

Prüfungsaufgaben zur Dünnschichtchromatographie und HPLC

C3CL/C2CL

Die folgenden Aufgaben zur Chromatographie lehnen sich an Prüfungsaufgaben aus der Abschlussprüfung für Chemielaboranten in Baden-Württemberg (Teil II) an.

Die Aufgaben in den Abschnitten sind umgekehrt chronologisch sortiert.

1. Aufgaben zur Dünnschichtchromatographie und zur Chromatographie (allgemein)

1.2012_Sommer:DC von Schmerzmitteln

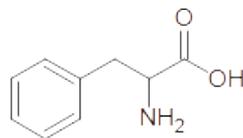
(ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Sommer 2012)

- a) Aus Essigsäureanhydrid und Salicylsäure wurde mit H_2SO_4 als Katalysator Acetylsalicylsäure hergestellt. Formulieren Sie die Reaktionsgleichung.
- b) Bei Luftfeuchtigkeit kann sich Acetylsalicylsäure in 2 Produkte spalten. Notieren Sie die passende Reaktionsgleichung und benennen Sie den Reaktionstyp. Geben Sie den Namen der aromatischen Verunreinigung an!
- c) Zur Überprüfung ob tatsächlich die bei b) beschriebene aromatische Verunreinigung vorhanden ist, wurde eine Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-F254-DC-Platten mit einem Ethanol/Dichlormethan-Gemisch durchgeführt. Beschreiben Sie alle wesentlichen Arbeitsschritte bis incl. Auswertung.
- d) Erklären Sie, wie die Detektion mithilfe von Kieselgel-F254-DC-Platten funktioniert.
- e) Weshalb können R_f -Werte nicht über dem Wert 1 liegen?
- f) Beschreiben Sie 2 Nachweismethoden in der DC incl. den Stoffen die damit nachgewiesen werden können.

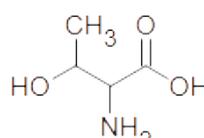
1.2010_Sommer

Aminosäurengemische lassen sich über eine Kieselgel-DC auftrennen. (ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Sommer 2010)

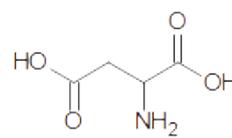
- a) Erklären Sie die Begriffe Kammersättigung, eluotrope Reihe, R_f -Wert und zweidimensionale DC
- b) Erklären Sie die beiden physikalischen Trennprinzipien die bei der Kieselgel-DC auftreten
- c) Beschreiben Sie mit welcher Art der Vorbehandlung der DC-Platte das Trennprinzip zugunsten der einen oder anderen Seite verschoben werden kann.
- d) Bei einer Kieselgel-DC mit einer relativ unpolaren mobilen Phase werden die 3 Aminosäuren Phenylalanin und Threonin und Asparaginsäure aufgetrennt. Ordnen Sie die 3 Stoffe nach steigendem R_f -Wert und begründen Sie Ihre Anordnung. .



Phenylalanin



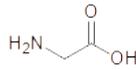
Threonin



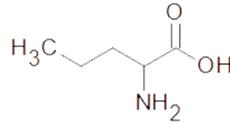
Asparaginsäure

1.2008_Sommer: DC-Trennung von Aminosäuren

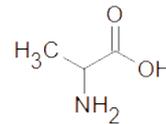
Ein Gemisch der Aminosäuren Glycin, Norvalin und Alanin soll mittels DC getrennt werden (Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Sommer 2008)



Glycine (Gly)



Norvaline (Nva)



Alanine (Ala)

- Welche stationäre und welche mobile Phase bietet sich an? Begründen Sie!
- Geben Sie stichwortartig die wichtigsten Arbeitsschritte an.
- Beschreiben Sie, wie die Stoffe detektiert werden können.

1.2006_2007_Winter

Sorbinsäure (2,4-Hexadiensäure), Benzoesäure und die Ester der *p*-Hydroxybenzoesäuremethylester sind farblose Konservierungsstoffe. Sie können mithilfe der DC nachgewiesen werden. (Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Winter 06/07)

- Zeichnen Sie die Strukturformeln der Verbindungen.
- Alle 3 Verbindungen besitzen eine mittlere Polarität. Begründen Sie!
- Die drei Konservierungsmittel sollen auf einer Kieselgel-DC-Platte getrennt werden. Auf der Verpackung der Platten findet sich die Bezeichnung „F 254“. Was bedeutet dies?
- Wie kann man eine Substanz mittels DC sicher ermitteln?

1.2006_Sommer

Dünnschichtchromatographie (Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Sommer 2006)

- Ordnen Sie folgende Lösungsmittel nach steigender Polarität: Essigsäureethylester, Wasser, n-Butanol, Cyclohexan, Ethanol. Begründen Sie Ihre Reihenfolge. Wie nennt man diese Angabe in der Chromatographie?
- Nennen Sie zwei Möglichkeiten der Erkennung von farblosen Substanzen auf der DC-Platte.
- Worin unterscheiden sich die Normalphasen- und die Umkehrphasenchromatographie (RP) hinsichtlich der stationären und der mobilen Phase.
- Auf einer DC-Platte mit einer polaren stationären Phase werden 3 Substanzen A, B und C chromatographiert. Als Fließmittel kommt ein Gemisch aller bei a genannten Stoffe zum Einsatz. Dabei erhält man folgendes Ergebnis:

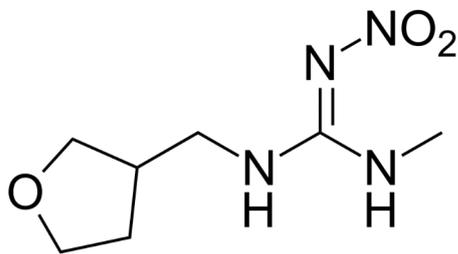
	A	B	C
Front	X	X	X
Start			

- Mit welcher Änderung der Fließmittelzusammensetzung kann eine bessere „Auftrennung“, d.h. größere Unterschiede in den zurückgelegten Laufstrecken, erreicht werden?
- Welcher der Stoffe A-C ist der polarste? Berechnen Sie von dieser Substanz den R_F -Wert.

