

Universität Regensburg  
LS für Organische Chemie  
Prof. B. König



Chromatographie  
Dr. R. Vasold  
CH 32.1.05

## Quantitative Analyse der Vitamine: A<sub>ac</sub>, D<sub>2</sub>, E, E<sub>ac</sub>, K<sub>1</sub>, K<sub>3</sub> mittels Microbore- HPLC und Multi-Level-Kalibrierung



Modul: MCH-MSc-M 03  
Grundmodul Bioanalytische Chemie

Blockpraktikum  
Chromatographische Methoden (HPLC)

# Inhalt

## I Theoretischer Teil

I.1	Einleitung.....	3
I.2	Vitamine .....	3
I.2.1	Vitamin A Retinol (Axerophthol).....	3
I.2.2	Vitamin D <sub>2</sub> (Ergocalciferol).....	4
I.2.3	Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol).....	4
I.2.4	Vitamin K <sub>1</sub> (Phyllochinon) .....	5
I.2.5	Vitamin K <sub>3</sub> (Menadion) .....	5
I.3	Zielsetzung .....	6
I.4	Microbore-HPLC Vorteile und Grenzen .....	7
I.5	Der Temperatureinfluss in der HPLC .....	7
I.6	Die Multi-Level-Kalibrierung mit ISTD.....	8
I.6.1	Wahl eines geeigneten Tracers .....	8
I.6.2	Verfahren der Multi-Level-Kalibrierung mit ISTD	9
I.6.3	Der Kalibrierfaktor (Correction-factor).....	10
I.6.4	Bestimmung der Massenkonzentration .....	10
I.7	Chromatographische Kenngrößen.....	11
I.7.1	Kapazitätsfaktor $k$ (Retention-factor) .....	11
I.7.2	Trennfaktor $\alpha$ (Selectivity) .....	12
I.7.2	Auflösung $R_s$ (Resolution) .....	12
1.8	Aufgaben zum Theoretischen Teil .....	13
II	Experimenteller Teil	
II.1	Durchführung der HPLC Analysen .....	14-16

# I Theoretischer Teil

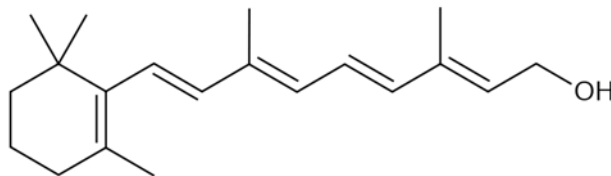
## I.1 Einleitung

Die HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography) ist eine leistungsfähige Methode zur analytischen, wie auch präparativen chromatographischen Trennung bzw. quantitativen Bestimmung von organischen und anorganischen Verbindungen fast aller Klassen. So stellt die HPLC auch in der Medizinischen Chemie eine unerlässliche analytische Methode dar.

## I.2 Vitamine

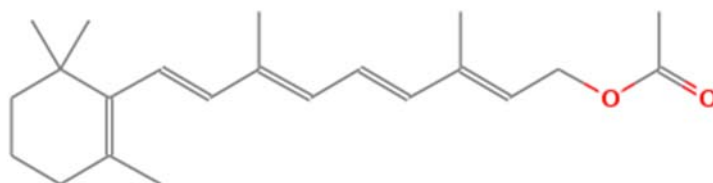
Vitamine sind eine strukturell sehr verschiedenartige Gruppe organischer Verbindungen. Vitamine sind für den Menschen essentiell und werden oft nur in kleinen Mengen benötigt. Dadurch unterscheiden sie sich von den anderen Nahrungsbestandteilen. Einige Vitamine werden dem Körper als Vorstufen (sog. Provitamine) zugeführt. Als solche sind sie unerlässlich für die Funktionsfähigkeit des Organismus. Werden Vitamine bzw. Provitamine nicht in ausreichendem Maße zugeführt, sind meist schwerwiegende Mangelerscheinungen die Folge

