

Fragenkatalog

1. Ionenchromatographie: Schildern Sie

- a. die chromatographische Grundvoraussetzungen
 - b. den Ablauf des Trennprozesses selbst
 - c. welche Probleme treten im Hinblick auf eine empfindliche Detektion auf und wie kann man sie lösen?
-
- a. Zielkomponenten liegen als Anionen bzw. Kationen vor. Die stationäre Phase ist auf die Eigenschaften dieser geladenen Spezies eingestellt. Es handelt sich um Anionen- bzw. Kationenaustauscher. Diese haben zu den verschiedenen Ionen unterschiedliche Bindungsaffinität. Diese Affinität ist von folgenden Größen abhängig:
 - Höhe der positiven bzw. negativen Ladung
 - Radius des betreffenden Kations bzw. Anions
 - Art der Gegenionen in Lösung
 - pH-Wert der mobilen Phase
 - Bindungsstärke des Ionenaustauschers
 - b. Es gibt zwei Arten von Ionenaustauschern
 - Kationenaustauscher: Hier befinden sich an der Oberfläche stark saure – SO_3^- oder schwach saure $-\text{COO}^-$ Gruppen, die in der Lage sind mit Kationen in Wechselwirkung zu treten. Nach Probenaufgabe treten die enthaltenen Kationen in Konkurrenz zueinander. Je nach vorhandener Affinität der Einzelionen ergeben sich unterschiedliche Retentionszeiten und damit eine Trennung.
 - Anionenaustauscher: Enthält an der Oberfläche positiv geladene Gruppen, i.d. Regel freie Aminogruppen, die durch entsprechende pH-Wahl in die eigentlich aktiven Amino-Gruppen überführt werden. Die Trennung erfolgt analog zum Kationenaustauscher.
 - c. Viele ionische Zielkomponenten besitzen weder eine ausgesprochene Absorptionsbande im UV/VIS-Bereich noch fluoreszierende Eigenschaften. Als Detektionsprinzip wird bei dieser Art von Analyten deren elektr. Leitfähigkeit eingesetzt. Immer, wenn ein Ion von der Trennsäule eluiert wird, steigt die Leitfähigkeit im Eluenten an, was dann in ein chromatographisches Signal umgesetzt wird.

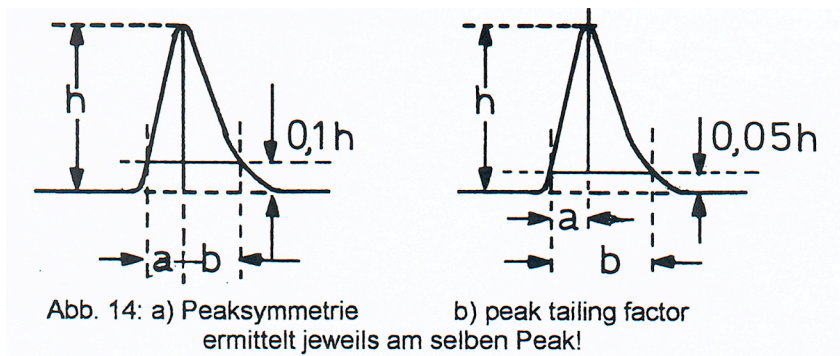
Problem: Der Eluent selbst besitzt eine hohe Grundleitfähigkeit, denn Ionenchromatographie wird mit gepufferten mobilen Phasen betrieben, die allerlei ionische Hilfskomponenten enthalten. Das bedeutet eine vergleichsweise hohe Grundleitfähigkeit, die die empfindliche Registrierung von ionischen Zielkomponenten im Spurenbereich stark beeinträchtigt.

Lösung: Eliminierung der Grundleitfähigkeit in der mobilen Phase durch wahlweise

- chemische Unterdrückung
- elektronische Unterdrückung

2. Leading (bzw. Fronting) und Tailing:

- a. Was versteht man darunter?
 - b. Welche Ursachen kommen für diese beiden Phänomene in Frage?
 - c. Skizzieren sie eine Methode zur quantitativen Erfassung dieser Größen
-
- a. Peakdeformation → der ideale Peak in einem Chromatogramm besitzt die „Gauß-Form“. Sie wird aber in den meisten Fällen nicht erreicht.
Beeinflussen der Peakssysteme durch Tailing und Leading
Tailing: Der Gipfel ist nach links verschoben, d.h. links steilerer Anstieg als rechts
Fronting: Der Gipfel ist nach rechts verschoben, d.h. rechts steilerer Anstieg als links
(Fronting ist seltener als Tailing)
 - b.
 - Totvolumina
 - schlecht gepackte Säule
 - Überladung der Trennsäule
 - Tailing durch Chemisorption
 - c. Peaksymmetrie T (Europa)



3. Die van-Deemter-Gleichung

- Welche Einzelvorgänge in der chromatographischen Säule gehen in diese Gleichung ein? Wie wirken sich diese Einzelvorgänge aus und wie lassen sie sich jeweils beeinflussen?
- Welche Größen können sie der van-Deemter-Gleichung bzw. der daraus resultierenden Kurve für praktische Arbeit entnehmen

a.

- Strömungsunabhängige Faktoren

- **Eddy-Diffusion = Streudiffusion (1)**

Die Trennsäule ist mit kleinen Teilchen der stationären Phase gefüllt. Die mobile Phase strömt daran vorbei und transportiert die Probenmoleküle. Für diese Moleküle gibt es nun verschieden lange Wege durch das chromatographische „Bett“. Ein Teil wird einen ziemlich geradlinigen Weg wählen, während die Wege von anderen Probenmolekülen recht verschlungen sein können. Die Gesamtheit der Moleküle kommt als Folge nicht gleichzeitig am Ende der Säule an, sondern es gibt bestimmte Verzögerungen, die sich in einer Verbreiterung des zugehörigen Peaks dokumentieren.

- *Strömungsverteilung (gehört laut Skript nicht zu van Deemter-Kurve)*

Der Eluent fließt (bei optimiertem Gerät) laminar durch die Säule. Betrachtet wird die Strömung zwischen zwei Partikeln der stationären Phase, so erkennt man das Vorliegen eines Strömungsprofils über den Querschnitt des Partikelabstandes. Es gibt also je nach Abstand vom Partikel unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb der mobilen Phase, die wiederum eine Differenzierung der Wanderungsgeschwindigkeit der Probenmoleküle zur Folge haben.

Der Einfluss von Eddy-Diffusion und Strömungsverteilung kann durch gleichmäßiges Füllen der Säule mit stationärer Phase aus möglichst einheitlichen Teilchen verringert werden. Dabei kann als Richtwert der Korngrößenverteilung gelten, dass das Verhältnis des größten vorkommenden Kornes zum kleinsten nicht größer als 2 sein soll.

- Strömungsabhängige Faktoren

- **Diffusion der Probenmoleküle (Längsdiffusion) (2)**

Die Probenmoleküle breiten sich in der mobilen Phase auch ohne äußerliches Zutun aus. Generell gilt, dass sich die Längsdiffusion umso stärker auswirkt, je länger die betreffende Substanz im Trennsystem verweilt.

Ziel: Möglichst rasche Strömungsgeschwindigkeit anstreben

- **Stagnierender Stoffaustausch (3)**

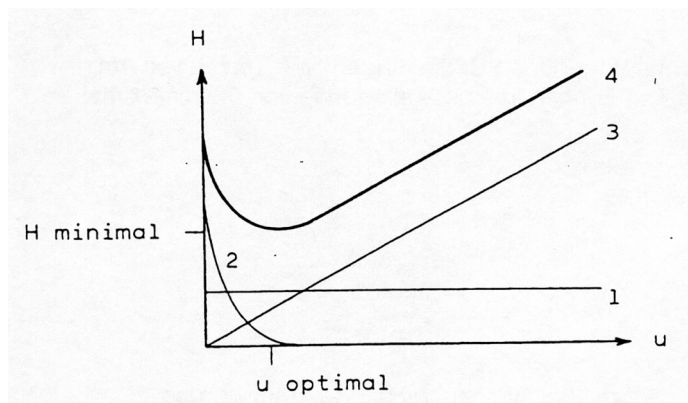
Verschiedene Phänomene sind dafür verantwortlich, denen allen gemeinsam ist, dass sie sich mit steigender Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase immer stärker auswirken, sprich: zu einer immer breiteren Peak-Form führen.

Die Partikel der stationären Phase besitzen oft eine ausgeprägte Porenstruktur wenn einzelne Moleküle der Probensubstanz in solche Poren geraten, so stagniert in Folge fehlender Strömungsgeschwindigkeit der Stofftransport Richtung Säulenende für diese Moleküle. Die betroffenen Moleküle der Probe können zwar durch Diffusion zurück in die fließende mobile Phase gelangen, haben aber auf jeden Fall eine Verlangsamung gegenüber nicht in poröse Struktur eingedrungene

Teilchen erfahren. Dieser Effekt zeigt sich im Chromatogramm ebenfalls in einer Peakverbreiterung, die umso stärker ausfällt, je schneller die mobile Phase strömt. Eine weitere Möglichkeit der Verlangsamung der Wanderung von Molekülen durch die Säule besteht in einer Wechselwirkung mit den Säulenpartikeln. Einzelne Moleküle bleiben gewissermaßen an deren Oberfläche eine zeitlang kleben, wodurch sich deren Elution ebenfalls etwas verzögert.

Für die stationäre Phase kleine Teilchen oder Teilchen mit einer nur oberflächlich porösen Struktur verwenden. Lösemittel niedriger Viskosität verwenden (schnelle Rückdiffusion aus den Poren!)

- b. Die grafische Darstellung dieser Gleichung stellt den Zusammenhang zwischen Fließgeschwindigkeit und Trennstufenhöhe H dar.
Aus der Kurve wird deutlich, dass es eine ganz bestimmte Strömungsgeschwindigkeit gibt, bei der der einzelne theoretische Boden eine minimale Höhe erreicht. Dieser Zustand ist gleichbedeutend mit der maximalen Trennstufenzahl oder optimaler Trennleistung des betreffenden Systems.