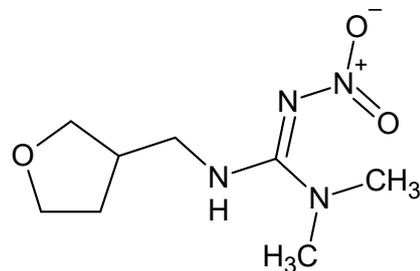
2. Aufgaben zur HPLC (in Anlehnung an Prüfungsaufgaben)

2.2021_Sommer: Neonicotinoide, AW3

Dinetofuran gehört zur Gruppe der Neonicotinoide. Sie werden also Insektizide eingesetzt. Mithilfe der HPLC unter wurde es unter Verwendung eines internen Standards (I.S.) quantitativ bestimmt.



Dinetofuran



I.S.

- a) Entscheiden Sie begründet, welche der beiden Verbindungen die höhere Retentionszeit an einer RP18-Säule besitzt.
- b) Der Referenzlauf und der Probelauf lieferten folgende Ergebnisse:

Referenzlauf		Probelauf	
Gehalt	Flächen	Gehalt	Flächen
$\beta(\text{Dinetofuran}) = 2,5 \mu\text{g/mL}$	29845	$\beta(\text{Dinetofuran}) = ?$	30484
$\beta(\text{I.S.}) = 2,5 \mu\text{g/mL}$	35419	$\beta(\text{I.S.}) = 2,0 \mu\text{g/mL}$	33719

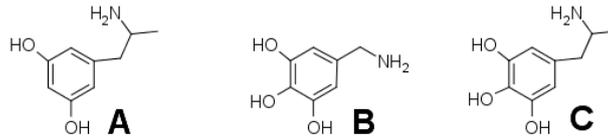
Berechnen Sie den Gehalt an Dinetofuran in der Probelösung in $\mu\text{g/mL}$.

- c) Zur Herstellung der Probelösung wurden aus 100 Milligramm des pulverförmigen Insektizids nach Zugabe des internen Standards I.S. 10 mL Extrakt hergestellt. 2 mL des Extrakts wurden vor Injektion wieder auf 10 mL verdünnt. Berechnen Sie mithilfe der Ergebnisse von b) den Massenanteil im Insektizid in ppm.
Hinweis: Wenn Sie bei b) kein Ergebnis ermitteln konnten, gehen Sie von $\beta(\text{Dinetofuran}) = 2 \mu\text{g/mL}$ aus.

2.2018_Winter: Trennung von Nitrotoluenen (Nitrotoluolen)

Verschiedene Nitrotoluene sollen aus einer Bodenprobe extrahiert und über eine RP-HPLC analysiert werden. Die Quantifizierung erfolgt mit der internen Standardsubstanz 2,5-Dimethylnitrobenzen (2-Nitro-*p*-xylen) (Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Winter 2018)

- a) Geben Sie die Strukturformeln aller möglichen Dinitrotoluene an.
- b) Welchen Zusammenhang gibt es zwischen der Anzahl an Nitrogruppen und der Retentionszeit bei ansonsten vergleichbarem Molekülbau?
- c) Geben Sie die Strukturformel der Standardsubstanz an und begründen Sie warum dieses Kalibrierverfahren mit diesem Kalibrierstoff hier sinnvoll ist.
- d) Aus 2-Nitro-*p*-xylen ($M = 151,16 \text{ g/mol}$) sollen als Kalibrierlösung 100 mL mit $\beta = 5 \text{ ng/mL}$ hergestellt werden. Die Einwaage soll aus Genauigkeitsgründen zwischen 10 -50 mg liegen. Es sollen ausschließlich gängige Messkolben- und Vollpipettengrößen benutzt werden, die jedoch in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen (Messkolben in mL: 100, 200, 500, 1000 mL; Vollpipetten in mL: 5, 10, 20, 25 mL, 50). Geben Sie eine praktikable Herstellungsmöglichkeit an.
- e) Weshalb werden bei der HPLC so hohe Drücke benutzt?

2.2017_Sommer: Trennung stickstoffhaltiger organischer Verbindungen


Folgende 3 Stoffe werden auf einer RP8-Säule getrennt. (Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Sommer 2017)

- Geben Sie 2 Gründe für die Notwendigkeit der Entgasung der Komponenten der mobilen Phase an.
- Nennen Sie mehrere Möglichkeiten zur Entgasung.
- Ordnen Sie die drei Stoffe nach aufsteigender Retentionszeit.
- Eine großen Einfluss auf die Retentionszeiten hat bei dieser Trennaufgabe der pH-Wert. Begründen Sie mithilfe einer Reaktionsgleichung.

2.2012_Sommer: HPLC

(ähnlich einer Prüfungsaufgabe aus dem Sommer 2012): Eine wässrige Probe soll über HPLC auf die Schadstoffe Phenol, 1-Phenylpropan und Toluol (Methylbenzen) untersucht werden. Die Trennung erfolgt auf einer RP-C8-Säule mit einem Methanol-Wasser-Lösung als mobile Phase.

- Geben Sie schematisch den Aufbau der HPLC-Anlage an.
- Ordnen Sie den 3 Schadstoffen die Retentionszeiten $t_r = 16,1$ min, $t_r = 18,4$ min und $t = 24,6$ min zu und begründen Sie!
- Aufgrund einer Verunreinigung mit Benzoesäuremethylester ist noch ein 4. Peak zu sehen. Geben Sie an, in welchem Zeitraum (Zeitintervall) dieser Peak auftritt und begründen Sie (siehe auch Retentionszeiten der drei Peaks in Aufgabe b).
- Definieren Sie kurz die Begriffe Totzeit und Tailing (**auch 2021_Sommer**).
- Weshalb kann die Detektion in diesem Fall mithilfe eines UV-Detektors erfolgen? Begründen Sie mit der Struktur der Moleküle/Analyte.
- Wie muss sich die Anfangszusammensetzung und die Zusammensetzung der mobilen Phase in einer Gradiententrennung ändern, damit alle 3 Peaks früher erscheinen und der letzte Peak näher bei den anderen liegt. Belegen Sie Ihre Aussagen mit Argumenten!
- Der Toluol-Gehalt wurde mittels Benzylalkohol als internem Standard bestimmt.