### I.2.1 Vitamin A (*Retinol, Axerophthol*)



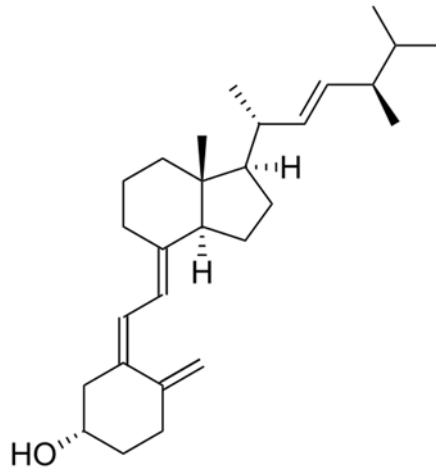
Vitamin A

Im Versuch wird Vitamin A in Form des Acetats bestimmt: Vitamin A<sub>ac</sub>



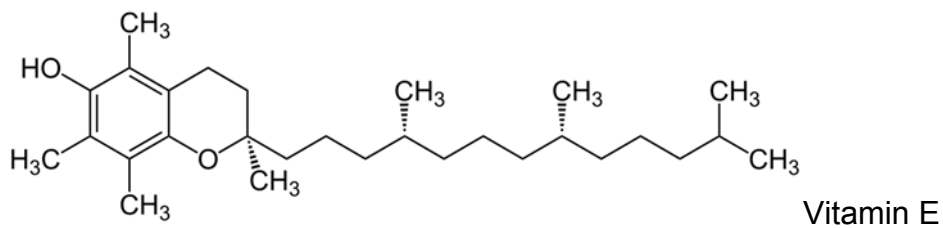
Vitamin A<sub>ac</sub>

## I.2.2 Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol)

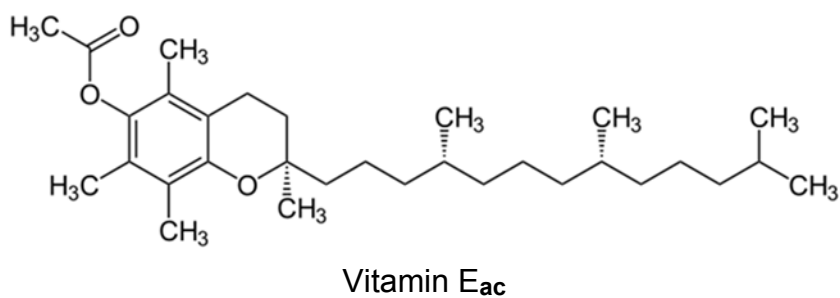


Ergocalciferol ist eine Form von Vitamin D, auch Vitamin D<sub>2</sub> genannt. Ergocalciferol ist strukturell ein Secosteroid.

## I.2.3 Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol)

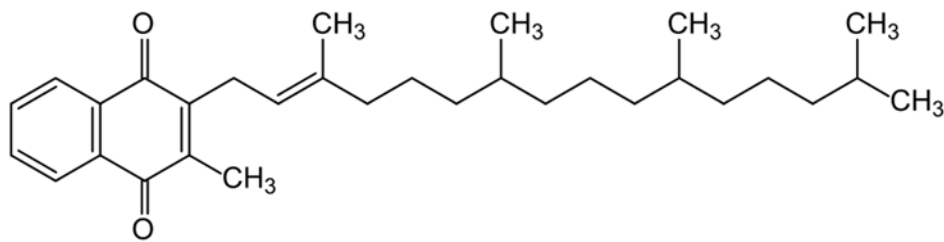


Die am häufigsten vorkommende Vitamin E-Form ist das Tocopherol  
Das verbreitetste ist das  $\alpha$ -Tocopherol



$\alpha$ -Tocopherolacetat ist ein synthetisches Vitamin E-Derivat. Im Körper wird es zu Vitamin E umgewandelt und zählt damit zu den Provitaminen.

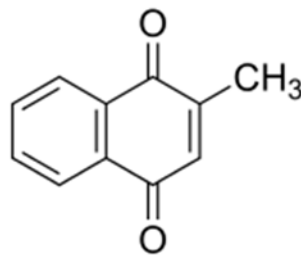
## I.2.4 Vitamin K<sub>1</sub> (Phyllochinon)



Vitamin K<sub>1</sub>

Phyllochinon oder Vitamin K<sub>1</sub> gehört zu den fettlöslichen K-Vitaminen. Im menschlichen Organismus spielt es unter anderem bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle.

## I.2.5 Vitamin K<sub>3</sub> (Menadion)



Vitamin K<sub>3</sub>

Für den menschlichen Verzehr ist Menadion verboten. Wegen toxischer Wirkungen wird der Einsatz vermieden und anstelle dessen das natürlich vorkommende Phyllochinon (s.o.) verwendet.

## I.3 Zielsetzung

Ziel dieses Praktikums ist es, eine spezielle Fragestellung aus dem Bereich der Medizinischen Chemie mit der Methode der Hochdruckflüssigchromatographie zu lösen.

