

Instrumentalanalytisches Grundpraktikum

Versuch 2 - Umkehrphasen-HPLC von Wasserrückständen [1]

Autor: Florian KLUIBENSCHEDL

Bericht verfasst am: 15. Januar 2020

Versuchsdurchführung am: 07. Jänner 2020
Gruppe, Matrikelnummer: 6, 11805747
Lehrveranstaltung: Instrumentalanalytisches
Grundpraktikum
Institut: Analytische Chemie
Dozent, Betreuer: o.Univ.-
Prof.Mag.Dr.Dr.h.c.
Günther Bonn, MSc
Susanne Huber

Zusammenfassung

Motiviert durch die Zunahme an Medikamentenrückständen in Süßwasser, wird in diesem Experiment die qualitative und quantitative Zusammensetzung eines Pharmazeutika-Mix unter Verwendung einer Umkehrphasen-HPLC bestimmt. Durch Vergleich der Kapazitätsfaktoren der Probe mit jenen von zuvor bestimmten Standards wurde festgestellt, dass im Pharmazeutika-Mix Carbamazepin, Ibuprofen, Naproxen, Estron und Estradiol enthalten sind. Für die quantitative Bestimmung von Carbamazepin wurde die Methode des externen Standards gewählt. Das Ergebnis lautet: $c_{Probe} = (42.5 \pm 0.5) \text{ ppm}$ ($N = 15, m = 3, s_x = 0.241 \text{ ppm}, \alpha = 0.05$).

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 Ziel des Experiments | 3 |
| 2 Theoretische Grundlagen | 4 |
| 2.1 Aufbau der HPLC und Ablauf einer Analyse | 4 |
| 2.1.1 Probenaufgabe | 4 |
| 2.1.2 Lösungsmittel und Entgaser | 5 |
| 2.1.3 Pumpe und Gradientenentwicklung | 5 |
| 2.1.4 Trennsäule | 5 |
| 2.1.5 Detektor | 5 |
| 2.2 Trennmechanismen und stationäre Phasen | 6 |
| 2.2.1 Normalphasenchromatographie | 6 |
| 2.2.2 Umkehrphasenchromatographie | 6 |
| 2.3 Chromatographische Parameter | 6 |
| 2.4 Elutionsmechanismen der Umkehrphasenchromatographie | 7 |
| 2.4.1 Isokratische Elution | 7 |
| 2.4.2 Gradienten Elution | 8 |
| 2.5 Kalibrierung über einen externen Standard | 8 |
| 3 Praktischer Teil | 9 |
| 3.1 Geräteparameter | 9 |
| 3.2 Chemikalienliste | 9 |
| 3.3 Bestimmung einer optimalen Eluentenzusammensetzung | 10 |
| 3.4 Qualitative und quantitative Bestimmung von Wasserrückständen nach der Methode des externen Standards | 11 |
| 4 Ergebnisse und Auswertung | 12 |
| 4.1 Qualitative Bestimmung von Wasserrückständen und Berechnung chromatographischer Parameter | 12 |
| 4.2 Quantitative Bestimmung von Wasserrückständen nach der Methode des externen Standards | 13 |
| 5 Fazit und Diskussion | 15 |
| Literaturverzeichnis | 16 |
| Abbildungsverzeichnis | 16 |
| Tabellenverzeichnis | 16 |

1 Ziel des Experiments

Eine Studie konnte zeigen, dass die Medikamentenrückstände in Süßwasser weltweit deutlich gestiegen sind. Auch das Trinkwasser sei in manchen Gebieten betroffen. Kommen die Medikamente in Kontakt mit Ökosystemen, können sie dort erhebliche Schäden anrichten. Antibiotika beispielsweise zerstören Bakterien, welche für die Stabilität des Ökosystems von großer Bedeutung sind. Auch ist der Weg zur Entwicklung von Antibiotika-Resistenten Bakterien geebnet. [2] Ursachen für die Rückstände sind unter anderem natürliche Exkretion bzw. nicht fachgerechte Entsorgung. [1] Die Möglichkeit, Medikamentenrückstände in Wasser nachzuweisen, gewinnt deswegen zunehmend an Bedeutung.

Motiviert durch diese Probleme soll in diesem Experiment die Zusammensetzung eines Pharmazeutika-Mix sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt werden. Dies geschieht unter Verwendung einer Umkehrphasen-HPLC. Auch sollten die Grundlagen der Chromatographie erarbeitet werden.

2 Theoretische Grundlagen

Die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ist ein häufig verwendetes Trennverfahren. Die mobile Phase ist flüssig und durchströmt unter hohem Druck eine Säule, die die stationäre Phase enthält. Aufgrund von unterschiedlich starken Wechselwirkungen der in der mobilen Phase gelösten Substanzen mit der stationären Phase kommt es zur Trennung. [3]¹

2.1 Aufbau der HPLC und Ablauf einer Analyse

Eine HPLC besteht aus einer Vorrichtung zur Probenaufgabe, einer Vorrichtung zur Lagerung der Lösungsmittel inklusive Entgaser, einer Pumpe, einer Trennsäule, einem Detektor und einem Gerät zur Auswertung. Die einzelnen Bestandteile werden in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Der grundsätzliche Aufbau verändert sich bis auf die Trennsäule und den Detektor nicht. Diese können je nach Analyse ausgetauscht werden.