4. Standardadditionsverfahren:

- a. Schildern sie exp. Vorgehensweise und einzuhaltende Randbedingungen
- b. In welchen Fällen wird man auf dieses Verfahren zurückgreifen?

a.

- zwei Aliquote der Probe werden in identischer Weise vorbereitet, wobei 1 Aliquot mit bekannter Menge der Zielkomponente angereichert wird
- bei der Messung erhält man 2 sehr ähnliche Chromatogramme. Die Peakfläche der Zielkomponenten ist im „aufgestockten“ Aliquot etwas größer, alle anderen bleiben gleich
- für die Berechnung der Konzentration der Zielkomponente benötigt man die beiden zugehörigen Peakflächen, sowie die beiden Peaks eines eng benachbarten Peak

→ Konzentrationsberechnung der Zielkomponente

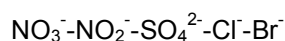
Beachte: Die Menge der zugesetzten Zielkomponente sollte in der gleichen Größenordnung liegen wie die in der Probe vorhandene Menge. Ist die Menge der Zielkomponente in der Probe nicht bekannt, kommt die Aufstockmethode zum Einsatz. (langsam Erhöhen)

b.

Wird eingesetzt bei probenbedingten Matrix-Problemen und wenn kein ISTD gefunden wird.

5. Trennverfahren + Detektor

- 5.1 Wie würden sie folgende Substanzmischungen analytisch voneinander trennen? Geben sie jeweils optimales Trennverfahren und empfindlichste Detektionsart an.



→ alles Anionen!

→ Ionenchromatographie/Anionenaustauscher + Leitfähigkeitsdetektor

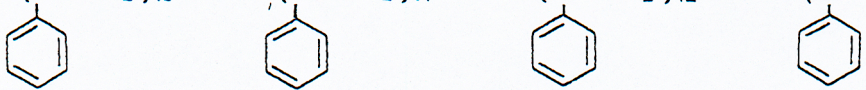
5.2 Geben Sie für folgende Gemische jeweils ein optimales Verfahren für die Auftrennung in die Einzelkomponenten für deren Detektion an. Begründen Sie ihre Vorschläge jeweils stichpunktartig!

- Anthracen – Benzoapyren – Fluoren – Chrysen (alles PAK)
 - CH_2Cl_2 - CHCl_2 - CH_2Cl - CHBr_3 - CH_2I_2 - CH_3NO_2
 - $\text{N}_2\text{H-Phe-Phe-Phe-COOH}$ - $\text{H}_2\text{N-Phe-Phe-Phe-Phe-Phe-COOH}$ - $\text{H}_2\text{N-Phe-Phe-Phe-Phe-Phe-Phe-Phe-COOH}$
- RP-HPLC +Fluoreszenzdetektor → speziell für PAK (polycyklische aromatische Wasserstoffe) gemacht → alle PAK fluoreszieren selbst → RP deshalb, da sie eine unpolare stationäre und eine polare mobile Phase hat → PAK sind unpolar, deswegen keine Gefahr von irreversibler Adsorption an der ebenfalls unpolaren stationären Phase → gute Trennleistung
 - GC + ECD → ECD bevorzugt Nitrat und halogenierte Verbindungen → ECD weil Verbindungen mit mehr Halogenmolekülen vorhanden sind.
 - Gelfiltration (GPC) + UV → unterschiedliche Molekülgröße

5.3 Geben Sie für die folgenden Mischungen das jeweils optimale Verfahren für Trennung und Detektion an. Begründen Sie den Einsatz jedes Verfahrens stichpunktartig!

- Naphtalin – Benzo[a]pyren – Anthracen – Acenaphthen – Phenanthren
 - Ein Gemisch aus Styrololigomeren
- RP-HPLC +Fluoreszenzdetektor → speziell für PAK (polycyklische aromatische Wasserstoffe) gemacht → alle PAK fluoreszieren selbst → RP deshalb, da sie eine unpolare stationäre und eine polare mobile Phase hat → PAK sind unpolar, deswegen keine Gefahr von irreversibler Adsorption an der ebenfalls unpolaren stationären Phase → gute Trennleistung
 - GPC + UV (evtl. anfärben) bei Styrololigomeren

5.5 Geben Sie für die folgenden Mischungen das jeweils optimale Verfahren für Trennung und Detektion an. Begründen Sie den Einsatz jedes Verfahrens stichpunktartig!

- $(\text{CH}_3)_2\text{NH}-(\text{CH}_3)_3\text{N-CH}_3\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3\text{-Na}^+\text{-K}^+$
- $$\text{H-(CH-CH}_2\text{)}_{10}\text{-H} - \text{H-(CH-CH}_2\text{)}_{11}\text{-H} - \text{H-(CH-CH}_2\text{)}_{12}\text{-H} - \text{H-(CH-CH}_2\text{)}_{13}\text{-H}$$

- $$\begin{array}{cccc} \text{COOH} & \text{COOH} & \text{COOH} & \text{COOH} \\ | & | & | & | \\ \text{H}_2\text{N-C-H} & - \text{H}_2\text{N-C-H} & - \text{H}_2\text{N-C-H} & - \text{H}_2\text{N-C-H} \\ | & | & | & | \\ \text{CH}_3 & \text{CH}_2\text{SH} & \text{CH}_2\text{OH} & (\text{CH}_2)_4\text{-NH}_2 \end{array}$$

- im sauren Bereich Ionenchromatographie/Kationenaustauscher + Leitfähigkeitsdetektion
- GPC + UV (evtl. anfärben) bei Styrololigomeren → unterschiedliche Molekülgröße
- Dansylierung/Derivatisierung, HPLC + Fluoreszenz

5.6 Bestimmen Sie für die folgenden Substanzgemische jeweils die optimale Methode für Trennung und Detektion.

- Glu-Ala-Asp-Val – Val-Ser-Phe-Glu – Ala-Arg-Phe-Asp
- CHCl_3 – $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$ – CH_2Br_2 – $\text{F}_2\text{ClC-CFCl}_2$
- Butadien-Oligomere (Typ: $\text{H-[-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-]}_n\text{-H}$)
- Li^+ - Na^+ - Mg^{2+} - Ca^{2+} - Ba^{2+} - Fe^{3+}

- e. Pyren – Chrysen – Benzo[a]Pyren – Benzo[g,h,i]Perylen
- a. Gemisch von Proteinen → IEF + Farbe
- b. Halogenierte Verbindungen → Gaschromatographie (GC) + ECD (bevorzugt Nitrat und halogenierte Verbindungen)
- c. C=C (Doppelbindung) → HPLC + UV-Detektor
- d. Kationen → Ionenchromatographie/Kationenaustauscher + Leitfähigkeitsdetektion
- e. RP-HPLC + Fluoreszenzdetektor → speziell für PAK (polycyclische aromatische Wasserstoffe) gemacht → alle PAK fluoreszieren selbst → RP deshalb, da sie eine unpolare stationäre und eine polare mobile Phase hat → PAK sind unpolar, deswegen keine Gefahr irreversible Adsorption an der ebenfalls unpolaren stationären Phase → gute Trennleistung

5.7 Bestimmen Sie für die folgenden Substanzgemische jeweils die optimale Methode für Trennung und Detektion. Begründen Sie ihre Wahl stichpunktartig.

- a. $(\text{CH}_3)_3\text{N} - \text{C}_6\text{H}_5 - \text{NH}_2 - (\text{CH}_3)_2\text{N} - \text{N}=\text{O} - \text{CH}_3 - \text{NH} - \text{C}_4\text{H}_9$
- b. Valin – Prolin – Aspargin - Histidin
- a. aliphatische Amine → Derivatisieren in der HPLC + UV-Detektion → empfindliche Trennung
- b. alle Aminosäuren → Derivatisieren in der HPLC + Fluoreszenz-Detektion → empfindliche Trennung

5.8 Geben Sie für die folgenden Mischungen das jeweils optimale Verfahren für Trennung und Detektion an. Begründen Sie den Einsatz jedes Verfahrens stichpunktartig!

- a. $\text{CH}_4 - \text{C}_2\text{H}_6 - \text{C}_3\text{H}_6 - \text{CO}_2 - \text{C}_4\text{H}_8 - \text{C}_5\text{H}_{12}$
- b. Anilin – 4-Nitroanilin – n-Butylamin – 1-Aminonaphthalin
- c. Citrat – Pyruvat – Tartrat – Malat - Oxalacetat
- a. GC + FID oder WLD → alles gasförmig
- b. HPLC + UV Detektor (Fluoreszenzdetektor) → alles aromatische Amide
- c. HPLC + UV Detektor

5.9 Geben Sie für die folgenden Mischungen das jeweils optimale Verfahren für Trennung und Detektion an.



GC + ECD → ECD bevorzugt Nitrat und halogenierte Verbindungen → ECD weil Verbindungen mit mehr Halogenmolekülen vorhanden sind.

5.10 Geben sie für folgende Gemische jeweils das optimale Verfahren zur Trennung in die Einzelkomponenten, sowie deren Detektion an. Begründen Sie ihre Vorschläge jeweils stichpunktartig.

D-Trp-L-Trp

Enantiomertrennung mittels HPLC
Normal: 1 Peak für 1 Enantiomerenpaar

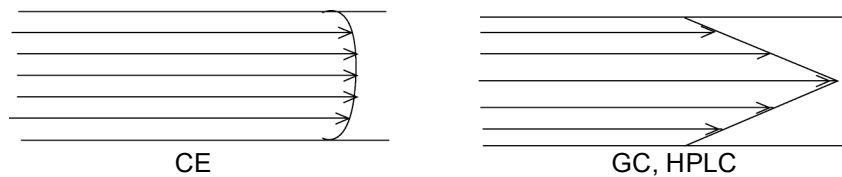
Beide voneinander trennen:

- optisch aktive Hilfsmittel in der mobilen Phase
- Oberfläche der stationären Phase mit enantiomeren reinen Substanzen belegen (unterschiedl. starke Wechselwirkung der Enantiomere mit der Oberfläche → 2 Peaks)
Substanz: Cyclodextrin → Fluoreszenzdetektor

6. Vergleichen Sie die erreichbaren Trennleistungen der drei Verfahren **GC**, **HPLC** und **CE** auf Basis der jeweils erreichbaren Trennbodenzahlen N miteinander! Welche Größe bewirkt hier entscheidend die Unterschiede zwischen elektrophoretischer und chromatographischer Trennung und in welcher Weise tut sie das?

