

VERSUCH:
HPLC



1 Versuch HPLC

1.1 Aufbau und Funktionsprinzip einer HPLC-Anlage

1.1.1 Einführung:

Der Name Chromatographie geht auf die frühen Anfänge dieser Technik zurück, bei denen verschiedene Farbstoffgemische getrennt wurden. Tswett, der als Begründer der modernen Chromatographie gilt, benutzte ab 1906 als erster die Begriffe Chromatographie und Chromatogramm. Chromatographie bedeutet wörtlich "Farbschreibung".

Nach einer längeren Entwicklung entstand in den letzten Jahrzehnten die modernste Form der chromatographischen Trenntechnik, die Hochleistungs- bzw. Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Die Abkürzung HPLC kommt aus dem Englischen (**H**igh **P**erformance (**P**ressure) **L**iquid **C**hromatography).

1.1.1.1 Prinzip der Chromatographie

Bei allen chromatographischen Verfahren werden Stoffgemische in Einzelkomponenten aufgetrennt. Allen Chromatographiearten ist gemeinsam, daß ein Lösungsmittel (oder Gas), die mobile Phase, an einer unbeweglichen stationären Phase vorbeiströmt. Besitzen die Komponenten unterschiedliche Affinität zur stationären bzw. mobilen Phase, können sie getrennt werden. Komponenten, welche schwächer an die stationäre Phase gebunden werden, von der mobilen Phase stärker mitgerissen und verlassen die stationäre Phase früher. Umgekehrt wandern Probenbestandteile, welche stark an die stationäre Phase gebunden werden, langsamer.

1.1.1.2 Anwendungsgebiete der HPLC

Die HPLC ist ein sehr vielseitig einsetzbares Analyseninstrument. Anwendung findet die HPLC unter anderem in folgenden Bereichen:

- Lebensmittelanalytik
- Umweltüberwachung
- Klinische Chemie
- Medizinische Forschung
- Biochemie
- Prozesskontrolle in verschiedenen industriellen Zweigen

Gegenüber der Gaschromatographie hat die HPLC folgende Vorteile: Es können Substanzen untersucht werden, die nicht flüchtig sind bzw. nicht unzersetzt verdampfbar sind. Meistens sind die Trennzeiten bei der HPLC geringer. Die Gaschromatographie bleibt, trotz der Fortschritte der HPLC in den letzten Jahren, eine unverzichtbare und vielseitige Analysetechnik.

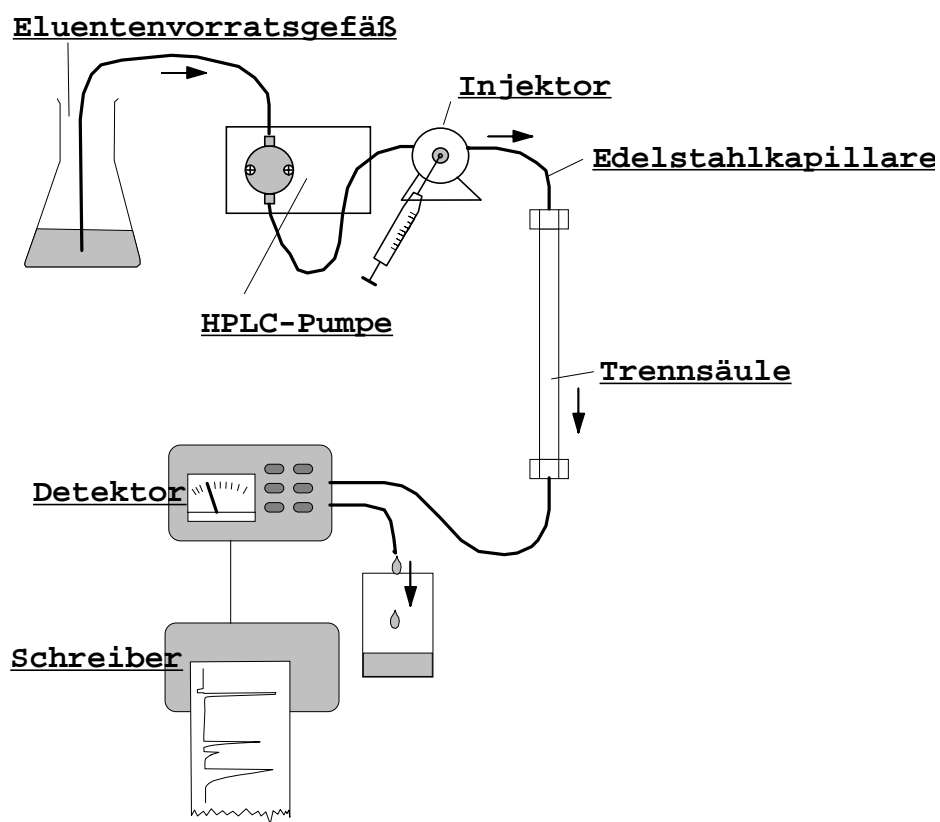
1.1.2 Geräteaufbau:

1.1.2.1 *Aufbau einer HPLC-Anlage:*

Ein HPLC-Gerät besteht im allgemeinen aus folgenden Teilen:

- Eine oder mehrere Kolbenpumpen
- Injektor
- Trennsäule
- Detektor
- Schreiber oder Integrator bzw. Rechner (Bei den modernen HPLC-Geräten übernimmt der Rechner nicht nur die Aufnahme und Verarbeitung der Meßdaten, sondern steuert die gesamte HPLC.)