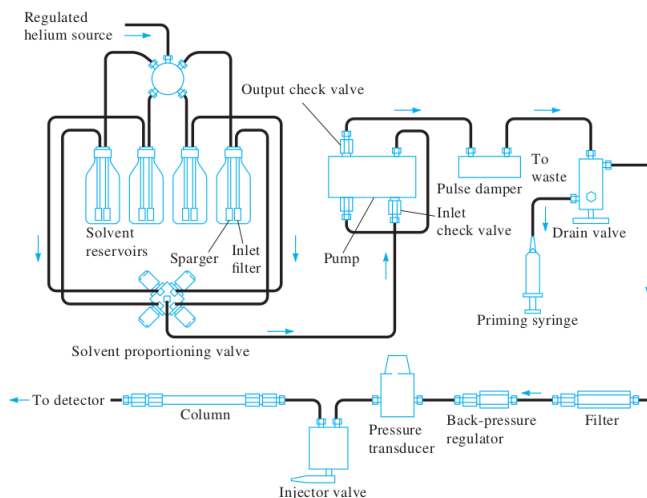


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer HPLC (Eigentum der PerkinElmer Corp., Norwalk, CT).

Im Folgenden werden die einzelnen Bestandteile näher beschrieben.

2.1.1 Probenaufgabe

Die Probenaufgabe erfolgt entweder manuell oder automatisch. Die manuelle Aufgabe wird heutzutage hauptsächlich bei präparativen Trennung verwendet. Bei der üblichen automatischen Aufgabe erfolgt die Injektion mit einer Spritze über ein 6-Wege Ventil. [3]

¹das ausgegebene Skript referenziert auf [4], [5] und [6] - im Folgenden wird aus Gründen der Einfachheit nur auf das Skript verwiesen

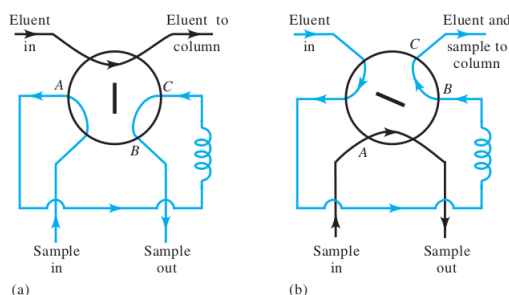


Abbildung 2: 6-Wege Ventil: in Position (a) wird die Probenschleife ACB gefüllt, in Position (b) wird die Probe mithilfe des Eluenten in die Säule überführt.

2.1.2 Lösungsmittel und Entgaser

Häufig wird eine Mischung aus mehreren Lösungsmitteln benötigt, um die Polarität der mobilen Phase besser einstellen zu können. Die Zusammensetzung wird über ein Umschaltventil oder durch Verwendung mehrerer Pumpen reguliert - siehe dazu Kapitel 2.1.3. Der Entgaser entfernt die restlichen Gasteilchen der Laufmittel, da diese die Messung beeinträchtigen können. [5, S. 749]

2.1.3 Pumpe und Gradientenentwicklung

Die Pumpe dient dazu, die mobile Phase unter hohem Druck durch die Trennsäule zu befördern. Man unterscheidet zwischen Hochdruck- und Niederdrucksystemen. Beim Hochdrucksystem wird pro Lösungsmittel eine Pumpe verwendet und durch Einstellung der jeweiligen Flussrate die Laufmittelzusammensetzung bestimmt. In einer Mischkammer werden die Lösungsmittel zum Eluenten vereinigt. Beim Niederdrucksystem reguliert ein Umschaltventil die Laufmittelzusammensetzung, wobei bis zu vier unterschiedliche Lösungsmittel gemischt werden. Die Gradientenentwicklung ist im Gegensatz zum Hochdrucksystem schwerfälliger, dafür wird nur eine Pumpe benötigt. [3]

2.1.4 Trennsäule

Die Trennsäule enthält die stationäre Phase. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen gepackten und monolithischen Säulen. Sie sollte folgenden Anforderungen genügen: hohe mechanische Festigkeit, chemische Stabilität, homogene Korngröße, Biokompatibilität, Resistenz gegen Mikroorganismen, keine unspezifischen Wechselwirkungen, hohe Selektivität und konstante Qualität. [3]

2.1.5 Detektor

Die Wahl des Detektors richtet sich an die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Analyten. In Verwendung sind z. B. Brechungsindex-Detektor (RI), Amperometrischer Detektor, Chemischer Reaktionsdetektor, Fluoreszenzdetektor (FLD), Massenspektrometer und Wellenlängendetektor (UV/Vis oder Diodenarray-Detektor, DAD). Im Experiment wird ein DAD verwendet. Dieser kann im Gegensatz zum UV/Vis Detektor die Absorption bei mehreren Wellenlängen gleichzeitig messen und liefert somit zu jedem Zeitpunkt ein vollständiges Chromatogramm. Damit lassen sich Rückschlüsse auf Strukturelemente machen. [7, S. 158]

2.2 Trennmechanismen und stationäre Phasen

Durch die unterschiedlich starken Wechselwirkungen der Analyten mit mobiler und stationärer Phase kommt es zu unterschiedlichen Verweilzeiten in der jeweiligen Phase und damit zur Trennung. Die Wahl der stationären Phase bestimmt die Art des Trennmechanismus. Man unterscheidet zwischen Normalphasen-, Umkehrphasen-, Affinitäts-, Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie. Bei der Normal- und Umkehrphasenchromatographie ist der Wechselwirkungsparameter die Polarität. Sie werden im Folgenden näher beschrieben, da die Umkehrphasenchromatographie im Experiment angewandt wurde.

