

Physikalisch-Chemisches Praktikum für Bioinformatiker

Versuch: Gaschromatographie

Versuchsziel

- Ermittlung der theoretischen Bodenzahl
- Verifizierung der Theorie der Verteilung eines Stoffes auf zwei Phasen
- Interpretation des Schaubilds, Zusammenhang zwischen Ausschlag der Kurve und Konzentration der entsprechenden Komponente

Definition

Chromatographie im Allgemeinen ist ein chemisch-physikalisches Trennverfahren. Bei der Gaschromatographie wird ein Gas, welches aus mehreren Komponenten besteht, in diese aufgeteilt.

Chromatographie-Säule, Phasen

Die Versuchsanordnung besteht aus zwei Phasen: Die mobile Phase ist ein Trägergas (enthält das eigentliche Gas, welches aufgetrennt werden soll), die fest in der Säule verankerte stationäre Phase ist entweder flüssig oder fest.

Funktionsprinzip

Die mobile Phase strömt an der stationären Phase vorbei, wobei Moleküle des zu trennenden Gases an der stationären Phase zurück gehalten werden. Durch den konstanten Fluss des Gases sammeln sich jedoch nicht alle Moleküle der verschiedenen Komponenten an einem Punkt. Es stellt sich vielmehr eine Binomialverteilung ein, welche mit Hilfe des Craig-Modells anschaulich erklärt werden kann.

Nernstsches Verteilungsgesetz

Wenn zwei Phasen α und β miteinander im Gleichgewicht stehen, so sind auch die chemischen Aktivitäten a_B^α und a_B^β des Stoffes B miteinander im Gleichgewicht.

(Es gilt: $\mu_B^\alpha = \mu_B^\beta \Rightarrow a_B^\alpha \sim a_B^\beta$)

Bei ideal verdünnten Lösungen sind dann auch die Konzentrationen zueinander proportional: $c_B^\alpha \sim c_B^\beta$. Der Quotient $\frac{a_B^\alpha}{a_B^\beta}$ heißt Nernstsche Gleichgewichtskonstante.

Craig-Verteilung

Das Craig-Modell zur Binomialverteilung geht von nummerierten Trichtern aus, die alle zunächst mit der Phase α halb gefüllt sind. In den ersten Trichter wird nun Phase β gegeben und geschüttelt, sodass sich die Moleküle in β auf das ganze Volumen im Trichter verteilen. Je nach Lokalität der Phase hat sich die Konzentration jetzt halbiert bzw. verdoppelt. Nun werden vom Trichter m aus, iterativ die Schritte „obere Hälfte in den Trichter $m + 1$ leeren“, „Trichter m mit der reinen Phase auffüllen“ und „schütteln“ solange ausgeführt bis alle Trichter voll sind. Es ergibt sich bezüglich der Konzentrationen in den einzelnen Trichtern die Craig-Verteilung, d.h. der mittige Trichter besitzt die höchste, die äußeren die niedrigste Konzentration.

Binomialverteilung

Die Binomialverteilung spielt in der Wahrscheinlichkeitsrechnung eine große Rolle und kann auf das Craig-Modell angewandt werden. Sie ist konkret durch Formeln darstellbar und für natürliche Zahlen definiert:

$$P_{m,n} = \binom{n}{m} p^m (1-p)^{n-m} = \frac{c_B(m)}{c_{B,0}}$$

$c_{B,0}$ ist dabei die Konzentration, die am Anfang in den ersten Trichter gegeben wurde. $c_B(m)$ gibt die Konzentration des Trichters m an. Der Quotient ist also die relative Konzentration im Trichter m .

Wichtig ist die Ermittlung des Trichters, der die höchste Konzentration besitzt: Aus dem Mittelwert der Verteilungsfunktion $\sum_{m=0}^n m P_{m,n}$ erhält man, durch Umformen und Miteinbeziehung der Binomialentwicklung, die Gleichung $y = np$, wobei y die Trichternummer und n die Anzahl der Schüttelvorgänge angibt. p hängt vom Verteilungskoeffizienten k ab.

