

1

Das Chromatogramm

Daniel Stauffer

1.1 Chromatographischer Prozess

Eine chromatographische Trennung ist dann erfolgreich, wenn es gelingt, die einzelnen Komponenten des zu trennenden Gemischs unterschiedlich schnell durch die Trennstrecke (stationäre Phase) wandern zu lassen. Die Möglichkeiten, unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Analyten zu realisieren, lassen sich in zwei Gruppen aufteilen:

1. Die Retention erfolgt durch unterschiedlich starke Sorption des Analyten an die stationäre Phase = unterschiedliche absolute Wanderungsgeschwindigkeit (z. B. Normalphasen-/Umkehrphasenchromatographie, Verteilungschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie).
2. Die poröse stationäre Phase teilt unterschiedlich großen Analytenteilchen unterschiedlich große Räume innerhalb der Trennstrecke zu, in welchen sie sich aufhalten können. Moleküle welche so groß sind, dass sie sich nur im Zwischenkornvolumen und somit im strömenden Eluenten aufhalten können, wandern am schnellsten. Weil die Wanderungsgeschwindigkeit für alle diese Teilchen ungefähr gleich groß ist, werden sie nicht getrennt. Kleinere Moleküle können durch Diffusion zusätzlich in die Poren der stationären Phase gelangen. In den Poren *steht* der Eluent. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Analytenteilchen in Flussrichtung ist somit während ihres Aufenthaltes im Porenvolumen der stationären Phase gleich null. Je kleiner die Analytenmoleküle sind, umso größer ist das für sie zugängliche Porenvolumen und somit die Aufenthaltszeit im stehenden Eluenten. Daraus resultieren für unterschiedlich große Moleküle unterschiedlich lange Wanderungswege = unterschiedliche relative Wanderungsgeschwindigkeit. Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC), Gelpermeationschromatographie (GPC) und Gelfiltrationschromatographie (GFC) sind die gängigsten Bezeichnungen für diese Art von Chromatographie.

Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC
Herausgegeben von Stavros Kromidas und Hans-Joachim Kuss
Copyright © 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
ISBN: 978-3-527-31774-5

Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Analyten kann durch Verändern verschiedener Einflussgrößen wie Zusammensetzung der mobilen Phase, Art der stationären Phase, Temperatur etc. mehr oder weniger kontinuierlich verändert werden. Man kann von einer *analogen*¹⁾ *Chromatographie* sprechen. Quantifizierung mittels Chromatographie erfolgt in der Regel auf diese Art.

Bei der Chromatographie mittels Sorption können die chromatographischen Bedingungen im Idealfall so gewählt werden, dass nur eine Komponente wandert und die anderen Komponenten am Kopf der Trennstrecke total festgehalten werden resp. dass nur eine Komponente festgehalten wird und die andern Komponenten wandern. Die am Säulenkopf festgehaltenen Moleküle werden anschließend durch Änderung der chromatographischen Bedingungen zum Wandern gebracht. Diese, hauptsächlich in der präparativen Chromatographie angewendete, Methode wird oft als *digitale*¹⁾ *Chromatographie* bezeichnet.

1.1.1

Selektivität und Effizienz – Maß für die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit

In der Chromatographie müssen wir zwischen zwei Arten von unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten unterscheiden. Gewünscht ist, dass unterschiedliche Spezies von Molekülen unterschiedlich schnell wandern. Das führt schlussendlich zur Trennung der einzelnen Komponenten. Je größer der Unterschied der Wanderungsgeschwindigkeit der unterschiedlichen Komponenten, umso besser ist die Trennung. Das System besitzt eine gute *Selektivität* (s. Abb. 1.1 und 1.8).

Auf der andern Seite haben auch die gleichartigen Moleküle leicht unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten. Dieser unerwünschte Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit wird als *Effizienz* (s. Abb. 1.2) des chroma-

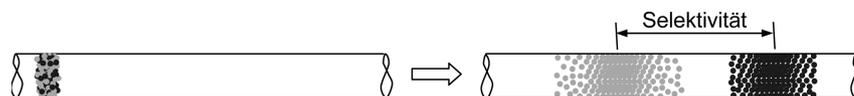


Abb. 1.1 Unterschiedliche Arten von Molekülen wandern unterschiedlich schnell. Dieser gewünschte Unterschied der Wanderungsgeschwindigkeiten wird als Selektivität des chromatographischen Systems bezeichnet.

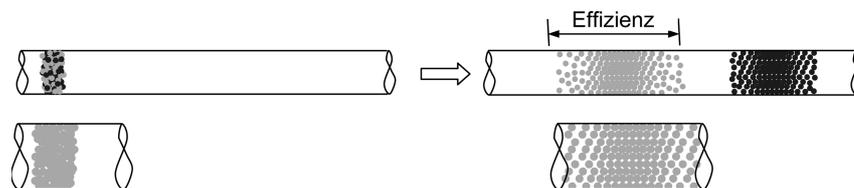


Abb. 1.2 Auch gleichartige Moleküle haben infolge von Eddy-Diffusion, Längsdiffusion und Massenaustauschverzögerung leicht unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten, was zu Bandenverbreiterung führt (= Effizienz des chromatographischen Systems).

¹⁾ *Analog* und *digital* beziehen sich auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten.

tographischen Systems bezeichnet. Kleine Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit gleichartiger Moleküle = schmale Peaks = gute Effizienz = große theoretische Bodenzahl (s. Gl. 1.9).

1.2 Chromatographische Kenngrößen

Bei analytischen Anwendungen ist der Zweck der Chromatographie, ein Chromatogramm zu erhalten, welches uns alle gewünschten Informationen liefert [1].

1.2.1 Retentionsgrößen

Diese bieten uns die Möglichkeit, Aussagen über die Art einer Probekomponente zu machen.

Normalerweise werden *Retentionszeiten* verwendet; an Stelle der Retentionszeit wird oft auch das *Retentionsvolumen* verwendet, weil dieses vom Eluentenfluss unabhängig ist.

$$V_R = t_R \cdot F \quad (1.1)$$

mit:

V_R = Retentionsvolumen, t_R = Retentionszeit, F = Eluentenfluss.

■ **Retentionsgrößen werden im Chromatogramm immer dort bestimmt, wo die höchste Probenkonzentration gemessen wird; also bei der Peakspitze.**

1.2.1.1 Totzeit (t_m ; t_0)

Unter Totzeit versteht man die Zeit, welche ein nicht-retardiertes Teilchen braucht, um die Trennstrecke zu durchqueren. Während dieser Zeit halten sich alle Probenpartikelchen in der mobilen Phase auf. Die genaue Bestimmung der Totzeit ist nicht so einfach; für die meisten Zwecke genügt es, die Totzeit mit einem sog. „Totzeitmarker“ zu messen (z. B. Methan in der GC resp. Nitromethan, Thioharnstoff, Uracil oder KNO_3 in der LC). Genauer erhält man die Totzeit durch Berechnung aus den Bruttoretentionszeiten von mindestens drei homologen Verbindungen, weil $\log k$ von Homologen in linearer Abhängigkeit zu deren Molmassen steht [9].

1.2.1.2 Bruttoretentionszeit (t_{ms} ; t_R)

Als Bruttoretentionszeit wird die durchschnittliche Zeit bezeichnet, welche ein Probenpartikelchen braucht um die Trennstrecke zu durchqueren. Die Bruttoretentionszeit setzt sich zusammen aus den Zeiten während welcher sich ein Probenpartikelchen in der mobilen und in (an) der stationären Phase aufgehalten hat. In Chromatogrammen werden die einzelnen Peaks in der Regel mit der Bruttoretentionszeit beschriftet.

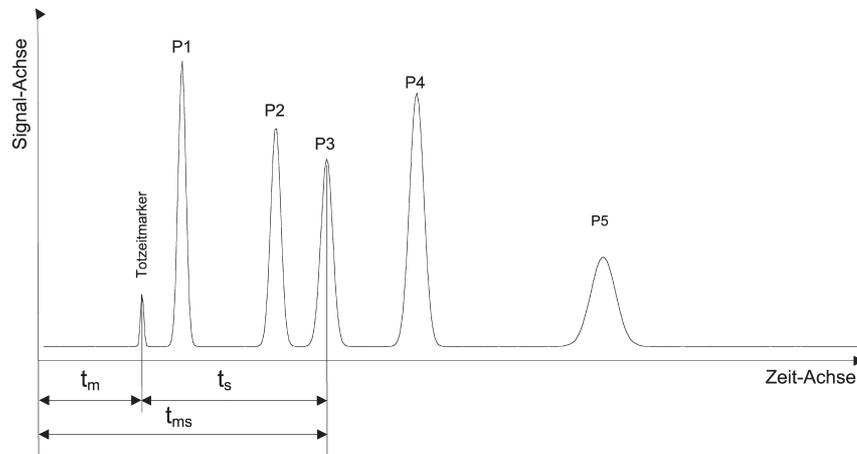


Abb. 1.3 Totzeit und Brutto- resp. Nettoretentionszeit von Peak Nr. 3.
 t_m = Totzeit, t_s = Nettoretentionszeit, t_{ms} = Bruttoretentionszeit.

1.2.1.3 Nettoretentionszeit (t_s)

Die Nettoretentionszeit sagt aus, wie lange sich eine Probekomponente in (an) der stationären Phase aufgehalten hat.

$$t_{ms} = t_m + t_s \quad (1.2)$$

mit:

t_m = Totzeit, t_s = Nettoretentionszeit, t_{ms} = Bruttoretentionszeit.

1.2.1.4 Retentionsfaktor oder Kapazitätsfaktor (k ; k')

Der Retentionsfaktor entspricht der Nettoretentionszeit, ausgedrückt in Anzahl Totzeiten. Als relative Retentionsgröße ist der k -Wert praktisch unabhängig vom Eluentenfluss und von den Säulendimensionen.

$$k = \frac{t_s}{t_m} = \frac{t_{ms} - t_m}{t_m} = \frac{t_{ms}}{t_m} - 1 \quad (1.3)$$

mit:

k = Retentionsfaktor, t_m = Totzeit, t_s = Nettoretentionszeit,
 t_{ms} = Bruttoretentionszeit.

1.2.2

Peak-Ausdehnung und Peakform

1.2.2.1 Basispeakbreite (w_b)

Die Basispeakbreite wird zwischen den Schnittpunkten der auf- und der absteigenden Wendetangente mit der Basislinie gemessen. Bei idealen chromatographischen Peaks (Gauß-Peaks) befindet sich die Basispeakbreite in 13,4% der Peakhöhe und entspricht der vierfachen Standardabweichung der Normalverteilung (s. Abb. 1.4).

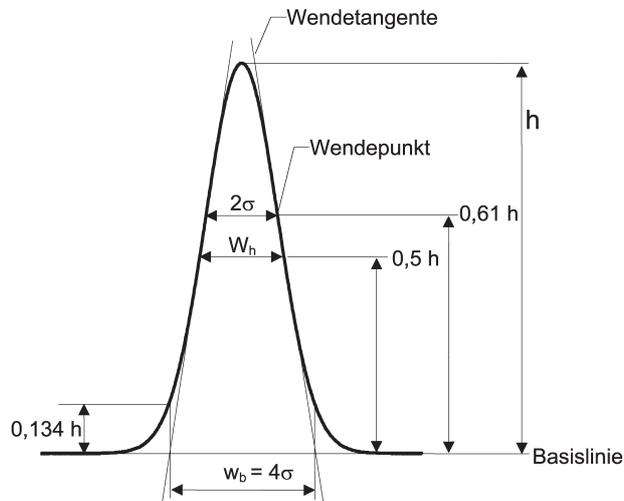


Abb. 1.4 Die Basispeakbreite (w_b) und die Peakbreite in halber Höhe ($b_{0,5}$). Bei idealen Peaks befindet sich die Basispeakbreite in 13,4% der Peakhöhe.

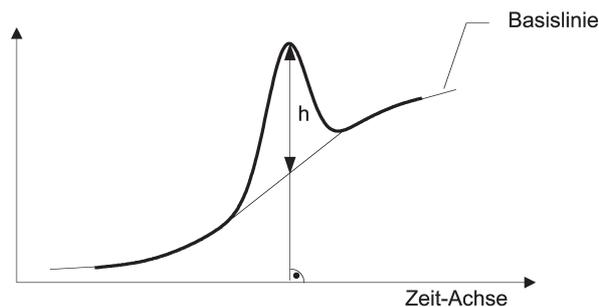


Abb. 1.5 Die Peakhöhe wird von der Peakspitze bis zur Basislinie gemessen.

1.2.2.2 Peakbreite in halber Höhe (w_h)

Weil es nicht ganz einfach ist, die Basispeakbreite zu bestimmen, wird oft die Peakbreite in halber Höhe (Halbwertsbreite) in Berechnungen eingesetzt (selbstverständlich muss die Formel entsprechend korrigiert werden).

1.2.2.3 Peakhöhe (h)

Die Peakhöhe ist die Ausdehnung des Peaks, von der Peakspitze bis zum Schnittpunkt mit der Basislinie (senkrecht zur Zeitachse gemessen).

1.2.2.4 Peaksymmetrie, Tailingfaktor (T)

Der Symmetriefaktor eines Peaks sagt aus, wie gut seine Form der Idealform eines chromatographischen Peaks (Gauß'sche Glockenkurve) angenähert ist. Der Tailingfaktor wird in Europa meistens in 10% (manchmal auch 5% oder 15%) der Peakhöhe bestimmt (s. Gl. 1.4).

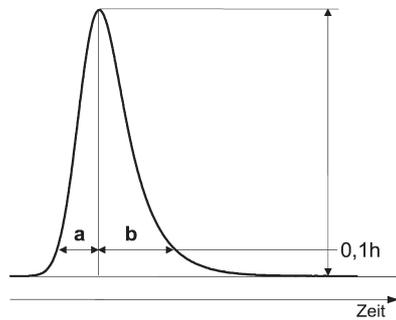


Abb. 1.6 Die Peaksymmetrie wird in 10% (5%) der Peakhöhe gemessen, wobei a die „halbe“ Peakbreite der aufsteigenden und b der absteigenden Peakseite bezeichnet.

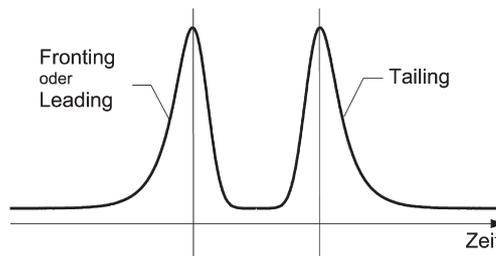


Abb. 1.7 Peakleading und Peaktailing. In der Praxis kommt das Peaktailing viel öfter vor als das Leading. Aufgepasst: In vielen Publikationen findet man Chromatogramme, bei welchen die Zeitachse von links nach rechts verläuft, weil zur Aufzeichnung des Chromatogramms z. B. ein Kompensationschreiber verwendet wurde.

$$T = \frac{b}{a} \quad (1.4)$$

mit:

T = Symmetrie- resp. Tailingfaktor, a = Breite der aufsteigenden Peakseite (in 0,1 h), b = Breite der absteigenden Peakseite (in 0,1 h).

Nach USP werden die Werte in 5% der Peakhöhe gemessen. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$T = \frac{a + b}{2a} \quad (1.5)$$

mit:

T = Symmetrie- resp. Tailingfaktor, a = Breite der aufsteigenden Peakseite (in 0,05 h), b = Breite der absteigenden Peakseite (in 0,05 h).

Langsames Ansteigen und schnelles Abfallen des Peaksignals nennt man *Leading* oder *Fronting*. Das Umgekehrte, schneller Anstieg und langsames Abfallen, nennt man *Tailing*.

Symmetrischer Peak: $T = 1$
 Peaktailing: $T > 1$
 Peakleading: $T < 1$

1.2.3

Auflösungsgrößen1.2.3.1 **Die Auflösung (R)**

Die Auflösung ist ein Maß, wie gut zwei Komponenten voneinander getrennt sind. Als Auflösung wird das Verhältnis von *Selektivität* und *Effizienz* eines Systems bezeichnet. Sie sagt nichts darüber aus, wie breit die Peaks sind.

Unaufgelöste Peaks (Abb. 1.8 a) können getrennt werden durch:

- Vergrößern der Effizienz des Trennsystems (Abb. 1.8 b),
- Vergrößern der Selektivität (Abb. 1.8 c).

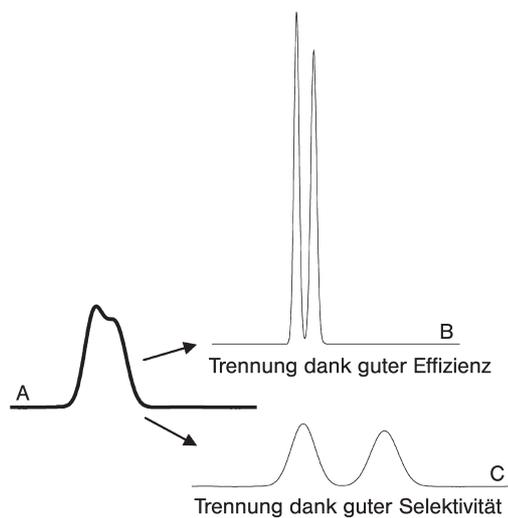


Abb. 1.8 Unaufgelöste Peaks (a) können getrennt werden durch:
 Vergrößern der Effizienz des Trennsystems (b) oder Vergrößern der Selektivität (c).

■ **Selektivität = Maß für den Retentionsunterschied zweier Komponenten**
großer Retentionszeit-Unterschied = selektives System

Effizienz = Maß für die Peakverbreiterung einer Komponente
schmale Peaks = effizientes System

Wenn man Gleichung (1.7) etwas näher betrachtet, lassen sich drei wichtige Aussagen ableiten:

1. Die Selektivität ist die empfindlichste Größe zur Beeinflussung der Auflösung [10].
2. Die Auflösung lässt sich zwar leicht durch Vergrößern der Bodenzahl, sprich Verlängern der Säule, erhöhen. Weil die Effizienz aber nur als \sqrt{N} in die Gleichung eingeht, sind die Nachteile, wie Verlängerung der Analysenzeit, Erhöhung des Gegendrucks etc., oft größer als der Gewinn. Wenn die Auflösung über die Verbesserung der Effizienz gesteigert werden soll, dann ist es besser, den Teilchendurchmesser der stationären Phase zu verringern, als die Säulenlänge zu vergrößern, weil so die Analysenzeit gleich bleibt.
3. Liegen die Peaks nahe der Totzeit ($k = \text{klein}$), kann die Auflösung durch Vergrößern von k (Verringern der Elutionskraft des Eluenten) stark gesteigert werden. Weil der Term $\frac{k}{1+k}$ gegen eins strebt, ist in der Regel ein Wert von k zwischen zwei und zehn sinnvoll.

$$R = \frac{t_R(2) - t_R(1)}{\frac{w_b(1) + w_b(2)}{2}} = \frac{\Delta t_R}{\bar{w}_b} = \frac{1,177 \cdot [t_R(2) - t_R(1)]}{w_h(1) + w_h(2)} \quad (1.6)$$

mit:

R = Auflösung, $t_R(1)$ = Retentionszeit des schneller eluierenden Peaks, $t_R(2)$ = Retentionszeit des langsamer eluierenden Peaks, $w_b(1)$ = Basispeakbreite des schneller eluierenden Peaks, $w_b(2)$ = Basispeakbreite des langsamer eluierenden Peaks, \bar{w}_b = mittlere Basispeakbreite, Δt_R = Retentionszeit-Unterschied, $w_h(1)$ = Halbwertsbreite des schneller eluierenden Peaks, $w_h(2)$ = Halbwertsbreite des langsamer eluierenden Peaks.

$$R = 0,25 \frac{\alpha - 1}{\alpha} \sqrt{N_2} \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (1.7)$$

mit:

R = Auflösung, α = relative Retention (k_2/k_1), k_1 = Retentionsfaktor der schneller eluierenden Komponente, k_2 = Retentionsfaktor der langsamer eluierenden Komponente, N_2 = theoretische Bodenzahl der langsamer eluierenden Komponente.