2.2.1 Normalphasenchromatographie

Bei der Normalphasenchromatographie wird eine polare stationäre Phase (z. B. Al_2O_3 oder Kieselgel - hydrophile Oberfläche) und eine unpolare mobile Phase (z. B. organische Lösungsmittel wie *n*-Hexan) verwendet. Wird Kieselgel verwendet, sollte keine Base im Laufmittel sein, da diese die Silika-Bindungen auflöst. Die Retentionszeiten sind proportional zur Stärke der polaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase. [3]

2.2.2 Umkehrphasenchromatographie

Bei der Umkehrphasenchromatographie wird eine unpolare stationäre Phase (z. B. Kieselgel derivatisiert mit langen, unpolaren Kohlenwasserstoffketten - hydrophobe Oberfläche) und eine polare mobile Phase (z. B. Gemische von Wasser mit organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril) verwendet. Die Retentionszeiten sind proportional zur Stärke der hydrophoben Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Die Elutionsreihe beschreibt die Retention in absteigender Reihenfolge: Aliphaten > induzierte und permanente Dipole > Lewis Basen > Lewis Säuren. [1], [7, S. 162]

2.3 Chromatographische Parameter

Um den Trennvorgang sowie die Trennleistung einer Analyse bzw. einer Säule zu charakterisieren, hat sich eine Vielzahl an Kenngrößen und Parametern etabliert, die im Folgenden beschrieben werden.

Um die Position und das Aussehen eines Peaks zu beschreiben eignet sich die Totzeit t_0 (Zeit der Probe in der mobilen Phase), die Bruttoretentionszeit t_B (Zeit der Probe in mobiler und stationärer Phase), die Nettoretentionszeit t_R (Zeit der Probe in der stationären Phase - $t_R = t_B - t_0$), die Basispeakbreite w (Anlegen zweier Tangenten in 60 % Peakhöhe und Bestimmung des Abstandes der Schnittpunkte mit der Basislinie), die Halbwertspeakbreite $w_{1/2}$ (Peakbreite bei halber Höhe) und die Peaksymmetrie T ($T = B/A$ mit Abstand vom Peakanfang zum Peakmaximum A und Peakmaximum zu Peakende B in ca. 10 % der Peakhöhe). Ist T kleiner als 1, so spricht man von Fronting, ansonsten von Tailing. Im Idealfall liegt der Wert zwischen 0.8 und 1.2.

Wechselwirkungsvorgänge werden durch den Kapazitätsfaktor k (relative Verweildauer des Analyten in stationärer Phase - $k = t_R/t_0$), den Verteilungskoeffizient K ($K = c_S/c_M$ in Analogie zum Massenwirkungsgesetz) und die lineare Strömungsgeschwindigkeit v ($v = L/t_R$ mit Säulenlänge L) beschrieben.

Die Effizienz einer Trennsäule wird durch die theoretische Trennstufenhöhe (Bodenhöhe) H und die Anzahl an theoretischen Böden (Trennstufenzahl) N charakterisiert ($L = NH$). Die Anzahl an

theoretischen Böden ist ein Maß für die Anzahl an theoretischen Gleichgewichtseinstellungen des Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase und kann mit

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (1)$$

unabhängig von H und L berechnet werden. Die Bodenhöhe in Abhängigkeit von der linearen Strömungsgeschwindigkeit v wird durch die Van-Deemter Gleichung

$$H(v) = A + \frac{B}{v} + Cv \quad (2)$$

beschrieben (Beiträge der Eddy-Diffusion A , Longitudinaldiffusion B und des verzögerten Massentransfers C). Die Eddy Diffusion beschreibt die unterschiedlichen Wegmöglichkeiten des Analyten in der Säule und ist unabhängig von der Fließgeschwindigkeit. Die Longitudinaldiffusion erfolgt längs zur Säule und nimmt mit steigender v ab. Der verzögerte Massentransfer beschreibt die unvollständige und verzögerte Gleichgewichtseinstellung zwischen stationärer und mobiler Phase aufgrund der bewegten mobilen Phase. Er steigt mit zunehmender Fließgeschwindigkeit. Die maximale Trennleistung erfolgt am Minimum der Kurve - siehe Abb. 3.

