

Grundpraktikum Analytische Chemie II (Modul BC 5.1)

Kapillargaschromatographie

Aufgabe: Erlernen der Funktionsweise und Anwendungsgebiete eines Gaschromatographen sowie die qualitative und quantitative Untersuchung verschiedener Analysenproben mit Hilfe der Gaschromatographie

Betreuer: Dipl.-Chem. Jan Grüneberg
Institut für Anorganische und Analytische Chemie, LB Bioorganische Analytik
Lessingstraße 8, Raum 3.06
Tel.: 9-48177
E-Mail: jan.grueneberg@uni-jena.de

Dipl.-Biol. Johannes Frenkel
Institut für Anorganische und Analytische Chemie, LB Bioorganische Analytik
Lessingstraße 8, Raum 3.02
Tel.: 9-48178
E-Mail: johannes.frenkel@uni-jena.de

1. Einleitung und Zielstellung

Seit Einführung der Kapillarsäulen ist die Gaschromatographie (GC) eine wichtige und leistungsfähige Methode zur Analyse komplexer, komponentenreicher und isomerer Gemische geworden. Die Kapillarsäulen-GC zeichnet sich durch hohe Trenneffizienz aus und erlaubt Trennungen von Gemischen mit mehr als hundert Komponenten. Moderne Entwicklungen, wie die flash- oder fast-GC, sind auf eine drastische Verkürzung der Analysenzeiten auf wenige Minuten gerichtet. Bei Wahl einer geeigneten Probeninjektion, eines optimalen Phasensystems und eines genügend empfindlichen Detektors ist die Kapillar-GC eine der wichtigsten Methoden in der Spurenanalytik organischer Verbindungen und stellt in DIN-Vorschriften, wie z. B. Bestimmung von Leichthalogenkohlenwasserstoffen (LHKW) oder Bestimmung von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Trinkwasser, die bevorzugte analytische Methode dar. Durch Probenvorbereitung und Probeninjektion mit Robotern und Autosamplern kann ein hoher Automatisierungsgrad erreicht werden.

Mit der GC können nur flüchtige Verbindungen untersucht werden. Als Faustregel gilt: Die GC ist für Verbindungen geeignet, die bei Normaldruck noch unzersetzt destillierbar sind. Das sind im Wesentlichen nur die unpolaren bis mäßig polaren Verbindungen. Schwerflüchtige organische Verbindungen wie Zucker oder Aminosäuren können jedoch mittels geeigneter Derivatisierungsreagenzien leicht in Derivate guter Flüchtigkeit überführt und somit der GC-Analyse zugänglich gemacht werden.

Durch Kopplung mit einem massenselektiven Detektor (GC/MS) oder einem IR-Detektor (GC/IR) wird die GC auch in weit verbreiteten Methoden für die *qualitative Analyse* unbekannter Stoffe und Stoffgemische genutzt. Dabei wird die ausgezeichnete Trennleistung der GC mit dem hohen Informationsgehalt des Massen- bzw. IR-Spektrums verbunden.

Durch Kopplung mit einem Headspace-sampler (*HS-GC*) wird das Anwendungsgebiet der GC auf die Bestimmung von Analyten aus flüssigen und festen Proben ohne aufwendige Probenvorbereitung beträchtlich erweitert.

Inhalte des Grundpraktikums Kapillar-Gaschromatographie sind:

1. Aufbau eines Gaschromatographen, Einstellung, Messung und Kontrolle wichtiger Geräteparameter.
2. Untersuchungen zum Einfluss der Geräteparameter auf das chromatographische Verhalten
3. Kriterien für die Auswahl optimaler Trennbedingungen und Prinzipien zur Optimierung einer GC-Analyse
4. Methoden der qualitativen Analyse bekannter und unbekannter Verbindungen in Stoffgemischen
5. Quantitative Analyse mittels internem bzw. externem Standard.

2. Aufbau eines Gaschromatographen

Den prinzipiellen Aufbau eines Gaschromatographen vermittelt Abb. 1.

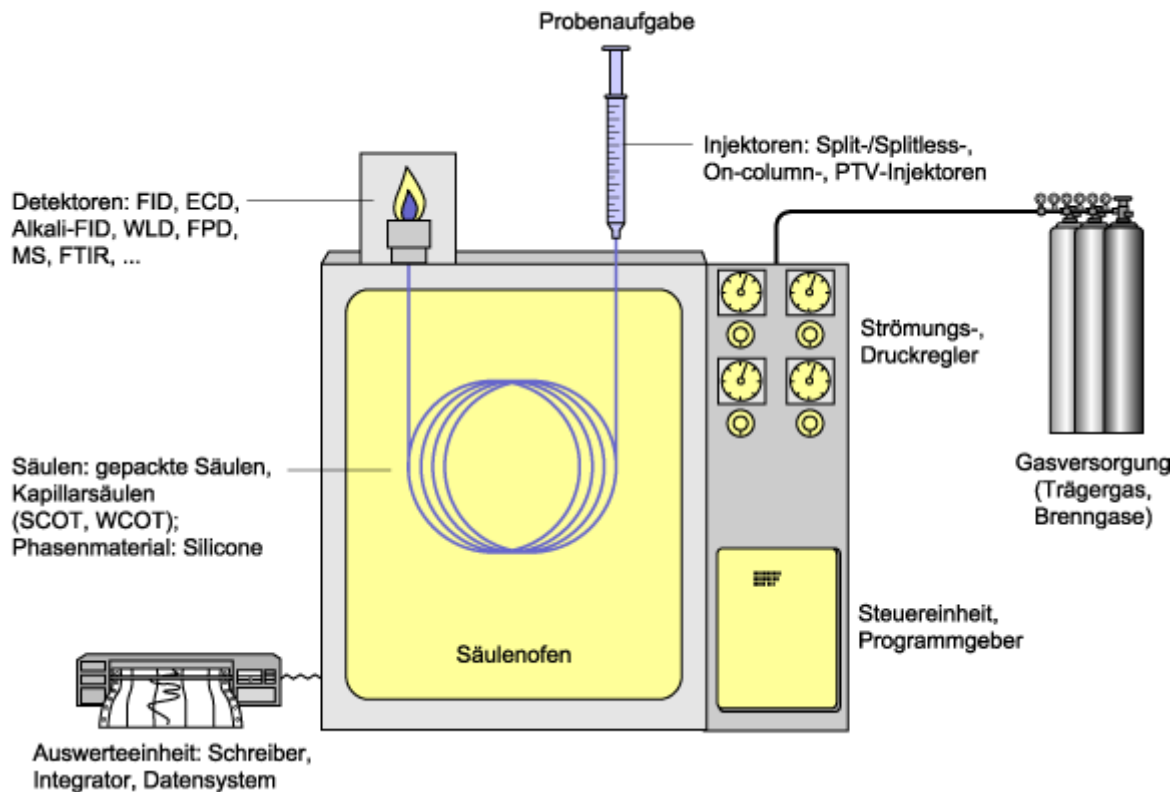


Abb. 1: Funktionsbild eines Gaschromatographen (Quelle: Roempp online 3.0, 07/07)

Die wichtigsten Bauteile eines Gaschromatographen unter Berücksichtigung der Ausstattung des Praktikumsgerätes GC-Autosystem von Perkin-Elmer sind:

- Gasversorgungseinrichtung: Trägergas He, Gase für den Betrieb des Flammenionisationsdetektors (FID): H₂ und Luft.
Die Gase müssen in hoher Reinheit vorliegen (5.0, d.h. 99.999 % rein oder besser).
- Probeninjektionssystem: Split-/Splitloser Injektor (s. Abb. 2) mit manueller Injektion
- Säulenofen: Programmierbar für verschiedene Temperaturprogramme
- Kapillarsäule zur Probenauftrennung
- Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID) (s. Abb. 4)
- Datenauswertung über PC (z. B. TotalChrom von Perkin-Elmer)

Im Folgenden wird die Funktionsweise der relevanten einzelnen Einheiten erläutert und auf die Theorie der GC eingegangen.

Probeninjektionssysteme und Probeninjektion

Die Dosierung von Gasen und Lösungen flüssiger und fester Proben erfolgt manuell oder mittels Autosampler. Die Probe wird mit einer Mikroliterspritze durch ein Septum in das Verdampferrohr (Liner, Insert) injiziert. Auch wenn sich das relativ einfach anhört, ist die Probenaufgabe die häufigste Quelle für fehlerhafte GC-Analysen. Ursachen der Fehlerquellen sind:

- Handhabung und Genauigkeit der Mikroliterspritze; Es werden in der Regel sehr geringe Dosiervolumina (0,1 – 5 μL) injiziert.
- Unvollständige Verdampfung der höher siedenden Komponenten im Injektor
- Teilweise oder vollständige Zersetzung von Analyten bei der gewählten Injektortemperatur
- Adsorption von (vorwiegend polaren) Substanzen an der aktiven Innenwand oder am Füllstoff des Verdampferrohres; Die Peaks zeigen in diesem Fall ausgeprägtes Tailing.

Ziel ist es zu Beginn der Chromatographie am Kopf der Kapillar-Trennsäule eine möglichst enge Probenzone zu schaffen. Die Probenaufgabe im Splitmodus mit dem von GROB entwickelten **Split-/Splitlosen Injektor** (siehe Abb. 2) ist die am häufigsten angewendete Probeninjektionstechnik. Im heißen Injektor wird die Probe schnell verdampft und der Injektorblock wird währenddessen vom Trägergas durchspült. Der größere Teil des Gasstroms verlässt den Detektor über ein regelbares Ventil nach außen und nur der kleinere Teil gelangt auf die Kapillarsäule. Typische Splitverhältnisse liegen im Bereich von 1:10 bis 1:100, diese Werte können bei stark konzentrierten Proben allerdings noch erhöht werden. Nachteilig bei dieser Injektion sind auftretende Diskriminierungseffekte. Flüchtigere Stoffe eines Analytgemischs mit großem Siedepunktsbereich werden leichter über den Split nach außen befördert als die schwer flüchtigen Komponenten. Diese wiederum können sich leichter an der Innenwand absetzen. Die normierten Peakflächenverhältnisse entsprechen dann nicht mehr der Stoffzusammensetzung in der Injektionslösung.