Damit ein Chromatogramm quantitativ ausgewertet werden kann, ist anzustreben, die einzelnen Peaks möglichst so voneinander zu trennen, dass jeder Peak von der Basislinie aus startet und wieder zur Basislinie zurückkehrt.

- **Anzustreben ist eine genügend große Auflösung ($R \approx 1,5-2$), nicht eine möglichst große Auflösung.**

1.2.3.2 Quantitative Größe der Selektivität

Als Maß für die Selektivität eines Trennsystems wird das Verhältnis der Retentionsfaktoren zweier Peaks verwendet.

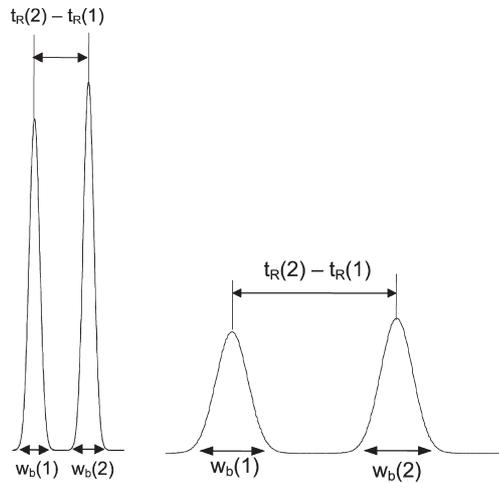


Abb. 1.9 Der Wert der Auflösung sagt nichts aus über die Qualität der Trennung in Bezug auf die Effizienz des Systems. Beide Peakpaare sind gleich gut aufgelöst.

Trennfaktor (α)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (1.8)$$

mit:

α = Trennfaktor (relative Retention), k_1 = Retentionsfaktor der schneller eluierenden Komponente, k_2 = Retentionsfaktor der langsamer eluierenden Komponente.

1.2.3.3 Quantitative Größen für die Effizienz der Trennsäule

Zur Beurteilung der Effizienz einer Trennsäule wird oft die theoretische Bodenzahl (Trennstufenzahl) resp. die theoretische Bodenhöhe (Trennstufenhöhe) verwendet. Diese Begriffe stammen aus der Destillationstheorie. Sie haben nichts mit der Anzahl der Gleichgewichtseinstellungen, welche in der Trennsäule ablaufen, zu tun, sondern sie sind ein reines Maß für die Peakverbreiterung, welche von einem Trennsystem hervorgerufen wird.

Die theoretische Bodenzahl resp. Trennstufenzahl (N)

$$N = \left(\frac{t_{ms}}{\sigma} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_{ms}}{w_b} \right)^2 = 8 \cdot \ln 2 \left(\frac{t_{ms}}{w_h} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_{ms}}{w_h} \right)^2 \quad (1.9)$$

mit:

N = theoretische Bodenzahl, t_{ms} = Bruttoretentionszeit, σ = Peak-Standardabweichung (bei Gauß-Peaks gilt: $w = 4 \sigma$), w_b = Basispeakbreite, w_h = Halbwertsbreite.

Die theoretische Bodenhöhe resp. Trennstufenhöhe (H , HETP)

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.10)$$

mit:

H = theoretische Bodenhöhe, L = Länge der Trennsäule, N = theoretische Bodenzahl.

Sowohl die theoretische Bodenzahl als auch die theoretische Bodenhöhe gelten nur für isokratisch/isotherm erzeugte Chromatogramme.

1.2.4

Bestimmung von kleinen Substanzmengen

Kann ein Analyt in einer Probe nur in kleinen Mengen vorhanden sein [2, 8], stellen sich die Fragen:

- In welcher Konzentration muss ein Analyt in einer Probe vorliegen, damit man mit einer vorgegebenen Sicherheit seine Anwesenheit nachweisen kann?
- Wie groß ist der Höchstgehalt des Analyten, wenn nichts detektiert wird?
- Ab welcher Konzentration kann ein Analyt (mit einem vorgegebenen relativen Fehler) quantifiziert werden?

Nachweisgrenze, LOD (*Limit of Detection*)

Damit ein Analyt in einer Probe nachgewiesen werden kann, muss sich das Messsignal (in der Chromatographie in der Regel die Peakhöhe) deutlich vom Blindwert bzw. vom Signalrauschen unterscheiden. Die kleinste, qualitativ erfassbare Konzentration eines Analyten wird als Nachweisgrenze bezeichnet.

Messen wir bei einer Analysenprobe den Gehalt eines Analyten knapp oberhalb der Nachweisgrenze, ist die Wahrscheinlichkeit, dass wir uns irren und die Probe den Analyten in Wirklichkeit gar nicht enthält, relativ klein. Bei einer nochmaligen Messung der gleichen Probe könnten wir mit etwa 50%iger Wahrscheinlichkeit ein Ergebnis erhalten, welches knapp unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Wahrscheinlichkeit, dass wir uns mit der Aussage, „der Analyt ist in der Probe *nicht* enthalten“, irren und der Analyt in Wirklichkeit in der Probe enthalten ist, wäre um einiges höher.

Erfassungsgrenze (*Limit of Inclusion*)

Wird der qualitative Nachweis eines Analyten mit einer bestimmten Signifikanz verlangt, verwendet man die Erfassungsgrenze. Die Erfassungsgrenze gibt die kleinste Konzentration eines Analyten an, welche mit einer vorgegebenen Sicherheit nachgewiesen werden kann.

Wie beschrieben eignet sich die Nachweisgrenze nicht, wenn eine Aussage darüber gemacht werden soll, wie viel eines Analyten maximal in einer Probe vorhanden sein kann, wenn der Messwert unterhalb des definierten Grenzwerts liegt. Zur Beantwortung dieser Frage ist die Erfassungsgrenze besser geeignet, denn bei einer Analytenkonzentration der Probe im Bereich der Erfassungsgrenze

sind der α - und der β -Fehler gleich groß, d. h., dass in einer positiv gemessenen Probe der Analyt nicht vorhanden ist, ist gleich wahrscheinlich, wie dass in einer negativ gemessenen Probe der Analyt doch vorhanden ist.

Die Erfassungsgrenze hat in der Regel den doppelten Wert der Nachweisgrenze.

Entscheidungsgrenze (*Limit of Decision*)

Lautet die Fragestellung „Ist ein Analyt in signifikanter Menge in der Probe vorhanden (ja/nein)?“, wird die Entscheidungsgrenze angewendet.

Messwert < Entscheidungsgrenze: Analyt nicht vorhanden.

Messwert \geq Entscheidungsgrenze: Analyt vorhanden.

Die Entscheidungsgrenze wird in der Regel der Erfassungsgrenze gleichgesetzt.

Bestimmungsgrenze LOQ (*Limit of Quantification*)

Je näher die Konzentration eines Analyten bei der Nachweisgrenze liegt, umso mehr streuen die gemessenen Werte. Soll ein Analyt quantitativ erfasst werden, ist das mit einer geforderten maximalen Streuung der Messwerte erst ab der Bestimmungsgrenze möglich.

1.2.4.1 Ermitteln der Nachweis-, Erfassungs-, Entscheidungs- und Bestimmungsgrenze

In der Chromatographie werden Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze meistens entweder über das Signal/Rausch-Verhältnis oder aus den Daten, welche bei der Linearitätsprüfung im Rahmen der Validierung einer chromatographischen Methode anfallen, ermittelt.

Mit Hilfe des Signal/Rausch-Verhältnisses (*S/N*)

Aus den Chromatogrammen einer Blindprobe und einer Probe, welche den zu bestimmenden Analyten in einer Konzentration nahe der Nachweisgrenze enthält, wird das Signalrauschen (in der Regel in der 20-fachen Halbwertsbreite des zu untersuchenden Peaks) gemessen (s. Abb. 1.10). Als Rauschen (*noise*) wird die Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten Messpunkt im betrachteten Chromatogrammabschnitt (im Chromatogramm der Blindprobe oder peakfreier Abschnitt in der Nähe des zu beurteilenden Peaks im Chromatogramm der Analysenprobe) bezeichnet. Die Nachweis-, Erfassungs- oder Bestimmungsgrenze wird als Anzahl Rauschen (in positiver oder negativer Richtung von der Basislinie aus gesehen = $N/2$) angegeben, welche der Peak mindestens aus der Basislinie herausragen muss. Sie kann je nach Anforderung unterschiedlich groß sein.

$$S/N = \frac{H}{\frac{h_n}{2}} = \frac{2 \cdot H}{h_n} \quad (1.11)$$

mit:

S/N = Signal/Rausch-Verhältnis, H = Signalthöhe, h_n = Rauschen.

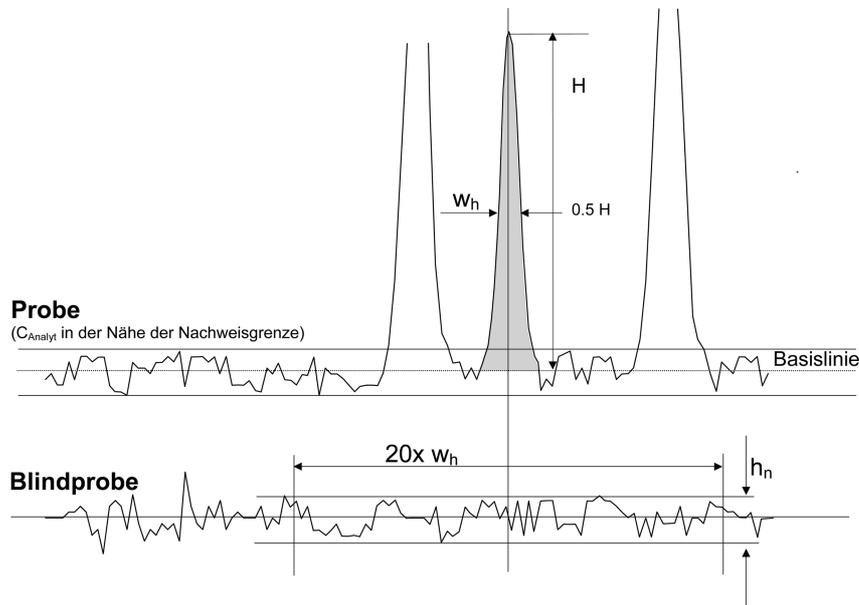


Abb. 1.10 Berechnung des Signal/Rausch-Verhältnisses:
 S/N = Signal/Rausch-Verhältnis, H = Höhe des gemessenen Peaks (Basislinie bis Peakspitze) und h_n = größte Schwankung der Basislinie im Bereich von 5–20 Halbwertsbreiten (w_h) gemessen am Chromatogramm einer Blindprobe. Beispiel: $H = 48$ mm und $h_n = 7$ mm;
 $S/N = \frac{2 \cdot H}{h_n} = \frac{2 \cdot 43 \text{ mm}}{6 \text{ mm}} \approx 14$; Signal/Rausch-Verhältnis = 14 : 1.

Für die Nachweisgrenze (LOD) wird in der Regel ein S/N von 3 : 1 bis 10 : 1 angewendet, für die Erfassungs-/Entscheidungsgrenze ein Wert von 6 : 1 bis 10 : 1 und für die Bestimmungsgrenze (LOQ) ein S/N von 10 : 1 bis 20 : 1.

Aus den Daten einer Validierung oder Kalibrierung

Die oben beschriebenen Grenzwerte können auch aus den Daten, welche bei der Linearitätsbestimmung einer Methodvalidierung oder bei der Kalibrierung anfallen, in Anlehnung an die DIN-Norm 32645 [2] bestimmt werden [3, 4].

$$X_{NG} = s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (1.12)$$

mit:

X_{NG} = Nachweisgrenze, s_{x_0} = Verfahrensstandardabweichung, $t_{f,\alpha}$ = t -Wert, m = Anzahl der Parallelmessungen, n = Anzahl der Kalibrierpunkte, \bar{x} = mittlere Konzentration der Kalibrierlösungen (= Mittelpunkt des Arbeitsbereichs), Q_x = Summe der Abweichungsquadrate.

$$X_{EG} = 2 X_{NG} \quad (1.13)$$

mit:

X_{NG} = Nachweisgrenze, X_{EG} = Erfassungsgrenze.

$$X_{\text{BG}} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_{\text{BG}} - \bar{x})^2}{Q_x}} \approx k \cdot X_{\text{NG}} \quad (1.14)$$

mit:

X_{BG} = Bestimmungsgrenze; X_{NG} = Nachweisgrenze; k = In der DIN 32 645 wird 3 als Wert für den Faktor k empfohlen, was einer Ergebnisunsicherheit von 33% entspricht; s_{x_0} = Verfahrensstandardabweichung; $t_{f,\alpha}$ = t -Wert; m = Anzahl der Parallelmessungen; n = Anzahl der Kalibrierpunkte; \bar{x} = mittlere Konzentration der Kalibrierlösungen (= Mittelpunkt des Arbeitsbereichs); Q_x = Summe der Abweichungsquadrate.

Über einen maximalen Variationskoeffizienten

Von einer Reihe Standardlösungen (mit abnehmender Konzentration) werden jeweils z. B. 6 Injektionen gemacht und der Variationskoeffizient berechnet. Die Konzentration der Standardlösung, deren V_k gerade noch unter dem zuvor definierten Wert (z. B. 0,1 für die Bestimmungsgrenze) liegt, wird als Grenzwert festgelegt [5].

1.3

van Deemter- und Golay-Gleichung

Die van Deemter-Gleichung beschreibt die Abhängigkeit der Effizienz eines chromatographischen Peaks von der linearen Strömungsgeschwindigkeit des Eluenten durch Eddy-Diffusion, Längsdiffusion und Massenaustauschverzögerung. In der Gaschromatographie werden heute hauptsächlich offene Kapillarsäulen eingesetzt. Die Peakverbreiterung wird nur durch die Längsdiffusion und die Massenaustauschverzögerung beeinflusst. Der Einfluss der Eddy-Diffusion ist gleich null. Die van-Deemter-Gleichung vereinfacht sich zur Golay-Gleichung (Gl. 1.16) [6].

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u} \quad (\text{van-Deemter-Gleichung}) \quad (1.15)$$

mit:

H = theoretische Bodenhöhe, A = Eddy-Diffusion, B = Längsdiffusion, C = Massenaustauschverzögerung, \bar{u} = durchschnittliche lineare Strömungsgeschwindigkeit.

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u} \quad (\text{Golay-Gleichung}) \quad (1.16)$$

mit:

H = theoretische Bodenhöhe, B = Längsdiffusion C = Massenaustauschverzögerung, \bar{u} = durchschnittliche lineare Strömungsgeschwindigkeit.

Werden die Terme B (Längsdiffusion) und C (Massenaustausch) weiter aufgeschlüsselt, ergibt sich:

$$H = \underbrace{\frac{2 D_m}{\bar{u}}}_{\text{Längs-}} + \underbrace{\frac{2 k}{3 (1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s} \bar{u}}_{\text{Massenaustausch}} + \underbrace{\frac{1+6k+11k^2}{96(1+k)^2} \frac{d_c^2}{D_m} \bar{u}}_{\text{Massenaustausch}} \quad (1.17)$$

(erweiterte Golay-Gleichung)

mit:

H = theoretische Bodenhöhe, D_m = Diffusionskoeffizient der mobilen Phase, D_s = Diffusionskoeffizient der stationären Phase, d_c = Innendurchmesser der Kapillarsäule, d_f = Filmdicke, k = Retentionsfaktor, \bar{u} = durchschnittliche lineare Strömungsgeschwindigkeit.

Eine wichtige Aussage, welche die erweiterte Golay-Gleichung macht, ist, dass in der Kapillargaschromatographie die Effizienz durch Verkleinern des Innendurchmessers der Kapillare und der Filmdicke gesteigert werden kann. Soweit die Theorie, in der Praxis kann jedoch eine Vergrößerung der Filmdicke sowohl zu einer verbesserten Effizienz (weniger Überladung der Säule) als auch zu einer größeren Selektivität führen (s. Abb. 1.13).

In der Regel führt man einen GC-Run nur dann mit der optimalen linearen Gasgeschwindigkeit durch, wenn das letzte Quäntchen an Effizienz (= möglichst schmaler Peak) aus der Trennsäule herausgeholt werden muss. Es ist zu bedenken, dass bei temperaturprogrammierter Arbeitsweise (und das ist bei Verwendung von Kapillarsäulen meistens der Fall) der Trägergasfluss mit steigender Temperatur wegen der steigenden Viskosität kleiner wird, wenn man mit einem druckgeregelten Gaseinlassventil arbeitet. Fällt der Trägergasfluss dann unter das van-Deemter- resp. Golay-Optimum, wird die Peakverbreiterung hauptsächlich vom B -Term (Längsdiffusion) beeinflusst. Dort ist die H/u -Kurve relativ steil, kleine Veränderungen des Trägergasflusses haben einen größeren Einfluss auf die Peakbreite (s. Abb. 1.11).

Ziel der Suche nach dem van Deemter-Optimum ist die Steigerung der Effizienz des Systems, um entweder die chromatographische Auflösung zu steigern oder die Nachweisgrenze eines Analyten herunter zu setzen. Liegen die beiden Größen in einem akzeptablen Bereich, macht es mehr Sinn, den Eluentenfluss in Bezug auf die Analysezeit zu optimieren. Optimale Analysezeit heißt möglichst schnell chromatographieren, ohne dass die Effizienz (und somit die Auflösung), die Anfälligkeit des Systems auf Undichtigkeit oder die Genauigkeit der Peakerkennung darunter leiden.

Zur Steigerung der Auflösung sind andere Maßnahmen als die Anpassung des Eluentenflusses oft wirkungsvoller.

