

Der HPLC-Tipp im Februar

Ist es vorteilhaft für mich, *diesen* Parameter zu erhöhen/erniedrigen?

Dr. Stavros Kromidas, www.kromidas.de

Der Fall

Im HPLC-Tipp vom letzten November haben wir uns über folgenden Tatbestand unterhalten: Wenn ich in der HPLC einen physikalischen Parameter verändere, ist das Ergebnis selten eindeutig „gut“ oder „schlecht“. Je nach Betrachtungsweise bzw. Anforderungen überwiegen Vor- oder eben Nachteile. Dies gilt analog auch für chemische Parameter, heute wollen wir nachfolgend stellvertretend sechs betrachten.

Die Lösung

Was	Nachteile	Vorteile
Erhöhung der Temperatur	In der Regel Abnahme der Selektivität und der Lebensdauer der Säule, ferner erhöhte Gefahr für eine Zersetzung von Analyten	Abnahme der Retentionszeit und des Druckes, Verbesserung der Peakform und dadurch Zunahme der Peakkapazität (Anzahl der Peaks pro Zeiteinheit)
Erhöhung des Acetonitril-Anteils in der mobilen Phase	Oft schlechtere Selektivität generell und speziell für polare Komponenten	Abnahme der Retentionszeit. Und da die Viskosität ebenso abnimmt: Schmalere Peaks, geringerer Druck, dadurch Zunahme der Lebensdauer der Säule
Erniedrigung des pH-Wertes der mobilen Phase (pH-Wert ca. 2-3)	Kleine/polare funktionelle Gruppen könnten evtl. durch Hydrolyse von der Oberfläche der stationären Phase abgespalten werden („Bluten“), die Säule wäre irreversibel verändert	Evtl. vorhandene Restsilanolgruppen auf der Oberfläche liegen im Sauren undissoziiert vor: Merkliche Verbesserung der Peakform von Basen, da Ionenaustauschwechselwirkungen unterdrückt werden
Einsatz einer modernen, „sauberen“, endcappeden, hydrophoben C18-Phase	Dürftige sterische Selektivität sowie geringe bis mangelnde Selektivität für polare und/oder sehr ähnliche Moleküle (z. B. starke Basen, Isomere, halogenierte Komponenten usw.)	In der Regel: Gute Chargenreproduzierbarkeit, geringe(re) Probleme in der Routine, konstante Retentionszeiten, gute Peakform
Core Shell (oder: Fused Core, Solid Core, Superficial Porous Particles usw.)	Im Alltag nicht immer so „robust“ wie poröse Materialien: Überladungsgefahr? Matrix-belastete Proben? Effizienzverlust?	Im Vergleich zu porösen Materialien: Geringerer Druck, schnellere Trennungen, bessere Peakform

	Chargenreproduzierbarkeit?	
Zugabe von Additiven zu der mobilen Phase (z. B. MTBE, Di- oder Triethylamin, Ionenpaarreagenzien)	Störungen in der Basislinie, Erhöhung der Eigen-UV-Absorption des Eluenten und überhaupt oft Probleme: Einlaufen der Säule dauert sehr lang, Memory-Effekte, Geisterpeaks, Säule irreversibel verändert usw.	Vielleicht die beste Möglichkeit, stark polare/ionische Komponenten mittels RP zu chromatographieren (Ionenpaarreagenzien), Basen an älteren Säulen (Triethylamin) oder sehr apolare Komponenten in kurzer Zeit und mit guter Peakform zu trennen (MTBE)

Das Fazit

Man sollte die Auswirkungen bei der Veränderung eines Parameters bzw. Anwendung eines solchen in Gänze betrachten und den für die aktuelle Fragestellung sich ergebenden Vor- bzw. Nachteil erkennen. Es seien hier nur drei Beispiele genannt:

- *Temperatur*; habe ich für eine schnelle Kinetik bei der Desorption meines Moleküls von der stationären Phase zu sorgen, da es sich um einen langsamen/multiplen Mechanismus handelt bzw. meine Moleküle groß sind (Ionenaustausch, Makromoleküle), steht also eine gute Peakform im Vordergrund? Dann erhöhe ich natürlich die Temperatur. Muss ich sehr ähnliche Moleküle trennen (Stellungsisomere, Enantiomere), geht es also primär um eine gute Selektivität? Die Temperatur müsste in diesem Fall eher erniedrigt werden
- *Core Shell*; habe ich klare Lösungen und ist eine kurze Retentionszeit für mich wichtig? Core Shell-Säulen sind hier definitiv eine sehr interessante Möglichkeit. Ist meine Matrix eine „schwierige“ und die Zeit für eine gründliche Probenvorbereitung ist kaum vorhanden, oder: Müsste ich aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen meiner Komponenten die Säule lokal überladen? Der Einsatz von Core Shell-Säulen sollte in solchen Fällen kritisch hinterfragt werden
- *Ionenpaarreagenzien*; sind meine Komponenten stark ionisch und ich darf/will keine Mixed Mode-Säulen einsetzen? Es gibt kaum eine Alternative zum Einsatz von Ionenpaarreagenzien, die Nachteile müsste ich in Kauf nehmen. Werden an jener Apparatur unterschiedliche Methoden gefahren? In diesem Fall muss ich viel Zeit und viel Geduld mitbringen, um Geisterpeaks, unschöne Basislinie usw. zu „ertragen“