

Der HPLC-Tipp im Juli – Verschiebung der Retentionszeit

Im Juni-Tipp haben wir uns mit der Verschiebung der Retentionszeit beschäftigt, die Ursachen lagen in einer Veränderung der stationären Phase im Sinne der „Chemie“. Heute werden wir uns Änderungen der mobilen Phase widmen. Auch heute geht es um ungewollte Veränderungen, also um solche, die nicht vom Anwender bewusst vorgenommen wurden, z.B. Eluenten-Zusammensetzung oder pH-Wert verändert.

Nachfolgend werden einige Gründe für eine veränderte Eluenten-Zusammensetzung genannt. Sie resultieren durch kleine, ung(b)eachtete Variationen beim Ansetzen der mobilen Phase oder während der Trennung.

- Ein Eluent wird z.B. dadurch hergestellt, dass die wässrige (z.B. Puffer) und die organische Phase (z.B. ACN mit etwas Tetrahydrofuran) gleichzeitig in das Eluenten-Vorratsgefäß hinein gekippt werden. Das nächste Mal liegt die wässrige Phase vor und in diese wird anschließend der organische Anteil hinein gekippt. Bei der ersten Variante kann es im Falle von größeren Mengen an Puffer - da es ja durch das Mischen von ACN-haltigen Lösungen plötzlich recht kalt wird - zum Niederschlag kommen. Neben den bekannten Problemen in der Pumpe ist eine Retentionszeit-Verschiebung möglich. Diese Gefahr ist bei der zweiten Variante des Ansetzens kaum zu befürchten. Es kann auch etwas ausmachen, ob beispielsweise zur Durchmischung der zwei Phasen 4 oder 5 Min lang gerührt wird.
- Darüber hinaus kann je nach angewandter Technik der Eluenten-Herstellung (s. weiter oben) eine unterschiedliche Konzentration an THF – aber auch anderer flüchtiger Komponenten – „verloren“ gehen und es kann zu einer veränderten Retentionszeit kommen.
- Heute wird ein Plastik- und das nächste Mal ein Glas-Meßzylinder verwendet. Fragen: Sind beide geeicht, wie sieht es mit Weichmacher aus dem Plastikbehältnis aus, ändert sich vielleicht durch eine Differenz in der Temperatur und deren Einfluss auf die unterschiedliche Materialien das Volumen geringfügig, vor allem, wenn Behältnisse mit unterschiedlichem Volumen verwendet werden?
- Wird stets das gleiche ACN verwendet sowohl bzgl. Qualität („Gradient-Grade“, „Spectro-Quant“, „Hyper-Grade“) als auch bzgl. Lager- bzw. Transportbedingungen (in Stall-, in Aluminium- oder in Glas-Behältnissen)?
- Entmischungsproblematik: Es ist bekannt, dass nach einer gewissen Zeit „stehen lassen“ einer beispielsweise 30/70 THF/Wasser-Mischung zur Schlierenbildung kommen kann. Diese Schlierenbildung wird manchmal auch bei harmlosen ACN/Wasser-Mischungen beobachtet – oft sind die Schlieren erst nach „ordentlichem“ Schütteln erkennbar. Ist dies der Fall, sollte mit Hilfe

eines langsamen(!) (sonst Gefahr zur Luftbildung) Rührers für eine stete und gute Durchmischung gesorgt werden.

- Kommen wir zum Schluss zu dem „berühmten“ 1 %... Ich habe den Eindruck, dass manchen KollegInnen nicht bewusst ist, wie stark 1 oder 2% Differenz an organischem Anteil B in der mobilen Phase die Trennung beeinflussen können. Diese geringe Abweichung kann durch Temperaturdifferenz in Kombination mit einem unterschiedlichen Material eines Behältnisses (geringfügige Änderung des Volumens) oder unterschiedlich präzises Ablesen bei Verwendung unterschiedlicher Behältnisse (einmal 1000 mL, einmal 1500 mL) zustande kommen. Vor allem bei kleineren Volumina oder komplexen Eluenten ist Abwiegen die einzig sichere Vorgehensweise. Und: 1% Differenz an B kann zu einer Verschiebung der Retentionszeit in der Größenordnung von 5-10% führen. Wir schließen unseren heutigen Tipp mit folgendem Fall ab: Zum Ansetzen des Eluenten werden üblicherweise trockene Gefäße verwendet. Es kann sein, dass Mann/Frau beim Ansetzen des Eluenten einen Fehler gemacht hat, der glücklicherweise direkt bemerkt wird. Also wird der falsche Eluent entsorgt und es wird nun neu angesetzt, man verwendet vielleicht das gleiche Gefäß, vielleicht nach einem kurzen Ausspülen. Jetzt befindet sich allerdings an den Gefäßwänden Rest-Lösungsmittel aus dem ersten „Versuch“ bzw. durch das Ausspülen. Macht das wirklich etwas aus? Um das zu überprüfen haben wir zunächst eine Trennung mit einem Eluenten, in einem trockenen Behältnis angesetzt, durchgeführt. Anschließend wurde dieser Eluent entsorgt, das Gefäß kurz mit ACN ausgespült, das Gefäß etwas abgetropft und der gleiche Eluent in diesem „nassen“ Behältnis neu angesetzt. In Abb. 1 wird im oberen Bild die Trennung mit dem Eluenten aus dem trockenen Gefäß und im unteren Bild die Trennung mit dem Eluenten aus dem nun „nassen“ Gefäß dargestellt. In Abb. 2 wird zur besseren Anschauung der Bereich 2,5 – 3,5 min. größer dargestellt. Das Chromatogramm mit dem Eluenten im „nassen“ Gefäß sieht anders aus: Die Retentionszeiten nehmen durch die geringfügige Zunahme des ACN-Anteils im Eluenten ab und dadurch ergibt sich im vorderen Chromatogramm, s. 1-3 min., eine schlechtere Auflösung.

