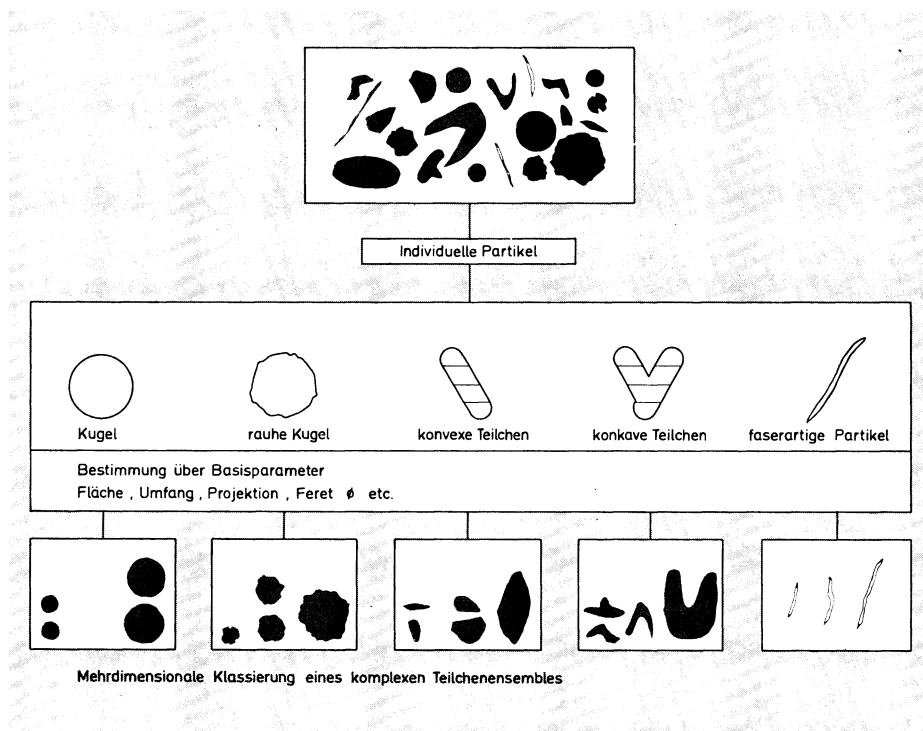
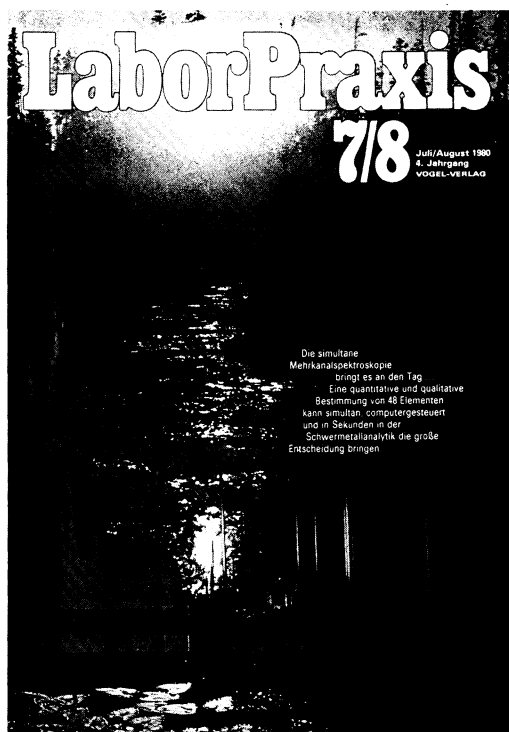


LaborPraxis

Forschung, Entwicklung und Kontrolle



Wie wichtig eine exakte und schnelle Schwermetallbestimmung in Oberflächenwässern ist, zeigt das Titelbild und der Beitrag Einsatz der simultanen ICP-AES in der Wasseranalytik. Die Qualitätsmerkmale der hier vorgestellten ICP-Atomemissionsspektrometrie sind im Allgemeinen die der Flammen-AAS-Technik. Die Analysengeschwindigkeit bei der ICP-AES beträgt jedoch nur wenige Sekunden. In dieser Zeit können bis zu 48 Elemente qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die Themen Störungen bei der Aerosolbildung, spektrale Interferenzen und richtige Auswahl der Analysenkanäle werden genauso durchleuchtet wie der praktische Anwendungsbereich bei Schwermetallkonzentrationen im Wasser (Spectroscania GmbH, 8036 Herrsching). **Seite 18**