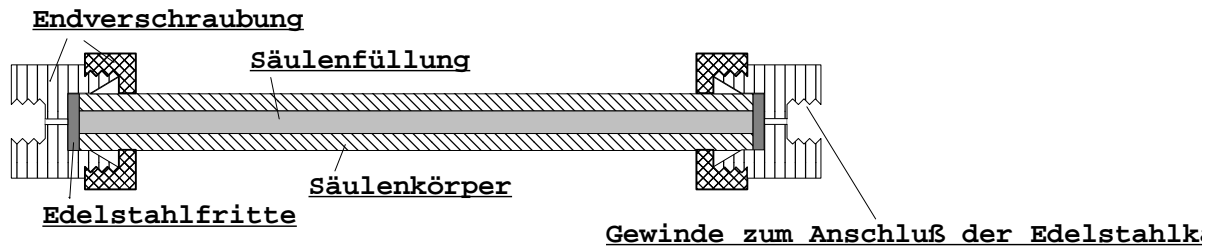
Prinzipieller Aufbau einer HPLC



1.1.2.2 Die Trennsäule:

Trennsäulen für analytische Zwecke sind meist Stahlrohre mit einem Innendurchmesser von 2-5mm, die mit der stationären Phase gefüllt sind. An das Material des Rohres werden besondere Anforderungen gestellt. Es muß korrosionsbeständig sein, hohen Drücken standhalten und chemisch inert gegenüber den zu trennenden Substanzen sein. Gelegentlich werden auch Trennsäulen aus Glas oder Kunststoff verwendet. Da die meisten Säulenfüllungen empfindlich gegen Druckstöße sind, sollte die Förderrate der Pumpe nicht abrupt geändert werden.

Aufbau einer Trennsäule



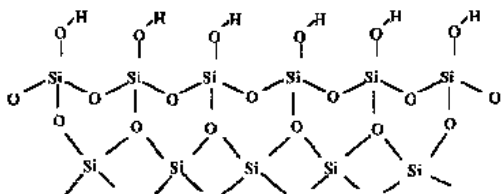
1.1.2.3 Säulenfüllmaterialien:

Das am meisten verwendete Füllmaterial für Trennsäulen ist chemisch verändertes Kieselgel. Kieselgel besteht aus dreidimensional vernetztem SiO_2 , wobei die freien Enden durch OH-Gruppen abgeschlossen werden. Hergestellt werden Silikagele durch saure Hydrolyse von geeigneten Siliziumverbindungen wie z.B. Natriumsilikat. Es entsteht dabei Monokieselsäure, die durch Kondensation (= Wasserabspaltung) Polykieselsäure bildet.

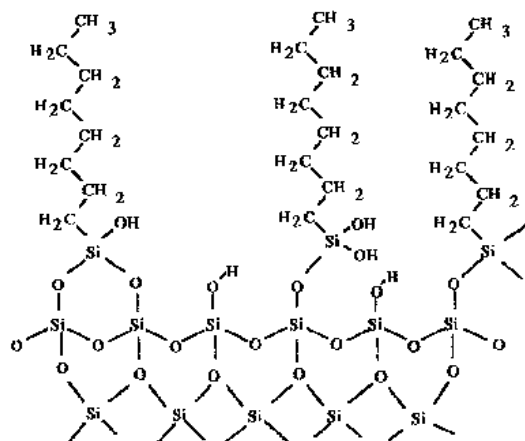
Meistens wird in der HPLC kein reines Kieselgel verwendet, sondern chemisch modifiziertes. Durch ein geeignetes Reagenz wird an die freien OH-Gruppen ein organischer Rest angekoppelt. Die meistens verwendeten Säulenfüllmaterialien sind sogenannte Reversed Phase Kieselgele. (Bei der klassischen Chromatographie wird als stationäre Phase polares, chemisch nicht verändertes Kieselgel verwendet und als mobile Phase ein unpolares Lösungsmittel. Bei Reversed-Phase Materialien werden Kohlenwasserstoffketten an die OH-Gruppen gebunden, wodurch das Kieselgel unpolar wird. Als mobile Phase werden polare Lösungsmittelgemische verwendet.) Reversed Phase Säulen zeigen gegenüber den normalen Kieselgelfüllungen höhere Trennleistungen und höhere Belastbarkeit.

Da die Trennleistung einer Säule mit sinkender Teilchengröße der stationären Phase zunimmt, haben die heute verwendeten Säulenfüllmaterialien eine Korngröße zwischen $4\mu\text{m}$ und $10\mu\text{m}$ bei einer engen Korngrößenverteilung. Da die Teilchen in einer Säule dicht gepackt sind, ergeben sich hohe Strömungswiderstände, so daß bei den üblichen Fördermengen der mobilen Phase von 0,5-2ml/min Drücke zwischen 80 und 200bar entstehen.

Kieselgeloberfläche mit Silanolgruppen



Chemisch Modifiziertes Silikagel Reversed-Phase Material (C8-Typ)





1.1.2.4 Chromatographiearten

Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und Probenkomponenten unterscheidet man folgende wichtige flüssigchromatographische Verfahren:

1.1.2.4.1 Adsorptionschromatographie:

Als stationäre Phase dient ein relativ polares Material mit großer spezifischer Oberfläche (als Adsorbens wird meistens Silikagel verwendet, wobei die auf der Oberfläche sitzenden Silanolgruppen die aktiven Zentren darstellen). Als mobile Phase werden Lösungsmittel verwendet, die gegenüber der stationären Phase unpolar sind. Polare Substanzen werden stärker an die stationäre Phase adsorbiert und eluieren später als unpolare Stoffe. Die Methode wird angewendet: zur Trennung unterschiedlich polarer organischer Substanzen.

1.1.2.4.2 Chromatographie mit Phasenumkehr (Reversed Phase Chromatographie):

Hier sind die Verhältnisse genau umgekehrt wie bei der Adsorptionschromatographie. An die Silanolgruppen des Silikagels werden chemisch unpolare Alkanreste (C8 oder C18) gebunden. Der Eluent ist polar und besteht meistens aus einem Gemisch von Methanol oder Acetonitril und Wasser. Die Methode wird ebenfalls zur Trennung unterschiedlich polarer Moleküle angewendet.

