

Die DAD Parameter

Der Einfluss der DAD Parameter auf
Chromatogramm und Spektrum.



Kurze Einführung DAD

Das Ziel der Chromatographie ist es, Substanzen zu trennen und über die Integration der resultierenden Peakflächen eine Quantifizierung möglich zu machen. Neben Trennung und Quantifizierung spielt auch die Identifizierung der Substanzen eine wichtige Rolle. Dabei ist eine einfache Identifikation über die Retentionszeit nicht immer eindeutig, da leichte Veränderungen im System (Temperatur, pH-Wert, Druck) die Trennung beeinflussen können. Veränderte Retentionszeiten erschweren die korrekte Zuordnung.

Um die Identifikation sicherer zu machen, empfiehlt es sich daher, einen Detektor zu wählen, der Spektren aufnehmen kann und dadurch ein substanzspezifisches Identifikationsmerkmal zur Retentionszeit liefert. Der DAD bietet diese Möglichkeit, sodass die Identifikation über das Spektrum erfolgen kann (bei Interesse zu der Einstellung gibt es eine Publikation zum Spektrenabgleich). Wichtig ist dabei, die Qualität der Spektren zu optimieren. Dafür bietet der DAD zahlreiche Parameter, die Einfluss auf die Qualität des Spektrums, aber auch des Chromatogramms nehmen.

Parameter

Die Parameter werden in der Instrumentenmethode eingestellt und beeinflussen somit das Messsignal. Das hat Einfluss auf das Chromatogramm und die Spektren. Die vorgestellten Optionen können daher einerseits zur Optimierung der Spektren genutzt werden, was auch empfohlen wird, wenn Spektrenabgleiche ausgeführt werden sollen. Es ist aber andererseits auch möglich, die Parameter zu optimieren, damit die chromatographische Auflösung verbessert wird. Entscheidend ist das Ziel der Auswertung, welche Optimierung angestrebt werden sollte.



#1 Die Messzelle

Die Messzelle selbst ist eigentlich kein DAD spezifischer Parameter, sondern ein Bauteil, das in veränderten Längen verbaut werden kann. Viele Geräte bieten die Möglichkeit, die Messzelle zu tauschen, sodass mit einer anderen Länge auch ein anderes Probenvolumen gemessen werden kann. Mit einem höheren Probenvolumen steigt auch die Zahl der Moleküle und somit die Interaktion des Lichts, was in einer Verbesserung der Signalintensität resultiert. Der längere Messweg verursacht allerdings auch eine vermehrte Streuung, wodurch das Basislinienrauschen intensiviert wird. Messungen haben ergeben, dass eine Verlängerung der Messzelle um den Faktor X das Signal-zu-Rausch Verhältnis um den Faktor $0.5 \cdot X$ verbessert. Am Beispiel von Messzellen mit den Längen 10 mm und 60 mm verbessert sich das Signal-zu-Rausch Verhältnis um den Faktor 3, die Signalhöhe fast um den Faktor 5 (Abbildung 1). Diese Veränderung auf die chromatographische Auflösung ist bei niedrigen Konzentrationen und insbesondere in der Spurenanalytik relevant.

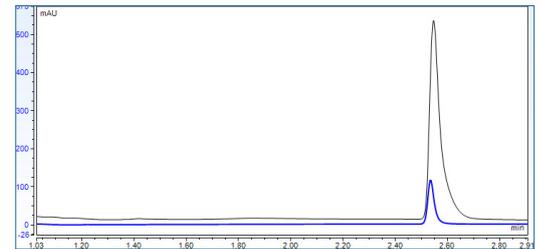


Abb. 1 Veränderung der Signalintensität einer 10 mm Messzelle (blau) und einer 60 mm Zelle (schwarz)

#2 Schlitzweite

Mit dem optischen Schlitz kann die Menge des Lichts, das in die Messzelle gelangt, reguliert werden. Hierbei unterscheiden sich die Geräte durch die Zahl der verfügbaren Optionen. Während es bei älteren Geräten oft nur die Option "Groß" oder "Klein" gibt, bieten moderne Geräte oft 4 oder 5 verschiedene Schlitzgrößen an. Die Größe des Schlitzes liegt dabei meist im einstelligen Nanometerbereich und verdoppelt sich mit jeder Einstellung. So sind Schlitzgrößen von 1, 2, 4 und 8 Nanometern bei vielen Geräten Standardoptionen.

