

Chromatogramme richtig integrieren und bewerten

Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC

*Herausgegeben von
Stavros Kromidas und Hans-Joachim Kuss*



WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

**Chromatogramme
richtig integrieren und bewerten**

*Herausgegeben von
Stavros Kromidas und
Hans-Joachim Kuss*

***Beachten Sie bitte auch
weitere interessante Titel
zu diesem Thema***

W. Gottwald

Statistik im Labor

Anwendungen in der analytischen Chemie
2., vollständig überarbeitete Auflage

2007

ISBN 978-3-527-32011-0

S. Kromidas (Hrsg.)

HPLC richtig optimiert

Ein Handbuch für Praktiker

2006

ISBN 978-3-527-31470-6

V. R. Meyer

Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern

2006

ISBN 978-3-527-31268-9

V. R. Meyer

Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie

2004

ISBN 978-3-527-30726-5

Chromatogramme richtig integrieren und bewerten

Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC

*Herausgegeben von
Stavros Kromidas und Hans-Joachim Kuss*



WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Herausgeber

Dr. Stavros Kromidas

Rosenstraße 16
66125 Saarbrücken

Dr. Hans-Joachim Kuss

Psychiatrische Klinik der
Ludwig-Maximilians-Universität
Nussbaumstraße 7
80336 München

Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

Printed in the Federal Republic of Germany
Gedruckt auf säurefreiem Papier

Umschlaggestaltung Schulz Grafik-Design,
Fußgönheim

Satz Manuela Treindl, Laaber

Druck betz-druck GmbH, Darmstadt

Bindung Litges & Dopf GmbH, Heppenheim

ISBN 978-3-527-31774-5

Inhaltsverzeichnis

Vorwort XIII

Autorenliste XV

Zum Aufbau des Buches XVII

Teil I Auswertung in der Chromatographie – die Integration 1

1 Das Chromatogramm 3

Daniel Stauffer

- 1.1 Chromatographischer Prozess 3
- 1.1.1 Selektivität und Effizienz – Maß für die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit 4
- 1.2 Chromatographische Kenngrößen 5
 - 1.2.1 Retentionsgrößen 5
 - 1.2.1.1 Totzeit ($t_m; t_0$) 5
 - 1.2.1.2 Bruttoretentionszeit ($t_{ms}; t_R$) 5
 - 1.2.1.3 Nettoretentionszeit (t_s) 6
 - 1.2.1.4 Retentionsfaktor oder Kapazitätsfaktor ($k; k'$) 6
 - 1.2.2 Peak-Ausdehnung und Peakform 6
 - 1.2.2.1 Basispeakbreite (w_b) 6
 - 1.2.2.2 Peakbreite in halber Höhe (w_h) 7
 - 1.2.2.3 Peakhöhe (h) 7
 - 1.2.2.4 Peaksymmetrie, Tailingfaktor (T) 7
 - 1.2.3 Auflösungsgrößen 9
 - 1.2.3.1 Die Auflösung (R) 9
 - 1.2.3.2 Quantitative Größe der Selektivität 10
 - 1.2.3.3 Quantitative Größen für die Effizienz der Trennsäule 11
 - 1.2.4 Bestimmung von kleinen Substanzmengen 12
 - 1.2.4.1 Ermitteln der Nachweis-, Erfassungs-, Entscheidungs- und Bestimmungsgrenze 13