Gegenüber der "normalen" Adsorptionschromatographie besitzt die reversed Phase Chromatographie einige Vorteile: Höhere Trennleistung und Reproduzierbarkeit. Die Trennsäulen lassen sich mit größeren Stoffmengen belasten.

1.1.2.4.3 Chromatographie an chemisch gebundenen Phasen:

Durch geeignete chemische Umsetzungen lassen sich an die Silanolgruppen des Silikagels organische Reste koppeln. Auf diese Weise lassen sich die Eigenschaften der Trennsäulen in weiten Bereichen gezielt verändern. Die Reversed Phase Chromatographie stellt den wichtigsten Spezialfall dieser Technik dar.

1.1.2.4.4 Sonstige:

Es gibt noch eine Reihe von anderen speziellen Chromatographiearten, die durch andere physikalisch-chemische Wechselwirkungen zwischen mobiler Phase, stationärer Phase und Probenmolekülen eine Trennung der Probenkomponenten bewirken.

Eine industriell wichtige Abart der HPLC ist die präparative HPLC. Mit ihr können Substanzen in größerem Maßstab gereinigt werden, die auf andere Art und Weise nicht leicht voneinander trennbar oder sehr instabil sind. (z.B. Trennung der seltenen Erden, Reinigung und Trennung von Proteinen und Peptiden).

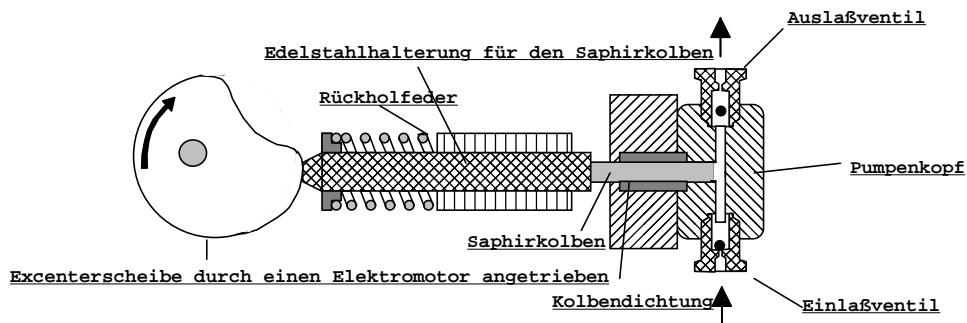
1.1.2.5 Die Kolbenpumpe

Die HPLC-Pumpe hat die Aufgabe, die mobile Phase durch die Trennsäule zu fördern. Folgende Forderungen werden an eine derartige Pumpe gestellt:

1. Ausreichende Förderleistung
2. Geringe Pulsation, um eine stabile Detektion zu erreichen.
3. Konstante Förderleistung, um die Trennungen reproduzierbar zu machen
4. Geringes Innenvolumen, um schnelle Gradientenbildung zu ermöglichen
5. Druckstabilität, da je nach Säulenfüllung hohe Drücke bis 400bar auftreten können.

Der überwiegend eingesetzte Pumpentyp ist die Kurzhub-Kolbenpumpe. Da die Pumpen hohen Belastungen ausgesetzt sind, unterliegen sie starkem Verschleiß.

Aufbau einer Kurzhubkolbenpumpe



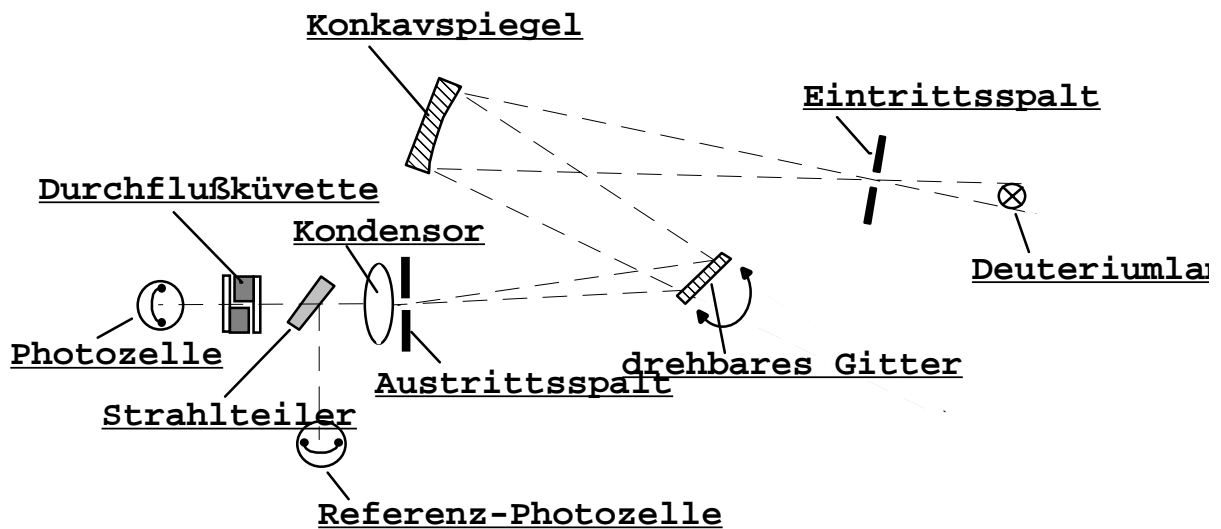
Zur Dämpfung der störenden Pulsation werden meist zwei Pumpen verwendet die phasenverschoben arbeiten

1.1.2.6 Detektoren

Der Detektor erfäßt Änderungen in der Zusammensetzung der mobilen Phase. Hierzu werden meßbare physikalisch-chemische Eigenschaften der Probenkomponenten, wie Brechungsindex, Lichtabsorption, Fluoreszenz, Leitfähigkeit, in elektrische Signale umgewandelt. Die Signale werden dann von einem Schreiber oder Rechner registriert.

