

Ist Ihre Probe in Ihrer mobilen Phase löslich?

Die Löslichkeit einer Probe ist für ein optimales chromatographisches Ergebnis erheblich. Dabei spielt aber nicht nur die Löslichkeit im Injektionslösungsmittel, sondern auch in der mobilen Phase eine Rolle. Entspricht das Injektionslösungsmittel der Eluentenzusammensetzung, so ist die Löslichkeit auch in der mobilen Phase gegeben. Unterscheiden sich Injektionslösungsmittel und mobile Phase jedoch, so kann die Probe bei Vermischung der verschiedenen Solventien ausfallen. Die möglichen Folgen sind:

- erhöhter Rückdruck,
- Peakdeformation,
- Peaksplitting,
- verringerte Auflösung und
- Retentionszeitverschiebung.

Eine Untersuchung der Löslichkeit der Probe in beiden Medien in Abhängigkeit von der Menge kann dabei Abhilfe schaffen!

Im hier beispielhaft dargestellten Versuch wurde eine definierte Menge eines schwer wasserlöslichen Zytostatikums in Acetonitril gelöst und mit einer Standardmethode analysiert. Das eingesetzte Injektionsvolumen betrug 25 µL. Die mobile Phase zum Zeitpunkt der Injektion bestand aus 40% Acetonitril und 60% Wasser.

Bereits nach wenigen Injektionen wurden eine Erhöhung des Rückdrucks sowie eine Peakaufspaltung beobachtet.

Da dies auf Präzipitation der Probe hindeutete, wurden Mischungsversuche vorgenommen. Unterschiedliche Volumina der Probenlösung wurden dafür in 0,5 mL der mobilen Phase pipettiert.* Es zeigte sich, dass die Zugabe von 25 µL der Probenlösung zu einer Trübung des Gemisches führte. Bei 15 µL konnte hingegen keine Trübung mehr beobachtet werden.

Lösungsansatz:

Verringerung des Injektionsvolumens

Entsprechend wurde das Injektionsvolumen der Probe für die chromatographische Analyse verringert. Abbildung 1 zeigt im Vergleich die Chromatogramme bei Injektion von 20 µL der Probe im Vergleich zu 10 µL Injektionsvolumen.

Bei Injektion von 20 µL traten Peaksplitting und eine verringerte Retentionszeit auf. Wurden hingegen 10 µL injiziert, entstand ein symmetrischer Peak zur erwarteten Retentionszeit. Neben der Vermeidung von Probenniederschlag auf der Säule zeigte die Verringerung des Injektionsvolumens somit noch einen weiteren positiven Effekt. Die ineffiziente Vermischung von Injektionslösungsmittel und mobiler Phase bei 20 µL Injektionsvolumen führte zu verringerter Retention, da durch das starke Elutionsmittel Acetonitril die Wechselwirkung der Probe mit der stationären Phase teilweise verhindert wurde. Bei Injektion von nur 10 µL dagegen vermischte sich die Probe mit der mobilen Phase so gut, dass eine vollständige Ausnutzung der stationären Phase stattfinden konnte.

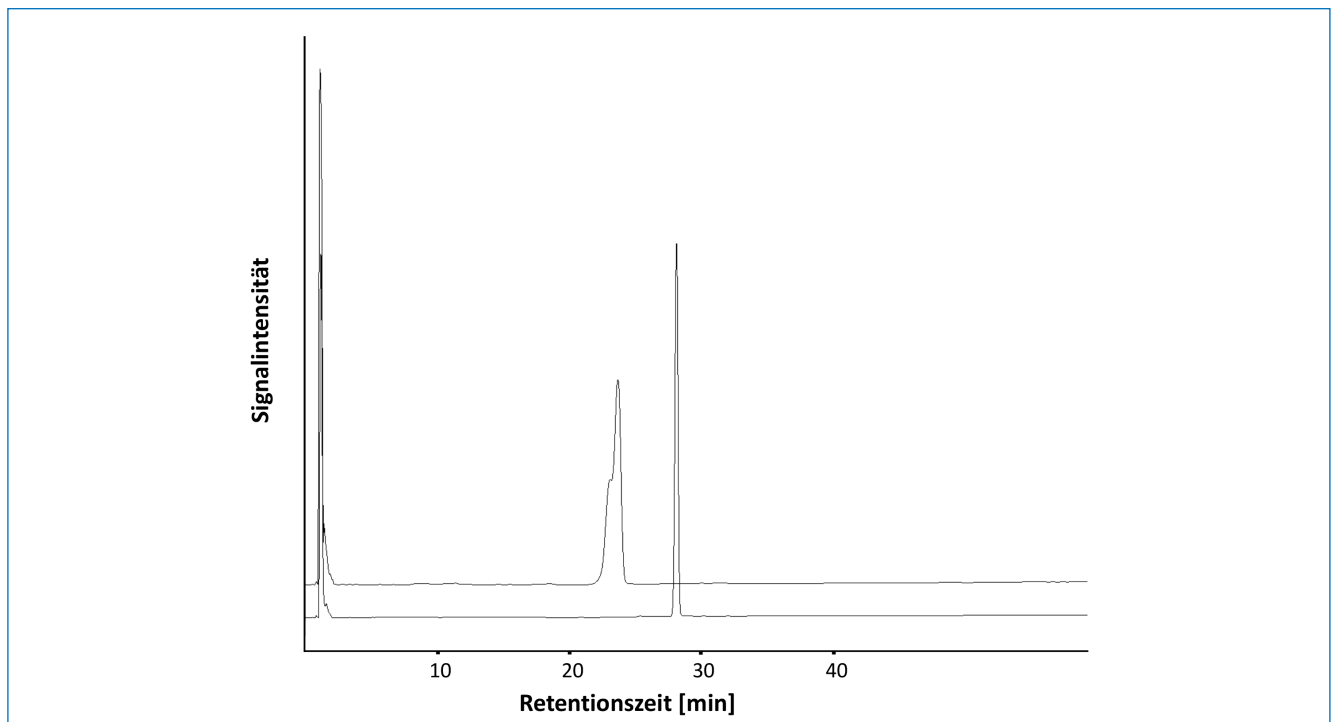


Abbildung 1: Chromatogramme bei 20 µL Injektionsvolumen (oben) und 10 µL Injektionsvolumen (unten).

Tabelle 1: Chromatographische Bedingungen.

Säule	YMC-Pack ODS-A 3 µm, 150x4,6mm ID AA12S03-1546WT	
Temperatur	35 °C	
Flussrate	1,2 mL/min	
Detektion	UV bei 220 nm	
Mobile Phase	A: Wasser B: Acetonitril	
Gradientenverlauf	t [min]	B [%]
	0	40
	20	40
	60	94
	62	40
	70	40

* Anleitung: 0,5 mL der mobilen Phase werden in einem klaren, schmalen Probengefäß vorgelegt. Die Probenmenge wird mithilfe einer Mikroliterpipette hinzugegeben. Nicht schütteln. Zur visuellen Prüfung wird das Gefäß mit der Mischung gegen eine Lichtquelle gehalten.

Hinweis: Zu beachten ist, dass die Probe in der Säule auf ein Volumen geringer als 0,5 mL verdünnt wird. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe auf der Säule ausfällt, noch höher.