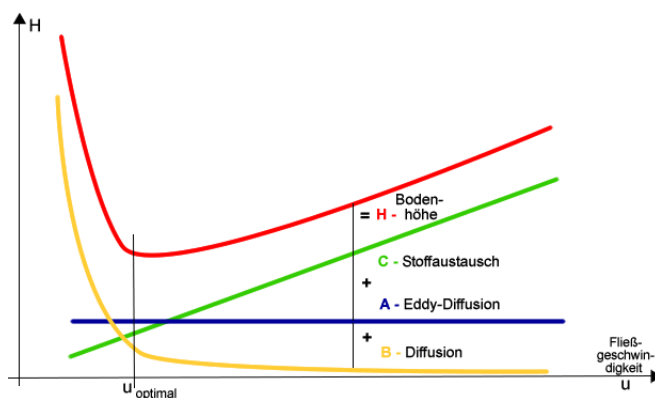


Abbildung 3: Van-Deemter Gleichung mit Illustration der einzelnen Paramter.

Die Trennleistung, also die Fähigkeit zwei benachbarte Peaks eindeutig aufzutrennen, wird durch die Auflösung $R = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_2 + w_1)$ und die relative Retention bzw. Selektivität $\alpha = t_{R2}/t_{R1} = k_2/k_1$ charakterisiert. Desto größer R und α , desto besser ist die Trennung. [1]

2.4 Elutionsmechanismen der Umkehrphasenchromatographie

2.4.1 Isokratische Elution

Bei der isokratischen Elution ist die Laufmittelzusammensetzung im Verlauf der gesamten Analyse konstant. Die Methode eignet sich zur Trennung von Molekülen mit ähnlichen Polaritäten. [3]

2.4.2 Gradienten Elution

Bei der Gradienten Elution wird die Laufmittelzusammensetzung während der Analyse kontinuierlich verändert. Die Methode eignet sich zur Trennung von Molekülen mit stark unterschiedlichen Retentionszeiten bzw. Polaritäten. Anmerkung: das Konzept der in Kapitel 2.3 vorgestellten theoretischen Böden gilt nur für die isokratische Elution. [7, S. 156], [3]

2.5 Kalibrierung über einen externen Standard

Der verwendete Standard entspricht dem Analyten, was voraussetzt, dass dieser bekannt ist. Für die Kalibrierung werden mehrere Standardlösungen mit bekannten Konzentration hergestellt und jeweils der Messwert bestimmt. In einem Diagramm wird der Messwert auf der Ordinate und die Standardkonzentration auf der Abszisse aufgetragen. Man legt eine lineare Funktion

$$y = kx + b \quad (3)$$

durch die Messpunkte (Fitparameter k und b , Messwert y und Konzentration x). Anschließend wird die Probe gemessen und man erhält durch Umstellen von (3) auf x die Probenkonzentration. Bei der Messung von Standard und Probe müssen die Messbedingungen konstant gehalten werden. Auch sind Matrixeffekte aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzungen von Probe und Standard möglich. Dafür benötigt man nur 1 Kalibriergerade für viele Messungen.

3 Praktischer Teil

3.1 Geräteparameter

In der folgenden Tabelle werden alle relevanten Geräteparameter aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der Geräteparameter

| Parameter | Beschreibung |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HPLC System | Agilent 1100 Series |
| Software | Chemstation von Agilent |
| Säule | ACE HPLC-Säule EXCEL 3 C18-PFP, Pentafluorophenyl |
| Länge der Säule | 150 mm |
| Innendurchmesser der Säule | 4.6 mm |
| Mobile Phasen | Eluent A: Wasser (Milli-Q Anlage) mit 0.1 % TFA, Eluent B: Acetonitril (HiPerSolv CHROMANORM, HPLC Super Gradient) |
| Eluentenzusammensetzung | isokratisch, 55 % Eluent B |
| Flussrate | 1.0 mL min ⁻¹ |
| Druck | 177-178 bar |
| Temperatur | 40 °C |
| Injektionsvolumen | 20 µL |
| Detektoreinstellungen | DAD, detektiert bei 230 nm |
| Totzeit inkl. Bestimmung | Thioharnstoff wird in 1:1 Methanol/Wasser gemischt und gemessen - $t_0 = 1.452$ min |

3.2 Chemikalienliste

In Tabelle 2 befindet sich eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, die für die qualitative und quantitative Analyse verwendet wurden. Die Strukturen der Chemikalien sind in Abbildung 4 gezeichnet. Für die verwendeten Laufmittel sind keine Daten bekannt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

| Chemikalie | CAS Nummer | Reinheit | M in g mol ⁻¹ | Lieferant |
|-----------------------|------------|--------------------|----------------------------|-----------|
| Carbamazepin (Analyt) | 298-46-4 | ≥ 99 % (HPLC) | 236.27 g mol ⁻¹ | SIGMA |
| Ibuprofen (Analyt) | 15687-27-1 | ≥ 98 % (GC) | 206.29 g mol ⁻¹ | SIGMA |
| Naproxen (Analyt) | 22204-53-1 | Reference Material | 230.26 g mol ⁻¹ | SIGMA |
| Estron (Analyt) | 53-16-7 | ≥ 99 % | 270.37 g mol ⁻¹ | SIGMA |
| Estradiol (Analyt) | 50-28-2 | ≥ 98 % | 272.38 g mol ⁻¹ | SIGMA |

