



Egal, um welche chromatographische Methode es sich genau handelt: Die Quantifizierung eines Analyten erfolgt in der Regel nach einem der unten vorgestellten Verfahren. Alle diese Verfahren beruhen auf einer Kalibrierung mit Stoffen, deren Gehalt genau bekannt ist. Bei der Kalibrierverfahren unterscheidet man zwischen einem **externen Standard** und einem **internen Standard**.

1. Externer Standard: Einpunktkalibrierung

Es existiert ein Lernvideo: <https://youtu.be/y9LBGiQrkTI>

Die dortigen Ausführungen zu Abschnitt 3 sind nicht relevant.



Externe Standardisierung bzw. externer Standard bedeutet, dass die Kalibriersubstanz nicht direkt zur Probe gegeben wird, sondern in einem separaten chromatographischen Lauf, dem Kalibrierlauf, gemessen wird.

Hierzu wird eine oder mehrere Kalibrierlösungen bekannten Gehalts X (z.B. Masse, Stoffmenge, Konzentration) chromatographiert und die Peakfläche(n) (seltener: Peakhöhe) gemessen. So kann man einen mathematischen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Kalibriersubstanz und der resultierenden Signalfäche herleiten. Nachdem man in einem separaten chromatographischen Lauf (Probelauf) die Fläche des Analyten bestimmt hat, kann man mit dem mathematischen Zusammenhang auf den Gehalt an Analyt schließen.

Im einfachsten Fall wird nur *eine* Kalibrierlösung benutzt, man spricht dann von einer **Einpunktkalibrierung**. Sie geht davon aus, dass es einen proportionalen Zusammenhang zwischen Gehalt und Signal gibt und dass eine Lösung mit einem Gehalt von Null, auch tatsächlich einen Signal von Null liefert.

1.1 Zeichnen Sie einen solchen Zusammenhang, also ein *Kalibrierdiagramm*:

1.2 Eine Fluoranthen-Kalibrierlösung mit \checkmark (Fluoranthen) = 16,49 ng/mL erzeugt in einem Kalibrierchromatogramm die Fläche von 17184 Flächeneinheiten.

a) Welche Konzentration hat eine Fluoranthenprobe, wenn sie einen Peak von 14357 Flächeneinheiten erzeugt?

Hinweis: Es wurde in beiden Fällen das gleiche Probevolumen injiziert

Berechnung mit dem Dreisatz:

b) Welche Nachteile ergeben sich durch diese Kalibriermethode. Wie lassen sie sich unter Beibehaltung der Einpunktkalibrierung minimieren?

Statt mit dem Dreisatz zu rechnen, kann man auch mit einem **Kalibrierfaktor f** rechnen. **Er gibt den Gehalt X (z.B. ng/mL, mmol/L, g, mmol o.ä.) pro Signaleinheiten A (z.B. Flächeneinheiten) an.** Er kann aus den Daten des Kalibrierlaufs berechnet werden. Mit Hilfe von f lässt sich dann der Gehalt der Probe berechnen. Allgemeine Formeln:

$f =$ $\text{Gehalt} =$

Konkretisierung für Aufgabe 1.1:

2. Externer Standard: Zweipunktkalibrierung und Mehrpunktkalibrierung

Setzt man mindestens 2 Kalibrierpunkte, und spannt dadurch einen Kalibrierbereich auf, so muss gewährleistet sein, dass der Probepunkt auch wirklich in diesem Bereich liegt, d.h. das Signal zwischen dem des Minimal- und des Maximalwerts der Kalibrierpunkte liegt. Auch hier gilt, dass das Ergebnis umso genauer wird, je näher die Kalibrierpunkte am Probepunkt liegen.

Die Auswertung erfolgt über eine über *eine einfache lineare Regression*, d.h. man ermittelt die Geradengleichung einer Ausgleichsgerade. Ist der y-Achsenabschnitt nicht Null, wovon ausgegangen werden muss, ist die Auswertung **nicht** wie bei der Einpunktkalibrierung möglich: Man kann deshalb **nicht** mit jedem einzelnen Kalibrierpunkt ein Ergebnis über den Dreisatz berechnen und dann den Mittelwert aller Ergebnisse bilden.

2.1: *Unter den gleichen Bedingungen wurden neben der Probe auch 2 Kalibrierlösungen chromatographiert. Berechnen Sie den Gehalt der Probe!*

Daten der Chromatographie:

Kalibr_1:	30 mg/L	≅ 17149 AU
Kalibr_2:	37,5 mg/L	≅ 19186 AU
Probe:	?	≅ 18901 AU

Der Versuch zur Auswertung als zwei getrennte Einfachkalibrierungen mit jeweils einem der Kalibrierpunkte und anschließender Mittelwertbildung SCHEITERT:

Mit Kalibr_1:

30 mg/L	≅ 17149 AU
x mg/L	≅ 18901 AU
⇒ x ≈ 33,0649 mg/L	

Mit Kalibr_2:

37,5 mg/L	≅ 19186 AU
x mg/L	≅ 18901 AU
x mg/L ≅ 36,9429 mg/L	

Mittelwert: $\bar{x} \approx 35,004 \text{ mg/L}$ **FALSCH!!!!!!!**

richtige Berechnung:

Musterlösungen

1.1

Dreisatz: 13,78 ng/mL

$$f = \frac{\text{Gehalt}}{\text{Signaleinheiten}}$$

$$f = \frac{\text{Gehalt}}{\text{Signaleinheiten}} = \frac{16,49 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}}{17184 \text{ AU}} \approx 9,6 \cdot 10^{-4} \frac{\text{ng}}{\text{mL} \cdot \text{AU}} \quad \beta = f \cdot A \approx 9,6 \cdot 10^{-4} \frac{\text{ng}}{\text{mL} \cdot \text{AU}} \cdot 14357 \text{ AU} \approx 13,78 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$$

2.1

Wächst der Gehalt um 7,5 mg/L, so nimmt das Signal um 2037 AU (=19186 AU – 17149 AU) zu. Eine Zunahme von 1752 AU (=18901 - 17149 AU) entspricht also einem Zuwachs von 6,45066 mg/L. Der Gehalt der eingespritzten Probe beträgt also ca. 36,45 mg/L.

ODER

z.B. mit Taschenrechner oder Tabellenkalkulationsprogramm: Steigung: 271,6; y-Achsenabschnitt: 9001

Geradengleichung: $y = 271,6 \cdot x + 9001 \Rightarrow 18901 = 271,6 \cdot x + 9001 \Rightarrow x \approx 36,45 \text{ mg/L}$

(hier etwas genauer): Einsetzen in Geradengleichung: $y = \beta(\text{Chinin}) = 21,64 \mu\text{g/mL}$.

b) In 250 mL : $m(\text{Chinin}) = 5409,8 \mu\text{g}$

$w(\text{Chinin}) = 5409,8 \mu\text{g}/40000 \mu\text{g} = 0,135$ (13,5%)