Die Erhöhung des Splitflusses in der GC kann z. B. bewirken, dass aus einer Peakschulter plötzlich ein gut abgetrennter Peak entsteht (s. Abb. 1.12) oder entgegen der Theorie, dass sich durch Verkleinern der Filmdicke einer GC-Kapillarsäule die Auflösung dank besserer Effizienz vergrößert (s. Gl. 1.17) resp. umgekehrt mit

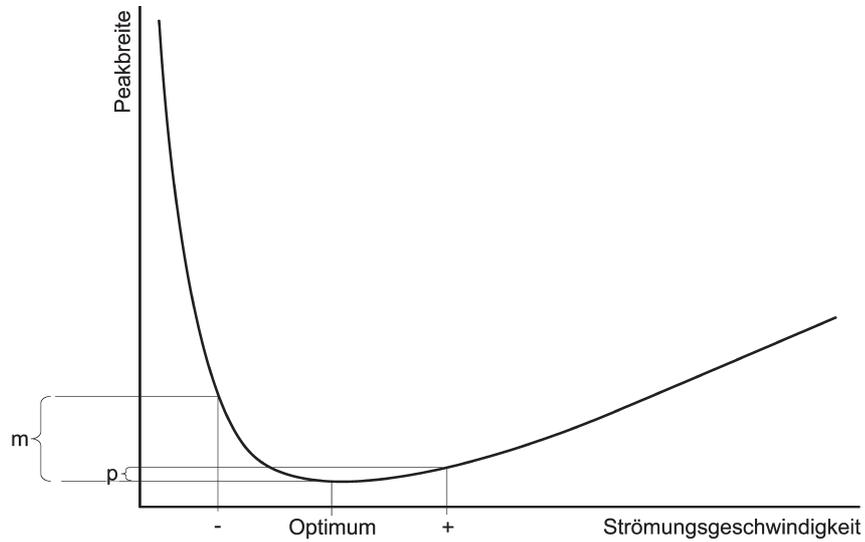


Abb. 1.11 Eine Abweichung vom Optimum der Strömungsgeschwindigkeit in positiver Richtung wirkt sich weniger stark auf die Peakverbreiterung aus (p), als wenn der Eluentenfluss unterhalb des Optimums liegt (m).

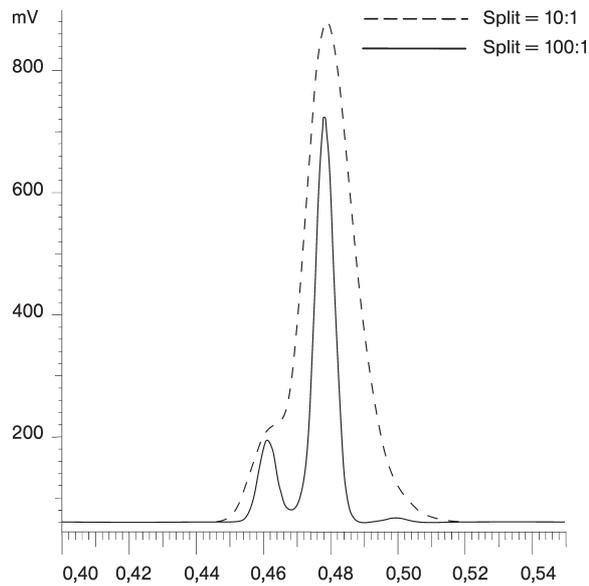


Abb. 1.12 Totzeitbestimmung eines GC-Systems mittels Feuerzeuggas (Ofentemperatur = 120 °C, Filmdicke = 2 μm). Die Erhöhung des Splitverhältnisses ist oft mit einer Zunahme der Effizienz verbunden. Die Peakhöhe nimmt in einem kleineren Maße ab, als aufgrund des größeren Splitverhältnisses zu erwarten wäre.

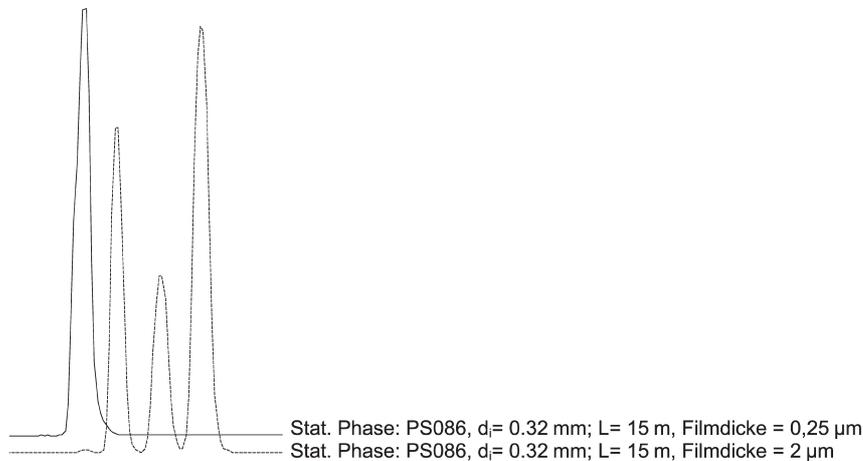


Abb. 1.13 Totzeitbestimmung eines GC-Systems mittels Feuerzeuggas (Ofentemperatur = 50°C , Filmdicke = $0,25 \mu\text{m}$ resp. $2 \mu\text{m}$). Auf der Säule mit dem dünneren Film sieht man an der aufsteigenden Peakflanke eine kleine Schulter, wogegen sich auf der Säule mit dem dickeren Film Propan, Butan und Isobutan dank besserer Selektivität gut trennen. Dass für eine Totzeitbestimmung entweder die Temperatur erhöht oder Methan als Totzeitmarker verwendet werden sollte, sei hier nur am Rande vermerkt.

zunehmender Filmdicke verkleinert, kann oft eine Vergrößerung der Filmdicke zu einer besseren Auflösung führen, weil die Selektivität zunimmt oder weil dank geringerer Überladung der dickfilmigen Säule die Peakbreite sogar abnimmt.

1.4 Erzeugen von Chromatogrammen

Der von Mikail Semenowitsch Tswett geprägte Begriff Chromatographie bedeutet in der deutschen Übersetzung bekanntlich „Farbschreibung“. Für die Erkennung der Substanzzonen bei präparativen Trennungen von Farbstoffgemischen mochte das menschliche Auge als Detektionssystem noch zu genügen, aber bereits zur Erkennung von farblosen Komponenten oder gar für die Quantifizierung von Analyten braucht es technische Einrichtungen, welche in der Lage sind, feinste Unterschiede in der Zusammensetzung des Eluentenstroms reproduzierbar zu erkennen.

Der ideale Detektor, welchen man nur in die Nähe der zu untersuchenden Probe halten muss, wenn die genaue qualitative und quantitative Zusammensetzung ermittelt werden soll, existiert leider (oder zum Glück?) nicht. Die Meinung, dass mit der großen Verbreitung von massensensitiven Detektoren der chromatographische Schritt, also die Auftrennung des Substanzgemisches sekundär werde oder sogar ganz wegfallen, hat sich bis heute als Irrtum erwiesen. Neben der guten Probennahme und Probenvorbereitung ist in der Regel eine saubere

chromatographische Trennung unabdingbar, wenn Substanzgemische richtig analysiert werden sollen.

1.4.1

Datenaufnahme, Erzeugen der Rohdaten

Die meisten Detektionssysteme liefern ein der Substanzmenge proportionales, analoges, elektrisches Signal (Spannung, Stromstärke). Dieses Signal wird vom Datensystem in digitaler Form in einem Rohdatenfile abgespeichert (s. Abb. 1.14). Aus diesem zweidimensionalen Chromatogramm können sowohl qualitative (Retentionszeit) als auch quantitative (Peakfläche/Peakhöhe) Informationen erhalten werden, jedoch immer nur im Vergleich mit Referenzsubstanzen.

Datenaufnahme und Datenauswertung werden meistens im gleichen Atemzug genannt. Um zu verstehen, was dabei genau vor sich geht, ist es meines Erachtens äußerst wichtig, die beiden Vorgänge getrennt zu betrachten, auch deshalb, weil bei verschiedenen Integrationsprogrammen einige Parameter zur Steuerung der Datenaufnahme gleich bezeichnet werden wie diejenigen der Datenauswertung und nicht immer klar ersichtlich ist, in welchem Schritt (Abb. 1.15) die Aktion erfolgt. Beispiel: Wird im Integrationsprogramm angegeben, dass die Datensammelrate in bestimmten Abständen halbiert werden soll, können entweder die Hälfte der Daten als Rohdatenpunkte abgespeichert werden (Abb. 1.15, Schritt 1) oder während der gesamten Datenaufnahme werden die Rohdaten in der gleichen Frequenz abgespeichert und die Datenreduktion erfolgt erst bei der Datenauswertung (Abb. 1.15, Schritt 2).

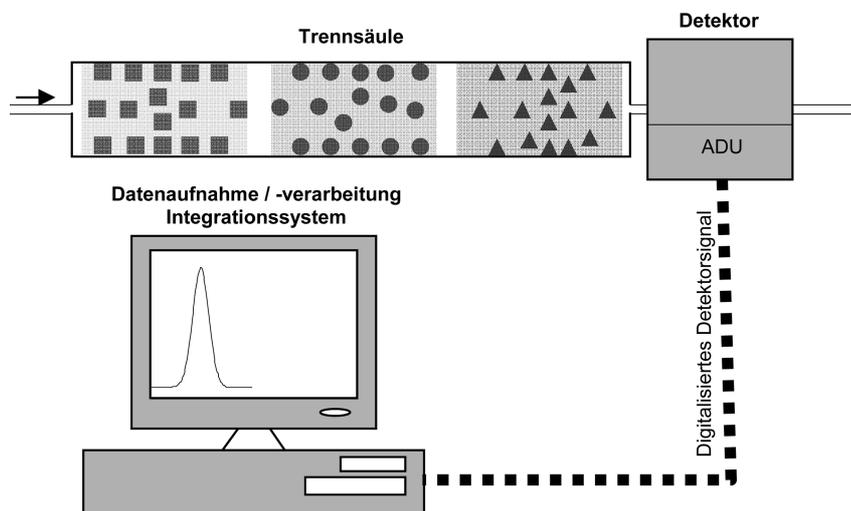


Abb. 1.14 Das vom Detektor erzeugte Analogsignal wird im Analog/Digitalwandler (ADU) digitalisiert und vom Integrationssystem als Rohdatenfile abgespeichert.

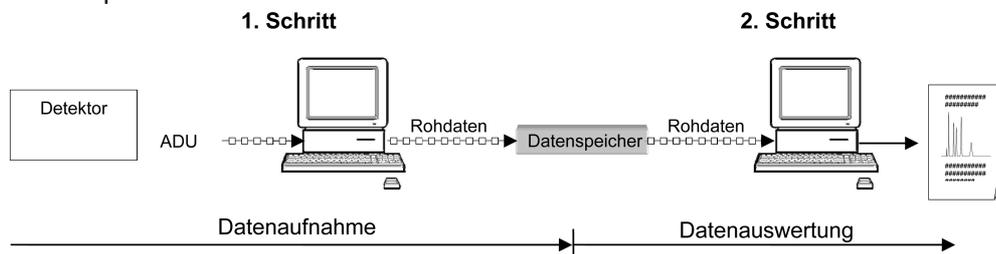


Abb. 1.15 Die Datenaufnahme (Erzeugen des Rohdatenfiles) und die Datenauswertung (Peakerkennung, Peakreduktion, Bestimmung der Basislinie, Peakzuordnung, qualitative und quantitative Auswertungen) sind zwei gesondert zu betrachtende Vorgänge.

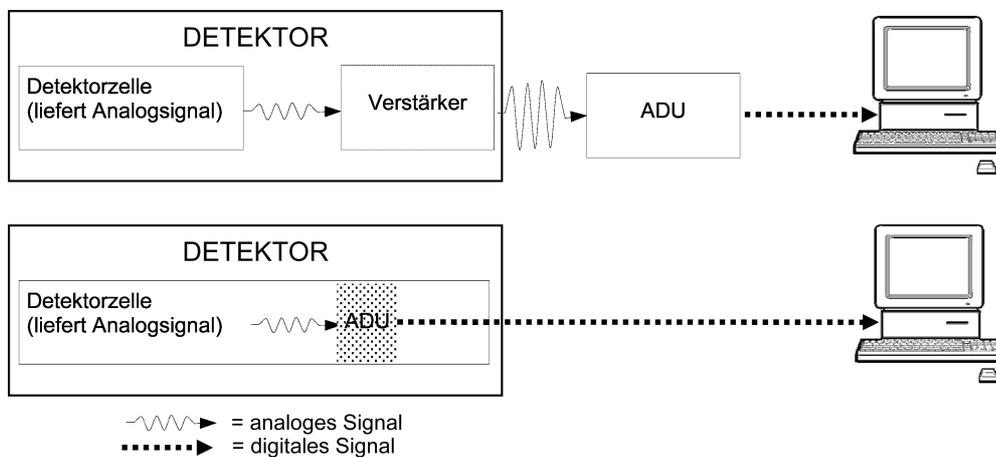


Abb. 1.16 In der Detektorzelle wird ein analoges Signal erzeugt, welches vom Analog/Digitalwandler (ADU) digitalisiert wird. Die ADU kann im Detektor eingebaut, in einem externen Interface untergebracht oder als Karte im Computer eingebaut sein.

Sehen wir uns die Datenaufnahme etwas näher an: Das vom Detektor erzeugte analoge Signal kann (eventuell verstärkt) entweder an einem Analoganschluss des Detektors abgegriffen und anschließend „extern“ digitalisiert werden oder der Analog/Digitalwandler ist bereits Bestandteil des Detektors und das Signal steht am Detektor in digitaler Form zur Verfügung.

Auch wenn auf modernen Computern der Speicherplatz nicht mehr einen limitierenden Faktor darstellt, macht es wenig Sinn, das analoge Detektorsignal mit der größtmöglichen Frequenz zu digitalisieren und jeden digitalen Datenpunkt abzuspeichern. Damit erhöht sich neben dem Platzbedarf auch die Zeit, welche der Rechner für die Datenauswertung braucht. Die abgespeicherten Datenpunkte bezeichnet man als Rohdaten. Das Detektorsignal sollte ein möglichst genaues Abbild der Konzentrationsverhältnisse im Eluentenstrom in der Detektorzelle

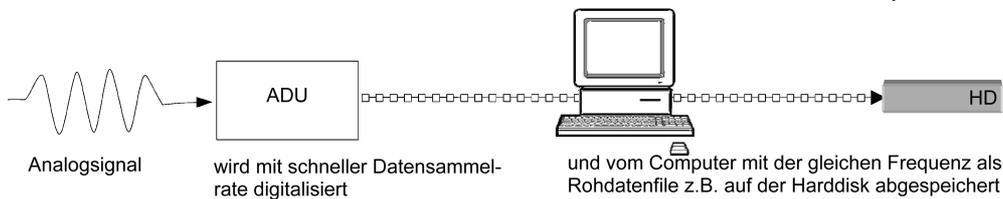


Abb. 1.17 Das analoge Detektorsignal wird (für schmale Peaks) mit einer hohen Datensammelrate von der ADU digitalisiert und mit der gleichen Frequenz vom Computer abgespeichert (in unserem Beispiel auf einer externen Festplatte).

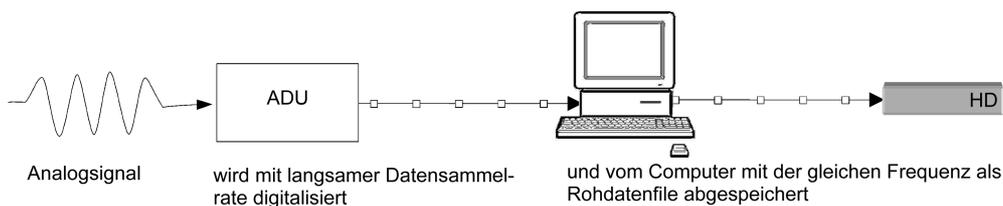


Abb. 1.18 Für breite Peaks ist eine langsamere Datensammelrate besser geeignet. Es braucht nicht nur weniger Speicherplatz, sondern die Einstellung der optimalen Peakerkennungsparameter bereitet meistens auch weniger Probleme. Ob die von der ADU gelieferten Daten mit der gleichen Frequenz (z. B. 5 Hz) aufgenommen oder ob bereits in der ADU ein Datenbunching vorgenommen wurde (z. B. Datenaufnahme mit 100 Hz und der Mittelwert aus 20 Messwerten wird ausgegeben, was einer Rohdatenerzeugung gem. Abb. 1.19 gleichkommt), wird meistens in den Handbüchern der Hersteller von Integrationssoftware nicht beschrieben. Durch Vergleich der Bandbreite der mit kleiner und großer Frequenz aufgenommenen Basislinie kann abgeschätzt werden, welches Vorgehen angewendet wurde (s. Abb. 1.21).

darstellen. Diesem konzentrations- (oder massenstrom-)abhängigen Signal ist ein höherfrequentes (hauptsächlich elektronisches) Rauschen überlagert.

Man kann sich verschiedene Möglichkeiten ausdenken, wie aus dem Analogsignal ein möglichst genaues digitales Abbild entsteht, aus welchem das Rauschen teilweise entfernt ist und/oder welches möglichst wenig Speicherplatz braucht.

- Je nach Art des Chromatogramms (schnelle Gaschromatographie mit sehr schnellen Peaks oder LC/SEC mit ziemlich langsamen Signaländerungen) wird das Analogsignal mit einer angepassten Frequenz abgetastet (s. Abb. 1.17 bzw. Abb. 1.18). Die Datensammelrate wird so eingestellt, dass der schmalste Peak mit z. B. 20 Datenpunkten dargestellt wird.
- Die Daten werden mit einer relativ hohen Datensammelrate abgetastet, aber nur der Mittelwert aus einer bestimmten Anzahl Datenpunkten wird abgespeichert (s. Abb. 1.19). Das Verfahren wird als Datenbunching bezeichnet.
- Je nach Größe der Signaländerung passt sich die Datensammelrate so an, dass die einzelnen Peaks mit mehr Datenpunkten dargestellt werden als die Basislinie (s. Abb. 1.20).
- Nur die Differenz zum vorhergehenden Datenpunkt wird abgespeichert.

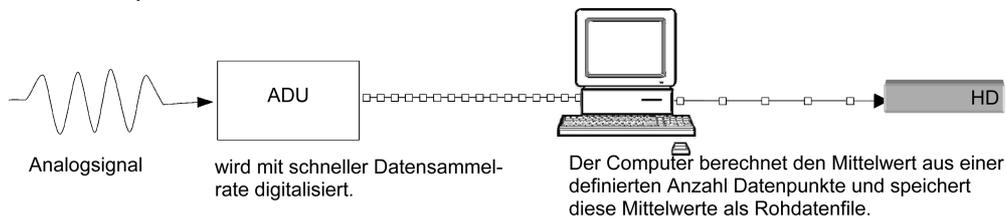


Abb. 1.19 Das Analogsignal wird von der ADU stets mit einer hohen Frequenz abgegriffen. Eine mit Bunching Rate, Peak Width oder ähnlich bezeichnete Funktion steuert, wie viele Datenpunkte zusammengefasst und deren Mittelwert im Rohdatenfile abgelegt wird. Als Beispiel sei ein Gaschromatogramm erwähnt, welches mit einem Mikro-Wärmeleitfähigkeitsdetektor aufgenommen wird, der nur über *ein* Filament verfügt und abwechselnd Messgasstrom und Referenzgasstrom über dieses Filament leitet. Wird mit zu großer Datensammelrate gearbeitet, erhält man einen treppenförmigen Peak (s. Abb. 1.23).

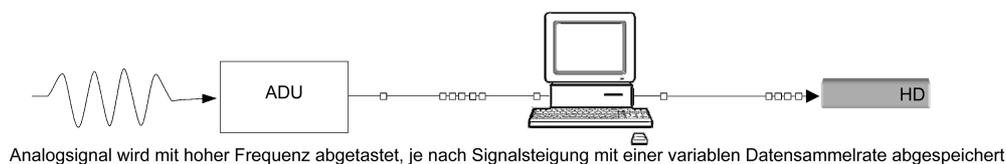


Abb. 1.20 Je nach augenblicklicher Signalsteigung wird eine variable Anzahl Datenpunkte als Rohdaten abgespeichert. Peaks werden mit mehr Datenpunkten dargestellt als das Signal zwischen den Peaks.

