

# Gaschromatographie

## Vorausgesetzte Kenntnisse

Temperaturabhängigkeit des Dampfdrucks (Clausius-Clapeyron-Gleichung), Verteilungsgleichgewichte eines Stoffes auf zwei Phasen, Nernstscher Verteilungssatz, Raoult'sches Gesetz, Stofftrennung durch Destillation (Trennleistung, theoretische Böden).

## Literatur

- [1] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems "Instrumentelle pharmazeutische Analytik" Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1992
- [2] H. Naumer, W. Heller (hrsg.) "Untersuchungsmethoden in der Chemie" G.Thieme Verlag Stuttgart 1986
- [3] E. Leibnitz, G. Struppe "Handbuch der Gaschromatographie" Akadem. Verlagsgesellschaft Geest & Portig, Leipzig 1984
- [4] H.Hrapia "Einführung in die Gaschromatographie" WTB 30 Akademie - Verlag Berlin 1977

## Ziel des Versuches

Kennenlernen der Grundprinzipien und einfacher experimenteller Techniken der Gaschromatographie. Untersuchung der Abhängigkeit der Trennleistung von Gasstrom, Säulentemperatur und Säulenbelastung. Vergleich zwischen gepackten und Kapillarsäulen.

Optimierung der Säulentemperatur bei einem gegebenen Trennproblem. Substanzidentifizierung mit Referenzsubstanzen ("Retentionsindices"). Quantitative Analyse mit internem Standard.

## Methodisches

Unter dem Begriff der Gaschromatographie werden physikalisch-chemische Methoden zusammengefasst, bei denen eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer ruhenden ("stationären") und einer sich bewegenden ("mobilen") Phase erfolgt. Ein gaschromatisches System besteht also aus zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, von denen die eine sich an der anderen vorbeibewegt. Die Gaschromatographie umfasst alle chromatographischen Methoden, bei denen die mobile Phase ein Gas ist.

Man unterscheidet:

### Gas-flüssig-Chromatographie (GLC).

Die stationäre Phase ist eine auf einem festen Träger oder der Säulenwand aufgebraute Flüssigkeit.

### Gas-fest-Chromatographie (GSC).

Als stationäre Phase fungiert ein fester Stoff, die mobile Phase wechselwirkt mit der stationären über Adsorptions-Desorptions-Prozesse (Adsorptionsgaschromatographie).

Da mit der Gaschromatographie (im folgenden als "GC" abgekürzt) eine selektive und vollständige Trennung von Stoffgemischen möglich ist, ergeben sich vielfältige Anwendungsgebiete:

- qualitative Analyse (Substanzidentifizierung)
- quantitative Analyse (Konzentrationsbestimmung vieler Komponenten gleichzeitig)

Vorteile der GC sind:

- sehr viele Komponenten sind nebeneinander trennbar (Voraussetzung: Probe ist verdampfbar)
- geringer Substanzverbrauch
- (relativ) geringe Analysendauer

Wirkungsweise

Die Trennsäule des Gaschromatographen befindet sich in einem Säulenofen und wird kontinuierlich vom Trägergas durchströmt. Die Probe (Substanzgemisch) wird am Probeneinlass (Injektor) in das System gebracht, verdampft, vom Trägergas durch die Trennsäule befördert und dort nach Komponenten aufgetrennt. Mit dem Erscheinen der einzelnen Komponenten an einem Detektor wird ein elektrisches Signal erzeugt, das nach geeigneter Verstärkung als Chromatogramm aufgezeichnet wird. Die Zeitdifferenz zwischen Einspritzen der Probe und Erscheinen des Signals einer Komponente wird als deren "Retentionszeit" bezeichnet. Die Fläche unter dem Signal ist unter definierten Versuchsbedingungen der Stoffmenge der Komponente proportional. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit (bei der GLC) bzw. der unterschiedlichen Adsorption (bei der GSC) der Komponenten in der stationären Phase und wird bedingt durch:

- Siedepunktunterschiede (bzw. Dampfdruckunterschiede)
- Polaritätsunterschiede.

