

Anleitung HPLC

Assistenten: Agni Gavriilidou HCI E 330, 2 47 83,
agni.gavriilidou@org.chem.ethz.ch
Katharina Root HCI D 325, 3 91 64,
katharina.root@org.chem.ethz.ch

1. Theorie

Die Trennung verschiedener Komponenten beruht auf unterschiedlichen physikalischen oder chemischen Eigenschaften, im Allgemeinen in der Verteilung zwischen zwei Phasen, in der Beweglichkeit innerhalb einer Phase, in der Permeabilität etc.

Zur Einführung sollen die Seiten 1-17 aus dem Kapitel 1 „Das Chromatogramm“ von D. Stauffer aus dem Buch *„Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishand - buch für die HPLC und GC*, Herausgegeben von Stavros Kromidas und Hans-Joachim Kuss, 2008, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN: 978-3-527-31774-5“ gelesen werden. Das Kapitel ist auf www.analytik.ethz.ch zu finden. Das benötigte Passwort wird vom Assistenten im Voraus per Mail bekannt gegeben. Damit an den Versuchstagen effizient gearbeitet werden kann, ist eine seriöse Vorbereitung notwendig.

2. HPLC-Gerät

HPLC ist eine Methode der Flüssigkeits-Chromatographie, bei der die Trennung unter hohem Druck (bis 300 bar bei einem Fluss von typischerweise 1 ml/min) abläuft. Die am häufigsten verwendeten stationären Phasen sind Silicagel (Normalphasen-HPLC) oder Silicagel modifiziert mit langen Alkylketten (Umkehrphasen-HPLC). Die Partikelgrösse beträgt 1.7-5 μm . Damit sind theoretische Trennstufen von bis zu $N = 100'000$ möglich.

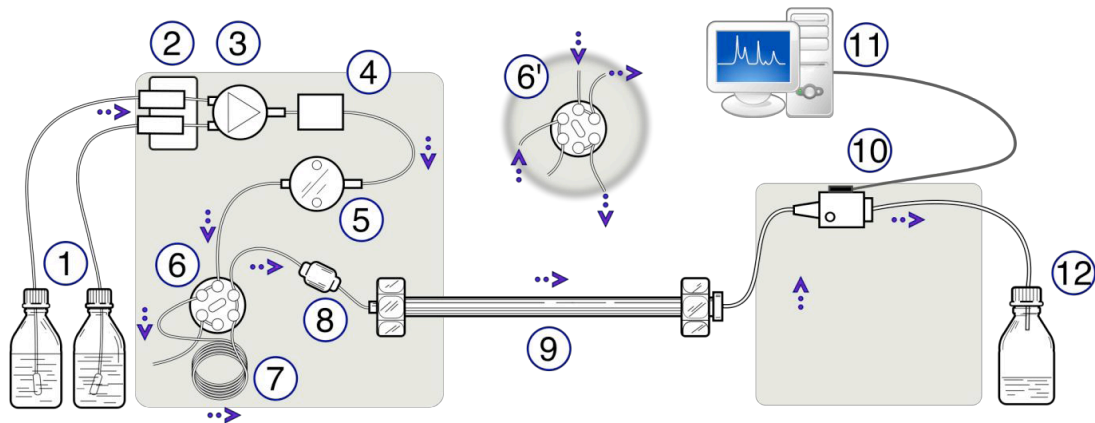


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer HPLC Apparatur. 1 Laufmittelreservoir, 2 Laufmittel Degasser, 3 Ventil zum Einstellen des Gradienten, 4 Mischgefäß für Bereitstellung der mobilen Phase, 5 Hochdruckpumpe, 6 und 6' Sechskanalventil in „Inject“- respektive „Load“-Position, 7 Probenschleife, 8 Vorsäule, 9 Trennsäule, 10 Detektor, 11 Datenaquisition, 12 Abfall. (Graphik von Radbound University, Bioorganic chemistry, Nijmegen).