Die wichtigsten Detektoren der HPLC sind die UV-Detektoren. Es gibt Festwellenlängen-Detektoren, Detektoren mit variabler Detektionswellenlänge und Diodenarraydetektoren zur Erfassung eines größeren Wellenlängenbereichs. UV-Detektoren messen die Schwächung der UV-Strahlung durch Probenkomponenten bei einer fest einzustellenden Wellenlänge.

Prinzip eines HPLC-UV-Detektors mit variabler Well





1.1.2.7 Injektoren

Injektoren für die HPLC müssen hohen Drücken standhalten und eine exakt reproduzierbare Probenmenge auf die Trennsäule bringen können. Hierzu werden heutzutage nur noch Injektoren mit Dosierschleife verwendet.

Funktion:

Injektoren bestehen aus einem 6-Wegventil und der Injektionsschleife, wobei das Ventil in zwei Positionen (1. Befüllen der Schleife (LD oder Load-Position; 2. Analysenbetrieb (INJ oder Injekt-Position) geschaltet werden kann. In der ersten Position kann die Schleife mit Probe befüllt werden, wobei Pumpe und Trennsäule direkt miteinander verbunden sind. Durch das Umschalten des Ventils in die Arbeitsposition wird die Schleife zwischen Pumpe und Säule geschaltet und die Probe wird durch den Eluenten auf die Säule befördert. Die Dosierschleife wird mittels einer Spritze befüllt, wobei mindestens das 5-fache des Dosierschleifenvolumens verwendet werden muß, um den Eluenten vollständig durch die Probenlösung zu verdrängen. Um stärkere Druckstöße zu vermeiden, sind Injektionsventile zügig zwischen den beiden Positionen zu schalten.

1.2 Die Auswertung von Chromatogrammen.

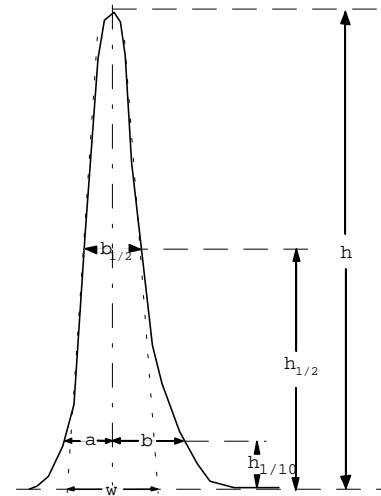
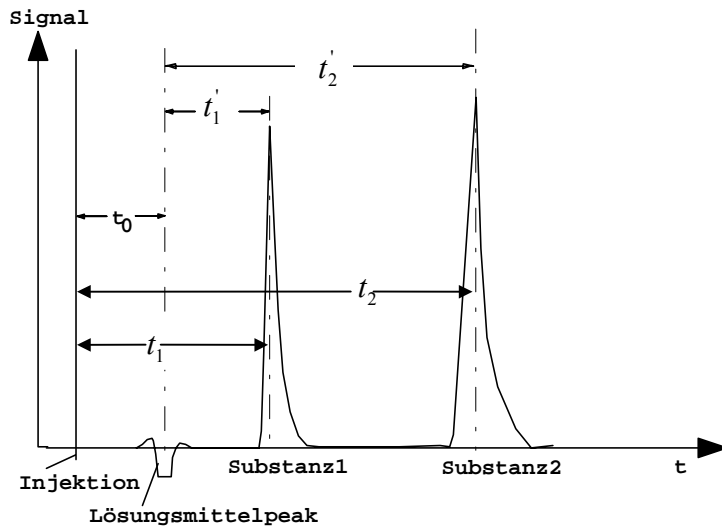
1.2.1 Qualitative Auswertung

Anhand der Rückhaltezeiten (Retentionszeiten) können die im Probengemisch enthaltenen Substanzen identifiziert werden (unter gleichen Bedingungen: d.h. gleiche Säule, gleiche Eluentenzusammensetzung und gleiche Förderrate der Pumpe). Die Retentionszeit setzt sich aus der Totzeit und der Netto-Retentionszeit zusammen. Die Totzeit ist diejenige Zeit, die Substanzen, die nicht mit der stationären Phase wechselwirken, benötigen, um in den Detektor zu gelangen. Die Totzeit kann angenähert durch die Zeit des Lösungsmittelpeaks ersetzt werden.

1.2.2 Quantitative Auswertung eines Chromatogramms

Bei allen Verfahren, bei denen ein zeitabhängiger Massen- bzw. Stoffmengenstrom auftritt, wird zur Quantifizierung die Peakfläche verwendet. Die Peakfläche ist im linearen Arbeitsbereich des Verfahrens der Konzentration bzw. Stoffmenge direkt proportional. Man vergleicht daher die Peakflächen von Standardlösungen bekannter Zusammensetzung mit den entsprechenden Peakflächen der Probenchromatogramme. Die Peakflächen können, sofern kein Rechner zur Datenaufnahme und Verarbeitung zur Verfügung steht, folgendermaßen ermittelt werden:

1. Man ermittelt Höhe und Halbwertsbreite (Breite des Peaks auf halber Höhe) und multipliziert sie miteinander. Diese Methode kann bei stark asymmetrischen Peaks nicht mehr verwendet werden.
2. Auszählen von Kästchen auf Millimeterpapier. (Diese Methode ist sehr zeitaufwendig.)
3. Ausschneiden der Peaks und Wägung auf einer Analysenwaage. (sehr zeitaufwendig).
4. Flächenbestimmung unter Verwendung eines Planimeters.



t_0 : Totzeit

t_i : Retentionszeit von Substanz 1,2,3,.....

t_i' : Nettoretentionszeit der Substanz 1,2,3,.....

h : Höhe des Peaks

$h_{1/2}$: Halbwertshöhe

$h_{1/10}$: 10% der Höhe

$b_{1/2}$: Halbwertsbreite

w : Basisbreite

a : Abstand von der aufsteigenden Flanke zum Zentrum des Peaks (bei $h_{1/10}$ zu bestimmen)

b : Abstand vom Zentrum des Peaks zur fallenden Flanke (bei $h_{1/10}$ zu bestimmen)