Abb. 1

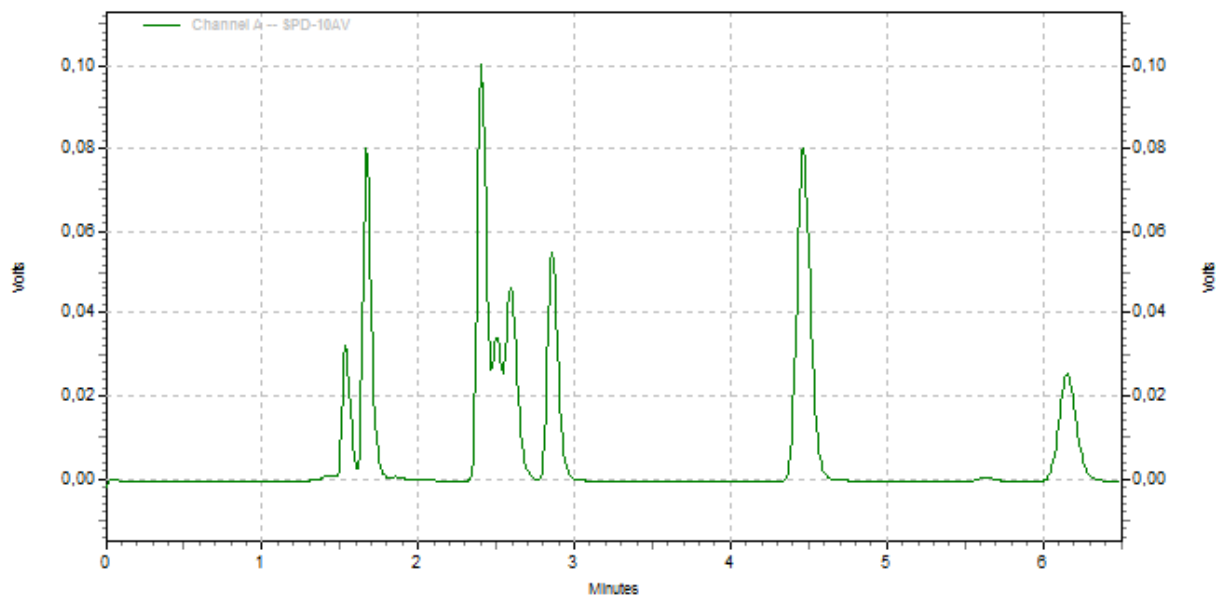
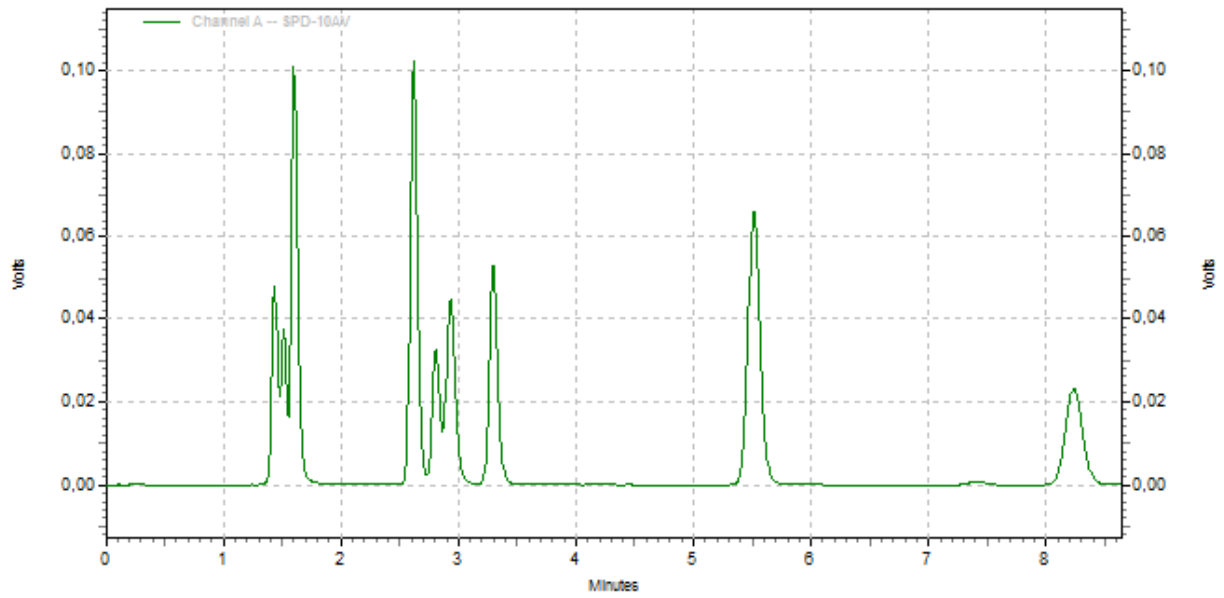


Abb. 2

