

In der zur analytischen Chromatographie gehörenden Detektion weisen Gas- und vor allem Dünnschicht-Chromatographie bisher noch ein größeres Spektrum an Möglichkeiten als die HPLC mit überwiegend photo- und fluorimetrischen Messungen in Durchflußdetektoren auf.

Für diesen Bereich der qualitativen und quantitativen Analyse gewinnt daher neben der physikalischen Meßtechnik die Chemie der zu bestimmenden Substanzen immer mehr an Bedeutung.

Über diese Möglichkeiten der Chemie in der HPLC-Analytik berichtet dieses Buch. Es stellt den Versuch dar, eine Bestandsaufnahme der bisher beschriebenen Anwendungen post-chromatographischer Derivatisierungen in chemischen Reaktionsdetektoren zu geben und darüber hinaus durch die Vermittlung detaillierter Angaben zur experimentellen Technik der Verfahren Anregungen zu Entwicklungen für eigene Analysenprobleme zu liefern. Die theoretischen Grundlagen werden kurz dargestellt, der Schwerpunkt liegt jedoch in der Vermittlung praktischer Ergebnisse dieser ständig an Bedeutung gewinnenden Analystechnik.

Hüthig

1. Einleitung

Innerhalb der analytischen Chromatographie erfüllen chemische Derivatisierungen der zu bestimmenden Substanzen eine Reihe wichtiger Aufgaben (Tab.1) und haben insbesondere in den letzten zehn bis zwanzig Jahren eine erhebliche Ausweitung erfahren (s. Monographien von LAWRENCE u. FREI 1976 -(79)- sowie BLAU u. KING 1977 -(8)-).

Tab. 1

Aufgaben chemischer Derivatisierung in der analytischen Chromatographie

I. Substanzen bestimmten chromatographischen Trennsystemen zugänglich zu machen.

(Beispiele:

GC - Silylierung und damit Bildung flüchtiger Verbindungen aus polaren, nicht-flüchtigen oder thermisch instabilen Substanzen wie höheren Carbonsäuren, Substanzen mit mehreren funktionellen Gruppen wie Aminosäuren.

LC - Umwandlung von z.B. Aminen in weniger polare Amide zur Anwendung der Adsorptions-Chromatographie.)

II. Bestehende Trennmöglichkeiten zu verbessern.

z.B. durch Steigerung der Selektivität oder durch eine Verringerung der erforderlichen Trennzeit

(Beispiele:

GC (seltener LC) - Reaktion optisch aktiver Substanzen mit chiralen Reagenzien zur Bildung von Diastereomeren und zur Trennung an nicht-chiralen stationären Phasen.

Tab. 1 (Fortsetzung)

LC - Verringerung der Polaritätsunterschiede innerhalb einer Substanzgruppe und damit kürzere Trennzeit bei isochratischer Elution.)

III. Empfindlichkeit und Selektivität in der Detektion zu steigern.

(Beispiele:

GC - Einführung elektroneneinfangender Gruppen oder Atome (F, NO₂ u.a.).

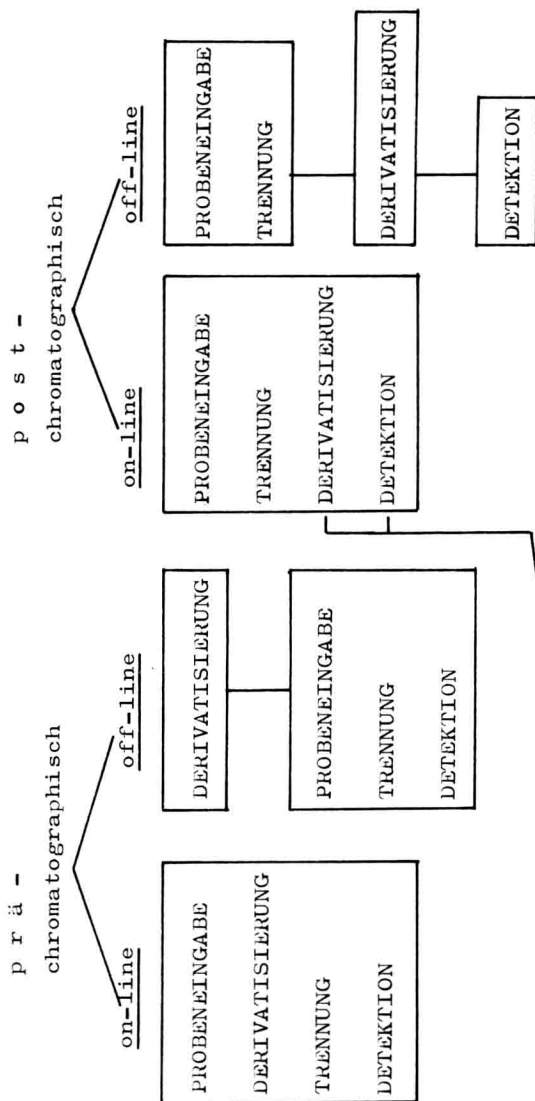
LC - Einführung von Chromophoren mit hohen Extinktionskoeffizienten und gleichzeitig bathochromem Effekt; selektive Derivatisierung funktioneller Gruppen; Bildung von Derivaten mit sehr ähnlichen spektralen Eigenschaften zur simultanen Detektion unter konstanten apparativen Bedingungen.)