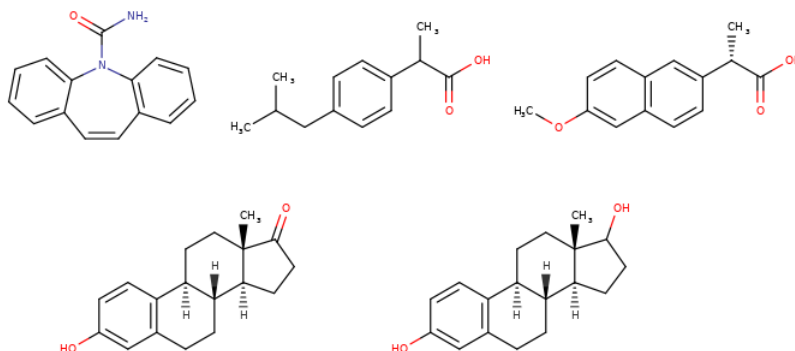


Abbildung 4: Strukturen der verwendeten Chemikalien: Carbamazepin, Ibuprofen, Naproxen, Estron, Estradiol (von links nach rechts, links oben beginnend).

3.3 Bestimmung einer optimalen Eluentenzusammensetzung

Die verwendeten Lösungsmittel sind 0.1 %-ige Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B). Vor Verwendung werden die beiden Laufmittel im Ultraschallbad entgast. Ein Online-Entgaser in der HPLC entfernt die letzten Gasreste, damit diese die Trennung nicht stören. Folgende Laufmittelzusammensetzungen wurden getestet:

1. 30 % Eluent B, Flussrate 1.0 mL min^{-1}
2. 55 % Eluent B, Flussrate 1.0 mL min^{-1}
3. 55 % Eluent B, Flussrate 0.5 mL min^{-1}
4. 70 % Eluent B, Flussrate 1.0 mL min^{-1}

Die Probe mit den 5 Analyten Carbamazepin, Ibuprofen, Naproxen, Estron und Estradiol wird aufgegeben und nach Einstellen der Laufmittelzusammensetzung die Analyse gestartet. Auf diese Weise werden alle oben angegebenen Laufmittelzusammensetzungen getestet. Vor jeder Änderung der Zusammensetzung wird das System für mind. 5 min äquilibriert. Bei der optimalen Laufmittelzusammensetzung wird die Totzeit durch Injektion einer Lösung von Thioharnstoff (Detektion bei 254 nm) bestimmt.

Es zeigt sich, dass die zweite Laufmittelzusammensetzung (55 % Eluent B, Flussrate 1.0 mL min^{-1}) die beste Trennung der Substanzen liefert. Bei der ersten Laufmittelzusammensetzung (bezogen auf obenstehende Tabelle) sind die Retentionszeiten viel zu groß, da im Prinzip nur der erste Eluent sichtbar ist. Die anderen Eluenten sind nach Ende der Analyse also vermutlich noch in der Säule. Bei der vierten Laufmittelzusammensetzung kommt es zu einer Überlappung zweier benachbarter Peaks, was eine Trennung unmöglich macht. Bei der dritten Laufmittelzusammensetzung sind zwar alle Peaks schön getrennt, jedoch braucht die letzte Substanz doppelt so lang wie bei der zweiten Laufmittelzusammensetzung. Aus diesen Gründen wird bei den Folgenden Analysen die zweite Laufmittelzusammensetzung verwendet.

3.4 Qualitative und quantitative Bestimmung von Wasserrückständen nach der Methode des externen Standards

Für die qualitative Bestimmung wird ein Chromatogramm von jeder Substanz aufgenommen. Aus diesen Chromatogrammen bestimmt man die Retentionszeit, Kapazitätsfaktor und weitere chromatographische Parameter der entsprechenden Substanz. Anschließend wird die Probe gemessen und die Peaks durch Vergleich mit den Kapazitätsfaktoren zugeordnet.

Für die quantitative Bestimmung werden für jede der in 3.2 angeführten Chemikalien 100 mL einer 500 ppm Urstandardlösung hergestellt. Dazu werden je 50 mg von Carbamazepin, Ibuprofen, Naproxen, Estron und Estradiol in einen 100 mL Messkolben eingewogen und bis zur Marke aufgefüllt. 20 mL der jeweiligen Urstandardlösung werden entnommen und in einen 100 mL Messkolben transferiert. Aufgefüllt wird mit einem Gemisch aus 70 % Methanol und 30 % Wasser, das auf 50:50 verdünnt wird. Ausgehend von diesen 100 ppm Standardlösung werden Standardlösungen mit 10, 20, 30, 40 und 50 ppm hergestellt. Damit das Gesamtvolumen immer 1 mL beträgt werden 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 und 0.5 mL Urstandard mit der Kolbenhubpipette entnommen und auf 1 mL aufgefüllt. Um die eben angegebenen Volumina zu berechnen, wird die Verdünnungsformel

$$V_1 = \frac{V_2 c_2}{c_1} \quad (4)$$

verwendet. Die hergestellten Standardlösungen werden jeweils dreimal gemessen und eine Kalibriergerade mithilfe der Peakfläche erstellt. Anschließend wird die Probelösung dreimal gemessen und aus der Kalibriergerade die Konzentration der einzelnen Substanzen bestimmt.