1.2.3 Beurteilung der Trennleistung einer Säule:

Zur Beurteilung der Güte einer Trennung können außer den Brutto-Retentionszeiten noch folgende Parameter herangezogen werden:

Der Kapazitätsfaktor k gibt an, in welchem Verhältnis die Aufenthaltszeiten der Substanz in stationärer und mobiler Phase stehen.

$$k_i' = \frac{t_i'}{t_0} = \frac{t_i - t_0}{t_0}$$

Die relative Retention α ist ein Maß für die Selektivität und das Auflösungsvermögen des Trennsystems.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} \quad \text{mit } k_2' > k_1'$$

Für zwei benachbarte Peaks gilt:

$\alpha = 1$: Keine Trennung möglich:

$\alpha = 1,5$: Trennung ist für quantitative Bestimmungen ausreichend.

Relative Retentionen über 1,5 gehen auf Kosten der Analysenzeit. Oft kann die Trennung dann noch optimiert werden.

Um die Trennleistungen zweier Säulen vergleichen zu können, können aus einem Chromatogramm die effektive Bodenhöhe und die effektive Bodenzahl einer Säule, bezogen auf eine bestimmte Substanz berechnet, werden.

Effektive Bodenzahl:

$$N_{\text{eff}} = 16 \cdot \left(\frac{t_i}{w} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_i}{b_{1/2}} \right)^2$$

Wenn die Säulenlänge L bekannt ist läßt sich die effektive Bodenhöhe:

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{16} \cdot \left(\frac{w}{t_i} \right)^2 = \frac{L}{5,54} \cdot \left(\frac{b_{1/2}}{t_i} \right)^2$$

1.2.3.1 Peakverbreiterung und Peakasymmetrie:

Theoretischen Überlegungen zufolge müßte ein chromatographischer Peak die Form einer Gaußkurve haben. Dies ist in der Praxis jedoch nie der Fall. Es treten in den meisten Fällen asymmetrische Peaks auf, wobei meist das Ende des Peaks verbreitert ist. Ein Maß für die Peakasymmetrie ist der Quotient aus den Abständen zwischen Peakende - Peakzentrum und Peakzentrum - Peakanfang, gemessen in 10% der Peakhöhe.

$$A_s = \frac{b}{a}$$

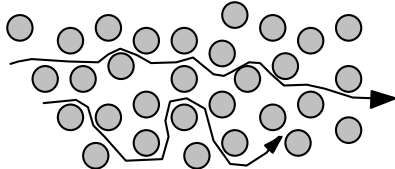
Man nennt diesen Effekt Tailing. Gute Trennsäulen haben einen A_s -Wert kleiner als 2,5

Gründe für extremes Tailing:

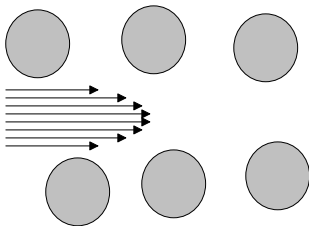
- Überladung der Trennsäule mit Probe
- Schlecht gepackte Trennsäulen
- Totvolumina im Trennsystem
- Schlecht an das Analysenproblem angepaßtes Trennsystem (falsche Säule und /oder falscher Eluent).

Eine Peakverbreiterung wird durch verschiedene Effekte hervorgerufen:

1. Streudiffusion: Beim Durchströmen der stationären Phase nehmen die Probenmoleküle unterschiedlich lange Wege.



2. Strömungsverteilung: In der Mitte von Strömungskanälen ist die Geschwindigkeit der mobilen Phase größer als am Rand der Kanäle.



3. In nicht durchströmten Poren der stationären Phase bewegen sich die Moleküle langsamer. Die Moleküle können nur durch Diffusion wieder in die strömende mobile Phase gelangen.

Um diese Effekte zu minimieren, müssen Säulenfüllmaterialien eine möglichst geringe Korngröße und Korngrößenverteilung haben.

1.3 Durchführung der Schmerzmittelanalyse mittels HPLC

1.3.1 Herstellung des Eluenten/Lösungsmittel

Folgende Lösungsmittel werden benötigt und müssen falls nicht in ausreichender Menge vorhanden, hergestellt werden:

1. Ein Gemisch aus 20 Vol.% Methanol und 80 Vol.% Wasser
2. Als mobile Phase(Eluent) und Lösungsmittel für Standard- und Probenlösungen wird etwa 1l eines Gemisches aus 97 Volumenteilen Methanol (20-%ig) und 3 Volumenteilen Eisessig benötigt.

1.3.2 Inbetriebnahme der HPLC

1. HPLC-Pumpe, Detektor und Rechnersystem einschalten.
2. Eluentenbehälter auffüllen
3. In 0,1ml/min - Schritten eine Flußrate von 0,4ml/min einstellen. Der Druck erreicht nach einigen Minuten 2000 psi.

1.3.3 Herstellung der Tablettenlösung:

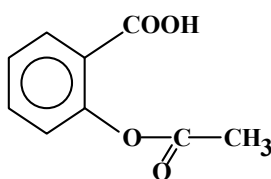
1. Eine Schmerztablette (Thomapyrin) wird in ein kleines Becherglas eingewogen. Anschließend wird die Tablette mit 20ml Eluent aufgeköcht. Man läßt die Mischung 5min stehen und kühlh danach auf Raumtemperatur ab. Die erhaltene Suspension wird in einen 50ml-Meßkolben überführt und das Becherglas wird 4-mal mit einigen ml Lösungsmittel nachgespült. Die Spüllösungen ebenfalls in den Meßkolben überführen. Den MK bis zur Marke auffüllen und gut schütteln.
2. Mit einem Teil der obigen homogenen Tablettensuspension werden zwei Zentrifugenröhrchen zu maximal 2/3 befüllt und beide Röhrchen zur Vermeidung von Unwuchten mit einer Präzisionswaage austariert (0,1g Genauigkeit genügen!). Bei 4000 Umdrehungen/Minute wird 5 Minuten lang zentrifugiert.
3. Mit einer Kolbenhubpipette 1ml der **klaren** Lösung aus einem Zentrifugenglas entnehmen und 1:50 verdünnen. Die verdünnte Lösung wird zur Analyse verwendet.