Wird über die Schlitzweite nun die Lichtmenge reduziert, weil ein kleiner Schlitz gewählt wurde, so kommt es zu weniger Streulicht und zu einer verbesserten Aufspaltung am Gitter. Die optimierte Aufspaltung am Gitter sorgt für besser zu unterscheidende Intensitäten an den einzelnen Dioden. Das führt zu einer höheren Auflösung des UV-Spektrums, da insbesondere feine Signale, die bei aromatischen Systemen oft auftreten, so besser aufgelöst werden können (Abbildung 2).

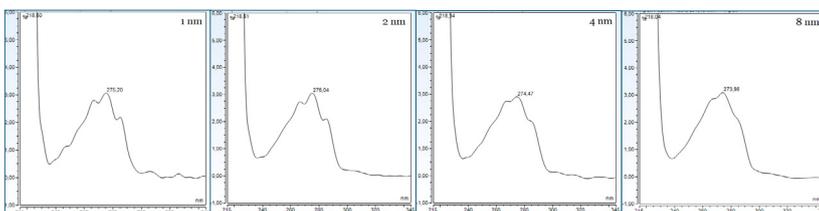


Abb. 2 Entwicklung der Auflösung von 1 nm Schlitzweite (links) bis 8 nm (rechts)

Wird die Schlitzweite groß gewählt, so erreicht mehr Licht die Messzelle und die feinen Signale verlieren an Auflösung (Abbildung 2). Allerdings kann durch die höhere Lichtintensität die Empfindlichkeit verbessert werden. Mehr Licht erreicht die einzelnen Dioden und es folgt eine Verringerung des Rauschens (Abbildung 3) und somit eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses des Chromatogramms.

Weitere Tipps?

Haben Sie Interesse an weiteren Informationen oder Tipps und Tricks, die sich an dieser Stelle befinden?

Keine Sorge, mit der Vollversion dieser Publikation erhalten Sie diese.

Füllen Sie dafür einfach unser Kontaktformular auf quaxc.eu aus, akzeptieren Sie die Datenschutzerklärung. Im Anschluss senden wir Ihnen gerne die Vollversion als PDF via Mail zu.

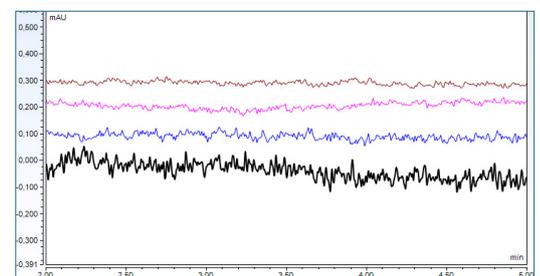


Abb. 3 Entwicklung des Rauschens von 8 nm Schlitzweite (oben) zu 1 nm Schlitzweite (unten)



#3 Datensammelrate

Die Datensammelrate ist ein Parameter, den jeder Detektor besitzt und der in unterschiedlichen Größenordnungen eingestellt werden kann. Beim DAD liegt diese Größenordnung üblicherweise zwischen 1 und 200 Hertz [Hz], wobei die Einstelloptionen je nach Gerät auch auf 0,2 Hz bis 250 Hz erweitert vorliegen können. Beim DAD ist die Datensammelrate mit der Response Time [s] verknüpft, die die Antwortzeit des Detektors darstellt und angibt, wie schnell ein Detektor auf die Veränderung des Signals reagieren kann. Bei den meisten DADs ist zu jeder Datensammelrate eine passende Response Time verknüpft und eine Entkopplung nicht immer möglich. Sollte eine Entkopplung möglich sein, sollte dies nur von erfahrenen Nutzern gemacht werden, da dieser Schritt massiven Einfluss auf das Chromatogramm nimmt.