Sie lesen

| | |
|----------------------|----|
| Editorial | 3 |
| Messen und Kongresse | 6 |
| Weiterbildung | 9 |
| Neue Bücher | 11 |
| Firmschriften | 12 |
| Aus der Wirtschaft | 14 |

Fachbeiträge

| | |
|--|----|
| <i>Dr. H.-J. Hoffmann, München:</i> Einsatz der simultanen ICP-AES in der Wasseranalytik | 18 |
| <i>P. Broske, Lippstadt:</i> Systematische Untersuchungen von AAS-Analysen bei Kupfer | 26 |
| <i>Dr. E. Bentz, Wetzlar:</i> Partikelmeßtechnik als Einsatzgebiet der automatischen Bildanalyse | 30 |
| <i>Dr. H. Scheer, München:</i> Empfindliche und flexible Kopplung von HPLC und AS | 34 |
| <i>Dr. R. Kaiser und R. Rieder, Bad Dürkheim:</i> Richtigkeit in der Chromatographie? — Stand der instrumentellen HPTLC — | 40 |
| <i>B. Pol, Stuttgart:</i> Programmieren in BASIC (Serie: Folge 4) | 51 |
| Produktinformationen | |
| TiPs = Technisch industrielle Problemlösung | 56 |
| Produkte | 68 |
| Laborhilfsmittel | 85 |
| Inserentenverzeichnis | 86 |
| Impressum | 86 |
| Supplement »Management-Wissen« | 87 |
| Leserdienstkarten am Schluß des Heftes | |

Empfindliche und flexible Kopplung von HPLC und AS

Zur Identifizierung von einzelnen Fraktionen bei der Hochdruckflüssigkeitschromatografie eignet sich die Kopplung mit der Absorptionsspektroskopie. Es wird beschrieben, wie man einen Absorptionsdetektor mit variabler Wellenlänge mittels eines Kleinrechners mit integriertem Schreiber und Plattenspeicher zu einem empfindlichen Spektralphotometer ausbauen kann, welches die

Spektroskopie direkt am Säulenausgang ermöglicht. Einige Kriterien für die Auswahl der Komponenten zum Erreichen einer hohen Empfindlichkeit werden diskutiert. Es werden Anwendungsbeispiele aus dem Gebiet der Photosynthesepigmente gezeigt, darunter die Anwendung der Derivativspektroskopie zur spektroskopischen Auflösung überlagerter Peaks im Chromatogramm.

Hugo Scheer*

Günter Rauscher*

Einleitung

Die Analytik schwerflüchtiger Substanzen hat sich durch die Entwicklung der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) entscheidend verbessert. Damit kombinierte selektive und positive Identifizierungsmethoden sind jedoch nur schleppend dieser Entwicklung gefolgt. Die überwiegende Zahl der HPCL-Systeme verwendet einen von drei Standard-Detektoren, welche entweder die Absorption, die Fluoreszenz oder den Brechungsindex des Eluats mit hoher bis höchster Empfindlichkeit registrieren. Diese Detektoren liefern eine eindimensionale Information: Die jeweilige Meßgröße wird über die Zeit verfolgt, und die einzige, naturgemäß begrenzte Information zur Identifizierung einer Substanz ist, neben der Retentionszeit, daß die Substanz bei der gewählten Wellenlänge absorbiert bzw. fluoresziert. Der erste Schritt in eine zweiten Dimension ergibt sich, wenn z.B. die Absorption bei mehreren Wellenlängen gleichzeitig verfolgt wird und, gegebenenfalls, das Extinktionsverhältnis registriert wird. So absorbieren z.B. Chlorophylle der a-Serie maximal bei etwa 670 und 435 nm, ihre metallfreien Analoga, die Phäophytine, jedoch bei 670 und 410 nm. Bei einer entsprechenden

Wahl eines Wellenlängenpaares lassen sich diese beiden Substanzenklassen befriedigend diskriminieren. Wesentlich sicherer für die positive Identifizierung bestimmter Banden im Chromatogramm ist die Kopplung mit einer spektroskopischen Technik, d.h. im obigen Fall die Registrierung des gesamten Absorptionsspektrums. Man bekommt auf diese Weise ein zweidimensionales Muster, in der einen Dimension wiederum die Retentionszeit, in der anderen die spektroskopische Information an ausgewählten Punkten auf der Zeitskala.