Zusammenhang zur Chromatographie

Die Verteilungsfunktion gibt an, wie sich die einzelnen Konzentrationen auf der Säule verteilen. Wird beim Craig-Modell weiter geschüttelt als oben beschrieben, so wandert das Maximum der Konzentration von der Mitte auf das Ende zu. Diese maximale relative Konzentration am Ende der Säule ist abhängig vom Volumen des Trägergases.

Poisson-Verteilung

Als „theoretische Böden“ werden Segmente bezeichnet in die man sich die Chromatographie-Säule zerlegt denkt. Diese Böden sind so angeordnet, dass innerhalb jedes Bodens die Phasen α und β jederzeit zueinander im Gleichgewicht sind. Die Böden sind Analogien zu den Trichtern im Craig-Modell. Die sogenannte Poisson-Verteilung ergibt sich durch eine sehr hohe Anzahl an Böden. Betrachtet man nun nach Einspritzen des Gasgemisches den Transport der Teilvolumina über die einzelnen Böden $\dots, m-1, m, m+1, \dots$, so leitet sich folgende Verteilungsformel her: $P_{n,m} \approx \frac{(np)^m}{m!} e^{-np}$.

Diese Poisson-Verteilung gilt für große n und kleine p . Für das Gesamtvolumen der Säule gilt die Gleichung: $V = y(V_{(m)}^\beta + kV_{(m)}^\alpha)$. Der geklammerte Term auf der rechten Seite der Gleichung entspricht dem „wirksamen Bodenvolumen“. Mit $\frac{c_{(m)}^\beta}{c_{(0)}^\beta} = \frac{e^{-y} y^m}{m!}$ lässt sich die relative Konzentration berechnen. y bezeichnet den Mittelwert der Poisson-Verteilung.

Eluierungskurven

Das Schaubild mit der relativen Konzentration als Funktionswert in Abhängigkeit von y mit m als Parameter heißt Eluierungskurve. Durch den Parameter m stellt es eine Kurvenschar dar. Die jeweiligen Maxima sind bei $y = m$, Wendepunkte gibt es bei $y = m \pm \sqrt{m}$ (jeweils $m \neq 0$).

Das Konzentrationsverhältnis am Ende der Säule in Abhängigkeit von der Zeit und vom Volumen des Gases ist gegeben durch $\frac{c_{(m)}^\beta}{c_{(0)}^\beta} = \frac{e^{-y} y^m}{m!}$ mit $m = \text{const}$

Wenn für das Retentionsvolumen (Volumen das durch die Säule geströmt ist) gilt $V_R = n(V^\beta + kV^\alpha)$, dann ist das Maximum der Konzentration am Ende der Säule angekommen. n bezeichnet die theoretische Bodenzahl.

Eluierungsdiagramme

Der Zeitraum zwischen dem Einspritzen und dem Auftreten des Maximums einer Komponente am Säulenende nennt man Retentionszeit t_R . Das entsprechende Volumen heißt Retentionsvolumen V_R . Für das effektive Retentionsvolumen gilt: $V_R^{\text{eff}} = V_R - nV^\beta = knV^\alpha$. Im Diagramm wird nun die Konzentration des ausströmenden Trägergases gegen V_R oder t_R aufgetragen.

Berechnung der theoretischen Bodenzahl

Die theoretische Bodenzahl ergibt sich aus den Wendepunktabständen einiger Eluierungskurven und den effektiven Retentionsvolumina. Es gilt: $V_R^{\text{eff}} = \frac{1}{2} \sqrt{n} \Delta V_W - nV^\beta$. Wird V_R^{eff} gegen ΔV_W aufgetragen, so ergibt sich die Bodenzahl aus der Steigung des Graphen.

Vorüberlegungen zum Versuchsablauf

- Der Ablauf zum Abgleich des Detektors sollte im Vorhinein klar sein (Geräteanleitung), da dies laufend während des Experiments gemacht werden muss.
- Der Substanzwechsel (4.3.3) sollte davor geübt werden, so dass während des Versuchs keine Zeit verloren geht.
- Aufgrund des charakteristischen Fehlers ist es sinnvoll nur eine Person mit den Spritzen arbeiten zu lassen.

Vorfragen

1. Zeigen Sie bitte, dass bei idealer Verdünnung das Verhältnis der Konzentrationen ebenfalls konstant ist. (Finden Sie einen Zusammenhang zwischen und über Molekulargewicht, Molzahl und Dichte der gelösten bzw. der im Überschuss vorhandenen Komponente. Siehe Kap. 2.1, Gl. (2.2).)