Silicagel ist eine polare stationäre Phase. Somit sollte für eine gute Trennung eine apolare mobile Phase verwendet werden (z.B. Heptan, Dichlormethan). In Fall der Umkehrphasen-HPLC ist das Silicagel chemisch modifiziert: Durch die Modifikation erhält man eine apolare Oberfläche.

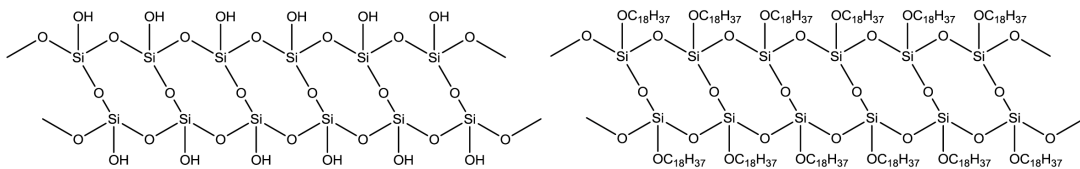


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Säulenmaterials einer Normalphasen (links) und einer Umkehrphasen-Trennsäule (rechts).

Deshalb sollte bevorzugt eine polare mobile Phase verwendet werden (Methanol, Aceto-nitril, Wasser). Die Polarität der mobilen Phase kann über das Mischungsverhältnis zweier oder mehrerer Lösungsmittel kontinuierlich verändert werden. Der Einfluss der Laufmittel-Polarität wird in Aufgabe 1 aufgezeigt.

2.1 Der verwendete Chromatograph

Das im Praktikum verwendete System des Herstellers Shimadzu besteht aus mehreren separaten Komponenten:

System Controller SCL-10A. Dieser Teil des Systems steuert die anderen Komponenten. Es ist möglich, das System manuell oder über die

Software zu steuern.

Der **Diode Array Detector SPD-M 10A vp** besteht aus vielen, gleichzeitig arbeitenden Dioden, die elektromagnetische Strahlung feststellen können. Jede Diode misst die Intensität innerhalb eines Spektralbereiches von 2 nm Breite. Man kann also gleichzeitig das ganze Spektrum im Bereich von 190–800 nm messen. Es gibt drei Möglichkeiten, Messresultate zu visualisieren:

- 1) Chromatogramm bei einer bestimmten Wellenlänge
- 2) Maximum-Absorbance-Chromatogramm – maximale Extinktion gemessen für jede Substanz im angegebenen Bereich
- 3) 3D-Chromatogramm – Zusammenfassung aller Chromatogramme im angegebenen Bereich.

Der **Liquid Chromatograph LC-10AT vp**. In diesem Geräteteil befindet sich das eigentliche Herzstück des Trennsystems, die Säule mit der stationären Phase. Dazu gehört auch das Injektionsventil mit einem maximalen Probenvolumen von 20 µl (wie bei unserem Versuch).

Der **Degasser DGU-14A** reduziert gelöste Luft in der mobilen Phase, verhindert Luftblasen und Unregelmässigkeiten in der Basislinie.

Die **Vacuum Pump VCV-10AL vp** saugt und mischt die Laufmittelkomponenten, kontrolliert die Flussgeschwindigkeit. Das Laufmittel kann aus maximal vier Komponenten zusammengesetzt werden. Erst nach dem Mischen wird das Laufmittel unter Druck gesetzt. Pumpenparameter kann man manuell oder via Software einstellen. Der Druck sollte 200 bar nicht überschreiten. Wenn der Druck zu hoch oder zu niedrig ist, wird die Pumpe automatisch abgeschaltet. Wichtig: In den Kapillaren vor der Pumpe dürfen sich keine Luftblasen befinden, ansonsten muss die „Purge“-Prozedur durchgeführt werden.

Der **Autosampler SIL-10A vp** ermöglicht das automatisierte Einspritzen der vorbereiteten Probe. Zudem werden die Proben auf einer konstanten Temperatur gehalten um den Einfluss von Temperaturschwankungen zu minimieren.