Zusammensetzung und resultierende Flächen der Kalibrierlösung:

Gehalt	Flächen
β (Benzylalkohol) = 35 $\mu\text{g/mL}$	104845
β (Toluol) = 50 $\mu\text{g/mL}$	354719

Zur Probenanalyse wurden 1 mL einer Benzylalkohollösung mit $\beta = 35$ mg/100 mL zu 5 mL Probe gegeben und anschließend das Gemisch auf 10 mL Gesamtvolumen verdünnt. Es ergaben sich folgende Peakflächen:

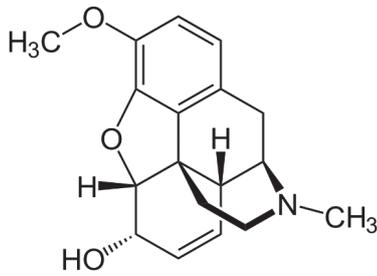
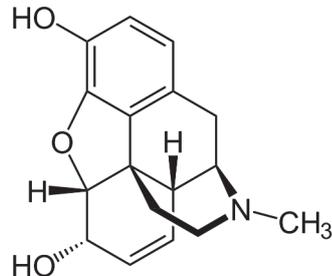
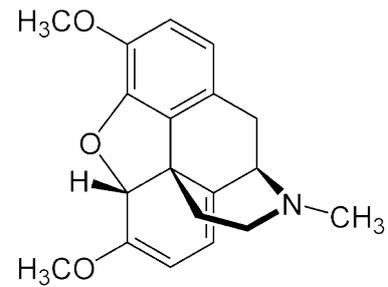
Gehalt	Flächen
Benzylalkohol	98485
Toluol	308784

Berechnen Sie die Massenkonzentration β (Toluol) in der Probe.

2.2009_Sommer. Drogenanalyse mit HPLC

(Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Sommer 2009)

In Morphin sind folgenden halluzinogene Substanzen enthalten.

**Codein****Morphin****Thebain**

- Ordnen Sie diese Verbindungen nach Polarität und begründen Sie die Anordnung.
- Ein Opiumextrakt wird per RP-HPLC mit RP-18-Material getrennt. Erklären die Begriffe RP18 und machen Sie Aussagen zur chemischen Natur dieses Materials. (**auch 2021_Sommer**)
- Worin unterscheiden sich RP-Chromatographie und Normalphasen-Chromatographie?
- Geben Sie die Elutionsreihenfolge an, wenn als Elutionsmittel ein Gemisch aus Methanol (50%) und Wasser (50%) verwendet wird. Begründen Sie kurz.
- Die isokratische Trennung aus d) ergab, dass die ersten beiden Stoffe kaum getrennt werden, der 3. Stoff jedoch sehr viel später eluiert wird. Mit welcher Vorgehensweise lässt sich das Trennergebnis optimieren?

2.2007_Sommer

HPLC: *Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, (Sommer 2007)*

- Geben Sie den Aufbau einer HPLC-Anlage in Form eines Schemas wieder. Geben Sie dabei an, welche Bauteile unter Druck stehen. (*Ähnlich Sommer 2007, Sommer 2009*)
- Erklären Sie folgende Begriffe in Textform und mithilfe einer beschrifteten Skizze eines Chromatogramms: Bruttoretentionszeit, Totzeit, Area
- Ein optimierte HPLC-Trennung erlaubt die größtmögliche Auflösung in der kleinstmöglichen Analysenzeit. Erläutern Sie 2-3 Möglichkeiten die dem Experimentator zur Verfügung stehen um nach diesen Prinzipien eine Trennung zu optimieren.

2.2007_Sommer_Nr_II

HPLC

Ein Probengemisch besteht aus Heptansäure, Hexan und Pentanal und wird auf Kieselgel mit einer mobilen Phase geringer Polarität getrennt. (*Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Sommer 2007*)

- Zeichnen Sie die Strukturformeln der Verbindungen und geben Sie die Retentionsreihenfolge der Stoffe an (incl. Begründung)
- Welche Änderung erfährt das Chromatogramm, wenn eine stark polare mobile Phase verwendet wird?

2.2006_2007_Winter. Säulenchromatographie und HPLC

(*Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Winter 06/07*)

- Was versteht man unter der elutropen Reihe? Ordnen Sie folgende Substanzen in der elutropen Reihe ein. Hexan, Ethanol, Chlorbenzol, Aceton, Wasser
- Was versteht man in der Chromatographie unter „stationäre Phase“, „mobile Phase“ und „Retentionszeit“?
- In der HPLC wird ein Gemisch aus Ethanol, Wasser, Benzol und Aceton auf eine Kieselgelsäule injiziert. In welcher Reihenfolge treten die getrennten Substanzen aus der Säule aus? Begründen Sie ihre Antwort.

2.2005_Sommer. HPLC-Trennung

(*Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Sommer 2005*)

Ein HPLC-Gerät trennt mit einer Säule mit der Bezeichnung „RP18“. Zwei Stoffgemische sollen mit dem Gerät jeweils in ihre Bestandteile getrennt werden:

Gemisch 1: n-Pentan, n-Heptan, 2-Methylhexan und Nonan

Gemisch 2: Butanon, 1-Butanol, 2-Propanol

- a) Was bedeutet diese Angabe „RP18“. Geben Sie den vollständigen Namen an und beschreiben Sie den Aufbau des Säulenmaterials? **(auch 2021_Sommer. auch 2009_Sommer.)**
- b) Eines der Gemische lässt sich nur auf einer RP-18-Säule gut trennen. Begründen Sie ausführlich, um welches der beiden Gemische es sich handelt.
- c) Geben Sie den Namen von 3 Stoffen an, die als Bestandteile eines Laufmittelgemisch bei einer RP-18-Trennung genutzt werden.

2.2004_2005_Winter

. Ein Gemisch der drei aromatischen Verbindungen Benzylalkohol, Benzoesäure und Benzoesäuremethylester soll mittels HPLC getrennt werden. (*Ähnlich einer Aufgabe aus der Abschlussprüfung Teil 2 für CL, Winter 2004/2005*)

- a) Begründen Sie, mit welcher Reihenfolge die drei Substanzen auf einer Kieselgel-Säule mit Benzen (Benzol) als mobiler Phase am Detektor erscheinen.
- b) Wie verändert sich die Form von Peaks mit zunehmender Retentionszeit? Begründen Sie!
- c) Definieren Sie kurz die Begriffe Totzeit und Nettoretentionszeit. **(auch 2021_Sommer)**
- d) Welche Änderung des Chromatogramms erhält man, wenn man während der Elution den Methanolanteil der mobilen Phase kontinuierlich erhöht?

