

## Der HPLC-Tipp im Mai

„Trennleistung“, „Effizienz“, „Bandenverbreiterung“ das alles bedeutet doch fast das gleiche – oder?

Von Dr. Stavros Kromidas, Saarbrücken

### **Der Fall**

Betrachten wir die drei Säulen: 250 mm/5 µm, 150 mm/3 µm und 75 mm/1,5 µm. Mit Hilfe der empirischen Formel: Bodenzahl = 3.000 x Länge der Säule (in cm) durch Teilchengröße (in µm) stellen wir leicht fest, dass alle drei Säulen – vorausgesetzt sie sind gleich gut gepackt – die gleiche Bodenzahl, nämlich  $3.000 \times 5 = 15.000$  Böden liefern. Sind nun die Säulen wirklich vergleichbar, kann ich also bei gleicher Bodenzahl (15.000 Böden) und völlig identischen chromatographischen und apparativen Bedingungen die gleiche Trennung, sprich die gleiche Auflösung erwarten? Bemerkung: Vorteile der kürzeren Säulen wie Retentionszeit- und Eluentensparnis bleiben hier außer Acht, es geht ausschließlich um Auflösung.

### **Die Lösung**

Nein, bei weitem nicht!

Die Bodenzahl ist ein Maß für die Bandenverbreiterung der Substanzzone in einer chromatographischen Anlage. Je geringer die Diffusion der Probenmoleküle auf dem Weg von der Injektion bis zur Detektion, umso schmaler der Peak, umso höher die Bodenzahl. In diesem Fall sprechen wir von einer guten Trennleistung bzw. Effizienz (Bemerkung: „Effizienz“ und „Trennleistung“ sind streng genommen nicht das gleiche – Trennleistung = Bodenzahl/Retentionszeit – aber im hiesigen Zusammenhang können wir beide Begriffe vereinfacht gleichsetzen). Vorausgesetzt, dass erstens die Trennungen bei identischen Bedingungen inkl. Einstellparametern stattfinden und zweitens die Packungsqualität bei allen drei Säulen völlig identisch ist, wird die Bandenverbreiterung zusätzlich durch folgende zwei Faktoren beeinflusst: Injektionsvolumen und Totvolumen der Apparatur - also Kapillarovolumen, Säulenvolumen, Zellvolumen. Man kann mit Hilfe einer Varianzanalyse (ANOVA) ausrechnen, wie nun beim Einsatz von Säulen identischer Bodenzahl die tatsächliche Bandenverbreiterung im Gerät ausfällt. Darüber hinaus ist es möglich, durch Veränderung der Zahlenwerte für das Injektionsvolumen, den Kapillarinne Durchmesser und das Zellvolumen festzustellen, wie stark der Einfluss

dieser apparativen Parameter auf die Bandenverbreiterung bei Verwendung der jeweiligen Säule ist. Ich habe zunächst Zahlenwerte für mehrere Kombinationen ermittelt und anschließend zur Bestätigung einige Experimente durchgeführt. Nachfolgend sind ausgewählte Ergebnisse in Kurzform zusammengefasst.

#### Bemerkung

Das Säulenmaß 75 mm/1,5  $\mu\text{m}$  ist recht ungewöhnlich, deswegen habe ich für die Beispielerrechnungen das eher übliche Maß 50 mm/1,8  $\mu\text{m}$  berücksichtigt.

