

Der HPLC-Tipp im Mai 2016

**Kommen die Peaks früher, wird die Trennung wohl schlechter – oder?**

von Dr. Stavros Kromidas, Saarbrücken

**Der Fall**

Es gibt in der HPLC mehrere Möglichkeiten, die Peaks nach vorne zu schieben. Dabei rücken sie zusammen, die Auflösung nimmt natürlich ab. So eine (vor)schnelle Schlussfolgerung. Das stimmt allerdings nicht immer. Wann nicht und warum?

**Die Lösung**

Betrachten wir hier ein klassisches RP-System. Ich kann die Wechselwirkungen zwischen Analyten und stationärer Phase wie folgt verringern, die Peaks eluieren dabei früher: Den organischen Anteil der mobilen Phase bzw. die Temperatur erhöhen, den pH-Wert verändern, schließlich kann ich eine polarere stationäre Phase verwenden. Wenn meine Substanzen nun sich chemisch ähneln und dementsprechend auch chromatographisch ähnlich verhalten – man spricht in der Literatur von „regulären“ Substanzen – ist die „Beschleunigung“ für alle Peaks gleich: Die Retentionszeit nimmt gleichmäßig ab und die Trennung wird tatsächlich schlechter. Wenn die Komponenten aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften (z. B. eine neutrale Komponente und eine Base) sich chromatographisch anders verhalten, ist die Rede von „irregulären“ Substanzen. Selbstverständlich eluieren beispielsweise durch Erhöhung des ACN-Anteils auch im letztgenannten Fall alle Komponenten früher – allerdings: Die Beschleunigung ist nicht für alle Komponenten zwangsläufig gleich, manche Substanz marschiert schnell nach vorne, manche recht gemütlich... In einem solchen Fall müsste man mit allem rechnen: Sowohl mit einer besseren Trennung als auch mit einer schlechteren Trennung als auch mit Koelution, s. als Beispiel Abbildung 1:

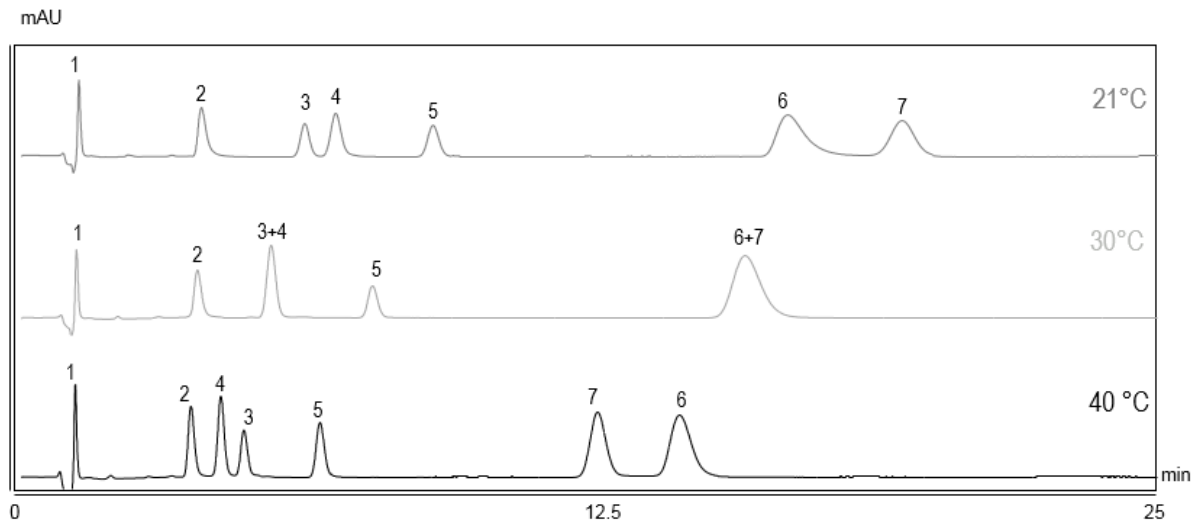


Abb.1 Änderung der Elutionsreihenfolge sowie der Auflösung im Falle von irregulären Komponenten, Details, s. Text

Bei 21°C Elutionsreihenfolge 7,6, bei 30°C Koelution, bei 40°C Elutionsreihenfolge 6,7. Peak Nr. 6 entspricht einer neutralen Komponente, Peak Nr. 7 einer Base. Statt dass ich Ihnen jetzt weitere Beispiele zeige, die zu analogen Ergebnissen führen, sollten wir uns lieber der Unterscheidung zwischen isokratischen und Gradiententrennungen widmen: Im Falle von isokratischen Trennungen führt eine Änderung physikalischer Natur wie beispielsweise Abnahme der Flussrate oder der Säulenlänge stets zu einer Abnahme der Retentionszeit - bei gleichbleibender Elutionsreihenfolge. Im Falle von Gradiententrennungen ändert sich bei einer Änderung  $u$  A von den Säulendimensionen und der Flussrate der mittlere Retentionsfaktor  $k^*$  (Maß für die Stärke der Wechselwirkungen). Liegen irreguläre Substanzen vor, kann die Änderung von  $k^*$  für zwei mich interessierenden Substanzen unterschiedlich ausfallen. Dadurch kann sich der Quotient  $k^*_1/k^*_2$  ändern, was eine Änderung der Selektivität und/oder der Elutionsreihenfolge bedeuten kann. Die Selektivität kann schlechter oder auch besser werden.

## Das Fazit

Nur bei regulären Komponenten (Homologe, lediglich unterschiedliche Anzahl an Methylen-/Methylgruppen am Molekül, Zucker, Aldehyde etc.) führt eine Abnahme der Retentionszeit zwangsläufig zu einer Abnahme der Auflösung.