

Der HPLC-Tipp

Die Kleinen im Juli/August

©Dr. Stavros Kromidas, www.kromidas.de

Unsere heutigen Themen sind:

- Permanent auftretender Geisterpeak
- Faustregeln zu Log P und Log D
- Abnahme der Auflösung – eine mögliche Ursache

Seit kurzem erscheint ein Geisterpeak bzw. stets ein Blindwert im Blank...

Seit einiger Zeit taugt bei einer Methode – oder bei mehreren – die noch vor kurzem keine Probleme machte(n), ein Geisterpeak auf. Oder aber, Sie haben in Ihrem Blank auf einmal stets einen Blindwert. Und dieses Problem haben Sie unabhängig von der Anlage, dem/der Anwender(in) und sogar der Methode. D.h. das übliche Fehler-Ausschluss-Programm haben Sie gründlich aber leider erfolglos absolviert.

Versuchen Sie in einem solchen Fall im Team sich zu erinnern, welches Ereignis mit dem Erscheinen des Problems möglicherweise zusammenfällt. Nachfolgend einige mögliche Ursachen für das weiter oben beschriebene Problem:

- Lieferung von neuen (kontaminierten) vials; durch das Reinigen bzw. das Einsetzen einer neuen Charge verschwindet das Problem. Analoge Fälle: Neue Filter, neue Pipettenspitzen, neue Aufsätze für die Eluentengefäße usw.
- Man hat das Spülmittel bzw. die Klärlösung des Spülautomaten gewechselt. Mit diesem Problem verwandt: Seit jenem Zeitpunkt werden Etiketten überhaupt oder andere Etiketten (evtl. anderes Lösungsmittel für den Kleber?) verwendet. Oder: Sie benutzen einen anderen Stift zum Beschriften von Etiketten bzw. Glaskolben und diese Utensilien werden im Spülautomaten gereinigt
- Neue Mitarbeiterin, die nun die Proben ansetzt und/oder verteilt. Macht die neue Kollegin evtl. eine Hormontherapie (ein wahrlich schwieriger Fall, da dies eine recht persönliche Situation ...) oder trägt sie ein bestimmtes Parfum?
- Wurden im Probenvorbereitungsraum neue Fensterdichtungen eingebaut, sind für die neue Klimaanlage Plastikröhre verwendet worden (die alte Anlage hatte Metallröhre), sind zwei große Plastikkanister aufgestellt worden? In solchen Fällen kann sich bei frischen Kunststoff-Gegenständen zu Beginn das Ausdunsten von Weichmachern bemerkbar machen
- Hat sich das Reinigungspersonal gewechselt? Verwendet die neue Kraft/der neue Kontraktpartner ein anderes Zitronenkonzentrat?
- Neuer Lieferant/andere Charge der Ionenaustauscherkartusche oder des Kohlefilters für die Wasseraufbereitungsanlage?
- Wird seit jener Zeit Acetonitril aus Stahlfässern statt aus Glasbehältnissen verwendet?
- Befindet sich das Labor in einem Industriepark/Industriegebiet und wird seit kurzem in unmittelbare Nachbarschaft ein neues Produkt hergestellt?

Sie können sich vorstellen, dass die Liste hier lang sein kann. Ein „in sich gehen“ und eine gründliches „Grübeln“ lohnt sich.

Zwei grobe Faustregeln zu Log P und eine zu Log D

1. Log P und % ACN

Manchmal findet sich bei den Substanzdaten auch der log P-Wert (Verteilungskoeffizient Wasser/Octanol). Multiplizieren Sie diesen log P Wert mit der Zahl 15. Substanzen mit einem Molekulargewicht zwischen ca. 350-500, also eher kleine Moleküle, eluieren im isokratischen Modus an einer hydrophoben endcappeden C₁₈-Säule und einem Eluenten, dessen Anteil % ACN gleich dem sich ergebenden Produkt log P x 15 entspricht, mit einem Retentionsfaktor von ca. 4. Und dieser Wert ist recht vernünftig, d.h. es herrschen ausreichend starke Wechselwirkungen.

2. Log P und Wahl der stationären Phase

Folgende Faustregeln gelten zur Auswahl der stationären Phase bzw. des empfohlenen Trennmodus abhängig vom Log P-Wert der Zielkomponente:

- Log P 2 - 3: Moderat polare C18
 - 0 - 1: Polare C18, C1-C8
 - 1 - 2: Stark polare Phase wie PFP, CN, Amid
 - 3 - 4: HILIC, Normal Phase

3. Falls (auch) der Log D-Wert bekannt ist:

- Log D \ll Log P: Es handelt sich um eine stark ionische Komponente, der empfohlene Trennmechanismus wäre hier Ionenaustausch
- Log D (bei pH = 7) < -2,5 : Sehr polare Komponente
 - 2,5 – 2: Polare Komponente
 - > 2,0 : Apolare Komponente

Die geforderte Auflösung wird seit kurzem gerade nicht erreicht

Betrachten wir folgende Gradientenmethode:

Eluent A: Acetatpuffer 10 mMol, pH-Wert = 3,95 + Methanol. Nach der Zugabe von Methanol ergibt sich ein pH-Wert von 4,04 (bekannte Verschiebung nach der Zugabe eines organischen Lösungsmittels)

Eluent B: (mehr) Methanol + Acetatpuffer, es ergibt sich ein pH-Wert von 5,88

Seit Jahren konnte die geforderte Auflösung $R = 2$ erreicht werden. Seit kurzem jedoch ergibt sich eine Auflösung von lediglich $R = 1,9$, was dem Kriterium des Systemeignungstests knapp nicht entspricht. Eine mögliche Ursache: Es werden neue Geräte eingesetzt, die in unmittelbarer Nähe der besagten Anlage aufgestellt worden sind – und dort ist es eng... Die merkliche Hitzeentwicklung führt dazu, dass durch die Temperaturerhöhung in unmittelbarer Nähe der Lösungsmittel-Reservoirs der pH-Wert sich verschiebt, zumal mit 10 mMol die Pufferkapazität recht gering ist...