Die wohl aussagekräftigste und zur Zeit am besten entwickelte Technik dieser Art ist die Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektroskopie (GC-MS), welche jedoch flüchtige Substanzen bzw. flüchtige Derivate voraussetzt. Versuche einer Kopplung von HPLC mit der Massenspektroskopie sind bisher durch die Vakuumtechnik und die Physik der Verdampfung begrenzt. Massenspektrometer benötigen im Analysator Hochvakuum. Dazu muß die mobile Chromatographie-Phase mit ausreichender Geschwindigkeit abgepumpt werden, mit möglichst geringen Verlusten der zu analysierenden Substanz. Dies gelingt befriedigend nur mit Gasen, aber noch nicht mit Flüssigkeiten als mobiler Phase [1].

Als neue Technik wurde vor kurzem die NMR-Spektroskopie zur Kopplung mit HPLC vorgeschlagen, aber diese Technik ist durch die Schwierigkeiten bei protonenhaltigen Lösungsmitteln und durch geringe Empfindlichkeit noch sehr begrenzt [2]. Eine dritte Möglichkeit ist die Kopplung mit der Absorptionsspektroskopie. Sie ist prinzipiell für alle Substanzen mit Absorptionen oberhalb etwa

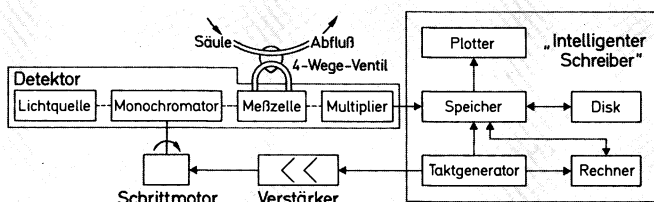
200 nm geeignet, bei Verwendung von geeigneten Derivatisierungsverfahren vor oder am Ende der Säule [3] auch für eine Vielzahl anderer Trennprobleme. Die Technik erfordert ein registrierendes Spektralphotometer als Detektor. In dieser Arbeit soll beschrieben werden, wie ein kommerzieller HPLC-Detektor mit variabler Wellenlänge für diesen Zweck mit einem ebenfalls kommerziellen „intelligenten Schreiber“ gekoppelt werden kann. Die dargestellte Lösung stellt einen Kompromiß zwischen Zeit- und Kostenaufwand einerseits und der erreichbaren Empfindlichkeit andererseits dar [4].

Methode

Die verwendete Apparatur ist schematisch in Bild 1 dargestellt. Verwendet wurde ein Doppelstrahl-Detektor mit variabler Wellenlänge von 200 bis 750 nm (Latek, Modell LDC II), welcher zusätzlich mit einem Wellenlängenantrieb durch einen Schrittmotor ausgerüstet wurde, und ein Kleinrechner mit integriertem x-y-Schreiber und Plattenspeicher (Bryans Modell BS 8000). Letzterer diente auch als Taktgenerator für den Schrittmotor, wobei ein Verstärker zwischengeschaltet wurde. Zur Unterdrückung von hochfrequentem Rauschen im Ausgangssignal wurde ein low-pass-Filter vor den Eingang des Rechners geschaltet. In der verwendeten Konfiguration können gleichzeitig bis zu 8 Detektoren angeschlossen werden. Zwischen Säulenausgang, Detektor und Abfluß wurde ein manuell betriebenes Vierwegeventil eingebaut, mit dem der Peak im Detektor „gefangen“ werden kann (Fangstellung siehe Bild 1).