1.3	van Deemter- und Golay-Gleichung	15
1.4	Erzeugen von Chromatogrammen	18
1.4.1	Datenaufnahme, Erzeugen der Rohdaten	19
1.4.1.1	Bei der Datenaufnahme verwendete Parameter	22
1.4.1.2	Beispiele der unterschiedlichen Art der Datenaufnahme	24
1.4.1.3	Innere/äußere Chromatogramme	28
1.4.1.4	2-D-/3-D-Chromatogramme	28
1.4.2	Charakterisierung von Detektoren	30
1.4.2.1	Zerstörend/nicht zerstörend	31
1.4.2.2	Selektiv, spezifisch, universell	31
1.4.2.3	Konzentrations- und massenstromabhängige Detektoren	31
1.4.2.4	Detektorempfindlichkeit	33
1.4.2.5	Linearer und dynamischer Bereich	34
1.4.2.6	Ansprechzeit, Zeitkonstante	35
1.5	Integration	39
1.5.1	Integration anschaulich	39
1.5.1.1	Methoden zur Peakerkennung	41
1.5.2	Integration und Integrationsparameter, Beispiele	43
1.5.2.1	Datenaufnahme und -integration mit Empower 2	43
1.5.2.2	Datenaufnahme und -integration mit Chromeleon	45
1.5.2.3	Datenaufnahme und -integration mit EZChrom Elite	47
1.5.2.4	Datenaufnahme und -integration mit ChemStation	47
1.5.2.5	Vergleich der wichtigsten Integrationsparameter von vier unterschiedlichen Integrationsprogrammen	48
	Anhang: Experimente zur Optimierung der Zeitkonstante/Datensammelrate	50
	<i>Literatur</i>	53
2	Integrationsfehler und Auswertung	55
	<i>Hans-Joachim Kuss</i>	
2.1	Was sagt die Literatur über Integrationsfehler?	55
2.2	Integration in der täglichen Praxis	58
2.2.1	Integration – einfach und immer gleich?	58
2.2.2	Vergleich von Integrationssystemen mit wenigen großen Peaks	61
2.2.3	Vergleich von Integrationssystemen mit vielen kleinen Peaks	64
2.3	Chromatogramm-Simulation	66
2.3.1	Simulation eines digitalen Chromatogramms	68
2.3.2	Ein Peak	69
2.3.3	Mehrere Peaks	71
2.3.4	Rauschen	72
2.3.5	Drift	72
2.3.6	Gaschromatogramm	75
2.3.7	Verschmolzene Peaks	77
2.3.8	Datenpunktabstand	81
2.3.9	Tailing	87

2.3.10	Peakfläche und Peakhöhe	87
2.3.11	Andere Kenngrößen	88
2.4	Anwendungen der Simulation	89
2.4.1	Simulation einer Kalibriergeraden	91
2.4.2	Zehnfache Simulation an der Bestimmungsgrenze	98
2.4.3	Simulation eines isokratischen Chromatogramms	103
2.4.4	Simulation eines Gradienten-Chromatogramms	107
2.4.5	Nebenproduktanalyse	113
2.4.6	Eigene Chromatogramme simulieren	123
2.4.7	Welche Konsequenz ist daraus zu ziehen?	127
2.5	Auswertung	128
2.5.1	Auswertemethoden	129
2.5.2	Kalibrierung	131
2.5.3	Lineare Regression	131
2.5.4	Gewichtete lineare Regression	136
2.5.5	Nullpunktsgerade	140
2.5.6	Chromatogrammserien überprüfen	140
	<i>Literatur</i>	142
3	Allgemeine Beurteilung analytischer Daten	145
	<i>Joachim Ermer</i>	
3.1	(Normal-)Verteilung von analytischen Daten	145
3.2	Probleme des Schließens	149
3.3	Analytische Variabilität	153
3.3.1	Variabilitätsbeiträge und Präzisionsebenen	153
3.3.2	Systempräzision	155
3.3.3	Wiederholpräzision	157
3.3.4	Vergleichspräzision	159
3.3.4.1	Varianzanalyse	160
3.3.4.2	Literaturangaben zur Vergleichspräzision	162
3.3.5	Konsequenzen für das Design eines Prüfverfahrens	163
3.3.6	Konzentrationsabhängigkeit der Präzision	165
3.3.7	Schlussfolgerungen	168
3.4	(Be)Merkenswertes	168
	<i>Literatur</i>	169
4	Metrologische Aspekte der Beurteilung chromatographischer Daten	171
	<i>Ulrich Panne</i>	
4.1	Einführung	171
4.2	Messunsicherheit	173
4.3	Rückführbarkeit von analytischen Messungen	186
	<i>Literatur</i>	189