3. Aufgaben

3.1 Einfluss der Laufmittelzusammensetzung: Qualitative Interpretation des Chromatogrammes einer homologen Phenon-Reihe

Vorgehen: Eine verdünnte Lösung von Acetophenon, Propiophenon, n-Butyrophenon und n-Valerophenon in Acetonitril : Wasser (1:1) steht zur Verfügung. Konzentration 100 mg/L.

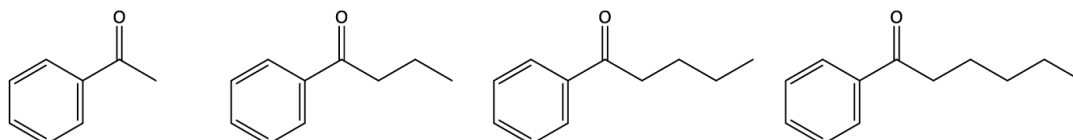


Abbildung 3: Von links: Acetophenon, Propiophenon, Butyrophenon und Valerophenon.

Der Chromatograph kann mit unterschiedlichen Säulen bestückt werden. Der Einfluss auf das Trennverhalten der folgenden Parameter wird untersucht:

- Laufmittelzusammensetzung (ACN:H₂O, 50:50, 80:20, 95:5)
- Flussrate (0.5 mL/min, 0.75 mL/min, 1 mL/min)
- Partikelgröße (3mm, 5mm)

Die folgenden Kombinationen sollen bei 250 nm gemessen werden:

Tabelle 1: Zusammenstellung der zu untersuchenden Trennparameter.

| 5 µm Säule | | 3 µm Säule | |
|---|--------------------|---|--------------------|
| Lösungsmittelverhältnis [ACN : H ₂ O] | Flussrate [mL/min] | Lösungsmittelverhältnis [ACN : H ₂ O] | Flussrate [mL/min] |
| 50 : 50 | 0.5 | 50 : 50 | 0.5 |
| | 0.75 | | 0.75 |
| | 1 | | 1 |
| 80 : 20 | 0.5 | 80 : 20 | 0.5 |
| | 0.75 | | 0.75 |
| | 1 | | 1 |
| 95 : 5 | 1 | 95 : 5 | 1 |

Auswertung: Die Chromatogramme werden von Hand ausgewertet und zusammen mit dem Bericht abgegeben. Auf den Chromatogrammen werden die verwendeten Wendetangenten eingezeichnet und die Basispeakbreite (in cm) ausgemessen und in eine zeitliche Peakbreite umgerechnet. Weiter werden folgende chromatographischen Parameter berechnet: Retentionszeit, Nettoretentionszeit, Kapazitätsverhältnisse, relative Retentionen, Trennstufenzahl, Auflösung. Dabei wird folgende Annahme getroffen: $V_0 = 1$ mL bei einer Flussrate von 1mL/min.

Diskussion: Besprechen sie anhand der gemessenen chromatographischen Parameter die Eigenheiten der Trennung. Bestimmen und begründen sie die optimalen Parameter für das vorliegende Trennproblem.

3.2 Quantitative Bestimmung von Acetophenon mittels internem Standard

Vorgehen: Je eine Stammlösung von Acetophenon und Propiophenon stehen zur Verfügung. Die Konzentration beträgt jeweils 10 mg/L in einem 1:1-Gemisch von Acetonitril und Wasser. Der Assistent bereitet eine Acetophenonlösung mit unbekannter Konzentration (=Analyt) zu. Um die Konzentration von Acetophenon zu bestimmen, werden von den Studenten in Messkolben von 10 mL Inhalt drei Kalibrationslösungen mit unterschiedlicher Konzentration von Acetophenon- aber konstanter Konzentration von Propiophenon hergestellt. Die drei Kalibrationslösungen und der Analyt werden mittels HPLC quantifiziert. Die Trennung wird mit den in Aufgabe 3.1 bestimmten optimalen Trennparametern vorgenommen. Sämtliche Messungen werden dreifach durchgeführt.