Es gilt: $c_i = \frac{n_i}{V}$ und $x_i = \frac{n_i}{n}$, außerdem $n = \frac{m}{M} = \frac{\rho V}{M}$.

Somit folgt für c_i : $c_i = x_i \frac{n}{V} = x_i \frac{\rho}{M}$.

Nach Gleichung 2.1 ist $\frac{x_B^\alpha}{x_B^\beta}$ konstant. Aufgrund der Konstanz von ρ und M folgt: $\frac{x_B^\alpha}{x_B^\beta} \cdot \frac{\rho^\alpha M^\beta}{\rho^\beta M^\alpha} = \frac{c_B^\alpha}{c_B^\beta}$

2. Betrachten Sie beim Schütteln in Kap. 2.2 die zeitliche Verteilung der relativen Konzentration in Trichter 9 (Ausguss), beginnend mit dem 1. Ausschütten. Bis wann ist es sinnvoll, den Ausguss so zu beobachten?

Bis zur achten Ausschüttung ist die relative Konzentration in Trichter neun gleich null. Ab dem neunten Ausschütten steigt die relative Konzentration. Es gilt: $y = n \cdot p$, wobei y die Trichternummer ist und $p = 0,5$ (siehe Praktikum-Skript S. 6 Mitte). Also folgt: $9 = \frac{1}{2}n \Rightarrow n = 18$. Bis zu diesem Zeitpunkt ist es sinnvoll den Ausguss zu beobachten.

3. Berechnen Sie nach Kap. 2.3.1, Gl. 2.6, die Anzahl der Permutationen für das Ereignis, bei sieben Ziehungen zwei schwarze Kugeln zu ziehen.

Die Aufgabenstellung „zwei aus sieben“ liefert als Problem der Form „ungeordnetes Ziehen ohne Zurücklegen“ sofort:

$$P = \binom{7}{2} = 21$$

Es gibt also 21 verschiedene Möglichkeiten zwei schwarze Kugeln aus sieben zu ziehen.

p_w bezeichnet die Wahrscheinlichkeit eine schwarze Kugel zu ziehen (nicht gegeben).

4. Berechnen Sie $P_{2,5}$ nach Kap. 2.3.1, Gl. 2.6, für eine Urne mit 2 schwarzen und 3 weißen Kugeln, sowie $P_{3,7}$ für eine Urne mit 5 schwarzen und 4 weißen Kugeln ($m =$ gezogene schwarze Kugeln).

$$P_{2,5} = \binom{5}{2} \left(\frac{2}{5}\right)^2 \left(\frac{3}{5}\right)^3 = \frac{5!}{2! \cdot 3!} \cdot \frac{4}{25} \cdot \frac{27}{125} = 0,3456 = 34,56\%$$

$$P_{3,7} = \binom{7}{3} \left(\frac{5}{9}\right)^3 \left(\frac{4}{9}\right)^4 = \frac{7!}{3! \cdot 4!} \cdot \frac{125}{729} \cdot \frac{256}{6561} \approx 0,2342 = 23,42\%$$

5. Wie wird sich die Verteilung Kap. 2.3.1 ändern, wenn Sie 16-mal schütteln und dabei jeweils die Phasen im letzten Trichter verwerfen (nur qualitativ)?

Die Kurve wird flacher und nach rechts verschoben.

6. Wie unterscheiden sich $V_{(0)}^\alpha$, $V_{(0)}^\beta$, $V_{(5)}^\alpha$, $V_{(5)}^\beta$ in Gl. 2.19 für die Craig-Verteilung und für die Chromatographie-Säule?

Bei $V_{(0)}^\alpha$ und $V_{(0)}^\beta$ sammelt sich die Substanz hauptsächlich im ersten Segment, bei $V_{(5)}^\alpha$ und $V_{(5)}^\beta$ vor allem im sechsten. $V_{(n)}^\alpha$ und $V_{(n)}^\beta$ bezeichnen die Volumina der Phasen α und β im Segment n . Diese Volumina müssen jedoch gleich sein.