Tabelle 3: Übersicht zur Herstellung der Kalibrierstandard-Lösung.

| $c_{Std.}$ in ppm | $V_{Ges.}$ in mL | $c_{Ur-Std.}$ in ppm | $V_{Ur-Std.}$ in mL |
|-------------------|------------------|----------------------|---------------------|
| 10 | 1 | 100 | 0.1 |
| 20 | 1 | 100 | 0.2 |
| 30 | 1 | 100 | 0.3 |
| 40 | 1 | 100 | 0.4 |
| 50 | 1 | 100 | 0.5 |

4 Ergebnisse und Auswertung

4.1 Qualitative Bestimmung von Wasserrückständen und Berechnung chromatographischer Parameter

In den folgenden Tabellen befinden sich die Ergebnisse der qualitativen Analyse.

Tabelle 4: Ergebnisse der qualitativen Analyse (Einzelstandards 50 ppm).

| Peak Nr. | Analyt | t_0 in min | t_R in min | t_N in min | k |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| 1 | Carbamazepin | 1.452 | 2.271 | 0.819 | 0.564 |
| 2 | Estradiol | 1.452 | 2.921 | 1.469 | 1.012 |
| 3 | Naproxen | 1.452 | 3.429 | 1.977 | 1.362 |
| 4 | Estron | 1.452 | 3.748 | 2.296 | 1.581 |
| 5 | Ibuprofen | 1.452 | 4.838 | 3.386 | 2.332 |

Tabelle 5: Ergebnisse der qualitativen Analyse (Pharmazeutika-Mix 50 ppm).

| Peak Nr. | Analyt | t_0 in min | t_R in min | t_N in min | k |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| 1 | Carbamazepin | 1.452 | 2.263 | 0.811 | 0.559 |
| 2 | Estradiol | 1.452 | 2.923 | 1.471 | 1.013 |
| 3 | Naproxen | 1.452 | 3.431 | 1.979 | 1.363 |
| 4 | Estron | 1.452 | 3.753 | 2.301 | 1.585 |
| 5 | Ibuprofen | 1.452 | 4.842 | 3.390 | 2.335 |

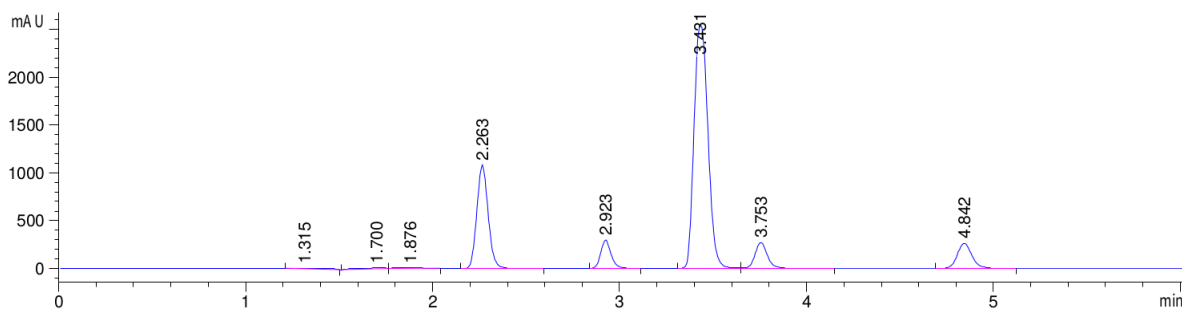


Abbildung 5: Chromatogramm des 50 ppm Pharmazeutika-Mix.

Tabelle 6: Auflistung der chromatographischen Parameter beim Pharmazeutika-Mix ($t_0 = 1.452 \text{ min}$, $L = 150\,000 \mu\text{m}$).

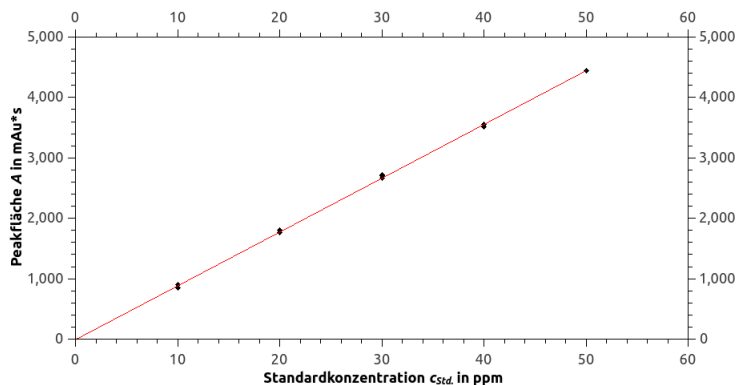
| Peak Nr. | Analyt | t_R in min | w in min | N | H in μm |
|-----------------|---------------|----------------|-------------|--------------|----------------------|
| 1 | Carbamazepin | 2.263 | 0.0646 | 19635 | 7.639 |
| 2 | Estradiol | 2.923 | 0.0580 | 40637 | 3.691 |
| 3 | Naproxen | 3.431 | 0.0840 | 26693 | 5.619 |
| 4 | Estron | 3.753 | 0.0680 | 48737 | 3.078 |
| 5 | Ibuprofen | 4.842 | 0.0817 | 56199 | 2.669 |
| Auflösung | t'_R in min | t''_R in min | w' in min | w'' in min | R |
| Peak 1 / Peak 2 | 2.263 | 2.923 | 0.0646 | 0.0580 | 10.8 |
| Peak 2 / Peak 3 | 2.923 | 3.431 | 0.0580 | 0.0840 | 7.15 |
| Peak 3 / Peak 4 | 3.431 | 3.753 | 0.0840 | 0.0680 | 4.24 |
| Peak 4 / Peak 5 | 3.753 | 4.842 | 0.0680 | 0.0817 | 14.5 |

