



Instrumentelle Bioanalytik

Trennverfahren

Prof. Dr. Mircea Tric

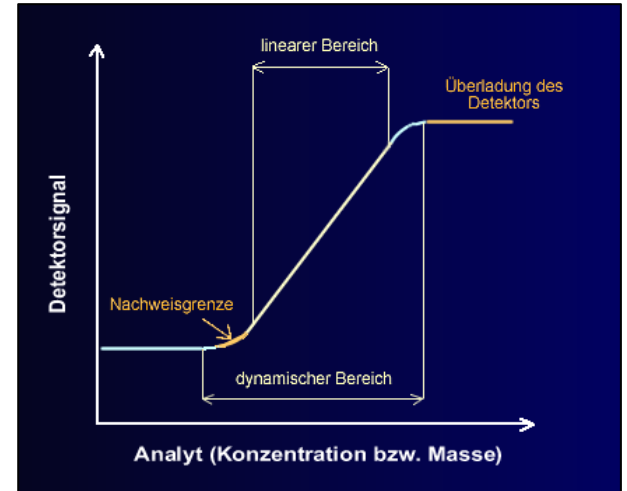
SS 2026

Detektion

Anforderungen an einen HPLC-Detektor:

- Hohe Sensitivität (Empfindlichkeit, Steigung der Kalibrationsgeraden)
- Spezifisch (z.B. Fluoreszenz (FLD), Massenspektrometer (MS))
- Kurze Ansprechzeit → schnelle Datenaufnahme
- Hohe Stabilität der Messung (geringer Basisliniendrift, Reproduzierbarkeit)
- Hohe Linearität
- Kleine Messzellvolumen → geringe Bandenverbreiterung (Diffusion!)
- Möglichst preisgünstig

Aber: Leider gibt es keinen perfekten Universaldetektor!



Detektortypen

Detektortypen:

a) Universelle Detektoren (sind unspezifisch):

Annähernd **gleiche Ansprechempfindlichkeit** für viele Substanzen

- **ELSD-Detektor** (Evaporative Light Scattering Detector)
→ Zerstäuben und Eindampfen des Analyten mit Inertgas → Feststoffpartikel streuen Laserstrahl
- **RI-Detektor** (Refractive Index = Brechungsindex)

b) Spezifische / Selektive Detektoren:

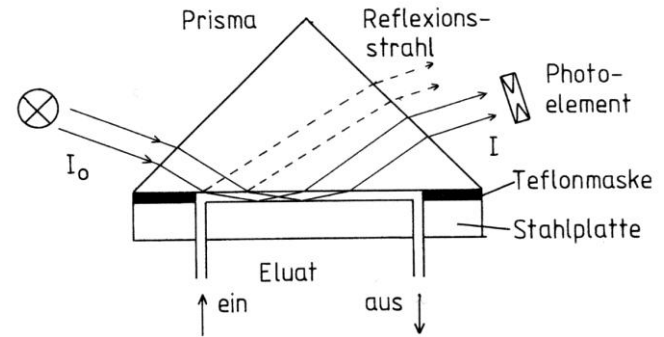
Ansprechempfindlichkeit **struktur-/ elementselektiv** für einzelne Komponenten

- UV/VIS-Detektor
- Fluoreszenzdetektor
- Massenselektiver Detektor

Brechungsindex-Detektor

Brechungsindex-Detektor (RI = Refractive Index):

- **Unselektiv (universell)**
- **Zerstörungsfrei**
- Einsatz wenn Analyt nicht UV/VIS aktiv
- Faktor 1000 **unempfindlicher** als UV/VIS
- **Brechungsindex n ist temperaturabhängig**
→ **Thermostatisierung**
- Nicht sinnvoll bei Gradientenelution, da sich der Brechungsindex verändert
- Anwendung: Aliphatische Polymere, Zuckeranalytik



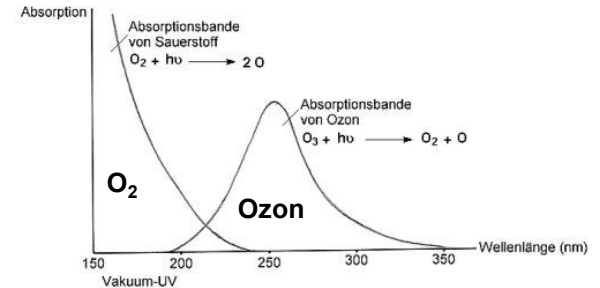
UV/VIS-Spektralphotometer

UV/VIS-Detektoren (190 – 1000 nm):