Teil II Die Charakteristika der Auswertung in einzelnen LC-Modi 191

- 5 Auswertung von GC-Daten 193**
Werner Engewald
- 5.1 Einführung 193
 - 5.2 Worin unterscheidet sich die GC von der HPLC? 194
 - 5.2.1 Welche Konsequenzen ergeben sich aus diesen Unterschieden? 195
 - 5.2.1.1 Anwendbarkeit der GC 195
 - 5.2.1.2 Probeninjektion 199
 - 5.2.1.3 Trennsäule 200
 - 5.2.1.4 Detektor 201
 - 5.2.1.5 Schnelle Gaschromatographie 203
 - 5.3 Qualitative Analyse 204
 - 5.3.1 Vorbemerkung 204
 - 5.3.1.1 Fingerprint-Analyse 205
 - 5.3.1.2 Peakreinheit 205
 - 5.3.2 Vergleich von Retentionswerten 206
 - 5.3.3 Relative Retentionswerte 206
 - 5.3.4 Retention Time Locking (RTL) 207
 - 5.4 GC/MS-Kopplung 208
 - 5.4.1 MS als identifizierender Detektor (Scan-Modus) 209
 - 5.4.2 Nutzung von Spektrenbibliotheken 210
 - 5.4.3 Spektren-Deconvolution 213
 - 5.4.4 MS als massenselektiver Detektor 215
 - 5.4.4.1 Massenfragmentographie (Reconstructed oder Extracted Ion Chromatogramm) 215
 - 5.4.4.2 SIM (Single Ion Monitoring) oder MID (Multiple Ion Recording) 216
 - 5.4.4.2 SIM (Single Ion Monitoring) oder MID (Multiple Ion Recording) 216
 - 5.4.4.5 Chemische Ionisation 217
 - 5.5 Quantitative Analyse 218
 - 5.5.1 Aufstellen einer Analysensequenz 219
 - 5.6 Isotopenverdünnungsanalyse (IVA) oder Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) 219
 - 5.7 Matrixeffekte bei der Spurenanalytik 220
 - 5.8 Headspace-GC 221
 - 5.9 Abschätzung von Korrekturfaktoren beim FID 222
- Literatur 224*
- 6 Bewertung chromatographischer Daten in der Ionenchromatographie (IC) 225**
Heiko Herrmann und Detlef Jensen
- 6.1 Einleitung 225
 - 6.2 Eluenten 226
 - 6.2.1 Der Wasserdip – Lösemittelpeak der Ionenchromatographie 227
 - 6.3 Kontaminationen 230
 - 6.4 Kalibrierfunktionen 232
- Literatur 233*

7	Qualifizierung von GPC/GFC/SEC-Daten und -Ergebnissen	235
	<i>Daniela Held und Peter Kilz</i>	
7.1	Einleitung	235
7.2	Grundlagen der GPC-Datenverarbeitung in der Ausschlusschromatographie	236
7.2.1	Berechnung der Molekulargewichtsmittelwerte	238
7.3	Richtlinien, Normen und Anforderungen an GPC-Datenverarbeitungsprozesse	241
7.4	Bewertung und Tests der GPC-Datenbearbeitungsprozesse	243
7.4.1	Beschreibung eines allgemeinen Verifikationsverfahrens für GPC-Software	243
7.4.2	Überprüfung der Richtigkeit der Berechnung der Molmassenverteilung	245
7.5	Einfluss von Datenprozessen, Kalibrationsverfahren und Signalqualität auf Richtigkeit und Reproduzierbarkeit von GPC-Ergebnissen	248
7.5.1	Prüfung der GPC-Auswertung mit direkter Kalibration	248
7.5.2	Überprüfung der Ergebnisgenauigkeit einer GPC-Viskositätskopplung	249
7.5.3	Einfluss des Detektor-Rauschens auf die Genauigkeit von GPC-Ergebnissen	250
7.5.4	Einfluss der Detektordrift auf die Genauigkeit von GPC-Ergebnissen	252
7.5.5	Einfluss der Datendichte auf die Genauigkeit von GPC-Ergebnissen	253
7.6	Einfluss von GPC-spezifischen Größen auf Verlässlichkeit und Richtigkeit von GPC-Resultaten	254
7.6.1	Einflussgrößen für GPC mit direkter Kalibration	255
7.6.1.1	Einfluss der Kalibration	255
7.6.1.2	Einfluss der Geräteeigenschaften (Geräteperformance)	259
7.6.1.3	Einfluss der Auswerteparameter	260
7.6.2	Einflussgrößen für GPC mit Lichtstredetektion	262
7.6.3	Vergleichspräzision und Wiederholbarkeit von GPC-Analysen	265
7.7	Zusammenfassung	265
	<i>Literatur</i>	266
8	Auswertung in der LC-MS-Kopplung	267
	<i>Hartmut Kirchherr</i>	
8.1	Einleitung	267
8.2	Chromatographie und Matrixeinfluss	268
8.3	Interne Standards	276
8.4	Einstellungen Massenspektrometer	280
8.5	Auswertesoftware	282
	<i>Literatur</i>	283

Teil III Anforderungen an und Umgang mit chromatographischen Daten aus Sicht von Organisationen und Behörden 285