Dieser Sachverhalt wird quantitativ durch Selektivität  $\alpha$  beschrieben, die (nach Gl.8)) näherungsweise dem Verhältnis der Retentionszeiten zweier Komponenten i und j entspricht:

$$\alpha = \frac{f_i \cdot p_i^0}{f_j \cdot p_j^0} \approx \frac{t_j}{t_i} \quad (1)$$

( $f_i$  = Aktivitätskoeffizient für die Wechselwirkung der Komponente i mit der stationären Phase,  $p_i^0$  = Dampfdruck der reinen Komponente i bei der gegebenen Säulentemperatur)

Gl(1) zeigt die beiden Möglichkeiten der GC:

- Trennung chemisch ähnlicher Substanzen (z.B. homologe Reihen) mit unterschiedlicher Siedetemperatur über deren Dampfdruck  $p^0$ .
- Trennung von Substanzen gleicher Siedetemperatur (gleichen Dampfdrucks) durch unterschiedliche Wechselwirkung mit der stationären Phase (unterschiedliche Aktivitätskoeffizienten  $f_i$ )

Da der Dampfdruck nach der Clausius-Clapeyron-Gleichung von der Temperatur abhängt ( $p^0 \approx \text{const.} \cdot \exp(-\Delta_v H/RT)$ ), kann die Selektivität durch eine geeignete Analysentemperatur beeinflusst werden. Sie liegt bei gepackten Säulen im allgemeinen 10 - 40 K, bei Kapillarsäulen sogar bis 100 K unter der Siedetemperatur der Proben. Bei großen Siedetemperaturunterschieden der Komponenten wird ein Temperatur-Zeit-Programm gewählt.

Eine Variation der Aktivitätskoeffizienten (Trennung bei gleichen Siedetemperaturen) kann durch eine geeignete stationäre Phase erreicht werden (Prinzip: "Gleiches löst sich in Gleichem").

Deshalb gibt es für bestimmte Stoffklassen bestimmte Säulenfüllungen, die sich zum Beispiel in der Polarität der Säulenfüllung unterscheiden.

Im vorliegenden Versuch wird zum einen eine nahezu unpolare gepackte Säule (Chromosorb W, mit SE 30 beladen) verwendet und zum anderen eine schwach polare Kapillarsäule (DB-5), die einen relativ breiten Anwendungsbereich besitzt.

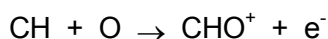
Als **Detektor** eignet sich jede Messsonde, die auf Unterschiede zwischen reinem Trägergas und den gasförmigen Probenkomponenten anspricht. Im Versuch werden verwendet:

#### Wärmeleitdetektor

Der von der Wärmeleitfähigkeit des vorbeiströmenden Gasgemisches abhängige Widerstand eines geheizten Drahtes wird gemessen. Dieser robuste Detektor kann fast alle Substanzklassen nachweisen, ist aber nicht sehr empfindlich. Die höchste Empfindlichkeit wird für ein Trägergas sehr hoher Wärmeleitfähigkeit erreicht ( $H_2$  oder He).

#### Flammen-Ionisationsdetektor

Am Säulenausgang brennt eine kleine Wasserstoff-Luft-Flamme, in die die Trägergas-Substanz-Mischung eingeleitet wird. Gemessen wird der durch zwei Elektroden fließende, von Ladungsträgern in der Flamme getragene elektrische Strom. In der normalerweise kaum ionisierten Wasserstoff-Flamme entstehen über eine Radikalreaktion



Ladungsträger, die im elektrischen Feld abgesaugt und mit einem Elektrometer gemessen werden können. Der Detektor reagiert hochempfindlich auf Kohlenwasserstoffe.

### Wichtige Grundbegriffe

#### Retentionszeit $t_R$

Verweilzeit einer Substanz in der Säule, d.h. die Zeit, die die Substanz braucht, um die Säule zu durchwandern (Abb.1).

#### Totzeit $t_0$

entspricht der Zeit, die das Gas braucht, um **ungehindert** (ohne Wechselwirkung mit der stationären Phase) durch die Säule zu gelangen. Sie wird im Versuch im Falle der gepackten Säule mit Luft gemessen ("Luftpeak"), im Falle der Kapillarsäule mit Methan (Einspritzen einer Erdgasprobe) (Abb.1).