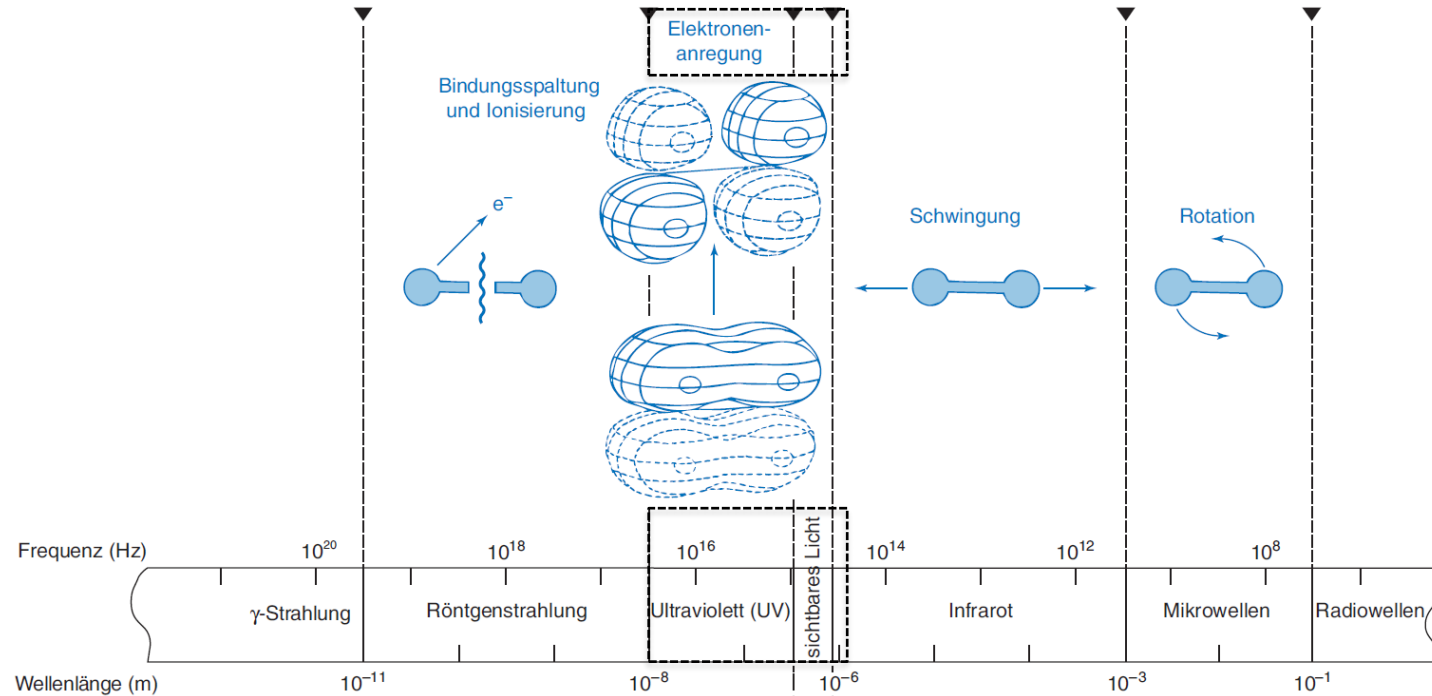
- Häufig eingesetzter Detektorentyp für **UV/VIS-aktive Substanzen**
- Relativ hohe Empfindlichkeit
- Relativ günstig
- Wellenlänge kann auch während des Laufs geändert werden
- Hohe Linearität
- Zerstörungsfreie Messung
- Auch bei Gradientenbetrieb nutzbar

Nachteile:

- Temperaturabhängigkeit des Extinktionskoeffizienten (relativ gering)
- Sauerstoff absorbiert im UV-Bereich ab $\lambda < 250$ nm

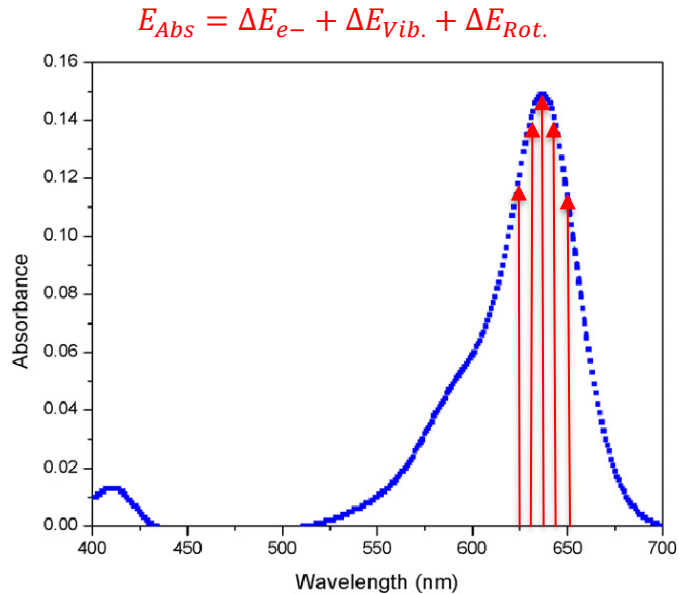


Anregung von Molekülen



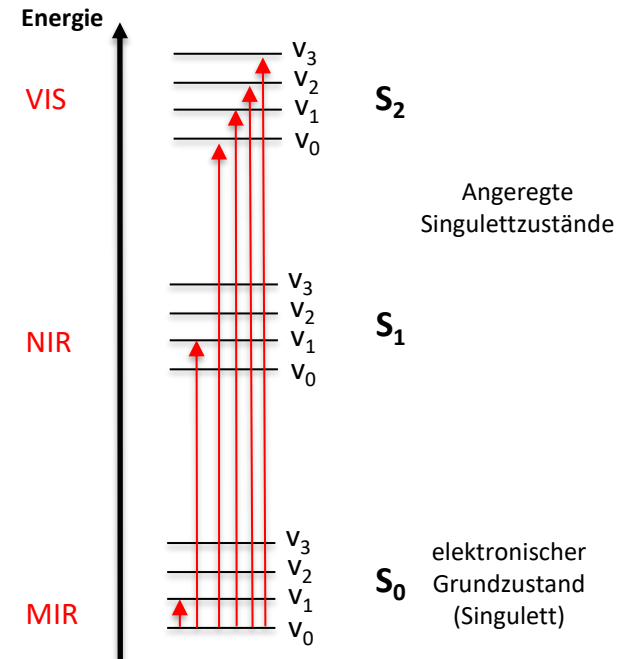
Absorptionsspektren von Molekülen

Absorptionsbanden eines Moleküls (z.B. Patentblau)



