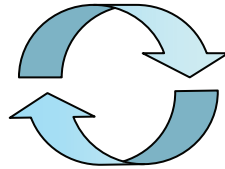


GC: Methodenentwicklung und Validierung einer quantitativen Bestimmung von Alkoholen mit Hilfe des inneren Standards

Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan 13](#)



Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfeld 8](#)

Geräte: GC-System mit 25-m-Säule, Split-Injektor, Autosampler oder GC-Spritze, WLD oder FID, Auswertesystem, Bürette, Pipetten, Kolben, Waage

Chemikalien: Pentan-1-ol (R-Sätze: 10 - 20, S-Sätze: 24/25, VbF: A II, Xn) , n-Decan (R-Sätze: 10, VbF: A II) Hexan-1-ol (R-Sätze: 10 - 20, S-Sätze: 22/24, VbF: A III, Xn).

1. Prinzip

In einer Probe ist Pentan-1-ol und n-Decan enthalten. Es ist ein Massenanteil zwischen 40% und 60 % Pentan-1-ol zu erwarten. Als innerer Standard soll Hexan-1-ol verwendet werden.

Zunächst werden die Trennungsbedingungen am GC-System optimiert, um die drei Bestandteile bis zur Basis-Linie zu trennen. Bei der quantitativen Methode des inneren Standards wird eine Kalibrierlösung mit genau definierter Konzentration an Pentan-1-ol, n-Decan, Hexan-1-ol im GC-System chromatografiert. Aus den Peakflächen an Pentan-1-ol und Hexan-1-ol (Standard) in den Chromatogrammen wird dann der Methodenfaktor MF berechnet.

Zu einer definierten Menge an „künstlicher Probe“ wird eine definierte Menge Standard eingewogen und das Gemisch chromatografiert. Aus den Peakflächen, dem Methodenfaktor MF und den eingewogenen Massen ist der Massenanteil an Pentanol-1-ol zu berechnen. Dann werden die Selektivität, die Präzision und die Richtigkeit der Methode abgeschätzt sowie die Robustheit des analytischen Verfahrens überprüft.

2. Orientierungsfragen

- (1) Was versteht man unter „Validieren“?
- (2) Welche Validierungsparameter kennen Sie?
- (3) Worin besteht der Unterschied zwischen „Präzision“ und „Richtigkeit“?
- (4) Warum wurden für diese Untersuchung die Parameter „Richtigkeit“, „Präzision“ und „Robustheit“ herausgesucht?
- (5) Welche Bedingungen müssen geändert werden, wenn statt eines FIDs ein WLD benutzt wird?
- (6) Welche Vor- und Nachteile hat die Methode „innerer Standard“?
- (7) Welche Eigenschaften soll ein innerer Standard aufweisen?
- (8) Wie soll das Massenverhältnis „innerer Standard“ und „Analyt“ in etwa sein, um dann den Methodenfaktor zu bestimmen?

3. GC-Bedingungen

Säule:	25 m oder 30 m, unpolare Kapillarsäule, z.B. 100 % Methylsilicon, 320 μm oder 530 μm Innendurchmesser, Filmdicke ca. 1 μm
Ofen:	temperaturprogrammiert
Injektor:	Split, Splitverhältnis 1 : 20 (530- μm -Säule) oder 1: 40 (320- μm -Säule)
Injektortemperatur:	180 °C
Detektor:	Micro-WLD oder FID
Detektortemperatur:	185 °C
Gas:	He, mind 99,99 %
Gasgeschwindigkeit durch die Säule:	30 bis 45 cm/s (gemessen mit Methan - Totzeitpeak)

Ofentemperatur

Anfangstemperatur:	40 °C
Aufheizrate:	20 °C / Min
Endtemperatur:	210 °C

Das Temperaturprogramm muss noch optimiert werden.