9 Beurteilung von analytischen Daten in der Lebensmittelanalytik 287
Herbert Otteneder

- 9.1 Aufgaben der Behörde 287
- 9.2 Problembereiche 287
 - 9.2.1 Pflanzenschutzmittelrückstände 289
 - 9.2.1.1 In-house-Qualitätskontrolle (= IQC: *Internal Quality Control*) 292
 - 9.2.1.2 Laborvergleichsuntersuchung (LVU), *Proficiency Test* 292
 - 9.2.1.3 Validierungsstudie (*Method Performance Study*) 293
 - 9.2.2 Schadstoffe, Kontaminanten und Mykotoxine 294
 - 9.2.3 Pharmakologisch wirksame Stoffe 295
- 9.3 Definition und Bestimmung der Messunsicherheit 297
 - 9.3.1 Analyse der Einzelkomponenten, „bottom-up“-Prinzip 297
 - 9.3.2 Berechnung aus der Vergleichsstandardabweichung, „top down“-Prinzip 298
 - 9.3.3 Berechnung mit der Horwitz-Gleichung 298
 - 9.3.4 Der „Tauglichkeits“-Ansatz 299
 - 9.3.5 Ergebnis-Interpretation mit Hilfe der Messunsicherheit 299
- 9.4 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze 300
- 9.5 Das Problem der Wiederfindung 303
- 9.6 Die Probennahme 306
- 9.7 Nationale und internationale Leitlinien und Gremien zur Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie 309
Literatur 312

10 Beurteilung von analytischen Daten aus Behördensicht – Regelarbeitsweise und AQS für selten angewandte und zeitaufwändige Analysenverfahren 315
Günter Papke

- 10.1 Einleitung 315
- 10.2 Werkzeuge und Definitionen für die AQS 316
 - 10.2.1 Kontrollproben 316
 - 10.2.2 Kontrollkarten/Zielwertkarten 316
 - 10.2.3 Objektbezogene AQS 320
 - 10.2.4 Stichproben-AQS 320
 - 10.2.5 Stellvertreterproben-AQS 320
 - 10.2.6 Validierung von Analysenverfahren 320
 - 10.2.7 Messunsicherheit 323
 - 10.2.8 Zusammengefasste AQS-Werkzeuge 324
- 10.3 Praxis der AQS 328
 - 10.3.1 Hierarchisch aufgebaute AQS 328
 - 10.3.2 Praxis bei selten angewandten und zeitaufwändigen Analysenverfahren 330

- 10.3.2.1 AQS-Vorgehensweise für selten angewandte Analysenverfahren 331
- 10.3.2.2 AQS-Vorgehensweise für zeitaufwändige Analysenverfahren 333
- 10.4 Beurteilung der Analysenergebnisse 336
- 10.5 Fazit und Ausblick 337
 - Literatur* 338

- 11 Auswertung Chromatographischer Daten nach den Arzneibüchern – Kontrolle von Verunreinigungen 339**
 - Ulrich Rose*
 - 11.1 Problemstellung 339
 - 11.2 Auswertung qualitativer Daten 340
 - 11.2.1 Systemeignungstest 343
 - 11.3 Auswertung quantitativer Daten 345
 - Literatur* 347

- 12 Anforderungen an analytische Prüfverfahren im Rahmen der Arzneimittelzulassung 349**
 - Susanne Keitel*
 - 12.1 Einführung 349
 - 12.2 Beschreibung chromatographischer Prüfverfahren im Zulassungsdossier 349
 - 12.3 Arzneibuchverfahren 352
 - 12.4 Anforderungen an die Validierung und Bewertung durch die Zulassungsbehörde 355
 - 12.5 Anforderungen der Zulassungsbehörde im Rahmen von Anträgen auf Genehmigung klinischer Prüfungen 360
 - 12.5.1 Häufige Mängel 361
 - 12.5.2 Spezielle Mängel 361
 - 12.5.3 Fallbeispiele 362
 - Literatur* 364

- 13 Anforderungen an (chromatographische) Daten in der pharmazeutischen Analytik 365**
 - Joachim Ermer*
 - 13.1 Systemeignungstests 365
 - 13.1.1 Europäisches Arzneibuch (EP) 367
 - 13.1.1.1 Chromatographische Parameter 369
 - 13.1.1.2 Signal/Rausch-Verhältnis 370
 - 13.1.1.3 Systempräzision 371
 - 13.1.2 US-Arzneibuch 373
 - 13.1.3 FDA Reviewer Guidance 374
 - 13.2 Spezifikationsgrenzen und Präzision 375
 - 13.2.1 Gehaltsbestimmungen 375
 - 13.2.1.1 Auf Grundlage des Methodenfähigkeitsindex 375
 - 13.2.1.2 Auf Grundlage des 95-%-Prognosebereiches (DPhG-Verfahren) 376