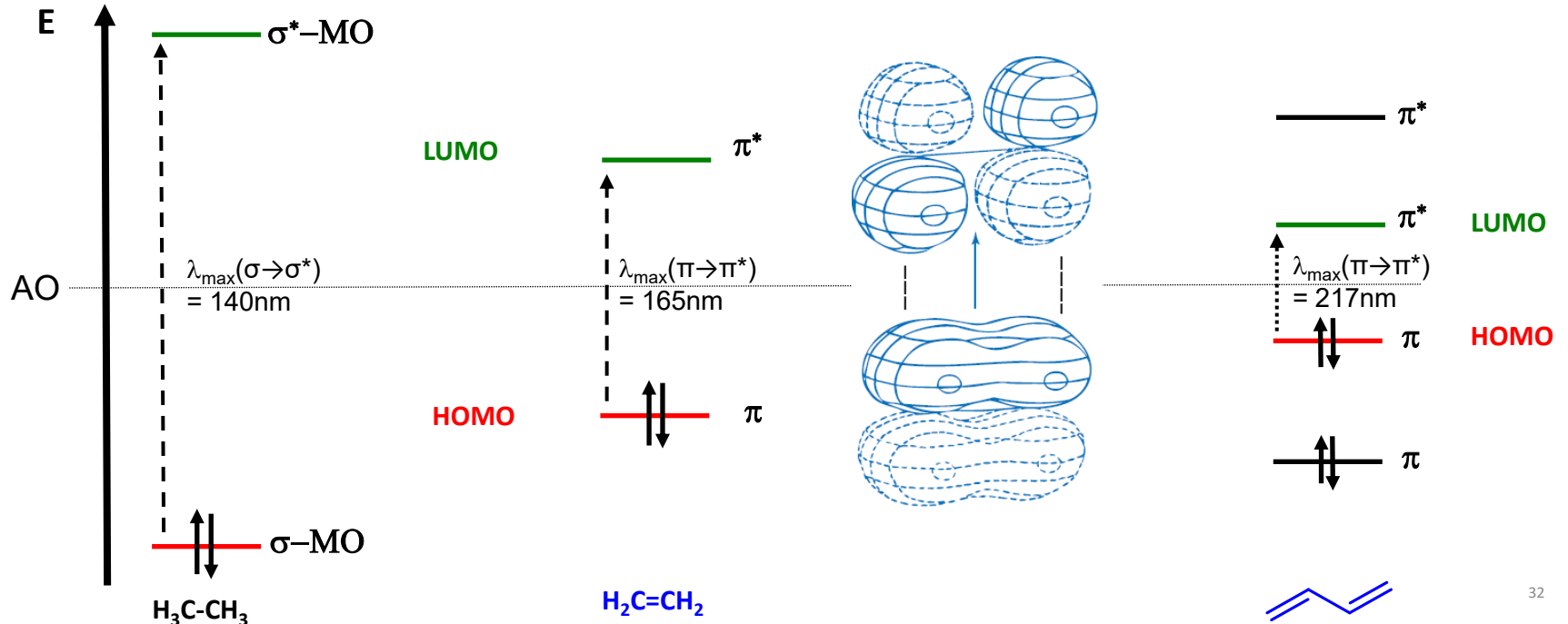
Jablonski-Diagramm

Beschreibt elektronische Zustände von Molekülen



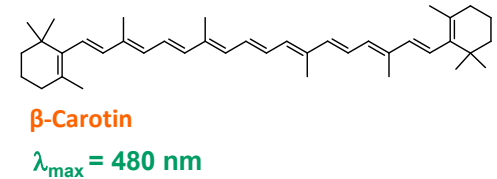
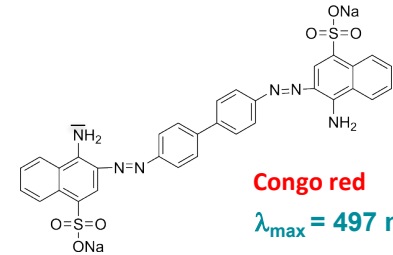
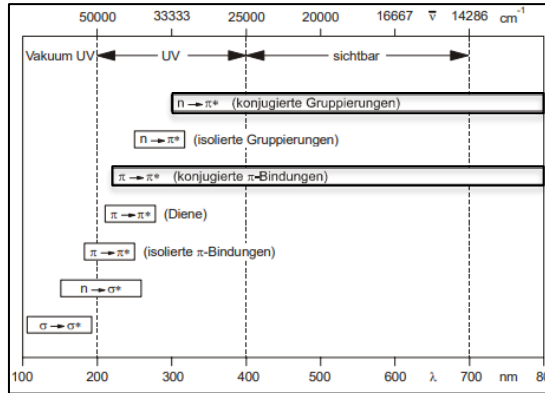
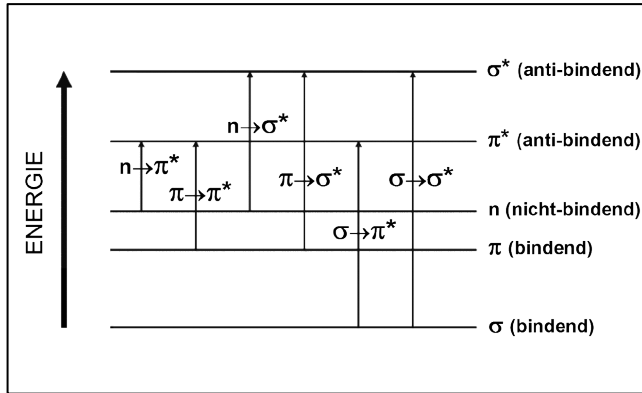
Elektronenspektroskopie (UV/VIS/NIR)

UV/VIS führt zu **Anregung** von **Valenzelektronen** in Molekülen → höhere Energiezustände



Absorption elektromagnetischer Strahlung

HOMO/LUMO-Übergänge:

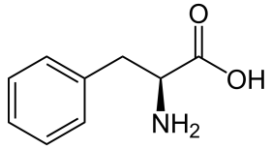


$n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge, wenn freie Elektronenpaare vorhanden (z.B. **Peptidbindung** bei $\lambda = 220 \text{ nm}$)

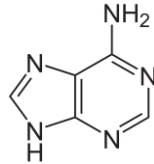
$\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge bei Molekülen mit **Mehrfachbindungen** (z.B. Resonanzstruktur von **Peptidbindungen** bei $\lambda = 190 \text{ nm}$)

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge (Bruch der **Einfachbindung**) vorwiegend bei $\lambda < 190 \text{ nm}$ (\rightarrow Strahlengang sollte frei von O_2 sein)