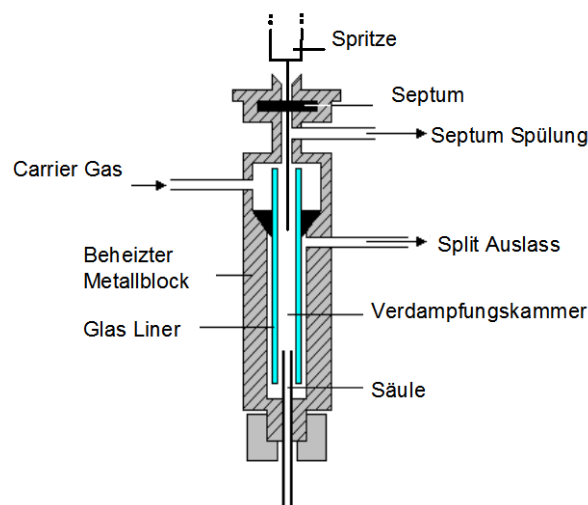


Abb. 2: Split-/Splitloser Kapillarsäuleninjektor

Allgemeine Regeln für die Split-Injektion:

- ⇒ Zu hohe Injektortemperaturen vermeiden (in der Regel 200-250 °C; bis auf wenige Ausnahmen immer unter 300 °C).
- ⇒ Bei *quantitativen* Analysen Standardaddition oder Methode mit internem Standard und Autosamplung wählen
- ⇒ Wahl eines geeigneten Splitverhältnisses unter Berücksichtigung der folgenden Richtwerte:

Säulennendurchmesser ID [μm]	150	250	320	530
Mindestverhältnis	1:80	1:40	1:10	1:5
Maximalverhältnis	1:1000	1:200	1:100	1:30

In der Spurenanalytik findet die **splitlose** Injektionstechnik Anwendung, um Verluste zu vermeiden. Dabei wird bei der Probeninjektion zunächst für eine gewisse Zeit (meist eine Minute) der Split geschlossen gehalten, wobei der größte Teil der Probe auf die Kapillarsäule gelangt. Danach wird der Split wieder geöffnet.

Weitere häufig verwendete Injektionstechniken sind (s. auch Abb. 3):

- Headspace bei der die Gasphase analysiert wird, die eine Probe in einem geschlossenen System umgibt
- cool on column (Injektion direkt *in* die Säule)
- Kaltaufgabesysteme mit temperaturprogrammierter Verdampfung

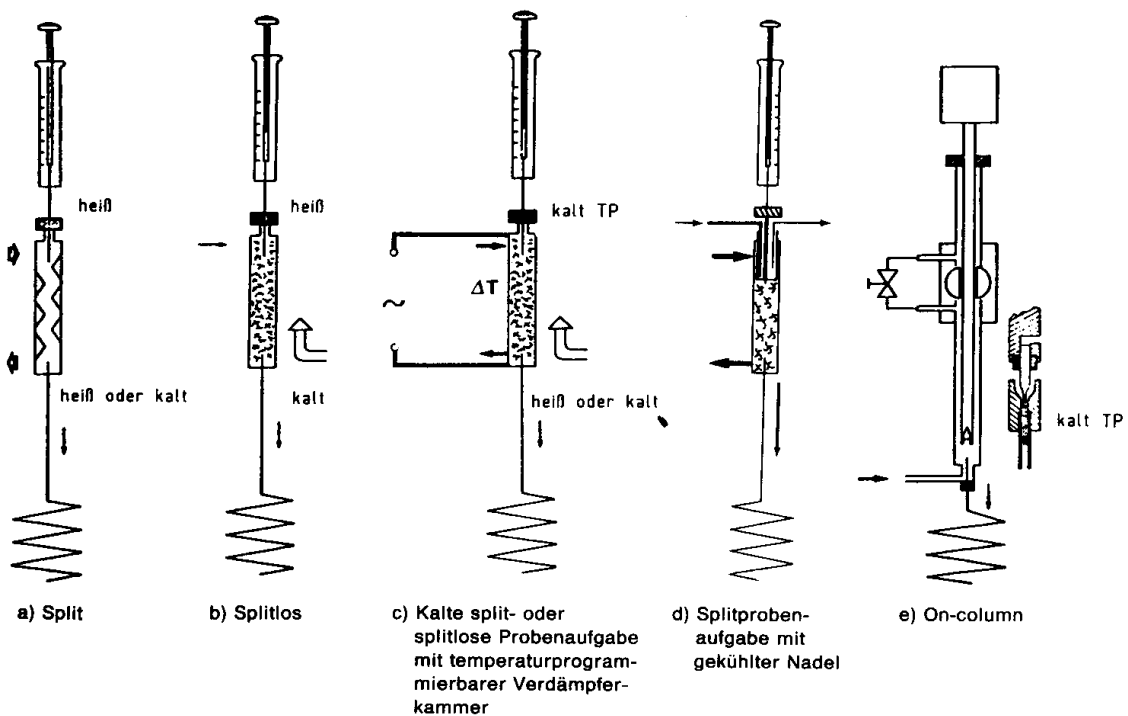


Abb. 3: Einige Injektionstechniken in der Kapillar-Gaschromatographie.

Phasensystem

Das Phasensystem ist die Kombination von mobiler Phase (Trägergas), stationärer Phase (Säulenmaterial) und Temperatur.

Trägergas

Das Trägergas stellt die mobile Phase in der GC dar, es werden hauptsächlich He, H₂, N₂, Ar, Ar/CH₄(V/V=95/5) verwendet.

In der mobilen Phase finden folgende Vorgänge statt:

- Verdampfung des Analytgemisches im Probeninjektor, Splitten der verdampften Probe und Transport der Komponenten zur und durch die Säule
- Verteilungsvorgänge der Analyten zwischen dem Trägergas und der stationären Phase (Flüssigkeit)
- Nachweis der getrennten Substanzen im Detektor

Im Unterschied zur HPLC beeinflusst die mobile Phase, wegen der vernachlässigbar kleinen Wechselwirkung der unpolaren Gasmoleküle mit der Probe, die Selektivität wenig. Daher wird die Selektivität und damit die Trennung des Analytgemisches in der GC nahezu ausschließlich von der stationären Phase in Verbindung mit einem geeigneten Temperaturprogramm bestimmt. Vergleiche: Selektivität in der HPLC wird vorwiegend durch die Optimierung der mobilen Phase (Eluent) erreicht.

Stationäre Phase

In der analytischen GC werden vorwiegend *Film-Kapillarsäulen*, sog. WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) von 5 – 100 m Länge verwendet. Die meisten Kapillarsäulen bestehen aus gesintertem Quarz (*Fused Silica*, FS-Säulen) und sind zur Stabilität mit Polyimid beschichtet. Bei den WCOT-Säulen haftet die stationäre Phase als dünner Film (Schichtdicke $d_f = 0,1$ bis einige μm) an der Innenwand einer dünnen Quarzröhre. Da diese stationäre Phase nur einen verschwindend kleinen Teil des Säuleninnendurchmessers einnimmt, haben die Kapillarsäulen einen offenen Längskanal und eine hohe Permeabilität.

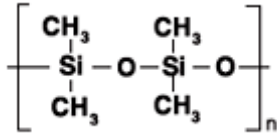
Die stationäre Phase ist eine Flüssigkeit und ist in der Regel zur Steigerung der Stabilität vernetzt oder mit der Wand der Kapillare chemisch verbunden. Solche sog. *immobilisierte Säulen* sind widerstandsfähig gegen höhere Temperaturen und Lösungsmittel. Während des Betriebs mit einer intakten Säule wird wenig Säulenmaterial freigesetzt, was sich durch das Auftreten von Geisterpeaks bemerkbar machen würde (Bluten, *bleeding*).

Die Verwendbarkeit der Kapillarsäulen richtet sich nach der

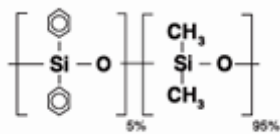
- maximalen Säulentemperatur
- Verträglichkeit mit der Probe und dem Lösungsmittel
- Möglichkeit der Gleichgewichtseinstellung der Probenmoleküle zwischen der stationären und mobilen Phase. Die Probenmoleküle müssen eine bestimmte Löslichkeit in der stationären Phase besitzen. Es gilt die Regel: *Gleiches löst sich in Gleichem!*

Häufig verwendete stationäre Phasen:

Methyl-, Vinyl-, Phenyl- oder Cyanopropyl substituierte *Polysiloxane* sind die am häufigsten eingesetzten Säulenmaterialien. Die Substituenten bestimmen die Polarität der Kapillarsäule.



unpolarste Polysiloxansäule: 100 % Methyl (Bezeichnung: OV1, DB1, HP1); Universell einsetzbare Phase zur Trennung von Aminen, Aromen und Duftstoffen, PAHs, PCBs, Pestiziden und Phenolen. Diese Phase wird in der Praxis jedoch fast nur noch in der Petrochemie eingesetzt.



mittelpolare Polysiloxansäule: 95 % Methyl, 5 % Phenyl (Bezeichnung BP5) oder 94 % Methyl, 5 % Phenyl, 1 % Vinyl (Bezeichnung: DB5, Se54, HP5); Standardphase mit breiter Anwendbarkeit zur Trennung von z.B. Pharmazeutika, Aminen, Herbiziden, Aromen, PAHs, PCBs, Pestiziden und Phenolen



polare Polysiloxansäule: 50 % Methyl, 50 % Cyanopropyl (Bezeichnung: BP225)

Hauptsächlich zur Zuckeranalytik

Hier sind nur drei Beispiele genannt, die Kombinationsmöglichkeiten mit verschiedensten Substituenten sind groß.

- *Polyethylenglykole*

sehr stark polare Säulen (Bez.: Carbowax M20, DB WAX)

- *Cyclodextrine mit variablen Additiven*

Zur Trennung von enantiomeren Gemischen (z.B. Lipodex, Cyclodex)

Kenngrößen von Kapillarsäulen

Die Einteilung von Kapillarsäulen erfolgt nach verschiedenen Kenngrößen:

- nach dem *Innendurchmesser ID*

microbore Kapillarsäulen ID: 0,05 - 0,15 mm

normale Kapillarsäulen ID: 0,2 - 0,35 mm

widebore Kapillarsäulen ID: > 0,4 mm (meist 0,53 mm für on-column Injektion)

Regel: Die chromatographische Auflösung nimmt mit abnehmendem ID zu, die Beladbarkeit jedoch ab. Letztere wird außerdem noch von der Filmdicke bestimmt.

- nach dem *Phasenverhältnis* β

Das Phasenverhältnis β stellt das Verhältnis der Volumina von mobiler (V_M) zu stationärer (V_S) Phase in der Säule dar (Gl. 1).

$$\beta = \frac{V_M}{V_S} \quad (1)$$

Da bei Kapillarsäulen der Innendurchmesser ID sehr viel größer als die Schichtdicke d_f der stationären Phase ist, gilt für die Berechnung von β in guter Näherung Gl. 2.

$$\beta = \frac{ID}{4 \cdot d_f} \quad (2)$$

d_f Schichtdicke

- | | | | |
|---|---------------|---------|-----------|
| - | Dünnsäulen: | β | > 300 |
| - | Normalsäulen: | β | 150 - 300 |
| - | Dicksäulen: | β | < 150 |

Die Belastbarkeit der Säule (maximal mögliche Probenmenge, die die chromatographische Auflösung nicht beeinträchtigt) ist umgekehrt proportional zum Phasenverhältnis β .