13.2.2	Nebenproduktbestimmungen	377
13.2.3	(Be)Merkenwertes	378
13.3	Interpretation und Behandlung analytischer Daten	378
13.3.1	Voraussetzungen	378
13.3.2	Messprinzipien und Variabilität	378
13.3.3	Ausreißer	379
13.3.4	Vergleich von Analysenergebnissen	380
13.3.5	Präzision	380
13.3.6	Richtigkeit	382
13.3.7	(Be)Merkenwertes	383
	<i>Literatur</i>	384
14	Über Bewertung und Wertung chromatographischer Daten	385
	<i>Stavros Kromidas</i>	
14.1	Einleitung	385
14.2	Die Situation – oder warum ändert sich so wenig?	385
14.3	Wie kann sich etwas ändern und wann ist es überhaupt notwendig?	387
14.4	Wer kann etwas ändern?	390
	Stichwortverzeichnis	393

Vorwort

In der Chromatographie liegt der Fokus auf der Probenvorbereitung und der Trennung selbst. Das ist auch gut so, denn eine schlechte Trennung ist im Nachhinein nicht „reparierbar“. Wir haben allerdings den Eindruck gewonnen, dass im Alltagsstress der anschließenden Auswertung und auch der Bewertung der Ergebnisse nicht immer mit der gebührenden Vorsicht begegnet wird. Man verlässt sich gerne auf die Auswerteprogramme – schließlich ist ja die Integrationssoftware validiert und dies wird per Hersteller-Zertifikat „belegt“. Dass sich die Integrationsalgorithmen seit 30 Jahren nur unwesentlich geändert haben und dass z. B. die Fläche verschmolzener Peaks stets per Lotfällung bestimmt wird, wird kaum als Problem registriert. Auch reduziert sich die Bewertung der Ergebnisse oft auf die Frage: „Passt der VK und ist mein Wert „in spec“?“. Das mag manchmal ausreichen, manchmal aber auch nicht.

Wir möchten uns in diesem Buch z.B. mit den folgenden Fragen beschäftigen: „Wie „richtig“ integrieren eigentlich kommerzielle Systeme?“, „Kann man dies überhaupt überprüfen?“, „Wie wichtig sind Einstellparameter, was bewirken sie?“ usw. Wir wollten uns aber auch mit Fragen auseinandersetzen, wie: „Wie kann ich ein Ergebnis wirklich beurteilen?“, „Wie wahrhaftig kann ein Ergebnis sein?“ und schließlich: „Was sagt „die Behörde“ dazu, was muss ich tun, wo bin ich frei?“. Dazu haben wir erfahrene Kollegen eingeladen, die ihr Wissen in diversen Bereichen zur Verfügung gestellt haben. Diesen Kollegen gilt unser herzlicher Dank.

Das Ziel des Buches ist es, zum einen aufzuzeigen, dass man Auswertesystemen vielleicht nicht immer blind vertrauen sollte und dass es sich lohnt, ein tieferes Verständnis für das Integrieren zu entwickeln. Zum anderen einen Beitrag zu leisten, wie chromatographische Ergebnisse kritisch hinterfragt werden können, vor allem wenn es um brisante quantitative Aussagen geht. Wir hoffen, dem Leser möglichst viele Anregungen und Ideen zu geben, die eigene „richtige“ Auswerte- und Bewertungspraxis zu finden. Dem Verlag WILEY-VCH und insbesondere Frank Weinreich und Steffen Pauly danken wir für die sehr gute Zusammenarbeit.