7. Wie unterscheiden sich die Ansätze der Binomial-, Poisson- und Gauß-Verteilung?

Bei der Binomial-Verteilung betrachtet man die Anzahl der Experimente, bis eine bestimmte Anzahl an Molekülen zu einem Trichter gelangt ist.

In der Poisson-Verteilung wird die Konzentration der Stoffe über die gesamte Säule betrachtet und infinitesimale Änderungen vorgenommen.

Mit der Gauß-Verteilung wird die Konzentration jeweils an einem Ort betrachtet. Dadurch entsteht eine Glockenkurve.

8. Berechnen Sie für eine theoretische Bodenzahl von 1000 das Verhältnis des insgesamt notwendigen Volumens zum wirksamen Bodenvolumen unter der Annahme, dass sich Luft in der stationären Komponente nicht löst.

In der Gleichung $V_R = n(V^\beta + kV^\alpha)$ ist $k = 0$, da sich Luft nicht in der stationären Phase löst. Es folgt: $\frac{V_R}{V^\beta} = n = 1000$

9. Der Fluss in einer Säule soll $1 \frac{\text{ml}}{\text{s}}$ betragen. Das Säulenvolumen ist 20ml. Wie lange benötigt die Komponente (keine Verteilung) bei optimaler Trennleistung für den Weg von einem Säulenende zum andern?

$$t = \frac{20 \text{ml}}{1 \frac{\text{ml}}{\text{s}}} = 20 \text{s}$$

10. Welche Größen gehen in die Wärmeleitfähigkeit eines Gases ein? Diskutieren Sie diese für den Fall von Helium als Trägergas (entnehmen Sie diese Information einem Lehrbuch oder einem der angegebenen Chromatographiebücher; Stichwort Wärmeleitfähigkeitsdetektor Kap. 3.2).

Die Wärmeleitfähigkeit λ hängt von folgenden Größen ab:

- Temperatur T
- Leistung P
- Strecke s

Es gilt: $\lambda = \frac{P}{s \cdot T} = \frac{1}{2} \cdot \frac{N c_V \bar{v} \lambda_m}{N_A V}$.

- N : Teilchenzahl
- N_A : Avogadro-Zahl
- V : Volumen
- c_V : Wärmekapazität bei konstantem Volumen
- \bar{v} : mittlere Teilchengeschwindigkeit
- λ_m : mittlere freie Weglänge

Durch die geringe Größe eines Helium-Atoms werden \bar{v} und λ_m groß, die Wärmeleitfähigkeit von Helium steigt. Aufgrund der Edelgas-Eigenschaft ist Helium kaum reaktiv und somit als Trägergas für Wärme besonders geeignet.

4. Versuchsdurchführung

Die Versuche 4.1 und 4.2 (Einstellung des Durchflussvolumens, Einstellung der Säulen-, Detektor- und Einspritzblocktemperatur sowie Abgleichen des Detektors) wurden bereits von den Vorgruppen durchgeführt. Die Geräte konnten daher übernommen werden.

4.3 Vorversuche

1 μ l Ethanol wurde mit der Spritze aufgezogen und in den polaren Teil des Schreibers eingespritzt. Der Rest der Spritze ist mit Luft aufgefüllt worden, um die Totzeit (Zeit von der Startposition bis zum Luftpeak) messen zu können. Gleichzeitig zum Einspritzen wurde der Schreiber gestartet um den Peak aufzuzeichnen. Sobald wieder die Nulllinie erreicht war, wurde er angehalten und die Startposition des nächsten Durchlaufes markiert. Die Abschwächungseinstellung (Attenuation) bei diesem Versuch betrug 128. Bei den weiteren Durchgängen wurde mit Attenuation 256 gearbeitet.

4.4.1 Messung der Reproduzierbarkeit

Es wurden drei Durchgänge mit jeweils 0,6 μ l durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf Gleichheit geprüft.

	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3	Mittelwert	Std.abweichung
t_R^{eff} [min]	1,20	1,15	1,15	1,17	0,03
n	14,9	14,5	15,8	15,07	0,67

Betrachtet man das Maximum der Peaks sowie den Wert t_R^{eff} , so erscheint die Abweichung relativ gering. Die Reproduzierbarkeit des Verfahrens ist somit geeignet um sinnvolle Analysen durchführen zu können.