1.4.1.1 Bei der Datenaufnahme verwendete Parameter

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, gehen die Hersteller von Chromatographiesystemen leicht unterschiedliche Wege, das analoge Detektorsignal in digitaler Form auf ein Speichermedium zu schreiben. Zur Steuerung des Vorgangs werden nur ein paar wenige Parameter gebraucht. Sie dienen dazu

- der ADU mitzuteilen, wann das Analogsignal mit welcher Frequenz gelesen werden soll;
- die ADU oder den Computer anzuweisen, wie viele Datenpunkte gemittelt werden sollen.

Leider werden diese Steuerungsparameter nicht von jedem Hersteller gleich benutzt.

Datensammelrate (*Sampling Rate*)

Die Datensammelrate gibt an, wie viele Datenpunkte pro Sekunde aufgenommen werden oder wie viele Datenpunkte der A/D-Wandler des Detektors liefern soll. Die Datensammelrate wird in Hertz [Hz] angegeben. Von Hersteller zu Hersteller kann dieser Parameter etwas unterschiedliche Aktionen auslösen:

- Das Analogsignal wird gemäß Abb. 1.17 bzw. 1.18 mit der angegebenen Frequenz abgetastet, digitalisiert und mit der gleichen Frequenz abgespeichert.
- Das Analogsignal wird immer mit der gleichen, hohen Frequenz abgetastet (z. B. 100 Hz) und die gemittelten Werte mit der angegebenen Frequenz (z. B. 5 Hz) abgespeichert. In unserem Beispiel würde somit jeweils der Mittelwert aus 20 Datenpunkten abgespeichert.

Ob die eingestellte Datensammelrate während des ganzen chromatographischen Laufs konstant bleibt, ob sie sich mit der Zeit verändert (z. B. bei isokratischen/isothermen Läufen in bestimmten Abständen langsamer wird) oder sich sogar mit der Signalsteigung verändert (je steiler das Signal, umso größer die Datensammelrate), ist von Hersteller zu Hersteller unterschiedlich.

Schrittweite (Sampling Period, Step)

Anstelle der Datensammelrate wird oft auch deren Reziprokwert verwendet. Die Schrittweite bezeichnet den Zeitabschnitt zwischen zwei Messungen und wird normalerweise in Millisekunden [ms] angegeben.

Peak Width

Wie verschiedentlich gezeigt wurde, ist nicht die größtmögliche Datensammelrate das Optimum bei der Datenaufnahme, sondern es ist unbedingt nötig, diesen Parameter auf das erwartete Chromatogramm abzustimmen. Mit zu wenig Datenpunkten können die Peaks nicht wirklichkeitsgetreu abgebildet werden (s. Abb. 1.24) und zu viele Datenpunkte erschweren die „richtige“ Peakerkennung und verbrauchen unnötig viel Speicherplatz und Rechenzeit. Die Peak Width hilft dem Benutzer, auf einfache Art eine angepasste Datensammelrate einzustellen. Als Wert für die Peak Width wird in der Regel die Breite des schmalsten Peaks (in Sekunden) in einem Chromatogrammabschnitt angegeben. Ob der Software-Hersteller die Halbwertsbreite, die Basispeakbreite oder irgendeine andere Peakbreite meint, ist dem jeweiligen Handbuch zu entnehmen. Innerhalb der bei Peak Width angegebenen Zeit wird eine definierte Anzahl Datenpunkte verwendet.

Ob die Peak Width Einfluss auf die abgespeicherten Rohdaten hat (s. Abb. 1.15, Schritt 1) oder erst bei der Datenauswertung zum Tragen kommt, findet man mit etwas Glück in den Handbüchern der Software. Das Gleiche gilt für den Einfluss der Peak Width auf die Art der Datenumwandlung; wird das Analogsignal in der durch diesen Parameter definierten Frequenz abgetastet oder wird eine unterschiedliche Anzahl Datenpunkte gemittelt, was sich durch ein verringertes Signalrauschen bemerkbar machen würde (s. Abb. 1.48).

Ändern der Datensammelrate während der Datenaufnahme

Bei isokratisch/isotherm aufgenommenen Chromatogrammen werden die Peaks mit zunehmender Retentionszeit breiter. Damit alle Peaks mit einer ähnlichen Anzahl Datenpunkten aufgenommen werden und sich die Peakerkennung innerhalb des Chromatogramms nicht allzu stark ändert, kann bei vielen Integrationsprogrammen eingestellt werden, ob und wie sich die Datensammelrate im

Verlauf der Datenaufnahme verändern soll. „Auto Data Sampling Mode“, „Auto Peak Width“ werden z. B. als Begriff dafür verwendet oder ein negativer Wert für die Peak Width schaltet die automatische Anpassung der Datensammelrate ein oder aus. Auch hier gilt das Gleiche wie bei der Peak Width. Ob die automatische Anpassung der Datensammelrate Einfluss auf die Anzahl der Rohdatenpunkte hat oder erst die Datenauswertung beeinflusst, ist von der Integrationssoftware abhängig.

Selbstverständlich ist die Anwendung dieser Parameter nur bei isokratischer/ isothermer Chromatographie sinnvoll, bei Gradientenelution kann sie sich negativ auswirken, wenn spät eluierende Peaks mit einer zu geringen Anzahl an Datenpunkten erfasst werden (s. Abb. 1.24)!

Einfluss bei der Datenaufnahme oder der Datenauswertung

Ob die Parameter zur Steuerung der Datenaufnahmefrequenz wirklich einen Einfluss auf die Datenaufnahme haben oder ob sie erst bei der Datenauswertung wirksam werden, ist oft ebenso schwer aus den Handbüchern der Software-Hersteller herauszulesen wie die Antwort auf die Frage, ob das analoge Detektorsignal wirklich mit der eingegebenen Datensammelrate aufgenommen wird oder ob umso mehr Datenpunkte gemittelt werden, je kleiner die Datensammelrate eingestellt wird.

Zur Überprüfung des Ersteren können zwei Chromatogramme bei unterschiedlichen Datensammelraten aufgenommen, die Chromatogramme in ein von Excel lesbares Format konvertiert und die Datenreihen verglichen werden. Die Antwort auf die zweite Frage erhält man, wenn wiederum zwei Chromatogramme mit unterschiedlichen Datensammelraten aufgenommen und das Rauschen verglichen wird (s. Abb. 1.48).

1.4.1.2 Beispiele der unterschiedlichen Art der Datenaufnahme

Folgende Beispiele sollen den Effekt der unterschiedlichen Art des Sammelns von Rohdaten zeigen.

Zur Darstellung des in Abb. 1.21 dargestellten Chromatogrammausschnitts wurde zur besseren Vergleichbarkeit ein mit FID aufgenommenes Gaschromatogramm nach Excel exportiert. Ein Ausschnitt von sechs Sekunden zwischen zwei gut aufgelösten Peaks des mit 100 Hz aufgenommenen Signals wurde ausgewählt, um die unterschiedlichen Arten der Rohdatenerzeugung darzustellen. In Abb. 1.21 Kurve (a) ist das Diagramm der Originaldaten dargestellt. Die Abb. 1.21 Kurve (b) zeigt das Diagramm, wenn 19 von 20 Datenpunkten gelöscht werden, was einer Datensammelrate von 5 Hz entspricht. Um Abb. 1.21 Kurve (c) zu erzeugen, wurde jeweils der Mittelwert von 20 aufeinander folgenden Originaldatenpunkten berechnet und nur diese Mittelwerte zur Darstellung verwendet. Dieses Vorgehen entspricht einem Datenbunching mit einer Bunching Rate von 20.

In Abb. 1.21 Kurve (a) ist der größere Informationsgehalt gegenüber der mit 1/20 an Datenpunkten dargestellten Kurve (b) deutlich sichtbar, die Bandbreite des Signalrauschens bleibt in etwa gleich groß. Wie Abb. 1.22 zeigt, kann auf die größere Informationsdichte ohne Qualitätseinbuße verzichtet werden, wenn ein

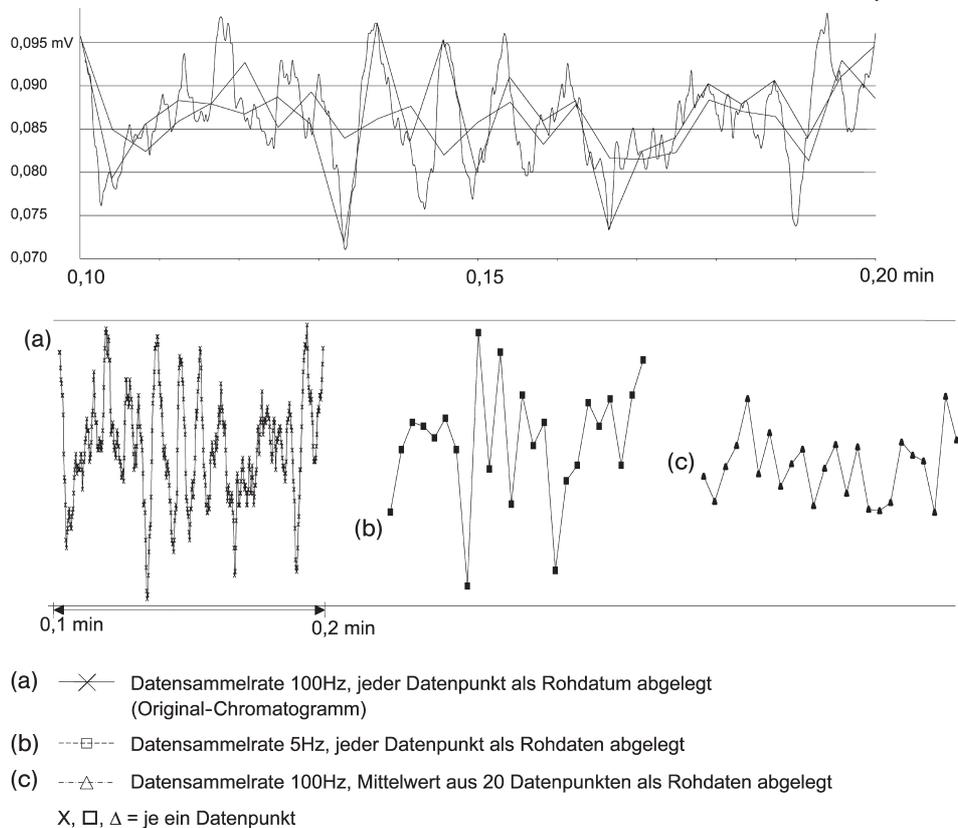


Abb. 1.21 Ausschnitt von sechs Sekunden der Basislinie eines Gaschromatogramms, mit FID aufgenommen. Das Original-Chromatogramm (a) wurde mit einer Datensammelrate von 100 Hz aufgenommen und in ein Excel-File exportiert. Zur Veranschaulichung des Unterschieds der Datenaufnahme mit einer kleineren Datensammelrate mit und ohne Datenbunching wurde bei

(b) nur jeder 20. Datenpunkt verwendet und bei (c) der Mittelwert aus 20 Datenpunkten (= Datenbunching). Bei den Chromatogrammausschnitten (b) und (c) ist deutlich erkennbar, dass die Datenreduktion genau die gleiche ist, dass sich aber mit dem Datenbunching eine deutliche Reduktion des Signalrauschens erzielen lässt.

Peak mit genügend Datenpunkten dargestellt wird. Die Kurve (c) in Abb. 1.21 wird mit der genau gleichen Anzahl Datenpunkte dargestellt wie Kurve (b). Durch die Mittelwertbildung wird sie jedoch geglättet, das Signalrauschen verringert sich. Für diese Art der Datenreduktion ist der Begriff „Datenbunching“ üblich. Mit der Größe *Bunching Rate* wird die Anzahl der Datenpunkte bezeichnet, welche zu einem Datenpunkt zusammengefasst werden.

Wie aus Abb. 1.22 gut ersichtlich ist, bringt eine sehr hohe Datensammelrate keinen Gewinn an Genauigkeit der Darstellung des Peaks, solange genügend (ca. 20) Datenpunkte vorhanden sind (s. Abb. 1.24).

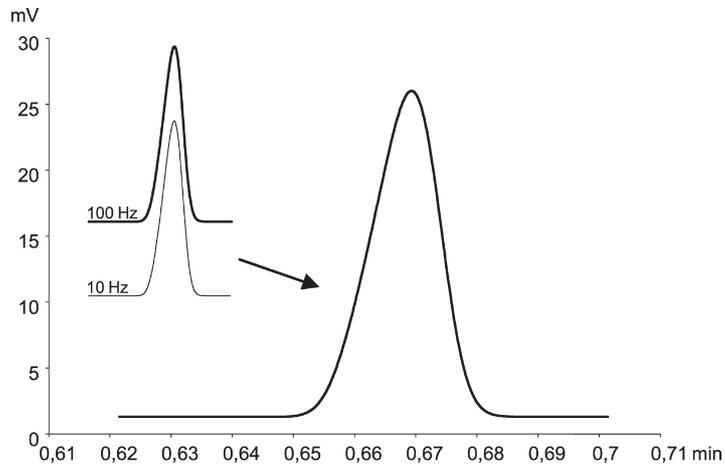


Abb. 1.22 Sofern der Peak mit genügend Datenpunkten dargestellt wird (ca. 20), bringt eine zu hohe Datensammelrate keine Vorteile. Die beiden Peaks, einer mit 100 Hz aufgenommen, der andere mit 10 Hz, sind praktisch deckungsgleich.

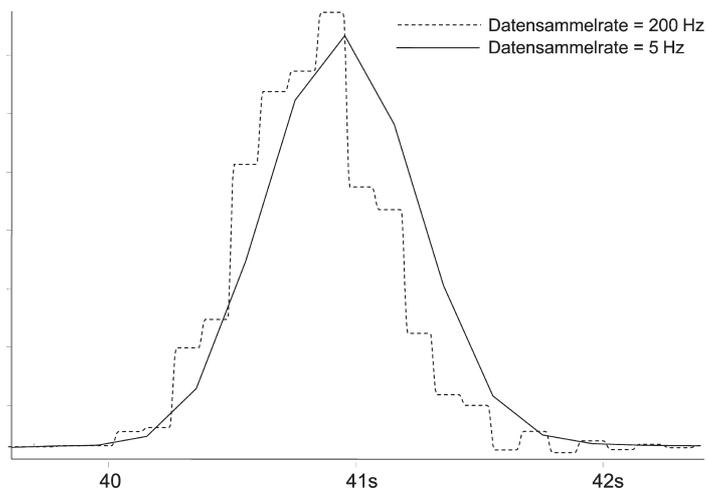


Abb. 1.23 Totzeitbestimmung auf einem GC-System mit Methan. Detektor: WLD. Mit einer Frequenz von ca. 10 Hz werden abwechselungsweise der Referenzgasstrom und der Trägergasstrom über das eine Filament geleitet. Die Datensammelrate von 200 Hz lässt den Peak als treppenförmige Pyramide erscheinen, weil sich während der Messung des Referenzgasstroms die Konzentration nicht ändert. Je kleiner die Datensammelrate

eingestellt wird, umso mehr nähert sich die Peakform einer Gaußkurve. Mit 5 Hz ist die Sampling Rate eindeutig zu klein gewählt. Eine Optimierung der Aufnahme Frequenz ist unerlässlich. Das hier verwendete Integrationsprogramm arbeitet gemäß Abb. 1.19 und misst mit einer hohen Frequenz, speichert aber nur den Mittelwert der mit Peak Width eingestellten Anzahl Datenpunkte.

Im Gegenteil, Abb. 1.23 zeigt ein Beispiel, wie sich zu viele Datenpunkte (jedenfalls optisch) kontraproduktiv bemerkbar machen können. Hier wurde mit Methan die Totzeit des GC-Systems bestimmt. Der verwendete Wärmeleitfähigkeitsdetektor misst das Signal der Probe und das Referenzsignal abwechselungsweise mit dem gleichen Filament. Ein Ventil schaltet die Gasströme mit einer Frequenz von ca. 10 Hz um. Weil das Integrationssystem bei kleinerer Datensammelrate mehr Datenpunkte mittelt (ein Datenbunching vornimmt), sieht der mit 5 Hz aufgenommene Peak eher nach einem chromatographischen Peak aus. Über die Unterschiede der Richtigkeit der beiden Peaks kann der Autor leider keine Angaben machen, weil er diesbezüglich keine Abklärungen vorgenommen hat.

Für sehr schmale Peaks werden solch hohe Datensammelraten benötigt, damit die Peaks überhaupt mit einer genügenden Anzahl Datenpunkten dargestellt werden können. Weil zur Peakerkennung in der Regel die Signalsteigung benutzt wird, kann es bei etwas breiteren Peaks Schwierigkeiten bei der Peakerkennung geben, wenn ein stark verrauschtes Signal mit einer hohen Datensammelrate aufgenommen wird (s. Abb. 1.25).

1.4.1.3 Innere/äußere Chromatogramme

Nicht nur aus der Säulenchromatographie, sondern auch aus der Dünnschichtchromatographie können Chromatogramme erzeugt werden. Bei der Säulenchromatographie durchwandern die Analyten in der Regel die gesamte Trennstrecke und werden außerhalb der Säule detektiert. Das dabei erhaltene Chromatogramm wird als *äußeres Chromatogramm* bezeichnet (s. Abb. 1.26).

Bei Dünnschichtchromatogrammen bleiben die Analyten innerhalb der Trennstrecke und werden dort detektiert; man spricht hier von einem *inneren Chromatogramm* (s. Abb. 1.27).

1.4.1.4 2-D-/3-D-Chromatogramme

Eine Erweiterung der Aussagekraft von Detektoren ist der Einbezug der dritten Dimension. Ein typischer Vertreter ist der Diodenarray-Detektor (DAD oder *Photo Diode Array*, PDA). Im Gegensatz zum klassischen UV-Detektor wird nicht nur die Absorption eines schmalen Wellenlängenbereichs mit *einer* lichtempfindlichen Diode gemessen, sondern ein breiterer Wellenlängenbereich wird auf z. B. 512 Dioden verteilt.

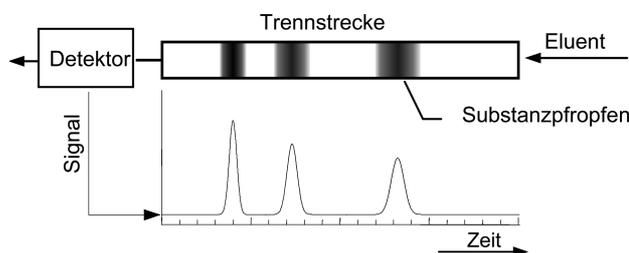


Abb. 1.26 Wird der Analyt außerhalb der Trennstrecke detektiert, spricht man von einem äußeren Chromatogramm.