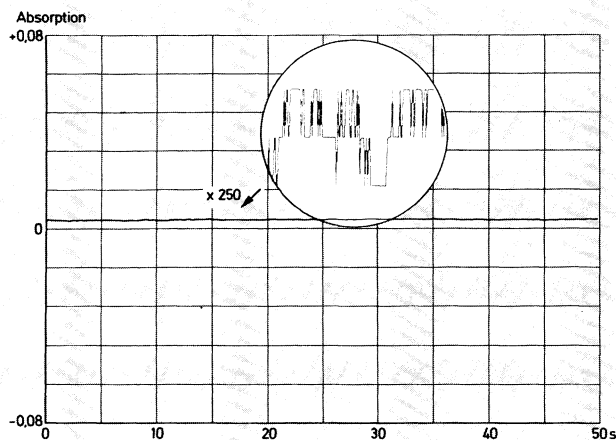
Spezifikationen

Wesentlich für das Erreichen einer hohen Empfindlichkeit ist neben einem rauscharmen Detektor vor allem das Verhältnis von Nichtlinearität der Detektor-Basislinie zur vertikalen Auflösung des Rechners. Am Eingang des Rechners wird das Signal vom Detektor, im allgemeinen eine kontinuierlich variable Spannung von 0 bis 10 bis 100 mV, digitalisiert, d.h. in diskrete Werte aufgelöst. Eine Kurve wird so in eine Treppe umgewandelt, und eine Grundlinie mit leichtem Rauschen (Bild 2, nachfolgende Seite) ergibt bei entsprechender Vergrößerung das im Kreis gezeigte Bild, bei dem die vertikalen Ausschläge sich nur um bestimmte Beträge bzw. ein Vielfaches davon ändern. Die Zahl der verfügbaren Stufen, die sogenannte Wortlänge des Rechners, bestimmt das vertikale Auflösungsvermögen. Es ist im allgemei-

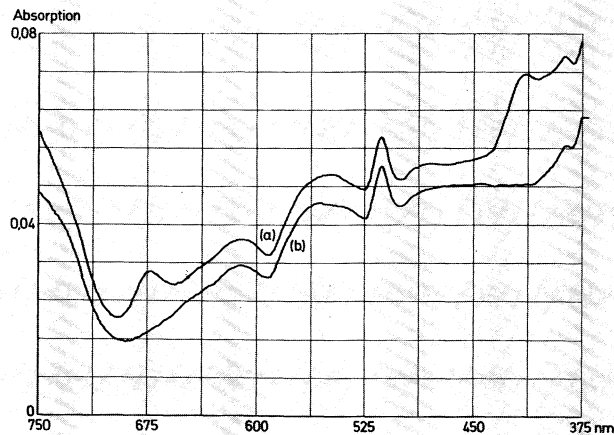


1 Schema der Apparatur. In der gezeigten Stellung des Vierwegeventils ist das Eluat im Detektor gefangen.

*Dr. H. Scheer und G. Rauscher, Botanisches Institut der Universität München, Menzinger Str. 67, 8000 München 19



2 Grundlinie des Detektors bei stehender Wellenlänge, 0,32 Absorptionseinheiten Vollausschlag. Der eingekreiste Bereich ist ein vertikal um den Faktor 250 gespreizter Ausschnitt, Originalplot.



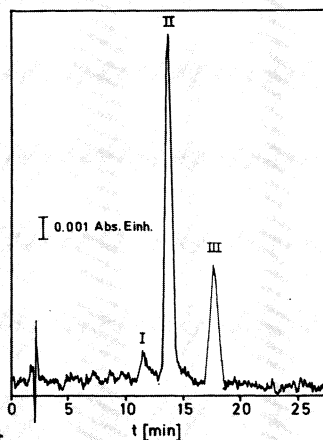
3 a) Grundlinie des Detektors im Bereich 750 bis 375 nm, Empfindlichkeit: $E = 0,08$ für Vollausschlag, Originalplot.
b) Unkorrigiertes Spektrum (rohe Daten) des Peaks III von Bild 4, Meßbereich wie bei 3a. Die Zeit zur Aufnahme des Spektrums betrug 51,2 s. Für die Differenzbildung ist das gesamte Spektrum um 5% Vollausschlag angehoben. Originalplot.

nen eine Potenz von zwei, wobei der Exponent die Dimension (bit) hat. Die verwendete Apparatur digitalisiert mit 12 bit, d.h., sie hat $2^{12} = 4096$ Stufen für die Bewertung des Eingangssignals, wobei „null“ dem Minimal- 4095 dem Maximalausschlag zugeordnet werden. Nimmt man an, daß eine signifikante Bande selbst bei minimalem Rauschen wie in Bild 2 mindestens 20 „Stufen“ hoch sein sollte, so bedeutet das eine minimale Höhe von 0,5% des Vollausschlags am Detektor. Je kleiner man den Vollausschlag wählt, d.h. je höher die Empfindlichkeit des Detektors, desto kleinere Banden könnten demnach im Prinzip nachgewiesen werden.