Verfahren	N_{prometer}	Säulenlänge in m	N_{gesamt}
HPLC	140.000	0,25	35.000
GC	4.000	30	120.000
CE	1.000.000	1,0	1.000.000

→ bei CE deutlich bessere Trennleistung, da das Strömungsprofil eine fast ebene Fläche aufweist (die Kapillare muss dabei geladen sein!)



7. Für **eine Molmassenbestimmung per GPC** erhalten Sie mittels einer Kalibrierungsmischung zweier Proteine ($M_1 = 23000D$, $M_2 = 35000D$) als Elutionsvolumina 25,3ml und 36,5ml. Ein anschließend chromatographiertes unbekanntes Protein zeigt $V_E = 31,2ml$. Welche Molmasse besitzt dieses Protein?

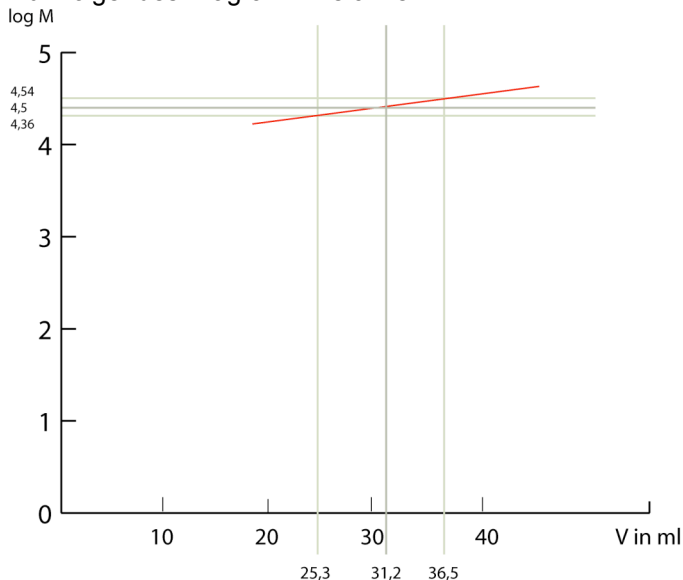
Geg.: $M_1 = 23000D$, $M_2 = 35000D$, $V_1 = 25,3ml$, $V_2 = 36,5ml$, $V_E = 31,2ml$

Ges.: M_{UP}

Am Anfang den log der gegebenen Massen ausrechnen:

$\log M_1 = 4,36$, $\log M_2 = 4,54$

Nun folgendes Diagramm zeichnen:



Zuerst die beiden Log M und die beiden dazugehörigen Volumina einzeichnen und die Schnittpunkte der zusammengehörenden Geraden bilden. Diese Schnittpunkte verbinden (rote Gerade). Nun von V_E eine Senkrechte einzeichnen und vom Schnittpunkt mit der roten Gerade eine Waagrechte zur y -Achse ziehen. Log M -Wert ablesen und den umgekehrten Log davon nehmen. Fertig.

$\log M_{VE} = 4,5 \rightarrow M_{VE} = 10^{4,5} = 31623D$

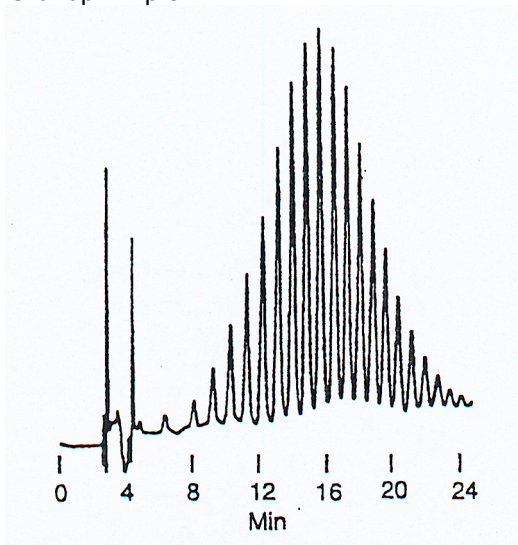
8. Gegeben sei ein **System zur Analyse ionischer Komponenten**, das eine Trennsäule mit **stark saurem Kationenaustauscherharz** enthält. Das System wird mit einer Pufferlösung von **pH 4,3** als mobiler Phase betrieben und dient der Trennung und quantitativen Bestimmung von **NH₄⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺**. Welche Auswirkungen auf die Retentionszeiten dieser Komponenten erwarten Sie (qualitativ) bei
- Erhöhung des pH-Wertes um 1 Einheit?
 - Erhöhung der Temperatur der mobilen Phase?
 - Erhöhung der Ionenstärke der mobilen Phase?
- a. Erhöhung des pH-Wertes um eine Einheit → Retentionszeit aller Kationen wird erhöht
Begründung: höherer pH-Wert → weniger H⁺ Ionen in der mobilen Phase, die Bindungsstellen besetzen können → Analyten können besser mit statischer Phase wechselwirken → Erhöhung der Retentionszeit
- b. Erhöhung der Temperatur der mobilen Phase → Retentionszeit wird niedriger
Begründung: die Viskosität der mobilen Phase sinkt → dadurch erfolgt ein schnellerer Stoffaustausch
- c. Erhöhung der Ionenstärke der mobilen Phase → Verkleinerung der Retentionszeit der zu trennenden Analyten
Begründung: Mehr Ionen der mobilen Phase besetzen Ladungszentren der Oberfläche → weniger Bindungsstellen für die Ionischen Analyten
9. Gegeben sei ein **System zur Analyse ionischer Komponenten**, das eine Trennsäule mit **stark basischem Anionenaustauscherharz** enthält. Das System wird mit einer Pufferlösung von **pH 8,2** als mobiler Phase betrieben und dient der Trennung und quantitativen Bestimmung von **Cl⁻, Br⁻, SO₄²⁻, HCOO⁻, CH₃COO⁻**. Welche Auswirkungen auf die Retentionszeiten dieser Komponenten erwarten Sie (qualitativ) bei
- Erniedrigung des pH-Wertes um 1 Einheit?
 - Erhöhung der Temperatur des Eluenten?
 - Erhöhung der Ionenstärke des Eluenten?
- a. Erniedrigung des pH-Wertes um eine Einheit → Retentionszeit aller Anionen wird erhöht
Begründung: niedrigerer pH-Wert → weniger OH⁻ Ionen in der mobilen Phase, die Bindungsstellen besetzen können → Analyten können besser mit statischer Phase wechselwirken → Erhöhung der Retentionszeit
- b. Erhöhung der Temperatur der mobilen Phase → Retentionszeit wird niedriger
Begründung: die Viskosität des Eluenten sinkt → dadurch erfolgt ein schnellerer Stoffaustausch
- c. Erhöhung der Ionenstärke des Eluenten → Verkleinerung der Retentionszeit der zu trennenden Analyten
Begründung: Mehr Ionen des Eluenten besetzen Ladungszentren der Oberfläche → weniger Bindungsstellen für die Ionischen Analyten
10. Die bevorzugte Detektionsmethode in der **Ionenchromatographie (=IC)** ist die **Leitfähigkeitsdetektion**. Schildern Sie die prinzipiell damit verbundenen Probleme in der IC und skizzieren Sie, wie man diese in der Praxis löst!

Problem: Der Eluent besitzt eine hohe Grundleitfähigkeit, denn Ionenchromatographie wird mit gepufferten mobilen Phasen betrieben, die allerlei Hilfskomponenten enthalten
→ hohe Grundleitfähigkeit beeinträchtigt stark die empfindliche Registrierung von ionischen Zielkomponenten im Spurenbereich

Lösung: Eliminierung der Grundleitfähigkeit in der mobilen Phase durch wahlweise

- chemische Unterdrückung:
Einsatz zweier Säulen (die eigentliche Trennsäule und eine Unterdrückersäule)
- elektronische Unterdrückung
 - Eigenleitfähigkeit des Eluenten wird quantitativ elektr. erfasst und bei den anschließenden Analysenläufen herausgerechnet
 - Gute Thermostatisierung nötig
 - Trotz Thermostatisierung ist mit elektronischer Kompensation ein höheres Rauschen und damit eine schlechtere Nachweisempfindlichkeit verbunden

11. Sie erhalten ohne weitere Information das folgende **Chromatogramm**. Wie könnte es entstanden sein? Gehen Sie dabei auf die Art der Probe, das verwendete Trennverfahren und dessen Grundprinzip ein!



→ **Gelfiltration**

→ Trennung von Styrol-Oligomeren: Oligomere ähneln sich sehr, deswegen ein Peak nach dem anderen

→ Grundprinzip der Trennung: Klassifizierung nach Molekülgröße

12. Mit welchen Auswirkungen auf das entsprechende **Chromatogramm** müssen Sie insgesamt rechnen, wenn Sie die folgende Veränderung vornehmen (nur qualitative Beschreibung und stichpunktartige Begründung)?

Ausgangssituation: HPLC von aromatischen Ketonen an RP-Material mit Wasser/Acetonitril (50:50, v/v) als mobiler Phase

Veränderung: Erhöhung des Wasseranteils auf 60%-Vol.

Durch Erhöhung des H₂O-Anteils wird die mobile Phase deutlich polarer.

→ Substanzen lösen sich schlechter

→ Das Gleichgewicht verschiebt sich in Richtung RP-Material

→ Substanzen halten sich länger in der stationären Phase auf

→ Retentionszeit wird größer

→ Peaks werden auf Grund dessen breiter: entweder bessere Trennung, weil die Peaks vorher dicht hintereinander lagen oder schlechtere Trennung

13. Beschreiben sie stichpunktartig

- a. Das Trennprinzip
- b. Bevorzugte Einsatzgebiete
- c. Chromatographische Randbedingungen

für die **Gelpermeationschromatographie (GPC)**.