Die Datensammelrate mit der Einheit Hertz, also Datenpunkte pro Sekunde, stellt ein, wie viele Datenpunkte pro Sekunde gemessen werden. Dabei kann die Merkgel angewendet werden, dass ein Verzehnfachen der Datensammelrate das Signalrauschen um den Faktor 3 erhöht (Abbildung 4). Durch die Erhöhung der Zahl der Datenpunkte vergrößert sich auch die Datei selbst. Im Extremfall ist es möglich, dass ein DAD in 2,5 Stunden 1 GB an Daten erzeugt.

Dennoch kann es wichtig sein, über eine Erhöhung der Datensammelrate nachzudenken. Denn mit mehr Datenpunkten in einem Zeitraum, in dem ein Peak oder mehrere Peaks kommen, wird der Zeitraum besser dargestellt. Die Peakhöhe

steigt mit mehr Datenpunkten (Abbildung 5). Ein Peak benötigt zur sicheren Integration circa 30 oder mehr Datenpunkte. Mit einem Erhöhen der Datensammelrate ist es möglich, schmalere Peaks zu detektieren und zu integrieren. Auch ein Tal zwischen zwei Peaks wird mit mehr Datenpunkten verbessert dargestellt, was dazu führen kann, dass Peaks, deren Basislinie nicht getrennt ist, durch ein schlichtes Erhöhen der Datensammelrate getrennt integriert werden können (Abbildung 5).

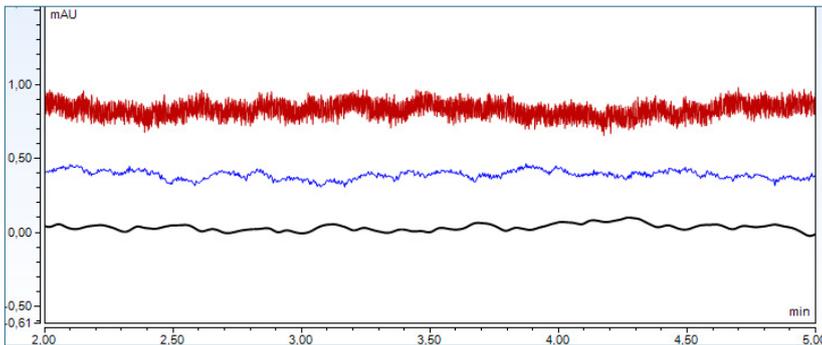


Abb. 4 Entwicklung des Signalrauschens von 2 Hz (schwarz) über 20 Hz (blau) zu 200 Hz (rot)

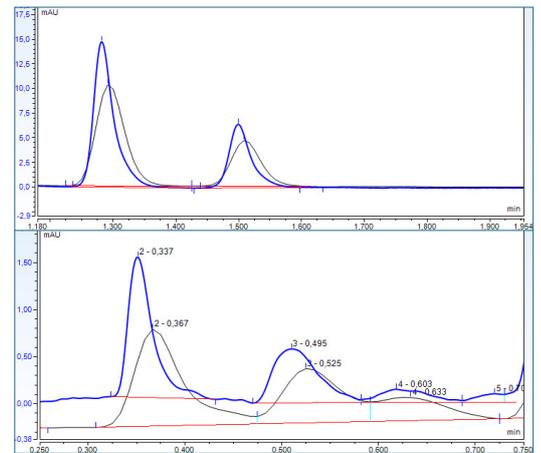


Abb. 5 Oben: Unterschiedliche Peakhöhe bei 2 Hz (schwarz) und 10 Hz (blau). Unten: Basislinientrennung bei 5 Hz (blau) und keine Basislinientrennung bei 2 Hz (schwarz).

Fazit

Haben Sie Interesse an weiteren Informationen oder Tipps und Tricks, die sich an dieser Stelle befinden?

Keine Sorge, mit der Vollversion dieser Publikation erhalten Sie diese.

