

## Der HPLC-Tipp im Juni 2015

Dieser Aktion folgt *dieses* Ergebnis – wieso eigentlich (I)?

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Liebe HPLC-Anwenderinnen, liebe HPLC-Anwender,

wie in jedem Jahr, wollen wir uns in den Sommermonaten mit kleinen Tipps beschäftigen; betätigen wir uns in diesem Monat ein wenig „sportlich“ und betrachten folgendes:

Jeder von uns macht in seinem (HPLC-) Alltag mechanisch Handgriffe, die richtig und dienlich sind; auch werden erwartete Ergebnisse als selbstverständlich angesehen – es funktioniert ja alles prima... Wenn man allerdings auf einmal zu einem Tatbestand „dumme“ Fragen stellt, kommt man vielleicht doch ins Grübeln und fragt sich: „Moment mal, wieso ist es eigentlich so?“ Nachfolgend formuliere ich je solch´ drei Fragen, einmal zur Peakfläche und einmal zur Retentionszeit. Wenn Sie möchten, können Sie sie für sich beantworten und im Juli/August-Tipp werde ich auf diese Fragen mit kurzer Kommentierung/Erläuterung zurückkommen. Stellen wir uns für die nachfolgenden Fragen übliche HPLC-RP-Läufe mit einem konzentrationsabhängigen Detektor, z. B. einem UV-Detektor, vor.

### Peakfläche und konzentrationsabhängiger Detektor

1. Nehmen wir an, am Eingang zum Detektor tritt eine Leckage auf und ein Teil der Probe geht dadurch verloren. In diesem Fall nimmt zwar die Probenmasse (absolute Anzahl der Substanzmoleküle) in jenem Segment des Eluenten, in dem die Probe sich befindet, ab, die Konzentration aber (Anzahl der Substanzmoleküle pro Volumeneinheit) bleibt konstant. Das bedeutet also, die Peakfläche muss konstant bleiben – oder?
2. Wenn ich 10 µl injiziere, bekomme ich eine Peakfläche von beispielsweise 5.000 Flächeneinheiten. Wenn ich nun 20 µl injiziere, injiziere ich zwar die doppelte Menge an Moleküle, diese Moleküle befinden sich aber in einem doppelten Volumen, die Konzentration bleibt dadurch konstant und damit müsste die Peakfläche auch konstant bleiben. Tut sie aber nicht – wieso nicht?
3. Ich injiziere 10 µl bei einem Fluss von 1 mL/min, es ergibt sich eine Fläche von 10.000 Flächeneinheiten. Ich injiziere noch einmal diese 10 µl, diesmal bei 2 mL/min. Da ich ja 100% das gleiche injiziert habe, müsste die Peakfläche konstant bleiben - die Peakhöhe lassen wir im Moment außer Acht. Tut sie das wirklich, und wenn nicht, wieso nicht?

### Retentionszeit in einem RP-System

1. Ich injiziere in einem RP-System polare Komponenten, sie eluieren früh; wenn ich den wässrigen Anteil im Eluenten erhöhe, eluieren sie später. Wieso eigentlich? Was ist an folgender Argumentation falsch? Polare Analyte

müssten im polarer gewordenen Eluenten sich nun wohler fühlen („Ähnliches mit Ähnlichem“), sie würden vom Eluenten eher mitgenommen und müssten demnach später eluieren...

2. Benzylamin ist eine starke Base; wieso eluiert eine derart polare Komponente an einer LiChrospher- oder an einer Zorbax ODS-Säule (beide Materialien weisen eine starke Belegung mit C18-Alkylketten auf, folglich sind starke hydrophobe Wechselwirkungen möglich) später als eine hydrophobe, neutrale Komponente wie beispielsweise Toluol?
3. Ich injiziere meine Probe und erhöhe - nach dem Erhalt einer (passablen) Trennung - anschließend den Acetonitril-Anteil im Eluenten. Doch dies führt dazu, dass einige Peaks auf einmal koeluieren, ihre Elutionreihenfolge ändern oder urplötzlich ein Tailing aufweisen. Wieso kann dieser, eigentlich „harmlose“ Schritt solche drastische Erscheinungen als Folge haben?

Ich wünsche Ihnen gute Gedanken, eine sonnige Zeit und bis zum nächsten Monat.