

Der HPLC-Tipp im Juli/August 2015

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

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Schauen wir uns die im letzten Monat beschriebenen Fälle an:

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?

Das ist richtig auch dann, wenn wir zwei mögliche Fälle betrachten: 1. Eine Leckage führt zu einer Abnahme des Flusses, z. B. um 20%. Dadurch verweilen die Moleküle um 20% länger in der Detektorzelle. Die Anzahl der Moleküle ist zwar durch die Leckage geringer geworden, aber jene geringere Anzahl absorbiert um 20% länger UV-Licht, die Fläche bleibt konstant. 2. Die Leckage führt zunächst zur Abnahme der Flussrate, der Druck nimmt ebenfalls ab. Manch eine Pumpe kann über eine eingebaute Korrektur den Fluss nun um jenen Betrag erhöhen, so dass der ursprünglich eingestellte Fluss wieder erreicht wird. Die Ausgangssituation ist erneut hergestellt worden, die Peakfläche bleibt konstant.

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?

Das Volumen, in dem die Probenmoleküle sich befinden ist das Peakvolumen (Fluss x Peakbreite). Wenn in beiden Fällen das Peakvolumen konstant bleibt (Beweis: Peakbreite bleibt konstant, also Überladung liegt nicht vor) bedeutet dies gleichzeitig, dass in diesem konstant gebliebenen Peakvolumen die doppelte Anzahl an Molekülen sich befinden, die Konzentration nimmt um Faktor 2 zu, die Peakfläche ebenso.

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?

Im Prinzip der identische Fall wie unter 1: Wenn der Fluss sich ändert, ändert sich die Verweildauer der Moleküle in der Detektorzelle und somit die Zeit für die UV-Absorption. Der aktuelle Fluss beeinflusst somit die sich aktuell ergebende Peakfläche: Wenn der Fluss zunimmt, nimmt die Peakfläche ab und umgekehrt, es gilt: Fluss x Fläche = konstant – für einen Konzentrations-abhängigen Detektor wie z. B. DAD!

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...

Jedes reale Molekül enthält mindestens einen Kohlenstoff plus „irgendetwas“, somit ist *jedes* Molekül (bis auf das Oxoniumion H_3O^+) hydrophober als ein Wassermolekül. Das bedeutet, jede Substanz muss mit einem RP-Material eine stärkere Wechselwirkung als ein Wasser-Molekül eingehen – ob sie will oder nicht. Je mehr Wasser also der Eluent enthält (bis hin zu 100% Wasser bei „AQ“-Phasen) umso intensiver wird die Substanz „komplimentiert“/gezwungen, mit der stationären Phase in stärkere Wechselwirkung zu treten und eluiert somit später.

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 Toluol?

Vorbemerkung: Hydrophobe Wechselwirkungen sind nicht so stark wie polare Wechselwirkungen. Eine starke Base (also eine recht polare Komponente) kann mit polaren Gruppierungen an der stationären Phase wie Restsilanole starke Wechselwirkungen eingehen. Und solche Restsilanole – die in diesem Fall sogar dissoziiert vorliegen und somit ganz schön „aggressiv“ sind – gibt es bei diesen älteren Materialien wie „Sand am Meer“ – ein größeres „Glück“ für eine Base ist kaum vorstellbar, sie bleibt sehr gerne dort und eluiert (wenn überhaupt...) sehr spät.

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?

Eine Erhöhung des Acetonitril-Anteils bedeutet eine Erhöhung der Elutionskraft der mobilen Phase, die Peaks eluieren früher. Soweit so gut – nur: Diese

Beschleunigung ist im Falle von unterschiedlichen Substanzen nicht für alle Substanzen gleich, einige Peaks marschieren schneller nach vorne, einige langsamer, das Ergebnis lautet: Es sind alle mögliche Variationen denkbar. Derartige Beispiele gibt es viele, ich zeige Ihnen eines aus der Literatur, s. Abbildung 1.

Abb. 1

Abb.1 Elutionsreihenfolge abhängig von der Eluenten-Zusammensetzungen im Falle von unterschiedlichen Substanzen in der Probe (Base, Säure, neutrale Komponente), Details, s. Text

In Abbildung 1 wird der Ink-Wert (k : relative Retentionszeit) von drei unterschiedlichen Substanzen in Abhängigkeit von % Acetonitril in der mobilen Phase dargestellt. Es ergeben sich je nach Eluentenzusammensetzung folgende Elutionsreihenfolge der Komponenten:

Bei 30% ACN: 1, 2, 3

Bei 40% ACN: 1, Koelution 2+3

Bei 70% ACN: Koelution 1+2, 3

Bei 90% ACN: 2, 1, 3

Wenn schließlich auf einmal ein Peak ein auffallendes Tailing zeigt, könnte der Grund mit einer Veränderung des pH-Wertes nach der Zugabe/Veränderung des organischen Anteils im Eluenten zusammen hängen (s. auch HPLC-Tipp April 2015).