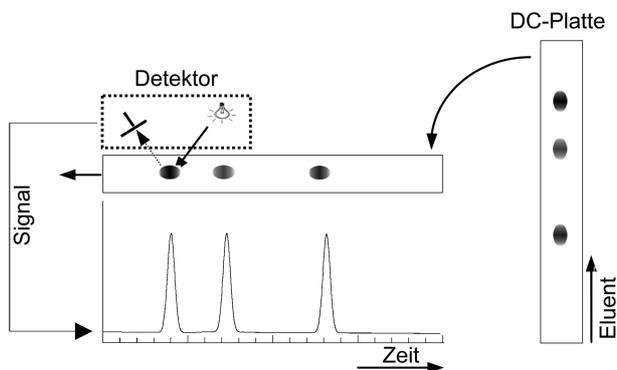


Abb. 1.27 Auf Dünnschichtplatten entstehen innere Chromatogramme; die Analyten werden innerhalb der Trennstrecke detektiert.

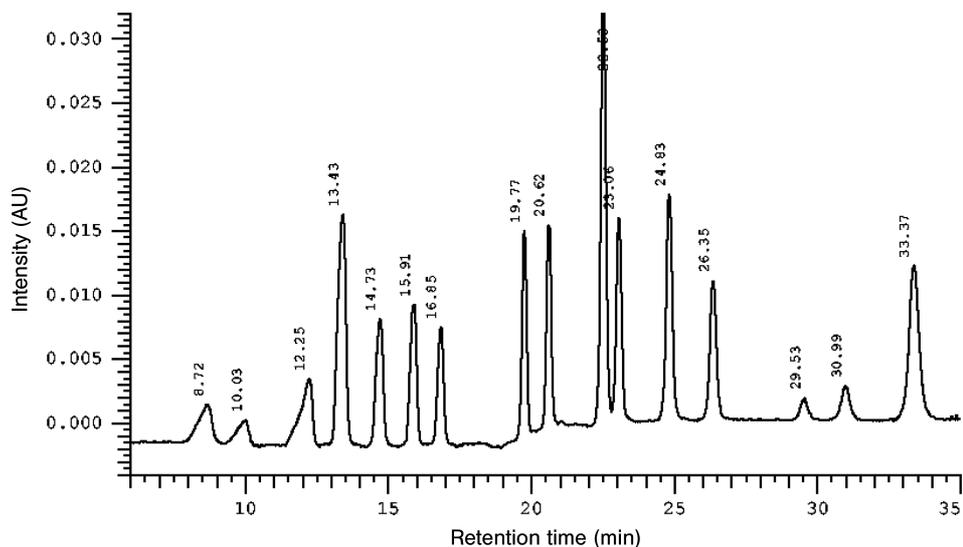


Abb. 1.28 Ein 2-D-Chromatogramm.

Mit der zusätzlichen Dimension vergrößert sich der Informationsgehalt eines Chromatogramms wesentlich. So lässt sich z. B. aus dem in Abb. 1.29 dargestellten, mit einem Diodenarray-Detektor aufgenommenen Chromatogramm leicht das UV-Spektrum bei einer beliebigen Zeit extrahieren. Mit Hilfe einer Spektrendatenbank kann so die einem Peak zugrunde liegende Substanz ermittelt werden. Diese Information kann z. B. bei der automatisierten Methodenentwicklung wertvolle Dienste leisten, wenn nicht nach jeder Anpassung der chromatographischen Bedingungen die Peaks neu identifiziert werden müssen.

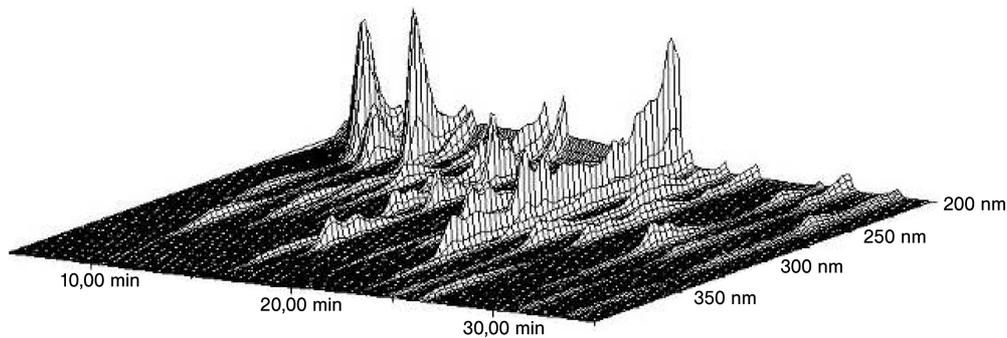


Abb. 1.29 Das gleiche Chromatogramm wie in Abb. 1.28, jedoch mit der Wellenlänge als dritter Dimension.

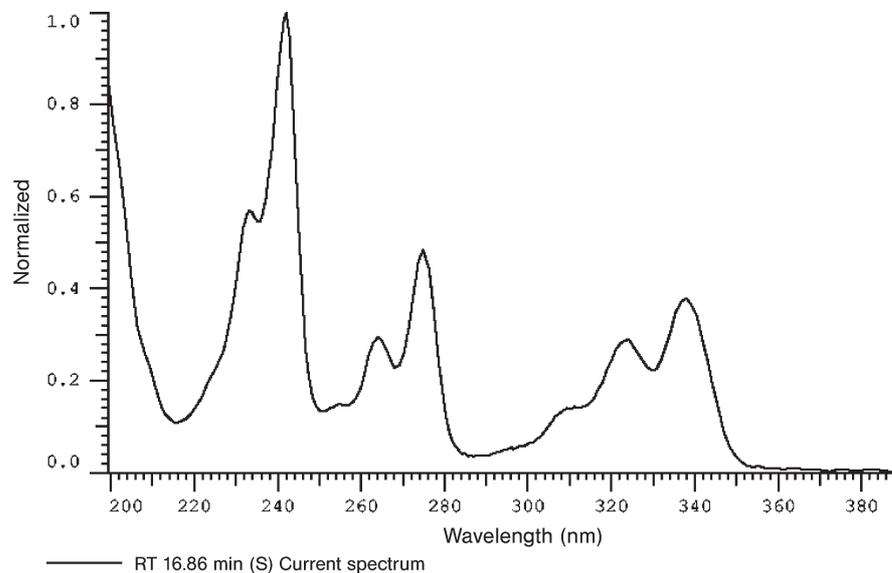


Abb. 1.30 UV-Spektrum bei der Spitze vom Peak bei 16,85 min (s. Abb. 1.28). Gemäß Spektrenbibliothek handelt es sich um Pyren.

1.4.2

Charakterisierung von Detektoren

Den Universaldetektor gibt es leider nicht. Jedes Detektionssystem besitzt unterschiedliche Eigenschaften, welche mehr oder weniger Einfluss auf die Qualität der ermittelten chromatographischen Daten haben. Das ausgeklügeltste Integrationssystem nützt nichts, wenn der Detektor unpräzise Daten liefert. Mit den technischen Spezifikationen des Detektors müssen wir leben; oft kann man jedoch mit einer optimalen Abstimmung der Geräteeinstellungen und der

chromatographischen Bedingungen wie Probekonzentration, Eluentenfluss oder Wahl der Säulendimension die Güte der Ergebnisse maßgeblich beeinflussen. Besitzen wir z. B. eine HPLC-Anlage mit einem UV-Detektor, dessen Detektorzelle ein Volumen von 20 µl aufweist und die Datensammelrate maximal auf 5 Hz eingestellt werden kann, macht es wenig Sinn, eine 5 cm lange Säule mit einem Innendurchmesser von 2 mm und einem Partikeldurchmesser von 3 µm zu verwenden und erst noch einen Eluentenfluss von 3 ml pro Minute einzustellen.

Allgemein können Detektoren mit folgenden Werten charakterisiert werden:

- zerstörend/nicht zerstörend,
- selektiv, spezifisch, universell,
- konzentrations-/massenstromabhängig,
- Empfindlichkeit,
- linearer/dynamischer Bereich,
- Ansprechzeit,
- Rauschen,
- Drift.

1.4.2.1 Zerstörend/nicht zerstörend

Je nach Messprinzip eines Detektors werden die Substanzen während der Messung zerstört. Ein typischer Vertreter dieser Art ist der Flammenionisations-Detektor. Die Kenntnis, ob ein Detektor zerstörend ist oder nicht, ist für präparative Trennungen wichtig, oder wenn ein selektiver und ein universeller Detektor hintereinander geschaltet werden, darf der erste Detektor nicht zerstörend sein.

1.4.2.2 Selektiv, spezifisch, universell

Typische Vertreter von universellen Detektoren sind der Wärmeleitfähigkeits-Detektor in der GC oder der Brechungsindex-Detektor in der LC. Es werden alle Substanzen detektiert, deren Wärmeleitfähigkeit resp. Brechungsindex sich von den Werten des Eluenten unterscheiden.

Ob ein Detektor selektiv oder spezifisch ist, lässt sich nicht immer so leicht unterscheiden. Definitionsgemäß versteht man unter Selektivität, wenn mehrere Komponenten nebeneinander und ohne gegenseitige Störung erfasst werden können. Als Spezifität bezeichnet man demgegenüber die Fähigkeit, eine bestimmte Komponente aus einer Mischung ohne Störung durch andere Komponenten zu erfassen. So ist z. B. ein *enantioselektiver* Detektor in der Lage, die beiden Enantiomere in einem Racemat nebeneinander zu erfassen, mit einem *enantiospezifischen* Detektor könnte eine der beiden Formen bestimmt werden, ohne dass die andere einen störenden Einfluss hätte.

1.4.2.3 Konzentrations- und massenstromabhängige Detektoren

Detektoren liefern ein Signal, welches der detektierten Masse (z. B. Flammenionisations-Detektor) oder der detektierten Konzentration (z. B. UV-Detektor) proportional ist. Das Chromatogramm ist somit ein Abbild der Substanzverteilung in der stationären Phase.

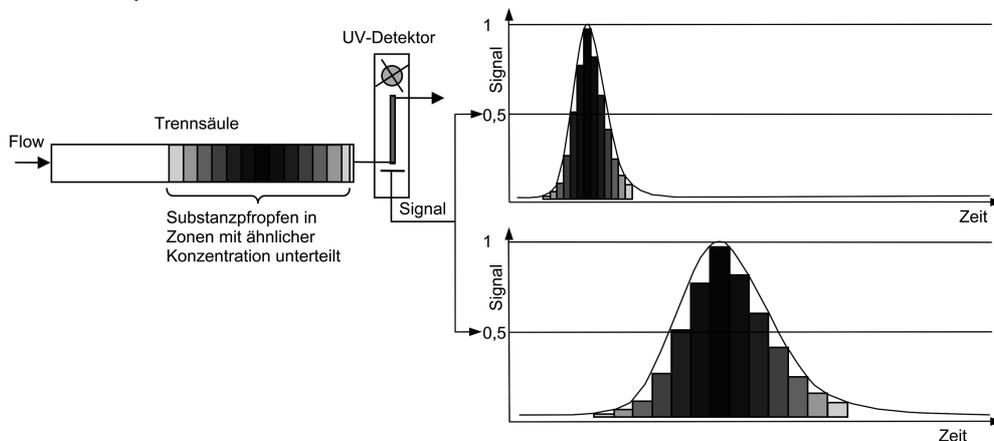


Abb. 1.31 Konzentrationsabhängiger Detektor (misst die Konzentration). Zur Veranschaulichung stellen wir uns den Substanzpfropfen in der Trennsäule als Aneinanderreihung von mehreren Zonen mit homogener Konzentration vor. Unabhängig vom Flow bleibt die Substanzkonzentration der einzelnen Konzentrationszonen gleich.

Bei kleinerem Flow (unterer Peak) ist das Signal für jede Konzentrationszone gleich groß wie beim größeren Flow (oberer Peak), aber die einzelnen Konzentrationszonen halten sich länger in der Detektorzelle auf. Der Peak bleibt gleich hoch, wird aber breiter. Die Peakfläche wird größer.

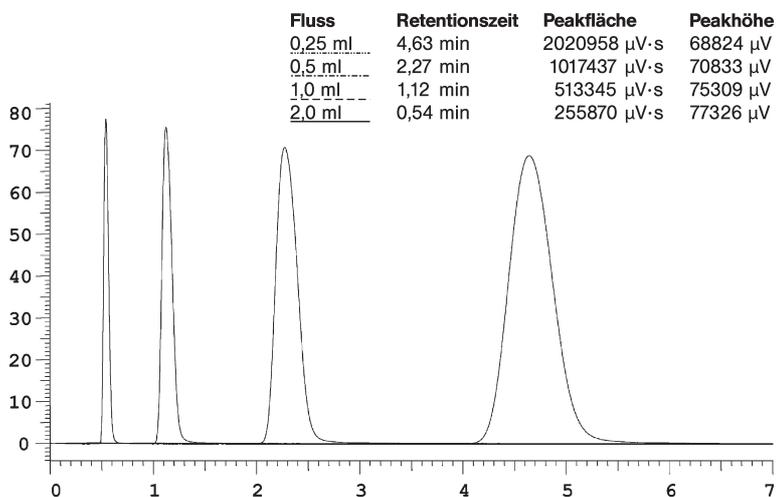


Abb. 1.32 Die vier Chromatogramme, welche mit einem UV-Detektor aufgenommen wurden, bestätigen die Theorie. Links sind vier Chromatogramme, welche mit einem Eluentenfluss von 0,25, 0,5, 1 und 2 ml/min aufgenommen wurden, rechts die dazugehörigen Größen. Dass die Signalthöhe nicht bei allen

Peaks genau gleich ist, lässt sich damit erklären, dass gemäß van Deemter-Gleichung die Effizienz vom Eluentenfluss abhängig ist. Probe: 0,5 $\mu\text{l/ml}$ Toluol in ACN/ H_2O 1 ml + 1 ml; Säule: 25 \times 4 mm; Stationäre Phase: Purospher 100 RP-18 (5 μm); Mobile Phase: ACN/ H_2O 1 ml + 1 ml.

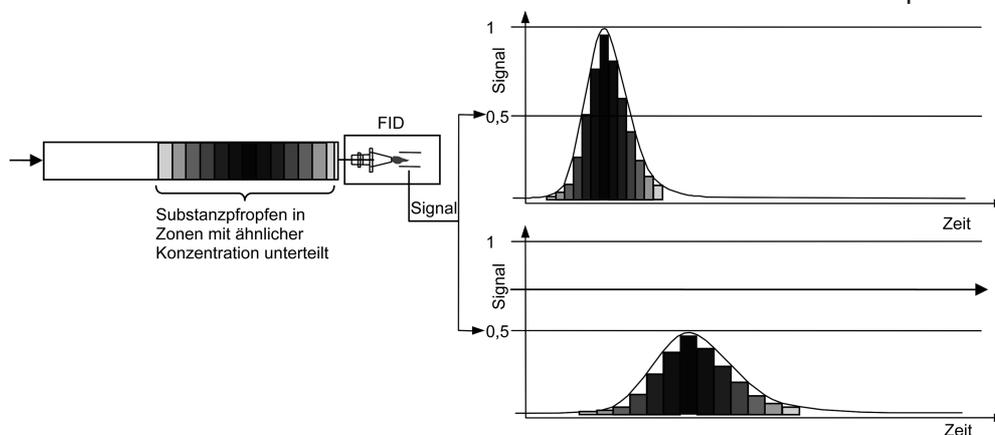


Abb. 1.33 Massenstromabhängiger Detektor (misst die Anzahl Teilchen, welche pro Zeiteinheit durch die Detektorzelle strömen). Weil die Konzentration an Analyt im Eluentenstrom (abgesehen vom Einfluss der Eddy- und Längsdiffusion resp. der Massenaustauschverzögerung) nahezu konstant bleibt, ändert sich die Anzahl der Teilchen, welche pro Zeiteinheit den Detektor verlassen.

In unserem Beispiel wird die Eluentengeschwindigkeit halbiert (ursprüngliche Eluentengeschwindigkeit = Peak oben, reduzierte Eluentengeschwindigkeit = Peak unten). Der Peak wird zwar umgekehrt proportional zur Eluentengeschwindigkeit verbreitert, weil sich aber im gleichen Maß die Anzahl der Teilchen verändert, welche die Detektorzelle pro Zeiteinheit durchströmen, bleibt die Peakfläche ziemlich konstant.

Vernachlässigen wir die Peakverbreiterung durch die Änderung der Eluentengeschwindigkeit (van-Deemter-Gleichung (Gl. 1.15), bleiben die Konzentrationsverhältnisse in einem Substanzpfropfen, welcher sich in der Trennsäule befindet, annähernd konstant. Was sich ändert, ist die Aufenthaltszeit der Substanz in der Detektorzelle resp. die Anzahl der Teilchen, welche pro Zeiteinheit die Detektorzelle passieren.

So lässt sich leicht erklären, dass sich bei *konzentrationsabhängigen Detektoren* die Peakfläche umgekehrt proportional zum Eluentenfluss verändert (s. Abb. 1.31 und 1.32), während bei *massenstromabhängigen Detektoren* die Peakfläche nahezu konstant bleibt (s. Abb. 1.33).

1.4.2.4 Detektorempfindlichkeit

Die Detektorempfindlichkeit wird üblicherweise als Signal (Peakhöhe) pro Konzentrations- oder Massenstromeinheit angegeben [6].

Für *konzentrationsabhängige Detektoren* gilt:

$$S = \frac{m_{\max} \cdot w_h \cdot F}{W} \quad (1.18)$$

$$= \frac{\text{Peakhöhe}}{\text{Durchschnittliche Analytenkonzentration im Peak}}$$

mit:

S = Detektorempfindlichkeit, m_{\max} = Peakhöhe (Signal am Peakmaximum),
 w_h = Halbwertsbreite des Peaks, F = Eluentenfluss (in der GC druck- und temperaturkorrigiert), W = Masse des Analyten.

Die Einheit der Detektorempfindlichkeit ist meistens $\frac{[\text{mV}] \cdot [\text{cm}^3]}{[\text{mg}]}$ oder $\frac{[\text{mAU}] \cdot [\text{cm}^3]}{[\text{mg}]}$.

Für *massenstromabhängige Detektoren* gilt:

$$S = \frac{m_{\max} \cdot w_h}{W} = \frac{\text{Peakfläche}}{\text{Masse des Analyten im Peak}} \quad (1.19)$$

mit:

S = Detektorempfindlichkeit, m_{\max} = Peakhöhe (Signal am Peakmaximum),
 w_h = Halbwertsbreite des Peaks, W = Masse des Analyten.

Die Einheit der Detektorempfindlichkeit ist meistens $\frac{[\text{pA}] \cdot [\text{s}]}{[\text{mg}]}$.

Die Detektorempfindlichkeit ist sowohl von der Bauweise des Detektors als auch von der Art des zu detektierenden Analyten abhängig. Zur Beurteilung von Detektoren muss daher immer die Detektorempfindlichkeit in Bezug auf einen definierten Analyten betrachtet werden.

1.4.2.5 Linearer und dynamischer Bereich

Als *linearer Bereich* eines Detektors wird der Konzentrations- resp. Massenbereich bezeichnet, in welchem sich die Empfindlichkeit eines Detektors in einem definierten Band befindet (in der Regel $\pm 5\%$).

Als Untergrenze dient die Nachweisgrenze resp. die Analytenkonzentration, welche das Signal des dreifachen Signalrauschens erzeugen würde (s. Abb. 1.34).