Diese chemischen Umsetzungen zur Verbesserung von Trenn- und/oder Detektionsmöglichkeiten lassen sich an verschiedenen Stellen eines chromatographischen Analyseverfahrens entweder als prä- oder als post-chromatographische Derivatisierung durchführen (s. Abb.1).

*s. W.DÜNGES, Prä-chromatographische Mikromethoden; Hüthig: Heidelberg 1979.

Abb. 1

MÖGLICHKEITEN DER DERIVATISIERUNG IN DER CHROMATOGRAPHIE



in: CHEMISCHEN REAKTIONSDETEKTOREN

Die weite Verbreitung dünn-schicht-chromatographischer Verfahren ist nicht nur auf die vielfältigen Trennmöglichkeiten chemischer Stoffe mit den verschiedensten Methoden der Flüssigkeits-Chromatographie, sondern auch auf das breite Spektrum an Detektionsmöglichkeiten zurückzuführen. Ein wichtiger Teil in der DC-Detektion, die Verwendung von Sprühreagenzien, wird in der Flüssigkeits-Chromatographie in Säulen in chemischen Reaktoren durchgeführt und in Verbindung mit einem Durchflußdetektor in "on-line"-Kopplung als CHEMISCHER REAKTIONSDETEKTOR bezeichnet.

Diese Art von Detektion wird bereits seit mehr als zwanzig Jahren mit Erfolg in der Aminosäure-Analytik angewendet: Nach dem klassischen Verfahren von SPACKMAN, STEIN u. MOORE 1958 (Lit. s. in: SCHWEDT 1979b (133): Nr. 22) erfolgt nach der Trennung der Aminosäuren an einem Ionenaustauscher die Umsetzung mit dem Reagenz Ninhydrin in einem direkt angeschlossenen AutoAnalyzer vor der photometrischen Detektion im Durchfluß. Im Vergleich zur Anwendung von Sprühreagenzien in der DC und zu den prä-chromatographischen Derivatisierungen sind solche post-chromatographischen Umsetzungen in der Säulen-Chromatographie bisher erheblich seltener beschrieben worden (Übersichten: SCHWEDT 1979b (133), FREI u. SCHOLTEN 1979-(32)-).

Hierfür sind drei wesentliche Gründe zu nennen:

1. Als Folge der chemischen Umsetzungen im kontinuierlich fließenden Eluentenstrom zwischen dem Ausgang der Trennsäule und der Durchflußzelle des Detektors in einem Reaktor tritt eine Verbreiterung der Elutionsbanden und damit eine Verringerung der Auflösung durch Diffusionseffekte auf. Diese Effekte wirken sich umso nachteiliger auf die Auflösung aus, je leistungsfähiger das flüssigkeits-chromatographische

Trennsystem ist, also ganz besonders in der Hochdruck- (Hochleistungs)-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), der modernen schnellen Flüssigkeits-Chromatographie in Säulen.