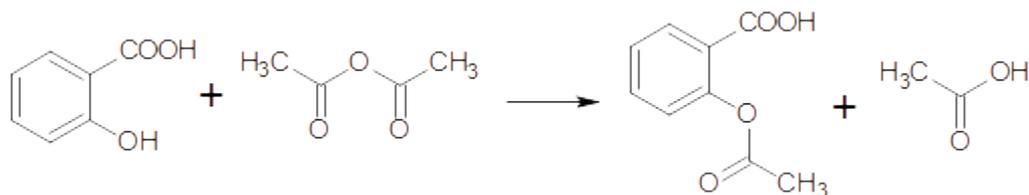
Lösungshinweise zu den Aufgaben

1. Aufgaben zur Dünnschichtchromatographie - LOESUNGEN

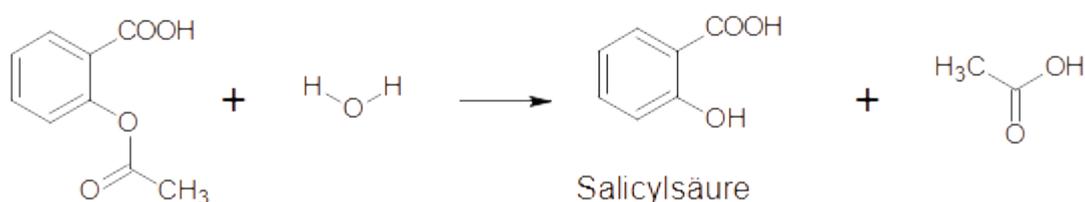
Hier sind bei vielen Aufgaben nur Lösungshinweise angegeben.

1.2012_Sommer:DC von Schmerzmitteln

a)



b) Esterhydrolyse



c)

- Fließmittelmischung ansetzen und in DC-Kammer füllen. Diese mit saugfähigem Papier auskleiden und längere Zeit (mindestens 30 Minuten) stehen lassen => **Kammersättigung**. Eine Kammersättigung verkürzt übrigens bei der anschließenden Trennung die Trennzeit, da nicht ständig Fließmittel von der Laufmittelfront weg verdunstet. So kann das Laufmittel pro Zeiteinheit eine höhere Strecke zurücklegen.
- Das Stoffgemisch in einem Lösungsmittel lösen. Wenige Mikroliter werden anschließend mit einer DC-Kapillare oder einer Mikropipette aufgetragen. Entweder erfolgt die Auftragung punkt- oder strichförmig. Als Referenz trägt man in mindestens 2 cm Abstand die Verbindung auf, die man als enthaltene Verunreinigung vermutet, hier also Salicylsäure.
- Spätestens 1 – 2 cm bevor die Laufmittelfront den oberen Rand erreicht, wird die Platte aus der Trennkammer genommen und z.B. mit dem Föhn (nicht zu hohe Temperaturen!), Laufmittelreste verdampft/Platte getrocknet.
- Die DC-Platte wird unter einer UV-Strahlenquelle bei $\lambda = 254$ nm betrachtet. Die Platte leuchtet, außer diejenigen Bereiche, bei denen eine UV-absorbierende Verbindung liegt. Die nicht-leuchtenden Flecke werden mit Bleistift unter der UV-Lampe markiert.
- Zur Auswertung wird überprüft ob die Probe auf gleicher Höhe wie die Salicylsäure der Referenz einen Fleck aufweist (**vergleichende Chromatographie**). Wenn ja, ist dies ein sehr starkes Indiz dafür, dass die Probe mit Salicylsäure verunreinigt ist. Die Auswertung kann auch über R_F -Werte erfolgen.

d) Wegen ihres π -Elektronensystems absorbieren alle aromatischen Verbindungen im UV-Bereich. In die stationäre Phase sind Fluoreszenzfarbstoffe eingelagert, die bei Bestrahlung mit UV im sichtbaren Wellenlängenbereich leuchten (Fluoreszenz). Dort wo UV-absorbierende Verbindungen liegen, kann die UV-Strahlung nicht oder nur in abgeschwächter Intensität zur stationären Phase gelangen, da sie vollständig oder großteils durch den Aromaten absorbiert wird. So unterbleibt an diesen Stellen auch das Fluoreszenzleuchten der Platte. Es erscheinen dunkle oder weniger stark leuchtende Flecken. Dieses Prinzip der Detektion wird **Fluoreszenzminderung** genannt.

e) Der R_F -Wert ist definiert als $R_F = \text{Wanderungsstrecke der Substanz} / \text{Laufmittel-Wanderungsstrecke}$. Der Nenner ist immer größer als der Zähler, so dass der Quotient immer kleiner 1 ist.

f) Aminosäuren können durch Besprühen mit **Ninhydrin-Reagenz** nachgewiesen werden. Nach Besprühen werden die DC-Platte zur Entwicklung der Färbung einige Zeit im Trockenschrank erhitzt.

Ein **Universalreagenz**, mit dem sich sehr viele (völlig voneinander verschiedene) Verbindungen nachweisen lassen ist Iod (I_2). Die DC-Platte wird mit Iod bedampft. Dort wo Verbindungen abgelagert sind, entstehen (z.T. reversible) braune Verfärbungen. Lagert man die DC-Platte außerhalb der Kammer, so kann das Iod z.T. wieder absublimieren, so dass die Bildung brauner Flecken wieder verschwindet.