Füllen Sie dafür einfach unser Kontaktformular auf quaxc.eu aus, akzeptieren Sie die Datenschutzerklärung. Im Anschluss senden wir Ihnen gerne die Vollversion als PDF via Mail zu.



#4 Bandbreite

Die Bandbreite ist ein Parameter, der pro Messwellenlänge eingestellt werden kann. Die Größenordnung ist dabei üblicherweise von 1 nm bis 100 nm einstellbar. Mit der Bandbreite wird angegeben, wie viele Wellenlängen zusammengefasst werden, um das Messsignal zu ergeben. In der Frühzeit der DAD Technologie war dies eine gute Möglichkeit, um das deutlich schlechtere Signal-zu-Rausch Verhältnis im Vergleich zu einem klassischen UV-Detektor zu verbessern. Bei moderneren Geräten ist dieser Einfluss fast nicht mehr zu beobachten und spielt, wenn überhaupt, nur bei Bandbreiten im niedrigen einstelligen Bereich eine Rolle. In Abbildung 6 kann eine Bandbreite von 1 nm mit einer von 96 nm bei einem modernen Gerät verglichen werden. Ein Einfluss auf das Signal-zu-Rausch Verhältnis kann bei diesem Gerät nicht beobachtet werden.

Die beschriebene Zusammenfassung der Wellenlängen hat hingegen auf das UV-Spektrum einen starken Einfluss. Durch die gewählte Zusammenfassung werden die Signale über mehrere Nanometer Wellenlänge gemittelt, wodurch Unterschiede von wenigen Nanometern schnell nicht mehr beobachtet werden können (Abbildung 7). Würde eine Bandbreite von z. B. 5 nm gewählt, so würde ein Signal bei 275 nm als Mittelwert des Bereiches 273 bis 277 nm dargestellt werden. Diese Mittelung erfolgt für jede Wellenlänge, was zu einem Verlust an Informationen führt. Die Abbildung 7 zeigt diesen steigenden Mittelungsverlust sehr deutlich.

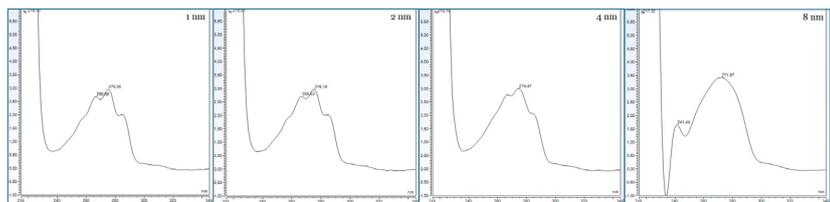


Abb. 7 Entwicklung der Auflösung von 1 nm Bandbreite (links) bis 8 nm (rechts)

Der Einfluss der Bandbreite hängt stark von dem Gerät ab. Es sollte daher unbedingt für jedes Gerät geprüft werden, wie stark eine veränderte Bandbreite das Chromatogramm beeinflusst. Der Effekt auf das UV-Spektrum ist hingegen bei allen Geräten vergleichbar und liefert bei höheren Bandbreiten schnell schlechtere Auflösungen.

#5 Referenzwellenlänge

Die Referenzwellenlänge ist eine zweite Wellenlänge, die in jedem Messkanal hinterlegt werden kann. Alle Signale, die dabei in der Referenzwellenlänge gemessen werden, subtrahiert die Software in Echtzeit von dem Messsignal. Folglich ist das Resultat eines Messkanals mit z. B. 220 nm als Messwellenlänge und einer Referenzwellenlänge von 480 nm die Differenz der beiden Wellenlängen. Mit diesem Vorgehen können Drift-Phänomene eliminiert und das Rauschen minimiert werden. Eine falsch eingestellte Referenzwellenlänge, die ein Nebensignal einer Substanz trifft, birgt aber immer die Gefahr, dass Signale verkleinert oder komplett eliminiert werden (Abbildung 8). In dem Chromatogramm auf der rechten Seite ist dabei gut zu erkennen, dass das Signal zwischen den beiden Peaks kleiner wird, die anderen beiden Peaks dadurch aber nicht betroffen sind.