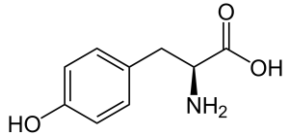
Chromophore biologische Strukturen



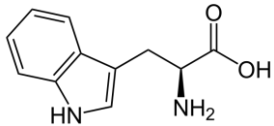
Phenylalanin



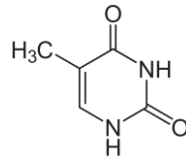
Adenin



Tyrosin



Tryptophan



Thymin

| | Bereich/ λ_{\max} | ϵ (in $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) | Absorbierende Gruppe im Molekül |
|-----|---------------------------|---|---|
| UV | ca. 190 nm | ca. 7000 | $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Peptidbildung |
| | ca. 220 nm | ca. 100 | $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Peptidbildung |
| | 260 nm | ca. 13.000 | $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ Adenin |
| | 275 nm | ca. 6000 | $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ Guanin |
| | 267 nm | ca. 6000 | $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ Cytosin |
| | 264 nm | ca. 8000 | $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ Thymin |
| | 258 nm | ca. 6600 | $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ DNA |
| | 257 nm | ca. 200 | $\pi \rightarrow \pi^*$ arom. Seitenkette, Phenylalanin |
| | 274 nm | ca. 1400 | $\pi \rightarrow \pi^*$ arom. Seitenkette, Tyrosin |
| | 280 nm | ca. 5600 | $\pi \rightarrow \pi^*$ arom. Seitenkette, Tryptophan |
| VIS | 420 nm | ca. 125.000 | Soret-Bande des Häms |
| | 450 nm | ca. 120.000 | Carotin |
| | 500 nm | ca. 42.000 | Retinal im Sehpigment Rhodopsin |
| | 550 nm | ca. 18.000 (Δ) | α -Bande des Häms (Differenzspektrum, reduzierte Form minus oxidierte Form) |
| | 590 nm | ca. 25.000 | Q_x -Übergang Bakteriochlorophyll a (in EtOH) |
| | ca. 600 nm | ca. 5000 | $\pi \rightarrow \pi^*$ Flavin-Radikal |
| | 590–630 nm | ca. 2000–5000 | <i>Charge-transfer</i> -Bande Typ-I-Cu-Protein |
| NIR | 772 nm | ca. 100.000 | Q_y -Übergang Bakteriochlorophyll a (in EtOH) |
| | 800 nm | >100.000 | Q_y -Übergang Bakteriochlorophyll a in Antennenproteinen |
| | 850 nm | >100.000 | Q_y -Übergang Bakteriochlorophyll a in Antennenproteinen |
| | 860 nm | ca. 80.000 | Bakteriochlorophyll-Dimer in photosynthet. Reaktionszentrum |
| | 1020 nm | >100.000 | Q_y -Übergang Bakteriochlorophyll b, Antennen in <i>Rhodospseudomonas viridis</i> |

UV-VIS-Detektor

UV/VIS-Detektoren:

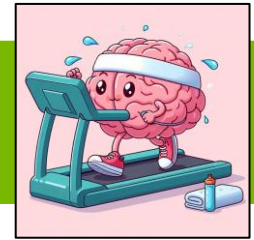
- UV/VIS-aktiv sind: **Aromatische** und **ungesättigte, konjugierte Verbindungen**
→ **Derivatisierung** mit aromatischen Reagenzien, **falls** Analyt **UV/VIS-inaktiv!**
- Je kurzwelliger, desto unspezifischer (viele Verbindungen absorbieren im UV)
- Im längerwelligen Bereich (VIS) absorbieren weniger Verbindungen

Typische Gerätearten:

- **VWD – Variabler Wellenlängendetektor** → Messung bei einer ausgesuchten **Wellenlänge**
- **DAD – Dioden-Array-Detektor** → Gleichzeitige Aufnahme des gesamten **Spektrums**

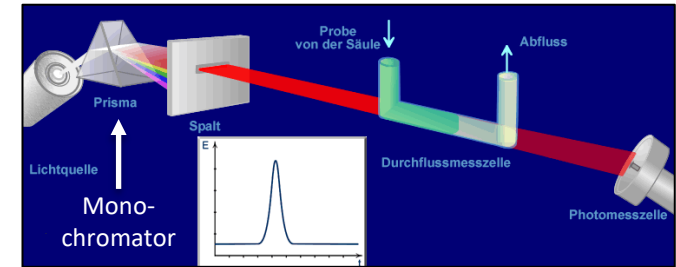
UV-VIS-Detektor

Welche Nachteile hat ein Monochromator hinter der Probe?



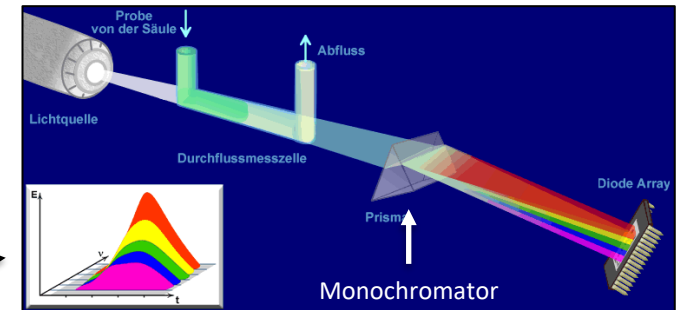
Variabler Wellenlängendetektor (VWD):

- Monochromatisches Licht
- Detektion bei einer Wellenlänge (λ_{\max})

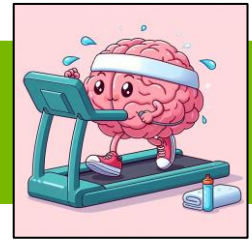


Diodenarray-Detektor (DAD):

- Detektion des gesamten Spektrums
- Polychromatisches Licht wird in die Messzelle gestrahlt und danach mit einem **Beugungsgitter** zerlegt
- Eindimensionale Sensoren mit bis zu 1024 Photodioden (→ 1024 Wellenlängen, 1 nm spektrale Auflösung)
- Es entsteht ein dreidimensionales Chromatogramm (Absorbanz **A**, Zeit **t**, Wellenlänge **λ**)

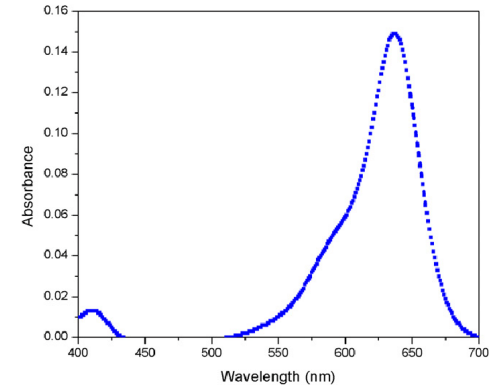


Übung



Bei welcher Wellenlänge λ würden Sie die Konzentration von Patentblau bestimmen und warum?