- a. Klassifizierungsprozess nach Molekülgröße:
Die stationäre Phase besteht aus porösem Material mit definierter Porengröße. Angabe der Verweildauer ist nicht mehr die Retentionszeit, sondern die Elutionsvolumina. Die Analyten gelangen in Kontakt mit der porösen stationären Phase. Je nach Molekülgröße und Porengröße der stationären Phase können diese Analyten mehr oder weniger gut in die Poren eindringen oder einfach „vorbeischwimmen“, weil sie zu groß sind.
→ Fraktionierung nach Molmassen (große Moleküle kommen zu erst an = kurze Laufzeit; kleine Moleküle haben lange Laufzeit)
- b. Proteinreinigung, Proteintrennung
- c. Stationäre und mobile Phase müssen bezüglich ihrer Polarität sehr ähnlich sein. Die stationäre Phase besteht aus porösem Material mit definierter Porengröße.

14. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

- a. Worauf beruht die Trennbarkeit von Proteinen mit Hilfe der **IEF**? Gehen Sie dabei kurz auf den Verlauf des Trennprozesses ein!
 - b. Bestimmen Sie anhand des im folgenden dargestellten Gels das Auflösungsvermögen der IEF für zu trennende Proteine im sauren Bereich des Gels anhand zweier selbst gewählter Banden.
- a. Bei der IEF werden die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der Proteine als Trennparameter ausgenutzt.
In die Gelmatrix sind in Laufrichtung der Analyten immobilisierte pH-Bereiche einpolymerisiert, so dass sich von der Anode zur Kathode ein kontinuierlicher pH-Gradient im Gel ergibt, der während des gesamten Trennprozesses erhalten bleibt. Je nach Verhältnis von sauren, basischen und neutralen Aminosäuren werden die Proteine nach Anlegung einer Spannung im elektr. Feld, gemäß ihrer Nettoladung, in Richtung Kathode oder Anode wandern und anhalten, wo der pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Dort angekommen verlieren sie ihre Ladung und wandern nicht mehr weiter.
Das ergibt eine genaue Trennung, da jedes Protein seinen speziellen IEP hat, wo sie dann neutral (ohne Ladung) ist.
- b. pH-Wert-Range von 3-9 → der Bereich von $\Delta\text{pH}=6 \approx 120\text{mm} \rightarrow 1\text{mm} \approx \text{pH von } 0,05$. Die zwei ausgewählten Banden sind je 1mm breit.
Daraus lässt sich schließen, dass Proteine sich noch trennen lassen, solange sich ihre pH-Werte um mindestens 0,05 Einheiten unterscheiden.

15. Wie unterscheiden sich **stoffstromabhängige und konzentrationsabhängige Detektoren**?

Benennen Sie für beide Typen je einen Vertreter für den Einsatz bei:

- a. GC-Analysen
- b. HPLC-Analysen

Bei welcher Fragestellung muss man der Auswahl des jeweiligen Detektortyps (stoffstrom-, bzw. konzentrationsabhängig) besonderes Augenmerk schenken?

Konzentrationsabhängige Detektoren behalten ihr Signal bei (arbeiten also zerstörungsfrei), während bei stromabhängigen Detektoren der Signalwert auf 0 sinkt, da keine detektierbaren Probenmoleküle mehr nachgeliefert werden (stoffstromabhängig zerstört).

- a. GC-Analysen
WLD → konzentrationsabhängiger Detektor
FID → stoffstromabhängiger Detektor
- b. HPLC-Analysen
UV → konzentrationsabhängiger Detektor
ECD → stoffstromabhängiger Detektor

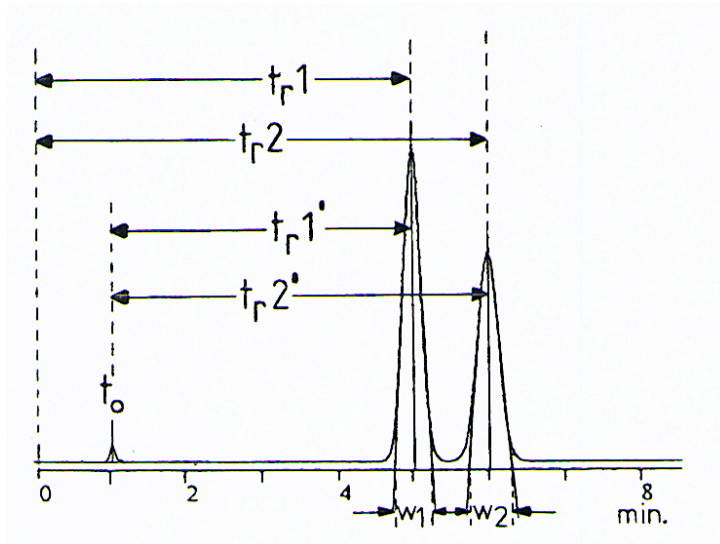
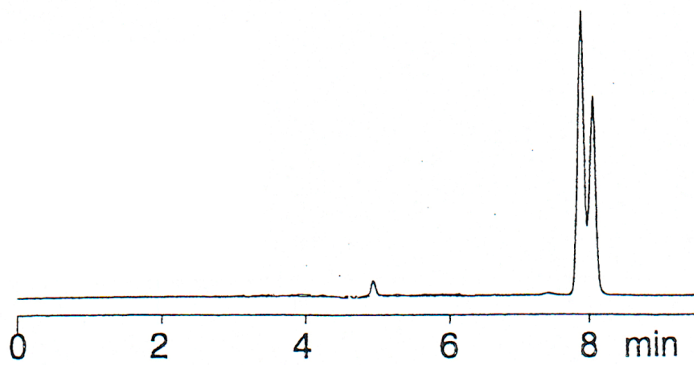
Weitere Fragestellung: Bei der Wahl des Detektors muss auch darauf geachtet werden, ob die Probe für eine weitere Trennung genutzt werden soll (z.B. GC gekoppelt mit MS)

16. Phenol und Benzol sind im folgenden **Chromatogramm** nicht ordentlich voneinander getrennt. Belegen sie dies anhand der Werte für Retentionsfaktoren, relative Retention und Auflösung. Schlagen sie einen Weg zur Verbesserung des Trennergebnisses auf Basis der gegebenen Trennbedingungen vor und begründen Sie ihren Vorschlag kurz.

16.1

Trennbedingungen:

Säule: 4,6mm I.D. *25cm
Stat. Phase: RP-18
Mob. Phase: 80%Acetonitril (CH₃CN) / 20% 0,001M wässrige H₂SO₄
Flussrate: 1,5ml/minute
Detektion: UV; $\lambda = 254\text{nm}$



Geg.(aus Graph):
 $t_0=5,0\text{min}$
 $t_{R1}=7,8\text{min}$
 $t_{R2}=8,1\text{min}$
 $w_1=0,18\text{min}$
 $w_2=0,18\text{min}$

Ges.: k_1, k_2, α, R

$$k_1 = \frac{t_{R1} - t_0}{t_0} = \frac{7,8\text{min} - 5,0\text{min}}{5,0\text{min}} = 0,56$$

$$k_2 = \frac{t_{R2} - t_0}{t_0} = \frac{8,1\text{min} - 5,0\text{min}}{5,0\text{min}} = 0,62$$

relative Retention α :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = 1,1$$

Auflösung R:

$$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1} = 2 \cdot \frac{8,1\text{min} - 7,8\text{min}}{0,18\text{min} + 0,18\text{min}} = 1,67$$

Die Auflösung R ist größer als 1,5 was auf ein überoptimiertes System hinweist. Die Analysezeiten sind zu lang.

Mögliche Verbesserung: Flussrate erhöhen (unsichere Vermutung)

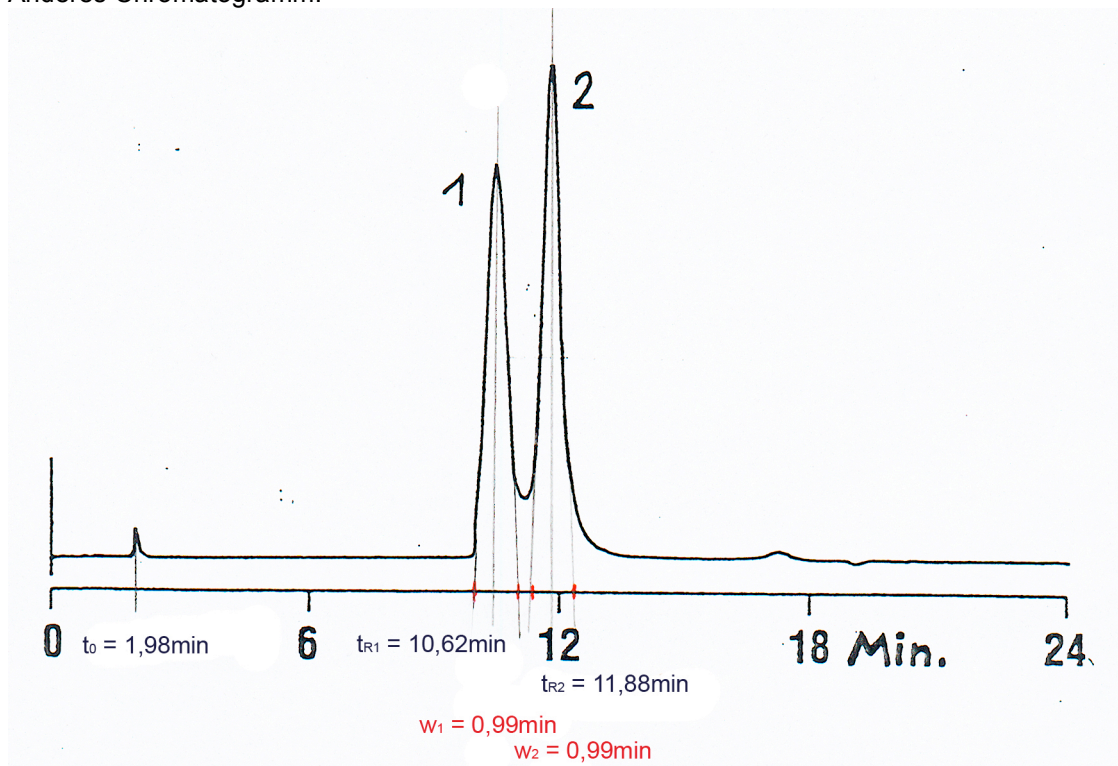
Allgemein:

R = 1: Peaks nicht vollständig voneinander getrennt, jedoch sind zwei Komponenten deutlich erkennbar. Die Wendetangenten berühren sich auf der Zeitachse; die Flächenüberlappung beträgt etwa 2%

R = 1,25: Ausreichende Trennung für quantitative Analyse (ohne EDV-Nachbearbeitung)
 R > 1,5: überoptimiertes System → zu lange Analysezeiten

16.2

Anderes Chromatogramm:



Retentionsfaktor: $2 < k < 10$
 Auflösung zweier Peaks: $R \geq 1,25$

- Prüfen Sie rechnerisch, ob diese Vorgaben im vorherigen Chromatogramm gegeben sind!
- Bestimmen Sie die Zahl der theoretischen Trennböden für Peak 1

- Im Chromatogramm entsprechen 1mm ca. 0,18min
 $t_{R1} = 10,62\text{min}$
 $t_{R2} = 11,88\text{min}$
 $t_0 = 1,98\text{min}$
 $w_1 = 0,99\text{min}$
 $w_2 = 0,99\text{min}$

Retentionsfaktoren:

$$k_1 = \frac{t_{R1} - t_0}{t_0} = \frac{10,62\text{min} - 1,98\text{min}}{1,98\text{min}} = 4,36$$

$$k_2 = \frac{t_{R2} - t_0}{t_0} = \frac{11,88\text{min} - 1,98\text{min}}{1,98\text{min}} = 5,0$$

→ beide Retentionsfaktoren liegen im geforderten Bereich
 Auflösung:

$$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1} = 2 \cdot \frac{11,88\text{min} - 10,62\text{min}}{0,99\text{min} + 0,99\text{min}} = 1,27$$

→ Auflösung liegt über dem geforderten Minimalwert

b.

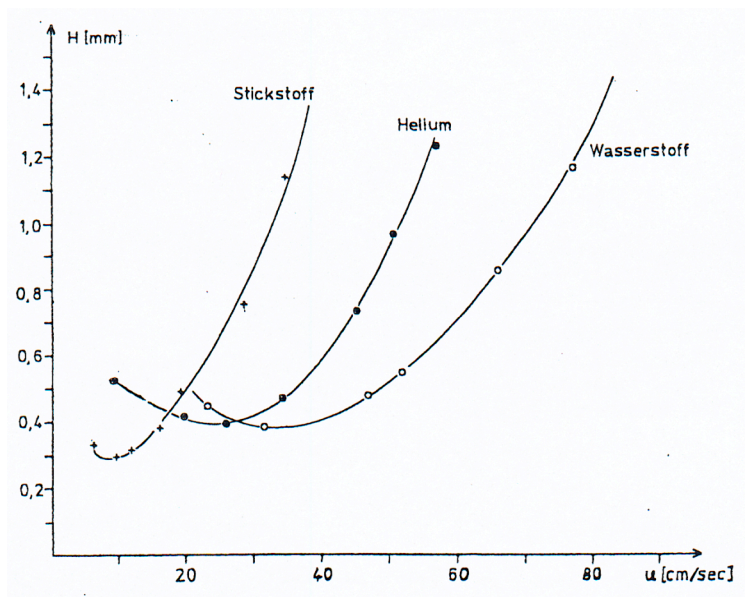
allgemeine Formel für Trennbödenanzahl: $N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w}\right)^2$

für Peak 1:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_{R1}}{w_1}\right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{10,62}{0,99}\right)^2 = 1841$$

17. Gegeben sie die folgende Schar von **van-Deemter-Kurven** für verschiedene Trägergase in der Gaschromatographie.

Diskutieren Sie die verschiedenen Aspekte, die bei der Auswahl des geeigneten Trägergases für einen effizienten und ökonomischen Einsatz in der Praxis zu berücksichtigen sind!



H₂:

- billig, breites van-Deemter-Minimum → problemlose Einstellung von u_{opt} (u : Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase)
- $u_{opt} = \text{ca. } 30 \text{ cm/s}$ → hoher Gasverbrauch
- Nachteil: explosiv

He:

- etwas engere Kurve für u als bei H₂ → wird schwieriger das Gerät zu kalibrieren aber immer noch gut einstellbar
- $u_{opt} = \text{ca. } 20 \text{ cm/s}$ → weniger Gasverbrauch als bei H₂
- unbrennbar aber teuer

N₂:

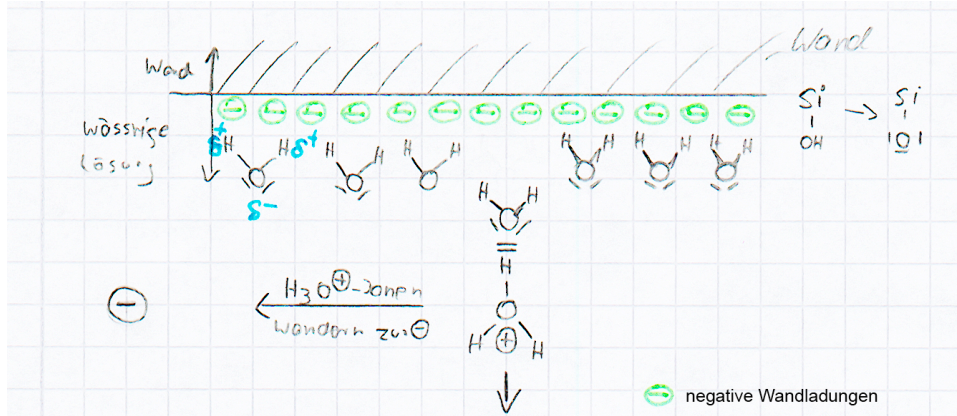
- sehr steile enge u -Kurve (enges v.-D.-Minimum), exaktes einstellen von u_{opt} ist nötig, da leichte Schwankungen bereits große Abweichungen nach sich ziehen
- $u_{opt} = \text{ca. } 10 \text{ cm/s}$ → niedriger Gasverbrauch
- unbrennbar und preiswert

allgemeine Aspekte: Die graphische Darstellung der Van-Deemter-Gleichung stellt den Zusammenhang zwischen Fließgeschwindigkeit und Trennstufenhöhe dar → maximale Trennstufenzahl bedeutet optimale Trennleistung.

18. Elektroosmotischer Fluss (EOF)

- Schildern Sie das Zustandekommen des elektroosmotischen Flusses!
- Erläutern Sie, auf welche Weise man den EOF nach Betrag und Richtung verändern kann.
- Unter welchen Bedingungen bewegt sich ein anionisches Probenteilchen in der Kapillarelektrophorese auf die Kathode zu?

a.



Der EOF tritt als Folge des Grenzflächenphänomens zwischen Kapillarwand und der Elektrolytlösung bei Anlegen eines elektrischen Feldes auf.

- Anlagerung von H₂O an negative Wandladungen
- freie negative (Wand-)Ladungen wirken in die Lösung hinein und üben Anziehungskräfte auf die H₃O⁺ Ionen aus
- elektrostatische Wechselwirkungen mit H₃O⁺ in der Lösung
- auf Grund der ständigen Bewegung ist in der Lösung ein dauerndes Hin- und Wegdiffundieren von H₂O und H₃O⁺ an diesen negativ geladenen Zentren der Wandung zu beobachten
- Wassersäule bewegt sich zu den negativen Wandladungen
- Voraussetzung: nur geladene Teilchen können untersucht werden
- ➔ Durch Anlegen einer Potentialdifferenz an die Enden einer Kapillare lässt sich eine Strömung der enthaltenen Flüssigkeit hervorrufen die in Richtung von der Anode zur Kathode geht

b.

Beeinflussung durch:

- das Material der Kapillarwand - sprich Änderung der Wandladung
- der pH-Wert des Puffers in der Kapillare
- Viskosität des Mediums
- Ionenstärke
- Dielektrizitätskonstante
- Form und Größe der Moleküle
- Umkehren der Polarität

c.

langsame Anionen

→ ←

μ_{ion} μ_{EOF}

➔

←

μ_{obs} Anionen bewegen sich zur Kathode

μ_{EOF} ist stärker als die Abstoßungskräfte zwischen den negativen Ladungen (μ_{ion}). Somit werden die Anionen „gewaltsam“ gegen die Wandladungen gedrückt.