Die maximale Empfindlichkeit wird jedoch durch zwei Faktoren begrenzt. Der eine ist das Detektorrauschen, welches bei einem guten Detektor ($\leq 0,0003$ Absorptionseinheiten je nach Wellenlängenbereich) gegenüber dem zweiten Faktor, der Nichtlinearität der Basislinie vernachlässigt werden kann. Da HPLC-Detektoren auf höchste Empfindlichkeit ausgelegt sind, zeigt die Basislinie über größere Wellenlängenbereiche selbst bei Doppelstrahlgeräten nicht unerhebliche Nichtlinearitäten. Bild 3 zeigt die Basislinie des Detektors im Bereich von 750–375 nm. Die maximalen und minimalen Werte differieren um 0,05 Extinktionseinheiten. Dies entspricht der maximal wählbaren Empfindlichkeit, da bei einer größeren Empfindlichkeit bereits die Basislinie des Spektrometers den Meßbereich überschreiten würde. Der im vorliegenden Fall gewählte Bereich trägt zur Sicherheit 0 bis 0,08 Extinktionseinheiten. In Verbindung mit der Wortlänge, in diesem Fall 12 bit, des Rechners bedeutet dies theoretisch eine minimale Peakhöhe von 0,0004, praktisch werden abhängig vom Wellenlängenbereich und der Scangeschwindigkeit etwa 0,001 erreicht.

Auch das spektrale Auflösungsvermögen wird durch die Speicherkapazität bestimmt, ist aber in Anbetracht der breiten Banden gelöster Substanzen weniger kritisch. Die in Bild 3a gezeigte Grundlinie wurde auf $3 \times 512 = 1536$ Speicher-

plätzen aufgenommen. Das entspricht etwa 4 Speicherplätzen pro nm und ist für die meisten Fälle mehr als ausreichend. Die spektrale Reproduzierbarkeit wird vor allem mechanisch durch den Schrittmotor und den Wellenlängenantrieb limitiert und liegt bei 1 bis 2 nm. Die Zeit für den Durchlauf eines Spektrums hängt neben dem gewünschten Wellenlängenbereich von der Dämpfung des Detektors ab. Da HPLC-Peaks selten Halbwertbreiten unter 10 Sekunden haben, sind die Detektoren verhältnismäßig stark gedämpft. Bei zu hohen Scangeschwindigkeiten führt dies zu Verzerrungen, welche bei der anschließenden Differenzbildung (s.u.) die Empfindlichkeit verringern. Da die steilsten Flanken im allgemeinen durch die Basislinie und nicht durch die eigentlichen Absorptionsbanden bedingt sind (Bild 3), bestimmt die Güte der Basislinie die maximale Scangeschwindigkeit. Die abgebildeten Spektren wurden mit 0,2 s/nm aufgenommen, aber 0,1 s/nm sind noch vertretbar. Falls nur ein enger Spektralbereich interessiert, kann unter diesen Bedingungen auch das fließende Eluat vermessen werden.



4 HPLC-Chromatogramm von zwei Chlorophyll-Derivaten. Säule RP-8 Nucleosil 10 μ m, Eluens: Methanol/Wasser = 95 : 5 1,5 ml/min; Detektor: 667 nm. Die Spektren von Bild 3 und 5 sind im Maximum vom Peak III ($T_{Ret} = 17,5$ min) gemessen.

