

Die kleinen HPLC-Tipps im September

Peakfläche und Injektion, Spülen von RP-Säulen

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Einiges verschiebt sich immer mehr nach hinten: Ende der Pubertät, aktives Arbeitsleben – nicht zuletzt der Sommer. Also definieren wir kurzerhand den September als „Sommermonat“, so dass wir uns auch heute mit kleinen Tipps beschäftigen wollen, es geht um folgende zwei Themen:

Bei Wiederholinjektionen mangelnde Reproduzierbarkeit der Peakfläche(n) bzw. fehlerhafte Peakfläche z. B. im Rahmen einer Methodenübertragung. Zu besprechende Ursache heute, Injektion im erweiterten Sinne.

Weitgehend bekannte Ursachen wie Leckage, Luft in der Spritze, verstopftes Nadelloch durch Dichtungsmaterial/Septumpartikelchen/Salz etc. lassen wir heute außer Acht, ich würde gerne eher auf Sachen eingehen, an die man vielleicht nicht sofort denkt. Nachfolgend stichwortartig einige Ideen und Denkanstöße.

Erstes großes Thema: Memory-Effekt durch Physisorption bestimmter Analyte an unterschiedlichen Oberflächen. Merke: Die Affinität gegenüber Oberflächen hängt nicht nur vom Material der Oberfläche selbst, sondern auch von den chromatographischen Bedingungen ab.

- Unterschiedliches Material der Kapillare (Peek vs. Stahl)
- Unterschiedliches Material der Nadel (Stahl vs. Messing vs. Titan vs. Peek vs. Keramik) auch hier evtl. Memory-Effekt durch Adhäsion – nicht nur bei Proteinen!
- Die Kanülen am Rotorseal sind teilweise z. B. mit Matrix aus der Probe (Tween, Sorbat, Stearat usw.) belegt, dort kann auch etwas „hängen“ bleiben
- Bei den vials Unterschiede in der Glasoberfläche (großes Problem!) bzw. in der Farbe (weiß vs. braun – Metallionen aufgrund der Braunfärbung)
- Die Art der Nadelspülung beeinflusst die Effektivität dieses Vorgangs: Welche Waschflüssigkeit wird verwendet, Spülung nur von außen oder auch durch die Nadel, wird quasi „off-line“ gespült oder wird ein wasch-vial verwendet in das die Nadel eintaucht, etc.?
- Die verwendeten Septen können bzgl. Memory-Problematik eine entscheidende Rolle spielen: „Sandwich-Septen“ (Septum-Drähtchen-Septum) vs. Silikon, vs. Teflon, vs. dunklen (letztere sind hart und sie „bröseln“ auch wenn es warm wird) vs. hellen

Fassen wir alle anderen Probleme, die mit mangelnder Reproduzierbarkeit zu tun haben, zusammen:

- Autosampler-Prinzip: Fixed-Loop vs. Standard Flow-Through vs. optimiertem Flow-Through

- Unterschiedliches Schleifenvolumen im Zusammenhang mit dem Injektionsvolumen
- Das Ende der Nadel ist minimal verbogen – Δ Injektionsvolumen
- Unterschiedliche Ansauggeschwindigkeit; Wichtig bei viskosen Probenlösungen, so sind beispielsweise wässrige Pufferlösungen recht viskos
- Vorgeschlitzte Septen vs. dicht verschlossenen vials:
 - Bei dicht verschlossenen vials wird durch den Unterdruck bei der ersten Injektion die Probenlösung in die Nadel regelrecht gedrückt; Ab der zweiten Injektion aus dem gleichen vial ist ein Druckausgleich möglich, das Injektionsvolumen ist etwas anders. Das ist häufig der Grund, warum man bei Wiederholinjektionen aus einem vial oft die erste – oder auch zweite - Injektion „vergessen“ kann.
 - Bei dicht verschlossenen vials kann abhängig von der Füllhöhe durch den Unterdruck die Probenlösung die Unterseite des Septums berühren, ein winziger Teil bleibt womöglich dort haften und möglicherweise ändert sich dadurch die Konzentration. Dieser Fehler kann sich marginal bis merklich erweisen - abhängig von der Dauer der Sequenz und der Anzahl der Injektionen
- Ungewollte Änderung der Konzentration im vial (relevant nur für Konzentrations-abhängige Detektoren wie dem UV- und dem Fluoreszenzdetektor)
 - Dichtegradient wg. eines Temperaturgradienten im vial (z. B. Probe war tiefgefroren/im Kühlschrank)
 - Probenlösungsmittel verdampft (es ist warm und der Autosampler wird nicht (genügend) gekühlt) bzw. es kondensiert an der unteren Seite des Septums
 - Entmischung oder Schlierenbildung im vial, Sedimentation, Nachfällung (z. B. wg. Δ Temperatur, Δ Beschaffenheit der Glasoberfläche)

Schließlich sei nur kurz auf folgende Problematik hingewiesen: Manche Autosampler (aber auch Detektoren...) mögen offensichtlich den Sommer gar nicht. Das Kondenswasser kann schon mal ein Problemchen verursachen und direkte Sonneneinstrahlung kann dazu führen, dass manch eine Elektronik „spinnt“: Das vial wird gar nicht gefunden, oder nur manchmal oder der Autosampler steigt ganz aus, oder ... Also: Autosampler evtl. etwas kippen, damit das Wasser auslaufen kann und/oder Ihren armen Autosampler mithilfe einer Pappe oder einer schwarzen Folie von der Sonne schützen. Dass übrigens Ihr Autosampler „lebt“ und seine Elektronik Vorlieben entwickeln kann sehen Sie daran, dass sie einige Septen und Kappen eher mag und andere wiederum ignoriert und sie als solche gar nicht erkennt, z. B: Weiße Septen werden von XYZ nicht erkannt, blau schon, oder: Alu-Kappen reflektieren Licht, dadurch kann der lineare Bereich eines DAD beeinträchtigt werden, rote Kappen dagegen sind OK usw.

Spülen von RP-Säulen

Das Thema haben wir an dieser Stelle mehrmals behandelt, ich möchte Ihnen heute für hartnäckige Verunreinigungen kurz 2-3 Tipps geben:

Hartnäckige polare Verunreinigungen

Solche sind natürlich mit Wasser herunter zu spülen. Sollte dies nicht reichen, müssten Sie noch polarer werden, z. B: 0,01 N Salpetersäure oder eine KCl- oder NaCl-Lösung verwenden. Alle drei Flüssigkeiten sind polarer als Wasser, vielleicht klappt es besser.

Hartnäckige apolare Verunreinigungen

Solche sind natürlich mit Acetonitril herunter zu spülen. Sollte dies ebenfalls nicht reichen, müssten Sie noch apolarer werden. Sehr gut ist DMSO (Dimethylsulfoxid), das mit Abstand beste jedoch ist DMF (Dimethylformamid). Ich weiß schon, dass es wg. seiner Toxizität nicht besonders beliebt ist. Sollten Sie jedoch mit sehr hartnäckigen organischen Verunreinigungen zu tun haben, wäre dieser Ausweg überlegenswert. Merke somit bzgl. Spül-Effektivität für organische Verunreinigungen: DMF>DMSO >Iso-OH>ACN>MeOH.