Saarbrücken und München
Januar 2008

Stavros Kromidas
Hans-Joachim Kuss

Autorenliste

Prof. Dr. Werner Engewald

Fakultät für Chemie und Mineralogie
Institut für Analytische Chemie
Universität Leipzig
Linnestraße 3
04103 Leipzig

Dr. Joachim Ermer

Paul-Sieben-Weg 12
64625 Bensheim/Auerbach

Dr. Daniela Held

PSS GmbH
Postfach 3368
55023 Mainz

Dr. Heiko Herrmann

Dionex GmbH
Am Wörtzgarten 10
65510 Idstein

Dr. Detlev Jensen

Dionex GmbH
Am Wörtzgarten 10
65510 Idstein

Dr. Susanne Keitel

26 rue Schweighaeuser
67000 Strasbourg
Frankreich

Peter Kilz

PSS GmbH
Postfach 3368
55023 Mainz

Dr. Hartmut Kirchherr

Medizinisches Labor Bremen
Haferwende 12
28357 Bremen

Dr. Stavros Kromidas

Rosenstraße 16
66125 Saarbrücken

Dr. Hans-Joachim Kuss

Psychiatrische Klinik der
Ludwig-Maximilians-Universität
Nussbaumstraße 7
80336 München

Dr. Herbert Otteneder

Louvecienner Weg 4
88709 Meersburg

Prof. Ulrich Panne

Richard-Willstätter-Straße 11
12489 Berlin

Prof. Dr. Günter Papke

Fachhochschule Wiesbaden
Studienbereich Umwelttechnik
und Dienstleistung
Am Brückweg 26
65428 Rüsselsheim

Dr. Ulrich Rose

Ludwig-Trick-Straße 35
77694 Kehl

Daniel Stauffer

Traugott-Meyer-Straße 7
4147 Aesch
Schweiz

Zum Aufbau des Buches

Das Buch besteht aus drei Teilen.

Teil I: Grundsätzliches zur Auswertung und Bewertung von chromatographischen Daten

Im Teil I wird dargestellt, wie chromatographische Daten erzeugt sowie Ergebnisse bewertet werden können. Im Kapitel 1 (Daniel Stauffer) wird dargelegt, wie überhaupt ein Chromatogramm entsteht und welche Faktoren die Peakform, die Peakhöhe und die Peakfläche beeinflussen. Ferner wird auf die Einstellparameter bei der Integration eingegangen. Kapitel 2 (Hans-Joachim Kuss) widmet sich schwerpunktmäßig der Integration. Es wird der Frage nachgegangen, wie „richtig“ eigentlich kommerzielle Auswerteprogramme integrieren (können). Ferner wird anhand zahlreicher Beispiele eine Möglichkeit aufgezeigt, wie dies überprüft werden kann. Schließlich wird der Einsatz der gewichteten Regression erklärt und diskutiert. Die allgemeinen Kriterien zur Beurteilung von analytischen Daten werden im Kapitel 3 (Joachim Ermer) systematisch vorgestellt und kritisch hinterfragt. Teil I wird mit Kapitel 4 beendet, in dem die metrologischen Aspekte der Beurteilung von analytischen Daten mit einer detaillierten Diskussion der Messunsicherheit behandelt werden (Ulrich Panne).

Teil II: Die Charakteristika der Auswertung in einzelnen LC-Modi

Im Teil II wird auf Spezifika in folgenden chromatographischen Techniken eingegangen, Spezifika, die bei der Auswertung, aber auch bei der Beurteilung von chromatographischen Ergebnissen, berücksichtigt werden sollten: Gaschromatographie (Werner Engewald), Ionenchromatographie (Heiko Herrmann und Detlef Jensen), Gelpermeationschromatographie (Daniela Held und Peter Kilz) und LC-MS-Kopplung (Hartmut Kirchherr).

Teil III: Anforderungen an und Umgang mit chromatographischen Daten aus Sicht von Organisationen und Behörden

Im Teil 3 werden die Anforderungen seitens Organisationen/Behörden an chromatographische Daten dargestellt – sowohl das Formale als auch das Inhaltliche betreffend. Hier kommen die am stärksten reglementierten Bereiche zur Spra-

che: Lebensmittel, Umwelt, Pharma. Im ersten Kapitel 9 (Herbert Otteneder) werden die Anforderungen an die Beurteilung von analytisch/chromatographischen Daten in der Lebensmittelindustrie beleuchtet. Günter Papke stellt im Kapitel 10 die Vorgaben eines Landesuntersuchungsamtes für den Umgang mit analytischen Daten dar. Der am stärksten reglementierte Bereich ist gewiss Pharma. Die Anforderungen dort werden aus dreierlei Blickwinkeln erläutert: aus Sicht eines Angehörigen des EU-Direktoriats (Ulrich Rose, Kapitel 11), aus Sicht der nationalen Behörde BPharm (Susanne Keitel, Kapitel 12) und aus Sicht der Pharmaindustrie (Joachim Ermer, Kapitel 13). Statt eines Nachwortes wird im abschließenden Kapitel 14 (Stavros Kromidas) kurz der alltägliche Umgang mit Zahlenwerten diskutiert.