2. Bei der Detektion störender Reagenzüberschuß oder störende Nebenprodukte von Reaktionen lassen sich nicht oder nur unter weiterem Verlust an Auflösung beseitigen. Dieses Problem kann bei prä-chromatographischen Derivatisierungen durch eine spezielle Probenvorbereitung, z.B. Flüssig-flüssig-Verteilung oder durch die chromatographische Trennung selbst gelöst werden.
3. Die durch das Trennproblem festgelegte mobile Phase schränkt als Reaktionsmedium der post-chromatographischen Derivatisierungen die Auswahl an chemischen Umsetzungen ein.

Diesen allgemeinen Nachteilen stehen jedoch eine Reihe von Vorteilen zur Derivatisierung vor der chromatographischen Trennung gegenüber:

- Das exakte Timing an Reagenzienzufuhr und die damit erzielte optimale Kontrolle und Steuerung der Reaktionsbedingungen und des -verlaufs ermöglicht besser reproduzierbare Meßergebnisse (d.h. Ausbeuten) als bei prä-chromatographischen Derivatisierungen.
- Mit den Steuerungsmöglichkeiten im chemischen Reaktor ist eine optimale Nutzung von Reaktivitäts-Selektivitäten für verschiedene Substanzen verbunden.
- Infolge der Selektivitäten in der Reaktion lassen sich Analysen mit solchen Systemen in vielen Fällen ohne aufwendige Probenvorbereitung durchführen.
- Auch Reaktionen, die unvollständig ablaufen oder zu

mehreren Reaktionsprodukten führen, lassen sich für chemische Reaktionsdetektoren einsetzen, vorausgesetzt, sie führen zu reproduzierbaren Signalen und außerdem zu einer linearen Abhängigkeit von der Substanzkonzentration.

--- Derivate, die sich aufgrund sehr ähnlicher Strukturen bzw. Eigenschaften chromatographisch nur schwer trennen lassen, können jedoch im Hinblick auf die Detektion besonders vorteilhaft sein: Lassen sich Substanzen mit relativ niedrigen Molekulargewichten, sehr unterschiedlichen Absorptionsspektren und ähnlichen reaktiven Gruppen mit einem Reagenz hohen Molekulargewichts und hohem Absorptionskoeffizienten bzw. intensiven Fluoreszenzeigenschaften umsetzen, so wird die spektroskopische Eigenschaft im wesentlichen vom Reagenz bestimmt. Auf diese Weise lassen sich Detektionsmöglichkeiten schaffen, die zu gleich empfindlichen Nachweisen für eine Gruppe von Substanzen bei hierbei fester spektraler Einstellung des Detektors führen.

Diese Vorteile, die ganz besonders für die chemische Spurenanalytik gelten, haben zu einer Reihe von Anwendungen des Verbundsystems aus schneller Flüssigkeits-Chromatographie (mit Trennzeiten unter einer Stunde), chemischer Umsetzung in einem Reaktor und spektroskopischer Detektion im Durchfluß geführt, die anderen Analysenverfahren in vieler Hinsicht überlegen sind.

Die Möglichkeiten der Chemie innerhalb dieser Analysenmethodik sind bei weitem noch nicht ausgeschöpft und werden in den nächsten Jahren sicher zu weiteren interessanten Entwicklungen führen.

Übersichtsarbeiten und Monographien, die sich mit post- und prä-chromatographischen Umsetzungen beschäftigen, sind in der Tab. 2 zusammengestellt.

Das Kapitel 5 dieses Buches behandelt in ausführlichen Zusammenstellungen analytischer Einzelheiten die wichtigsten beschriebenen Anwendungen aus diesem speziellen analytischen Gebiet chromatographischer Analytik.

Tab. 2

Monographien (M) und Übersichtsarbeiten (Ü) zur Derivatisierung in der Chromatographie

Autor	Thema (Titel)	Lit.
AHUJA	Chemical derivatisation for the liquid chromatography of compounds of pharmaceutical interest (Ü)	(2)
BLAU, KING	Handbook of derivatives for chromatography (M)	(8)
ETTRE	Selective detection in column chromatography (Ü)	(27)
FREI, SCHOLTEN	Reaction detection in HPLC (Ü)	(32)
JUPILLE	UV-visible absorption derivatization in liquid chromatography (Ü)	(59)
LAWRENCE	Fluorimetric derivatization in high-performance liquid chromatography (Ü)	(78)
LAWRENCE, FREI	Chemical derivatisation in liquid chromatography (Ü)	(79)
ROSS	Pre-column derivatisation in high-performance liquid chromatography (Ü)	(104)
SCHWEDT	Liquid column chromatography with chemical derivatizations after separation (Ü)	(133)

2. Allgemeine Grundlagen - Aufbau von Reaktionsdetektoren

Zusammenfassung

Im folgenden Kapitel wird ein Reaktionsdetektor als Analysensystem aus chemischem Reaktor mit Durchfluß-detektor für den direkten Anschluß an eine Säulen-Chromatographen definiert.