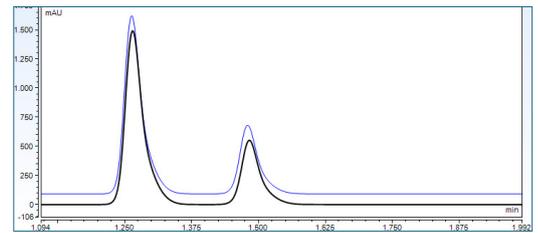


Abb. 6 Bandbreite 1 nm (schwarz) und 96 nm (blau)

Fehlt hier was?

Haben Sie Interesse an weiteren Informationen oder Tipps und Tricks, die sich an dieser Stelle befinden?

Keine Sorge, mit der Vollversion dieser Publikation erhalten Sie diese.

Füllen Sie dafür einfach unser Kontaktformular auf quaxc.eu aus, akzeptieren Sie die Datenschutzerklärung. Im Anschluss senden wir Ihnen gerne die Vollversion als PDF via Mail zu.

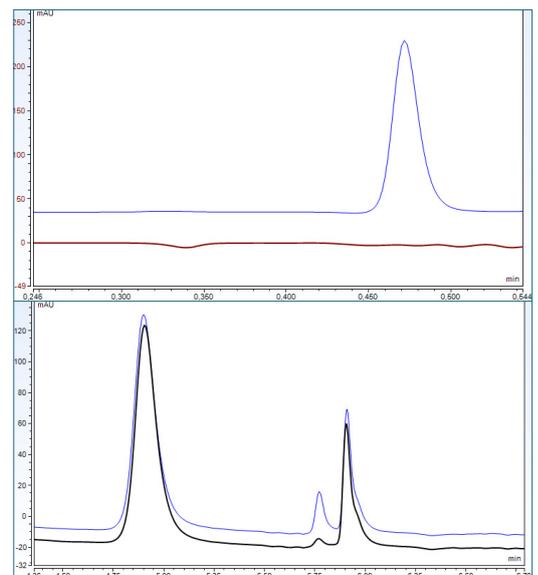


Abb. 8 Eliminierung des Signals mittels Referenzwellenlänge oben und Verkleinerung unten



Sie brauchen mehr Informationen?

Haben Sie Interesse an weiteren Informationen oder Tipps und Tricks, die sich an dieser Stelle befinden?

Keine Sorge, mit der Vollversion dieser Publikation erhalten Sie diese.

Füllen Sie dafür einfach unser Kontaktformular auf quaxc.eu aus, akzeptieren Sie die Datenschutzerklärung. Im Anschluss senden wir Ihnen gerne die Vollversion als PDF via Mail zu.

#6 Das 3D-Feld

Neugierig?

Haben Sie Interesse an weiteren Informationen oder Tipps und Tricks, die sich an dieser Stelle befinden?

Keine Sorge, mit der Vollversion dieser Publikation erhalten Sie diese.

Füllen Sie dafür einfach unser Kontaktformular auf quaxc.eu aus, akzeptieren Sie die Datenschutzerklärung. Im Anschluss senden wir Ihnen gerne die Vollversion als PDF via Mail zu.

Ausblick auf Abgleich

Für den Spektrenabgleich ist es grundsätzlich zu empfehlen, den Schwerpunkt der Messung auf die Qualität der Spektren zu legen. Diese Spektren können dann noch prozessiert werden, bevor ein Abgleich erfolgt. Die Vorgehensweise sollte dabei möglichst immer gleich sein, was die Reproduzierbarkeit der Auswertungen erhöht. Bei Interesse zu dieser Thematik gibt es eine andere Publikation, die ebenfalls auf der Homepage zu finden ist.





Dr. Julian Ramcke
Senior Manager Training &
Consulting e-Applications

QuACX GmbH
Waldstraße 1a | 56337 Simmern
julian.ramcke@quacx.eu

