

Der HPLC-Tipp im März

Einfluss von Einstellparametern auf die Trennung

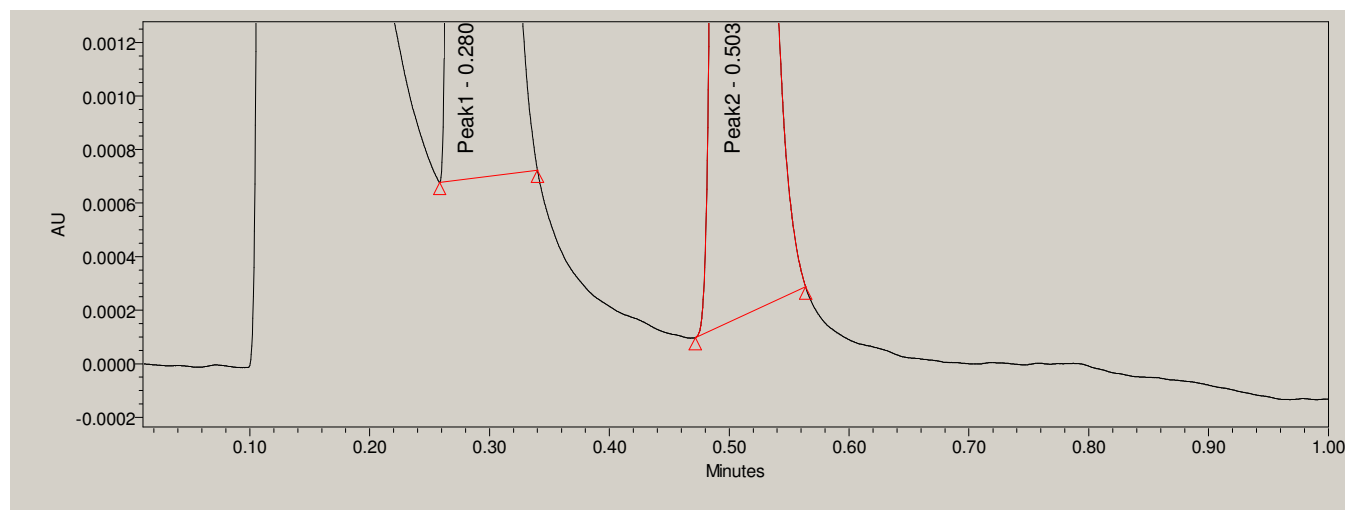
von Dr. Stavros Kromidas, Saarbrücken

Der Fall

Im vergangenen November ging es bei unseren HPLC-Tipp um den Einfluss von Einstellparametern auf die Peakform und damit auch auf die Auflösung. So „verschwinden“ schmale, früh eluierende Peaks bei zu groß eingestellten Werten für die Zeitkonstante (z. B. 0,7-1 s) bzw. zu kleinen Datenraten (z. B. 1-2 Hz). Nun mache ich in Seminaren und Workshops die Erfahrung, dass auch erfahrene Anwender die Brisanz der Einstellparameter unterschätzen oder einfach vergessen. Deswegen greife ich heute das Thema erneut auf und gehe kurz auf den Einfluß der Bandbreite (engl. „bandwidth“) bei einem Dioden Array Detektor auf das chromatographische Ergebnis ein.

Die Lösung

TC [s]	0,025	0,025	0	0	0,1	0,1	0,25	0,25
Bandwidth [nm]	1,2	12	1,2	12	1,2	12	1,2	12
Area P1	61783	66204	62161	66897	61723	67473	62445	67313
VK Area P1	1,4	1,8	0,6	1,8	2	1,5	1,2	1,2
Height P1	48215	51798	48480	52242	47119	51442	43402	46810
VK Height P1	1,1	1,3	0,7	1,5	1,7	1,3	1	1,1
Area P2	43966	42556	44143	42745	43340	42889	43864	42786
VK Area P2	1,4	1,9	0,7	1,8	2,2	1,6	1,1	1,3
Height P2	32117	31079	32103	31195	31007	30660	28767	28057
VK Height P2	1,4	1,8	0,8	1,9	2,1	1,5	1,2	1,2