⇒ Für schwerflüchtige Stoffe, die relativ spät eluieren, kann die Retentionszeit durch Erhöhung des Phasenverhältnisses β verringert werden. Dies kann durch Verwendung von Säulen mit kleinerer Schichtdicke d_f und/oder durch Erhöhung des Säulendurchmessers (ID) realisiert werden.

⇒ Umgekehrt können für niedrig siedende Analyten die Retentionszeiten durch Verwendung von Säulen mit kleinerem β (größere Filmdicke und/oder kleinerer Säulendurchmesser) vorteilhaft vergrößert werden.

⇒ Ähnliche Veränderungen können auch durch Variation der Säulentemperatur (Ofentemperatur) erreicht werden.

Säulenofen

Der Säulenofen ist ein gut isolierter, beheizter Raum, in dem exakt geregelt Temperaturgradienten mit hohen Genauigkeiten (± 0.1 °C) gefahren werden können. In Standard-Geräten kann im Temperaturbereich zwischen 35 °C und 350 °C gearbeitet werden. Für spezielle Anwendung kann auch eine aktive Kühlung oder höhere Temperaturbeständigkeit wichtig sein.

Detektor

Der Detektor hat die Aufgabe, am Ausgang der Trennsäule die Anwesenheit von Substanzen im Trägergas anzuzeigen.

Das Praktikumsgerät ist mit einem Flammenionisationsdetektor (**FID**) bestückt (Abb. 4). Der FID ist ein nahezu *universeller* Detektor, da er alle CH-Verbindungen anzeigen kann.

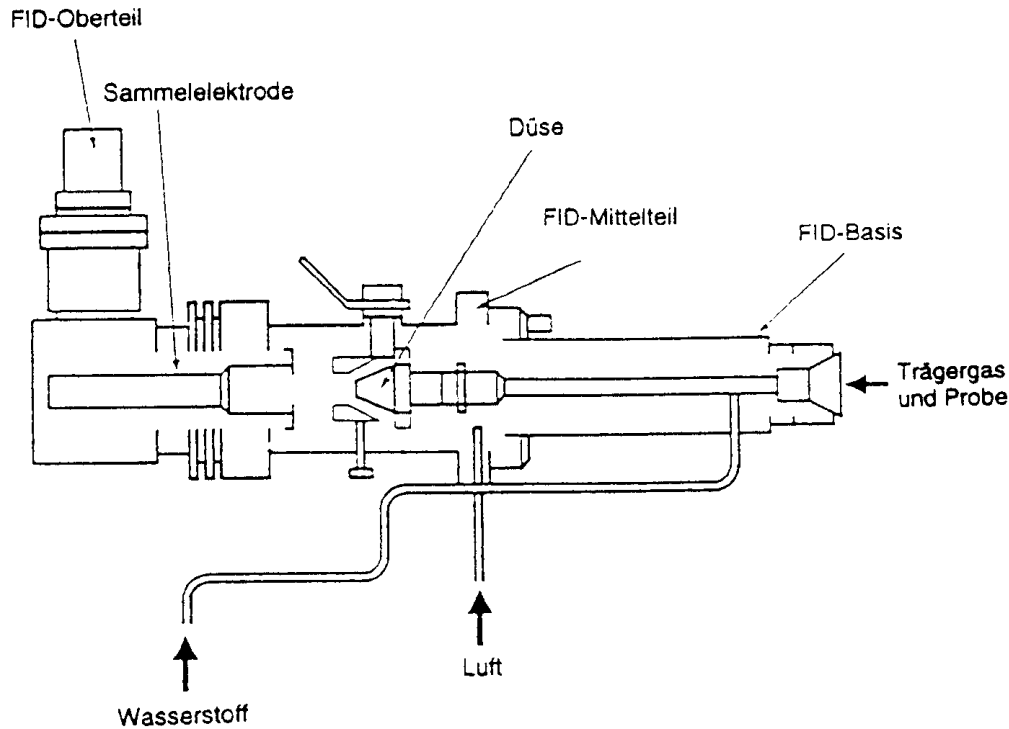


Abb. 4: Aufbau eines FID.

Für den Betrieb des FID werden Wasserstoff (5.0) und (synthetische) Luft benötigt. Das Trägergas wird durch eine Düse in eine Wasserstoffdiffusionsflamme geführt. Oberhalb der Düse ist, elektrisch isoliert, eine Kollektorelektrode angebracht, die auf einem negativen Potential von ca. 300 V gehalten wird. Gelangt ein Analyt in die heiße Flamme, erfolgt die Verbrennung der organischen Verbindungen, wobei intermediär positiv geladene Ionen entstehen.

Reaktionen im FID

Bildung von Pyrolyseprodukten: $\text{CH}_3^\circ, \text{CH}_2^\circ, \text{CH}^\circ, \text{C}^\circ$

Bildung von angeregten Radikalen: $\text{O}_2^*, \text{OH}^*$

Ionisierung: z. B. $\text{CH}_2^\circ + \text{OH}^* \rightarrow \text{CH}_3\text{O}^{*+} + \text{e}^-$

Infolge der Spannung gelangen die positiv geladenen Ionen zur Kollektorelektrode und werden dort entladen. Dadurch fließt ein Strom im pico-Amperbereich, der proportional zur Probenmenge in der Flamme ist. Die Signalintensität ist in erster Linie proportional zur Menge an Kohlenstoff, die durch den Detektor fließt.

Spezifische Detektoren haben oft eine höhere Empfindlichkeit, sind jedoch nur für bestimmte Substanzgruppen geeignet, Tab. 1 vermittelt einen Überblick über die wichtigsten GC-Detektoren. Massenselektive (MSD) und FTIR-Detektoren liefern außer der Retentionszeit und Peakfläche auch strukturanalytische Informationen und sind daher die Detektoren der Wahl für qualitative Analysen (Peakidentifizierung).

Detektor	Verwendung	Selektivität Element/Kohlenstoff	linearer Bereich	Nachweisgrenze pg Substanz
FID	unspezifisch		10 ⁷	10
NPD (P-Mode) (N-Mode)	organische P-Verbindungen organische N-Verbindungen	10 ⁵ 10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴	0,5–5 1–10
FPD (P-Mode) (S-Mode)	organische P-Verbindungen	10 ⁵ 10 ⁴	10 ⁴ nicht linear dynamisch 10 ³	10 100
ECD	mehrfach halogenierte organische Verbindungen		10 ³ –10 ⁴	0,1–1
PID	aromatische Verbindungen funktionelle Gruppen			1–10
ELCD	halogenierte Verbindungen organische N-Verbindungen organische S-Verbindungen	10 ⁵ 10 ⁴	dynamisch: 10 ⁶ 10 ⁴	0,1–1 4 2
MSD SCAN SIM EI	Strukturaufklärung selektiv einstellbar für Einzelverbindungen			1000
SIM CI				1–10 0,1–1
AED	elementspezifisch für C, H, N, O, S, P, Si, F, Cl, Br, J, Sn, Hg	>10 ⁴		abhängig vom Element S: 10 N: 200 Cl: 500
IRD	Strukturaufklärung selektiv für funktionelle Gruppen			5000

Tab. 1: Überblick über die wichtigsten GC-Detektoren (NPD - nitrogen phosphorous detector; FPD - flame photometric detector; ECD - electron capture detector; PID - photoionization detector; ELCD - electrolytic conductivity detector; MSD - mass sensitive detector; AED - atom emission detector; IRD - infrared detector)

Infolge der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Detektoren können sehr unterschiedliche Chromatogramme der gleichen Probe erhalten werden, wie die Paralleldetektion einer Umweltprobe nach Stromteilung des Eluats am Säulenausgang zeigt (Abb. 5). Mit dem FID werden bevorzugt die Alkane detektiert, die chlorierten Biphenyle (PCB) werden mit hoher Effizienz vom ECD detektiert. Dieser Detektor besitzt für Substanzen mit hoher Elektronenaffinität (Halogenkohlenwasserstoffe, Aromaten) eine gegenüber dem Flame Ionisation Detector (FID) bis zu 10³ höhere Empfindlichkeit.

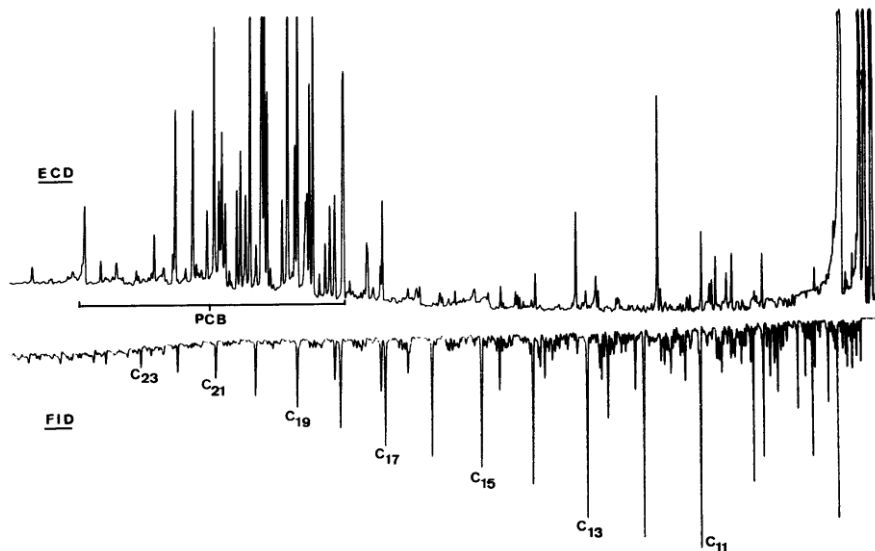


Abb. 5: Bestimmung von PCB in Altöl durch Paralleldetektion mit FID und ECD (Säule: OV1, L = 25 m, ID: 0,32 mm, $d_f = 0,2 \mu\text{m}$, TG: H_2 , Temperaturprogramm: 50 – 300 °C, 8 °C/min)

Wichtige Kenngrößen sind der *lineare* und *dynamische* Arbeitsbereich des Detektors. Linearität liegt vor, wenn die Signalintensität proportional der Analytkonzentration ist. Im dynamischen Bereich erzeugt eine Konzentrationsänderung eine Änderung der Signalintensität. Wird bei Konzentrationserhöhung keine Intensitätserhöhung beobachtet, liegt *Sättigung* vor. Der FID verfügt über einen dynamischen Bereich von 10^7 , Sättigungseffekte treten daher selten auf.

Neben der Linearität und Selektivität stellt die *Empfindlichkeit S* eine weitere wichtige Kenngröße des Detektors dar. Bei der Ermittlung der Empfindlichkeit ist der generelle Typ des Detektors zu berücksichtigen:

Der FID gehört zu den **massenstromempfindlichen** Detektoren. Bei ihnen wird die Signalintensität (A) bestimmt von der *Masse* (m) des Analyten, die pro Zeiteinheit (t) durch den Detektor fließt ($A \sim dm / dt$).

