



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 $\beta(\text{Fluoranthen}) = 16,49 \text{ ng/mL}$ 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 Probenvolumen 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 =

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.

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.

Stattdessen erfolgt die Auswertung über den Signalanstieg/Steigung zwischen beiden Punkten.

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

richtige Berechnung:

3. Die Detektionsempfindlichkeit eines Stoffs wird auch **Responsefaktor** genannt

3.1: Erzeugen 2 mol eines Stoffs Y beim Detektor die Fläche 1000 AU, so beträgt der Kalibrierfaktor $f(Y) = 0,002$ mol/AU. Erzeugt 1 mol eines anderen Stoffs Z beim Detektor dieselbe Fläche (1000 AU), so beträgt der Kalibrierfaktor $f(Z) = 0,001$ mol/AU.

a) Welcher der beiden Stoffe wird empfindlicher detektiert?

b) Die Detektionsempfindlichkeit eines Stoffs wird auch **Responsefaktor (RF, z.T. auch mit f abgekürzt)** genannt. Es handelt sich um die Signaleinheiten (Signalfläche, A) pro Gehalt (X). Geben Sie die entsprechende Formel an und finden Sie die Formel im Tabellenbuch.

c) Welchen mathematischen Zusammenhang gibt es zwischen Kalibrierfaktor (f) und Responsefaktor (RF)?

Zum Abschnitt 5 existiert ein Lernvideo: <https://youtu.be/OpHSOpct-RI>



Gleichnis: Der Kutscher aus dem alten Arabien hat ein Problem

Ein Kutscher im alten Arabien befördert Zuckersirup und Wasser in ein entlegenes Dorf gegen Geld. Neben seinem Zuckersirupfass steht das Wasserfass. Der Wassergehalt im Wasserfass beträgt zu Beginn der Reise 45 Liter. So macht er sich auf die mehrtägige Reise über holprige Pfade. Dabei geht immer etwas der Ware verloren, immer unterschiedlich viel. Auf der Waage des Basars („Detektor“) wiegt der Zuckersirup diesmal 160 Gewichtsstücke (auch „Einheiten“ genannt), beim Messen des Wassers zeigt die Waage 210 Einheiten an. Erschrocken stellt er fest, dass er den Zuckersirupgehalt im Fass nicht notiert hat, das er zu Beginn mitgenommen hatte. Er braucht es jedoch für die Abrechnung.

4.1a) Schätzen Sie mit den zur Verfügung stehenden Daten den Zuckersirupgehalt (in L).

4.1b) Warum kann es sich nur um eine Schätzung handeln, weshalb man auch lieber von „Gehalt an Wasseräquivalenten“ sprechen sollte, anstatt vom „Zuckersirupgehalt“. Ist der bei 5.1a) geschätzte Zuckersirupgehalt eher zu hoch oder eher zu klein? Begründen Sie!

Da erinnert sich der Kutscher an seinen letzten Transport. Er hatte 21 Liter Zuckersirup in sein Fass gefüllt und zusätzlich ein Wasserfass mit 30 Liter Wasser mitgenommen. Als er einige Tage später im Dorf ankam, wog er der Zuckersirup auf der Waage 128 Einheiten, das Wasser hingegen 160 Einheiten. Blöderweise, wurden beim letzten mal aber andere, geringfügig abweichende Gewichtsstücke genutzt, als diesmal.

4.1c) Wie kann er seine Schätzung mithilfe dieser Werte deutlich verbessern? Tipps: Berechnen Sie zuerst die Responsefaktoren (RF). Mit welchem Faktor (= **Methodenfaktor, MF**) muss das Ergebnis von 5.1a) multipliziert werden, um die Schätzung zu verbessern?

4.1d) Begründen Sie, ob das Ergebnis durch die Nutzung abweichender Gewichtsstücke bei der vorangegangenen Messung verfälscht wurde.

