

Die „Kleinen“ im Sommer...

Liebe HPLC-Anwenderinnen, liebe HPLC-Anwender,

gemäß unserer Tradition wollen wir uns auch heuer in den Sommermonaten mit kurzen, „knackigen“ HPLC-Tipps beschäftigen. Heute geht es um Lösungsmittel, Teilchengröße und Gradient.

Die HPLC-Tipps im Juli

Dr. Stavros Kromidas, www.kromidas.de

Zur Qualität von Lösungsmitteln für die HPLC – wann, was?

Sowohl „Gradient grade“ als auch „LC-MS grade“ sind sehr reine Lösungsmittel – worin liegt nun der Unterschied? Wie die Bezeichnung es ahnen lässt: Gradient grade Lösungsmittel sind speziell für die spektroskopischen Detektoren (Fluoreszenz- und vor allem UV-Detektor) optimiert, sie sind frei von organischen Verunreinigungen. Das Ziel dabei ist es, dass insbesondere bei Gradientenmethoden gegen Ende des Gradientenlaufs keine Geisterpeaks auftauchen. LC-MS grade ist frei von ionischen Verunreinigungen, da ja jene ein verstärktes Rauschen verursachen würden. Ferner würde ihre Ionisierung zum Empfindlichkeitsverlust führen. Organische Verunreinigungen können hier zwar zugegen sein, die allerdings kaum stören.

UHPLC-Lösungsmittel zusätzlich filtrieren?

UHPLC-Lösungsmittel sind bereits über 0,22 µm-Filter filtriert worden. Ist dies ausreichend? Nun, eine schwierige Frage... Im Prinzip ja, dennoch wurde – zwar schon selten, dennoch hin und wieder – folgendes festgestellt: Ein zusätzliches filtrieren über 0,16 oder 0,10 µm-Filter offenbarte bei einzelnen Lösungsmittelchargen winzige schwarze bzw. hellgraue Partikelchen.

Zu Kompressibilitätsfaktoren bei Gradientenmethoden

Moderne (U)HPLC-Geräte können die Viskositäts-Unterschiede der zu mischenden Lösungsmittel mithilfe von Korrekturfaktoren kaschieren. Nur: Erstens ist die Korrektur bei den unterschiedlichen Geräten nicht 100% identisch: Eigene Versuche ergaben, dass bei ca. 50% Methanol/Wasser bzw. Methanol/Puffer-Gemische kleine Unterschiede von ca. 5-7% existieren, was zu Unterschieden bei den Peakflächen in der gleichen Größenordnung führt. Bei kleinen und großen Methanolgehalten ist der Unterschied vernachlässigbar: Geringere Viskositätsunterschiede der Lösungsmittelanteile führen zur weitestgehend genauen Mischung und folglich zum „richtigen“ Fluss. Zweitens und vielleicht der „gefährlichere“ Unterschied, da man nicht immer daran denkt: Bei manchem Hersteller müssen die Kompressibilitätsfaktoren manuell eingegeben werden, bei manchen erfolgt dies automatisch...

Ob 2,5 oder 2,7 μ m-Core-Shell-Teilchen: Kaum wahrnehmbarer Unterschied

Es zeigt sich, dass ein Unterschied zwischen einem 2,5 und einem 2,7 μ m-Core Shell-Material – bei sonst identischen Charakteristika – kaum fest zu stellen ist. Und dies insbesondere im Gradientenmodus. Nehmen Sie also ruhig das etwas stabilere und vermutlich auch günstigere 2,7 μ m-Material. Und schielen Sie bei Ihrer Kaufentscheidung nicht unbedingt „blind“ auf kleine Teilchen: Eine homogene Packung und eine enge Korngrößenverteilung sind für eine gute Bodenzahl, viel, viel wichtiger als ein kleinerer (mittlerer!) Teilchendurchmesser bei inhomogener Packung und einer breiten Korngrößenverteilung.

Kurze, steile Gradienten: „Sexy“ und oft sinnvoll...

Wir haben uns an dieser Stelle bereits über die Vorteile von kurzen Gradienten – und kurzen Säulen! – im Falle von Proben mit weniger als 10-15 Peaks unterhalten. Hier auf die Kürze lediglich zwei Aspekte:

1. Kurze Gradienten sind oft steil. Dies führt zu scharfen Peaks, da hier die Peakkompression maximal ist. Peakkompression: Stetes „Schieben“ der Moleküle der hinteren Peakflanke nach vorne durch die permanent zunehmende Elutionskraft von B, bei steilen Gradienten ist dies besonders stark.
2. Nicht uninteressant: Die relative Standardabweichung sowohl der Retentionszeit als auch der Peakfläche erweist sich klein im Vergleich zu längeren Gradienten.