Die drei unterschiedlichen Reaktortypen -offenes oder gepacktes Reaktionsrohr sowie Mischspiralen-Reaktionseinheit mit luftsegmentierten Flüssigkeitsströmen- werden vorgestellt und in ihrem Aufbau beschrieben.

In den allgemeinen Betrachtungen wird auf die Rolle der Reagenzienförderung für die Pumpentechnik, den Verlauf der Mischungsvorgänge sowie auf Einflüsse des chromatographischen Eluentenstromes auf den Reaktionsablauf im Reaktor eingegangen.

KONZENTRAT

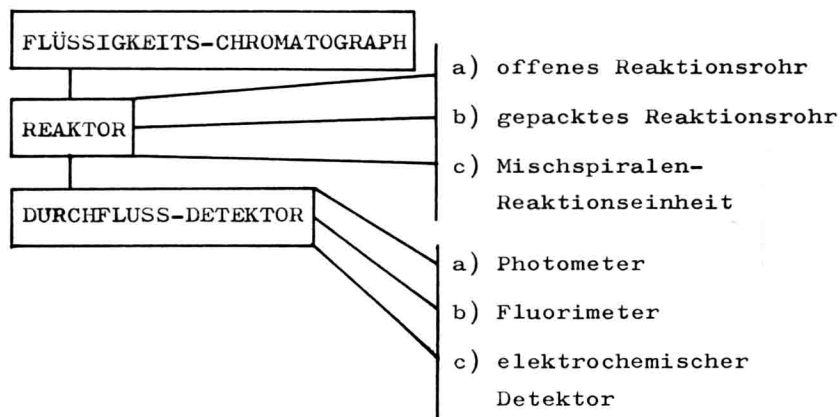
Definition CHEMISCHER REAKTIONSDETEKTOR. Reaktortypen: offenes Reaktionsrohr, gepacktes Reaktionsrohr, Mischspiralen-Reaktionseinheit. Fördertechniken für den Reaktor. Mischungsvorgänge. Einflüsse des Eluenten auf Reaktionsabläufe im Reaktor.

Analysensysteme, welche flüssigkeits-chromatographische Trennungen in Säulen mit chemischen Umsetzungen nach der Trennung im Durchfluß verbinden, bestehen aus einem (Hochdruck-) Flüssigkeits-Chromatographen, einem chemischen Reaktor und einem Durchflußdetektor (Abb. 2).

Abb. 2

Analysensystem aus Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph, chemischem Reaktor für Derivatisierungen nach der chromatographischen Trennung und Durchflußdetektor.

(nach SCHWEDT 1979b -(133)-)



CHEMISCHER REAKTIONSDETEKTOR = REAKTOR + DURCHFLUSSDETEKTOR

Der Eluentenstrom aus der Säule wird mit geeigneten Reagenzien bzw. deren Lösungen vermischt, gegebenenfalls erwärmt, um die Reaktion zu beschleunigen, und dann in einen konventionellen Durchfluß-Detektor geführt.

Im Englischen ist für den Teil des Analysensystems aus Reaktor und Durchfluß-Detektor die Bezeichnung "reaction detector" (s. z.B. SNYDER 1976 -(119)-) gebräuchlich. Im Deutschen hat sich die entsprechende Übersetzung (chemischer) REAKTIONSDETEKTOR durchgesetzt.

Die für die Umsetzungen erforderlichen Reaktoren können in drei unterschiedlichen Formen aufgebaut sein:

1. als offenes Reaktionsrohr (tubular reactor; capillary tube; reaction coil)

Der Kapillarausgang der LC-Säule wird über ein T-Stück mit einem weiteren Kapillarrohr verbunden, durch welches die Reagenzlösung mit Hilfe einer separaten Pumpe gefördert wird. Die Umsetzung erfolgt in einem weiteren Kapillarrohr, das direkt mit dem Eingang des Durchflußdetektors verbunden ist. Alle Verbindungen lassen sich bei Verwendung von Stahlkapillaren über totvolumenarme Schraubkupplungen (z.B. "Swagelok"-Kupplungen) herstellen. Aber auch Teflonschläuche mit entsprechenden Kunststoffkupplungen (z.B. OMNIFIT-Teile) lassen sich hier einsetzen.