4.2 Ergänzen Sie die fehlenden Bezeichnungen im folgenden Text

Zusammenfassung und Analogie zur Chromatographie: Bei der Kalibrierung mittels *internem Standard* gibt man zu der Probe (Analogie: Kutsche) mit dem Analyten (X, oben:), eine bekannte, der zu messenden Substanz ähnliche Substanz (S, oben:), in einer genau bekannten Gehalt hinzu. Diese Substanz dient als *Interner Standard*, da sie sich **in** der Probe befindet. Ab dem Zeitpunkt der Zugabe bis zur Messung macht der interne Standard alles mit, was auch die Probe-komponenten mitmachen.

Vorteile des internen Standards: Wenn durch die Probenaufarbeitung (z.B. Extraktion aus biologischem Material) oder die Probenauftragung jedes mal unterschiedlich viel Analyt zur Analyse gelangt oder der Detektor aufgrund veränderter Bedingungen, beispielsweise Betriebswärme, in seiner Empfindlichkeit von Lauf zu Lauf nicht exakt konstant ist, werden die Peakfläche der Standardsubstanz (S) und des Analyten (X) um den gleichen Faktor betroffen sein. So kann man mit dieser Kalibriermethode diese Veränderungen (z.B. Substanzverluste) kompensieren. Insbesondere bei komplizierter oder verlustreicher Probenaufarbeitung, etwa bei Extraktionen, kann ein interner Standard die Genauigkeit wesentlich erhöhen: Individuelle Analyt-Verluste werden durch die Standardsubstanz aufgedeckt und dann rechnerisch berücksichtigt!

Eine Verbindung, die als interner Standard einer Probe zugesetzt wird, ...

- ...darf nicht selbst in der ursprünglichen Probe enthalten sein.
- ...muss im Chromatogramm einen eigenständigen Peak ergeben, d.h. es darf keine Probenkomponente mit gleicher Retentionszeit vorhanden sein.
- ...soll in ihren chemischen Eigenschaften ähnlich dem Analyten sein (damit Substanzverlust vergleichbar ist)

Die Berechnung erfolgt entweder mit dem Dreisatz und Responsefaktoren (*siehe oben*) ODER man nutzt folgende vorgefertigte Doppelbruchformel.

Als Gehalte können hier auch Massen, Volumina, Konzentrationen oder Anteile benutzt werden.

$$\frac{\text{Gehaltverhältnis (X/S) in Probe}}{\text{Signalverhältnis (X/S) in Probe}} = \frac{\text{Gehaltverhältnis (X/S) in Referenz}}{\text{Signalverhältnis (X/S) in Referenz}} \quad \text{\underline{\underline{Der Doppelbruch rechts ist der MF!}}}$$

4.3 Zeigen Sie durch eine Rechnung, dass der Kutscher sein Ergebnis auch mit der Doppelbruchformel erhalten hätte!

4.4 Weitere Aufgabe

In einer Probe soll der Xylen-Gehalt chromatographisch ermittelt werden. Zur Herstellung der Referenzlösung wurden zuerst 140 µL Xylen in einem 20 mL-Messkolben bis zur Marke mit Lösungsmittel aufgefüllt. 250 µL dieser Xylen-Lösung werden mit 50 µL einer Isodurool-Kalibrierlösung (Volumenkonz. = 10 µL/mL) versetzt. Zur Herstellung einer Probelösung wurden 250 µL der Probe mit 50 µL der Isodurool-Kalibrierlösung versetzt. Nach Einlass in den Chromatographen ergaben sich die unten angegebenen Peakflächen. Berechnen Sie das Volumen und den Volumenkonzentration von Xylen in der ursprünglichen Probe.

Referenzlösung		Probelösung	
Substanz	Peakfläche	Substanz	Peakfläche
Isodurool (S)	16072	Isodurool (S)	18433
Xylen (X)	22035	Xylen (X)	21048

a) Berechnen Sie die Volumenkonzentration, $\sigma(\text{Xyl})$, in der ursprünglichen Probe.

b) Weshalb braucht der Verdünnungseffekt durch die Zugabe von Internem Standard nicht berücksichtigt werden?