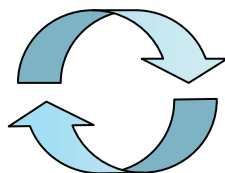


HPLC: Gerätequalifizierung, Reproduzierbarkeit von Retentionszeit und Peakfläche

Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan Nr. 7.6](#)



Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfelder 4, 8](#)

Geräte: HPLC-System mit UV-Detektor, RP18 –Säule, Injektionsspritze oder Autosampler

Chemikalien: Methanol (R-Sätze: 11 - 23 / 25, S-Sätze: 2 – 7 – 16 - 24, VbF: B, T = Giftig, F = leichtentzündlich, fruchtschädigend: D) oder Acetonitril (R-Sätze: 11 – 23/ 24 / 25, S-Sätze: 16 – 27 - 44, T = Giftig, F = leichtentzündlich), Ethylbenzol (R-Sätze: 11 – 20, S-Sätze: 16 – 24 / 25 - 29, Xn, F = leichtentzündlich), Hexylbenzol (R-Sätze: 11 – 20, S-Sätze: 16 – 24 / 25 - 29, Xn, F = leichtentzündlich), Phenyldecan (R-Sätze: 11 – 20, S-Sätze: 16 – 24 / 25 - 29, Xn, F = leichtentzündlich)

1. Prinzip

Im Rahmen der Gerätequalifikation sollte das HPLC-System regelmäßig gecheckt werden. Beispielhaft soll die Reproduzierbarkeit von Peakfläche und Retentionszeit beschrieben werden.

Ein Gemisch von Alkylbenzolhomologen, die einen großen Bereich der Retentionszeit abdecken, wird mehrmals hintereinander in den Injektor des HPLC-Systems injiziert und es werden jeweils die Peakflächen und die Retentionszeiten gemessen. Aus den Retentionszeiten und den Peakflächen wird der jeweilige Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Die erhaltenen Daten werden bewertet.

2. Durchführung

2.1 Probenlösung

Von den nachstehenden Analyten sollten etwa 2 - 4 mg in 100 mL Methanol gelöst werden:

- Ethylbenzol ($C_2H_5-C_6H_5$)
- Hexylbenzol ($C_6H_{13}-C_6H_5$)
- Phenyldecan ($C_{10}H_{21}-C_6H_5$)

2.2 HPLC-Bedingungen

- C18-RP-Phase, z. B. Hypersil ODS II
- 4 oder 4,6 mm Innendurchmesser
- 12,5 cm Länge
- Laufmittel 100 % Acetonitril oder Methanol/Wasser 90:10 (v/v)
- UV-Detektion: 254 nm

3. Analyse

Es werden von jedem Analyt die Peakfläche (3 pro Analysenlauf) und die Retentionszeit (3 pro Analysenlauf) gemessen und notiert. Der Analysenlauf ist insgesamt 6mal durchzuführen.

Die erhaltenen Daten sind auf grobe Ausreißer zu untersuchen, ggf. sollte der Ausreißer der Datenreihe entnommen werden und nochmals injiziert werden.

4. Auswertung

Von jedem Analyten ist jeweils von der Retentionszeit und von der Peakfläche

der Mittelwert
$$\bar{x} = \frac{x_i}{N}$$

die Standardabweichung
$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

der Variationskoeffizient V (%)
$$V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

zu berechnen.

5. Bewertung

Zunächst sind die aufgenommenen 6 Reihen auf einen Trend hin zu untersuchen. Ein deutlicher Trend ist immer schädlich, dann sollte sofort die Ursache gesucht werden.

Der Variationskoeffizient V ist der Maßstab zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit (Streuungsgröße) von den Peakflächen und den Retentionszeiten.

Von den drei erhaltenen Variationskoeffizienten für die Peakfläche sollte nun der Mittelwert berechnet werden, der Mittelwert sollte einen Wert von unter 0,7 % annehmen.

Von den drei Variationskoeffizienten für die Retentionszeit sollte der Mittelwert berechnet werden, der Mittelwert sollte einen Wert von unter 0,5 % annehmen.

Dann kann von einem HPLC-System ausgegangen werden, dessen Pumpe einen konstanten Volumenstrom fördert und einen intakten Injektor besitzt.

Ist der Variationskoeffizient der Peakfläche und gleichzeitig der Variationskoeffizient der Retentionszeit deutlich über den angegebenen Grenzwerten, pulst vermutlich die Pumpe und fördert nicht kontinuierlich einen konstanten Volumenstrom. Darüber hinaus kann das Injektionssystem defekt sein.

Ist der Variationskoeffizient der Retentionszeit in Ordnung, aber der Variationskoeffizient der Peakflächen zu groß, ist der Injektor defekt, die Pumpe fördert jedoch korrekt.

7. Umsetzungsvorschlag für den Ausbildungsbetrieb**7.1. Herstellung der Probe**

Die Probe wird vom Auszubildenden selbst hergestellt.

7.2. Zeitbedarf

Der durchschnittliche Zeitbedarf zur Durchführung der Aufgabe beträgt ca. 6 Stunden.

7.3. Bewertung

Eine Bewertung ist nicht vorgesehen