1.2010_Sommer

fehlt noch

1.2008_Sommer: DC-Trennung von Aminosäuren

a) Es handelt sich um mäßig polare Stoffe. Es bietet sich deshalb eine polare stationäre Phase an, mit der die einzelnen Substanzen dann wechselwirken können => Kieselgel. Als Fließmittel sollte ein Lösungsmittel(gemisch) eingesetzt werden, das unpolarer als die stationäre Phase ist (Normalphasenchromatographie). Eine zu geringe Polarität würde die Substanzen nur schlecht mitlaufen lassen und wäre evtl. gar nicht in der Lage, die an der stationären Phase gebundenen

Substanzen zu eluieren. Bei Verwendung eines zu polaren Fließmittels, könnte die Elutionswirkung auf die Substanzen sehr ähnlich sein. Die geringen Unterschiede in der Elutionswirkung würden einer guten Auftrennung im Wege stehen.

b) Kammersättigung, Probenauftragung, Chromatographische Trennung, Färbung,

c) siehe Unterricht

1.2006_2007_Winter

siehe Unterricht

1.2006_Sommer

a) vgl. Tabellenbuch . Eluotrope Reihe

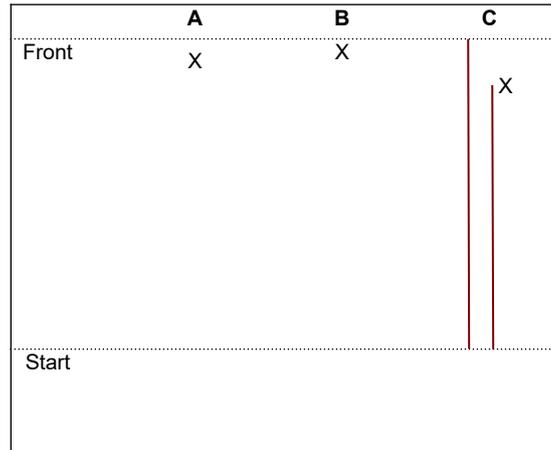
b) z.B. Bedampfen der Platte mit Universalfärbemitteln

z.B. Bestrahlung mit UV auf UV-DC-Platten (F254). Prinzip der Fluoreszenzminderung.

c) vgl. Unterlagen im Unterricht.

d) Hierfür lässt sich die Polarität des Fließmittels variieren. Einzelne Substanzen sollten stärker zurückgehalten werden als andere. Dies gelingt, indem man das Fließmittel noch unpolarer macht, so dass die Substanzen allgemein weniger stark eluiert werden. Da die Substanzen alle weniger stark eluiert werden, nimmt der Zeitanteil, an dem sich die Stoffe auf der stationären Phase bindend wechselwirken, zu. So können auch die individuellen Unterschiede in der Wechselwirkung mit der stationären Phase stärker zu Geltung kommen (da die Wechselwirkungszeit mit der stationären Phase allgemein zunimmt). Würde man die Polarität der mobilen Phase erhöhen, so würde man die Elutionswirkung auf die drei Stoffe noch weiter erhöhen und die Wechselwirkungszeit mit der stationären Phase allgemein verkürzen. Die relativen Unterschiede im Wechselwirkungsverhalten würden noch weniger zur Geltung kommen, die Stoffe sich in der zurückgelegten Laufstrecke also noch weiter angleichen.

e) Der polarste Stoff ist C, da er am stärksten durch die polare stationäre Phase zurück gehalten wird.



f) Bei der Normalphasenchromatographie, zu der diese Methode gehört (polare stationäre Phase, nur mäßig polare mobile Phase) werden die polarsten Verbindungen am schwächsten eluiert bzw. Am stärksten w zurück gehalten. \Rightarrow Substanzfleck C. $R_f = 3,7 \text{ cm} / 4,4 \text{ cm} \approx 0,8$

2. Aufgaben zur HPLC – LOESUNGEN

a) Als einzigem Unterschied, besitzt der interne Standard (IS) an der Amingruppe rechts eine Methylgruppe mehr. Er kann deshalb etwas stärker mit dem unpolaren RP18-Material wechselwirken und besitzt deshalb eine höhere Retentionszeit.

b)

$$\frac{\text{Gehaltverhältnis (X/S) in Probe}}{\text{Signalverhältnis (X/S) in Probe}} = \frac{\text{Gehaltverhältnis (X/S) in Referenz}}{\text{Signalverhältnis (X/S) in Referenz}}$$

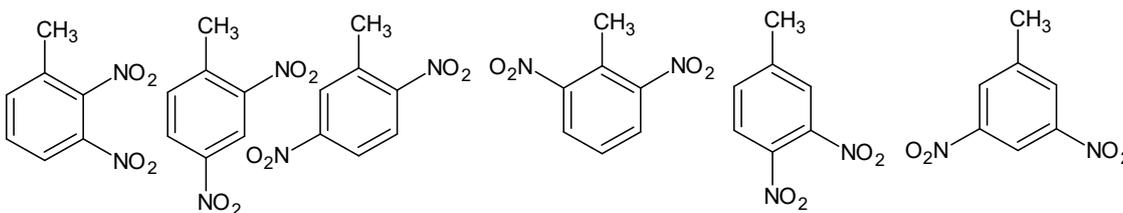
$$\frac{\frac{x}{2 \mu\text{g/mL}}}{\frac{30484}{33719}} = \frac{\frac{2,5 \mu\text{g/mL}}{2,5 \mu\text{g/mL}}}{\frac{29845}{35419}} \Rightarrow x \approx 2,1458 \mu\text{g/mL}$$

c)

- Berücksichtigung der Verdünnung mit $F = 5$: $\beta(\text{Dinetofuran}) \approx 5 \cdot 2,1458 \mu\text{g/mL} \approx 10,729 \mu\text{g/mL}$
- In 10 mL Extrakt enthaltene Masse: $107,29 \mu\text{g}$ ($107,29 \cdot 10^{-6} \text{ g}$).
- $w \approx 107,29 \cdot 10^{-6} \text{ g} : 0,100 \text{ g} \approx 107,29 \cdot 10^{-5}$ (**$\approx 1073 \text{ ppm}$**).

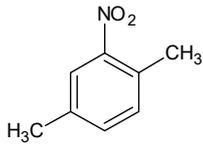
2.2018_Winter: Trennung von Nitrotoluenen (Nitrotoluolen)

a)



b) Je mehr Nitrogruppen das Molekül trägt, desto schwächer sind die Wechselwirkungen zur unpolaren stationären Phase. Weiterhin steigt die Affinität zur mobilen Phasen. Je mehr Nitrogruppen das Molekül trägt, desto kürzer ist also die Retentionszeit.

c)



Das Kalibrierverfahren ist hier besonders sinnvoll, weil es eine Extraktion beinhaltet, bei der eine relativ große Stoffmenge an Analyten verloren gehen. Die Standardsubstanz wird vor der Extraktion zugesetzt. Der Verlust an Analyt wird rechnerisch kompensiert, weil man annimmt, dass auch der interne Standard im gleichen Anteil verloren geht.