#### **250 mm/5 $\mu\text{m}$ -Säule**

Aus 10  $\mu\text{L}$  Injektionsvolumen ergibt sich für eine Komponente mit einem Retentionsfaktor  $k$  von 1, einem 0,17 mm Kapillarinne Durchmesser und einem Zellvolumen von 8  $\mu\text{L}$  ein Peakvolumen (Volumen in dem sich die Probe beim Eintritt in den Detektor befindet) von 177  $\mu\text{L}$ , d.h. die Probenlösung verbreitert sich um ca. Faktor 18 auf dem Weg vom Injektor bis zum Detektor. Bei Verwendung eines Kapillarinne Durchmessers von 0,10 mm reduziert sich das Peakvolumen lediglich auf 176  $\mu\text{L}$ ! Die Reduzierung des Zellvolumens von 8 auf 2  $\mu\text{L}$  führt zu einem Peakvolumen von 165  $\mu\text{L}$ , also zu einer Abnahme um nur ca. 7%. Die Peakverbreiterung in der Säule macht ca. 85% der Gesamtverbreiterung aus, die restlichen 15% bedingt durch das Gerät fallen kaum ins Gewicht.

#### **150 mm/3 $\mu\text{m}$ -Säule**

Aus 10  $\mu\text{L}$  Injektionsvolumen werden hier 119  $\mu\text{L}$  Peakvolumen, die Peakverbreiterung in der Säule macht hier ca. 68% der Gesamtverbreiterung aus, d.h. das Totvolumen der Apparatur ist hier wesentlich wichtiger/kritischer. Eine Reduzierung des Zellvolumens von 8 auf 2  $\mu\text{L}$  führt zu einer Abnahme des Peakvolumens um immerhin ca. 28% (gegenüber von nur 7% bei der längeren Säule).

#### **50 mm/1,8 $\mu\text{m}$ -Säule**

Aus 1-2  $\mu\text{L}$  werden 34  $\mu\text{L}$  Peakvolumen. Bei einem Zellvolumen von 1  $\mu\text{L}$  beträgt die Peakverbreiterung in der Säule ca. 90%, bei einem Zellvolumen von 2  $\mu\text{L}$  ca. 78% und bei einem Zellvolumen von 8  $\mu\text{L}$  ca. 20%! D.h. würde man diese kurze Säule mit diesen kleinen Teilchen verwenden und würde weiterhin die klassische 8  $\mu\text{L}$  statt der 1  $\mu\text{L}$ -Zelle verwenden, verlöre man enorm an Auflösung, denn die Bandenverbreiterung im Gerät wäre wesentlich größer als in der Säule selbst! Das bedeutet, ein kleines Totvolumen der Apparatur ist hier wichtiger als eine gut gepackte Säule, merke: Eine nicht exakt eigebaute Säule, ein nicht perfekt sitzender Fitting, ein um 1 oder 2  $\mu\text{L}$  größeres Zellvolumen usw. machen in diesem Fall die Verwendung einer eigentlich gut gepackten Säule „überflüssig“ und eine eigentlich zu erreichenden Trennung zunichte. Wir haben festgestellt, dass bei anspruchsvollen, schwierigen Trennungen sogar eine „andersherum“ angeschlossene Kapillare am

Detektor einen starken Einfluss haben kann. Auf der anderen Seite ist es mir nicht gelungen, trotz mutwilligen Einbaus eines schlechten Fittings (Totvolumen!), einer 40 cm 0,25 mm Kapillare und einer 16  $\mu$ L Zelle die Peaksymmetrie eines spät eluierenden Peaks an einer 250 mm Säule merklich zu verschlechtern.

### **Das Fazit**

Im Falle von längeren als ca. 150 mm Säulen kann man – etwas vereinfacht formuliert – das Totvolumen der Apparatur (Kapillar-, Zellvolumen etc.) und die Einstellparameter getrost „vergessen“. Bei Säulen kürzer als 100 geschweige denn 50 mm spielen Einstellparameter und das Totvolumen der Apparatur *die* zentrale Rolle. Gesellen sich noch 2  $\mu$ m/sub2  $\mu$ m – Teilchen hinzu, stellt das Bemühen um eine optimale Apparatur einen wesentlicheren Erfolgs-versprechenden Faktor als das Finden einer „gut“ gepackten Säule dar. Ansonsten fährt man einen Ferrari permanent mit 40 km/h – ein Mofa tut´s auch und ist dazu billiger...