In diesem Praktikum sollen u.a. folgende Kompetenzen wiederholt bzw. neu erarbeitet werden:

- Stationäre Phase (hier sog. Microbore-RP-Phase).
- Mobile Phase (Eluenten)
- Pumpen und Injektionseinheit (Autosampler),
- Detektoren, (hier Diodenarray-DAD-Detektor)
- Quantitative Analyse mit Internem Standard (Multi-Level-Calibration).
- Chromatographische Kenngrößen: Durchbruchzeit  $t_M$ , Retentionszeit  $t_R$ , Nettoretentionszeit  $t'_R$ , Kapazitätsfaktor  $k$ , Trennfaktor  $\alpha$ , Auflösung  $R_S$  etc.

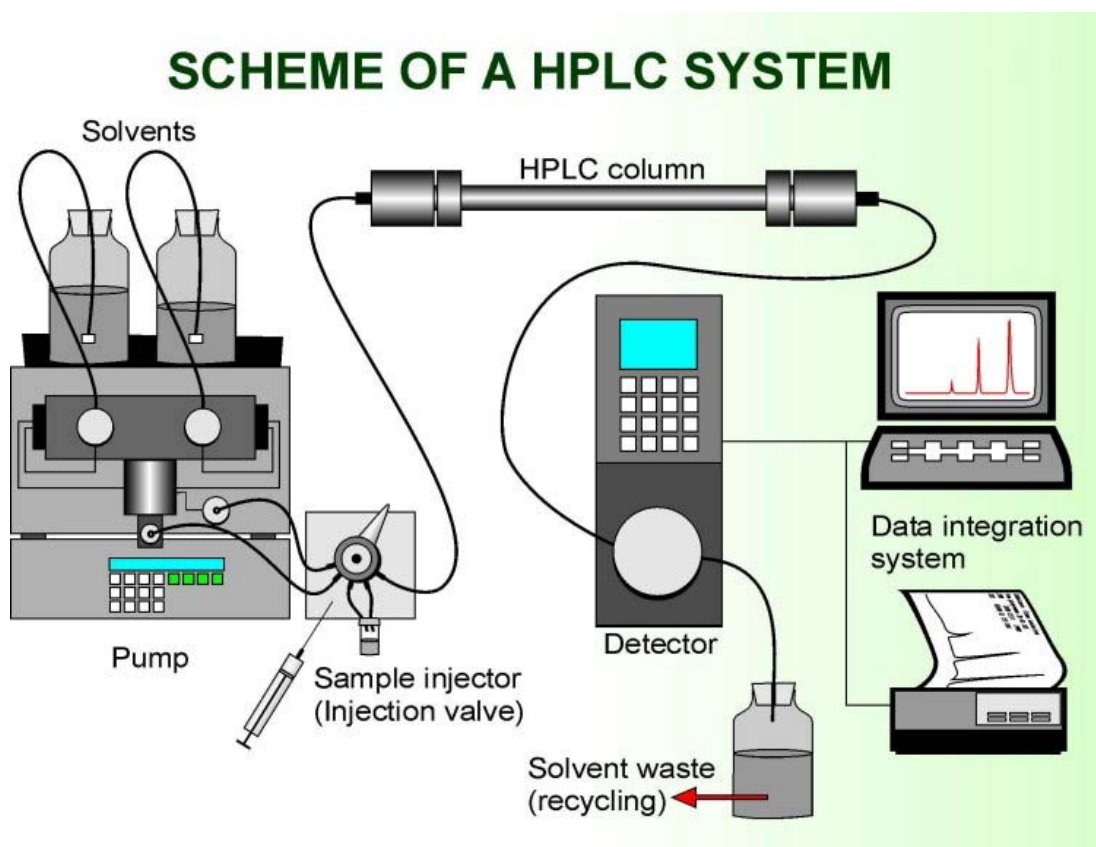


Abb.: 1.3.a Schematischer Aufbau einer HPLC Apparatur

## I.4 Microbore-HPLC Vorteile und Grenzen

Konventionelle HPLC Säulen haben Innendurchmesser von 4.6 mm und eine Länge von 3-25 cm. Sie sind gepackt mit porösen Mikropartikeln, die einen Durchmesser von 3,5 oder 10 µm aufweisen. Modernen Microbore HPLC Säulen haben einen deutlich **reduzierten Innendurchmesser** (1-2 mm). Der Hauptgrund liegt in einer deutlich höheren Nachweisempfindlichkeit.