Absorbanzspektrum Patentblau



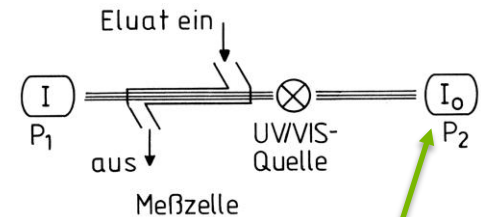
UV-VIS-Detektor

Messzelle eines UV/VIS-Detektors:

- **Schichtdicke** der Messzelle möglichst lang (ca. 1 cm) → **Z-Zelle** → **hohe Sensitivität**
- **Volumen** möglichst gering (10 μL)
→ flache Messzelle (geringe **Bandenverbreiterung!**)

Lichtquellen:

- **Deuteriumlampe** (UV-Emissionsspektrum: 200 – 340 nm, Lebensdauer ca. 2000 h)
- **Wolframlampe** (Emissionsspektrum: 340 – 1000 nm)



Z-Zelle

Referenzmessung
(I_0 Intensität der
Lichtquelle)

Transmission

Transmissionsgrad T:

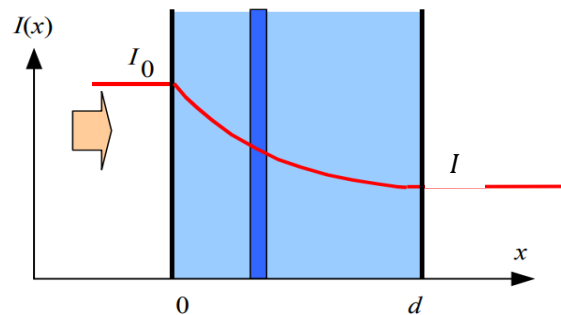
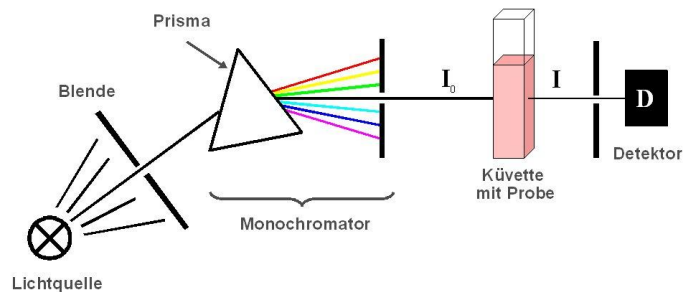
Durchdringt ein Lichtstrahl mit der Intensität I_0 ein Medium mit der Schichtdicke d , wird der Lichtstrahl durch die **Absorptionseigenschaften** der Probe **geschwächt**

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 [\%]$$

- I_0 Eingestrahlte Lichtintensität
- I Lichtintensität nach Abschwächung

Absorption:

$$\text{Absorption} = 100 - T [\%]$$



Absorbanz

Absorbanz A (alt Extinktion E):

Maß für die Abnahme der Strahlungsintensität
(Annahme: Lichtschwächung nur durch Absorption)

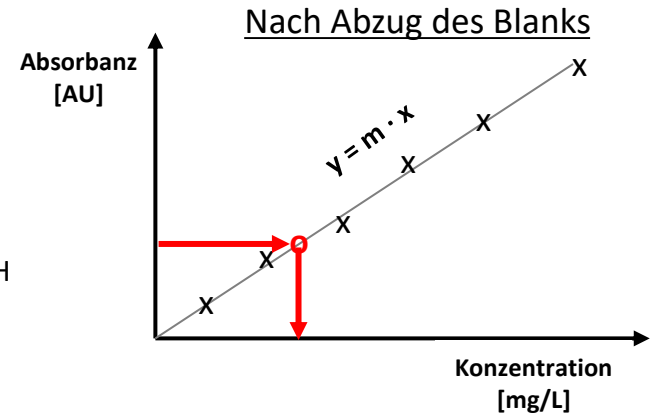
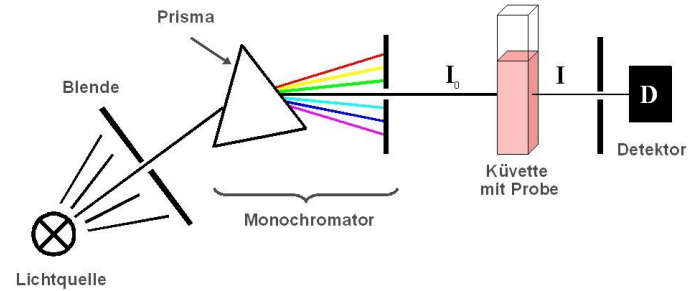
$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

Lambert-Beersches Gesetz:

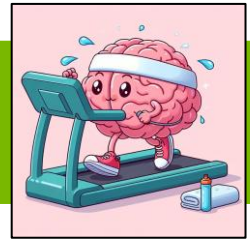
$$A = \varepsilon_\lambda \cdot d \cdot c$$

$$y = m \cdot x \rightarrow \text{Proportionalität}$$

- A Absorbanz (Abzug des Blanks bereits erfolgt)
- ε_λ Extinktionskoeffizient in [L/(mol·cm)], abhängig von: **Stoff**, λ , T, P, LM, pH
- c Konzentration
- d durchstrahlte Schichtdicke



Übung

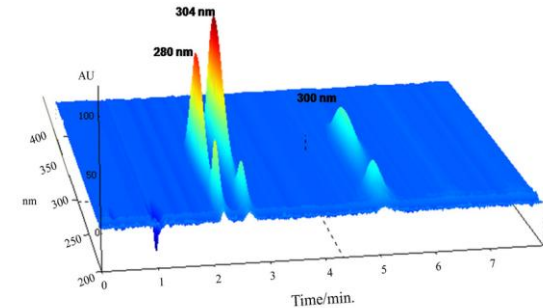
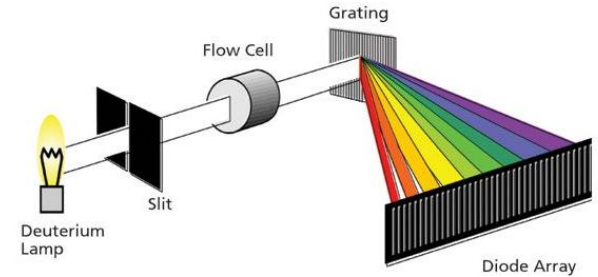


Die Transmission einer Lösung (Schichtdicke der Küvette: 1 cm) beträgt bei 300 nm $T = 1\%$. Wie müssen Sie die Konzentration (unter sonst gleichen Bedingungen) wählen, um eine Transmission von 10 % zu erhalten?

