

Der HPLC-Tipp im April

Wie kann die Bodenzahl erhöht werden?

von Dr. Stavros Kromidas, Saarbrücken

Der Fall

In einem der nächsten HPLC-Tipps werden wir uns über folgenden Fakt unterhalten: Eine Erhöhung der Selektivität stellt mit Abstand die effektivste Maßnahme dar, um die Auflösung zu verbessern. Folglich sollte diesem Schritt als erstem die ganze Aufmerksamkeit zu Beginn einer Methodenoptimierung geschenkt werden. Wenn jedoch eine Verbesserung der Selektivität mit einem vertretbaren Aufwand nicht zu erzielen ist, wäre die Erhöhung der Bodenzahl der zweitbeste Weg. Welche Möglichkeiten gibt es nun, dies zu erreichen und welche Maßnahme „bringt“ wie viel?

Die Lösung

In Abb. 1 sind die Möglichkeiten zusammengefasst, die zu einer Erhöhung der Bodenzahl führen.

Symbol-Erklärung:

N: Bodenzahl

R: Auflösung („Resolution“)

S/N: Peak/Rausch-Verhältnis („Signal to Noise“), Maß für die Nachweisgrenze

t_R : Retentionszeit

„LM-Verbr.“: Lösungsmittelverbrauch

L: Länge

d_p : Partikeldurchmesser („Diameter Particle“)

T: Temperatur

ID: Innendurchmesser

„x“: „Erhöhung bzw. Erniedrigung um Faktor „x“

Abb. 1, siehe letzte Seite

Kurze Kommentierung der Tabelle in Abb. 1

Zunächst folgendes vorweg: Eine Verringerung des Innendurchmessers führt zu einer Erniedrigung der relativen Massenempfindlichkeit – und des Lösungsmittelverbrauchs -, der Innendurchmesser hat allerdings nichts mit der Auflösung zu tun. Da er jedoch immer wieder fälschlicherweise mit der Auflösung in Verbindung gebracht wird, habe ich auch den Innendurchmesser als Parameter in die Tabelle mit aufgenommen. Damit haben Sie ein „rundes“ Bild der Zusammenhänge.

Wie in einigen der jüngst erschienenen HPLC-Tipps demonstriert, gibt es eine Reihe von einfachen, kostenlosen oder quasi „kostenlosen“ Maßnahmen, die zu einer merklichen Verbesserung der Peakform führen können:

- **Einstellparameter** : Z.B. Zeitkonstante, Datenaufnahmerate
- „Optimierte“ **Injektion**: Evtl. Probenlösungsmittel bzw. pH-Wert der Probenlösung ändern, Probe verdünnen, Injektionsvolumen verringern
- **Totvolumen der Apparatur**: Kapillarinne Durchmesser und vor allem Zellvolumen verringern (Details, s. HPLC-Tipp im Mai)

Erhöhung der Säulenlänge um Faktor 2 führt...

... zu einer Erhöhung der Bodenzahl um Faktor 2, das führt wiederum zu einer Verbesserung der Auflösung um Faktor 1,4 bei einer allerdings um Faktor 1,4 höheren Nachweisgrenze, einer doppelten Retentionszeit, einem doppelten Lösungsmittelverbrauch und einem doppelten Druck

Erniedrigung der Korngröße um Faktor 2 führt...

... zu einer Erhöhung der Bodenzahl um Faktor 2 und damit Verbesserung der Auflösung um Faktor 1,4 bei einer um Faktor 1,4 niedrigeren Nachweisgrenze, einem um Faktor 4 höheren Druck und konstantem Lösungsmittelverbrauch

Erhöhung der Säulenlänge um Faktor 2 und gleichzeitig Erniedrigung der Korngröße um Faktor 2 führen...

... zu einer Erhöhung der Bodenzahl um Faktor 4 und damit Verbesserung der Auflösung um Faktor 2 bei einer um Faktor 2 längeren Retentionszeit, einer konstant gebliebenen Nachweisgrenze, einem um Faktor 8 höheren Druck und einem um Faktor 2 höheren Lösungsmittelverbrauch

Erhöhung der Temperatur um Faktor 2

Bemerkung: Genaue Faktoren für die jeweilige Änderung sind schwer vorhersehbar, jene hängt u.a. stark vom Mechanismus ab. Halten wir dennoch wie folgt fest: Erhöhung der Bodenzahl (ob letzten Endes die Auflösung zu- oder abnimmt hängt vom Mechanismus ab), Abnahme der Retentionszeit und des Lösungsmittelverbrauchs bei einer Abnahme des Druckes um Faktor 2.

Bemerkungen:

1. Das oben aufgeführte gilt für isokratische Trennungen, beim Gradienten sind die Verhältnisse etwas komplizierter (1)
2. Die Praktikabilität einer Maßnahme sollte selbstverständlich ebenso stark im Fokus liegen - neben dem eigentlichen Ziel, der Verbesserung der Auflösung. So ist beispielsweise der Einsatz von (sehr) kleinen Teilchen nur in dafür ausgelegten Apparaturen möglich (Druck, Totvolumen!) – sofern man die Trennleistung der kleinen Teilchen möglichst ohne Verluste nutzen möchte. Oder aber, man optimiert die Apparatur selbst, das ist mit einem gewissen Aufwand schon möglich. Desweiteren bedarf es im Falle von „schwierigen“ Matrices unter Umständen einer aufwendige(n) Probenvorbereitung.

Das Fazit

Es stehen uns eine Reihe von Möglichkeiten zur Erhöhung der Bodenzahl zur Verfügung. Es liegt auf der Hand, dass die einfachste – „richtige“ Einstellparameter

vorausgesetzt – die optimale Injektion und die eleganteste die Verringerung der Korngröße darstellen. Das vorhandene Equipment und die Natur der Probe/Matrix entscheiden letzten Endes im Wesentlichen über die Praktikabilität und die Erfolgchancen einer Maßnahme. Ich hoffe, Abb 1. und die Kommentare dazu sind für Sie eine kleine Entscheidungshilfe, wenn es um Wege zu einer Erhöhung der Bodenzahl geht.

(1) H.-J. Kuss, S. Kromidas, unveröffentlichte Ergebnisse

Abb. 1 Möglichkeiten zur Erhöhung der Bodenzahl

Was	Vorteile		Nachteile				Kommentar
	N	R	S/N	t _R	LM-Verbr.	Druck	
2 x L	2 x	1,4	↓1,4	2 x	2 x	2 x	Robustheit gegeben
1/2 dp	2 x	1,4	↑1,4	-	-	4 x	Höherer Fluß möglich (Fläche?!) Robustheit?, Lebensdauer? Totvolumina?
2 x T	↑	?	↑	↓	↓	1/2	Selektivität?, Lebensdauer?
(1/2 ID	-	-	4 x	1/4	1/4	4 x)	Überladung?, Totvolumina?

* Verringerung des Flusses: Unterhalb ca. 5 µm geringer, unterhalb 3 µm kaum nennenswerter Effekt

* Verringerung des Totvolumens: Je kleiner das Säulenvolumen und die Korngröße um so wichtiger - ja manchmal unabdingbar

* Darüber hinaus: Injektionsvolumen verringern, Probenlösung verdünnen, Einstellparameter der Trennung anpassen

NOVIA