

## Der HPLC-Tipp im Januar/Februar

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Liebe Leserinnen, liebe Leser,

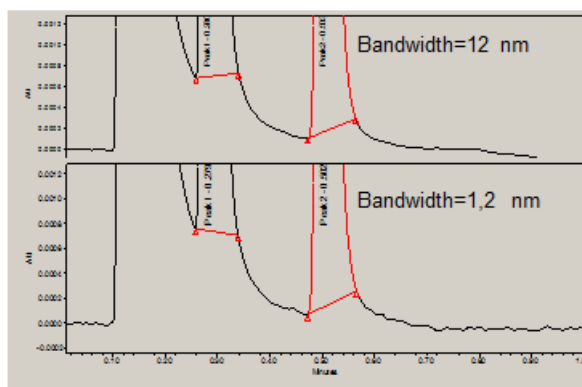
im Dezember habe ich Ihnen etwas HPLC-Denksport angeboten... Heute wollen wir uns anschauen, was nun richtig ist.

*Von welchem Parameter/Charakteristikum eines DAD´s wird die Empfindlichkeit nicht beeinflusst?*

- Bandbreite („Bandwidth“)
- Spalt („Slit“)
- Datenrateaufnahme („Sample Rate“)
- Wellenlänge
- Rauschen

Sie wird von allen beeinflusst; als Beispiel wird in Abb. 1 gezeigt, dass bei einer Bandwidth von 1,2 nm das Rauschen der Basislinie stärker ist als bei 12 nm. Somit ändert sich das Peak/Rauschen-Verhältnis und folglich auch die Empfindlichkeit. In Abb. 2 sieht man, dass bei einem Spalt von 16 nm mehr Licht auf die Moleküle in der Zelle fällt und dadurch die Nebenkompente beim ersten Peak immerhin als „Buckel“ zu sehen ist, was bei den anderen Einstellungen (8 nm, 4 nm) nicht der Fall ist.

**Einfluss der Bandbreite auf das Rauschen**



© Dr. Stavros Kromidas

Abb. 1 Zum Einfluss der Bandbreite auf Integration (Peak an der Flanke) und Basislinienrauschen, Details siehe Text

### Einfluss des Spalts auf die Empfindlichkeit

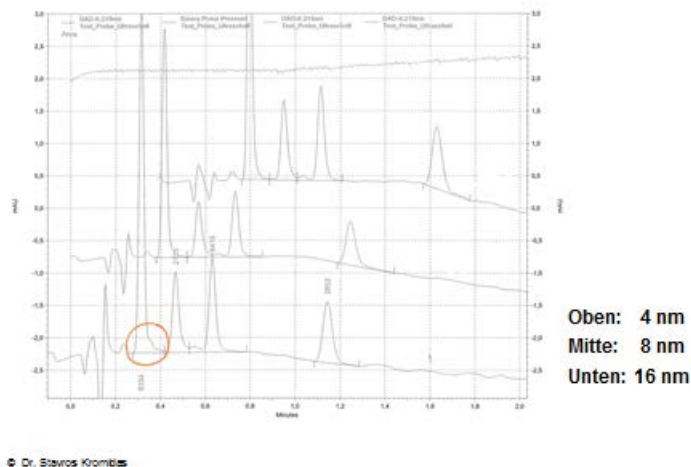


Abb. 2 Zum Einfluss des Spalts auf die Empfindlichkeit, Details, siehe Text

Was wird vom Totvolumen nicht/minimal beeinflusst, was jedoch bzgl. Verweilvolumens („Delay“-„Dwellvolume“) schon der Fall sein kann?

- Peakform
- Auflösung
- Elutionsreihenfolge **richtig**
- Selektivität **richtig**
- Retentionszeit

Durch ein größeres Totvolumen wird „nur“ die Peakform und demnach die Auflösung beeinflusst. Bzgl. Retentionszeit in einem klassischen HPLC-System ist eine Veränderung kaum wahrnehmbar – sie bewegt sich im Bereich von Sekunden –, der Rest ändert sich nicht.

Welcher chromatographischer Parameter ist bei der Gradientelution in der Regel von untergeordneter Bedeutung?

- Gradientenvolumen
- Bodenzahl (Effizienz, Trennleistung, Trennschärfe) **richtig**
- Säulenlänge **richtig**
- Totvolumen **richtig**
- Verweilvolumen

Die Peaks sind beim Gradienten in der Regel schmal, Totvolumen und Trennleistung der Säule (also Packungsqualität) sind somit nicht von enormer Wichtigkeit. Auch die Länge der Säule ist bis zu ca. 10 Peaks von untergeordneter Bedeutung (1).

Welche(r) der nachfolgenden Parameter beeinflusst die Retentionszeit nicht/kaum (typisches RP-System)?

- Gradientenvolumen
- Organischer Anteil in der mobilen Phase
- Säulenlänge
- Teilchengröße **richtig**
- Totvolumen **richtig**

Teilchengröße und Totvolumen beeinflussen nur die Peakform, nicht aber die Wechselwirkungen und somit nicht die Retentionszeit.

*Was wird von einem großen polaren Matrixpeak nicht/kaum beeinflusst (typisches RP-System)?*

- Die Retentionszeit von polaren Komponenten
- Die Retentionszeit von neutralen Komponenten **richtig**
- Die Lebensdauer der Säule **richtig**
- Die Auflösung von polaren Komponenten
- Die Trennleistung (Effizienz) der Säule **richtig**

Polare Komponenten eluieren früh, also werden sie von einem derartigen Peak beeinflusst und somit auch deren Auflösung. Die neutralen Komponenten interessieren sich überhaupt nicht was „vorne“ passiert und weil ja dieser polare Peak eine hydrophobe RP-Säule schnell verlässt, wird weder ihre Lebensdauer noch ihre Trennleistung beeinträchtigt.

(1) „Gradient: Auswahl, Optimierung, Troubleshooting“ in: Stavros Kromidas (Hrsg.) „HPLC-Tipps, Band 3“, ISBN 978-3-937436-58-6