Die einzelnen Kapitel wurden so verfasst, dass sie abgeschlossene Module darstellen, ein „Springen“ ist jederzeit möglich. Dadurch wurde versucht, dem Charakter des Buches als Nachschlagwerk gerecht zu werden. Es ist das Anliegen der Herausgeber, ein Ideenbuch vorzustellen mit möglichst vielen Anregungen, eigene Lösungen zu finden. Deshalb wurden abweichende Auffassungen der Autoren zu einem Thema akzeptiert, auch manche Wiederholung wurde in Kauf genommen, um die Harmonie im textlichen Kontext nicht zu beeinträchtigen. Der Leser möge von der unterschiedlichen Darstellung des Themas und der individuellen Gewichtung der Autoren profitieren.

Teil I

Auswertung in der Chromatographie – die Integration

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.

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 gleichartige Moleküle leicht unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten. Dieser unerwünschte Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit wird als *Effizienz* (s. Abb. 1.2) des chroma-

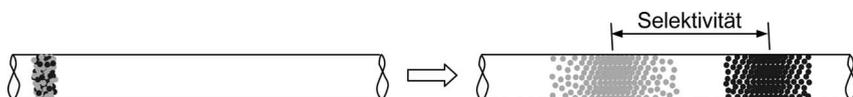


Abb. 1.1 Unterschiedliche Arten von Molekülen wandern unterschiedlich schnell. Dieser gewünschte Unterschied der Wanderungsgeschwindigkeiten wird als Selektivität des chromatographischen Systems bezeichnet.

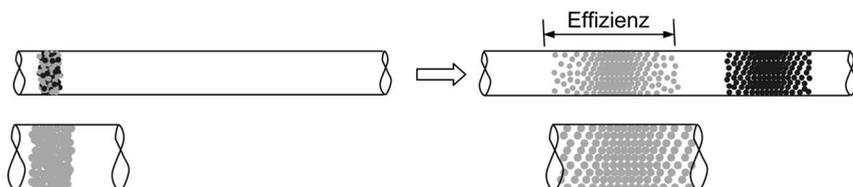


Abb. 1.2 Auch gleichartige Moleküle haben infolge von Eddy-Diffusion, Längsdiffusion und Massenaustauschverzögerung leicht unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten, was zu Bandenverbreiterung führt (= Effizienz des chromatographischen Systems).

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

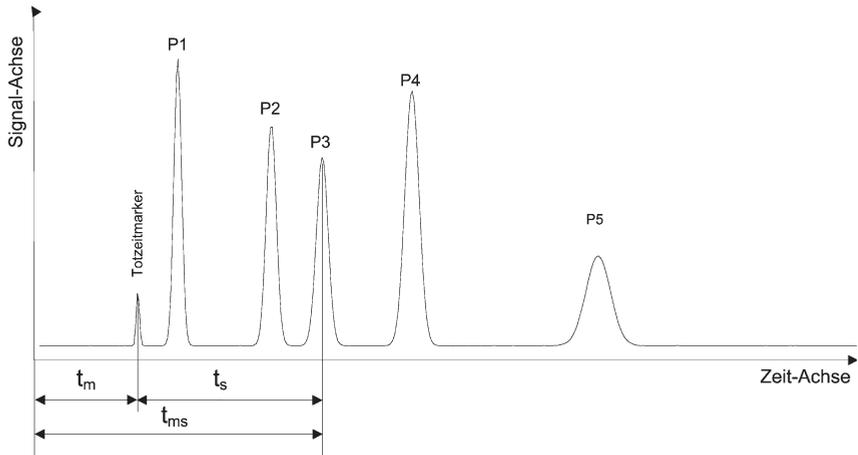


Abb. 1.3 Totzeit und Brutto- resp. Nettoretentionszeit von Peak Nr. 3.
 t_m = Totzeit, t_s = Nettoretentionszeit, t_{ms} = Bruttorentionszeit.

1.2.1.3 Nettoretentionszeit (t_s)

Die Nettoretentionszeit sagt aus, wie lange sich eine Probenkomponente 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} = Bruttorentionszeit.

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} = Bruttorentionszeit.

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).