Dieser Stoff ist wegen seines zu den Analyt-Molekülen ähnlichen Molekülbaus geeignet.

c) Beispiel: 50 mg auf 1000 mL lösen ($\Rightarrow 50 \text{ ng/mL} = 50 \text{ mg/L} = 50000 \text{ } \mu\text{g/L}$). Diese Lösung muss insgesamt mit $F = 1 : 10000$ verdünnt werden, um $5 \text{ } \mu\text{g/L}$ zu erhalten. Man kommt nicht umhin, erst mal eine Zwischenverdünnung anzusetzen (z.B. erst mal 1:100, also z.B. 10 mL Konzentrat ad 1000 mL, $\Rightarrow 500 \text{ } \mu\text{g/L}$). Diese Lösung wird erneut 1:100 verdünnt (also z.B. 10 mL ad 1000 mL oder 5 mL ad 500 mL o.ä.)

d) Die Trennung in der HPLC erfolgt nur deshalb so gut, weil die stationäre Phase sehr fein gekörnt vorliegt. Solches Säulenmaterial besitzt eine hohe Bodenzahl (Trennstufenzahl) bzw. eine sehr geringe Trennstufenhöhe. Um eine akzeptable Analysezeit zu bekommen, die nicht im Bereich von zig Stunden – Tage liegt, muss die mobile Phase mit hohem Druck durch die stationäre Phase gepumpt werden, denn die geringe Porengröße und dichte Packung bewirkt einen großen Widerstand.

2.2017_Sommer: Trennung stickstoffhaltiger organischer Verbindungen

fehlt noch

2.2012_Sommer: HPLC

a) Vorratsgefäß der mobilen Phase – Entgasungseinheit – Hochdruckpumpe – Probeinlass/Probeschleife – Chromatographiesäule – Detektor (incl. Auswerte-Elektronik) – Lösungsmittelabfall

b) RP8: Umkehrphase mit unpolaren Octylresten: Je unpolarer ein Stoff, desto stärker kann er mit der stationären Phase wechselwirken, d.h. desto höher der Zeitanteil an dem der Stoff nicht mit der (polaren) mobilen Phase weiter transportiert wird. \Rightarrow Desto höher die Nettoretentionszeit. **Phenol**: Zwar ist auch dieser Stoff unpolar, aber von der gegebenen Auswahl durch die Hydroxylgruppe noch am polarsten. Deshalb besitzt er die kleinste der angegebenen Retentionszeiten ($t_R = 16,1 \text{ min}$). **Toluol** und **1-Phenylpropan** sind beide ungefähr gleich unpolar. 1-Phenylpropan hat jedoch den längeren Alkylrest und kann sich so leichter selbst polarisieren (spontane Dipolbildung!) und polarisiert werden (induzierte Dipolbindung). Es bildet deshalb stärkere van-der-Waals-Kräfte zu den Octylresten der stationären Phase aus, als Toluol. Deshalb besitzt 1-Phenylpropan die längere Retentionszeit von $t_R = 24,6 \text{ min}$ und Toluol die Retentionszeit von $18,4 \text{ min}$.

c) Der Benzoesäuremethylester besitzt mit seiner Sauerstofffunktion eine höhere Polarität als die gegebenen Kohlenwasserstoffe und eine niedrigere Polarität als Phenol. Der Peak wird also im Zeitfenster zwischen $16,1 \text{ min}$ und $18,4 \text{ min}$ erscheinen, also als zweiter Stoff eluiert werden.

d) **Tailing**: Bezeichnet eine unsymmetrische Peakform, die zu längeren Retentionszeiten hin, nur langsamer auf die Basislinie absinkt. **Totzeit**: Zeit, die ein nicht-retardierter Stoff vom Probeinlass bis zur Ankunft am Detektor benötigt. Solche Stoffe sind beispielsweise Bestandteile der mobilen Phase. Häufig erkennt man ihre Ankunft am Detektor als „Lösungsmittelpeak“.

e) Alle 4 Stoffe sind einkernige Aromaten, deren C_6H_5 -Reste alle im UV-Bereich absorbieren.

f) Die Elutionskraft der mobilen Phase muss erhöht werden. Das geschieht in der RP-Chromatographie durch Erhöhung des Anteils unpolarerer Stoffe, denn diese Stoffe laut eluotroper Reihe die höchste Elutionskraft. Mit

anderen Worten: Die Affinität der Stoffe zur mobilen Phase muss erhöht werden, damit der Zeitanteil, den diese Stoffe in dieser Phase verbringen, erhöht ist. Dies führt dazu, dass sie die Säule früher verlassen und alle früher Detektiert werden können (geringere Retentionszeiten). Dafür muss die mobile Phase etwas unpolarer gemacht werden, denn alle Stoffe sind ausnahmslos unpolar. Dies geschieht z.B. in dem der Methanolanteil erhöht und der Wasseranteil verringert wird. Gerade zum Ende hin muss die mobilere Phase noch weiter in der Polarität abgesenkt werden, damit auch das Phenylpropan leichter eluiert werden kann. D.h. Gradiententrennung mit geringerem Wasseranteil zu Beginn, der im Verlauf der Trennung noch weiter sinkt. Weitere Möglichkeit: Im Verlauf der Trennung steigende Zumischung einer unpolaren Komponenten (z.B. Butanol).

g)

$$\frac{\text{Gehaltverhältnis}(X/S)\text{in Probe}}{\text{Signalverhältnis}(X/S)\text{in Probe}} = \frac{\text{Gehaltverhältnis}(X/S)\text{in Referenz}}{\text{Signalverhältnis}(X/S)\text{in Referenz}}$$

$$\frac{x}{35 \frac{\mu g}{mL}} = \frac{50 \frac{\mu g}{mL}}{35 \frac{\mu g}{mL}} \Rightarrow x \approx 46,34 \frac{\mu g}{mL}$$

$$\frac{308784}{98485} = \frac{354719}{104845} \Rightarrow x \approx 46,34 \frac{\mu g}{mL}$$