1.3.4 Herstellung der Standardlösungen

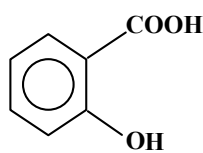
Benötigt werden jeweils 10ml dreier verschiedener Standardlösungen:

- Standardlösung I enthält: 50mg/l Paracetamol, 25mg/l Coffein und 50mg/l Acetylsalicylsäure
- Standardlösung II enthält: 100mg/l Paracetamol, 50mg/l Coffein und 100mg/l Acetylsalicylsäure
- Standardlösung III enthält 10mg/l Salicylsäure

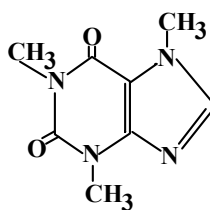
Strukturen der verwendeten Substanzen



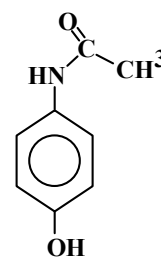
Acetylsalicylsäure



Salicylsäure



Coffein



Paracetamol (pharmazeutischer Name)
4'-Hydroxiacetanilid

1.3.5 Durchführung der Analyse

Zur Untersuchung der Hauptkomponenten wird das System folgendermaßen konfiguriert:

1. Detektor auf 275nm einstellen
2. Programm HPLCTOOL aufrufen und folgende Stauseinstellungen vornehmen:
 - Messbereich: 1.5V
 - Verzögerungszeit 200s
 - Wellenlänge 275nm
3. Datenaufnahme starten und Einstellen der Basislinie am Detektor. Nach der Einstellung Programm stoppen.

1.3.5.1 Untersuchung der Elutionsreihenfolge und Retentionszeiten der Substanzen

Zu 10ml Eluent werden 0,5ml der betreffenden Stammlösung zuaddiert. Nach jedem Additionsschritt wird ein Chromatogramm aufgenommen.

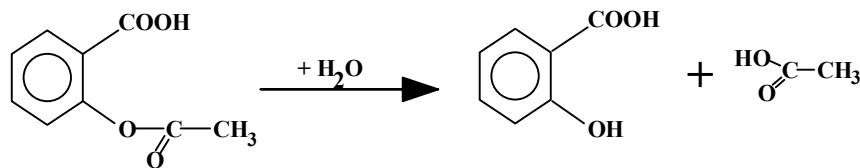
1.3.5.2 Quantitative Bestimmung der drei Hauptkomponenten

Das Gerät wird mit Standard I und II kalibriert; anschließend wird ein Chromatogramm der Tablettenlösung aufgenommen.

1.3.5.3 Untersuchung des Hydrolysegrades der Acetylsalicylsäure

Da die Acetylsalicylsäure in wäßrigem Medium hydrolytisch gespalten wird, muß der Gehalt an Salicylsäure in Standardlösung I, II und in der Tablettenlösung bestimmt werden.

Hydrolyse von Acetylsalicylsäure



Einstellungen:

1. Detektor: 305nm
2. Statusdefinitionen
 - Meßbereich: 0.15V
 - Wellenlänge: 305nm
3. Die Basislinie muß erneut eingestellt werden.



1.4 Hinweise zur Auswertung:

Wiederfindungsraten:

Paracetamol: 107%

Coffein: 103%

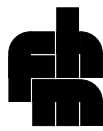
Acetylsalicylsäure: 104%

Bearbeiten sie folgende Aufgaben:

- a) Beschreiben Sie kurz das von Ihnen hier angewendete Analysenverfahren.
- b) Dokumentieren Sie die Probenvorbereitung und die verwendeten Geräte (Hersteller und Typ)
- c) Welche Retentionszeiten hatten die einzelnen Substanzen?
- d) Bestimmen Sie die Substanzkonzentrationen (von Acetylsalicylsäure, Paracetamol, und Coffein) in der verdünnten Tablettenlösung (im linearen Meßbereich ist die Peakfläche direkt proportional zur Konzentration.)
- e) Schätzen Sie die Streuung Ihrer Meßwerte mit Hilfe der 10-Punkt-Kalibrierung im Anhang 1 ab.
- f) Bestimmen Sie den Salicylsäuregehalt in Standard I, II und ihrer Tablettenlösung
- g) Führen Sie eine Korrektur der Acetylsalicylsäuregehalte mit Hilfe der Salicylsäuregehalte durch.
- h) Berechnen Sie den Substanzgehalt in mg (für alle drei Komponenten) der von ihnen verwendeten Tablette
 1. ohne Korrektur
 2. mit Korrektur des Acetylsalicylsäuregehaltes
 3. unter Verwendung der oben angegebenen Wiederfindungsraten.und vergleichen Sie Ihre Ergebnisse mit den Herstellerangaben. Berücksichtigen Sie bei Ihren Berechnungen Punkt e)
- i) Berechnen Sie den Anteil des Bindemittels in der Schmerztablette