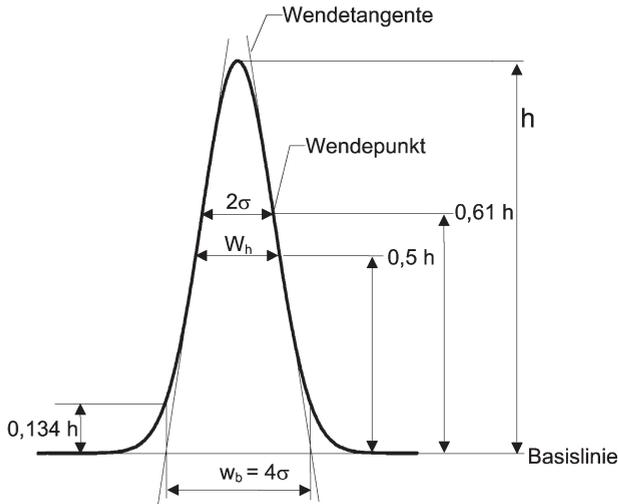


Abb. 1.4 Die Basispeakbreite (w_b) und die Peakbreite in halber Höhe ($b_{0,5}$). Bei idealen Peaks befindet sich die Basispeakbreite in 13,4% der Peakhöhe.

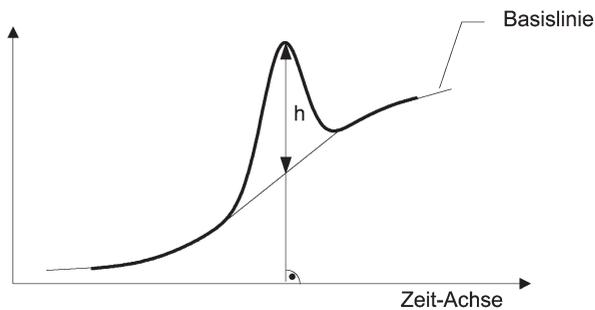


Abb. 1.5 Die Peakhöhe wird von der Peakspitze bis zur Basislinie gemessen.

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).

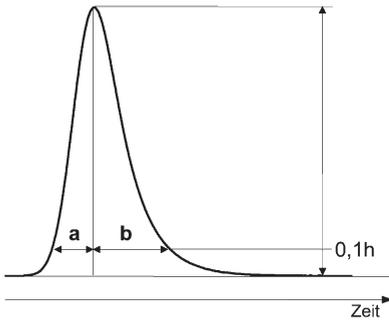


Abb. 1.6 Die Peaksymmetrie wird in 10% (5%) der Peakhöhe gemessen, wobei a die „halbe“ Peakbreite der aufsteigenden und b der absteigenden Peakseite bezeichnet.

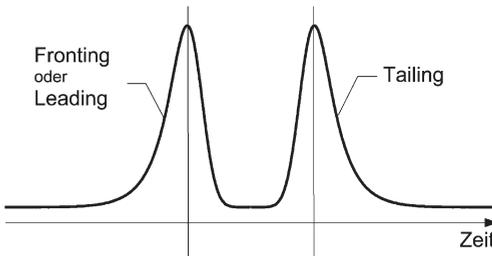


Abb. 1.7 Peakleading und Peaktailing. In der Praxis kommt das Peaktailing viel öfter vor als das Leading. Aufgepasst: In vielen Publikationen findet man Chromatogramme, bei welchen die Zeitachse von links nach rechts verläuft, weil zur Aufzeichnung des Chromatogramms z. B. ein Kompensationschreiber verwendet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

Auflösungsgrößen

1.2.3.1 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).

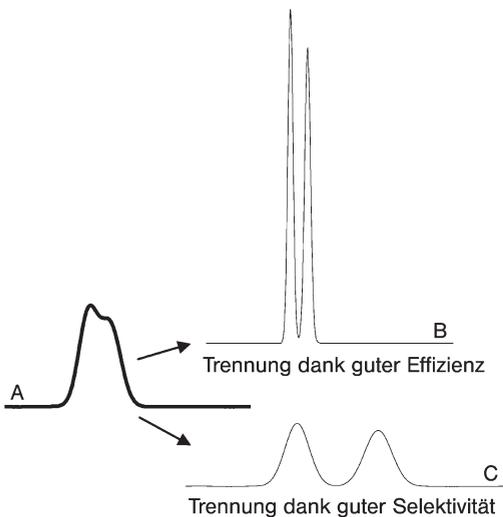


Abb. 1.8 Unaufgelöste Peaks (a) können getrennt werden durch: Vergrößern der Effizienz des Trennsystems (b) oder Vergrößern der Selektivität (c).

■ **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.