2. als gepacktes Reaktionsrohr (packed reactor; bed reactor)

Die chromatographische Trennsäule ist mit einer weiteren Säule verbunden, deren Packung aus Materialien besteht, die keine retardierende Wirkung auf die vorher getrennten, zu derivatisierenden und zu bestimmten Substanzen besitzt. Als Packungsmaterialien werden vorwiegend inerte Glaskugeln verwendet. Zur Förderung der Reagenzienlösungen sind Hochdruckpumpen häufig erforderlich.

3. als Mischspiralen-Reaktionseinheit mit luftsegmentierten Flüssigkeitsströmen (air segmented reactor; segmented flow reactor)

Die Mischspiralen-Reaktionseinheit hat ihren Ursprung in den AutoAnalyzern^R der Firma Technicon. Die Mischspiralen (mixing coils) bestehen aus spiralförmig ge-

wickelten Glasrohren. Je nach Reaktion werden mehrere von ihnen über sogenannte Nippel (aus Teflon) und/oder kurze Schlauchstücke miteinander verbunden. Sollen mehrere Lösungen vor einer Mischspirale zusammengeführt werden, so bedient man sich sogenannter "Cactus"-Verbindungen (s. Abb. 3).

Dem Eluentenstrom aus der LC-Säule wird Luft zugeführt, so daß der gesamte Flüssigkeitsstrom im Reaktor segmentiert wird (Abb. 4). Vor dem Eintritt in die Zelle des Durchflußdetektors wird die Luft mit Hilfe eines Entlüfters ("debubbler") wieder entfernt.

Zur Förderung der Flüssigkeiten wird eine peristaltische Schlauchpumpe eingesetzt, welche durch die Durchflußzelle des Detektors eine geringere Flüssigkeitsmenge pro Zeiteinheit pumpt als die Summe aller Flüssigkeitströme aus Eluentenstrom und Reagenzienlösungen beträgt. Auf diese Weise wird die Luft zusammen mit einem Anteil an Flüssigkeit (etwa 30 bis maximal 50 %) über den Entlüfter abgeschieden, so daß keine Luftblasen die Messung in der Detektorzelle stören. (Es werden auch AutoAnalyzer-Systeme ohne Entfernung der Luft beschrieben, die sich einer elektronischen Unterdrückung der Signale bedienen, die durch Luftblasen im Flüssigkeitsstrom hervorgerufen werden.)

Dieser Reaktor zeichnet sich allgemein durch seine besondere Flexibilität im Aufbau aus:

Anwendung von Mischspiralen in verschiedenen Größen mit Heiz- oder Kühlmantel, Kombinationsmöglichkeiten zwischen Mischspiralen, d.h. einfache Anwendung von Reaktionen aus mehreren Reaktionsschritten, Einsatz einer peristaltischen Pumpe im Vergleich zu mehreren und teuren Hochdruckpumpen.

