

Der HPLC-Tipp im März

## Modernes HPLC/UHPLC gekauft, dennoch unzufrieden – warum? I

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

### Der Fall

Sie haben ein modernes HPLC- oder gar ein recht teures UHPLC-Gerät gekauft. Voller Freude sind Sie auf die ersten tollen Ergebnissen gespannt. Dann die große Enttäuschung: Ihre Peaks zeigen ein Fronting, die Auflösung ist schlechter als an Ihrer alten „Kiste“ und/oder die Peaks sind wesentlich kleiner als sonst. Dass das Gerät qualifiziert wurde und demnach keine technischen Probleme vorliegen, ist völlig klar. Was ist los?

### Die Lösung

Lasst uns jedes Problem, das ich weiter oben genannt habe, separat behandeln. Betrachten wir heute das Fronting und im April-Tipp widmen wir uns der schlechteren Auflösung und dem Empfindlichkeitsverlust. Dazu ein realer Fall: An einem alten Gerät war die Peakform einwandfrei, an dem modernen Gerät lag ein Fronting vor, s. Abbildung 1: Links das Chromatogramm am alten Gerät, rechts am Neuen.

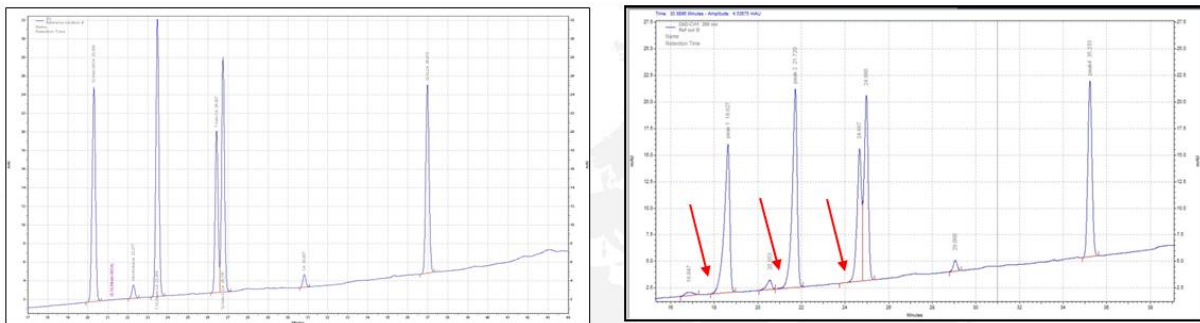
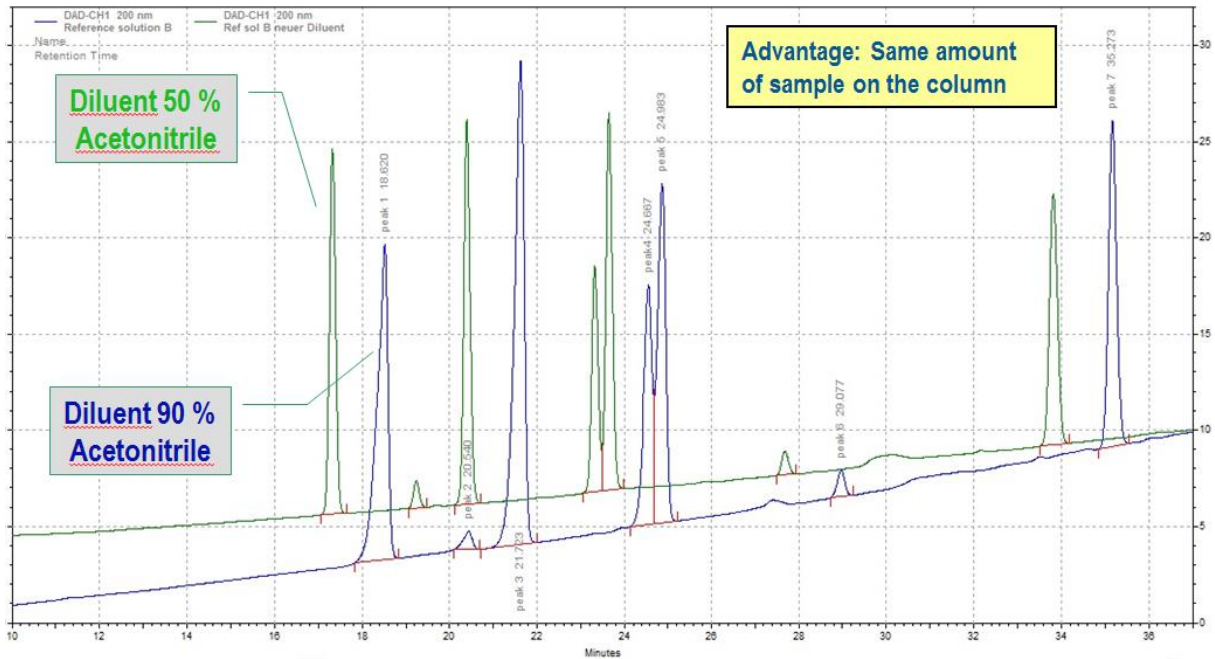


