

Der HPLC-Tipp im Juli/August

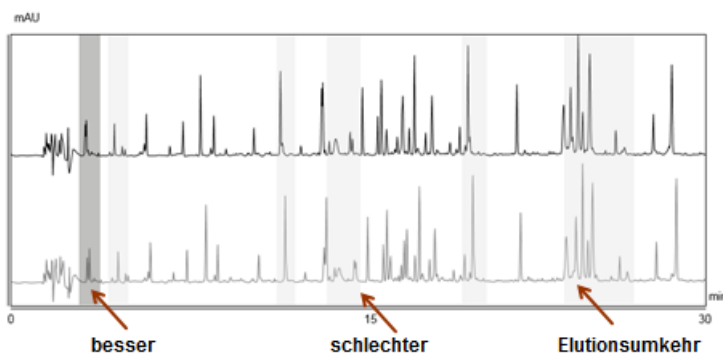
von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Die Kleinen im Sommer...

Lassen Sie uns jetzt im Sommer traditionsgemäß mit kleinen Tipps beschäftigen. Als erstes, passend zur Jahreszeit, 2-3 Bemerkungen zur Temperatur. Alsdann folgen zwei Beispiele, die zeigen, dass bei Unkenntnis der Einstellparameter einer übernommenen Methode und Verwendung von anderen Zahlenwerten man evtl. keine übereinstimmenden Ergebnisse erhält. Das kann viele Nerven bei Methodentransfers bedeuten. Es lohnt sich, gegenüber solchen Dingen ein wenig Sensibilität zu entwickeln.

Temperatur

- Wir unterstellen, dass zwei Säulenöfen technisch in Ordnung sind, sie wurden vor kurzem qualifiziert. Bei gleicher Temperaturanzeige kann es dennoch zu unterschiedlichen Chromatogrammen kommen, wenn das Funktionsprinzip der zwei Öfen unterschiedlich ist (Differenz in der Wärmeabfuhr). Abb. 1 zeigt ein Beispiel, das freundlicherweise von Michael Heidorn, ThermoScientific, zur Verfügung gestellt hat: Bei Verwendung eines Ruhluftofens bzw. eines Luftofens mit aktiver Luftumwälzung kann es sein, dass die Trennung an einer Stelle besser und an anderer Stelle schlechter wird, sogar Elutionsumkehr ist denkbar.



Dieselbe HPLC Trennung an einem Ruhluftofen (oben) und einem Umluftofen (unten)

Abb. 1

Quelle: Michael Heidorn, ThermoScientific

Abb. 1 Unterschiedliche Chromatogramme bei gleicher Temperaturanzeige und zwei unterschiedlichen Säulenöfen, Details, s. Text

- Früh morgens stellen Sie bei Ihrem DAD eine unruhige, wellenförmige Basislinie. Ab ca. 10.00 Uhr sieht sie wesentlich besser aus. Mögliche Erklärung: Morgens ist es noch kalt, die Klimaanlage pustet „ordentlich“ und

mancher DAD reagiert bekanntlich empfindlich auf einen Luftzug. Ab ca. 10.00 Uhr ist das Labor voll mit Menschen, es wird wärmer, die Luftzufuhr durch die Klimaanlage ist geringer, die Basislinie ist zufriedenstellend. Aber auch das Umgekehrte kann passieren: Nachmittags scheint die Sonne auf das Labor, die Klimaanlage arbeitet stärker, und...

- Sie haben auf einmal immer wieder periodisch ein Problem mit der Basislinie oder/und mit einer Verschiebung der Retentionszeit. Früher gab es keine Probleme, weder mit dieser Anlage noch mit dieser Methode. Folgendes war bei einem ähnlichem Fall die Ursache: Vor kurzem wurde in der Nähe der HPLC- eine Kapillar-GC-Anlage aufgestellt und nach jeder ca. halben Stunde erreichte die HPLC eine „Hitzewelle“

Andere Einstellparameter, anderer Integrationsalgorithmus

- Oft ist es so, dass in Methodenbeschreibungen die Einstellparameter („Settings“) fehlen. Man verwendet somit die voreingestellten Zahlenwerte, die häufig zufällig/willkürlich gewählt wurden. Abb. 2 zeigt ein Chromatogramm bei unterschiedlichen Einstellparametern: Es wird anders integriert, auch die Basislinienmarkierung ist unterschiedlich.