4.2 Quantitative Bestimmung von Wasserrückständen nach der Methode des externen Standards

In Tabelle 7 werden die Messwerte der Kalibrierstandards von Carbamazepin aufgelistet, wobei die Peakfläche als Quantifizierungsparameter verwendet wird. In Abbildung 6 ist die aus diesen Daten berechnete Kalibriergerade dargestellt.

Tabelle 7: Messung der Kalibrierstandardlösungen von Carbamazepin.

| $c_{Std.}$ in ppm | t_R in min | Peakfläche A in $\text{mAu} \cdot \text{s}$ |
|-------------------|--------------|-----------------------------------------------|
| 10 | 2.254 | 852.56478 |
| 10 | 2.244 | 851.82837 |
| 10 | 2.243 | 897.52515 |
| 20 | 2.252 | 1802.90051 |
| 20 | 2.247 | 1759.14392 |
| 20 | 2.245 | 1758.21021 |
| 30 | 2.246 | 2712.86621 |
| 30 | 2.250 | 2665.03857 |
| 30 | 2.251 | 2705.32861 |
| 40 | 2.243 | 3515.59009 |
| 40 | 2.252 | 3511.57788 |
| 40 | 2.241 | 3557.95532 |
| 50 | 2.245 | 4439.73486 |
| 50 | 2.247 | 4444.31152 |
| 50 | 2.239 | 4442.79785 |


 Abbildung 6: Kalibriergerade für Carbamazepin in der Form $y = a + bx$.

Folgende Parameter der Kalibriergeraden wurden bestimmt: Steigung $b = 89.05 \text{ mAu/ppm}$, Ordinatenabschnitt $a = -10.314 \text{ mAu}$, Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.9995$, Reststandardabweichung $s_y = 28.81$ und Freiheitsgrade $df = 13$. Die Reststandardabweichung s_y wurde mit

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}} \quad (5)$$

berechnet (gemessene Werte der Standards y_i , Erwartungswert \bar{y}_i , Anzahl der Messwerte N). Die Ergebnisse der Probemessung und das dazugehörige Chromatogramm werden in Tabelle 8 bzw. in Abbildung 7 festgehalten. Die Konzentration der Probe, c_{Probe} wurde durch umstellen der Kalibriergeraden auf x berechnet:

$$c_{Probe} = \frac{y - a}{b} \quad (6)$$

. Zur Bestimmung der Peaksymmetrie wurden die Chromatogramme der Probenmessungen ausgedruckt, mit Bleistift eine Referenzlinie durch den Peak gezeichnet und in ca. 10 % der Peakhöhe mit einem Geodreieck die Parameter A und B bestimmt (siehe Kapitel 2.3)².

 Tabelle 8: Ergebnisse der Probemessung (Probe Nr. 6, Substanz: Carbamazepin, $t_0 = 1.452 \text{ min}$).

| Nr. | t_R in min | Peakfläche A in $\text{mAu} \cdot \text{s}$ | c_{Probe} in ppm | w in min | Kapazitätsf. k | Peaksymmetrie T |
|-------------|--------------|-----------------------------------------------|--------------------|------------|------------------|-------------------|
| 1 | 2.266 | 3715.58032 | 41.84 | 0.0592 | 1.561 | 1.3 |
| 2 | 2.265 | 3713.09033 | 41.81 | 0.0590 | 1.560 | 1.1 |
| 3 | 2.259 | 3880.03760 | 43.69 | 0.0608 | 1.556 | 1.4 |
| \bar{x}_i | 2.263 | 3769.56942 | 42.45 | 0.0597 | 1.559 | 1.3 |

²Bei der Abgabe in gedruckter Form werden die auf diese Weise ausgewerteten Chromatogramme angehängt.

Die Standardabweichung s_x berechnet kann mit

$$s_x = \frac{s_y}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (7)$$

$$= \frac{28.81}{89.05} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{3} + \frac{(3769.57 - 2661.16)^2}{89.05^2 \cdot 1000}} = 0.241 \text{ ppm}$$

berechnet werden (Anzahl an Kalibriermessungen n , Anzahl an Probemessungen m , Reststandardabweichung s_y , Steigung b , Mittelwert der Kalibriersignale \bar{y} , Mittelwert des Probensignals y_0 , Konzentration des jeweiligen Standards x_i). Der Vertrauensbereich T_x ($\alpha = 0.05$ und $t = 2.160$ für $df = 13$) kann mit

$$T_x = s_x t = 0.521 \text{ ppm} \quad (8)$$

berechnet werden. Damit ist die Konzentration an Carbamazepin in der Probelösung:

$c_{Probe} = (42.5 \pm 0.5) \text{ ppm}$ ($N = 15, m = 3, s_x = 0.241 \text{ ppm}, \alpha = 0.05$).