### Vorteile der Microbore-HPLC:

- Höhere Nachweisempfindlichkeit (Sensitivity).
- Geringer Lösungsmittelverbrauch (geringere Kosten).
- Bessere Kompatibilität mit Kopplungsverfahren (z.B. LC/MS).
- Wichtig für Spurenanalytik bei begrenzter Probenmenge.

### Grenzen der Microbore-HPLC:

- Mit der Reduktion des Volumenflusses steigen auch die apparativen Anforderungen z.B. an das Pumpensystem. Es müssen konstante, sehr kleine Flussraten (bis hin zu 6 µl/min bei z.B. 1mm-Säulen) gefördert werden können.
- Die Reproduzierbarkeit von Gradientenprofilen muss gewährleistet sein.
- Oft ist eine Miniaturisierung der Detektorzelle (Micro-, Semimicrozellen) erforderlich.
- Das Kapillarsystem der HPLC-Apparatur muss entsprechend kleine Innendurchmesser aufweisen um Peak-Verbreiterung zu vermeiden.

## I.5 Der Temperatureinfluss in der HPLC

Es ist nicht möglich allgemein gültige Regeln für den Einfluss der Temperatur auf HPLC-Trennungen aufzustellen. Oft wird die Trennleistung einer Säule bei erhöhter Temperatur besser, weil die Viskosität der mobilen Phase abnimmt und dadurch der Stoffaustausch erleichtert wird. In manchen Fällen kann jedoch auch eine Abnahme der Trennleistung auftreten. Ebenso kann der **Trennfaktor  $\alpha$**  entweder zu oder abnehmen.

### Vorteile einer Temperaturerhöhung:

- Die Analysenzeit kann oft deutlich verkürzt werden.
- Bei hochviskosen Proben ist eine Erhöhung der Temperatur oft unerlässlich.
- Bei viskosen mobilen Phasen kann durch eine Temperaturerhöhung der Druck während der HPLC-Trennung oft deutlich reduziert werden.

### Nachteile einer Temperaturerhöhung:

- Gefahr einer Zersetzung von Probe, Lösungsmittel oder Eluent.
- Der Dampfdruck des Lösungsmittels steigt, damit steigt auch die Gefahr der Blasenbildung z.B. im Detektor.
- Die Löslichkeit von Silicagel in allen mobilen Phasen nimmt stark zu (die Temperatur darf bei Silica-Säulen max. 120°C, bei chemisch gebundenen Phasen max. 80°C betragen).

## I.6 Die Multi-Level-Kalibrierung mit Internem Standard (ISTD, Tracer)

In der HPLC ist es sehr wichtig, dass die vom Detektor erhaltenen Daten quantitativ ausgewertet werden können. Als Messgröße dient in der Regel die integrierte Fläche unter einem Peak. Diese ist proportional zur eingespritzten Stoffmenge des Analyten. Für die quantitative Analyse werden entsprechende Standards benötigt (z.B. Interner Standard ISTD = Tracer).

### I.6.1 Wahl eines geeigneten Tracers

Beim Verfahren des **Internen Standards** gibt man sowohl der Kalibrierlösung als auch der zu untersuchenden Probenlösung, eine weitere Komponente, den sog. **Internen Standard (ISTD, Tracer)** zu. Eine Substanz, die als Interner Standard eingesetzt werden soll, muss einige wichtige Bedingungen erfüllen:

- Ähnliches Retentionsverhalten, wie der Analyt
- Ausreichende chromatographische Trennung
- Physikalisch, chemisch ähnlich zur quantifizierenden Substanz



- Chemisch stabil bzw. inert gegenüber den restlichen Komponenten in der Probe, sowie gegenüber dem Packungsmaterial der Säule und der verwendeten mobilen Phase.
- Er sollte in möglichst hoher Reinheit vorliegen (> 98%).

## 1.6.2 Verfahren der Multi-Level-Kalibrierung mit ISTD

### Schritt 1:

Herstellen von unterschiedlich konzentrierten Analyt-Stammlösungen (**Lösungen A, B, C**). Diese enthalten die Analyten  $i$  in unterschiedlicher Konzentration  $m_i$ .

### Schritt 2:

Herstellen einer geeigneten Tracer-Stammlösung (**Lösung T**).