Zur **Ermittlung der Empfindlichkeit** wird das Detektorsignal auf die Analytkonzentration des Peaks (c_m) bezogen. Diese entspricht dem Verhältnis der Masse des Analyten (m_A) zum Peakvolumen (V_P), s. Gl. 3.

$$c_m = \frac{m_A}{V_P} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] \quad (3)$$

Gl. 4 gibt die Formel zur Berechnung des Peakvolumens V_P an.

$$V_P = w_{1/2} \cdot F_c \quad (4)$$

$w_{1/2}$ - Peakbreite in halber Höhe

F_c - Volumenstrom der mobilen Phase, gemessen am Säulenausgang

Empfindlichkeit S eines massenstromempfindlichen Detektors:

$$S = \frac{h_{\max}}{c_m} = \frac{h_{\max} \cdot V_P}{m_A} \left[\frac{mV \cdot mL}{mg} \right] \quad (5)$$

h_{\max} - Peakhöhe im Maximum

Bei den **konzentrationsempfindlichen** Detektoren ist die Signalintensität proportional der Konzentration des Analyten im Detektor ($A \sim dc / dt$). Änderungen der Strömungsgeschwindigkeit bewirken Änderung der Peakfläche. Bei diesen Detektoren ist daher die Einhaltung einer konstanten Strömung des Trägergases wichtig, andernfalls muss bei quantitativen Analysen erneut kalibriert werden. Diese Detektoren verändern die Probe nicht. Daher können solche Detektoren in Reihe mit einem weiteren Detektor (z. B. FID) geschaltet werden. Zu diesem Detektortyp gehört z. B. der ECD.

2. Wichtige Kennzahlen eines Chromatogramms und Parameter zur Säulencharakterisierung

Kenngrößen aus dem Gaschromatogramm

Aus dem fiktiven Chromatogramm einer Probe mit einer bzw. 2 Komponenten sowie einer nicht retardierten Verbindung (Abb. 6) können folgende chromatographische Kennzahlen entnommen werden.

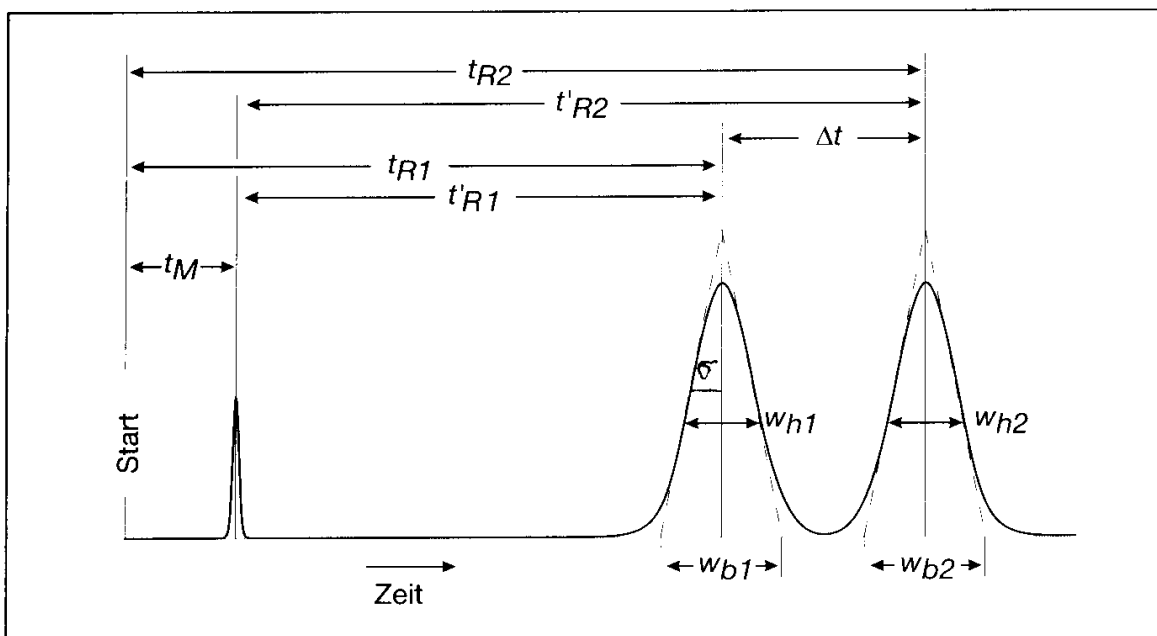


Abb. 6: Fiktives Gaschromatogramm mit einer nicht retardierten Substanz (t_0) und zwei Komponenten (t_{R1} und t_{R2})

Für die Bezeichnung von Größen in der Chromatographie gelten die Empfehlungen der IUPAC (Nomenclature for Chromatography, in *Pure & Applied Chemistry* **65** (1993) 819 – 872).

- **Retentionszeit, t_R**

Die (Brutto-) Retentionszeit t_R ist die Verweildauer einer retardierten Substanz im chromatographischen System. Sie wird in der Zeitskala im Peakmaximum abgelesen.

Die Retentionszeit t_R setzt sich additiv aus der **reduzierten Retentionszeit, t'_R** (Verweildauer des Analyten in der *stationären* Phase), und der **Durchflusszeit, t_M** (Verweildauer in der *mobilen* Phase), zusammen.

$$t_R = t_M + t'_R \quad (6)$$

Bei einem gegebenen Trägergas wird t_R von der Kapillarsäule (Art der stationären Phase, Phasenverhältnis, Säulenlänge, Alterung...), von der Säulentemperatur und der Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases bestimmt.

- **Durchflusszeit (Totzeit, Durchbruchzeit, unretained peak time), t_M**

Die Durchflusszeit ist die Zeit, die die mobile Phase in der Trennstrecke verweilt. Sie wird experimentell mit einer *nicht retardierten* Substanz bestimmt. Diese Substanz darf praktisch nicht in der stationären Phase verweilen und muss detektierbar sein.

$$t_M = \frac{L}{u} \quad (7)$$

L - Säulenlänge

u - durchschnittliche lineare Strömungsgeschwindigkeit (cm/s)

Beispiele für Substanzen zur Bestimmung der Durchflusszeit in der GC sind Methan (Detektor: FID) und Luft (Detektor: WLD)

- **Retentionsfaktor, k** (vormals: Kapazitätsverhältnis k')

Der Retentionsfaktor ist das Verhältnis der Verweildauer einer Substanz in der stationären Phase (t'_R) zur Verweildauer in der mobilen Phase (t_M).

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (8)$$

Der Retentionsfaktor k ist bei einer gegebenen Säule dem *Verteilungskoeffizienten* K direkt proportional (Gl. 4).

$$K = k \cdot \beta \quad (9)$$

β ist das Phasenverhältnis einer Säule (Gl. 1)

Der Retentionsfaktor ist nach Gl. 10 temperaturabhängig. Je höher die Temperatur, desto kleiner ist nach Gl. 8 und Gl. 10 die Retentionszeit t_R .

$$\lg k = \frac{a}{T_c} + b \quad (10)$$

T_c - absolute Temperatur der Säule
 a, b - Konstanten

- **Selektivität, α** (relative Retention)

Die Selektivität α ist das Verhältnis der Verweildauer zweier Analyten 1 und 2 in der stationären Phase und daher das Verhältnis ihrer reduzierten Retentionszeiten. Die später eluierende Komponente (hier Komponente 2) steht im Zähler.

$$\alpha = \frac{t_{R,2}}{t_{R,1}} = \frac{\gamma_2 \cdot p_2^o}{\gamma_1 \cdot p_1^o} \quad (11)$$

p^o - *Partialdampfdrücke* (relative Flüchtigkeit)

γ - *Aktivitätskoeffizienten* als Ausdruck für die Wechselwirkung zwischen den Komponenten mit der stationären Phase.

Diese Wechselwirkung ist umso größer, je ähnlicher stationäre Phase und Analyt sich sind. *Unpolare Stoffe* werden daher auf einer *unpolaren stationären Phase* stärker retardiert als auf einer polaren Phase. Für polare Analyten gilt das umgekehrte.

Zwei Analyten werden nur getrennt, wenn sie unterschiedliche Verweilzeiten in der stationären Phase haben, d. h. wenn $\alpha \neq 1,0$ ist. Es ergeben sich somit folgende Möglichkeiten:

⇒ *Trennung nach Unterschieden in der Polarität der Verbindungen*

Stoffe mit gleicher Flüchtigkeit (gleicher Siedepunkt) können getrennt werden, wenn sie unterschiedliche Aktivitätskoeffizienten besitzen (Beispiel: Methanol/n-Hexan).

⇒ *Trennung nach Unterschieden in den Siedepunkten*

Stoffgemische homologer Reihen (gleiche funktionelle Gruppen, ähnliche Aktivitätskoeffizienten) werden in erster Linie nach Unterschieden in den Dampfdrücken (Siedepunkte) getrennt (Beispiel: n-Hexan / n-Heptan).

⇒ *Trennung nach Unterschieden in der Polarität und den Siedepunkten*

Dies trifft für die meisten heterogenen Stoffgemische zu.

- **Peakfläche, A; Peakhöhe h; Peakasymmetrie, A_s**

Die **Peakfläche A** (Area) ist die Fläche unter dem Elutionsprofil. Die Angabe der mit einem Integrator ermittelten Peakfläche erfolgt in *Counts* (Zähleinheiten). Sie ist eine wichtige Kenngröße für quantitative Analysen.

Die korrekte Integration durch das Datenauswertesystem des GC erfordert idealerweise symmetrische Peaks („Gauß-Peaks“). Die Peakbreite in 13,4 % Höhe wird als Peakbreite an der Basislinie (w_b) bezeichnet und ergibt mit den Eigenschaften der Gauß-Verteilung

4σ (σ ist die Standardabweichung). Abweichungen von dieser Idealform werden durch den **Asymmetriefaktor** A_s ausgedrückt, der nach Gl. 12 berechnet wird.

$$A_s = b / f \quad (12)$$

Die Peakbreiten b und f werden in der Regel in 10% der Peakhöhe gemessen (s. Abb. 4).