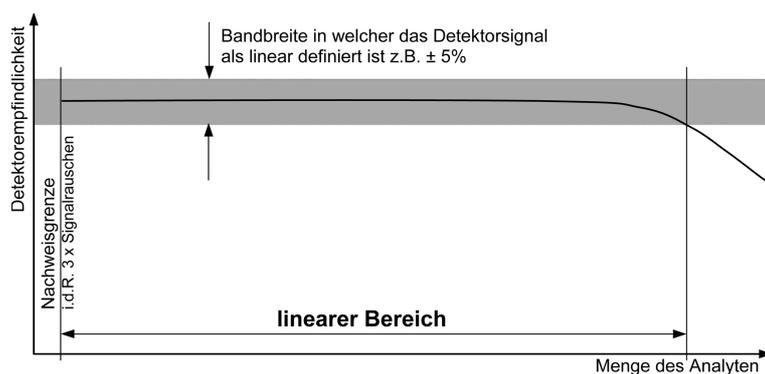


Abb. 1.34 Der lineare Bereich eines Detektors.

In diesem Bereich bleibt die Detektorempfindlichkeit konstant.

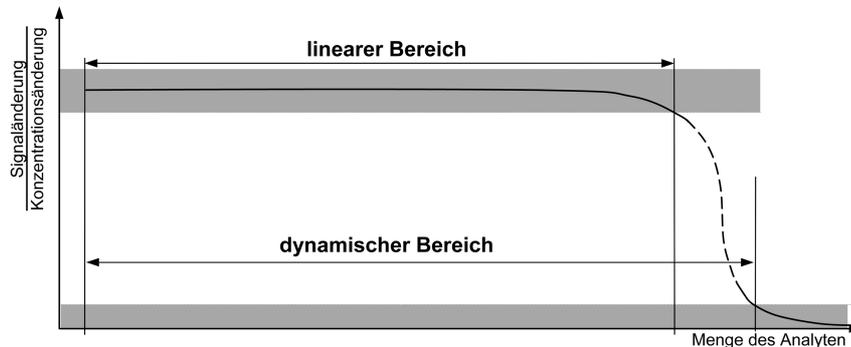


Abb. 1.35 Der lineare und der dynamische Bereich eines Detektors. Der lineare Bereich eines Detektors ist erreicht, wenn die Steigung nicht mehr konstant ist, der dynamische Bereich (der den linearen Bereich mit einschließt), wenn die Steigung des Detektorsignals gegen die Konzentrationsänderung einen Mindestwert unterschreitet.

In welchem Bereich sich das Detektorsignal zur detektierten Substanzmenge linear verhält, ist sowohl vom Detektor als auch von der detektierten Substanz abhängig.

Wird beispielsweise mit einem UV-Detektor eine nicht dissoziierende Verbindung gemessen, ist höchstwahrscheinlich der lineare Bereich des Detektors der limitierende Faktor. Anders bei der Analyse einer dissoziierenden Verbindung. Weil die Dissoziationskonstante von der Konzentration abhängig ist, kann hier der Analyt für die Größe des linearen Bereichs verantwortlich sein.

Der lineare Bereich des Detektors und der lineare Bereich der Detektion eines bestimmten Analyten sind zwei Paar Stiefel; sie können zwar, müssen aber nicht gleich groß sein.

Im *dynamischen Bereich* eines Detektors ergibt eine Änderung der Probenkonzentration eine signifikante Änderung des Detektorsignals. Innerhalb dieses Bereichs lässt sich eine Methode zwar noch kalibrieren, eine lineare Anpassung der Kalibrierkurve ist jedoch nur noch in kleinen Konzentrationsbereichen möglich und die Detektorempfindlichkeit wird immer schlechter (s. Abb. 1.35).

Das Ende des dynamischen Bereichs ist erreicht, wenn eine Konzentrationsänderung keine signifikante Signaländerung mehr hervorruft.

1.4.2.6 Ansprechzeit, Zeitkonstante

Erreicht das Eluat aus der Trennsäule die Detektorzelle, wird in dieser ein der Substanzmenge proportionales Signal als Stromfluss oder als elektrische Spannung erzeugt. Dieser Vorgang benötigt naturgemäß eine bestimmte Zeit. Bei vielen Detektoren (z. B. UV-, VIS- und Fluoreszenz-Detektoren) bewegt sich diese Ansprechzeit im Picosekunden-Bereich, das Signal rauscht aber ziemlich stark. Aus diesem Grund wird dieses analoge Detektorsignal mittels elektronischer Schaltungen geglättet. Das Maß der Glättung lässt sich über den Parameter

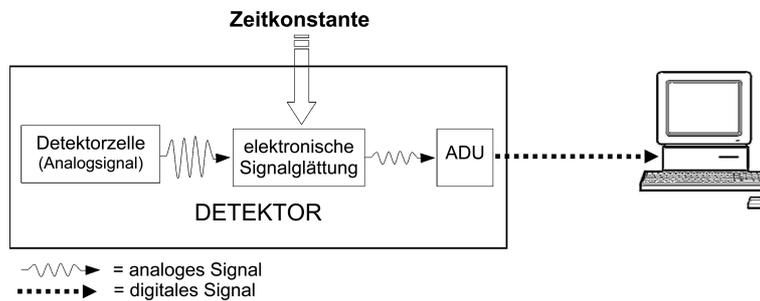


Abb. 1.36 Mit dem Parameter „Zeitkonstante“ (Time Constant, Rise Time) wird bei vielen Detektoren eine elektronische Glättung des Analogsignals beeinflusst.

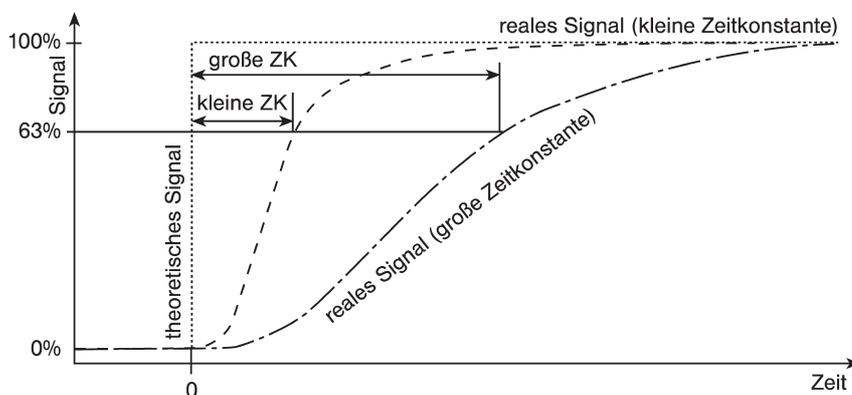


Abb. 1.37 Die Zeitkonstante gibt an, wie lange es dauert, bis das Ausgangssignal des Detektors das $(1 - e^{-1})$ -fache = 63,2% des Endwerts erreicht hat. Bei diversen Detektoren lässt sich die Zeitkonstante verändern.

„Zeitkonstante“ (Time Constant, Rise Time, Response) variieren (s. Abb. 1.37 und 1.38).

Wie Abb. 1.36 zeigt, beeinflusst die Zeitkonstante das Analogsignal. Bei der Digitalisierung dieses Signals kann mittels Datenbunching eine zusätzliche Signalglättung erreicht werden (s. Abb. 1.21 und 1.48). Dass der Optimierung dieser Parameter genügend Aufmerksamkeit geschenkt werden muss, liegt auf der Hand, besonders wenn man bedenkt, dass die Einstellung der Zeitkonstante und der Datenaufnahmeparameter wie Datensammelrate, Sampling Period, Peak Width etc. die aufgezeichneten Rohdaten beeinflussen.

■ **Eine falsche Einstellung der Zeitkonstante und der Datenaufnahmeparameter lässt sich nachträglich nicht mehr korrigieren!**

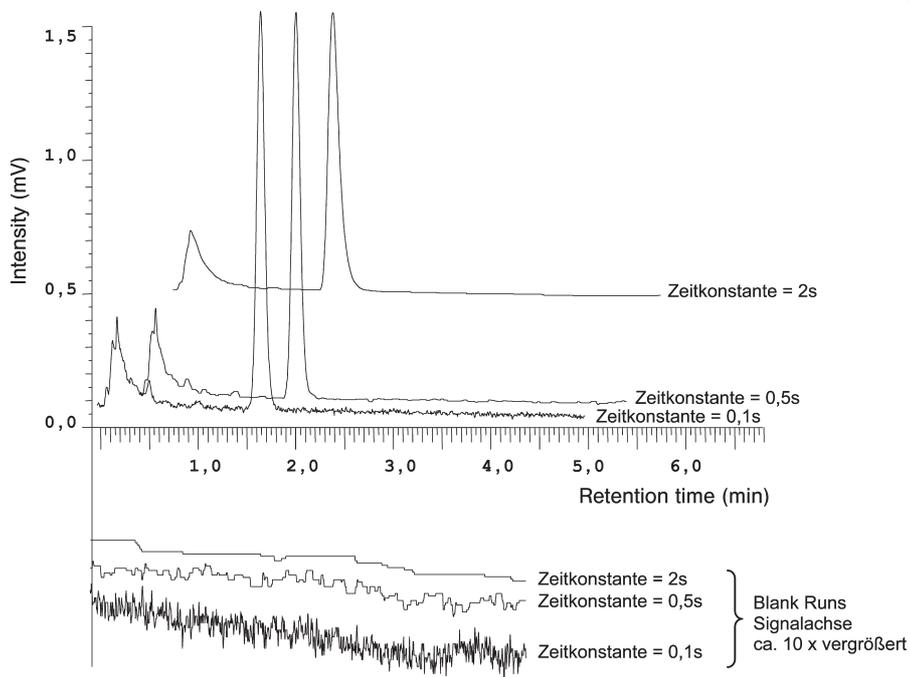


Abb. 1.38 Die eingestellte Zeitkonstante hat Auswirkungen auf das Signalrauschen, die Peakhöhe, das Signal/Rausch-Verhältnis und die Peaksymmetrie. Weil die Zeitkonstante bei der Reintegration nicht mehr verändert werden kann, ist es wichtig, diesen Wert bei der Methodenentwicklung zu optimieren. Probe: 20 μ l Phenyldecan (20 nl/ml) in Eluent; Stationäre Phase: Purospher RP-18 (5 μ m) 25 \times 4 mm; Mobile Phase: ACN/H₂O 15 ml + 85 ml; Flow: 1 ml/min.

Experiment Optimierung Zeitkonstante/Datensammelrate

Um die Größenordnung des Einflusses von Zeitkonstante und Datensammelrate auf die Datenauswertung abschätzen zu können, wurden zwei kleine Experimente gemacht. Die Ergebnisse der Versuche finden Sie im Anhang.

Für die Versuche wurde eine HPLC-Anlage LaChrom von Merck-Hitachi verwendet. Die Steuerung der Anlage und die Datenauswertung erfolgten mit der Software HSM (ebenfalls Merck-Hitachi).

Pumpe: L-7100 (Niederdruckgradient)
 UV-Detektor: L-7400 (261 nm)
 Säule: LichroCart 4 \times 25 mm, Purospher 100 RP-18 (5 μ m)
 Eluent: ACN/H₂O 85 ml + 15 ml
 Flow: 1 ml/min
 Probe: 3 nl/ml; 20 nl/ml; 1 μ l/ml 1-Phenyldecan in Eluent

Versuch 1

Der Einfluss der Zeitkonstante auf das Chromatogramm (Peakfläche, Peakhöhe, Peakverbreiterung, Peaksymmetrie und Detektionsempfindlichkeit) soll demonstriert werden:

- größtmögliche Datensammelrate: 10 Hz (bei HSM wird der Reziprokwert, die Sampling Period, eingestellt: SP = 100 ms);
- unterschiedliche Zeitkonstanten (ZK) bei gleich bleibender Sampling Period (SP);
- kleiner Peak/großer Peak (Probenkonzentration = 20 nl/ml resp. 1 µl/ml 1-Phenyldecan in Eluent);
- die Daten wurden aus jeweils fünf Injektionen ermittelt.

Versuch 2

Auch in diesem Versuch soll der Einfluss der Zeitkonstante auf das Chromatogramm demonstriert und zusätzlich untersucht werden, welchen Einfluss die Datensammelrate hat. Die Probenkonzentration von 3 nl/ml 1-Phenyldecan in Eluent ist nahe der Bestimmungsgrenze.

Die Daten wurden aus jeweils 10 Injektionen ermittelt. Den Noise berechnete das Programm HSM aus einem Blank, die Basislinie wurde für jeden Run manuell gesetzt.

Außer der Basispeakbreite, Anzahl der Datenpunkte und Auflösung wurden alle Werte vom Integrationsprogramm berechnet:

- Die Basispeakbreite (w) wurde aus der theoretischen Bodenzahl (N) gemäß Gleichung $w = \frac{4 t_{ms}}{\sqrt{N}}$ geschätzt.
- Zur Berechnung der Anzahl der Datenpunkte (Anz. DP) wurde die berechnete Basispeakbreite durch die Sampling Period (SP in [s]) dividiert.
- Für den Schätzwert von R ($R_{\text{geschätzt}}$) wurde von der Annahme ausgegangen, dass in jedem Chromatogramm ein (fiktiver) zweiter, gleich breiter Peak vorhanden sei. Im Chromatogramm mit dem schmalsten Peak wurde eine Auflösung von 1,5 (= Basislinientrennung) angenommen und für die anderen Chromatogramme die Auflösung gemäß $R = \frac{\Delta t_R}{\bar{w}}$ geschätzt.

Ergebnisse (s. Tabellen A.1 und A.2)

- Die Erhöhung der Zeitkonstante verringert das Rauschen, aber auch die Peakhöhe. Interessanterweise zeigte sich bei zwei unterschiedlichen Sequenzen, mit einer Datensammelrate von 10 Hz (SP = 100 ms) aufgenommen, ein Optimum des Signal/Rausch-Verhältnis bei einer Zeitkonstante von 0,5 s resp. 2 s und die Werte werden mit größerer Zeitkonstante wieder schlechter. Bei langsameren Datensammelraten verbesserte sich die Nachweisempfindlichkeit mit der Erhöhung der Zeitkonstante.
- Die Peakfläche verändert sich im Gegensatz zur Peakhöhe nicht wesentlich.
- Die Peaks werden mit zunehmender Zeitkonstante breiter.

- Die Auflösung wird daher mit zunehmender Zeitkonstante schlechter.
- Die Datensammelrate hat einen geringen Einfluss auf die Peakfläche, sofern der Peak mit genügend Datenpunkten aufgenommen wird.

Zusammenfassung

- Die Datensammelrate ist so zu wählen, dass der schmalste Peak im Bereich der Basispeakbreite mit 20–60 Datenpunkten aufgenommen wird. Werden zu viele Datenpunkte aufgenommen, kann die korrekte Einstellung der Peakerkennungsparameter erschwert werden, die Rohdatenfiles brauchen mehr Speicherplatz und die Datenauswertung mehr Rechenzeit.
- Eine sorgfältige Abklärung der optimalen Einstellung der Zeitkonstante ist empfehlenswert. Mit einem Wert von 0,5 s verbreitert sich der Peak noch nicht übermäßig, die Reproduzierbarkeit der Peakerkennung wird jedoch stark verbessert. 0,5 s sind somit als Grundeinstellung für UV-Detektoren gut geeignet. Kleinere Zeitkonstante = bessere Auflösung, größere Zeitkonstante = bessere Detektionsempfindlichkeit;
- Die zwei Experimente wurden unter gleichen chromatographischen Bedingungen durchgeführt, die Peakform blieb somit konstant. Je breiter jedoch ein Peak ist, umso weniger Einfluss hat die Zeitkonstante auf die zusätzliche Peakverbreiterung und Herabsetzung der Peakhöhe. Je breiter die Peaks sind, umso stärker kann das Signalrauschen durch Vergrößern der Zeitkonstante reduziert werden. Als *Faustregel* gilt: Zeitkonstante $\approx 1/4$ Halbwertsbreite (in [s]).

1.5

Integration

Ein Integrationssystem hat die Aufgabe, in einem Chromatogramm Retentionszeiten, Peakhöhen und Peakflächen möglichst genau zu bestimmen. Die Retentionszeit ist definiert als der Zeitpunkt, wo die größte Substanzmenge detektiert wird. Dementsprechend wird zu diesem Zeitpunkt die Peakhöhe gemessen. Eine Schwierigkeit besteht nun darin, dass vom Detektor auch ein Signal erzeugt wird, wenn sich die zu bestimmende Substanz nicht in der Detektorzelle befindet. Bei zweidimensionalen Chromatogrammen kann dieses Basissignal und das von den Analyten hervorgerufene Signal nur empirisch unterschieden werden. Aufgabe des Integrationssystems ist deshalb auch die Bestimmung des wahrscheinlichsten Verlaufs der Basislinie.

1.5.1

Integration anschaulich

Weil nicht die Peakhöhe, sondern die *Peakfläche* der Substanzmenge proportional ist, wird diese normalerweise zur Quantifizierung herangezogen. Zur Berechnung der Peakfläche muss das Integrationssystem zusätzlich den Peakbeginn und das Peakende definieren.

Dass die Substanzmenge der Peakfläche und nicht der Peakhöhe proportional ist, soll an einem kleinen Beispiel erläutert werden:

Nehmen wir an, dass sich bei einer HPLC-Trennung die Substanz in scheibenförmigen Konzentrationszonen befindet, welche genau so breit sind, dass eine solche „Konzentrationssscheibe“ bei einem Eluentenfluss von 0,6 ml/min (= 10 μ l/s) in *einer* Sekunde durch die Detektorzelle fließt. Nehmen wir weiter an, ein Signalausschlag von 1 mV entspreche einer Substanzkonzentration von 0,1 μ g/ml (= 1 ng/10 μ l). Dann enthält z. B. die „Scheibe ③“ in Abb. 1.39 folgende Substanzmenge: 65 mV \cdot 1 ng/mV = 65 ng.

Die totale Substanzmenge, welche sich unter dem Peak „verbirgt“, entspricht der Summe der Substanzmengen in „Scheibe ①–⑨“. Wenn wir uns nun diese „Scheiben“ sehr dünn vorstellen, dann erhalten wir einen Peak, wie wir ihn aus der Praxis kennen (s. Abb. 1.39).