19. Multiple Headspace Extraction - MHE-Verfahren:

- Was versteht man darunter (Name) und zu welchem Zweck dient das Verfahren?
- Schildern Sie die prinzipielle Vorgehensweise bei der
 - Experimentellen Durchführung
 - Auswertung

a. Multiple Headspace Extraction

→ Technik wird immer dann angewandt, wenn eine feste Probe untersucht werden soll, die nicht in homogene Lösung zu bringen ist (z.B. Bodenproben, Kunststoffgranulat usw...)

b.

i. Experimentelle Durchführung

- Probe wird in ein Headspace-Gläschen eingewogen, dieses druckdicht verschlossen und in üblicher Weise thermostatisiert und injiziert
- anschließend wird der Gasraum belüftet und dieselbe Probe erneut unter den gleichen Bedingungen thermostatisiert und injiziert
- diese Prozedur wird an der selben Probe 4 bis maximal 10mal durchgeführt
- man erhält 4 bis maximal 10 Chromatogramme mit sukzessive abnehmender Peak-Fläche für den Analyten x, da die Probe bei jeden dieser Schritte weiter an flüchtigen Komponenten verarmt

ii. Auswertung

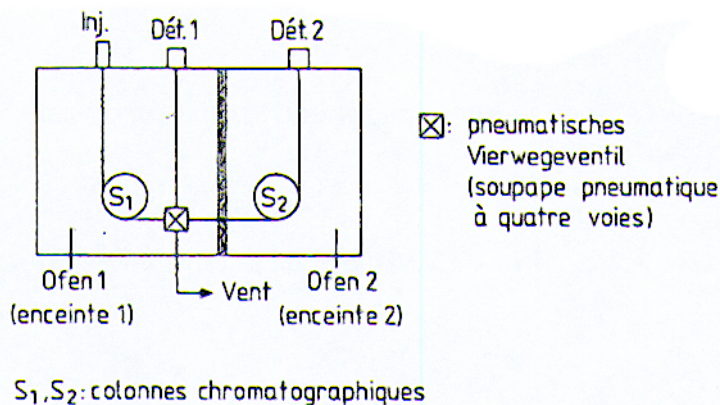
- man erhält eine Abklingkurve die in eine geometrische Reihenentwicklung mündet. Die e-Funktion wird in die Log-Funktion überführt
- bei gegebener Linearität zwischen Injektionsnummer und $\log(A_i)$ kann eine fiktive Gesamtfläche ΣA_i aus den Peakflächen der ersten beiden Injektionen berechnet werden. Diese Gesamtpeakfläche ist repräsentativ für den gesamten Gehalt der Komponente i in der Probe $\Sigma A_n = \frac{A1 \cdot A1}{A1 - A2}$
- durch vorherige Kalibrierung des Geräts mit bekannter Menge i kann auch in problematischen Fällen (unlösliche Proben) eine Quantifizierung vorgenommen werden

20. „Live-Schaltung“ („heart cut“)

a. Skizzieren Sie Aufbau und Funktion einer sog. „Live-Schaltung“ („heart cut“)

b. Wo setzt man dieses Verfahren vorzugsweise ein?

a.



- zunächst ganz normales Chromatogramm der Probe aufnehmen, Retentionszeitbereich der Säule festlegen, in dem die vermutete Zielkomponente eluiert
- dazu wird das gesamte Säuleneluat aus Säule S1 auf den Detektor D1 geleitet
- meistens erhält man ein sehr komplexes Chromatogramm in dem eine sichere Zuordnung von Signalen zu einzelnen Zielkomponenten nicht möglich ist
- in einem zweiten Schritt wird das Schaltstück pneumatisch so angesteuert, dass zunächst wieder das Säuleneluat aus S1 auf den Detektor D1 geleitet wird.
- In einem Zeitfenster jedoch, in dem die eluierende/n Zielkomponenten vermutet werden, schaltet das Schaltstück den Fluss so um, dass für ein paar Sekunden das Säuleneluat aus S1 auf die zweite Trennsäule geleitet wird.

- Dann läuft das S1-Eluat wieder weiter über D1
- Die Eluatfraktion, die auf S2 gelangt ist, wird nun dort weiter aufgetrennt
- Da nun aber der größte Teil der Probe nicht mehr stört, ist die weitere Auftrennung ungleich einfacher zu bewerkstelligen und in der Regel hat man nun keine Schwierigkeiten mehr, eine bestimmte Zielkomponente als sauber getrennten Peak eindeutig zu identifizieren
- Meist arbeitet man mit unterschiedlich polaren Trennsäulen S1 und S2, und macht sich damit einen zusätzlichen Selektivitätsgewinn zu nutze
- Beide Öfen können in gewissen Grenzen unabhängige Temperaturprogramme fahren, so dass auch von dieser Seite noch Selektivitätssteigerungen möglich sind

b. Verwendung in der Gaschromatographie (GC) um in Vielstoffgemischen eine sichere Identifizierung und Quantifizierung einzelner Zielkomponenten zu erreichen.

21. Weshalb erhält man bei flüssig chromatographischen Trennungen von z.B. Peptiden mit stationären Phasen aus reversed-phase-Material des Typs $-C_4H_9$ im allgemeinen etwas längere Retentionszeiten (zum Teil auch mehr Tailing) als mit solchen des Typs $-C_{18}H_{37}$ bei ansonsten gleichen Bedingungen?

Die unterschiedlichen Kettenlängen der Kohlenwasserstoffketten machen sich, obwohl für sich gesehen alle gleiche Polarität aufweisen trotzdem in verschiedenen Trennergebnissen bemerkbar. Der Grund liegt darin, dass die freien OH-Gruppen auf dem Kieselgelträger nicht vollständig mit diesen KW-Resten belegt werden können. Als Folge bleiben eine Reihe von freien OH-Gruppen auf der Kieselgeloberfläche erhalten. Diese Rest-OH-Gruppen entfalten ihre adsorptiven Eigenschaften umso stärker, je kürzer die KW-Kettenlänge ist, d.h. je näher diese OH-Gruppen der mobilen Phase und damit dem gesamten Trennprozess kommen.

22. Welches Probenaufgabesystem verwendet man üblicherweise in der **Kapillargaschromatographie**?

Schildern Sie stichpunktartig

- den prinzipiellen Aufbau
- die Funktionsweise
- die damit verbundene Problematik
- eine Möglichkeit diese Problematik zu überwinden

Trennsäule: Kapillarsäule

- die stationäre Phase befindet sich als dünner Film auf der Innenwandung (Al_2O_3) der Kapillare
Damit die Säule nicht überladen wird wendet man die Split-Injektion an:

- Split-Injektion:

Die Probe wird durch ein Butyl-Kautschuk-Septum in den geheizten Injektorraum injiziert und bei $T=200-300^\circ C$ schlagartig verdampft. Anschließend sorgt ein Strömungsteiler dafür, dass nur ein Bruchteil der gasförmigen Probe auf die Trennsäule gelangt.

→ Vermeidung einer Überladung der Säule

→ Empfindlichkeit trotz Absplitten noch sehr hoch

Nachteile: - Strömungsteiler erfasst nicht alle Komponenten der Probe in gleichen Anteilen → Diskriminierung nach Siedepunkt: leichter siedende Bestandteile gehen zu einem größeren Teil durch Split-Ausgang verloren als höher siedende (muss vor allem bei quantitativen Arbeiten berücksichtigt werden)

- T-Stress für Zielkomponenten durch hohe Verdampfungstemperatur

Die Problematik wird mittels „On Column Injektion“ verhindert (flüssige Probe wird in kalte Kapillare injiziert)

23. Welche Möglichkeiten bestehen in der Chromatographie generell für einen „**Gradientenbetrieb**“ und welche Zwecke verfolgt man damit?

Zwecke für „Gradientenbetrieb“:

→ zeitlich veränderbare Zusammensetzung der mobilen Phase

→ auf diese Weise werden Peaks die sehr spät oder gar nicht von der Säule eluieren in ihrer Laufzeit beschleunigt

Möglichkeiten:

→ zwei Gradientensysteme

1. Niederdruckgradientensystem (→ billig, eine Pumpe, aber träge)
2. Hochdruckgradientensystem (→ mehrere Pumpen, teuer, schnell)

24. a. Schildern sie stichpunktartig das Verfahren der **Ionenpaarchromatographie!**
b. Welche 2 Modellvorstellungen hat man dabei für den Ablauf des Trennprozesses?

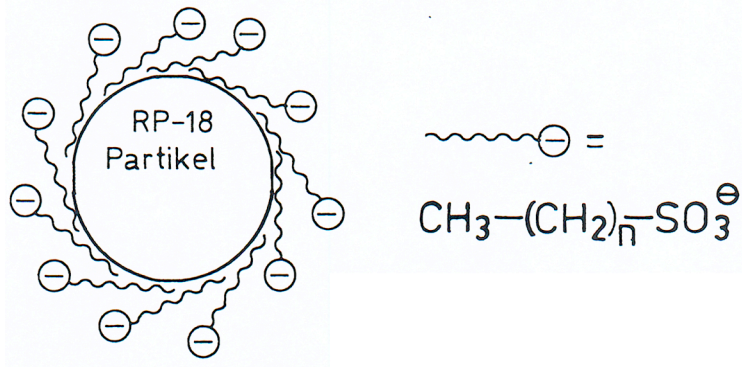
a. →

- der mobilen Phase wird ein Reagenz zugesetzt, das mit den ionischen Analyten ein Ionenpaar bildet.
- für kationische Analyten verwendet man als Gegenion meist organische Sulfonate mit unterschiedlich langen Alkylresten
- bei anionischen Analyten setzt man als Gegenionen quartäre Ammoniumionen ein

→ die so gebildeten Ionenpaare bleiben unter den gewählten chromatographischen Bedingungen assoziiert und durchlaufen das System als nach außen hin neutrale Teilchen.

→ diese Ionenpaare gehen als Ganzes Wechselwirkungen auf Grund von Adsorptionsprozessen mit der stationären Phase ein und so gelangt man zu einer Trennung der ursprünglichen Zielionen.

b. Erste Modellvorstellung:



Die Oberfläche des Partikels tritt zunächst in Wechselwirkung mit den Alkylketten der zugesetzten Gegenionen aus der mobilen Phase, was zu einer Belegung mit diesen Ionen führt. Damit erhält man quasi eine Oberfläche mit Oberflächenladungen die ähnlich wie bei einem Ionenaustauscherharz sind.

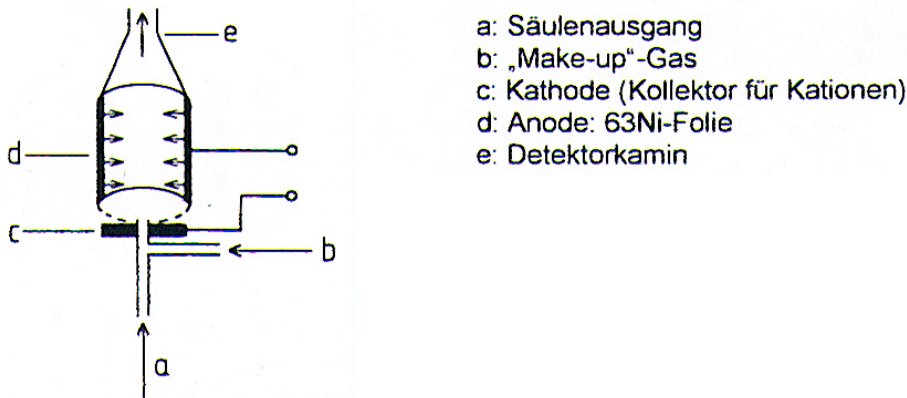
Zweite Modellvorstellung:

Man stellt sich den Trennprozess tatsächlich so vor, dass sich feste Assoziate bilden, die als ungeladenes Ganzes Wechselwirkungen mit der unpolaren, stationären Phase eingehen.

