

Optimierung einer HPLC Methode

1. Aufgabenstellung:

- Es ist eine Trennung dreier schwacher Säuren auf ihre Abhängigkeit vom pH Wert und der Zusammensetzung des LM zu untersuchen.

2. Durchführung und Auswertung:

- Das Laufmittel wird hinsichtlich seines Methanol-Gehaltes und seines pH Wertes (Puffer) verändert. Die erzielten Trennergebnisse sind in den Chromatogrammen zu sehen. man kann sehen, daß sich die Retentionszeit mit sinkendem Methanolgehalt stetig erhöht. Das ist bei einer reversed Phase Chromatographie auch zu erwarten, weil das LM polarer wird, wenn der Alkoholgehalt sinkt und somit die Stoffe schwerer von der stationären Phase runtergespült werden. Beim pH Wert ist das nicht ganz so eindeutig. Man sieht, daß mit sinkendem pH-Wert die Retentionszeit zuerst steigt, dann aber wieder fällt. Das läßt sich damit erklären, daß der pH Wert Einfluß auf die Dissoziation der schwachen Säuren hat. Geringer pH Wert heißt geringe Dissoziation, also unpolar, also langer Aufenthalt auf der stationären Phase (hoher pH Wert entsprechend umgedreht). Das folgende Abfallen der Kurve ergibt sich durch die Protonierung der neutralen Säure (wird dann positiv), also wieder polarer, also kürzere Retentionszeit.
- Die entsprechenden Trennstufenzahlen und Trennstufenhöhen sind in der Tabelle angegeben.
- Die Retentionsvolumina der Messung 6. (pH 4,5 Methanol 5% Triammoniumacetat-Puffer), die wir als ideal erachten, betragen: pHydroxybenzoesäure: 29,44 yl. Anthranilsäure 51,04 yl und Benzoesäure 72,08 yl.
- Bei dieser Messung beträgt die Auflösung zwischen pHydr. und Anthranils. 3,27 und zwischen Anthr. und Benz. 2,58.