Wegen Probenverdünnung (5mL Probe wurden auf 10 mL gebracht) $\beta(\text{Toluen}) = 2 \cdot 46,34 \mu\text{g/mL} \approx \underline{\underline{92,7 \mu\text{g/mL}}}$

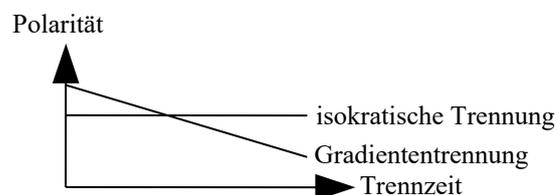
2.2009_Sommer. Drogenanalyse mit HPLC

a) – d) siehe Unterricht

e) Die Polarität der mobile Phase muss gegen Ende der Trennung im Rahmen einer Gradientenelution abnehmen, um das unpolare Thebain früher zu eluieren. Dieses hat dann eine höhere Affinität zur mobilen Phase.

Die beiden Stoffe zu Beginn, werden schlecht getrennt. Wenn man die Retentionszeiten beider Stoffe erhöht, können individuelle Unterschiede in der Struktur stärker zum Tragen kommen. Die Affinität beiden Stoffe zur mobilen Phase muss erniedrigt werden, damit sie länger auf der stationären Phase verweilen können. Dies erreicht man durch eine Erhöhung der Polarität zu Beginn.

Zusammenfassung: Zu Beginn wird für ein besseres Trennergebnis im Rahmen einer Gradiententrennung ein höherer H₂O-Anteil gewählt (polarere mobile Phase), der im Verlauf der Analyse sinkt (Verminderung der Polarität).



2.2007_Sommer

2.1. a) siehe Unterricht, siehe Arbeitsblatt, zusammengehörende Bauteile können zusammengefasst werden. z.B. Mischventile + Mischkammer zu Gradientenmischer

2.1 b) siehe auch blaues Buch

Bruttoretentionszeit: Zeit die eine Verbindung nach der Probeauftragung bis zum Ankommen am Detektor benötigt.

Totzeit: Zeit, die die mobile Phase (und Teilchen die durch die Säule gar nicht zurückgehalten werden) benötigt um bis zum Detektionsort zu gelangen.

ÜBRIGENS: Die **Netto-Retentionszeit** ist definiert als Bruttoretentionszeit minus Totzeit. Sie ist ein besseres Maß dafür, wie stark eine Verbindung durch die Säule zurückgehalten (retardiert) wird als die Bruttoretentionszeit.

Area: englisch für „Fläche“. Gemeint ist die Fläche eines Peaks. Je größer die Peakfläche für einen gegebenen Stoff, desto mehr ist von diesem Stoff vorhanden. Die Umrechnung von Flächeninhalt in eine Stoffmenge/Konzentration kann mithilfe von Kalibrierkurven erfolgen. **Vorsicht:** Wenn ein Stoff A eine größere Fläche erzeugt als ein Stoff B, heißt das nicht, dass die Stoffmenge von A größer ist als die von B. Es kann nämlich sein, dass der Detektor auf den Stoff A empfindlicher anspricht als auf den Stoff B! **Beispiel:** Benutzt man einen UV/VIS-Detektor so hängt die Empfindlichkeit mit der ein Stoff detektiert wird maßgeblich davon ab, welche Detektionswellenlänge man wählt. Absorbiert der Stoff A bei der gewählten Detektionswellenlänge (z.B. $\lambda = 350$ nm) große Anteile des Lichts, so kann schon eine kleine Stoffportion eine hohe Absorption bewirken und der Peak entsprechend groß ausfallen. Absorbiert der Stoff B bei der gewählten Detektionswellenlänge ($\lambda = 350$ nm) nicht so gut, so werden nur geringe Anteile des eingestrahnten Lichts absorbiert. So kann trotz relativ hoher Stoffmenge/Konzentration an B der entsprechende Peak nur klein ausfallen. Eine Stoffmenge an B kann also unter Umständen größer sein als die von A und der Peak von B trotzdem viel kleiner als der Peak von A.

c)

- * Variation der Zusammensetzung der mobilen Phase, z.B. Benutzung oder Veränderung eines Gradienten
- * Modifizierung der stationären Phase: z.B. statt Kieselgel eine RP-Säule benutzen (natürlich muss dann auch die mobile Phase daran angepasst werden)
- * Veränderung der Säulenlänge oder der Partikelgröße der stationären Phase
- * Veränderung der Trenntemperatur

2.2007_Sommer_Nr_II

a) Die polarsten Stoffe werden in der Normalphasenchromatographie am längsten zurückgehalten. => vgl. eluotrope Reihe

b) Die Verwendung stark polarer Phasen in der Normalphasenchromatographie ist nicht möglich. Da H_2O und andere polare Stoffe laut eluotroper Reihe in der NP-Chromatographie eine höhere Elutionskraft besitzen, würden die über polar Wechselwirkungen gebundenen Stoffe weniger festgehalten und stärker eluiert. Insgesamt eluieren alle Probestandteile deutlich früher. Da sie sich jedoch nicht gut in polaren Lösungsmitteln lösen, könnte evtl. unpolare Tröpfchen in einem polaren Medium entstehen, die eher passiv herausgeschwemmt werden. . Insgesamt nimmt die chromatographische Auflösung massiv ab und die Stoffe werden nicht oder nur schlechter voneinander getrennt.

2.2006_2007_Winter. Säulenchromatographie und HPLC

a) Eluotrope Reihe: **vgl. auch Tabellenbuch**

Es handelt sich um eine Anordnung gängiger Lösungsmittel aus der Chromatographie nach Ihrer Elutionswirkung auf polar gebundene Substanzen an einer stationären Phase. Wenn man Kieselgel oder Al_2O_3 als Grundlage nimmt, gilt (siehe Küster-Thiel):

Hexan → Chlorbenzol → Aceton → Ethanol → Wasser

b) **mobile Phase:** Phase in der die zu trennenden Substanzen weitertransportiert werden (Elutionsmittel, GC: Trägergas)

stationäre Phase: Phase, die mit den einzelnen Substanzen des Substanzgemisches Wechselwirkungen eingeht und sich innerhalb dieser nicht bewegt (z.B. Kieselgel bei der DC),.