### Schritt 3:

Herstellen der **Kalibrielösungen** (hier **3 Levels**) durch Zugabe von gleichen Mengen an **Tracer-Stammlösung** zu jeder **Analyt-Stammlösung**. Normalerweise verwendet man hier auch die gleichen Volumina (Ergebnis: **Lösungen A+T, B+T, C+T**).

### Schritt 4:

Messen der **Kalibrierlösungen A+T, B+T, C+T** und Feststellen der  $KF_i$  Werte für jeden Analyten mittels Kalibriergleichung (siehe 1.6.3).

### Schritt 5:

Herstellen der Realprobenlösung (**Lösung X**) und Zugabe von **Tracer Stammlösung** zur **Realprobenlösung (Lösung X+T)**, wie oben beschreiben.

### Schritt 6:

Für jeden Analyten **Kalibriergleichung** nach  $m_i$  auflösen.  $KF_i$ -Werte aus **Schritt 4** einsetzen. Flächenwerte aus Messung der Realprobe und die bekannte Massenkonzentration des Tracers einsetzen und unbekannte Analyt-Konzentrationen ausrechnen (siehe 1.6.4).

### 1.6.3 Der Kalibrierfaktor (Correction-factor)

$$KF_i = (m_i \cdot a_{Tr}) / (m_{Tr} \cdot a_i)$$

- $m_i$**  Massenkonzentration der Komponente i  
 **$KF_i$**  Kalibrierfaktor der Komponente i  
 **$a_i$**  Fläche des Peaks der Komponente i im Chromatogramm  
 **$m_{Tr}$**  Massenkonzentration des Tracers  
 **$a_{Tr}$**  Fläche des Tracers im Chromatogramm

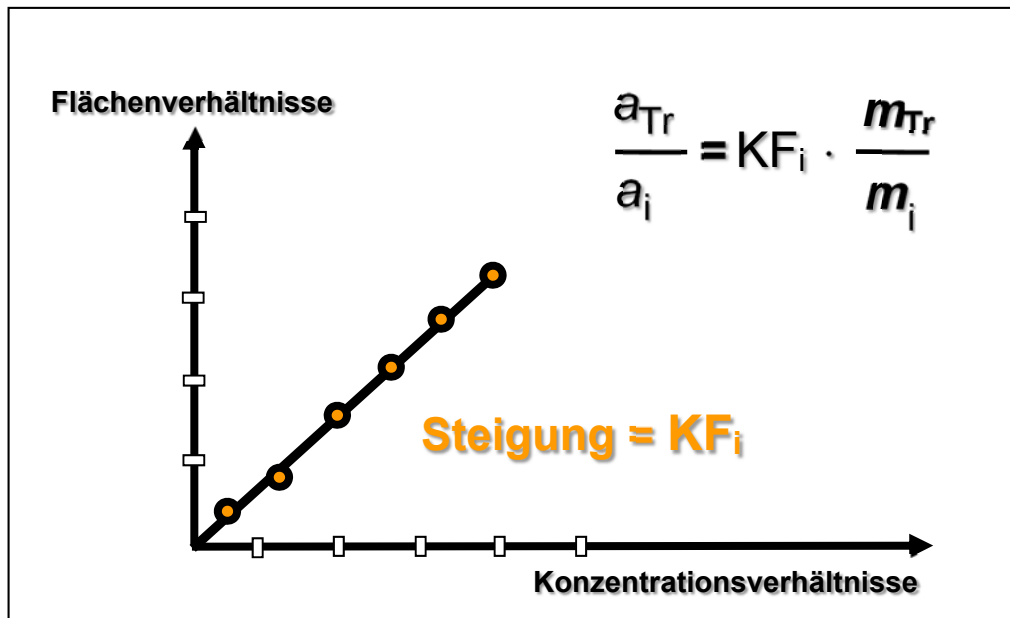


Abb. 1.6.3.a Multi-Level-Kalibrierung einer Komponente i mit internem (ISTD) und Bestimmung des  $KF_i$  Wertes

### 1.6.4 Bestimmung der Massenkonzentration

$$m_i = (KF_i \cdot a_i \cdot m_{Tr}) / a_{Tr}$$

Die Massenkonzentration des Stoffes i kann nach Ermittlung des  $KF_i$  Wertes nach obiger Formel ausgerechnet werden.

