

Der HPLC-Tipp im Januar-Februar 2017

Wie „richtig“ integriert meine Software?

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Der Fall

Wenn zwei oder mehr Peaks nicht Basislinie getrennt sind, ist die Integration mit Fehlern behaftet. Bei der Ermittlung der Peakfläche im Falle von gleich großen, symmetrischen Peaks und einem Valley zwischen den Peaks von kleiner 50 % der Peakhöhe beträgt der Fehler ca. 1-2 %. Dies dürfte kein ernstes Problem darstellen. Der Fehler bei tailenden, unterschiedlich großen und insbesondere sehr kleinen, sich an einer Drift befindenden Peaks kann allerdings in der Größenordnung von 50-60 % liegen (1). Man ist logischerweise unsicher und fragt sich, was denn das kleinere Übel ist: Lot fällen, Valley-to-Valley integrieren oder doch Tangential Skim anwenden? Bemerkung: In solchen Fällen wäre eine Auswertung über die Höhe genauer (2). Da eine solche jedoch traditionell recht selten praktiziert wird, lassen wir diese Möglichkeit hier außer Acht.

Die Lösung

Es wird z. Z. an einer Software gearbeitet, die möglicherweise eine gute Lösung für diese Problematik darstellt, nur es dauert noch... Bis es so weit ist, nachfolgend ein einfacher Weg, wie Sie wenigstens den gemachten Fehler abschätzen können. Dadurch kann man heraus bekommen wie groß in etwa die Abweichung vom „richtigen“ Wert ist, wenn *so* oder *so* (z. B. Lotfällen oder Tangential Skim) bei *dieser* oder *jener* Einstellung (z. B. 5 oder 20 Hz) integriert wird.

Das Prinzip:

Sie erzeugen zwei Peaks, die gut voneinander abgetrennt sind. Die errechneten Peakflächen sind wohl richtig, keine Software auf dem Markt bereitet in einem solchen Fall irgendwelche Probleme. Anschließend sorgen Sie dafür, dass die Peaks breiter werden und derart verschmelzen, dass sie nicht mehr Basislinie getrennt sind. Jetzt können Sie prüfen, mit welchem Integrationsmodus und welchen Einstellungen Ihre Software dem richtigen Wert am nächsten kommt. Sollte die Zeit es erlauben, wäre von Vorteil, wenn Sie folgende zwei Situationen testen würden: Erstens, zwei etwa gleich große, symmetrische Peaks. Zweitens, ein großer tailender neben einem kleinen symmetrischen Peak – also, einmal eine einfache und einmal eine schwierige Situation für jede Software.

Die Durchführung:

Test 1 (symmetrische Peaks, einfacher Fall)

Eluent: 80/20 MeOH/Wasser (v/v), das Analytpaar lautet, Ethylbenzol/Fluorenon, mit jeder C₁₈-Säule dürften Sie eine gute Trennung erhalten.

Test 2 (großer asymmetrischer Peak, kleiner symmetrischer Peak, anspruchsvoller Fall für die Software)

Eluent: 60/40 MeOH/Wasser (v/v), das Analytpaar lautet, Pyridin/Phenol, mit jeder modernen, endcappten C₁₈-Säule dürften Sie ebenfalls eine gute Trennung erhalten.

Jetzt ersetzen Sie die Kapillare vom Säulenausgang zum Detektor gegen eine dickere (z. B. eine 0,25 oder 0,50 mm Innendurchmesser), oder aber Sie verwenden einen „schlechten“ Fitting d. h. Sie erhöhen bewusst das Totvolumen der Apparatur. Dadurch werden die Peaks breiter und vermutlich verschmelzen sie. Die Auflösung wird schlechter. Nun können Sie unterschiedliche Integrationsmodi ausprobieren und haben im Nu das Ausmaß des Integrationsfehlers bei *diesem* Integrationsmodus und *diesen* Einstellungen. Dadurch fallen Entscheidungen leichter und Schlussfolgerungen können objektiv beurteilt werden.

Bemerkung:

Sie müssen keines Falls die oben angegebenen chromatographischen Bedingungen wählen. Sie brauchen lediglich zwei gut abgetrennten Peaks – mit welcher Methode auch immer...

Variante: Statt das Totvolumen, könnten Sie natürlich auch den MeOH-Anteil in der mobilen Phase erhöhen und dadurch eine schlechtere Trennung provozieren. Ich persönlich präferiere die erste Variante, denn: Eine etwas andere Eluentenzusammensetzung kann die UV-Absorption beeinflussen und eine sich dadurch veränderte Peakfläche kann zu falschen Deutungen führen. Die erste Variante – größeres Totvolumen – ist zwar etwas aufwendiger aber genauer.

Das Fazit

Verschmolzene Peaks können – insbesondere bei einer Auswertung über die Peakfläche – zu größeren Integrationsfehlern führen. Weiter oben beschriebenes Prozedere erlaubt das Abschätzen des Fehlers bei der aktuell verwendeten Software inkl. Integrationsmodus und Einstellparametern.

- (1) Stavros Kromidas, Hans-Joachim Kuss (Hrsg.) „Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC“, Wiley-VCH Verlag, 2008, ISBN 3-527-31774-5
- (2) Zitat aus USP, Kap. 621: “Peak areas are generally used, but may be less accurate if peak interference occurs”