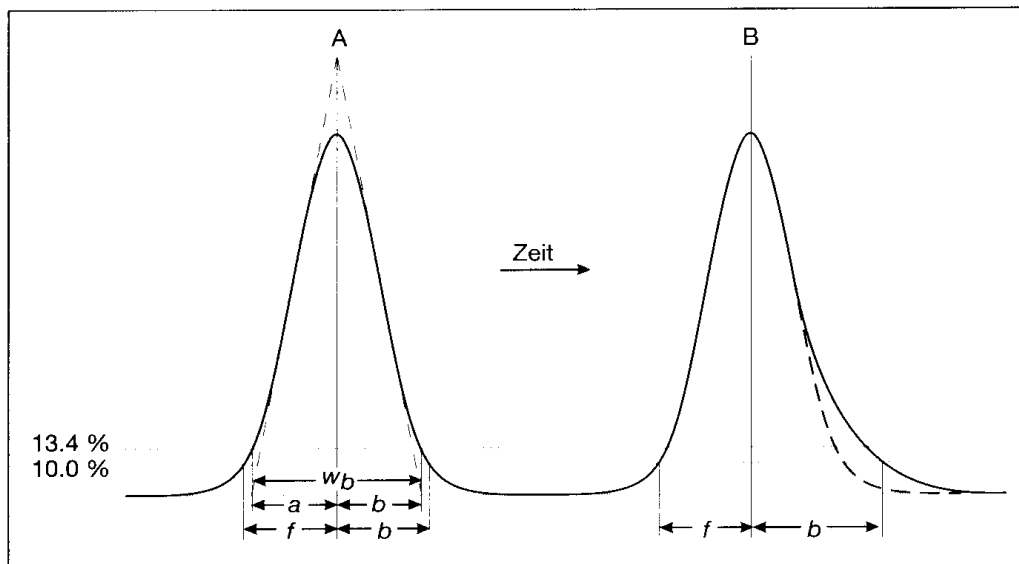


Abb. 7: Chromatogramm mit den Daten für die Berechnung der Peakasymmetrie.

Peaks mit $b > f$ zeigen *Tailing*, mit $b < f$ *Fronting*. Bei ideal symmetrischen Peaks ist $b = f$. Da die korrekte Ermittlung der Peakfläche durch das Datenauswertesystem von der Symmetrie der Peaks bestimmt wird (Festlegung der Integrationspunkte nach dem Anstieg der Basislinie am Peakanfang und -ende), ist in der Validierung einer GC-Methode der Grenzwert für die Peakasymmetrie festzulegen.

Die **Peakhöhe** h ist der Abstand zwischen Basislinie und Peakmaximum. Die Peakhöhe wird bei Anwendung des FID geräteseitig in mV angegeben. Die Verwendung der Peakhöhe ist in der quantitativen Analyse bei sehr kleinen aber schmalen Peaks, deren Integration nur sehr ungenau erfolgen kann, vorteilhaft.

- **Theoretische Bodenzahl, N; theoretische Bodenhöhe, H**

Die **theoretische Bodenzahl** N bzw. die von der Säulendimension unabhängige **theoretische Bodenhöhe** H (von **HETP** = *Height Equivalent to a Theoretical Plate*) ist ein Maß für das Trennvermögen und stellt daher eine wichtige Kenngröße zur Charakterisierung einer Säule dar.

Es ist üblich, mit einem geeigneten Testgemisch die theoretische Bodenzahl für eine neue Säule zu bestimmen und diese Kenngröße mit dem gleichen Testgemisch im Verlauf ihres Einsatzes zu kontrollieren (Erkennung der Alterung und damit Abnahme der Leistungskraft der Säule). Sie ist als wichtige Kenngröße einer Säule in der Methodenvalidierung festzulegen.

Die Ermittlung der theoretischen Bodenzahl **N** erfolgt nach Gl. 13, die streng genommen nur für einen völlig symmetrischen Peak mit einem Asymmetriefaktor von 1,0 gilt.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 = 2 \cdot \pi \cdot \left(\frac{h_p \cdot t_R}{A_p} \right) \quad (13)$$

w_b - Peakbreite (4σ -Breite)
 $w_{1/2}$ - Peakbreite in halber Höhe
 h_p - Peakhöhe im Maximum
 A_p - Peakfläche

Mit Kenntnis von **N** und der Säulenlänge **L** kann die theoretische Bodenhöhe **H** berechnet werden (Gl. 14).

$$H = \frac{L}{N} \quad (14)$$

N stellt keine physikalische Größe dar, sondern resultiert aus der modellhaften Beschreibung des Zusammenwirkens aller peakverbreiternden Prozesse. Gl. 13 wird aus der Standardabweichung σ des Peaks am Säulenausgang abgeleitet. Trennstufenzahl und -höhe sind keine Konstanten für eine Säule, sondern sie verändern sich mit der Retentionszeit. Zum Vergleich der Trennleistung einer Säule ist daher stets die gleiche Verbindung heranzuziehen!

Zur experimentellen Bestimmung von **N** ist die Peakbreite (entweder w_b oder besser in halber Höhe $w_{1/2}$) aus einem gespreizten Peak zu entnehmen. Üblicherweise wird zur Charakterisierung der Trennleistung einer Säule die theoretische Bodenzahl **N** auf die Länge 1 m bezogen (**N/m**).

Die theoretische Bodenhöhe **H** bestimmt im Wesentlichen die Breite eines Peaks, was entscheidend sein kann, ob zwei Analyten getrennt werden können oder nicht.

Folgende Effekte tragen zur Peakverbreiterung bei:

- *Eddy-Diffusion* (A-Term der van-Deemter-Gleichung (Gl. 15), entfällt in Kapillarsäulen).
Peakverbreiterung infolge unterschiedlicher Wege der Substanz im Säulenbett; Sie ist abhängig von der Teilchengröße, aber unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit.
- *Längsdiffusion* (B-Term in der van-Deemter-Gleichung (Gl. 15))
Peakverbreiterung infolge radialer Diffusion der Substanz in der mobilen Phase; Der Anteil am Gesamtwert für **H** ist umgekehrt proportional zur Strömungsgeschwindigkeit *u*.
- *Stoffaustausch* in der mobilen und stationären Phase (C-Term in der van-Deemter-Gleichung (Gl. 15))
Dieser Term beschreibt die statistische Verdünnung der Probenmoleküle in Längsrichtung der Säule. Er ist proportional zur Strömungsgeschwindigkeit *u*.

Der Stoffaustausch in der stationären Phase ist der einzige Effekt, der eine Stofftrennung bewirkt. Da die Probenmoleküle unterschiedlich weit in die stationäre Phase (Hohlräume des porösen Materials bei gepackten Säulen; stationäre Flüssigkeit in Kapillarsäulen) eindringen, tragen sie zur Peakverbreiterung bei. Je tiefer die Moleküle eingedrungen sind, desto länger benötigen sie für den Rücktransport in den sich längs der Säule bewegendem Eluentenstrom.

Summarisch resultieren diese Effekte in der **van-Deemter-Gleichung** (Gl. 15). Sie stellt den Zusammenhang zwischen theoretischer Bodenhöhe (HEPT) und der linearen Strömungsgeschwindigkeit für ein gegebenes Phasensystem dar, $H = f(u)$.

$$\text{HETP} = A + B / u + C \cdot u \quad (15)$$

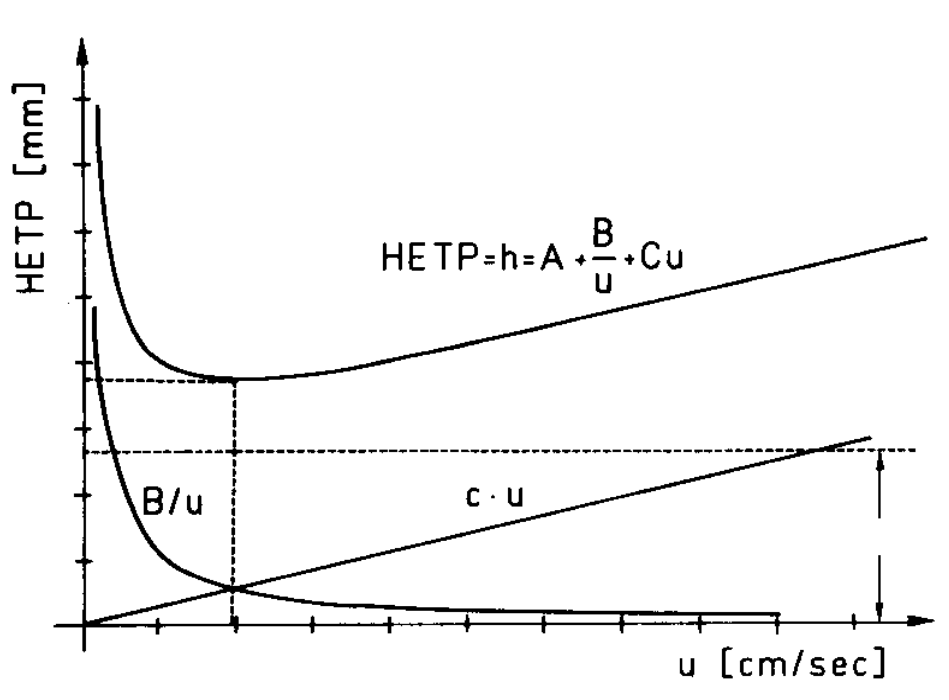


Abb. 8: van-Deemter-Funktion

- **Peakauflösung, R_S**

Die Optimierung der **Peakauflösung R_S** ist eine wesentliche Aufgabe in der Methodentwicklung für eine gaschromatographische Analyse. Daher ist die Kenntnis über die Einflussfaktoren auf R_S von großer Wichtigkeit. Die experimentelle Bestimmung der Peakauflösung R_S erfolgt nach US-Pharmacopeia (USP) nach Gl. 11.

$$R_S = 1,19 \cdot \frac{t_R(2) - t_R(1)}{w_{1/2}(1) + w_{1/2}(2)} \quad (16)$$

Wie aus Abb. 7 ersichtlich, bedeutet $R_S = 1,0$ (4σ -Trennung) eine etwa 94%ige Trennung der beiden Peaks, während bei $R_S = 1,5$ (6σ -Trennung) die Trennung praktisch vollständig erfolgt (Basislinientrennung). Noch größere Werte für R_S sind nicht erstrebenswert, da sie nur unnötig die Analysenzeit verlängern.