DAD vs VWD-Detektor

DAD-Detektoren:

- Sehr gut geeignet für **komplexe Matrix**
- Gesamtes Spektrum ist für jeden Peak verfügbar (spektrale Information → **Identifikation**)
- Simultane Detektion von **verschiedenen Substanzen**
- **Coelution** besser erkennbar



Fluoreszenzdetektor (FLD)

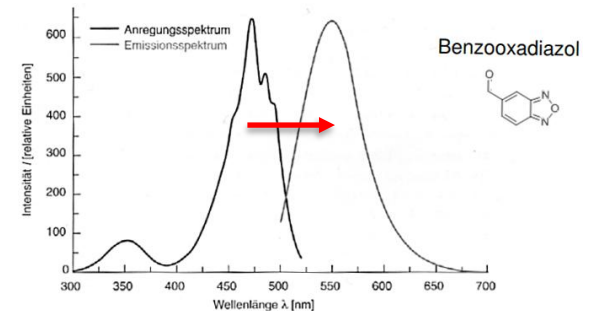
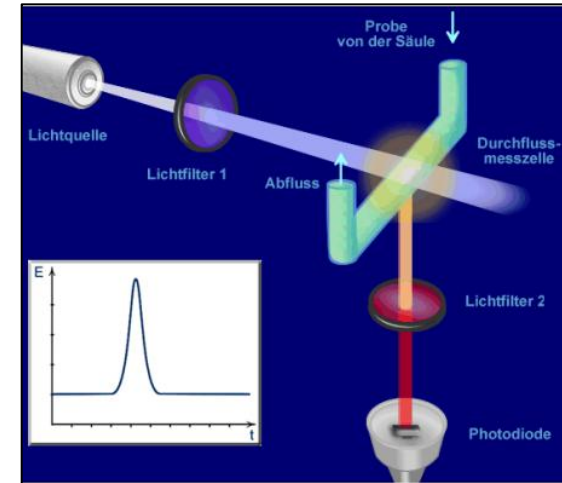
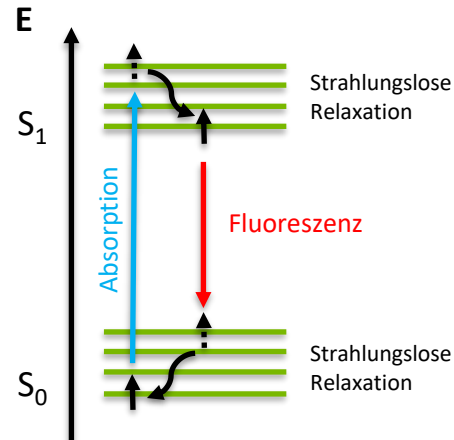
Fluoreszenzdetektor (FLD)

Typische Analyten:

- Aromatische Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe) / Peptide
- Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs)

Fluoreszenz (s. Jablonski-Diagramm):

- Spezifische Anregung
- **Stokes-Shift (redshift)**
- Quenching durch Störsubstanzen (Halogenide, Sulfide, O₂) möglich



Detektortypen

| Detektor | Art/Anwendung | Typische Nachweisgrenze | Linearität |
|----------------------------|---|-------------------------|---------------|
| UV/Vis: VWD, MWD, DAD | Selektiv Für UV/Vis-aktive Substanzen | 100 ng/L | 10.000 |
| Fluoreszenz | Selektiv Für fluoreszierende Substanzen | 1 ng/L | 1000 – 10.000 |
| Refraktionsindex | Universell Relativ unempfindlich | 100 µg/mL | 3000 |
| Elektrochemischer Detektor | Selektiv Für leicht oxidierbare/reduzierbare Verbindungen | 10 ng/mL | 1000 – 10.000 |
| Massenselektiver Detektor | Selektiv Alle ionisierbaren Verbindungen | 0,1 – 10 pg/L | 100.000 |

Nachweisempfindlichkeit

UV/VIS-Detektor



Fluoreszenz-Detektor



100 – 1000x empfindlicher als UV/VIS-Detektor

Signal-to-Noise-Ratio (SNR)

Empfindlichkeit und **Nachweisgrenze** werden durch das **Rauschen** des Messsystems **begrenzt**.

Unter **Rauschen** versteht man alle unerwünschten, **statistisch schwankenden Signale**, die sich dem Messsignal überlagern.

Signal-to-Noise-Ratio (SNR)

$$SNR = \frac{Signal}{Rauschen}$$

Verbesserung durch:

- Erhöhung des Signals (höhere Analytkonzentration, bessere Trennleistung)
- Verringerung des Rauschens (stat. Unsicherheit) z.B. durch Mehrfachmessungen, Detektorkühlung etc.

Rauschen (Noise)

Read-Noise: (Gauß-Verteilung)

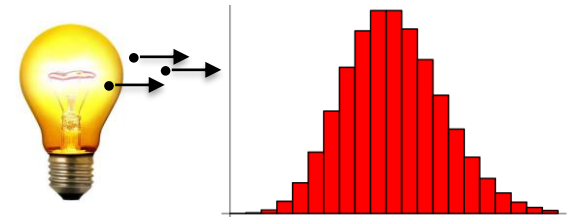
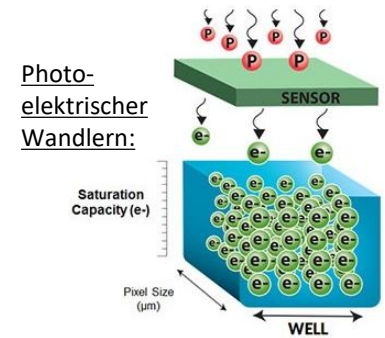
- Elektronen werden zufällig gewonnen/verloren während **Read-out** bzw. **Signalverstärkung** (Rauschen der elektronischen Bauteile)

Dark Noise (Dark current / thermal noise): (Poisson-Verteilung)

- **Thermische generierte Elektronen** aus den Siliziumatomen des Detektors
- → **Detektorkühlung** verringert “Dunkelstrom”

Photon Noise: (Poisson-Verteilung)

- Zufällige Fluktuationen der Photonenzahl aus der Lichtquelle (**quantenmechanischer Effekt**)



