

Der HPLC-Tipp im Januar/Februar

## Peaky und Chromy – die „HPLC-Versteher“?

von Dr. Stavros Kromidas, Saarbrücken

Herzlichen Glückwunsch an Marcus Hans, Bexbach!

Marcus Hans hat die richtigen Antworten geliefert, seine kurzen Erklärungen sind sehr prägnant und werden nachfolgend nahezu wörtlich verwendet:

Peaky meint:

1. *Das Totvolumen nach der Säule ist wichtiger als vor der Säule, ferner ist bei Gradiententrennungen das Totvolumen der Apparatur viel unwichtiger als das Verweilvolumen*

**Aussage ist korrekt;** das Totvolumen nach der Säule ist viel wichtiger als jenes vor der Säule: so kann die Verbreiterung der Substanzbanden durch eine lange/dicke Kapillare, ein nicht richtig sitzendes Fitting oder ein großes Volumen der Messzelle die in der Säule erfolgte Trennung zu Nichte machen. Bei Gradiententrennungen dagegen ist das Totvolumen in der Tat nicht so wichtig, die Peaks bleiben auch in einer suboptimalen Apparatur durch die stets zunehmende Elutionsstärke der mobilen Phase schmal („Peakkompression“). Das Verweilvolumen dagegen ist viel wichtiger, da dieses die Selektivität, die Peakform, die Auflösung und die Elutionsreihenfolge beeinflussen kann (Kap. 4.1 in „Der HPLC-Experte“, HPLC-Tipp 11/13 und 03/14).

2. *Die UHPLC liefert eine bessere Nachweisempfindlichkeit als die HPLC*

**Aussage ist falsch;** bei einem konzentrationsempfindlichen Detektor (UV/vis, DAD, FLD) kann eine Detektorzelle mit einer langen Wegstrecke verwendet werden, da ja Lambert-Beer nach einem langen Lichtweg „verlangt“. Die Gefahr, dass die Empfindlichkeit durch Totvolumina zu Nichte gemacht wird, besteht aufgrund des im Vergleich zu dem Zellvolumen großen Säulenvolumens kaum. In der UHPLC muss das Totvolumen und folglich das Detektorzellvolumen klein sein. Trotz in jüngster Zeit merklicher Fortschritte des Zelldesigns, kann der Lichtweg in einer Detektorzelle mit einem in der UHPLC weit unter 1 µl notwendige Zellvolumen nicht signifikant verlängert werden. Aus diesen Gründen ist die UHPLC per sé unempfindlicher als die HPLC, gemeint ist hier die Nachweisempfindlichkeit. Was Massenempfindlichkeit betrifft (Injektionsvolumen kann/darf nicht erhöht werden) ist die UHPLC der HPLC bei weitem überlegen (Kap. 1 in „Der HPLC-Experte 2“, HPLC-Tipp 05/14)

3. *Zeitgewinn ergibt sich bei der UHPLC allenfalls dann, wenn die Trennung den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt darstellt*

**Aussage ist korrekt;** An dieser Stelle haben wir des häufigeren darüber gesprochen, dass Trennungen von 5-10 Peaks auch an konventionellen Geräten unter ca. 4-5 min realisiert werden können. Eine UHPLC kann uns

hier sicherlich noch 1-2 min „schenken“ – nur: Wenn die Probenvorbereitung 20-30 min dauert, die Chromatogramme einzeln gesichtet werden müssen und/oder immer wieder manuell integriert werden muss, hält sich der Vorteil der UHPLC in diesem Fall in Grenzen. Die Stärke der UHPLC liegt u. A. im optimalen Bodenzahl/Retentionszeit-Verhältnis.

4. *Die Peaksymmetrie nimmt bei den später eluierenden Peaks im Falle von isokratischen Trennungen sowohl in der HPLC als auch in der UHPLC ab*  
**Aussage ist falsch**; Die Peakbreite nimmt zwar zu, die Peaksymmetrie jedoch bleibt – wenigstens theoretisch – konstant. In der Praxis ist es allerdings so, dass für eine gegebene Säule das Totvolumen oft viel zu groß ist. In solchen Fällen macht sich jenes eher bei den früh eluierenden Peaks bemerkbar, das Ergebnis lautet: Die früh eluierenden Peaks zeigen ein Tailing, je später die Peaks eluieren, umso symmetrischer werden sie, d.h. die Peaksymmetrie nimmt eher zu.

Chromy meint:

1. *Monolithen eignen sich besonders gut im Falle einer „dreckigen“ Matrix*  
Aussage ist korrekt; Es zeigt sich, dass eine monolithische Säule auch bei „schwierigen“ Matrices selten(er) „zu“ geht – die Makroporen lassen „alles“ durch...
2. *Eine stärkere Wechselwirkung führt zu einer besseren Differenzierung von Analyten und folglich zu einer besseren Selektivität und Auflösung*  
**Aussage ist ca. 50% richtig bzw. falsch**; Durch eine stärkere Wechselwirkung erhöht sich der Retentionsfaktor,  $k$ . Bis zu einem Wert von ca. 5-8 kann dadurch eine Verbesserung der Auflösung erwartet werden. Noch stärkere Wechselwirkungen (höhere  $k$ -Werte) führen kaum zu einer nennenswerten Verbesserung der Auflösung. Ist die Zunahme der Wechselwirkungen für beide mich interessierenden Komponenten gleich, ändert sich die Selektivität nicht (der Quotient beider  $k$ -Werte bleibt konstant)
3. *Eine Säule erzeugt einen Rückdruck von 100 bar; im Zuge von Gedankenspielen zur Optimierung wurde an diversen Kombinationen gedacht. Welcher Druck ergibt sich in welcher Situation und welche Situation ist mit einem kommerziellen Gerät z. Z. nicht realisierbar?*
  - Doppelte Länge plus gleichzeitig Abnahme des Innendurchmessers um Faktor 2 (Druck: 800 bar)
  - Abnahme des Innendurchmessers um Faktor 2 (Druck: 400 bar)
  - Doppelte Länge plus gleichzeitig um Faktor 2 kleinere Teilchen (Druck: 800 bar)
  - Abnahme des Innendurchmessers um Faktor 2 plus gleichzeitig um Faktor 2 kleinere Teilchen (Druck: 1600 bar – und das ist zur Zeit nicht realisierbar, s. HPLC-Tipp 09/14 und 11/14)
4. *Eine Vorsäule soll zwar eine möglichst große spezifische Oberfläche und eine starke Belegung aufweisen aber sie muss nicht unbedingt das gleiche Material wie die Hauptsäule enthalten*

**Aussage ist korrekt;** Ein große spezifische Oberfläche und eine starke Belegung sind genau das Richtige, um möglichst große Mengen – also effektiv - einer störenden Matrix zu binden. Andererseits können durch die Verwendung einer polarerer Vorsäule als der Hauptsäule (z. B. C18-Hauptsäule, Nitril-, Cyano-, Diol- oder Hypercarb als Vorsäule) polare, früh eluierende Komponenten besser abgetrennt werden.