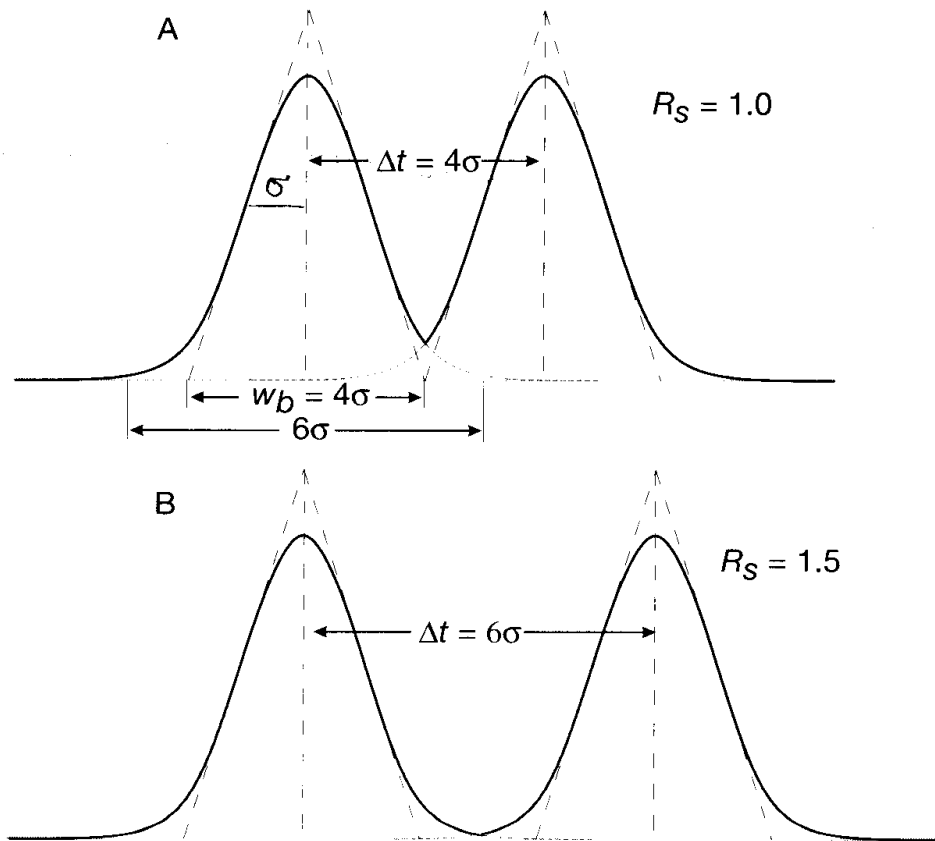


Abb. 9: Peakauflösung $R_S = 1,0$ (oben) und $1,5$ (unten)

Theoretisch lässt sich für die Peakauflösung R_S folgende Beziehung ableiten:

$$R_S = 0,25 \cdot (\alpha - 1) \cdot \frac{k_1}{1 + k_1} \cdot \sqrt{\frac{L}{H}} \quad (17)$$

Die Auflösung ist nach Gl. 17 Produkt aus den folgenden drei Termen:

- *Selektivitätsterm* $\alpha - 1$
Der Selektivitätsterm wird allein durch das Phasensystem bestimmt. Er ist der wichtigste Term bei der Optimierung von R_S , vorwiegend durch Auswahl der optimalen Säule und des optimalen Temperaturprogramms!
- *Kapazitätsterm* $\frac{k_1}{1 + k_1}$
Der Kapazitätsterm hat nur im Wertebereich $0 < k < 5$ einen merklichen Einfluss auf R_S . Die Optimierung von k erfolgt über das Temperaturprogramm.
- *Effektivitätsterm* \sqrt{N}
Der Effektivitätsterm wird durch die Trennstufenzahl N der Säule bestimmt und kann durch Veränderung der Säulenlänge L und der linearen Fließgeschwindigkeit u – Wahl der Fließgeschwindigkeit im Minimum der van-Deemter-Kurve – optimiert werden. Zu beachten ist aber die Wurzelabhängigkeit! Eine Verdopplung der Säulenlänge (erhöhte

Kosten für die Säule, doppelte Analysenzeit) verbessert die Auflösung nur um den Faktor $\sqrt{2}$!

3. Arbeitsweisen bei der GC

- **Säulentemperatur**

Neben der Säulenpolarität stellt die Säulentemperatur den wichtigsten Parameter für eine erfolgreiche Trennung dar, da gemäß Gl. 10 der Retentionsfaktor k durch die Temperatur bestimmt wird. Man unterscheidet:

- *isotherme* Arbeitsweise

Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur über die gesamte Trennperiode; Bei zu niedrig gewählter Ofentemperatur wird die Sättigungskonzentration des Analyten in der mobilen Phase überschritten, die Austauschprozesse verlaufen verzögert ab und es kommt daher zu Peakverzerrungen.

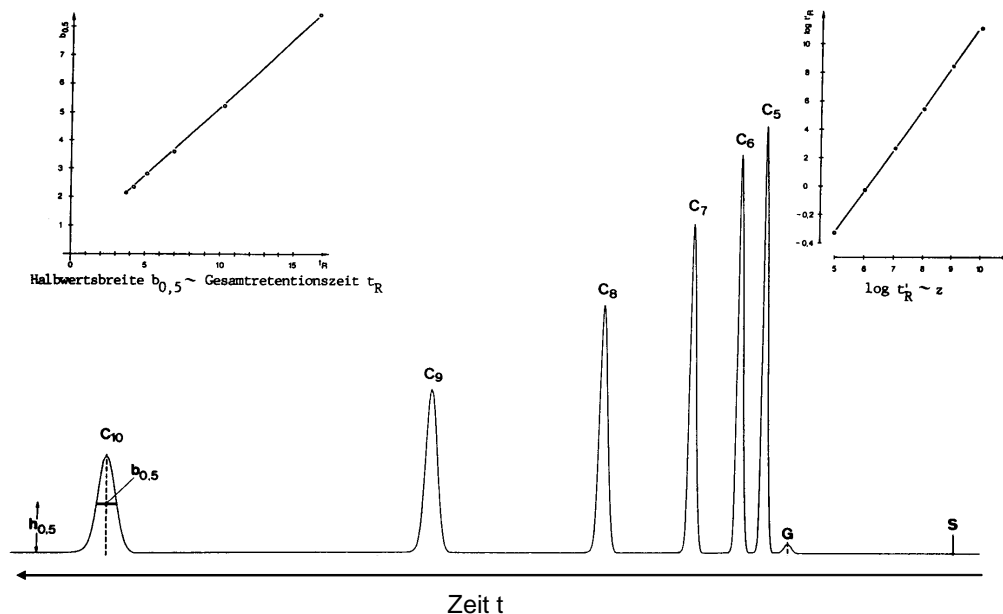


Abb. 10: Isotherme Trennung von homologen n -Alkanen ($C_5 - C_{10}$)

Säule: OV1, $L = 5$ m, i. D. = 0,27 mm, Ofen: 80 °C, TG: H_2 , Detektor: FID.

ACHTUNG: In der Literatur kann die Retentionszeit uneinheitlich von links nach rechts oder rechts nach links ansteigend notiert werden.

- Trennung mit einem *Temperaturgradienten*

Die Säulentemperatur wird nach einem gewählten Ofenprogramm während des Trennprozesses verändert. Neben Heizraten können auch isotherme Schritte im Ofenprogramm enthalten sein.

Wegen der logarithmischen Temperaturabhängigkeit der Siedepunkte werden die Retentionsfaktoren ebenfalls logarithmisch verkürzt.

Ein Beispiel einer GC-Analyse mit Temperaturprogramm zeigt Abb. 10.

Die meisten GC-Analysen erfordern ein angepasstes Temperaturprogramm!

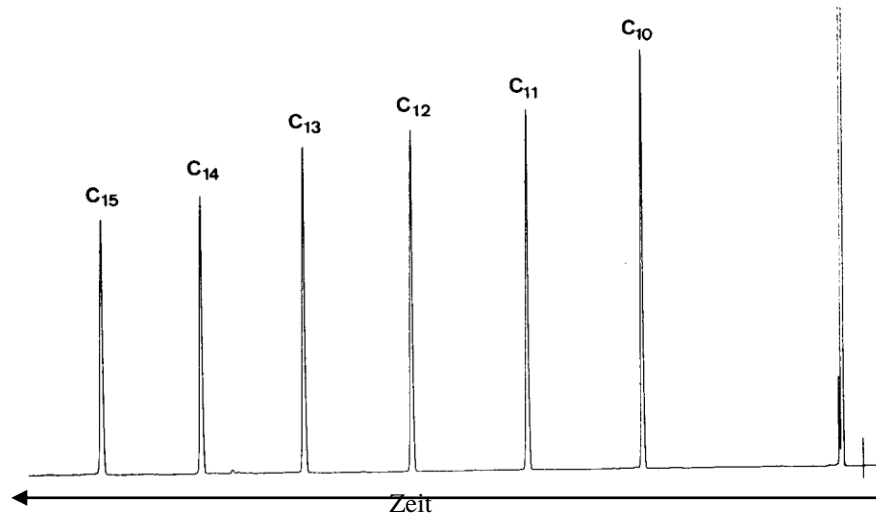


Abb. 11: temperaturprogrammierte Trennung von homologen n -Alkanen
Säule, TG, Detektor: wie Abb. 9, Temperaturprogramm: 28 – 200 °C; 2 °C/min

Einige Vorteile der temperaturprogrammierten Arbeitsweise:

- ⇒ Gemische mit großen Siedepunktsbereichen können in *einem* Arbeitsgang getrennt werden.
- ⇒ Verkürzung der Analysendauer
- ⇒ Durch die Verkürzung der Retentionszeiten werden die Peaks schmaler und besser integrierbar. Die Genauigkeit quantitativer Bestimmungen bleibt somit über das gesamte Chromatogramm nahezu unverändert.
- ⇒ Die Nachweisgrenze bleibt – unabhängig vom Siedepunkt der Analyten – während der Analyse konstant.

Nachteiligerweise ist die temperaturprogrammierte Arbeitsweise häufig mit einem Drift der Basislinie verbunden und vor einem erneuten Lauf ist eine Equilibrierzeit einzuhalten, die in der Methode zu programmieren ist.

4. Qualitative Analyse (Peakidentifizierung)

- **Retentionszeiten**

Die Identifizierung von Substanzen kann über die Retentionszeiten erfolgen: Die Retentionszeit des Analyten wird mit der einer Referenzsubstanz verglichen. Voraussetzung für die Peakidentifizierung über die **absoluten** Retentionszeiten sind völlig gleiche Analysenbedingungen. Dies wird in der Regel nur gewährleistet, wenn entweder die Referenzsubstanz unmittelbar nach der Probe gemessen wird, oder besser noch, wenn die Probe mit der Referenzsubstanz aufgestockt wird (co-Injektion). Im letzteren Fall erfolgt die Identifizierung über die Erhöhung der Intensität des betreffenden Peaks.

Bei größeren Retentionszeiten (> 10 min) ist die Peakidentifizierung über **relative** Retentionszeiten vorzunehmen, da geringfügige Schwankungen über eine Bezugssubstanz (**interner Standard**) korrigiert werden können. Bei sehr komponentenreichen Chromatogrammen mit langer Analysendauer werden zweckmäßigerweise auch mehrere interne Standards hinzugefügt.

• **Retentionsindex I nach KOVATS**

Die Retention einer Substanz wird hierbei auf die Retention der homologen Reihe der *n*-Alkane bezogen, wobei die Bezugssubstanzen entweder der Probe beigemischt oder unter sonst identischen Bedingungen einer getrennten Messung zugeführt werden. Es werden solche *n*-Alkane gewählt, dass die Retentionszeit des Analyten zwischen den Retentionszeiten zweier *n*-Alkane liegt. Voraussetzung ist, dass die *isotherme Arbeitsweise* angewendet wird.