#### Nettoretentionszeit $t_R'$

ist die Zeit, die eine Substanz in der stationären Phase zubringt (Abb.1):

$$t_R' = t_R - t_0 \quad (1)$$

Zwei Substanzen können nur dann getrennt werden, wenn sie sich in der Nettoretentionszeit unterscheiden.

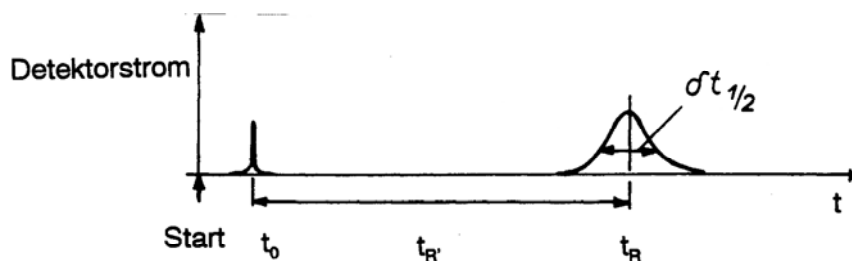


Abb.1 Totzeit, Retentionszeit und Halbwertsbreite

**Auflösung  $R_S$** 

Ein Maß für die Güte einer Trennung ist die Auflösung (resolution)  $R_S$ :

$$R_S = 1.18 \cdot \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\delta_{1/2(2)} + \delta_{1/2(1)}} \quad (2)$$

Die Auflösung sollte insbesondere bei der Durchführung quantitativer Analysen mindestens 1.4 betragen.

**Fließgeschwindigkeit (Trägergasgeschwindigkeit)  $u$** 

ist die Geschwindigkeit, mit der sich das Trägergas in der Säule fortbewegt:

$$u = \frac{L}{t_0} \quad (L = \text{Länge der Säule}) \quad (3)$$

**Bodenhöhe und Bodenzahl**

Wenn man sich die Säule als eine sehr lange Rektifikationskolonne vorstellt, wird die Trennleistung durch die Anzahl  $N$  der theoretischen Böden charakterisiert. Diese für eine gegebene Säule charakteristische Zahl kann aus dem Gaschromatogramm nach verschiedenen Näherungsformeln bestimmt werden. Das Arzneibuch empfiehlt folgende Beziehung:

$$N = 5.54 \cdot \left( \frac{t_{R_S}}{\delta t_{1/2}} \right)^2 \quad (4)$$

wobei  $t_{R_S}$  die Gesamtretentionszeit und  $\delta t_{1/2}$  die Halbwertsbreite des Peaks darstellen. Die (dimensionslose) Zahl 5.54 gilt für ein Gauß-Profil des Peaks. Eine große Bodenzahl bedeutet eine hohe Trennleistung. Zur Beschreibung der Trennleistung wird häufig auch die "Bodenhöhe" (Abkürzung HETP (height equivalent to theoretical plate)) herangezogen:

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (5)$$

Die Bodenhöhe ist von der Fließgeschwindigkeit unabhängig. Diese Abhängigkeit wird durch die **van Deemter-Gleichung** beschrieben:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (A, B, C \text{ sind für eine gegebene Temperatur konstant}) \quad (6)$$

Die Kurve zeigt ein Minimum, d.h. es gibt eine optimale Trägergasgeschwindigkeit, bei der die größte Trennleistung erreicht wird:

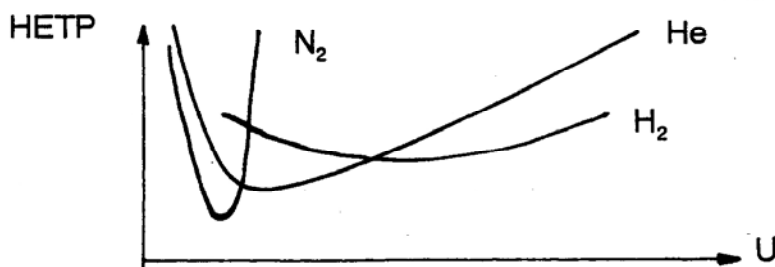


Abb.2 Trennstufenhöhe (HETP) als Funktion der Gasgeschwindigkeit  $u$

### Symmetriefaktor $S_s$

Bei optimaler Geräteeinstellung sollen die Peaks symmetrisch sein. Durch Totvolumina, zu niedrige Injektortemperatur, Probenzersetzung sowie Adsorption stark polarer Substanzen an aktiven Oberflächen kann ein Abflachen der Peakabfallflanke ("Tailing") sowie bei Überlastung der Säule ein Abflachen der aufsteigenden Flanke ("Heading") auftreten. Das  $S_s$  definiert den Symmetriefaktor als Verhältnis der Peakbreite bei 5 % der Peakhöhe  $b_{0.05}$  zum Doppel des Abstandes  $A$  zwischen dem ansteigenden 5%-Punkt und der Peakmitte:

$$S_s = \frac{b_{0.05}}{2 \cdot A} \quad (7)$$

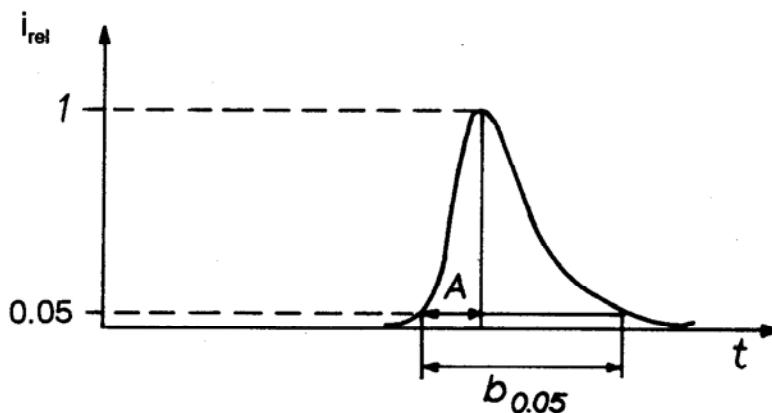


Abb.3 Symmetriefaktor  $S_s$

### Kapazitätsverhältnis $k$

ist das Verhältnis der Aufenthaltszeit der Probe in der stationären und in der mobilen Phase:

$$k = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R}{t_0} - 1 \quad (8)$$

Bestimmt man von zwei Substanzen das Kapazitätsverhältnis, ist die Selektivität  $\alpha$  zugänglich:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (9)$$

### Retentionsindex

Bei isothermer Arbeitsweise besteht für geradkettige Alkane ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Nettoretentionszeit  $t_R$  und der Kohlenstoffanzahl. Die Retentionsindices der n-Alkane werden erhalten, indem man die Kohlenstoffzahl im Molekül mit 100 multipliziert. Decan ( $C_{10}H_{22}$ ) hat demnach den Index 1000, Eicosan ( $C_{20}H_{42}$ ) den Index 2000. Für eine unbekannte Substanz (Retentionszeit  $t_x$ ) wird der Retentionsindex bestimmt, indem man diejenigen aufeinanderfolgenden n-Alkane als Standardsubstanzen verwendet, deren GC-Peaks vor und nach dem Peak der unbekanntes Substanz erscheinen (Retentionszeiten  $t_z$  und  $t_{z+1}$ , wenn  $z$  und  $z + 1$  die Kohlenstoffzahlen der Alkane sind). Der Retentionsindex ist dann

$$I = 100 \cdot \left( z + \frac{\log(t_x) - \log(t_z)}{\log(t_{z+1}) - \log(t_z)} \right) \quad (10)$$

Diese Beziehung kann zur Substanzidentifizierung herangezogen werden, da für eine außerordentlich große Zahl von Verbindungen die Retentionsindices tabelliert vorliegen (Tabelle liegt am Arbeitsplatz aus).

### Splitverhältnis

Da bei Kapillarsäulen die Probenmenge zur Erzielung einer hohen Trennleistung sehr klein gehalten werden muss, wird ein großer Teil der Probe an der Säule vorbeigeführt. Das zugeführte mit Probe angereicherte Trägergas wird in zwei getrennte Gasflüsse aufgeteilt - in den Kapillarsäulenfluss und in den Splitfluss.