4.4.2 Bestimmung der theoretischen Bodenzahlen

Vor diesem Versuch wurde die Spritze mit Aceton durchgespült. Statt Ethanol ist nun $0,6\mu\text{l}$ Methanol (polar) verwendet worden. Die gleiche Messung fand mit Essigsäureethylester (unpolar), Propanol-1 (polar) und Toluol (unpolar) statt. Der auf in der Messung zu sehende erste Versuch mit Propanol-1 war aufgrund von zuviel Luft in der Spritze ein Fehlversuch.

4.4.3 Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit des Detektors

Nacheinander wurden zuerst $0,9\mu\text{l}$, $0,7\mu\text{l}$, $0,6\mu\text{l}$ sowie $0,5\mu\text{l}$ an Essigsäureethylester und danach die gleichen Mengen Aceton eingespritzt.

4.4.4 Trennung eines Substanzgemisches

$1\mu\text{l}$ eines Substanzgemisches, bestehend aus Aceton, Essigsäureethylester und Acetonitril wurden in den Gaschromatographen gespritzt. Die Substanzen wurden dort getrennt und deshalb zu verschiedenen Zeiten eluiert. Man sieht deutlich, dass Aceton und Essigsäureethylester nicht vollständig getrennt wurden, da sich die Peaks teilweise überlagern. Der Versuch musste viermal wiederholt werden um zu einem optimalen Ergebnis zu gelangen.

5. Auswertung

5.1 Bestimmung der theoretischen Bodenzahl

	Methanol	Essigsäureethylester	Propanol-1	Toluol	Ethanol
$t_R^{eff}(V_R^{eff})$ [min]	0,40	1,20	0,65	1,90	1,15
V_R^{eff} [ml]	10,00	30,00	16,25	47,50	28,75
ΔV_W	3,82	4,47	4,61	7,66	4,51
Totzeit [min]	0,85	0,30	0,85	0,85	0,40

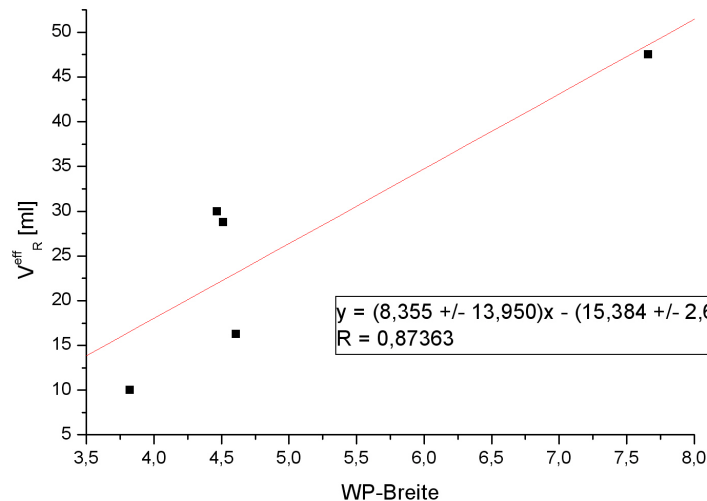


Abbildung 1: V_R^{eff} über WP-Breite

Auswertung 1: Kann man eine Gerade durch die Punkte für alle Substanzen legen? Welche Substanzen liegen bei Ihren Ergebnissen auf einer Geraden?

Besonders gut liegt Toluol auf der Geraden, betrachtet man nur Methanol, Propanol-1 und Toluol, so lässt sich durch die entsprechenden Punkte recht genau eine Gerade legen.

Auswertung 2: Berechnen Sie die Trennstufenzahl nach Gl. (2.26) für die eingespritzten Substanzen.

Die Steigung beträgt 8,36. Die Ermittlung der theoretischen Bodenzahl erfolgt mit der Formel

$$V_R^{eff} = \frac{1}{2} \cdot \sqrt{n} \cdot \Delta V_W - n \cdot V^\beta.$$

Diese Geradengleichung mit der Steigung $\frac{1}{2} \cdot \sqrt{n}$ liefert mit der von Origin für unsere Werte berechneten Steigung

$$\frac{1}{2} \cdot \sqrt{n} = 8,36.$$

$$\Rightarrow n = (2 \cdot 8,36)^2 = 279,56 \approx 280$$

Dieses Ergebnis entspricht der theoretischen Bodenzahl.