Tabelle 2: Konzentrationen von Acetophenon und Propiophenon

| Messlösung | cAcetophenon [µg/L] | cPropiophenon [µg/L] |
|------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | 20 | 20 |
| 2 | 40 | 20 |
| 3 | 60 | 20 |
| Analyt | unbekannt | 20 |

Auswertung: Die Flächenintegrale der Acetophenon- und Propiophenonpeaks stehen über den Faktor f in Beziehung:

$$\frac{A_{\text{Acetophenon}}}{A_{\text{Propiophenon}}} = f \cdot \frac{C_{\text{Acetophenon}}}{C_{\text{Propiophenon}}} \quad (1)$$

Der Faktor f wird durch die Auswertung der Chromatogramme der Lösungen 1-3 bestimmt. Durch Anwendung dieses Faktors auf die Chromatogramme des Analyten kann die unbekannte Konzentration von Acetophenon bestimmt werden.

Diskussion: Nach der Bestimmung der Acetophenonkonzentration kann beim Assistenten die tatsächliche Konzentration eingesehen werden. Im Bericht werden die beiden Konzentration verglichen. Allfällige Fehlerquellen werden identifiziert und diskutiert.

3.3 Quantitative Analyse von Koffein in Energy-Drinks oder ähnlichen Getränken

Vorgehen: Es wird eine Kalibration mit fünf Koffein-Konzentrationen im Bereich von 0.01-0.1 mg/mL erstellt. Die drei mitgebrachten Proben (Kaffee ohne Milch und Zucker, Energy-Drinks, Cola, o.ä.) werden von jedem Studenten separat aufbereitet und mittels Autosampler analysiert. Als Methode wird ein Gradient von 10% ACN auf 70% ACN verwendet. Die Analysesequenz wird zusammen mit dem Assistenten erarbeitet. Jede Probe und Kalibrationslösung wird dreimal eingespritzt und bei einer Wellenlänge von 270 nm detektiert.

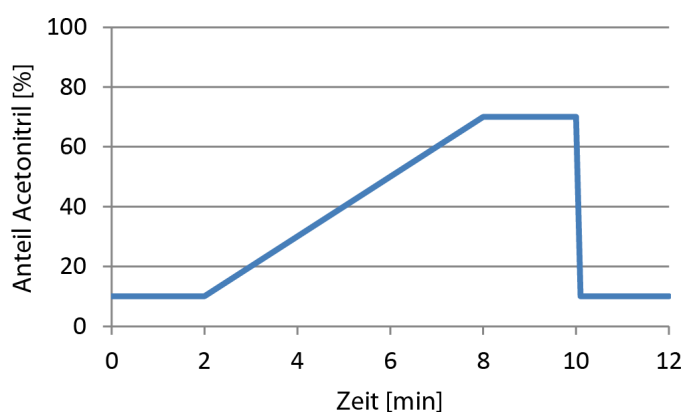


Abbildung 4; Lösungsmittelgradient der Methode für die Koffeinquantifizierung.

Die koffeinhaltigen Getränke werden zum Entgasen geschüttelt, anschliessend durch einen 0.45 mm Cellulosefilter filtriert und anhand der vom Hersteller deklarierten Koffeinmenge verdünnt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die verdünnte Konzentration dem gewählten Kalibrationsbereich entspricht.

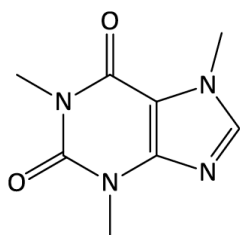


Abbildung 5: Strukturformel von Koffein.

Auswertung: Die Kalibrationsgerade wird berechnet. Die Koffein-Konzentrationen der Proben werden durch Vergleich des Integrals mit der Kalibrationsgerade bestimmt. Mithilfe des verwendeten Verdünnungsfaktors kann die tatsächliche Konzentration berechnet werden. Der Messfehler wird mithilfe der Student-t-Verteilung bestimmt.

Diskussion: Es soll der gemessene Wert in Bezug zur Herstellerangabe gesetzt werden. Mögliche Fehlerquellen sollen eruiert und besprochen werden. Ebenfalls sollen mögliche Verbesserungen im Analyseprotokoll beschrieben werden.