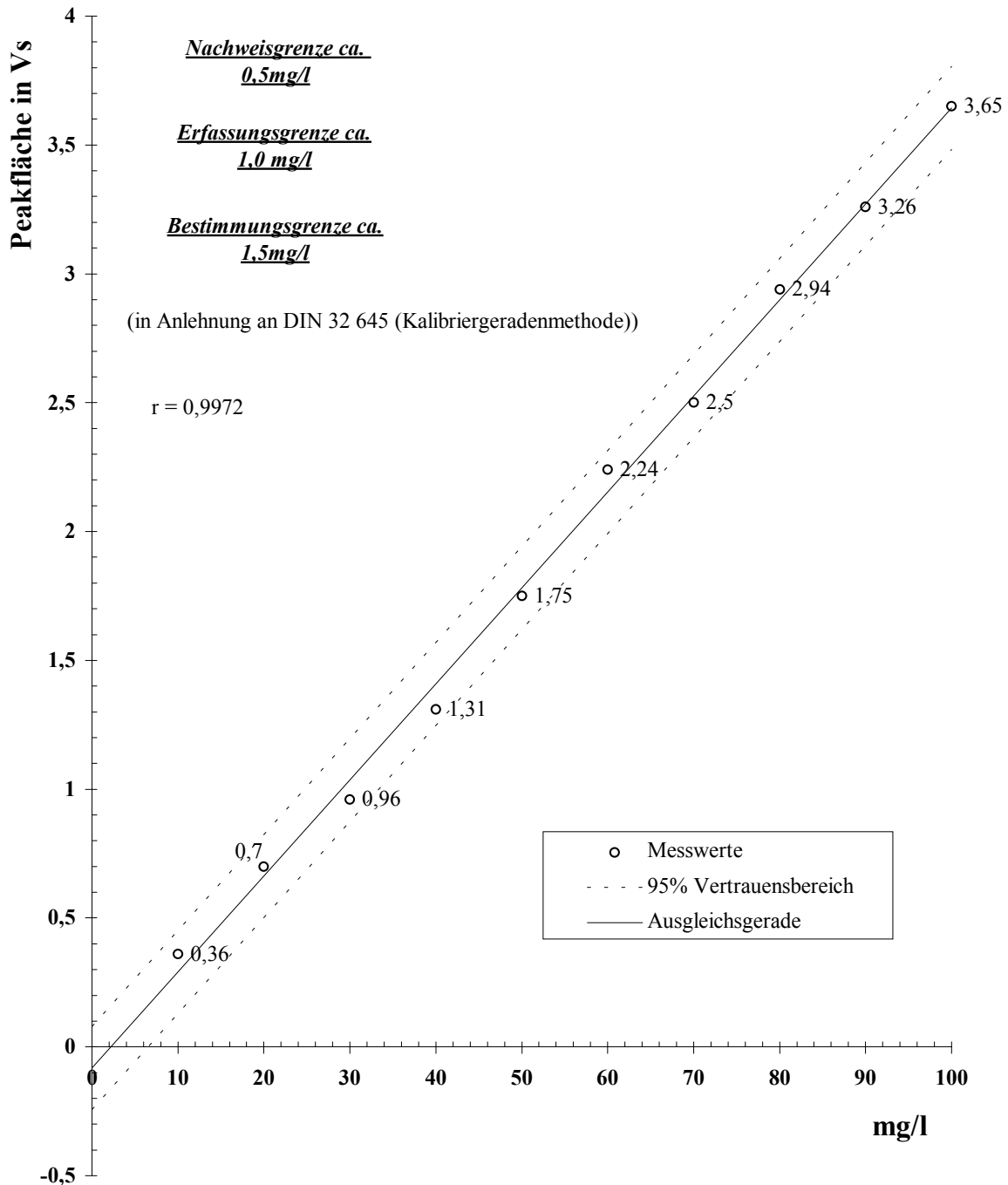
Literatur:

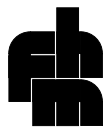
1. Meyer V.(1980), Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie; Diesterweg-Salle-Sauerländer Verlag, Frankfurt, Aarau
2. Otto Heisz, (1987) Hochleistungs-Flüssigkeits-chromatographie ABC der Meß- und Analysetechnik, Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg
3. Hans Naumer, Wolfgang Heller,(1986), Untersuchungsmethoden in der Chemie; Einführung in die moderne Analytik, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York



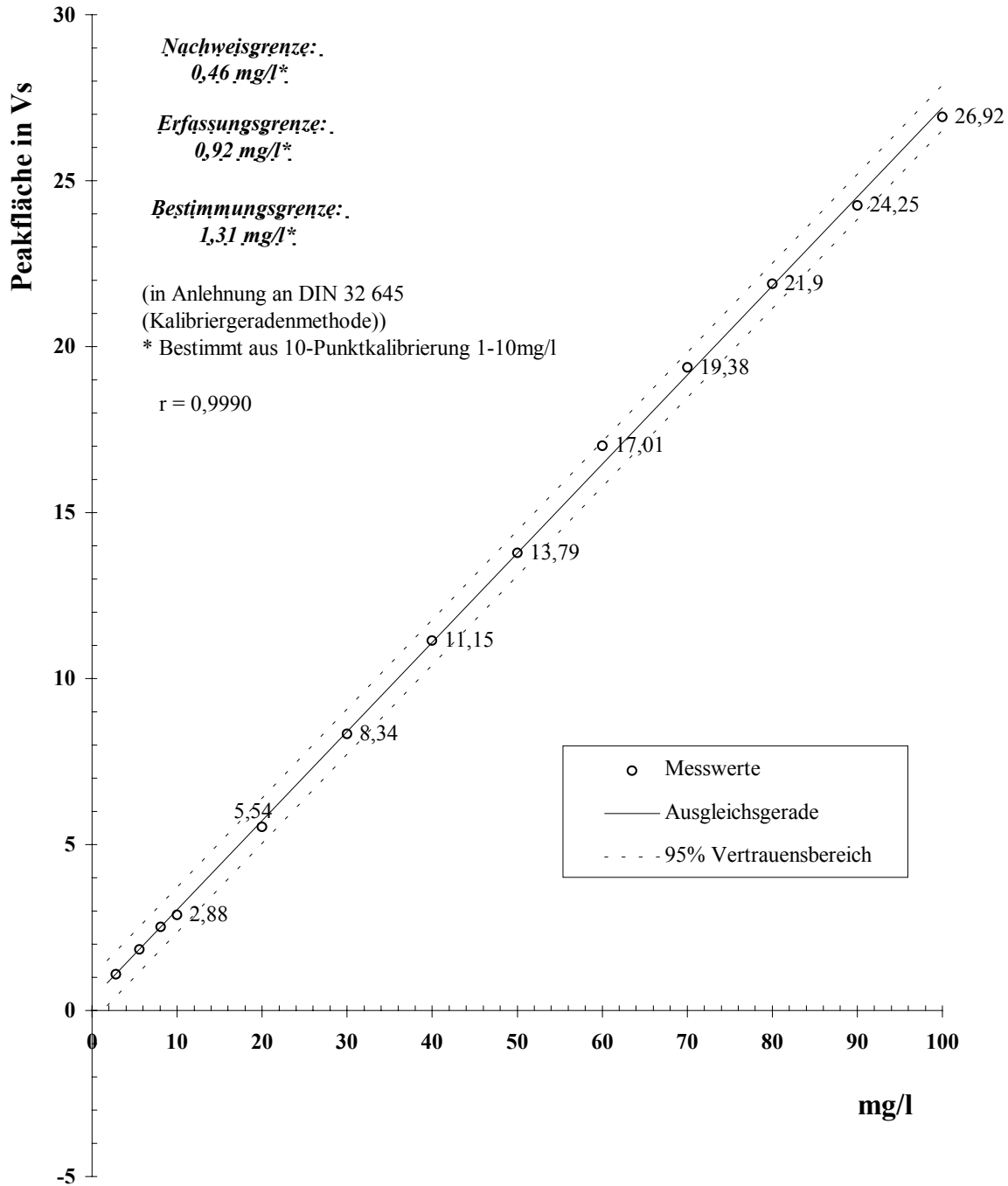
Anhang 1 (HPLC)