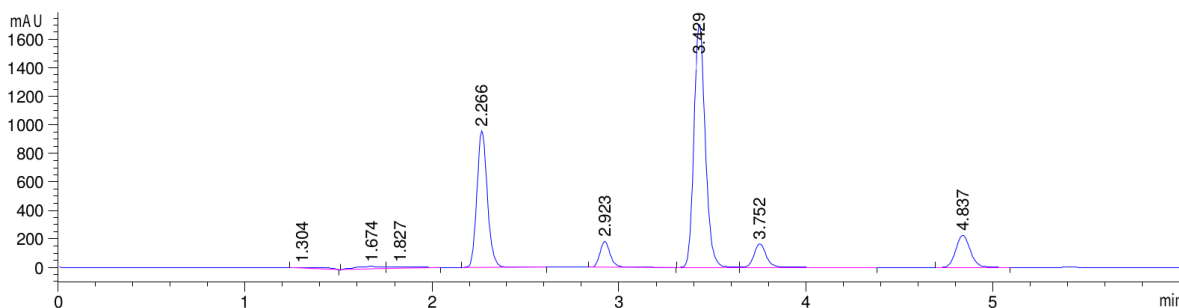


Abbildung 7: Chromatogramm von Probemessung Nr. 1.

5 Fazit und Diskussion

Die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analyse sind größtenteils kohärent. Die qualitative Zusammensetzung des Pharmazeutika-Mix konnte durch Vergleich der Kapazitätsfaktoren gut bestimmt werden. Diese stimmen bis auf Carbamazepin bis zur inkl. zweiten Nachkommastellen exakt überein, was die Robustheit und Zuverlässigkeit der Methode (HPLC) bestätigt.

Da das Bestimmtheitsmaß der Kalibriergeraden annähernd gleich 1 ist und keine offensichtlichen Ausreißer vorhanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Kalibrierung erfolgreich war. Potentielle Fehlerquellen wären hierbei mehrmaliges falsches Pipettieren, was aber in diesem Fall ausgeschlossen werden kann. Falsches Pipettieren bei einer Kalibrierlösung könnte man zum Beispiel durch einen Ausreißertest nachweisen. Grundsätzliche systematische Fehler sind natürlich nicht auszuschließen, man hätte aber in diesem Fall auch keine Möglichkeiten, diese aufzufinden. Dementsprechend kann die Analyse im Rahmen des Möglichen als erfolgreich betrachtet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Bonn Günther et al. *Arbeitsunterlagen Instrumentalanalytisches Grundpraktikum. Für Chemiker und Lehramtskandidaten*. Innsbruck, 2019 (siehe S. 1, 3, 6, 7).
- [2] Hanna Ronzheimer. *Medikamente im Wasser gefährden Umwelt*. Jan. 2020. URL: <https://science.orf.at/stories/2966086/> (siehe S. 3).
- [3] Susanne Huber. *Umkehrphasen HPLC von Wasserrückständen - Instrumentalanalytisches Grundpraktikum Wintersemester 2019/20*. 2019 (siehe S. 4-8).
- [4] Harris. *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. Springer, 2014 (siehe S. 4).
- [5] Douglas Skoog, James Holler und Stanley Crouch. *Principles of Instrumental Analysis*. 7. Aufl. Boston: Cengage Learning, 2016 (siehe S. 4, 5).
- [6] Snyder, Kirkland und Dolan. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Wiley-VCH, 2010 (siehe S. 4).
- [7] Georg Schwedt. *Taschenatlas der Analytik*. 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 2007 (siehe S. 5, 6, 8).

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Schematischer Aufbau einer HPLC (Eigentum der PerkinElmer Corp., Norwalk, CT), Quelle: [5] | 4 |
| 2 | Beschreibung der Funktionsweise des 6-Wege Ventil, Quelle: [5] | 5 |
| 3 | Van-Deemter Gleichung, Quelle: http://www.chemgapedia.de (Zugegriffen am 07.01.2020) | 7 |
| 4 | Strukturen der verwendeten Chemikalien, Quelle: Autor | 10 |
| 5 | Chromatogramm des Pharmazeutika-Mix, Quelle: Autor | 12 |
| 6 | Kalibriergerade für Carbamazepin, Quelle: Autor | 14 |
| 7 | Chromatogramm von Probemessung Nr. 1, Quelle: Autor | 15 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Auflistung der Geräteparameter, Quelle: Autor | 9 |
| 2 | Auflistung der verwendeten Chemikalien, Quelle: Autor | 9 |
| 3 | Übersicht zur Herstellung der Kalibrierstandard-Lösung, Quelle: Autor | 11 |
| 4 | Ergebnisse der qualitativen Analyse (Einzelstandards), Quelle: Autor | 12 |
| 5 | Ergebnisse der qualitativen Analyse (Pharmazeutika-Mix), Quelle: Autor | 12 |
| 6 | Auflistung der chromatographischen Parameter beim Pharmazeutika-Mix, Quelle: Autor | 13 |
| 7 | Messung der Kalibrierstandardlösungen von Carbamazepin, Quelle: Autor | 13 |
| 8 | Ergebnisse der Probemessung, Quelle: Autor | 14 |