

Der HPLC-Tipp

Die „Kleinen“ im September...

Bei den „Kleinen“ geht es heute um den optimalen Zeitpunkt für die Elution der wichtigsten/kritischen Peaks, um MeOH/ACN und um die isokratische Stufe beim Gradienten im Fall von kurzen Säulen.

Dr. Stavros Kromidas, www.kromidas.de

„Optimale“ Elution – wann sollen meine wichtigsten Peaks eluieren?

Zunächst direkt die Aussage: Die optimale Elution für die interessierenden Peaks liegt nach ca. der 3-5-fachen Totzeit („Front“, Injektionspeak). Sehen Sie zu, dass wenn irgendwie möglich wichtige/kritische Peaks bei einem Retentionsfaktor, k (k : Maß für die Stärke der Wechselwirkungen), von etwa 3-5 eluieren, d.h. eben nach der 3-5-fachen Totzeit. Warum? Hier drei Gründe:

1. Ab hier etwa fängt der robuste Bereich an, die Konsequenz lautet: Konstante Retentionszeiten in der Routine, kleine ungewollte Veränderungen beispielsweise beim Eluenten oder der Temperatur machen sich wenig bemerkbar
2. Dieser Bereich entspricht einem optimalen Bereich der Wechselwirkungen, die Konsequenz lautet: Optimaler Beitrag von k für eine gute Auflösung
3. In diesem Bereich ergibt sich eine gute Effizienz, sprich eine gute Bodenzahl, die Konsequenz lautet: Keine übermäßige und damit störende Peakverbreiterung

In Methanol/Wasser gelagerte Säulen

Für längere Zeiträume (mehrere Wochen/Monate) eignen sich zur Lagerung von polaren RP-Phasen eher ACN/H₂O- (mehr als ca. 60 % ACN) denn MeOH/H₂O-Gemische. Begründung: In einem ACN/H₂O-Gemisch tendiert die Gefahr der Abspaltung durch Hydrolyse von kleinen, polaren funktionellen Gruppen, z. B. C₈, C₄, Diol, CN, PFP, Phenyl-Hexyl usw. – also das bekannte „Bluten“ der Säule – gegen Null. 100% Methanol dürfte dagegen unkritisch sein. Soweit, so gut. Nun, einige Hersteller liefern ihre Säulen in MeOH/H₂O. Was kann jetzt passieren? Sie arbeiten mit einer recht polaren RP-Säule und es klappt alles bestens. Sie bestellen beim gleichen Hersteller erneut die gleiche Säule, der Hersteller beteuert, es handele sich um die gleiche Charge wie bei Ihrer ersten Säule, dennoch sieht Ihr Chromatogramm „scheußlich“ aus. Es mag sein, dass bei beiden Säulen sich tatsächlich um die gleiche Charge handelt. Die zweite jedoch war evtl. beim Hersteller längere Zeit gelagert. Ein Teil der polaren funktionellen Gruppen, siehe weiter oben, sind womöglich abgespalten und Sie erhalten beispielsweise stark tailende Peaks im Fall von basischen Komponenten: Jene interagieren mit frei gewordenen aktiven Silanolgruppen.

„Gleiche“ Charge...

Es ist zweifelsohne sinnvoll, im Rahmen der Methodenentwicklung oder später bei der Validierung drei Säulenchargen auszutesten. Hier sollten Sie etwas aufpassen:

Wenn Sie beim Hersteller drei Säulen aus drei „verschiedenen Chargen“ bestellen, bekommen Sie meist tatsächlich drei Säulen aus drei unterschiedlichen Herstellungsschichten. Für manch´ einen Hersteller jedoch bedeutet „unterschiedliche Chargen“, dass die Säulen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gepackt worden sind, die Säulen sind jedoch aus der gleichen Herstellungsschicht...

Denk´ an MeOH bzw. MeOH/ACN-Gemische

Wasser aus dem Eluenten wird an der Oberfläche von polaren, stationären Phasen adsorbiert. Dies wirkt sich positiv bei der Trennung von polaren Komponenten. Verwenden Sie für die Trennungen von polaren Komponenten tendenziell eher Methanol als Acetonitril als organisches Lösungsmittel. Erwarten Sie nicht ausschließlich stark polare Komponenten sondern auch moderat-polare und evtl. auch neutrale (apolare) Komponenten? Für diesen Fall folgender Vorschlag: Wenn Sie Ihren Gradienten beispielsweise mit 20% B starten und auf 80% B hochfahren möchten, könnten Sie mit 10% MeOH/10% ACN starten und dann auf 40% MeOH/40% ACN hochfahren: Sie nutzen in diesem Fall die gute polare Selektivität durch das Methanol und die gute Peakform durch das ACN (geringe Viskosität, scharfe Peaks). Generell: Eine ternäre Mischung, also Wasser bzw. Puffer-ACN-MeOH, erweist sich bei einer großen Polaritäts-Bandbreite der Komponenten in der Probe oft als vorteilhaft. Dies gilt auch und gerade bei isokratischen Trennungen.

Großes Verweilvolumen und kleines Säulenvolumen...

Ein großes Verweilvolumen („Dwell“- oder „Delay-Volume“) bei einer Gradientenanlage bedeutet, dass zu Beginn des Gradienten eine isokratische Stufe vorgeschaltet ist. Eine solche mag mitunter etwas Positives bewirken: Manche Peaks am Anfang des Chromatogramms werden besser abgetrennt, als wenn der Gradient „sofort“ an der Säule wäre und dort direkt wirkte. Bei einer kurzen Säule jedoch „sieht“ der Gradient im Fall eines längeren isokratischen Schrittes am Anfang nur einen Teil der Säule, d.h. Sie nutzen im Worst Case nur 50% der Säulenlänge aus. Die Peaks werden nach hinten „gestaucht“, bei mehr als 10-15 Peaks werden die letzten Peaks evtl. schlecht abgetrennt.