Wie wir gesehen haben, ist die Peakfläche der Substanzmenge proportional. Dennoch kann es vorteilhaft sein, die Peakhöhe zur Quantifizierung einzusetzen. Weil normalerweise mittels Vergleich mit Referenzlösungen bekannten Gehalts quantifiziert wird und sich eine Konzentrationsänderung des Analyten primär auf

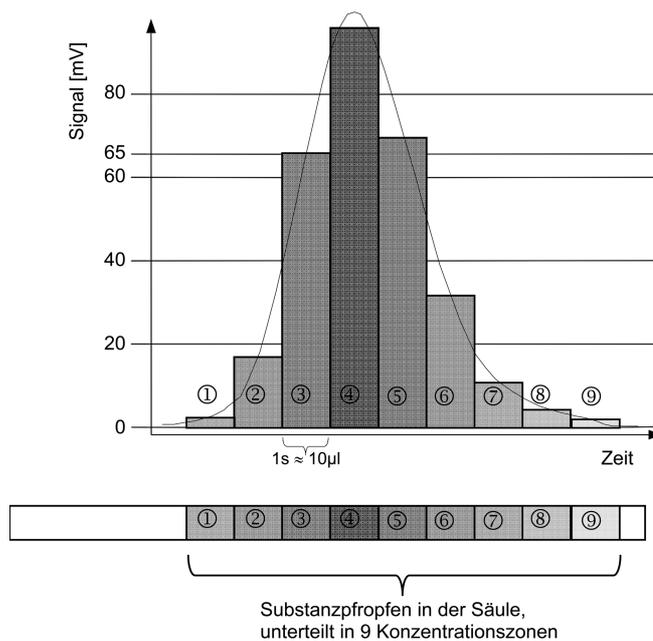


Abb. 1.39 Wenn wir uns die Substanzverteilung z. B. bei einer HPLC-Trennung als scheibenförmige Konzentrationszonen vorstellen, dann enthält die Zone ③ (mit den angenommenen Werten: Substanzkonzentration = 6,5 ng/ μ l, Eluentenfluss = 10 μ l/s) 65 ng Substanz. Die wirkliche Konzentrationsverteilung

können wir uns als eine unendlich große Menge unendlich schmaler solcher Scheiben vorstellen. Die Summe aller Substanzmengen in den einzelnen Zonen entspricht der gesamten eluierten Substanzmenge. Daraus ersehen wir, dass die Peakfläche der Substanzmenge proportional ist.

die Peakhöhe auswirkt, kann anstelle der Peakfläche auch die Peakhöhe kalibriert werden. Sind die Retentionszeiten nicht sehr stabil, dann kann bei isokratischen oder isothermen Trennungen das Produkt aus Peakhöhe und Retentionszeit zur Berechnung eingesetzt werden, um den Einfluss der Peakverbreiterung zu minimieren.

1.5.1.1 Methoden zur Peakerkennung

Klassische Methode

Bei der klassischen Methode wird ab dem Start des Chromatogramms laufend die Steigung zwischen zwei aufeinander folgenden Datenpunkten bestimmt und der Wert mit einem vom Benutzer definierten oder durch das System berechneten Schwellenwert verglichen. Sobald der Schwellenwert überschritten wird, markiert das System den betrachteten Datenpunkt als potentiellen Peakbeginn und startet einen zusätzlichen Algorithmus, welcher überprüft, ob dieser Datenpunkt definitiv als Peakbeginn festgelegt werden kann, oder ob es sich um Basisliniendrift oder einen Spike handelt (Abb. 1.40). Nachdem der Peakbeginn erkannt wurde, muss die Peakspitze gefunden werden. Jeder Datenpunkt, dem ein kleinerer Signalwert folgt, wird als potentielle Peakspitze markiert. Die Bestätigung erfolgt, wenn weitere Kriterien (z. B. drei nachfolgende Datenpunkte weisen eine negative Steigung auf) erfüllt sind. Nun beginnt die Suche nach dem Peakende. Dieses wird analog zum Peakbeginn ermittelt, nur dass hier natürlich der Schwellenwert unterschritten werden muss.

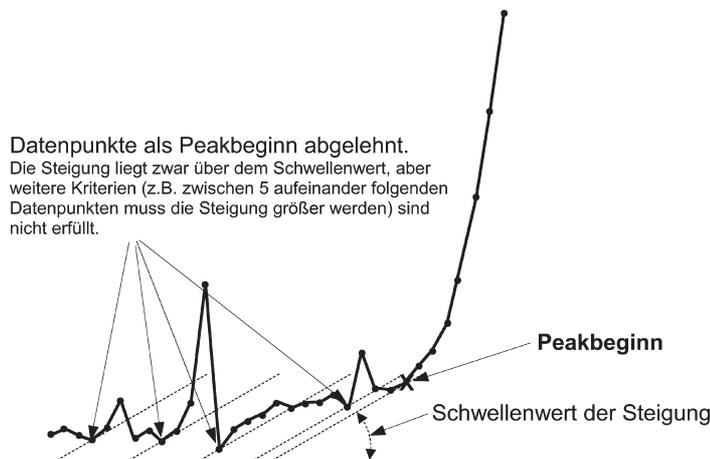


Abb. 1.40 Bei der klassischen Methode der Peakerkennung wird jeder Datenpunkt, bei welchem die Steigung zum nächsten Datenpunkt einen definierten Schwellenwert überschreitet, als potentieller Peakbeginn markiert. Werden weitere Kriterien erfüllt, wird der Punkt als Peakbeginn bestätigt und

die Suche nach dem Peakende beginnt. Die Signalsteigung und die Bestimmung des Schwellenwerts werden von den verschiedenen Herstellern von Integrationsprogrammen unterschiedlich definiert. Die Methoden lassen sich jedoch auf das oben beschriebene Verfahren zurückführen.

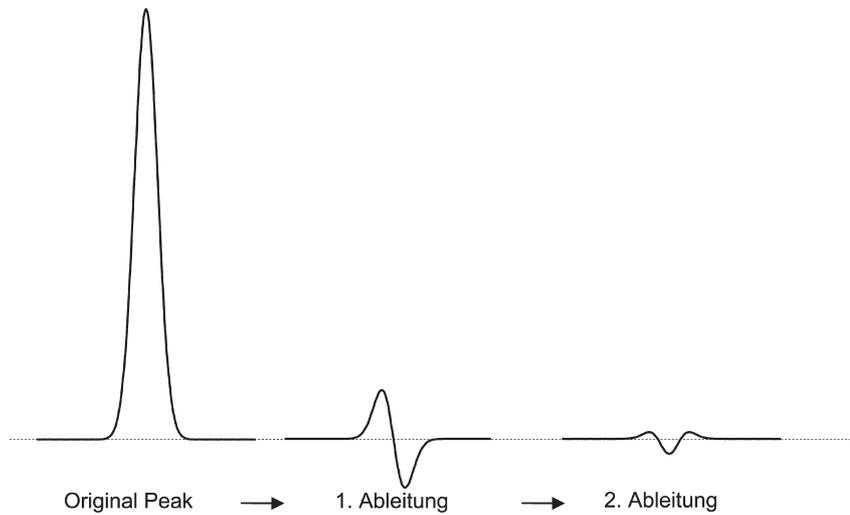


Abb. 1.41 Zur Darstellung der ersten Ableitung des Peaks wird anstelle des Detektorsignals die Steigung des Signals zum jeweiligen Zeitpunkt aufgezeichnet. Dementsprechend zeigt die zweite Ableitung die Steigung der Kurve der ersten Ableitung. Die erste Ableitung entspricht somit der Steigung, die zweite Ableitung der Krümmung des Peaks. Minimum der zweiten Ableitung = Peakspitze; Nullstellen vor und nach dem Minimum = auf- und absteigende Wendepunkte (s. Abb. 1.42).

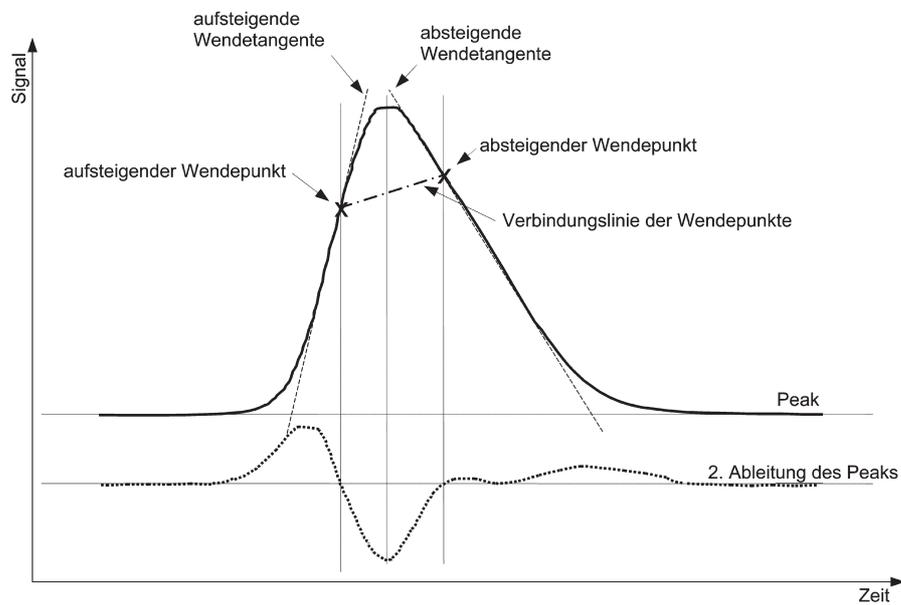


Abb. 1.42 Aus der zweiten Ableitung werden Peakspitze und Wendepunkte ermittelt.

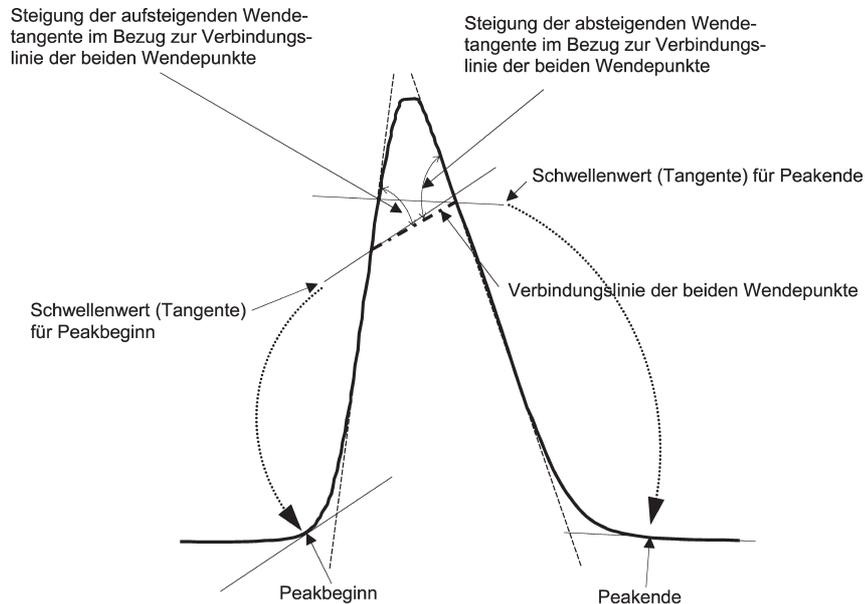


Abb. 1.43 Die Steigung der beiden Wendetangenten in Bezug zur Verbindungslinie der beiden Wendepunkte wird bestimmt. Daraus wird ein Schwellenwert (in [%]) abgeleitet. Von der Peakspitze wird nun die Tangente eines jeden Datenpunkts in Richtung Peakbeginn resp. Peakende mit den jeweiligen Schwellenwerten verglichen.

Alternative Methode

Als Beispiel einer anderen Methode zur Peakerkennung und Bestimmung der Basislinie kann das als „ApexTrack“TM bezeichnete Verfahren im Integrationsprogramm „Empower“TM (Waters Corporation) erwähnt werden.

Hier wird die zweite Ableitung des Detektorsignals gebildet und daraus die Peakspitze (= Retentionszeit) und die Wendepunkte bestimmt. Als Peakspitzen werden alle Minima in der zweiten Ableitung des Chromatogramms markiert, welche eine vom Benutzer definierte oder vom Programm berechnete Mindestgröße erreichen.

Zur Bestimmung von Peakbeginn und Peakende wird die Steigung der Tangente an jedem Datenpunkt von der Peakspitze in Richtung Peakbeginn resp. Peakende mit der Steigung der Verbindungslinie zwischen dem auf- und dem absteigenden Wendepunkt und einem vom Benutzer definierten oder durch das System berechneten Schwellenwert verglichen.

1.5.2

Integration und Integrationsparameter, Beispiele

1.5.2.1 Datenaufnahme und -integration mit Empower 2

Mit Empower [11] kann die Peakerkennung und der Verlauf der Basislinie mit zwei unterschiedlichen Methoden erfolgen:

- *Klassische Integration*
Peakbeginn und -ende werden anhand der Signalsteigung ermittelt (erste Ableitung).
- *ApexTrack-Verfahren*
Dieses Verfahren ermittelt die Spitze und die Wendetangenten des Peaks mittels der zweiten Ableitung und sucht von der Peakspitze aus den Peakbeginn und das Peakende.

Datenaufnahme

Der Hersteller von Empower empfiehlt, die Datensammelrate so einzustellen, dass der schmalste Peak innerhalb der Peakbreite (gemessen in 5% der Peakhöhe ([11], Abschn. 2–10) mit 15 Datenpunkten erfasst wird ([11], Abschn. 1–7). Zur Bestimmung der Peakfläche werden alle (ungefilterten) Rohdatenpunkte verwendet, egal welche Sampling Rate und Peak Width bei den Peakerkennungsparametern eingestellt wurden.

Peakerkennung

Wird eine höhere Datensammelrate als die 15 Datenpunkte pro Peak Width eingestellt, berechnet das System aus Peak Width und Sampling Rate eine Bunching Rate. Es werden so viele Datenpunkte zusammengefasst und die mittlere Signalgröße daraus berechnet, dass innerhalb der Peak Width 15 Datenpunkte resultieren.

$$\text{Anzahl zusammengefasster Datenpunkte} = \frac{\text{Peak Width} \cdot \text{Datensammelrate}}{15}$$

Durch das Zusammenfassen von Daten wird das Signal geglättet. Dieses geglättete Signal wird nur zur Bestimmung von Peakbeginn und Peakende verwendet. Die Berechnung der Peakfläche erfolgt anschließend mit den Rohdaten.

Peakspitze (Retentionszeit, Peakhöhe)

Der größte Signalwert innerhalb des Peaks plus zwei Datenpunkte vor und zwei Datenpunkte nach diesem Wert werden dazu verwendet, mittels quadratischer Anpassung die maximale Signalthöhe zu berechnen. Die zu diesem maximalen Signalwert (y) gehörende Zeit (x) entspricht der Retentionszeit.

Basislinie

Die Basislinie wird vom Peakbeginn zum Peakende eines Peaks oder einer nicht vollständig aufgelösten Peakgruppe gezogen.

Zur Bestimmung, ob zwei benachbarte Peaks vollständig aufgelöst sind, wird die Distanz Peakende von Peak 1 bis Peakbeginn Peak 2 mit der Peakbreite des breiteren Peaks verglichen. Beträgt das Verhältnis höchstens drei, werden die Peaks als einzelne, vollständig aufgelöste Peaks betrachtet, sonst als Peakgruppe.

In unserem Beispiel (Abb. 1.44) bildet das Peakpaar 1/2 eine Gruppe, weil w_2 (breiterer Peak des Paares) mehr als dreimal so breit ist wie EB1-2. Das Peakpaar 2/3 ist vollständig aufgelöst, denn w_3 ist nur etwa zweimal so breit wie EB2-3. Ein Basislinienpunkt wird somit bei Peakende 2 und Peakbeginn 3 gesetzt.

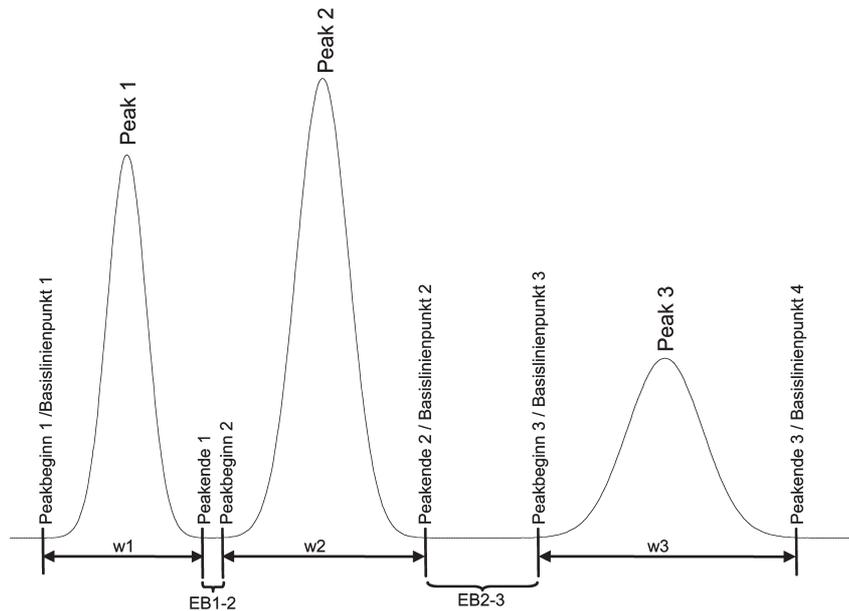


Abb. 1.44 Bei Peakende 1 und Peakbeginn 2 werden keine Basislinienpunkte gesetzt, weil der breitere Peak des Peakpaars 1/2 breiter ist als das Dreifache des Peakabstands EB1-2. Beim Peakpaar 2/3 ist die Distanz EB2-3 größer als $1/3 w_3$. Sowohl am Ende von Peak 2 als auch zu Beginn von Peak 3 werden Basislinienpunkte gesetzt.

1.5.2.2 Datenaufnahme und -integration mit Chromeleon

Datenaufnahme

Die Empfehlung des Herstellers von Chromeleon ist, jeden Peak mit mindestens 20 Datenpunkten zu erfassen, d. h., die Datenaufnahme-Parameter so einzustellen, dass der schmalste Peak mit 20 Datenpunkten aufgenommen wird [12, 13]. Sollen kleine Peaks detektiert werden (geringes Signal/Rausch-Verhältnis) oder bei schlecht aufgetrennten Peaks, ist die Anzahl der Datenpunkte auf ca. 40 pro Peak zu erhöhen.

Bei Detektoren, welche bereits digitale Signaldaten liefern, wird die Datenaufnahme mit der *Data Collection Rate* (Datenerfassungsrate) gesteuert, bei Detektoren, bei welchen das analoge Signal zuerst in einem A/D-Wandler digitalisiert wird, mit dem Befehl *Sampling Rate* (Datenaufnahmerate).

Neben den Befehlen *Data Collection Rate* und *Sampling Rate* muss mit *Step* auch die Schrittweite, also die Zeitdauer zwischen dem Abspeichern von zwei aufeinander folgenden Datenpunkten, angegeben werden. Standardmäßig wird der Wert von *Step* auf den Reziprokwert der Datenerfassungs- resp. Datenaufnahmerate gesetzt. Beispiel: Mit einer *Sampling Rate* von 100 Hz wird die Schrittweite (*Step*) auf 0,01 s gesetzt. Mit der Vergrößerung von *Step* auf z. B. 0,1 s und dem Zusatzbefehl *Average = on* kann bewirkt werden, dass von den

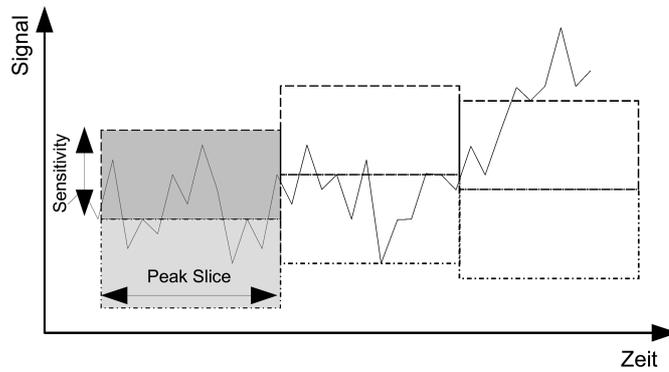


Abb. 1.45 Die Empfindlichkeit der Peakerkennung kann mit den beiden Parametern Sensitivity und Peak Slice beeinflusst werden.