Die Einzelteile für Mischspiralen-Reaktoren sind im

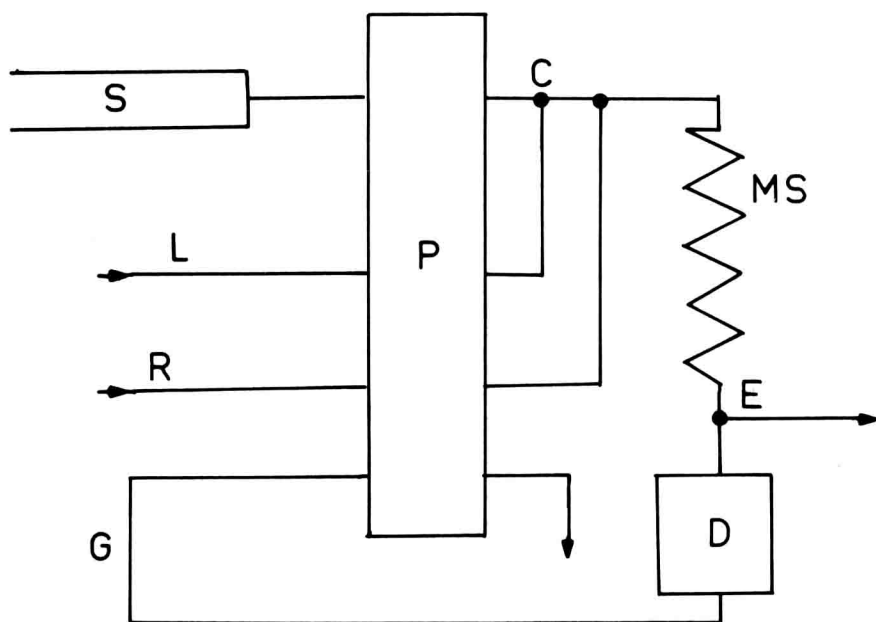


Abb. 3

Schematischer Aufbau eines Reaktionsdetektors mit
Mischspiralen-Reaktionseinheit

S: chromatographische Säule, P: peristaltische Pumpe,
L: Luftschlauch, R: Reagenzschlauch, G: Gesamtförder-
schlauch, C: Verbindungsteil für Schläuche, "Cactus",
MS: Mischspirale (mixing coil), D: Durchflußdetektor,
A: Abfluß der gemessenen Lösung, E: Entlüfter (debubbler).

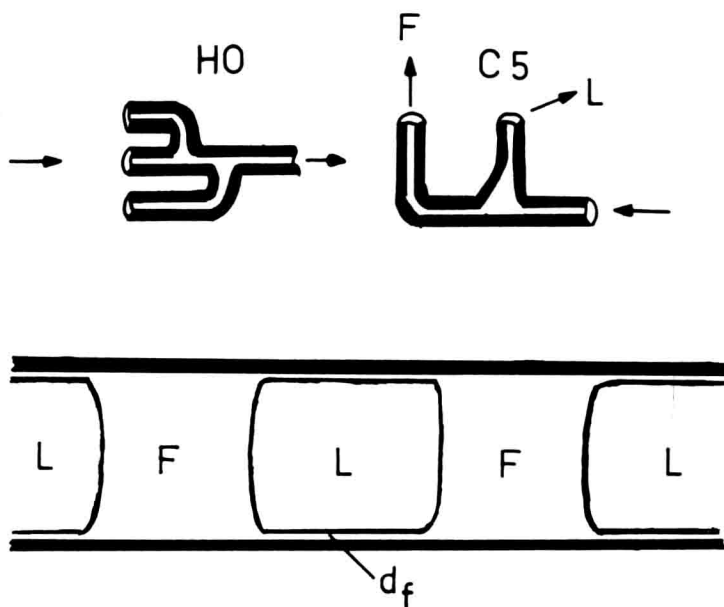


Abb. 4

Glasteile und Prinzip der Segmentierung in einer
Mischspiralen-Reaktionseinheit

Glasteile: HO - "Cactus" zur Verbindung mehrerer Schläuche,
C5 - Entlüfter (debubbler), F: Flüssigkeitsstrom, L: abge-
trennte Luft.

Segmentierung: L: Luftblase, F: Flüssigkeitssegment,
 d_f : Dicke des stationären Flüssigkeitsfilmes an der
Innenwandung des Glasrohres.

Handel als Einzelteile zu den Technicon-AutoAnalyzern über verschiedene Firmen erhältlich (z.B. Fa. Kleinfeld, Hannover; Fa. Biotechnik, Hamburg).

Die folgende Tab. 3 gibt eine Zusammenstellung der für die verschiedenen Reaktortypen erforderlichen Teile und Geräte.

Tab. 3

Bausteine der verschiedenen Reaktoren

<u>Reaktortyp</u>	<u>Pumpe</u>	<u>Bausteine des Reaktors</u>
<u>offenes Reaktionsrohr</u>	Hochdruck-pumpe	Kapillarrohr (Stahlrohr, Teflonschlauch), "Swagelok" -Verbindungen,* Kunststoffschraubverbindungen (OMNIFIT-Teile).
<u>gepacktes Reaktionsrohr</u>	Hochdruck-pumpe	Stahlrohr (-säule), inerte (silanisierte Glaskugeln als Packungsmaterialien, "Swagelok" -Verbindungen.*
<u>Mischspiralen-Reaktionseinheit</u>	peristaltische Pumpe	Mischspiralen aus Glas (oder Teflonschlauch, gewickelt), Misch- und Verbindungselemente (Kakteen), Verbindungsstücke aus Teflon (Nippels), Entlüfter (Debubblers), Pumpenschläuche.