Die Berechnung der Indizes erfolgt nach Gl. 18, veranschaulicht in Abb. 14.

$$I_T^Y = 100 \cdot n + 100 \cdot m \cdot \frac{\lg t'_x - \lg t'_n}{\lg t'_{n+m} - \lg t'_n} \quad (18)$$

- I_T^Y - Kovats-Index in der stationären Phase Y bei der Temperatur T
- n - Zahl der C-Atome des niederen *n*-Alkans
- n+m - Zahl der C-Atome des höheren *n*-Alkans
- x - Analyt
- m - Abstand der Glieder der homologen Reihe
- t' - Nettoretentionszeiten für das Alkan mit n-, n+m-C-Atomen sowie den Analyt x

Kovats-Indices sind für viele relevante Verbindungen tabelliert wurden.

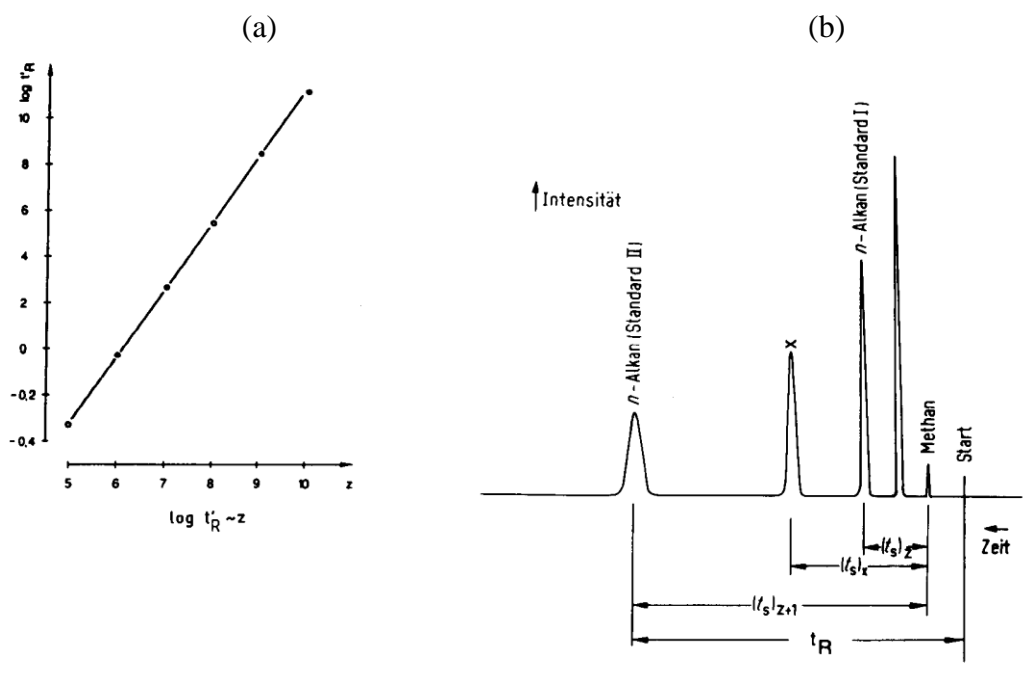


Abb. 12: (b) Chromatogramm zur Bestimmung des Kovats-Index für die Probe x
Die Nettoretentionszeit t_s wird mit Methan bestimmt.

(a) Substanzidentifizierung der Komponenten x aus dem Plot nach Gl. 19.

- **Massen-und IR-Spektren**

Eine sicherere Substanzidentifizierung kann in Kombination mit einer struktur-analytischen Methode (Massen- oder IR-Spektrum) erfolgen. Dabei werden die gemessenen Spektren mit einem Spektrum der Softwarebibliothek verglichen.

5. Quantitative Analyse

Die quantitative Analyse basiert auf der Beziehung zwischen Informationswert (in der Regel die Peakfläche A) und der Konzentration des Analyten. Der Proportionalitätsfaktor ist die Empfindlichkeit, die in der Chromatographie als **Responsefaktor RF** (Kalibrierfaktor) bezeichnet wird.

$$A_i = \frac{c_i}{RF_i} \quad (19)$$

Zur quantitativen GC-Analyse müssen im Kalibrationsschritt die Responsefaktoren für die in der Probe enthaltenen Analyten entsprechend der gewählten Auswertemethode bestimmt werden.

Als Auswertemethode sind üblich:

- **Externer Standard**

Die Kalibrierung erfolgt direkt mit den Analyten i . Mit Proben bekannter Konzentration (c_i) wird der Responsefaktor nach Gl. 20 berechnet.

$$RF_i = \frac{c_i}{A_i} \quad (20)$$

Die Auswertung von Analysenproben erfolgt aus der gemessenen Peakfläche A_i nach Gl. 21.

$$c_i = RF_i \cdot A_i \quad (21)$$

Bei Splitinjektion ist das Auswerteverfahren mit internem Standard wegen der besseren Präzision dem externen Standardverfahren vorzuziehen.

- **Interner Standard**

Diese Methode ist ein *relatives* Auswerteverfahren. Den Kalibrations- und Analysenproben wird stets die genau gleiche Menge einer Standardsubstanz (IS) zugefügt. IS darf nicht in der Probe enthalten sein, außerdem sollte der IS der gleichen Substanzklasse wie der Analyt angehören, sollte etwa in der Mitte im Chromatogramm erscheinen und der Peak des IS darf nicht mit Peaks der Probe interferieren. Für die Ermittlung des Responsefaktors gilt Gl. 22. Analysenproben werden nach Gl. 23 ausgewertet.

Responsefaktor: $RF_i = \frac{c_i \cdot A_{IS}}{c_{IS} \cdot A_i}$ (22)

Analyse: $c_i = \frac{A_i}{A_{IS}} \cdot RF_i \cdot c_{IS}$ (23)

I. Praktikumsaufgaben

Zur Beachtung! Da in der Analytischen Chemie der ordnungsgemäßen Protokollierung die gleiche Bedeutung wie den Messungen zukommt, sollten zunächst folgende feste Parameter **zu Beginn des Protokolls** notiert werden:

- Gerätetyp GC
- Detektor (+ Detektortemperatur)
- Trägergas
- Kapillarsäule (Art, Länge, Innendurchmesser, Filmdicke)
- Datenauswertesystem

Außerdem sollte **bei jeder Messung** folgende Parameter stets im Protokoll angegeben werden:

- Säulenvordruck in kPa
- Injektortemperatur
- Ofen Temperaturprogramm
- Injektionsvolumen in μL
- Splitverhältnis
- Probe
- Probenbezeichnung, die eine eindeutige Zuordnung zu den file-Namen der Chromatogramme erlaubt

Es wird erwartet, dass die erhaltenen Analysenwerte und Ergebnisse jeder Aufgabe diskutiert werden!

Versuch 1

Einstellung und Messung bzw. Ermittlung wichtiger Geräteparameter

1.1 Messung, Einstellung und Überprüfung des Trägergasstromes und Splitverhältnisses

- a. Stellen Sie einen Trägergasstrom von 80 kPa per Hand am Gerät ein. **<CarrierGas>** Überprüfen Sie, ob der Sollwert bei 80 kPa liegt. Falls notwendig am „Carrier Pressure“-Ventil für „Channel 1“ auf den Sollwert einstellen.
- b. Überprüfen Sie das Splitverhältnis und stellen Sie es auf ungefähr 20:1 ein. (Mit Strömungsmessgerät am Säuleausgang den Fluss durch die Säule messen und anschließend den 20-fachen Wert am Splitausgang einstellen (via „Split Flow“-Splitventil für „Channel 1“)
Der Fluss am Säulenausgang ist der Volumenstrom F_c (notieren!).

1.2 Aktivierung der GC-Methode 2 und Einstellung folgender Geräteparameter

Aktivierung der **Methode 2**:

am GC: <Method> ⇒ Setup <ENTER> ⇒ <SET →> „2“ <ENTER>.

Überprüfen der Geräteparameter:

- a. Detektortemperatur (über <Det Temp>) 250 °C
- b. Injektortemperatur (über <Inj Temp>) 250 °C

Wenn eine Detektortemperatur von mindestens 100 °C erreicht ist, kann der FID gezündet werden (Anleitung durch den Assistenten)!

1.3 Software TotalChrom

Die für das Praktikum notwendigen Bedienungsanweisungen werden am Computer vom Assistenten erläutert.

Starten von *TotalChrom* und Aktivierung der Sequenz „**Versuch1.seq**“:

TotalChromNavigator öffnen ⇒ *Einloggen* als Praktikum

<Setup> ⇒ *Browse* Sequenz ⇒ *Praktikum* ⇒ *Gruppe X* ⇒ „**Versuch1.seq**“ ⇒ *Häkchen setzen bei „Supress reports/plots“!* ⇒ <ok>

1.4 Ermittlung der Empfindlichkeit und Nachweisgrenze des FID für Toluol

Ofenprogramm: 40 °C (1,5 min)
Säulenvordruck: 80 kPa
Probeninjektion: 1 µL der Lsg. **T(5 ppm)** (5 ppm Toluol in MeOH)
Ausdruck: gespreizter Maßstab für die Entnahme der erforderlichen Daten

Anweisung für den Chromatogramm-Ausdruck:

<*Chromatograms*> ⇒ <Open> ⇒ *Datei suchen* ⇒ *Peak spreizen* ⇒ *Print*

Bestimmen Sie die Empfindlichkeit S des Detektors für Toluol. Entnehmen Sie die benötigten Daten aus dem Chromatogramm und verwenden Sie Gleichungen 3, 4 und 5. (Hinweise: Der Volumenstrom F_c wurde bereits in 1.1 ermittelt. Berücksichtigen Sie das Splitverhältnis, wenn Sie die tatsächlich auf die Säule gegebene Analytmasse m_A aus der Probenkonzentration bestimmen wollen.) Bestimmen Sie die Analytkonzentration c_m des Toluolpeaks.

Für das Abschätzen der Nachweisgrenze führen Sie eine weitere Messung mit reinem MeOH durch und bestimmen Sie den Wert der Standardabweichung des Rauschens im Bereich der Retentionszeit von Toluol (entnommen aus der 1. Messung). Mit der bereits ermittelten Empfindlichkeit lässt sich nun die Analytkonzentration c_m des kleinstmöglichen, detektierbaren Peaks berechnen: Ein Signal ist erst dann eindeutig als Peak identifizierbar, wenn es den dreifachen Wert der Standardabweichung des Rauschens überschreitet. Bestimmen Sie nun die kleinste detektierbare tatsächliche Toluolkonzentration in ppm (Benutzen Sie das aus der ersten Messung ermittelte Peakvolumen V_p , um die Analytmasse m_A zu erhalten). Beurteilen Sie das Ergebnis!