## I.7 Chromatographische Kenngrößen

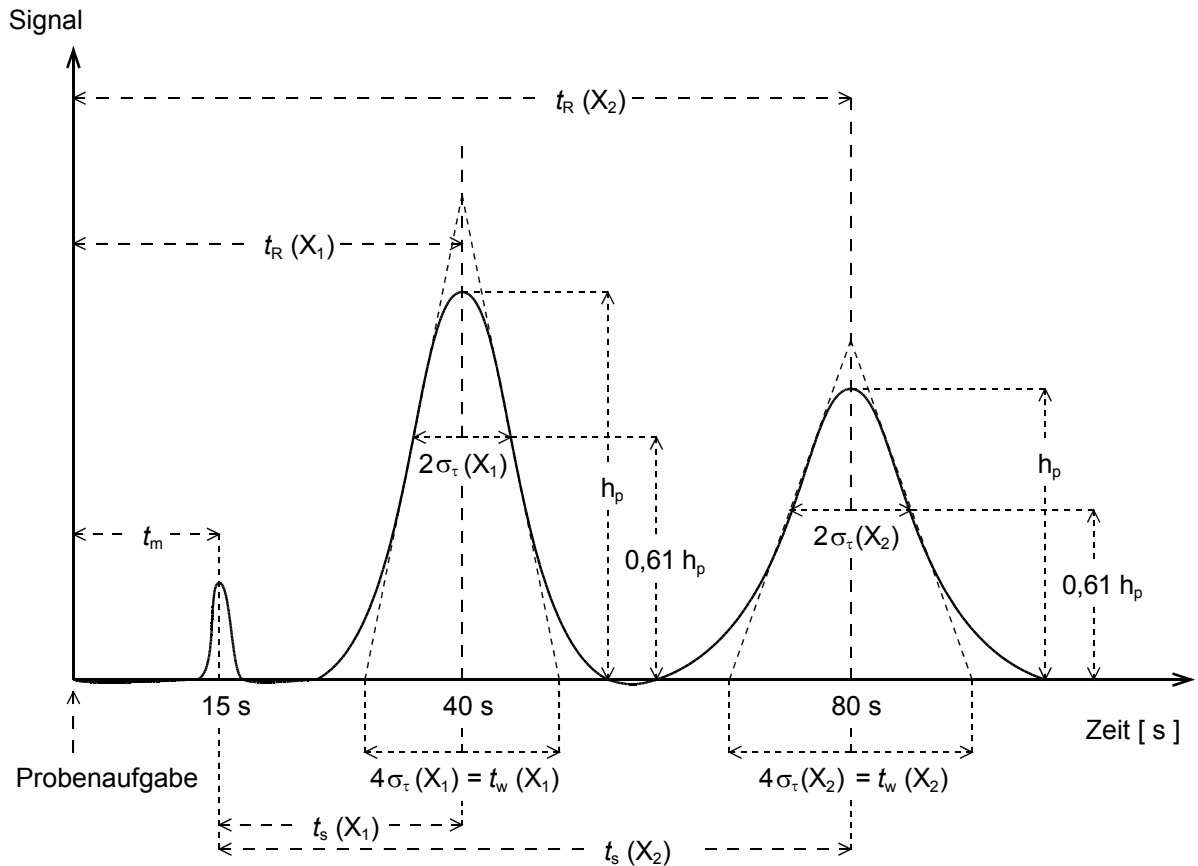


Abb.: 1.7.a Musterchromatogramm mit den elementaren Kenngrößen

$t_m$	Durchbruchzeit (hold-up time)
$t_R(X)$	Retentionszeit der Komponente X (retention time)
$t_s(X)$	Nettoretentionszeit (adjusted retention time) von X (auch $t'_R$ )
$\sigma_\tau(X)$	Diffuse Bandenverbreiterung (standard deviation) von X
$t_w(X)$	Basisbreite (peak width) von X
$h_p$	Peakhöhe (peak height)

### I.7.1 Kapazitätsfaktor $k$ (Retention-factor)

Der Kapazitäts (Retentionsfaktor) ist wie folgt definiert:

$$k = t'_R / t_m \text{ oder } (t_R - t_m) / t_m \text{ oder } (t_R / t_m) - 1$$

## I.7.2 Trennfaktor $\alpha$ (Selectivity)

Der Quotient aus den Retentionsfaktoren  $k_2$  und  $k_1$  zweier benachbarter Peaks wird als **Selektivität (oder Trennfaktor)  $\alpha$**  bezeichnet und gibt Aufschluss über die Güte einer Trennung:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_s(X_2)}{t_s(X_1)} \quad \text{mit} \quad k_2 \geq k_1$$

## I.7.3 Auflösung $R_s$ (Resolution)

Eine gute Trennung zweier benachbarter Peaks hängt natürlich nicht nur von deren Trennfaktoren, sondern auch von der jeweiligen **Peakbreite** (peak width) ab. Hier bleiben z.B. die Retentionszeiten der beiden benachbarten Peaks und damit der **Trennfaktor  $\alpha$**  gleich, aber die Peakbreiten und damit die **Auflösung** ändern sich.