Unter Annahme, dass die Durchflussgeschwindigkeiten (in ml/min) in diesen beiden Flusslinien  $v_1$  und  $v_2$  sind, wird das Splitverhältnis

$$R = \frac{v_1}{v_1 + v_2}$$

Es wird z.B. bei einem auf 1:50 eingestellten Splitverhältnis 1/50 der injizierten Probe in die Kapillarsäule eingeleitet. Im Normalfall wird das Splitverhältnis ungefähr zwischen 1:50 und 1:100 eingestellt.

$N_2$ , He, und  $H_2$  können als Trägergas verwendet werden.

Bei  $N_2$  liegt das Trennoptimum bei einer linearen Gasgeschwindigkeit von 5 - 8 cm/s, bei He bei 12 - 28 cm/s und bei  $H_2$  bei 20 - 50 cm/s, wobei die lineare Gasgeschwindigkeit  $u$  [cm/s] mit dem Gasdurchsatz  $dV/dt$  [cm<sup>3</sup>/s] über folgende Beziehung verknüpft ist:

$$u = \frac{1}{A} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (A = \text{innere Querschnittsfläche der Säule})$$

Der Trägergasdruck wird bei Kapillarsäulen konstant eingestellt, da bei eingestelltem Splitverhältnis der Gasfluss konstant gehalten werden kann.

### **Methode des inneren Standard für quantitative Bestimmungen**

Für die quantitative Bestimmung einer bestimmten Komponente eines Stoffes benutzt man eine Substanz (Innerer Standard = IS), deren Retentionszeit sich von der zu untersuchenden Komponente unterscheidet. Mit Hilfe einer Standardlösung, in der die Konzentrationen des inneren

Standards und der zu untersuchenden Komponente bekannt sind, bestimmt man zunächst den Empfindlichkeitsfaktor  $k$  nach folgender Beziehung

$$k = \frac{A_{Pr} \cdot c_{IS}}{A_{IS} \cdot c_{Pr}}, \quad \text{wobei } A_{Pr} \text{ und } A_{IS} \text{ Peakflächen darstellen.}$$

In der Probenlösung stellt man eine der Standardlösung etwa entsprechende Konzentration an IS her. Nach anschließender Vermessung der Probenlösung kann man durch Umstellen obiger Gleichung die Konzentration der gesuchten Komponente ermitteln.

$$c_{Pr} = \frac{1}{k} \cdot \frac{A_{Pr}}{A_{IS}} \cdot c_{IS}$$

**Aufgaben**

Die Versuche werden an einem Kapillar-Gaschromatographen mit FID durchgeführt. Die an den Geräten ausliegenden Arbeitsplatzanweisungen sowie die Hinweise des Assistenten sind zu beachten. Um eine Beschädigung der Geräte zu vermeiden, sind nur die angegebenen Geräteeinstellungen zu verwenden.

- 1.) Durchführung eines einfachen Analysenlaufs mit Methan  
Bestimmung des Splitverhältnisses
- 2.) Aufnahme des Chromatogramms eines höheren Alkans  
Bestimmung der theoretischen Bodenzahl.
- 3.) Quantitative Bestimmung einer (oder mehrerer) ausgewählter Komponente(n) in einem Arzneistoff, Naturstoff bzw. in einer Zubereitung nach der Methode des inneren Standards. Dazu gibt es verschiedene Versuchskomplexe, von denen auf Anweisung des Assistenten einer bearbeitet wird.

Legen Sie für Kalibrierlauf und Messlauf der Aufgabe 3 je eine Tabelle an:

Kalibrierlauf:

Stoff	$t_R$ in min	A in Zählheiten	c in mg/ml	k
.				
.				

Messlauf:

Stoff	$t_R$ in min	A in Zählheiten	$c_{St}$ in mg/ml	$k'$	$c_{Pr}$
.					
.					

Vermerken Sie zu den 3 Aufgaben alle Einstelldaten am Gaschromatographen (Temperaturprogramme), am Rechner (Zeitprogramme) sowie Angaben zu den Proben in Ihrem Protokoll.