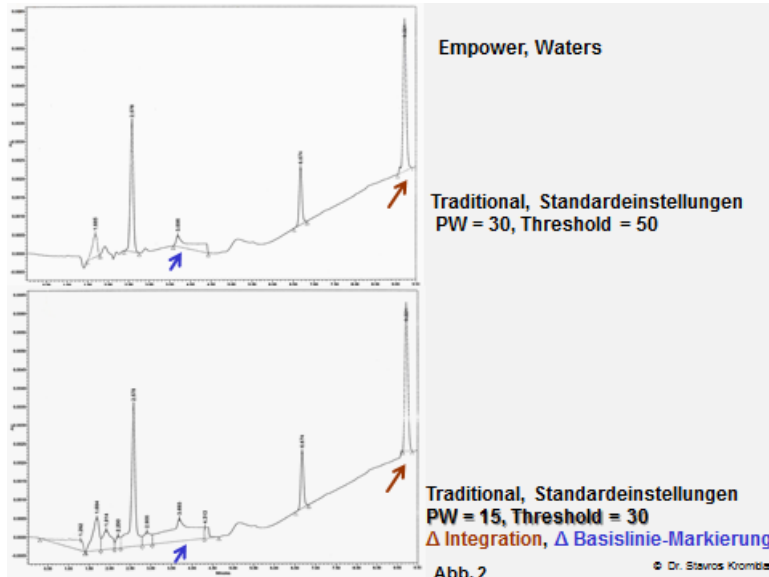
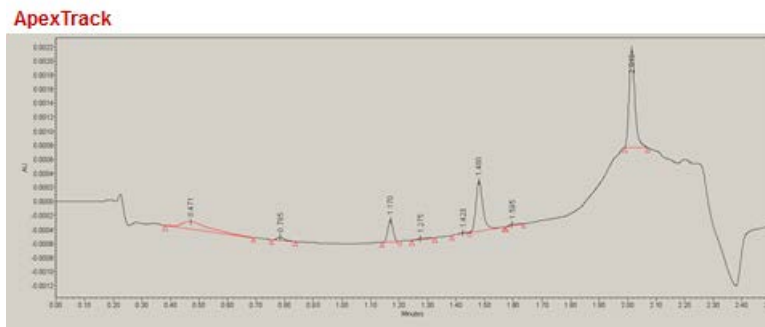


Abb. 2 Unterschiedliche Integration sowie Basislinie je nach eingestellten Parametern, Details, s. Text

- Bei modernen Auswertprogrammen hat man die Möglichkeit, nach unterschiedlichen Integrationsalgorithmen auszuwerten. In Abb. 3 und 4 wird eine UHPLC-Trennung gezeigt, als Software wurde Empower verwendet. Imfalle einer Auswertung über „ApexTrack“ (eher geeignet für kleine, tailende, nicht aufgelösten Peaks) erscheinen im Report 8 Peaks, s. Abb. 3. Imfalle von

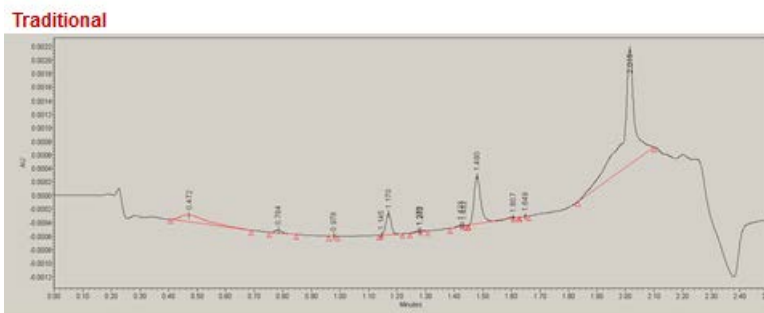
„Traditional“ (eher geeignet für gut aufgelöste Peaks) erscheinen dagegen 13 Peaks, darüber hinaus werden Peaks auf „Buckel“/Drift unterschiedlich integriert.



Es sind 8 Peaks erkannt worden

Abb. 3

Abb. 3 UHPLC-Chromatogramm, Auswertung über Empower (ApexTrack), Details, s. Text



Es sind 13 Peaks erkannt worden

Abb. 4

Abb. 4 Gleiche Trennung wie in Abb. 4, Auswertung über Empower (Traditional), Details, s. Text

Der HPLC-Alltag zeigt immer wieder, dass oft aufgrund von kleinen, unscheinbaren und nicht beachteten Unterschieden Ergebnisse sich nicht stets vergleichen lassen.