Nachweisempfindlichkeit

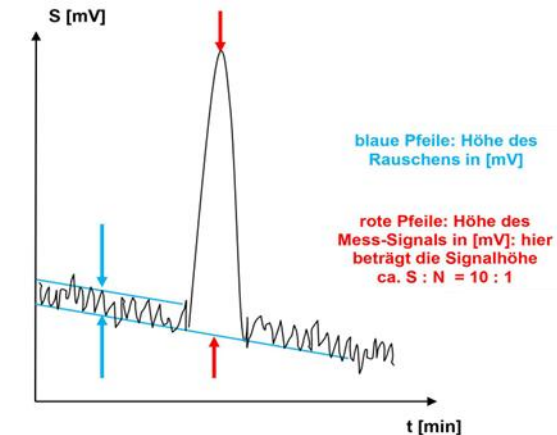
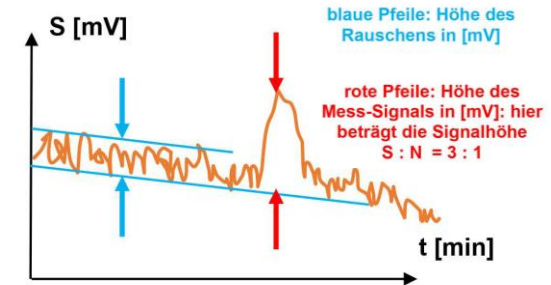
Nachweisgrenze (NWG, LOD):

- Qualitative Aussage
 - Rauschen → Standardabweichung der Blindwertsignale
 - Näherung für NWG:
Peakhöhe mindestens **3 x Basislinienrauschen** ($y_{LOD} = \overline{y_{Blank}} + 3 \cdot SD_{Blank}$)
- Empfehlung des Deutschen Instituts für Normung (DIN)

Bestimmungsgrenze (BG, LOQ)

- Quantitative Detektion
 - kleinste noch sichere Konzentrationsangabe für einen Substanzpeak
 - Näherung für y_{LOQ} : Peakhöhe mindestens **10 x Basislinienrauschen** ($y_{LOQ} = \overline{y_{Blank}} + 10 \cdot SD_{Blank}$)
- Empfehlung des Deutschen Instituts für Normung (DIN)

In der Praxis: Peak-to-Peak-Rauschen



Bestimmung der Nachweisgrenze

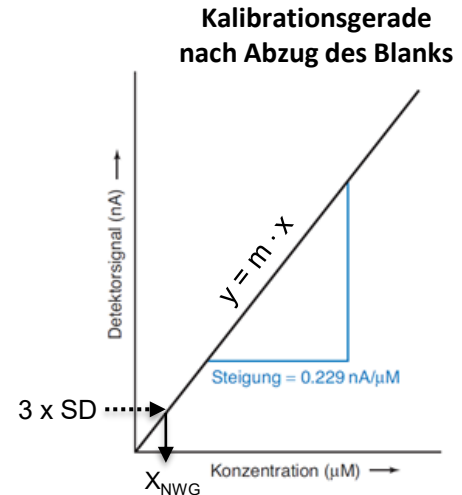
Nachweisgrenze:

Wie bestimmt man die Konzentration, ab der eine Verbindung nachgewiesen werden kann?

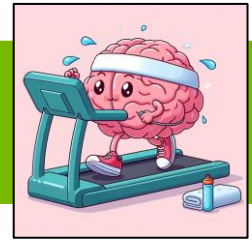
Bestimmung der Nachweisgrenze in der Praxis (Leerprobenmethode):

$$x_{NWG} = \frac{3 SD_{Blank}}{Steigung} = \frac{3 SD}{m}$$

| | |
|-----------|---|
| x_{NWG} | Konzentration an der Nachweisgrenze |
| SD | Standardabweichung der Leerprobe |
| m | $\Delta y / \Delta x$ Steigung der Kalibrationsgerade |



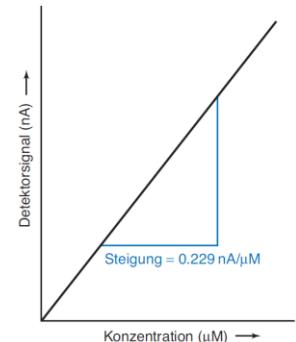
Übung



Die Signale von sieben Aliquoten einer Probe waren 5,0 ; 5,0 ; 5,2 ; 4,2 ; 4,6 ; 6,0 und 4,9 nA. Die Blindproben ergaben Werte von 1,4 ; 2,2 ; 1,7 ; 0,9 ; 0,4 ; 1,5 und 0,7 nA. Mit Hilfe von Kalibrationsstandards wurde eine Kalibrationskurve mit einer Steigung von $m = 0,229 \text{ nA}/\mu\text{M}$ ermittelt.

- Wie groß ist die kleinste nachweisbare Konzentration?
- Berechnen Sie die Konzentration der Probe.
- Wie groß ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die gemessene Probe?
- Ist die Angabe dieser Konzentration verlässlich? (Begründung)

Kalibrationsgerade nach Abzug des Blindwerts



Übung

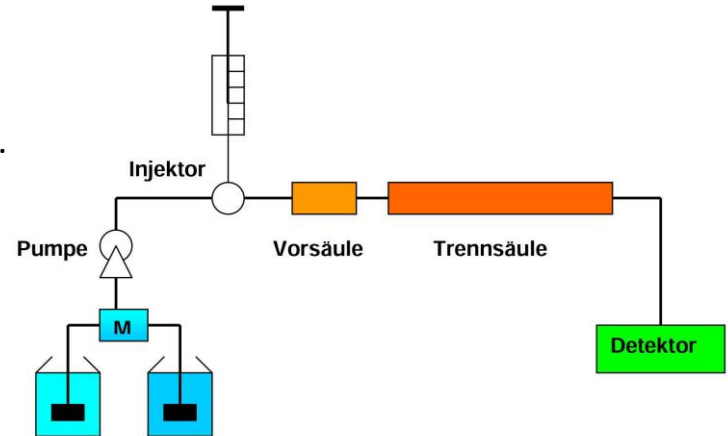
Übung

Übung

Vorsäulen

Vorsäule:

Kurze Säule, die zwischen Pumpe und Trennsäule geschaltet wird.
Sie enthält die **gleiche stationäre Phase** wie die Trennsäule.