* oder "Miconns", s. Trenncassetten für die HPLC-Technologie und Anwendung, E. OELRICH in: KAISER u. OELRICH (60)

Vier wesentliche Gesichtspunkte bestimmen die allgemeinen Betrachtungen zur Anwendung der verschiedenen vorher beschriebenen Reaktortypen (s. auch SNYDER 1976 -(119)-):

1. die Art der Förderung von Reagenzien bzw. Lösungen
2. der Verlauf der Mischungsvorgänge
3. der Reaktionsablauf bzw. dessen Bedingungen
4. die Effekte der Dispersion (d.h. Bandenverbreiterung im Reaktor) (s. Kap. 3)

zu 1.:

Von der Fördertechnik, d.h. von der für den Reaktor eingesetzten Pumpe, wird verlangt, daß sie in der Lage ist, konstante Mengen der Lösungen kontinuierlich dem Eluentenstrom zuzuführen. Das Verhältnis aus Eluenten- und Reagenzienstrom muß konstant bleiben, ansonsten können Schwankungen in der Signalhöhe, Verzerrungen der Bandenform, Veränderungen des Detektorrauschens und eine Drift der Basislinie auftreten.

Wegen der Druckverhältnisse im offenen (Kapillar)-Reaktionsrohr sowie auch im gepackten Kapillarrohr sind hier in der Regel (Hoch)druckpumpen, meist die gleichen wie für die HPLC, erforderlich. Für die Mischspiralen-Reaktionseinheit wird eine peristaltische Schlauchpumpe mit einem Schlauchbett für mehrere Pumpenschläuche wie in den AutoAnalyzern eingesetzt. Die Stabilität der Schlauchmaterialien begrenzt den Einsatz an Lösungen und Lösungsmitteln.

zu 2.:

Besonderes Augenmerk wird in einer Reihe von Arbeiten über Reaktionsdetektoren auf die Verbindungen von Eluenten- und Reagenzienstrom gerichtet (s. auch in:

FREI u. SCHOLTEN 1979 -(32)-). Es gilt die Forderung, daß der Mischvorgang zwischen Eluent und Reagenz vor Beendigung der Reaktion und/oder vor Eintritt des zu messenden Reaktionsgemisches in die Durchflußzelle abgeschlossen sein muß (s. auch SNYDER 1976). Die Mischvorgänge in unsegmentierten Flüssigkeitsströmen verlaufen bei sehr geringem Innendurchmesser der Reaktionsrohre meist sehr langsam.

zu 3.:

Die mobile Phase des Trennsystems hat in vielen Fällen einen erheblichen Einfluß auf die Kinetik und den Reaktionsablauf organisch-chemischer Reaktionen. Bei fluorimetrischer Detektion treten außerdem häufig fluoreszenzmindernde Effekte durch Lösungsmittel der mobilen Phase auf (s. auch in SCHWEDT 1980a -(135)-). In vielen Fällen sind jedoch mehrere chromatographische Systeme (z.B. anstelle einer Reversed-phase-Chromatographie mit wäßrigen Lösungen Adsorptions-Chromatographie oder Chromatographie an chemisch-gebundenen Phasen mit organischen Lösungsmitteln) für ein gegebenes Trennproblem geeignet (s. für Steroide: SCHWEDT u. REH -(137)-).

Die Beeinflussung der chemischen Derivatisierung nach einer flüssigkeits-chromatographischen Trennung in einer Säule stellt trotzdem die wesentlichste Einschränkung für chemische Reaktionsdetektoren dar, die in der DC kaum eine Rolle spielt.

zu 4.:

Die physikalischen Gesetze der Dispersion, d.h. der Diffusionseffekte und damit verbundenen Bandenverbreiterung von der Säule eluierter Substanzen, in einem chemischen Reaktor für die verschiedenen Reaktortypen werden im folgenden Kap. 3 behandelt.