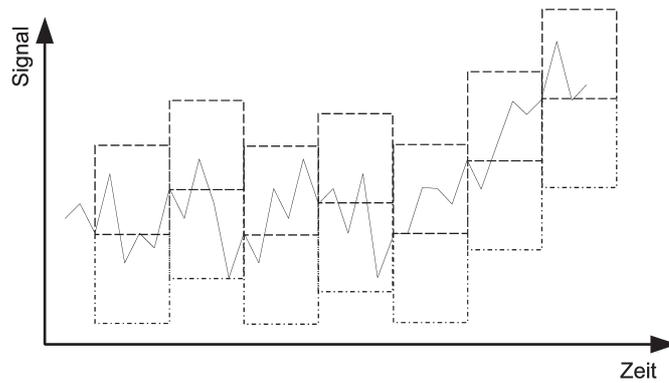


Abb. 1.46 Verkleinern von Peak Slice macht die Peakerkennung unempfindlicher, der Peak wird später oder gar nicht erkannt, weil die Signalsteigung als Basisliniendrift interpretiert wird.

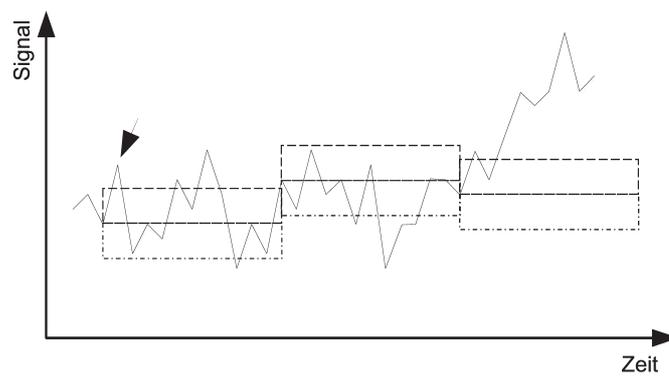


Abb. 1.47 Verkleinern der Sensitivity macht die Peakerkennung empfindlicher.

100 Datenpunkten, welche pro Sekunde gelesen werden, nur die Durchschnittswerte aus 10 Punkten im Speicher abgelegt werden. Dieses Datenbunching bewirkt eine Glättung des Signals.

Der Hersteller rät, die Möglichkeit, die Schrittweite vom System automatisch der Signalsteigung anpassen zu lassen, um mit dieser variablen Schrittweite die Datenmenge zu reduzieren, nur für schnelle Probe-Chromatogramme zu verwenden, bei denen die zu erwartenden Peakbreiten nicht bekannt sind. Für eine präzise und reproduzierbare Analytik wird eine feste Schrittweite empfohlen.

Peakerkennung

Die Peakerkennung wird mit den beiden Werten *Peak Slice* und *Sensitivity* gesteuert (s. Abb. 1.45 bis 1.47). Vom ersten gemessenen Datenpunkt ausgehend wird ein Rechteck gebildet, in der Zeitachse als *Peak Slice* und in der Signalachse als *Sensitivity* bezeichnet. Durch Spiegelung der *Sensitivity* in Richtung negativer Signalwerte wird die Fläche des Rechtecks verdoppelt. An dieses erste Rechteck wird nach Ablauf der für *Peak Slice* definierten Zeit ein nächstes Rechteck mit dem Nullpunkt auf den letzten Datenpunkt im ersten Rechteck gehängt. Solange sich alle Datenpunkte in diesem Rechteck befinden, wird die Signaländerung als Rauschen interpretiert. Verlässt ein Punkt das Rechteck, beginnt ein Peakerkennungsalgorithmus nach dem Peakbeginn zu suchen. Nach der Erkennung von Peakbeginn und Peakspitze sucht Chromeleon nach dem Peakende, sobald sich zwei aufeinander folgende Signalwerte wiederholen.

1.5.2.3 Datenaufnahme und -integration mit EZChrom Elite

Datenaufnahme

Der Hersteller von EZChrom Elite [14] empfiehlt ebenfalls die Anzahl der Datenpunkte des schmalsten Peaks auf 20 zu setzen. Die Anzahl der aufzunehmenden Datenpunkte kann entweder mit dem Befehl *Sampling Frequency* (in [Hz]) oder dem Reziprokwert der *Sampling Period* (in [ms]) eingestellt werden. Zur Glättung des Signals und zur Verringerung der Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte können mit *Width* so viele Datenpunkte zusammengefasst und gemittelt werden (= Datenbunching), dass innerhalb der bei *Width* angegebenen Zeit 20 Datenpunkte abgelegt werden.

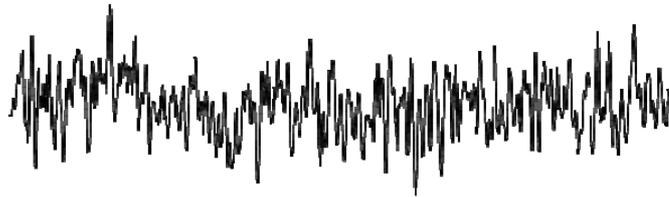
Peakerkennung

Die Peakerkennung wird mit *Threshold* angepasst. Wird dieser Wert durch Markieren eines Stücks Basislinie zwischen zwei Peaks graphisch ermittelt, legt das Programm zur Berechnung den größten Wert der ersten Ableitung, also die in diesem Abschnitt größte Signalsteigung, zugrunde.

1.5.2.4 Datenaufnahme und -integration mit ChemStation

Datenaufnahme

Das analoge Detektorsignal wird mit einer hohen, konstanten Frequenz abgetastet [15]. In der Instrumentensteuerung wird mit dem Parameter *Data Rate* eingestellt,



Data Rate = 100Hz, Minimum Peak Width = 0.002min



Data Rate = 10Hz, Minimum Peak Width = 0.02min

Abb. 1.48 Das Detektorsignal wird mit einer hohen Frequenz abgetastet, je nach eingestellter Peak Width werden jedoch mehr oder weniger Datenpunkte zusammengefasst („gebuncht“), was zu einer Glättung des Signals führt.

wie viele Datenpunkte gemittelt und als Rohdaten im Computer abgespeichert werden. Alternativ zur Data Rate kann auch die Halbwertsbreite des schmalsten Peaks (*Minimum Peak Width*) eingegeben werden. Die Datensammelrate wird dann so gewählt, dass während der Halbwertsbreite des Peaks 12 (gemittelte) Datenpunkte abgespeichert werden. Wie Abb. 1.48 zeigt, wird durch dieses Datenbunching das Signalrauschen geglättet.

Peakerkennung

Mit den fünf Parametern Initial Slope Sensitivity, Initial Peak Width, Initial Area Reject, Initial Height Reject und Shoulders (on/off) wird die Peakerkennung gesteuert.

1.5.2.5 Vergleich der wichtigsten Integrationsparameter von vier unterschiedlichen Integrationsprogrammen

Neben den Parametern, welche die Aufnahme der Rohdaten steuern, können bei den Integrationsprogrammen zeitabhängige Integrationsparameter eingegeben werden. Diese Werte beeinflussen die Peakerkennung, den Verlauf der Basislinie, die Peakzuordnung und bestimmen die Grenzen, innerhalb welcher sich die Ausdehnung eines Peaks bewegen muss, um als solcher erkannt zu werden. Besonders bei den Parametern für die Datenaufnahme ist es oft fast unmöglich, aus den Handbüchern der Software-Hersteller die Information zu erhalten, ob sich die Einstellung von *Sampling Rate*, *Data Rate*, *Peak Width* etc. auf die Aufnahme der Rohdaten oder auf die Peakerkennung bei der Datenauswertung auswirken (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Vergleich einiger Integrationsparameter in unterschiedlichen Integrationsprogrammen.

Einfluss auf	ChemStation	Chromleon	Empower	EZChrom
Anzahl Peaks reduzieren	Inhibit Integration Set Maximum Height Set Maximum Width Set Minimum Area Set Minimum Height	Inhibit Integration Maximum Peak Height Maximum Width Minimum Area Minimum Height Minimum Width Reject with smaller Area than ...%	Inhibit Integration Set Maximum Height Set Maximum Width Set Minimum Area Set Minimum Height	Integration on/off Minimum Area
Basislinie	Baseline at Valleys Baseline Backwards Baseline Hold Baseline Next Valley Baseline Now Detect Shoulders Negative Peak Shoulders Mode Split Peak Tail Tangent Skim Tangent Skim Mode Unassigned Peaks	Baseline Point Lock Baseline at Current Level Lock Baseline at Global Minimum Maximum Rider Ratio Peak Shoulder Threshold Rider Skimming Shape Shoulder Split Peak Tailing Sensitivity Factor Valley to Valley	Allow Negative Peaks Detect Shoulders Exponential Skim Force Baseline by Peak Force Baseline by Time Force Drop Line Force Peak Forward Horizontal by Peak Forward Horizontal by Time Reverse Horizontal by Peak Reverse Horizontal by Time Tangential Skim Valley to Valley	Backward Horizontal Baseline Front Tangent Skim Horizontal Baseline Lowest Point Horizontal Baseline Manual Baseline Move Baseline Negative Peak Reset Baseline Reset Baseline at Valley Shoulder Sensitivity Split Peak Tangent Skim Valley to Valley
Datenaufnahme Peakerkennung	Data Rate/Peak Width	Data Collection Rate Sampling Rate Step	Sampling Rate	Frequency Sampling Period Width
Peakerkennung Peakzuordnung Basislinie	Auto Peak Width Fixed Peak Width Slope Sensitivity Solvent Peak	Fronting Sensitivity Factor Insert Peak Peak Slice Rider Threshold Sensitivity	Set Liftoff Set Peak Width Set Touchdown	Threshold Disable End of Peak Detection Force Peak Start/Stop Manual Peak Adjust RT Window Reassign Peak

Anhang:**Experimente zur Optimierung der Zeitkonstante/Datensammelrate****Versuch 1**

Tabelle A.1 Der Einfluss der Zeitkonstante auf das Chromatogramm soll demonstriert werden. Mit der größtmöglichen Datensammelrate von 10 Hz, entspricht einer Sampling Period (*SP*) von 100 ms, wurden jeweils fünf Chromatogramme von zwei unterschiedlich konzentrierten Proben mit unterschiedlichen Zeitkonstanten (*ZK*) aufgenommen. Probenkonzentrationen: 20 nl/ml resp. 1 µl/ml 1-Phenyldecan (in Eluent).

	Konz	ZK [s]	SP [ms]	Area [µV s]	Hight [µV]	RT [min]	Peak- breite [min]	N(EUP)	Asym	S/N
Mittelwert	20 nl/ml	0.1	100	8749	1509	1,65	0,34	1877	1,12	100
RSD				3,40%	2,72%	1,48%	20,37%	1,86%	2,56%	2,72%
Mittelwert	20 nl/ml	0.5	100	8664	1444	1,61	0,38	1670	1,11	206
RSD				0,33%	0,79	0,65	12,68	0,88	1,24	0,80
Mittelwert	20 nl/ml	2	100	8533	1036	1,64	0,50	994	1,43	173
RSD				1,83%	1,05	0,81	16,39	0,78	1,55	1,06
Mittelwert	20 nl/ml	8	100	8319	462	1,63	1,22	252	2,88	62
RSD				1,17%	0,64	0,99	4,96	2,94	4,02	0,63
Mittelwert	1 µl/ml	0.1	100	40984	72514	1,56	0,46	1779	1,20	4395
RSD				0,07%	0,49	0,73	3,44	0,50	0,86	0,49
Mittelwert	1 µl/ml	0.5	100	409410	68951	1,53	0,44	1553	1,20	8112
RSD				0,11%	0,99	0,91	8,28	0,92	0,91	0,99
Mittelwert	1 µl/ml	2	100	407344	49172	1,56	0,71	894	1,54	8195
RSD				0,42%	0,21	0,76	10,56	0,42	0,72	0,22

Versuch 2

Tabelle A.2 In diesem Versuch soll der Einfluss der Zeitkonstante auf das Chromatogramm demonstriert und zusätzlich untersucht werden, welchen Einfluss die Datensammelrate hat. Die Probenkonzentration von 3 nl/ml 1-Phenyldecan (in Eluent) ist nahe der Bestimmungsgrenze. Die Daten wurden aus jeweils 10 Injektionen ermittelt, den Noise berechnete das Programm HSM aus einem Blank, die Basislinie wurde für jeden Run manuell gesetzt. Außer w , Anz. DP und R wurden alle Werte vom Integrationsprogramm berechnet. Die Basispeakbreite (w) wurde aus der theoretischen Bodenzahl (N) gemäß Gleichung $w = \frac{4 t_{ms}}{\sqrt{N}}$ berechnet.

Zur Berechnung der Anzahl der Datenpunkte (Anz. DP) wurde die berechnete Basispeakbreite durch die Sampling Period (SP in [s]) dividiert. Für den Schätzwert von R ($R_{\text{geschätzt}}$) wurde von der Annahme ausgegangen, dass in jedem Chromatogramm ein (fiktiver) zweiter, gleich breiter Peak vorhanden sei. Im Chromatogramm mit dem schmalsten Peak wurde eine Auflösung von 1,5 (= Basislinientrennung) angenommen und für die anderen Chromatogramme die Auflösung gemäß $R = \frac{\Delta t_R}{w}$ geschätzt.

Sampling Period = 100 ms / Sampling Rate = 10 Hz

ZK 0,1 s	RT [min]	Area [$\mu\text{V s}$]	Height [μV]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μV]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{\text{geschätzt}}$
Mittelwert	2,14	1881	225	1534	1,13	16	29	13,1	131	1,5*
RSD	0,62%	3,18%	2,92%	3,99%	6,61%	2,92%				
ZK 0,5 s	RT [min]	Area [$\mu\text{V s}$]	Height [μV]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μV]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{\text{geschätzt}}$
Mittelwert	2,12	1869	211	1369	1,2	26	16	13,8	138	1,43
RSD	0,31%	2,55%	1,10%	3,93%	6,50%	1,10%				
ZK 2 s	RT [min]	Area [$\mu\text{V s}$]	Height [μV]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μV]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{\text{geschätzt}}$
Mittelwert	2,16	1825	164	893	1,27	47	7	17,3	173	1,13
RSD	0,22%	3,54%	2,38%	1,95%	3,36%	2,38%				
ZK 4 s	RT [min]	Area [$\mu\text{V s}$]	Height [μV]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μV]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{\text{geschätzt}}$
Mittelwert	2,2	1779	123	574	1,43	41	6	22,0	220	0,89
RSD	0,29%	2,58%	1,71%	2,47%	2,65%	1,71%				

* Schmalster Peak als Peakpaar mit einer Auflösung von $R = 1,5$ angenommen.

Sampling Period = 200 ms / Sampling Rate = 5 Hz

ZK 0,1 s	RT [min]	Area [μ V s]	Height [μ V]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μ V]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{geschätzt}$
Mittelwert	2,11	1848	220	1522	1,2	14	31	13,0	65	1,5*
RSD	0,41%	2,58%	1,29%	8,50%	9,14%	1,29%				
ZK 0,5 s	RT [min]	Area [μ V s]	Height [μ V]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μ V]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{geschätzt}$
Mittelwert	2,12	1856	209	1354	1,23	23	18	13,8	69	1,41
RSD	0,24%	2,39%	1,69%	4,89%	6,20%	1,69%				
ZK 2 s	RT [min]	Area [μ V s]	Height [μ V]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μ V]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{geschätzt}$
Mittelwert	2,17	1801	165	919	1,28	55	6	17,2	86	1,13
RSD	0,24%	2,57%	2,02%	2,46%	3,72%	2,02%				
ZK 4 s	RT [min]	Area [μ V s]	Height [μ V]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μ V]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{geschätzt}$
Mittelwert	2,2	1745	123	571	1,48	62	4	22,1	111	0,88
RSD	0,46%	4,25%	1,77%	3,84%	3,43%	1,77%				

Sampling Period = 400 ms / Sampling Rate = 2,5 Hz

ZK 0,1 s	RT [min]	Area [μ Vs]	Height [μ V]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μ V]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{geschätzt}$
Mittelwert	2,14	1885	221	1455	1,28	15,77	28	13,5	34	1,5*
RSD	0,51%	4,35%	1,95%	6,72%	9,05%	1,96%				
ZK 0,5 s	RT [min]	Area [μ Vs]	Height [μ V]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μ V]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{geschätzt}$
Mittelwert	2,14	1895	210	1358	1,26	20,03	21	13,9	35	1,45
RSD	0,79%	2,39%	1,31%	4,07%	5,75%	1,32%				
ZK 2 s	RT [min]	Area [μ Vs]	Height [μ V]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μ V]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{geschätzt}$
Mittelwert	2,2	1795	162	921	1,26	32,4	10	17,4	43	1,16
RSD	0,54%	3,43%	1,43%	2,34%	4,92%	1,43%				
ZK 4 s	RT [min]	Area [μ Vs]	Height [μ V]	N(EUP)	Asym	S/N	Noise [μ V]	w_{ber} [s]	Anz. DP	$R_{geschätzt}$
Mittelwert	2,2	1810	123	551	1,48	41,15	6	22,5	56	0,90
RSD	0,44%	2,96%	1,47%	2,84%	4,01%	1,47%				

Literatur

- 1 Recommendations for Nomenclature for Chromatography. Pure Appl. Chem. 65, 819–872 (1993).
- 2 DIN 32 645 (1994) Beuth, Berlin.
- 3 W. Gottwald (2000) Statistik für Anwender. Wiley-VCH, Weinheim.
- 4 Leitfaden zur Akkreditierung von Schweizer Prüflaboratorien zur Durchführung forensischer Drogenanalytik, Dokument Nr. 318.d (2005), Schweizerische Akkreditierungsstelle, Bundesamt für Metrologie, Bern-Wabern.
- 5 S. Kromidas (1995) Qualität im analytischen Labor. Wiley-VCH, Weinheim.
- 6 L. S. Ettre, J. V. Hinshaw und L. Rohrschneider (1996) Grundbegriffe und Gleichungen der Gaschromatographie. Hüthig Verlag, Heidelberg.
- 7 H. Engelhardt und L. Rohrschneider Deutsche chromatographische Grundbegriffe zur IUPAC-Nomenklatur, Arbeitskreis Chromatographie der Fachgruppe Analytische Chemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (<http://www.uni-saarland.de/fak8/huber/pdf/CHROBEGR97.pdf>).
- 8 S. Kromidas (2000) Handbuch Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim.
- 9 R. E. Kaiser, Chromcard TMG. Institut für Chromatographie, Bad Dürkheim.
- 10 S. Kromidas (2006) HPLC richtig optimiert, Abschn. 1.1.3.2, Was „bringt“ das meiste? Wiley-VCH, Weinheim.
- 11 Empower 2, Data Acquisition and Processing Theory Guide, 71500109909/Rev. A, Waters Corporation.
- 12 Benutzerhandbuch Dionex-Softron 2005.
- 13 Helpfile *CHROM_G.HLP*.
- 14 ReferenceGuide, Agilent Technologies Inc., October 2006.
- 15 Agilent ChemStation, Informationen zu Ihrer Chemstation (G2070-92123).

