

Der HPLC-Tipp im März

## Effektives Spülen einer HPLC-RP-Säule – und Verifizierung des Erfolges

©Dr. Stavros Kromidas, [www.kromidas.de](http://www.kromidas.de)

### Der Fall

Eine RP-Säule sollte ab und an gespült werden; erfahrene AnwenderInnen wissen wie, z. B.:

- „Übliche“ Spülprozedur, oft vollkommen ausreichend: 70-80% Acetonitril (ACN)- oder Methanol (MeOH)-Wasser-Gemisch
- Imfalle von polaren Verunreinigungen: 90-95% H<sub>2</sub>O, Rest: ACN oder MeOH
- Imfalle von apolaren Verunreinigungen: 80-100% ACN oder MeOH

Soweit, so gut – nur: Bei unbekanntem Verunreinigungen müsste man – um des Erfolges sich recht sicher zu sein – einmal mit „viel“ Wasser und einmal mit „viel“ ACN spülen, was schon zeitaufwendig ist. Ferner: Bei unbekanntem Verunreinigungen und/oder „schwieriger“ Matrix ist man nach etwaiger Spülprozedur doch unsicher, in wieweit sie erfolgreich verlaufen ist. Gibt es nun eine Möglichkeit, erstens das Ganze effektiv zu gestalten und zweitens anschließend zu überprüfen, ob die Säule wirklich „sauber“ ist? Ja.

### Die Lösung

#### *Verunreinigungen*

Sie fahren bei ca. 40 °C einen steilen Gradienten von 95% H<sub>2</sub>O auf 95% ACN bei 2 ml/min, Dauer imfalle beispielsweise einer 125-150 mm-Säule, ca. 10-15 min: Zu Beginn eluieren evtl. vorhandene polare, gegen Ende des Gradienten evtl. vorhandene apolare Verunreinigungen.

Erfolgsüberprüfung:

1. Sie injizieren 1-2 Mal ca. 100 µl 0,01 N HNO<sub>3</sub>. Eluieren bei möglichst niedrigen Wellenlängen irgendwelche Peaks? Wenn nicht, ist die Oberfläche der stationären Phase frei von polaren Verunreinigungen. Wenn doch, sollte man die Säule mit ca. 30-50 ml (z. B. 2 ml/min, ca. 20 min) einer 0,01 N HNO<sub>3</sub>- oder einer ca. 5%-igen KCL-Lösung spülen.
2. Sie injizieren 1-2 Mal ca. 100 µl Tetrahydrofuran (THF) oder Dimethylformamid (DMF). Eluieren bei möglichst niedrigen Wellenlängen irgendwelche Peaks? Wenn nicht, ist die Oberfläche der stationären Phase frei von apolaren Verunreinigungen. Wenn doch, sollte man die Säule mit ca. 30-50 ml (z. B. 2 ml/min, ca. 20 min) THF/DMF spülen. Bemerkung: Letzterer Spülschritt ist recht selten notwendig (z. B. sehr „fettige“ Proben), in der Regel reicht die Elutionskraft von ACN aus.

#### *Metallionen*

Sie injizieren einen starken Komplexbildner, der empfindlich auf das Vorhandensein von Metallionen in der Kieselgelmatrix reagiert, z. B. 2,2'-Bipyridyl. Erhalten Sie einen stark tailenden Peak, so ist dies eine starke Indiz, dass Metallionen (Eisenionen) zugegen sind. In diesem Fall können die Metallionen mit einer 10-20 mMol-EDTA-Lösung herunter gespült werden.

## *Mikroorganismen*

Druckschwankungen bzw. Druckerhöhung und „Buckel“ in der Basislinie im Zusammenhang mit gepufferten Eluenten können als Hinweis bewertet werden, dass sich in der Anlage/Säule Mikroorganismen befinden. Solche wären mit einer 70/30 Isopropanol-Wasser- bzw. mit einer 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung herunter zu spülen.

Bemerkung für alle Spülprozeduren: Oft erfolgt der Spülprozess schneller/effektiver, wenn die Säule umgedreht wird.

### **Das Fazit**

- Erhöhte Elutionskraft hilft, Verunreinigungen herunter zu spülen, es gilt: „Gleiches löst Gleiches auf“
- Statt isokratisch zu spülen, hilft ein Gradientenlauf, auf einer effektiven Art und Weise unterschiedliche Verunreinigungen bzgl. ihrer Polarität zu entfernen
- Metallionen sind mit EDTA, Mikroorganismen mit 70/30 Isopropanol/Wasser bzw. mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu entfernen
- Bestimmte Lösungen können als Indikator für das Vorhandensein von Störsubstanzen dienen; solche können sich in der Säule/Vorsäule, im System oder lediglich an der Injektionsnadel befinden. Derartige Injektionen zeigen ferner, ob eine Spülprozedur erfolgreich verlaufen ist und demnach noch Handlungsbedarf besteht oder eben nicht