Auswertung 3: Benutzen Sie das Ergebnis der linearen Regression um den Fehler für n anzugeben.

Der Fehler σ einer Funktion $f(a, b, \dots)$ berechnet sich zu

$$\sigma f(a, b, \dots) = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial a} \sigma a\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial b} \sigma b\right)^2 + \dots}$$

Für unsere Funktion $f(x) = 4x^2$ ergibt sich als Fehler $\sigma f(x) = 8x \cdot \sigma x$. Dabei entspricht x der von Origin angegebenen Steigung, σx ist der angegebene Fehler dazu. Die theoretische Bodenzahl weist also einen Fehler von $8 \cdot 8,36 \cdot 13,95 = 872,12$ auf. Dieser äußerst hohe Fehler ist darauf zurück zu führen, dass Essigsäureethylester und Ethanol eine hohe Abweichung erzeugen. Lässt man diese Werte wegfallen, so beläuft sich der Fehler bei einer höheren theoretischen Bodenzahl auf lediglich 30,47.

Auswertung 4: Interpretieren Sie den y-Achsenabschnitt der Geraden

Mit der oben gegebenen Gleichung lässt sich auch der y-Achsenabschnitt als $b = -n \cdot V^\beta = -15,38 \pm 2,69$ interpretieren - er entspricht dem Totzeitvolumen.

5.2 Konzentrationsabhängigkeit des Detektors

	Einspritzvolumen Essigsäureethylester			
	0,5 μ l	0,6 μ l	0,7 μ l	0,9 μ l
Masse [mg]	25,6	31,2	39,3	48,8
Stoffmenge [mmol]	0,00511	0,00613	0,00715	0,00920

	Einspritzvolumen Aceton			
	0,5 μ l	0,6 μ l	0,7 μ l	0,9 μ l
Masse [mg]	31,5	37,5	44,8	61,5
Stoffmenge [mmol]	0,00680	0,00816	0,00952	0,01224

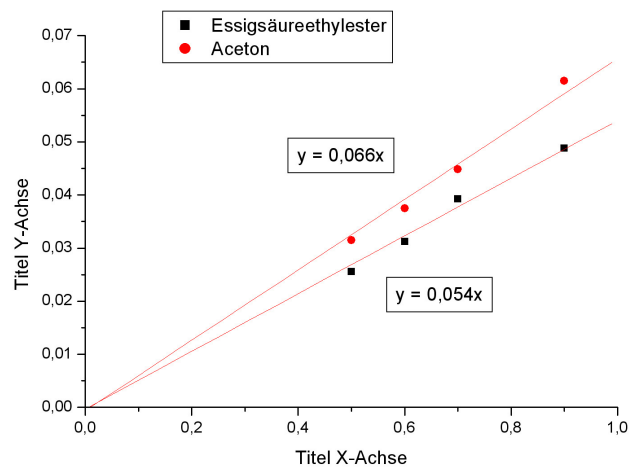


Abbildung 2: Masse über Volumen

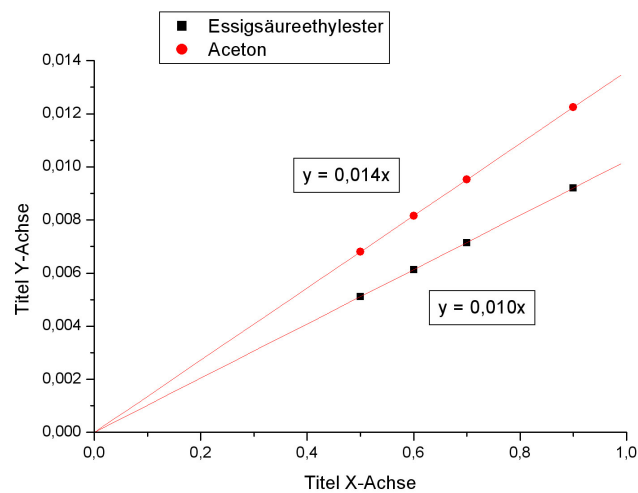


Abbildung 3: Stoffmenge über WP-Breite

In die Steigung der angegebenen Nullpunktgeraden geht die Konzentration ein.