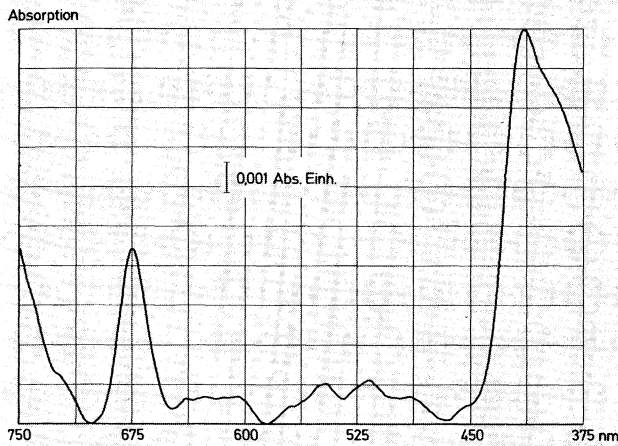
Messung

Zur Messung des Spektrums über einen größeren Bereich wird ein Peak mittels des Vierwegventils im Detektor gefangen; wahlweise kann der Fluß gestoppt werden oder, falls nur ein Peak interessiert, das restliche Eluat während der Messung am Detektor vorbeigeleitet werden. Die „rohen“ Spektren können abgespeichert und später verrechnet werden. Wenn kein steiler Gradient gefahren wird, genügt die Aufnahme einer Basislinie für alle Spektren. Voraussetzung dafür ist, daß alle Spektren und die Basislinie unter identischen Bedingungen aufgenommen werden. Bild 3a zeigt die Basislinie und 3b das „rohe“ Spektrum der Bande III im Chromatogramm in Bild 4. Das korrigierte Spektrum (Bild 5, nächste Seite) wird durch Differenzbildung von 3b und 3a, gegebenenfalls mehrmalige 5-Punkt-Mittelwertbildung (zur Rauschunterdrückung) und Normierung erhalten. Es weist die Substanz eindeutig als ein Phäophytin der α -Serie aus, zusammen mit der Retentionszeit ermöglichte dies die Identifizierung als Pyrophäophytin a, einem Abbauprodukt von Chlorophyll a.

Derivativspektroskopie

Neben der Identifizierung einer Substanz ist eine Spektrenaufnahme auch dann wichtig, wenn bei quantitativen Analysen mit überlagernden Peaks im Chromatogramm gerechnet werden muß. Sind die Absorptionsbanden in den Spektren der überlagerten Substanzen ausreichend getrennt, ist das Problem trivial. Bei Substanzen mit breiten, überlagerten Absorptionsbanden reicht jedoch unter Umständen die einfache Absorptionsspektroskopie nicht mehr zur Identifizierung und Quantifizierung aus. Ein Ausweg daraus ist die häufig sehr aufwendige Verbesserung der chromatographischen Trennung, ein zweiter ist die rechnerische Trennung der Absorptionsbanden durch Derivativspektroskopie. Dazu wird nach Erhalt des korrigierten Spektrums seine zweite, eventuell auch

Weitere Informationen über Kennziffer 25 ▶

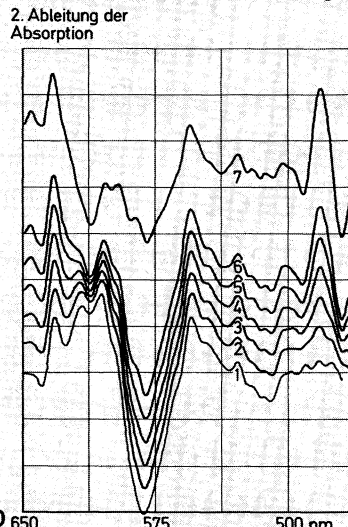
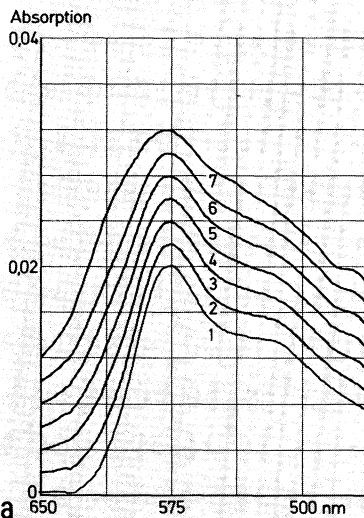


5 Korrigiertes Spektrum von Peak III aus Bild 4, erhalten durch Differenzbildung von 3b und 3a, Glätten und Normieren. Originalplot.

Fazit:

Die geschilderten Beispiele zeigen die Auswahlkriterien für den Ausbau von HPLC-Detektoren zu empfindlichen, registrierenden Photometern, und ihre Anwendungsmöglichkeiten bei der Identifizierung und Analyse von HPLC-Peaks durch die Kopplung. Der Vorteil der beschriebenen Kopplung ist die große Flexibilität des Systems bei wechselnden Problemstellungen. Der Nachteil ist zur Zeit noch, daß abgesehen von Ausnahmefällen nicht im fließenden Eluat gemessen wird. Wesentlich für eine Verbesserung ist eine möglichst geringe Trägheit des Detektionssystems, da die Rechner Scanzeiten von <2 Sekunden und entsprechend schnelles Speichern zulassen.