25. **ECD = Elektronenauffangdetektor**

- a. Was ist ein ECD und wo wird er eingesetzt?
 b. Skizzieren Sie stichpunktartig Aufbau und Funktionsprinzip

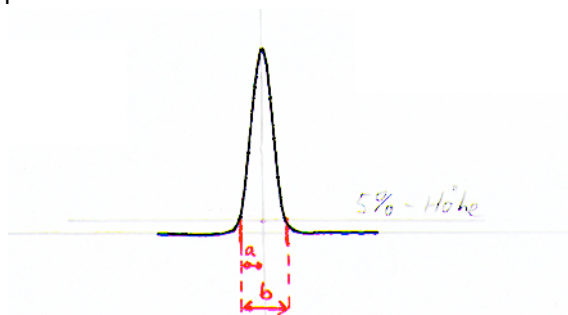
- a. **ECD = electron capture detector** → **Elektronenauffangdetektor**
 Bevorzugter Einsatz in der Gaschromatographie
 Wird bevorzugt bei Substanzen eingesetzt, die elektronegative Elemente enthalten (Nitroverbindungen und halogenierte Verbindungen)
- b.



- Prinzip: - Zylindrische ³⁶Ni Folie sitzt auf dem Säulenausgang und emittiert fortwährend Betastrahlung
 - Elektronen treffen auf Trägergasmoleküle und schlagen aus diesen jeweils ein weiteres Elektron heraus.
 → Sekundärelektronen und Rumpfionen des Trägermoleküls fliegen zu den vorgespannten Elektroden und erzeugen dort einen Grundstrom
 - Wird ein Analyt aus der Säule eluiert, so treffen die Sekundärelektronen auf diese Analytmoleküle, werden von diesen eingefangen („capture“) und führen dort zu einer Ionisation
 - damit steht jedoch nur mehr eine verminderte Zahl von Sekundärelektronen zur Verfügung, die an die Anode wandern → Grundstrom wird sinken
 - das Ausmaß dieses sinkenden Stroms wird wiederum verstärkt und als chromatographisches Signal registriert

26. Im Zuge der chromatographischen Qualitätskontrolle eines pharmazeutischen Präparates gesteht die FDA dem Hersteller einen Maximalwert von 1,20 für den **Peak-Tailing-Faktor** zu. Überprüfen Sie, ob das nebenstehende Chromatogramm diesen Vorgaben genügt! Schildern Sie dabei kurz Ihre Vorgehensweise.

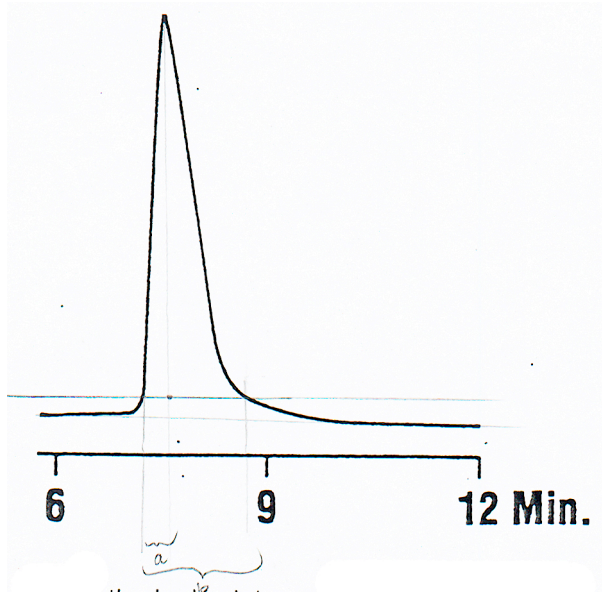
26.1



$a = 3\text{mm}, b = 6\text{mm}$

→ $\text{PTF} = b/2a = 6\text{mm}/6\text{mm} = 1 < 1,20$ → die Anforderungen werden erfüllt!

26.2



$a = 3,5\text{mm}$

$b = 14\text{mm}$

$\text{PTF} = b/2a = 2 > 1,20 \rightarrow$ die Anforderungen werden nicht erfüllt \rightarrow darf nicht quantitativ ausgewertet werden!

27. Eine wässrige Lösung enthält unbekannte Konzentrationen der beiden Stoffe Butanol und Methanol. Bei den Messungen zur **TOC Bestimmung** ergaben sich folgende Ergebnisse.

TC: 0,488g/l TIC: 0,008g/l

Eine zusätzlich durchgeführte GC-Analyse erbrachte für $c(\text{Methanol}) = 640\text{mg/l}$.

Erläutern Sie die Messergebnisse kurz und bestimmen Sie die Massenkonzentration an Butanol!

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{TIC} = 0,488\text{g/l} - 0,008\text{g/l} = 0,480\text{g/l}$$

TOC = total overal C (Kohlenstoff)

$$c(\text{Methanol}) = 0,640\text{g/l}$$

Methanol hat die Strukturformel CH_3OH mit den Gewichten $\text{C}=12$, $\text{O}=16$, $\text{H}=1$

\rightarrow ein Methanolkölmolekül wiegt somit 32g/mol

$\rightarrow c(\text{Methanol}) = 0,640\text{g/l}$ entspricht somit $n(\text{Methanol}) = 0,64\text{g/l} : 32\text{g/mol} = 0,02\text{mol/l}$

$\rightarrow n(\text{Methanol}) = 0,02\text{mol/l}$ entsprechen $0,02\text{mol/l}$ an C-Atomen (weil 1 C-Atom pro Methanol!)

$\rightarrow \text{TOC}_{\text{Methanol}} = 0,02\text{mol/l} * 12\text{g/mol} = 0,24\text{g/l}$ (mal 12, da im TOC nur nach Masse von C gefragt ist)

$\rightarrow \text{TOC}_{\text{Gesamt}} - \text{TOC}_{\text{Methanol}} = \text{TOC}_{\text{Butanol}} = 0,24\text{g/l}$

$\rightarrow 0,24\text{g/l} : 12\text{g/mol} = 0,02\text{mol/l}$ (entspricht $n(\text{Kohlenstoff})$ der in Butanol gebunden ist)

\rightarrow Butanol hat die Formel $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ und somit 4 C-Atome pro Molekül

$\rightarrow 0,02\text{mol/l} : 4 = 0,005\text{mol/l}$

\rightarrow ein Butanol wiegt: $4*12 + 9 + 16 + 1 = 74\text{g/mol}$

$\rightarrow 0,005\text{mol/l} * 74\text{g/mol} = 0,37\text{g/l}$

\rightarrow in der Lösung ist eine Massenkonzentration $c(\text{Butanol}) = 370\text{mg/l}$ enthalten

28. Eine wässrige Lösung enthält unbekannte Konzentrationen der beiden Stoffe Phenol und Ethanol. Bei den Messungen zur **TOC Bestimmung** ergaben sich folgende Ergebnisse.

TOC: 0,488g/l

Eine zusätzlich durchgeführte GC-Analyse erbrachte für $c(\text{Ethanol}) = 0,7\text{g/l}$.

Erläutern Sie die Messergebnisse kurz und bestimmten Sie die Massenkonzentration an Phenol $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$!

TOC = total overal C (Kohlenstoff)

$$c(\text{Ethanol}) = 0,7\text{g/l}$$

Ethanol hat die Strukturformel C_2H_5OH mit den Gewichten $C=12$, $O=16$, $H=1$

→ ein Methanolköleöl wiegt somit 46g/mol

→ $c(\text{Ethanol}) = 0,7\text{g/l}$ das entspricht $n(\text{Ethanol}) = 0,01522\text{mol/l}$

→ $n(\text{Ethanol}) = 0,01522\text{mol/l}$ entspricht $0,030434\text{mol/l}$ an C-Atomen (weil 2 C-Atome pro Ethanol!)

→ $\text{TOC}_{\text{Ethanol}} = 0,030434\text{mol/l} * 12\text{g/mol} = 0,36522\text{g/l}$ (mal 12, weil im TOC nur nach Masse von C gefragt ist)

→ $\text{TOC}_{\text{Gesamt}} - \text{TOC}_{\text{Methanol}} = \text{TOC}_{\text{Butanol}} = 0,12278\text{g/l}$

→ $0,12278\text{g/l} : 12\text{g/mol} = 0,1023\text{mol/l}$

→ Phenol hat die Formel C_6H_5OH und somit 6 C-Atome pro Molekül

→ $0,1023\text{mol/l} : 6 = 0,001705\text{mol/l}$

→ ein Phenol wiegt: 94g/mol

→ $0,001705\text{mol/l} * 94\text{g/mol} = 0,1603\text{g/l}$

→ in der Lösung ist eine Massenkonzentration $c(\text{Phenol}) = 160,3\text{mg/l}$ enthalten

29. Skizzieren Sie kurz drei Aspekte, deretwegen reines **Silicagel** nicht universell als stationäre Phase in der Flüssigchromatographie eingesetzt werden kann!

Silicagel geht nicht bei:

- Ionenchromatographie da hier die stationäre Phase geladen sein muss
- Verteilungschromatographie da hier die stationäre Phase aus hydrophilen bzw. lipophilen Trägern bestehen muss
- Affinitätschromatographie da hier die stationäre Phase aus Affinitätsträgern mit spezifischen Liganden bestehen muss

30. Im Verlauf einer Analyse (Messung mittels **GC-FID**) haben Sie einen Substanzpeak erhalten, der dem toxischen Stoff Pentachlorphenol entsprechen könnte. Schildern Sie kurz drei verschiedene Möglichkeiten, diesen Befund zusätzlich abzusichern (ohne spektroskopische Hilfsmittel).