Acetylsalicylsäurebestimmung mittels HPLC Standard 10-100mg/l



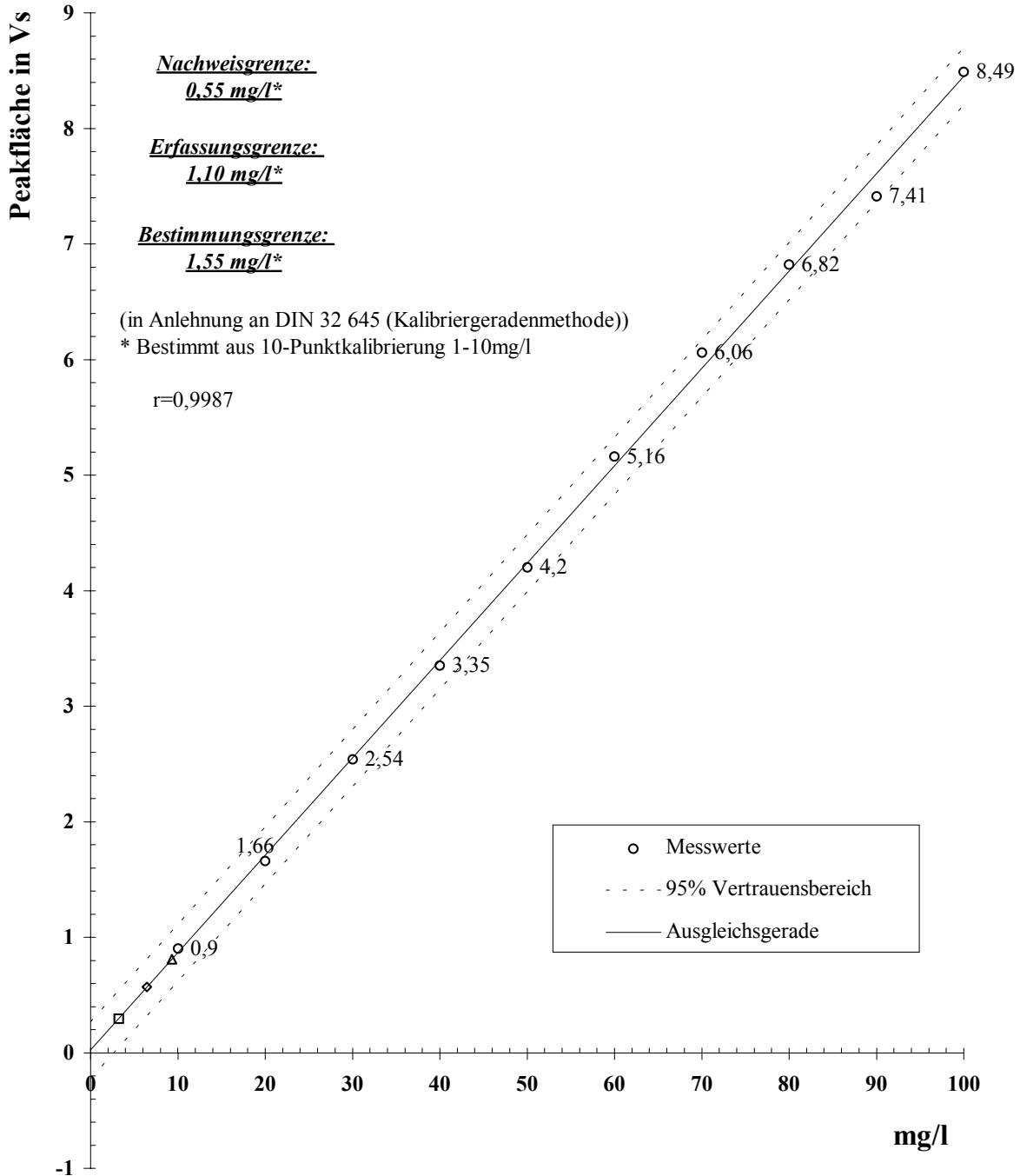


Coffeinbestimmung mittels HPLC Standard 10-100mg/l





Paracetamolbestimmung mittels HPLC Standard 10-100mg/l



Salicylsäurebestimmung mittels HPLC Standard 1-10mg/l