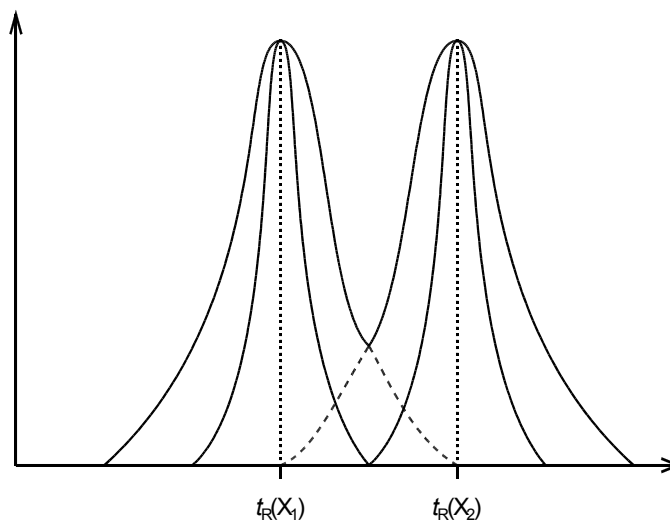


Abb.: 1.7.3.a Schlecht aufgelöstes Peakpaar

Die Definition für die Auflösung  $R_s$  zweier „gaußförmiger“ Peaks lautet:

$$R_s = \frac{(t_R(X_2) - t_R(X_1))}{0,5(t_w(X_1) + t_w(X_2))}$$

Die entsprechenden, dazu benötigten Größen können aus dem Chromatogramm (siehe oben) entnommen werden.

## 1.8 Aufgaben zum Theoretischen Teil:

- 1.) Nennen sie vier Vorteile der Microbore-HPLC:
  
- 2.) Welche Anforderungen an das apparative System bzw. welche Voraussetzungen müssen für die Durchführung einer Microbore-HPLC erfüllt sein (4 Beispiele)?
  
- 3.) Nennen sie drei mögliche Vorteile einer Temperaturerhöhung in der HPLC:
  
- 4.) Nennen sie drei mögliche Nachteile, einer Temperaturerhöhung in der HPLC:
  
- 5.) Welche Eigenschaften muss ein geeigneter Tracer aufweisen (4 Beispiele)?
  
- 6.) Wie ist der Retentionsfaktor (Kapazitätsfaktor) in Abhängigkeit von Retentionszeit  $t_R(X)$  und Durchbruchzeit  $t_m(X)$  definiert?
  
- 7.) Wie ist der Trennfaktor  $\alpha$  definiert?
  
- 8.) Wie ist die Auflösung  $R_s$  definiert?

## II Experimenteller Teil

### II.1 Durchführung der HPLC-Analysen

Es steht folgende Vitamin-Stammlösung (**Lösung A**) zur Verfügung:

Vit K <sub>3</sub>	[0.200 mg/ml MeCN]
Vit A acetat	[0.333 mg/ml MeCN]
Vit D <sub>2</sub>	[0.667 mg/ml MeCN]
Vit E	[0.400 mg/ml MeCN]
Vit E acetat	[0.267 mg/ml MeCN]
Vit K <sub>1</sub>	[1.333 mg/ml MeCN]

#### Aufgabe 1:

Vermessen Sie Lösung A unter den folgenden chromatographischen Bedingungen ([Chromatogramm\\_00.D](#)):

Eluent A (H<sub>2</sub>O): 5%  
Eluent B (MeCN): 95%  
Säulentemperatur: 20°C  
Inj. Vol.: 1 µl  
Detektorwellenlänge: 204 nm  
Run Time: 15 min  
Flow = 0.4 ml min<sup>-1</sup>

#### Aufgabe 2:

Nach Ende der Analyse soll mit dem Assistenten eine Zuordnung aller relevanten Peaks mit Hilfe der Diodenarray-Spektrenbibliothek (DAD) erfolgen.