4. Durchführung anhand von Leitvorgaben

- (1) Chromatografieren Sie die erhaltene Probe, die ein Gemisch von Pentan-1-ol und n-Decan ist. Schätzen Sie grob anhand der Peakflächen den ungefähren Massenanteil an Pentan-1-ol in der Probe.
- (2) Mischen Sie in einem Teil der Probe noch den inneren Standard Hexan-1-ol hinzu und chromatografieren Sie das Gemisch. Durch Verändern der GC-Parameter optimieren Sie die Trennung, so dass ein aussagefähiges Chromatogramm entsteht. Berechnen Sie die Resolutionsfaktoren zwischen den drei Peaks. Sie sollten mindestens $R_s > 1,5$ betragen.
- (3) Bestimmen Sie den Methodenfaktor MF, indem Sie in etwa das gleiche Verhältnis an Pentan-1-ol und n-Decan einwiegen, wie es in der Probe vorhanden ist. Dazu kommt soviel Hexan-1-ol, dass die Peakflächen an Pentan-1-ol und Hexan-1-ol ähnlich groß werden.
- (4) Die Bestimmung des Methodenfaktors ist so oft vorzunehmen, bis der Wert stabil ist, d. h., um nicht mehr als 0,5 % (rel.) differiert.
- (5) Anschließend wird eine „künstliche Probe“ hergestellt, indem 1000 mg Pentan-1-ol und 1000 mg n-Decan, jeweils auf 0,5 mg genau gewogen, intensiv vermischt und in einem verschlossenen Glas aufgehoben werden.
- (6) Die „künstliche Probe“ ist nach Zugabe von innerem Standard zu chromatografieren und der Massenanteil an Pentan-1-ol zu bestimmen. Der Versuch ist 5mal zu wiederholen.
 - Liegen ausreißerfreie Daten vor?
 - Ist ein zeitlicher Trend in der Datenreihe zu beobachten?
 - Berechnung des Mittelwertes der 6 Konzentrationen
 - Berechnung der Standardabweichung der 6 Konzentrationen
 - Berechnung des Variationskoeffizienten V(%)

Der Variationskoeffizient $V(\%)$ sollte unter 1,0 % sein und ist zu notieren. Er ist das Maß für die Präzision des Verfahrens unter „Wiederholbedingungen“.

- (7) Es werden 3 „künstliche Proben“ durch Einwiegen auf der Analysenwaage sehr sorgfältig hergestellt und intensiv homogenisiert:
- Probe 1 mit einem Massenteil von $w(\text{Pentan-1-ol}) = 40 \%$
 - Probe 2 mit einem Massenteil von $w(\text{Pentan-1-ol}) = 50 \%$
 - Probe 3 mit einem Massenteil von $w(\text{Pentan-1-ol}) = 60 \%$

Alle drei Mischungen werden nach Punkt 6 bearbeitet und chromatografiert (Doppelbestimmung). Die Richtigkeit des Verfahrens wird abgeschätzt durch folgende Gleichung:

$$WFR = \frac{\text{gefundene Konzentration Pentan-1-ol}}{\text{eingewogene Konzentration Pentan-1-ol}} \cdot 100\%$$

Es soll geprüft werden, ob die durchschnittliche Wiederfindungsrate aller drei Werte (WFR) nicht mehr als 2 % von 100 % abweicht und ob die WFR der drei Massenanteile (40, 50 und 60 %) nicht mehr als 1 % von einander abweichen.

- (8) Schreiben Sie alle kritischen Parameter auf, die Ihnen während der Analyse oder während der Validierung Schwierigkeiten gemacht haben. Verändern Sie ein paar Parameter und überprüfen Sie eine der künstlichen Proben auf die WFR:
- Veränderung der Ofentemperatur
 - Veränderung der Injektionstemperatur
 - Veränderung der Detektionstemperatur
 - Veränderung der Zuwaage an „innerem Standard“
 - usw.

Benennen Sie die kritischen Parameter des analytischen Verfahrens.

- (9) Es wird ein Validierungsbericht aufgesetzt, in dem alle Validierungsparameter benannt und bei Eignung das Verfahren freigegeben wird:
- Selektivität
 - Wiederholpräzision
 - Richtigkeit
 - Robustheit

- (10) Bestimmen Sie die erhaltene Probe auf den Massenanteil an Pentan-1-ol.

Ist Ihre Methode valide?

5. Umsetzungsvorschlag für den Ausbildungsbetrieb

5.1 Herstellung der Probe

In einer Probe ist Pentan-1-ol und n-Decan enthalten. Es ist ein Massenanteil zwischen 40% und 60 % Pentan-1-ol, auf eine Nachkommastelle genau, herzustellen.

5.2 Zeitbedarf

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

5.3 Bewertung

Eine Bewertung ist aufgrund der zusammengestellten Validierungsdaten vorzunehmen.