

Der HPLC-Tipp im Mai

## **Regulierter Bereich, feststehende Prüfvorschrift, geforderte Auflösung wird nicht erreicht – was ist möglich?**

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

### **Der Fall**

Sie arbeiten in einem regulierten Bereich und sind an strenge Prüfvorschriften gebunden. In einer solchen lautet die Forderung: „Auflösung R größer 1,5“, aber gerade diesen Wert erreichen Sie aktuell nicht. Welche regelkonforme Handgriffe kämen in Frage?

### **Die Lösung**

Was möglich ist, hängt letzten Endes davon ab, wie genau die Angaben in der betreffenden PV sind. Ist in der Tat restlos alles – von der Eluentenzusammensetzung bis zu den Einstellungen („Settings“) – vorgegeben, so können Sie de facto es nur mit einer neuen Säule versuchen. Ist die PV etwas „weicher“, d.h. es sind nur die wichtigsten Parameter wie Säule, Eluent, Temperatur, Fluss, Wellenlänge und Injektionsvolumen vorgegeben, gäbe es schon ein paar Möglichkeiten.

Vorbemerkungen:

1. Ziel hier ist eine Verbesserung der Peakform
  2. Nachfolgende Hinweise helfen vor allem bei früh eluierenden Peaks und bei isokratischen Trennungen
- Zeitkonstante (time constant, filter time) auf 50 oder 100 ms einstellen, Datenrateaufnahme („Sample Rate“) auf 20-40 Hz sowie Spalt („Slit“) beim Dioden Array auf 16 nm erhöhen
  - Minimieren Sie das Totvolumen der Apparatur indem Sie möglichst kurze, 0,05-0,12 mm Kapillaren verwenden; schauen Sie sich eventuell auch noch die Verbindungsstücke an. Falls die Kapillare von der Säule zum Detektor doch recht lang ist/sein muss und ferner aus PEEK besteht: Machen Sie in der Kapillare zwischen Säule und Detektor zwei, drei Knoten. Das ist kein „Gag“ sondern ernst: Durch den Knoten wird das laminare Strömungsprofil zerstört und die Zonenverbreiterung nimmt ab
  - Injizieren Sie zusammen mit der Probe 10-15 µl Luft. Dieses „Luftkissen“ direkt vor der Substanzzone verhindert die Verdünnung der Probe auf ihrem Weg vom Probengeber zur Säule. Übrigens erzeugen einige UHPLC-Geräte optional solche Luftsegmente. Sobald nun das Luftbläschen die Säule erreicht, wird es durch den Druck, der durch die Säule aufgebaut wird, in den Eluenten aufgelöst und stört weiter nicht

- In der Qualitätskontrolle ist folgender Trick sicherlich nicht erlaubt, dennoch behalten Sie ihn für alle Fälle im Kopf: Injizieren Sie zusammen mit der Probe etwas Guanidin mit. Dieses wird wie ein hochviskoser Pfropfen vor der Substanzzone und verhindert ebenfalls die Verdünnung. Die gute Nachricht: Guanidin eluiert mit der Front und stört nicht weiter im Chromatogramm
- Lösen Sie die Probe in ein schwächeres Lösungsmittel als den Eluenten auf; wenn Sie z.B. ein RP-System mit einer C18-Säule und einem Eluenten 60/40 ACN/H<sub>2</sub>O verwenden, so lösen Sie die Probe in 20/80 ACN/H<sub>2</sub>O auf. Dadurch wird die Substanz am Säulenkopf aufkonzentriert („On Column Concentration“) und man erhält schmale Peaks.

Die oben genannten Maßnahmen führen zu schmalen Peaks, ohne dass Sie die Selektivität verändern, was Sie ja nicht dürfen. Ergebnis: bessere Auflösung durch Erhöhung der Bodenzahl bei gleicher Selektivität.

Sollten Sie in der seltenen, glücklichen Lage sein, sich nur an Eluent und Säule festhalten zu müssen, gäbe es zusätzlich folgende Möglichkeiten:

- Herabsetzung des Injektionsvolumens
- Herabsetzung der Flussrate (bei sub3µm-Teilchen kaum, bei 5µm minimale Verbesserung)
- Herabsetzung der Temperatur (abhängig vom Mechanismus manchmal kaum, manchmal merkliche Verbesserung)

### **Das Fazit**

Will man sich in einer regulierten Umgebung wie Qualitätskontrolle konform verhalten, aber dennoch Vorgaben erfüllen, so sollte man an einige einfache Handgriffe denken.