Abb. 1 Symmetrische Peakform vs. Fronting abhängig vom Totvolumen des Gerätes, Details, s. Text

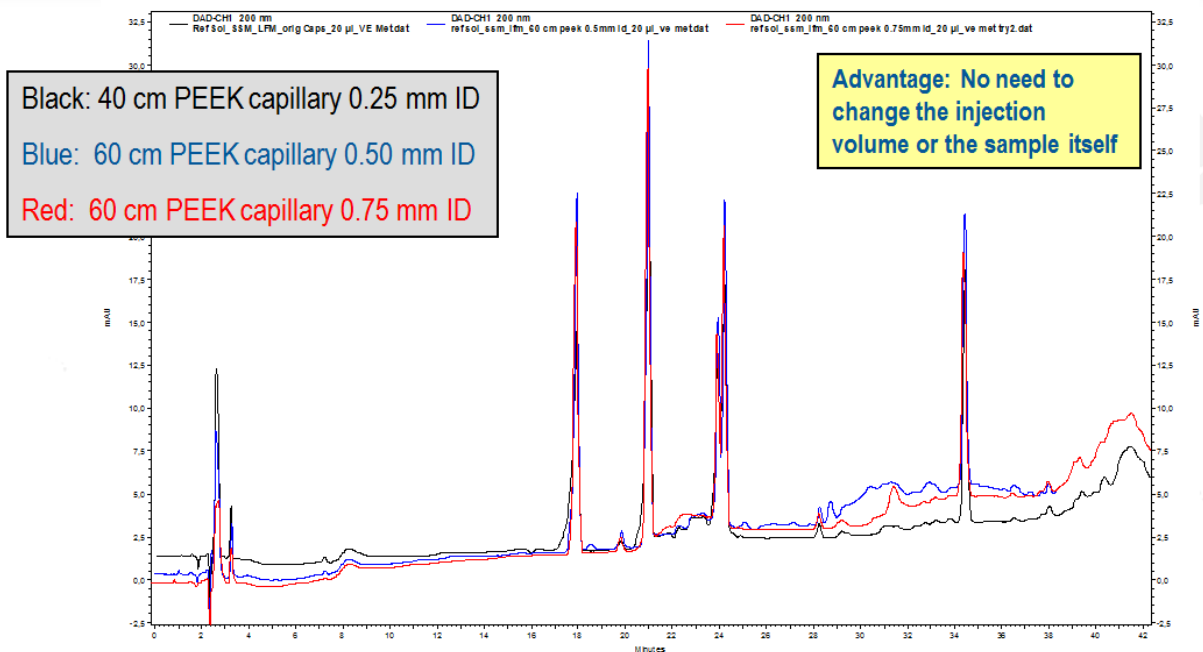
Die Probe war in 90/10 ACN/Wasser aufgelöst, der Gradient fing mit 80/20 Wasser/ACN an. Das Problem ist klassisch und liegt an dem stärkeren Probenlösungsmittel (viel ACN) im Vergleich zum Anfangsgradienten (viel Wasser). Das neue Gerät weist ein kleines Totvolumen auf, also befindet sich mehr ACN im Peakvolumen, d.h. dort wo die Substanz sich just im Moment des Eintritts in die Säule aufhält. Beim alten Gerät haben wir ein größeres Totvolumen, folglich hat die Substanz im größeren Peakvolumen mehr Zeit und somit eine erhöhte Chance für eine bessere Durchmischung – eine symmetrische Peakform ist die Folge. Die schnellste und einfachste Lösung wäre weniger injizieren. In einem reglementierten Umfeld ist dies jedoch schwierig, die injizierte Menge sollte konstant bleiben. In diesem Fall gibt es zwei Auswege: Erstens, die Injektionslösung wird um Faktor zwei verdünnt und es wird um Faktor zwei mehr injiziert, s. Abbildung 2.



Countermeasure: Dilute the sample in 50 % ACN or best in start eluent if possible (20 % ACN in this case)

Abb. 2. Peakform abhängig vom Probenlösungsmittel, Details, s. Text

Zweitens, man vergrößert das Totvolumen am modernen Gerät indem man eine etwas längere/dickere Kapillare einbaut, s. Abbildung 3



Countermeasure: Install a longer capillary with a wider ID to have a better mixing of the ACN in a bigger peak volume – more time for a better mixing at the entry of the column head

Abb. 3. Peakform abhängig vom Volumen zwischen Autosampler und Säule im Falle eines starken Probenlösungsmittels, Details, s. Text

## **Das Fazit**

Wenn aufgrund von Löslichkeitsproblemen der Eluent nicht als Probenlösungsmittel verwendet werden kann, letzteres stärker als der Eluent ist und ferner nicht weniger injiziert werden darf, gibt es folgende zwei Auswege: Entweder das Probenlösungsmittel möglichst „Eluent-ähnlich“ machen oder das Volumen zwischen Autosampler und Säule etwas vergrößern.