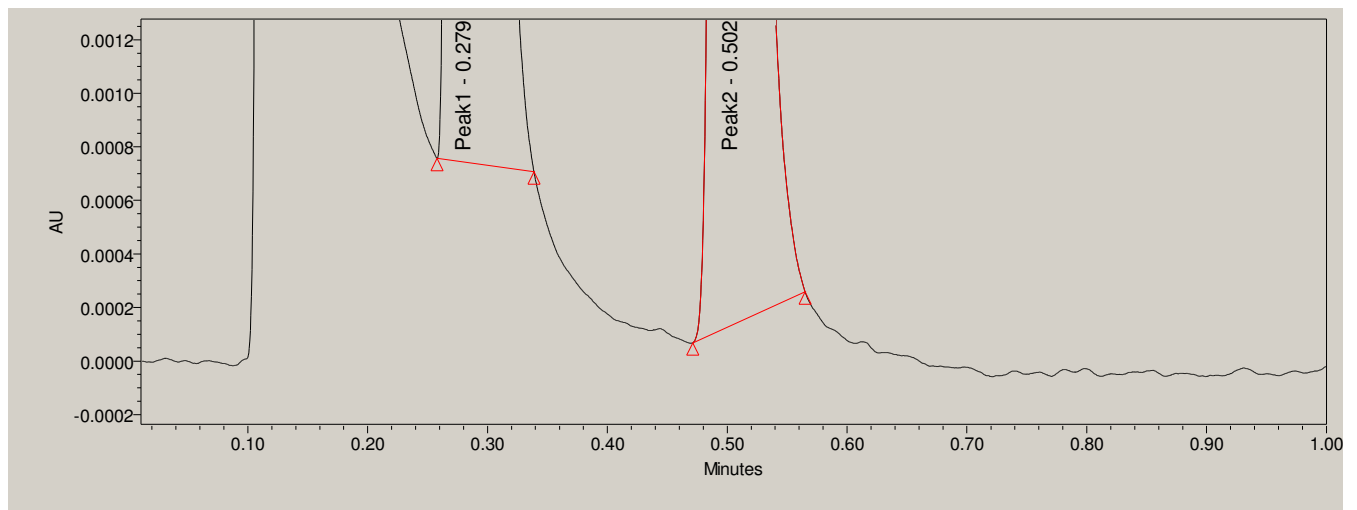


Abb. 1 Zum Einfluss der Bandbreite auf die Integration und auf das Rauschen, Erläuterungen, s. Text

In Abb. 1 wird ein Chromatogramm gezeigt, das bei gleicher Zeitkonstante (0,25 s) allerdings unterschiedlicher Bandbreite aufgenommen wurde, oberes Bild 12 nm, unteres Bild 1,2 nm – die Integration erfolgte mit Hilfe von Empower (Waters) im automatischen Modus. Was fällt auf?

1. Je nach eingestellter Bandbreite ergeben sich unterschiedliche Werte für die Peakhöhe und die Peakfläche. Da in der Praxis zur Auswertung fast ausschließlich die Peakfläche verwendet wird (ob das stets sinnvoll ist, ist eine andere Frage...) betrachten wir hier lediglich die Peakfläche: Beim ersten kleinen Peak, direkt an der Flanke des Matrix-Peaks, ergibt sich bei 12 nm Bandbreite eine Peakfläche von 67313 Flächeneinheiten, bei 1,2 nm von 62445. Beim zweiten, etwas später eluierenden Peak einmal 42786 und einmal 43864. Beim ersten Peak stellt sich damit eine Differenz in der Peakfläche von immerhin knapp 8%, im zweiten Fall von lediglich ca. 2,5%
2. Was ferner auffällt ist, dass das Rauschen wie zu erwarten bei 1,2 nm stärker als bei 12 nm ausfällt.

Das Fazit

Die Bandbreite – und natürlich auch andere Einstellparameter – können das quantitative Ergebnis beeinflussen, da bei unterschiedlichen Werten anders integriert wird und dadurch eine andere Peakfläche resultiert. Diese Gefahr besteht vor allem beim Integrieren von „schwierigen“ Peaks: Peaks an der Flanke, tailende Peaks usw. Aber auch das qualitative Ergebnis kann davon betroffen sein: Je nach Rauschen ergibt sich ein verändertes Peak/Rausch-Verhältnis und damit eine veränderte Nachweis-/Bestimmungsgrenze. Diese Dinge sollten vor allem bei schmalen, kleinen Peaks (Nebenkomponentenanalytik, Verunreinigungen, Zersetzungsprodukte usw.) beachtet werden und speziell beim Vergleich von Ergebnissen mit anderen Laboren, z.B: Methodentransfer vom/an den Kunden, validierte Methode geht in die Routine, Ringversuche.