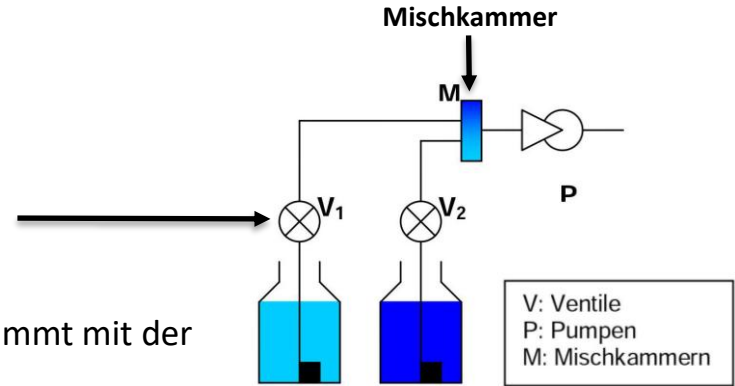
- a) Niederdruck-Gradientensystem
- b) Hochdruck-Gradientensystem

Niederdruckgradientensystem

a) Niederdruckgradientensystem:

- **Gradient** wird vor der **Pumpe** erzeugt → **Niederdruckseite**
- Lösungsmittel gelangen mittels **Dosierventile** in die Mischkammer
- Gelöste Gase können beim Mischen **ausgasen**

Ursache: Mischungswärme in der Mischkammer → Gaslöslichkeit nimmt mit der Temperatur ab!



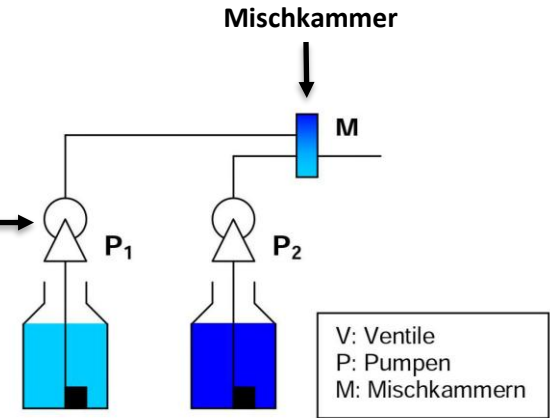
Nachteil:

- evtl. **Blasenbildung** in der Mischkammer! → Eluenten vorher entgasen
- **Weniger robust** als Hochdruckgradient
- Das System reagiert relativ **träge** auf **Gradientenänderungen**

Hochdruckgradientensystem

b) Hochdruckgradientensystem:

- **Gradient** wird nach der **Pumpe** erzeugt → **Hochdruckseite**
- Man braucht eine Pumpe je Lösungsmittel
- **Keine Blasenbildung** durch Hochdruckmischung (bessere Reproduzierbarkeit)
- Sehr schnelle, präzise Gradienteneinstellung



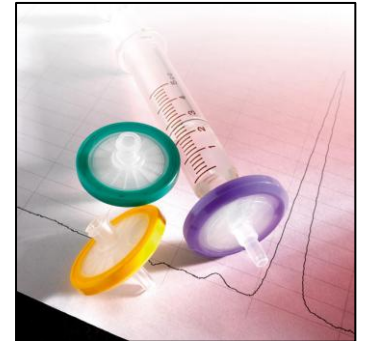
Nachteil:

- **Teurer als Niederdruck** und höherer apparativer Aufwand (**Wartung**)

Probenaufgabe

Probenvorbereitung:

- Proben sollten vor der Injektion mit einem **0.2 – 0.45 µm (Mikrofilter)** Spritzenvorsatzfilter **filtriert** werden
- frei von **Feststoffen** (Verstopfungen, Abrieb, schädigen Pumpe und Säule)
- Probe sollte **mischbar** mit dem Eluenten sein
→ Ausflocken → Verstopfung



Probeninjektion

Probeninjektion:

Die Probenaufgabe ist einer der kritischsten Punkte in der HPLC

Anforderungen an die Injektion:

- Exakt definiertes Volumen der Probe (→ möglichst **kleines Probevolumen reproduzierbar** aufgeben)
- Kein Unterbrechen des Eluentenstroms (möglichst rasch injizieren, **kein Druckabfall** während der Injektion)

Die Probenmenge hängt ab von

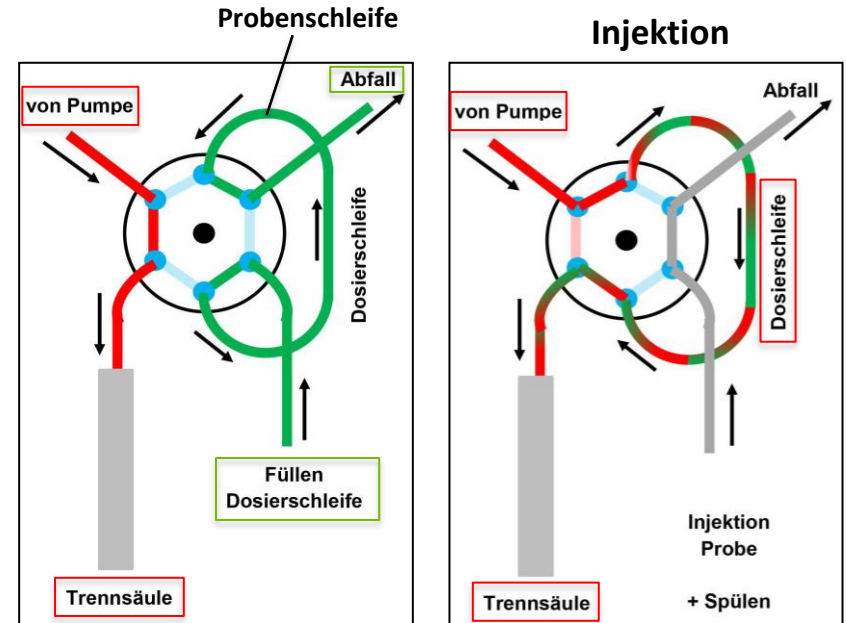
- Empfindlichkeit des Detektors
- Kapazität (Beladbarkeit) der stationären Phase

Injektion

Injektion über Dosierschleifen

Probenschleife mit definiertem Volume

- Ventil mit sechs Ausgängen.
(Sechswegen-Ventil, „Rheodyne-Ventil“)
- **Drehung** am Ventilkopf, so dass nun der **Eluentenstrom** von der Pumpe durch die **Probenschleife** fließt und erst dann zur Säule gelangt
- Reproduzierbare Probenaufgabe
- Schleifengrößen von 1-1000 μL einsetzbar
- Auch für präparative Mengen geeignet



Probenaufgabesystem

Moderne Autosampler sind multifunktionale Probenaufgabesysteme:

- Automatische Verdünnung von Proben
- Durchführung von Derivatisierungen
- Mischen von Substanzen
- Kühlung mittels Peltier-Elementen



Probengefäße (Vials) mit Septumdeckel dicht verschlossen, da sonst:

- Verdunstung von Lösungsmittel
- Oxidation der Probe
- Veränderung der Probe durch Licht und Temperatur



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**.