Dient dem Schutz der Trennsäule:

- Zurückhalten von **Partikeln** aus der mobilen Phase
- **Sättigung** der mobilen Phase mit (**gelöster!**) **stationärer Phase** (bei aggressiven Medien)
→ verhindert das Lösen der stationären Phase in der Trennsäule

Analytische/Präparative HPLC

Analytische HPLC

Flussbereich: 0,01 – 10 mL/min

Autosampler

Destruktive Detektoren einsetzbar

Semipräparative HPLC

Flussbereich: 0,01 – 50 mL/min

Fraktionssammler

Präparative HPLC

Flussbereich: 0,01 – 100 mL/min

Fraktionssammler

z.B. Proteinaufreinigung

Ziel: Aufreinigung

Trade-off zwischen Reinheit,
Ausbeute und Geschwindigkeit

Tab. 11.8 Funktionsbereiche der HPLC-Säulen

| Bezeichnung | Probenmenge | Säulendurchmesser (in mm) | Säulenlänge (in mm) | Flussrate (in ml min ⁻¹) |
|----------------|-------------|---------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| präparative LC | mg–g | > 4 | 15–250 | 5–20 |
| analytische LC | µg–mg | 2–4 | 15–250 | 0,2–1 |
| Mikro-LC | mg | 1 | 35–250 | 0,05–0,1 |
| Nano-LC | ng–µg | < 1 | 50–150 | < 0,05 |
| Nano-Chip | ng | < 0,1 | 50 | < 0,01 |

Jens Kurreck, Joachim W. Engels, Friedrich Lottspeich

Präparative Säulen:

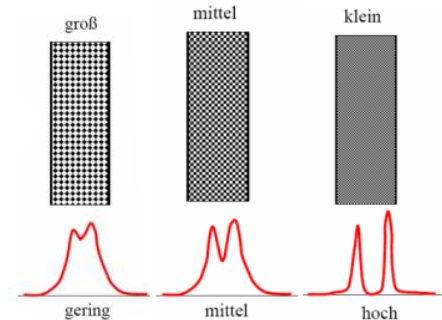


Lehrbuch der Quantitativen Analyse

Trennsäulen

Moderne Trennsäulen:

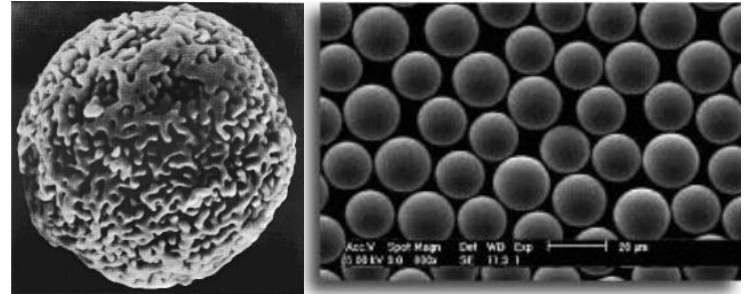
- Bestehen meist aus Edelstahl, Titan oder Polymeren
 - Die Säulenenden sind mit feinmaschigen **Filtersieben** ($0,45\ \mu\text{m}$) verschlossen \rightarrow verhindert den Austritt der Partikel
 - **kleine Trennsäuleninnendurchmesser** ($\sim 2\ \text{mm}$)
 - **kleine Partikelgrößen** (Standard: $1,7\ \mu\text{m}$)
- \rightarrow **geringe EDDY-Diffusion (A-Term)**
- \rightarrow **geringere Diffusionswege in die Partikel (C-Term)**
- \rightarrow **geringere Peakbreiten**



Trennsäulen

Typischerweise verwendete Partikel:

- Materialien meist Kieselgel (Silicagel, SiO_2)
- Idealerweise sphärisch (Silicabeads)
- Porös (Diffusionseffekte)
- Hohe Druckstabilität
- pH-Stabilität (Silicagel: pH 2-8)



Für **präparative** HPLC kommen bevorzugt **10 µm** Säulenmaterial zur Anwendung

Trennsäulen

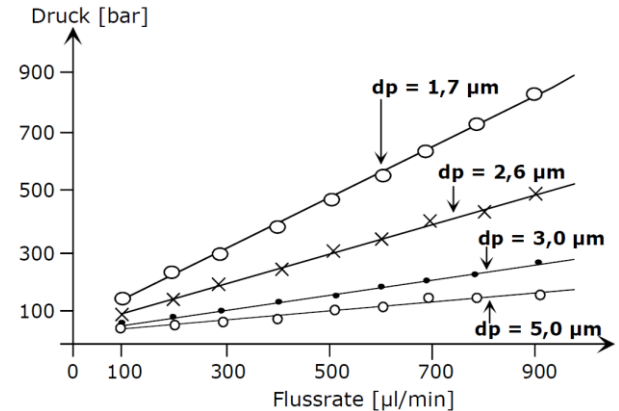
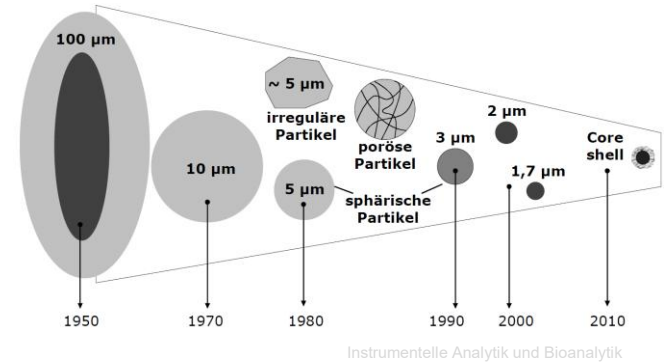
Entwicklung zu kleineren Partikeln:

Effizienz $N \propto \frac{1}{d_p}$

N: Trennstufenzahl
 d_p : Partikeldurchmesser
p: Druck

Druck $p \propto \frac{1}{d_p^2}$

Eine Verdopplung der Effizienz führt zu einer Vervielfachung des Drucks!



UHPLC

UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)

- **Höherer Druck** (bis zu 1500 bar)
 - **Partikelgröße: $\leq 2\mu\text{m}$**
- ⇒ schnellere Analyse
- ⇒ geringerer Eluentenverbrauch
- ⇒ höhere Auflösung
- ⇒ höhere Empfindlichkeit

Nachteile UPLC:

Höhere apparative Anforderungen (→ Lebensdauer der Pumpen)



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**.