Retentionszeit: Es wird unterschieden zwischen der Bruttoretentionszeit und der Nettoretentionszeit.

Bruttoretentionszeit: Zeitdauer von Probeauftragung bis zur Detektion der Verbindung. Nettoretentionszeit: Zeitdauer von Probeauftragung bis zur Detektion der Verbindung abzüglich der Zeit, die auch nicht-retardierte Stoffe benötigen, um das Probesystem zu durchlaufen. D.h. Nettoretentionszeit = Bruttoretentionszeit minus Totzeit

c) Die Stoffe werden unterschiedlich lange durch die polare stationäre Phase zurück gehalten. Je polarer die Verbindung, desto stärker wird der Stoff zurück gehalten. Zuerst tritt also das unpolare Benzol aus der Säule aus, gefolgt von Aceton, Ethanol und zum Schluss Wasser.

2.2005_Sommer. HPLC-Trennung

a) Es handelt sich um eine Umkehrphasen-Chromatographie (reversed phase), bei der auf einer unpolaren Säule Stoffe getrennt werden. Die verwendete mobile Phase ist polar. Das Material der stationären Phase wird aus Kieselgel hergestellt, indem man es mit Silanen reagieren lässt. Insgesamt entstehen an den Silanolgruppen C_{18} -Ketten.



b) Das unpolare Gemisch (n-Pentan, n-Heptan etc.) lässt sich auf der Umkehrphase gut voneinander trennen. Die bindende Wechselwirkung beruht hier zum großen Teil auf van-der-Waals-Kräfte zwischen den C_{18} -Resten und den zu trennenden Stoffen. Je länger der unpolare Rest, desto stärkere van-der-Waals-Wechselwirkungen sind möglich, die Stoffe werden dann umso länger durch die stationäre Phase zurück gehalten.

Wenn man polare Moleküle auf der Säule untersucht, so ist die Trennwirkung gering, so dass es unter Umständen nicht zu einer Auftrennung kommt. Statt Einzelkomponentenpeaks entstehen dann z.B. Überlagerungen, die als ein Peak (oft mit Fronting oder Tailing) registriert werden. Wegen der geringen Wechselwirkung mit der stationären Phase sind die Retentionszeiten dieser Stoffe allgemein gering.

1c) Polare Lösungsmittel, wie Wasser, Methanol, Acetonitril etc.

2.2004_2005_Winter

a) Da es sich um eine polare stationäre Phase handelt, kommt der polarste der drei Stoffe am spätestens am Detektor an. Je polarer der Stoff, desto stärker kann er mit der stationären Phase bindend wechselwirken. Je polarer der Stoff, desto höher ist also der Zeitanteil mit dem an der stationären Phase gebunden ist und in dieser Zeit nicht weiter transportiert.

Benzoessäuremethylester ist der unpolarste der drei Stoffe. Er besitzt als einzige der 3 Verbindungen keine OH-Gruppe. Somit besitzt Benzoessäuremethylester die kürzeste Retentionszeit. Benzylalkohol besitzt eine OH-Gruppe und ist damit polarer als der Carbonsäureester. Er besitzt deshalb die mittlere Retentionszeit.

Benzoessäure ist die polarste unter den 3 Verbindungen, denn neben der polaren OH-Gruppe ist auch noch eine

polare Carbonylgruppe vorhanden. Hinzu kommt, dass diese Carbonylgruppe über negative induktive Effekte die Polarität der OH-Gruppe noch weiter erhöht. Benzoesäure hat somit die höchste der Retentionszeiten.

b) Mit zunehmender Retentionszeit werden die Peaks i.d.R. breiter. Der Grund für die Peakverbreiterung liegt in Diffusionsvorgängen. Damit ist die räumlich ungerichteten Fortbewegung von Molekülen gemeint, die sowohl in Fließrichtung aber auch quer zur Fließrichtung oder gegen die Fließrichtung erfolgen kann. Im letzteren Fall bewegt sich während dieser Zeit das einzelne Molekül mit *verlangsamter* Geschwindigkeit in Fließrichtung weiter (Fließrichtung und Diffusionsrichtung stehen einander entgegen, die Fließgeschwindigkeit ist jedoch höher). Querdiffusion (d.h. quer zur Fließrichtung) führt zu individuellen Unterschieden in der tatsächlich zurückgelegten Wegstrecke. Insgesamt sorgt die Diffusion dafür, dass sich die Retentionszeiten der Moleküle (d.h. der Zeit vom Auftragszeitpunkt bis zum Detektionszeitpunkt) leicht unterscheiden. Mit steigender Trennzeit/Säulenlänge nehmen solche Diffusionsvorgänge zu! Analogon: Viele Autos fahren gleichzeitig von Karlsruhe auf der gleichen Autobahn in Richtung Norden los. Obwohl alle mit der gleichen Geschwindigkeit unterwegs sind, erreichen sie Frankfurt schon leicht zeitversetzt. In Köln sind dann die Unterschiede in den Ankunftszeiten schon größer geworden. Die Unterschiede kommen hier z.B. durch unterschiedliches zick-zack-Fahren auf der Autobahn (d.h. letztendlich leicht unterschiedliche Wegstreckenlängen („Querdiffusion“), zustande.

c) Totzeit: Dies ist die Zeit, die Moleküle, die überhaupt nicht durch die stationäre Phase retardiert werden, vom Auftragszeitpunkt bis zur Ankunftszeit am Detektor, benötigen.

Nettoretentionszeit: Dies ist die tatsächliche Retardierungszeit, d.h. die Bruttoretentionszeit minus der Totzeit.

d) Durch den höheren Methanolanteil erhöht man die Polarität der mobilen Phase. Die Elutionskraft der mobilen Phase gegenüber den polar gebundenen Analyten nimmt zu. D.h. alle Retentionszeiten sinken. Dies betrifft vor allem die später eluierenden Stoffe, da hier der Methanolanteil in der Gradiententrennung schon hoch ist. die Gesamtanalysezeit sinkt.