Versuch 2

Präzision der manuellen Probeninjektion; splitlose Probeninjektion

2. a) Präzision

Sequenz: **Versuch2a.seq**
Probe: **T/IS**
Toluol / interner Standard IS (200 ppm) (IS = *n*-Oktan)
Injektionsvolumen: 1 µL
Ofenprogramm: 40 °C (1,5 min)
Säulenvordruck: 80 kPa
Injektortemperatur: 250 °C

Durchführung: Es werden 5 Messungen mit dieser Probe durchgeführt, wobei jeder Student einmal injiziert.

Es sind die *Retentionszeit* und *Peakflächen* für **Toluol**, sowie die *Peakflächen* des internen Standards (**IS**) zu ermitteln und als Report auszudrucken. (Es wurde bereits ein zusammenfassender Report als **Versuch2a.sum** vorbereitet. <Summary>

Das Verhältnis der Peakflächen ($A_{\text{Toluol}}/A_{\text{IS}}$) ist zu bestimmen. Der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung aller 4 Größen ist zu ermitteln (mit einem Tabellenkalkulationsprogramm).

Der gespreizte Peak von Toluol oder IS eines selbst gewählten Chromatogramms dieser Reihe ist auszudrucken, der Asymmetriefaktor zu bestimmen und **zu bewerten** (in 10% der Peakhöhe ausmessen, mögliche Gründe für „tailing“ oder „fronting“?).

Ausdrucken des gespreizten Chromatogramms:

<Chromatograms> ⇒ <Open> ⇒ *Datei suchen* ⇒ *Peak spreizen* ⇒ <Print> (*current view only!*)

Ausdrucken der benötigten Daten als Liste:

<Summary> ⇒ *Gruppe X* ⇒ „*Versuch2a.sum*“ ⇒ *Sequenz laden, Pfad der Datenfiles eingeben* ⇒ <Druckvorschau>

Bewerten Sie die Ergebnisse!

2. b) Splitinjektion vs splitlose Injektion

Sequenz: **Versuch2b.seq**
Probe: **oX(10)**
: *o*-Xylen (10 ppm) in Methanol
Injektionsvolumen: 1 µL
Ofenprogramm: 40 °C (3 min)
Säulenvordruck: 80 kPa
Injektortemperatur: 250 °C

- Durchführung:
- Probe bei Splitinjektion injizieren
 - Wiederholung mit **splitloser** Injektion. Der Split 2 soll 1 min geschlossen bleiben und anschließend geöffnet werden (ist bereits als 2. Messung in der selben Sequenz programmiert). Aus beiden Chromatogrammen sind *Peakhöhe*, *Peakfläche* und *Retentionszeit* zu entnehmen und vergleichend zu bewerten (evtl. Overlay ausdrucken!).

Versuch 3

Bewertung der Säuleneffizienz mit Hilfe der van-Deemter Kurve

- Sequenz: **Versuch3.seq**
- Probe: **Toluen** (Gas) / **Methan** in ein Vial geben und verschließen
- Injektionsvolumen: **2 µL !! (extra Spritze verwenden!)**
- Ofenprogramm: 40 °C (1,5 min)
- Säulenvordruck: 80 kPa
- Injektortemperatur: 250 °C
- Datenentnahme: Retentionszeit für Methan entnehmen
(eventuell Unterscheidung vom Methanolpeak erforderlich!)
Ausdruck des gespreizten Toluenpeaks

Auswertung:

- Berechnung der durchschnittlichen Strömungsgeschwindigkeit **u** (Gl. 7)
- Berechnung der theoretischen Bodenzahl **N** und Bodenhöhe **H** (Gl. 13 und 14 mit Hilfe der Halbwertsbreite und Retentionszeit des Toluenpeaks)
- Vergleichen der Ergebnisse mit erstellter van-Deemter-Kurve $HETP = f(u)$ (bereits vorhandener Datensatz vom Assistenten als Excel-File)
- Wie hat sich die Trennleistung der Säule verändert?

Versuch 4

Methodenentwicklung

4. a) Es ist eine Methode für die Trennung einer methanolischen Lösung von **Ethylbenzen** und **p-Xylen** für den Routinebetrieb zu entwickeln! Ziel ist eine möglichst schnelle Messung, welche durch Erhöhung der Strömungsrate erreicht werden soll. Es ist zu prüfen, ob dies mit den Anforderungen an den Routinebetrieb vereinbar ist.

- Sequenz: 1. Messung: **Versuch4a80kPa.seq**
2. Messung: **Versuch4a120kPa.seq**
- Probe: **EB/p-X**
Ethylbenzen und p-Xylen (je 200 ppm) in Methanol
- Injektionsvolumen: 1 µL
- Ofenprogramm: 1. Messung: 40 °C (2,5 min)
2. Messung: 40 °C (2 min)
- Säulenvordruck: 1. Messung 80 kPa
2. Messung 120 kPa
- Injektortemperatur: 250 °C

- Auswertung:
- Ausdruck der Chromatogramme beider Peaks im gespreizten Maßstab (für die Bestimmung der Halbwertsbreiten)
 - Entnahme der Retentionszeiten aus den Chromatogrammen
 - Berechnung der Peakauflösung R_S (Gl. 16) für die Messungen
 - Bewertung des Ergebnisses und Diskussion

Welche Methode ist besser für eine automatische Analyse geeignet? Welche Bedingung muss mindestens erfüllt sein, damit beide Peaks im automatisierten Verfahren unterschieden werden können?

Welche Substanz eluiert zu erst? (Erklärung!) Wie kann man diese Annahme analytisch bestätigen? Was sind die Vor- und Nachteile der möglichen Methoden zur Identifizierung bekannter Substanzen?

4. b) Es ist eine Methode zur Trennung einer methanolischen Lösung von **Benzen** (Kp: 80 °C) und ***o*-Xylen** (Kp.: 144 °C) für den Routinebetrieb zu entwickeln. Es sollen Druck und Temperatur für 2 analytische Aufgabenstellungen jeweils so optimiert werden, dass eine möglichst schnelle Messung erreicht wird für:

- (I) **Nur *o*-Xylen** muss quantitativ bestimmt werden.
(II) **Beide Analyten** müssen quantitativ bestimmt werden.

Sequenz: **Versuch4bstart.seq** für die 1. Messung,
für Messung 2 bis 4 sollen eigene Sequenzen und Methoden
erstellt werden!

Probe: **B/*o*-X**
Benzen und *o*-Xylen (je 200 ppm) in Methanol

Injektionsvolumen: 1 µL

Durchführung und Auswertung:

1. Teilversuch (Startbedingungen)

Ofenprogramm: 40 °C (3 min)
Säulenvordruck: 80 kPa
Injektortemperatur: 250 °C

Bewerten Sie das Ergebnis und schlussfolgern Sie, wie man es für Aufgabenstellung (I) und (II) verbessern könnte und führen Sie die nachfolgenden Messungen entsprechend durch.

2. Teilversuch (Temp. optimiert für Aufgabenstellung (I))

3. Teilversuch (Druck. optimiert für Aufgabenstellung (I))

4. Teilversuch (Druck und Temperatur optimiert für Aufgabenstellung (II))

Auswertung: Overlay-Ausdruck der Chromatogramme:
Die Ergebnisse sind zu vergleichen und zu bewerten!

4. c) Analyse schwer trennbarer Gemische

Mit der Säule OV1 (100% Dimethylsilikon) lässt sich ein Gemisch aus **n-Hexan** (Kp: 68,6 °C) und **n-Butanol** (Kp.: 117,5 °C) nicht trennen, beide Peaks fallen zusammen. Erläutern Sie die Ursache dafür. Schlagen Sie vor, wie man beide Verbindungen trennen könnte und überprüfen Sie dies mit einer Messung.

Sequenz: **Versuch4c.seq**

Probe: **Hex/ButOH**

n-Hexan und *n*-Butanol (je 200 ppm) in Methanol

Injektionsvolumen: 1 µL

Ofenprogramm: 40 °C (2 min)

Säulenvordruck: 80 kPa

Injektortemperatur: 250 °C

Bewerten Sie das Ergebnis dieser Messung. Ist diese Methode für die Routineanalytik einsetzbar? Ordnen Sie die Peaks zu und begründen Sie die Zuordnung.

Wieso lässt sich **p-Xylen** nur schwer von **m-Xylen** trennen, wenn man eine SPB5 Säule verwendet? Was müsste man tun, um eine Trennung zu erreichen.

Welche experimentelle Methode ermöglicht eine Überprüfung der **Peakreinheit**?

Versuch 5

Peakidentifizierung, qualitative Analyse

5. a) Peakidentifizierung *unbekannter Gemische* unter Anwendung der Funktion **$\lg k = f(C_n)$** in einer homologen Reihe

Identifizierung eines unbekanntes **n-Alkans** in einer methanolischen Lösung

Sequenz: **Versuch5a.seq**

Probe: **1. Hex/Hept/Non/Dec**

1. *n*-Hexan, *n*-Heptan, *n*-Nonan, *n*-Decan (je 200 ppm) in MeOH

2. C₈-KW

2. Gemisch aus C₈-Kohlenwasserstoffen (je 200 ppm) in MeOH

Injektionsvolumen: 1 µL

Ofenprogramm: 40 °C (7 min)

Säulenvordruck: 80 kPa

Injektortemperatur: 250 °C

Auswertung: Es sind die Retentionszeiten der *n*-Alkane aus der ersten Messung zu entnehmen und zuzuordnen.

Die Retentionszeiten der unbekanntes Verbindungen sind aus der zweiten Messung zu entnehmen.

Aus dem Graph der Funktion **$\lg k = f(C_n)$** ist zu ermitteln, ob eine Struktur der C₈-Kohlenwasserstoffe zuordnenbar ist und wenn ja, welche? (Verwenden Sie Gl. 8 zur Berechnung des

Retentionsfaktors k . Benutzen Sie die Retentionszeit des Methans aus Versuch 3 für die Totzeit.)

5. b) Nachweis von **Toluen** in einer methanolischen Lösung mittels **Kovats-Index I**

Tabellenwert I_{Toluen} : 765

Sequenz: **Versuch5b.seq**

Probe: **T/Hept/Okt**

n-Heptan, *n*-Oktan und Toluen (je 200 ppm) in Methanol

Injektionsvolumen: 1 μL

Ofenprogramm: 40 °C (1,5 min)

Säulenvordruck: 80 kPa

Injektortemperatur: 250 °C

Auswertung: Ermittlung der Retentionszeiten

Berechnung des Kovats-Index I für KW (Gl. 18) und Vergleich mit dem Tabellenwert

Literatur

H. J. Hübschmann "Handbook of GC/MS" Wiley VCH

B. Kolb "Gaschromatographie in Bildern, Eine Einführung" Wiley VCH

Kellner, Mermet, Otto, Valcarcel, Widmer "Analytical Chemistry" Wiley VCH