#### Aufgabe 3:

Nach Identifikation der Peaks soll die Messung bei einer Säulentemperatur von 40°C wiederholt werden ([Chromatogramm\\_01.D](#)).

#### Aufgabe 4:

Vergleichen Sie beide HPLC-Trennungen miteinander und interpretieren sie das Ergebnis anhand der ermittelten Retentionszeiten.

#### Aufgabe 5:

Vergleichen sie die Güte der Trennung bei den Peaks der Vitamine E<sub>ac</sub> und K<sub>1</sub> bei 20°C und bei 40°C.

Welche Säulentemperatur ist für eine möglichst schnelle aber ausreichende Trennung zu bevorzugen?

**Aufgabe 6:**

Als Tracer für die quantitative Analyse soll 9-Phenylanthracen verwendet werden. Stellen Sie eine entsprechende Lösung T [0.18 mg/ml MeCN] her.

**Aufgabe 7:**

Vermessen sie den Tracer unter den gleichen chromatographischen Bedingungen wie unter Aufgabe 1 aber mit der unter Aufgabe 5 ermittelten optimalen Trenntemperatur ([Chromatogramm\\_02](#)). Erfüllt der Tracer das geforderte Reinheitskriterium?

**Aufgabe 8:**

Geben sie zu 100ul Vitamin-Stammlösung (Lösung A) 100 ul Tracer-Stammlösung (T).

Daraus erhalten Sie eine neue Lösung (Lösung A+T) aus Vitaminen und Tracer mit den folgenden Konzentrationen:

K <sub>3</sub>	[0.100 mg/ml ACN]
Tracer	[0.090 mg/ml ACN]
Aacetat	[0.167 mg/ml ACN]
D <sub>2</sub>	[0.334 mg/ml ACN]
E	[0.200 mg/ml ACN]
Eacetat	[0.134 mg/ml ACN]
K <sub>1</sub>	[0.667 mg/ml ACN]

Vermessen sie diese Lösung unter den gleichen Bedingungen wie unter Aufgabe 1, aber wählen Sie ein Injektionsvolumen von 2ul, um den Verdünnungseffekt, der durch die Tracer-Zugabe entstanden ist, auszugleichen. Als Stop-Time kann 7 min eingestellt werden. Als Ergebnis erhalten Sie [Chromatogramm\\_03.D](#). Beurteilen Sie die Lage des Tracers im Chromatogramm.

**Aufgabe 9:**

Für eine Multi-Level-Kalibrierung (hier 3 Levels) müssen zusätzlich zu Lösung A folgende verdünnte Lösungen (B und C) hergestellt werden:

Lösung	Konzentrations-Faktor	Zusammensetzung
A	x 1	unverdünnt
B	x 0.75	(150ul A + 50ul MeCN)
C	x 0.50	(100ul A + 100ul MeCN)

Jetzt werden jeweils 100 ul der Lösungen A bis C mit jeweils 100 ul der Tracerlösung T [0.18 mg/ml] versetzt.

Man erhält:

	<b>Lösung A+T (Level 1) [mg/ml MeCN]</b>	<b>Lösung B+T (Level 2) [mg/ml MeCN]</b>	<b>Lösung C+T (Level 3) [mg/ml MeCN]</b>
<b>K<sub>3</sub></b>	<b>0.100</b>	<b>0.075</b>	<b>0.050</b>
<b>Tracer</b>	<b>0.090</b>	<b>0.090</b>	<b>0.090</b>
<b>Aac</b>	<b>0.167</b>	<b>0.125</b>	<b>0.083</b>
<b>D<sub>2</sub></b>	<b>0.334</b>	<b>0.250</b>	<b>0.167</b>
<b>E</b>	<b>0.200</b>	<b>0.150</b>	<b>0.100</b>
<b>E<sub>ac</sub></b>	<b>0.134</b>	<b>0.100</b>	<b>0.067</b>
<b>K<sub>1</sub></b>	<b>0.667</b>	<b>0.500</b>	<b>0.334</b>

Für die quantitative Vitaminbestimmung aus einer unbekannt Probe X soll mit Hilfe des Assistenten die entsprechende Sequence-Table erstellt werden.

#### Aufgabe 10)

Erstellen Sie nach Abschluß der Sequence die Multi-Level-Calibration-Table und ermitteln sie die in der Probe X enthaltenen Vitaminkonzentrationen durch erstellen des ISTD-Reports (Detail-Report).