Die verwendete Kopplung ist erheblich teurer als ein HPLC-Detektor mit eingebauter Spektren-Scan-Einrichtung. Sie erfordert jedoch keine Kompromisse bei der Auswahl des Detektors und ist bei geeigneter Wahl des Rechners wesentlich empfindlicher. Da der Rechner getrennt ist, läßt er sich auch jederzeit oder sogar gleichzeitig auch für andere Probleme einsetzen. Eine wichtige Anwendung bei der Chromatographie ist die Integration von Chromatogrammen, oder in Zusammenhang mit registrierenden Spektralphotometern sind Differenz- und Derivativspektroskopie und kinetische Analysen möglich.



6a a) Absorptionsspektren von zwei überlagerten Substanzen. Kurve 1 zeigt die reine Substanz, einen dimeren Gallenfarbstoff A ($\lambda_{max} = 579 \text{ nm}$, E_{max} im Chromatogramm = $0,02 \approx 0,6 \mu\text{M}$). Die Zumischung der zweiten Substanz mit gleichem, aber um 28 nm langwellig verschobenem Spektrum geschah rechnerisch. Die Mischungsverhältnisse A : B sind 2-10 : 1; 3-10 : 2; 4-10 : 3; 5-10 : 4; 6-10 : 5; 7-10 : 10. Originalplots
 6b b) 2. Ableitung der Spektren aus Bild 6a, geglättet und normiert. Die Bezifferung entspricht der in Bild 6a. Originalplots.

geradzahlig höhere Abteilung gerechnet. Dies führt allgemein zu einer Verringerung der Halbwertsbreite, allerdings auch zu zusätzlichen Seitenbanden und verstärktem Rauschen. Bild 6 zeigt ein Beispiel dafür aus dem Bereich der Gallenfarbstoffe, welche sich durch breite, unstrukturierte Banden auszeichnen. Die beiden Dimeren A und B haben gleiche Bandenform und Extinktionskoeffizienten, aber um 28 nm ge-

geneinander verschobene Absorptionsmaxima. Die Zumischung von B macht sich im Absorptionsspektrum nur in einer Bandenverbreiterung bemerkbar, und selbst bei einem 1:1-Mischungsverhältnis erscheint B im Absorptionsspektrum nur als Schulter (Bild 6a). Im 2. Derivat-Spektrum (Bild 6b) sieht man dagegen bereits im „reinen“ A eine geringe Menge B und kann die Zumischung quantitativ verfolgen.

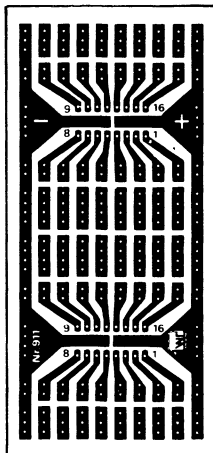
Schrifttum

[1] Für eine Übersicht, siehe z.B.: R. P. W. Scott „Contemporary Liquid Chromatography“, in A. Weissberger (Hergb.) „Techniques of Organic Chemistry“, Bd. XI, Wiley Interscience, New York, 1976
 [2] J. Buddrus, H. Herzog; Material- und Strukturanalyse, April 1980, S. 22
 [3] G. Schwedt, Angew. Chem. 91, 192 (1979)
 [4] Eine potentiell sehr schnelle, aber unempfindlichere Methode ist die Detektion mittels Vidicon-Röhre (vgl. A. McDowell, H. L. Pardue; Anal. Chem. 48, 1815 (1976))

Kennziffer: 416

Weitere im Text genannte Firmen

| Firma | Kennziffer |
|--------|------------|
| Latek | 596 |
| Bryans | 595 |



Lochraster- und Experimentierplatten für den Laboreinsatz

- aus Hartpapier und Epoxyd
- mit und ohne Steckanschlüsse
- zahlreiche Abmessungen auf Lager

Unser weiteres Programm: Kupferbeschichtete Platten aus Hartpapier und Epoxyd, Lochraster- und Lötpunktrasterplatten aus Hartpapier (2,5 und 2,54 mm), Lötleisten, Foto-Positiv-beschichtete Platten u.v.a.m.

Katalog mit Preisliste auf Anforderung oder über Kennziffer



Rademacher – Geräte – Elektronik
 Postfach 101 · 4292 Rhede
 Telefon: (0 28 72) 10 40 · Telex: 8 13 755