→ Parallelschaltung zweier verschiedener Detektoren:

- das Säuleneluat wird am Säulenausgang aufgesplittet und zwei unterschiedlichen Detektoren zugeleitet
- man erhält zwei Chromatogramme mit direkt vergleichbaren Retentionszeiten
- hier z.B. FID und ECD

→ Kopplung zweier unterschiedlicher, polarer GC Säulen mit je einem Detektor des selben Typs

- diese Kombination nutzt die Tatsache, dass zwei unterschiedliche Substanzen zwar auf einer, kaum jedoch auf zwei verschiedenen polaren GC-Säulen identische Retentionszeiten besitzen können.
- Gasförmige Probe nach der Injektion auf zwei GC-Säulen verteilen (mittels Splitter) und die getrennten Komponenten beide Male mit FID registrieren

→ „Heart Cut Technik“ (live-Schaltung)

- für sehr peakreiche Proben

31. **Richtigkeit – Reproduzierbarkeit – Wiederholbarkeit**

a. Wie sind diese Begriffe definiert?

b. Bei welcher analytischen Fragestellung spielen diese Begriffe eine Rolle?

a. Richtigkeit: Erreichen eines vorgegebenen Analyseergebnisses an sog. zertifiziertem Referenzmaterial

Reproduzierbarkeit: Reproduzierbare Ergebnisse bei wiederholter Analyse der Probe an verschiedenen Geräten mit verschiedenen Personen.

Wiederholbarkeit: Reproduzierbare Ergebnisse bei wiederholter Analyse der Probe am selben Gerät unter identischer Person und Bedingung.

b. Wichtige Größen bei quantitativen Analysen (100%-Methode, ESTD, ISTD, Standardadditionsmethode)

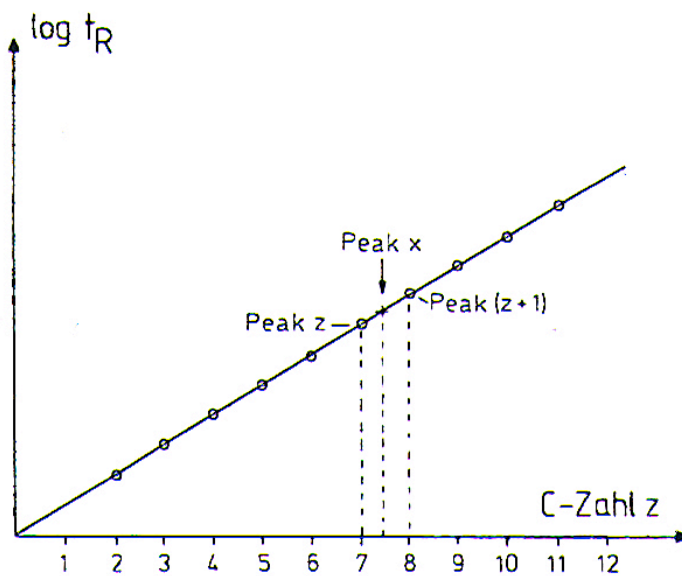
- Fragestellung der Qualitätskontrolle und Umweltanalytik

- Bestimmung der Reinheit eines zuvor synthetisierten oder sonst wie isolierten Stoffes
- Qualitätskontrolle chemischer Produkte
- Bestimmung von enthaltenen Substanzen in Proben

32. a. Was versteht man unter dem System der **Koväts-Indices**?
 b. Skizzieren Sie kurz die Vorgehensweise zur Ermittlung solcher Indizes!

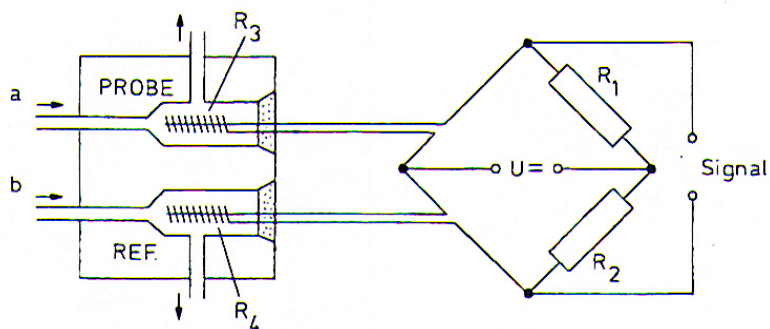
- a.
- Ausarbeitung eines Indexsystem auf Basis der Retentionszeiten von linearen unverzweigten Kohlenstoffen (Alkanen)
 - Nachteil (schwankende Retentionszeiten auf Grund schlechter Qualität früherer GC-Säulen) bei der Identifizierung von Substanzen wird eliminiert

b.



33. a. Was ist ein **WLD**? Und wo setzt man ihn ein?
 b. Skizzieren Sie seinen Aufbau und seine Funktionsweise.

- a. Ein **Wärmeleitfähigkeitsdetektor**. Einsatz in der GC.
 b.



a: GC-Säulenausgang

b: Referenzeingang (reines Trägergas)

Funktionsweise:

- Ausnutzung unterschiedlicher Wärmeleitfähigkeitsvermögen verschiedener gasförmiger Stoffe
- Die Detektorzelle ist zweigeteilt. Jede Teilzelle ist mit zwei geheizten Widerstandsdrähten versehen, die vom Trägergas umspült werden
- Teilzelle 1 wird vom Säuleneluat durchströmt, die Referenzzelle 2 nur vom reinen Trägergas
- Die Widerstandsdrähte sind in einer Art Wheatstone'sche Brücke zusammengeschaltet und bei reinem Trägergasstrom durch beide Zellen auf 0 abgeglichen (Stromlos)
- Wird nun eine gasförmige Substanz aus der GC-Säule in den Detektor eluiert, so wird dem Widerstandsdraht in Zelle 1 eine geringfügig andere (höhere oder niedrigere) Wärmemenge entzogen, als wenn reines Trägergas durch die Teilzelle strömen würde
- Dadurch wird der Nullabgleich der Wheatstone'schen Brückenschaltung aufgehoben und es fließt ein Strom durch das System, der verstärkt und als chromatographischer Peak registriert wird.
- Auf Grund der Tatsache, dass eine eluierte Substanz eine höhere oder niedrigere Wärmeleitfähigkeit besitzen kann als das reine Trägergas, erhält man positive und negative Signale, die durch eine geräteinterne Aufbereitung allerdings alle als normale Peaks erscheinen.

34. Linearität – Drift – Empfindlichkeit

- was versteht man unter all diesen Größen?
- Bei welchen analytischen Fragestellungen spielen sie jeweils eine besondere Rolle?
- Wie müssen Sie in der Praxis auf diese Parameter reagieren.

a.

Linearität:

- der ideale Detektor gibt sowohl bei großen als auch bei kleinen Konzentrationen eines bestimmten Analyten ein Signal, dessen Größe der eingespritzten Menge proportional ist
- diese Linearität ist bei realen Detektor nicht unendlich groß. Vielmehr ist die Antwort auf eine gerade eluierende Komponente nur in einem bestimmten Bereich linear

Drift:

- mehr oder weniger zeitl. Abweichung der Basislinie
- in seltenen Fällen während eines ganzen Chromatographie-Tages ideal waagrechter Verlauf

Empfindlichkeit:

- Höhe des Basislinienrauschens (Noise) legt die erreichbare Empfindlichkeit fest.

b.

Linearität: wichtig für quantitative Analysen

Drift: problematisch bei der Spurenanalyse

Empfindlichkeit: wichtig für quantitative Analysen

c.

Linearer Bereich: Konzentration muss in diesem Bereich liegen

Drift: Zu hohe Drift weist auf eine Verunreinigung des Systems hin → Reinigen/Erneuern

Empfindlichkeit: Steigerung der Empfindlichkeit durch Einsatz von Photoreaktoren

35.

- Welche prinzipiell denkbaren Möglichkeiten gibt es, um ein **Enantiomerenpaar** mit Hilfe der **HPLC** in die beiden Einzelisomere zu trennen?
- Welchen Weg beschreibt man in der Praxis?
 - optisch aktive Hilfssubstanz in der mobilen Phase (teuer! Viel benötigt)
 - Oberfläche der stationären Phase mit enantiomeren reinen Substanzen belegen
→ unterschiedlich starke Wechselwirkungen der Enantiomere mit der Oberfläche
→ 2 Peaks

b. den zweiten Weg ii

36. Die Methode des internen Standards (**ISTD**):

- a. Wann setzt man sie ein?
 - b. Schildern Sie kurz die Vorgehensweise in der Praxis!
 - c. Welche Randbedingungen müssen Sie berücksichtigen?
- a. Sie kommt zum Einsatz, wenn aufgrund von Matrixproblemen eine Probe einem sehr aufwändigen Aufreinigungsprozess unterzogen werden muss.
- b. – Um die Verluste quantitativ zu erfassen und ins Endergebnis einzurechnen setzt man in der Urprobe eine bekannte Substanz in bekannter Menge zu. Diese Hilfssubstanz (interner Standard) durchläuft alle Schritte bis zur messfertigen Lösung.
- Bei der anschließenden Messungen wird über eine zuvor durchgeführte Kalibrierung der Verlust an Hilfssubstanz quantitativ erfasst.
- Verlust an Hilfssubstanz = Verlust Probensubstanz (Kalibrierung mit Standardlösung + interner Substanz)
- c. – ISTD sollte der Zielkomponenten ähnlich sein (z.B. Benzol und Toluol)
- ähnliche t_{RS} für Zielkomponente und ISTD
 - keine Überlagerung mit Zielkomponenten im Chromatogramm
 - ähnliches response wie Zielkomponente
 - soll auch keine anderen Peaks überlagern
 - soll hohe und bekannte Reinheit
 - ISTD sauber! → keine Verunreinigung der Probe