

**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C

# Tipps und Tricks für HPLC und UHPLC

Mirko Pietsch  
Application Specialist  
Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany

The world leader in serving science

# Einfluss der HPLC-Module auf das Chromatogramm

1. Mobile Phase (z.B. Selektivität, Basislinie)
2. Pumpe (Retentionszeit, Basislinie)
3. Autosampller (Peakfläche)
4. Säulenthermostat (Elutionsverhalten, System-Druck)
5. Detektor (Signalgröße, Basislinie, Empfindlichkeit)



## Mobile Phase



# Allgemeine Folgen unreiner Lösemittel:

- Schlechte Reproduzierbarkeit der Trennung
- Veränderte Selektivität
- Verringerte Trennleistung
- Geisterpeaks
- Basisliniendrift
- Zunehmender Säulendruck auf Grund mechanischer Kontamination
- Hohes Basislinien-Grundrauschen (Empfindlichkeitsverlust)

# Anforderungen an die Eluenten

- **TN140: Qualität von Lösemitteln**

- Qualität des Laufmittels ist u.a. abhängig von der Art der Detektion (z.B. Einsatz flüchtiger Puffer bei Detektoren mit einem Zerstäuber wie Corona oder MS)
- Geeignete Additive verwenden

Optimizing and Monitoring Solvent Quality for UV-Vis Absorption, Fluorescence and Charged Aerosol Detectors

Melanie Neubauer and Holger Franz  
Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany

Technical Note 140

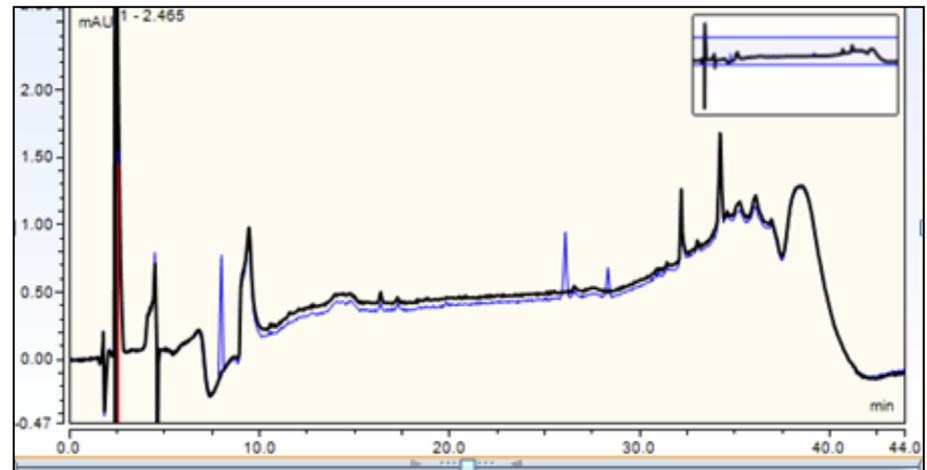
**Key Words**  
Eluent Quality, Mobile Phase, UHPLC, Liquid Chromatography

**Goal**  
Provide guidance on how to find out if mobile phase quality is sufficient for application specific UV-Vis, fluorescence, and charged aerosol detection requirements. Give assistance in laboratory solvent quality monitoring and solvent cost control.

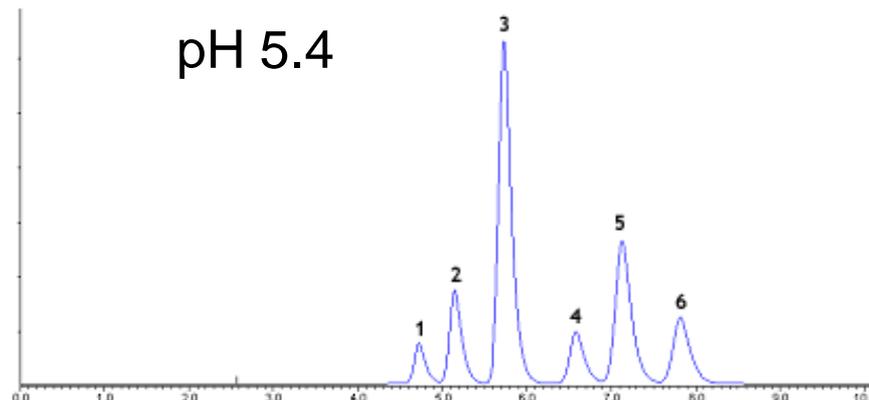
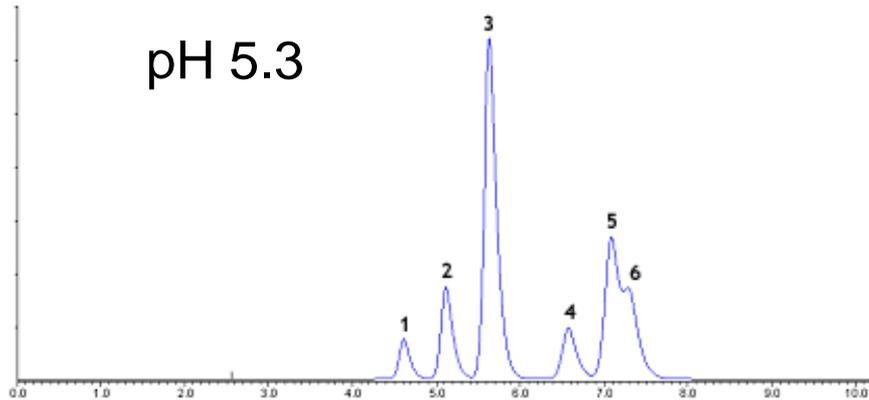
Beyond these precautions for the system mobile phase there are also detector- and application-related requirements. Optimizing the quality of mobile phase solvents can contribute to an improvement of the chromatographic or mass spectrometric properties of the analyte as well as the overall detection limits of the LC system.<sup>2</sup> To achieve lowest limits of detection (LOD) with optical detectors, the solvent should respond as little as possible to the selected wavelengths. Absorption or fluorescence of the

- **Überprüfung der Eluenten**

- Lehrgradienten ohne Injektion (Probentyp „Blank“)
- Injektion von Verdünnungslösungen der Proben



- Möglichst vorgemischte Eluenten verwenden
  - 5-10% organischen Eluenten zum wässrigen Eluenten zufügen
  - 5-10% wässrigen Eluenten zum organischen Eluenten zufügen
  - Verhindert lokale Kristallisation in der Pumpe bei Verwendung von Puffern
  - Bessere Mischbarkeit bei Gradientenläufen
- Eluenten mit Salzpuffern
  - Regelmäßiges Wechseln der Eluenten (wöchentlich)
  - Puffer müssen filtriert werden (0,2  $\mu\text{m}$ )
  - Anlage nach Benutzung unbedingt mit Wasser durchspülen!



## • Symptome

- Retentionszeiten der Peaks verschieben sich
- Verlust an Auflösung

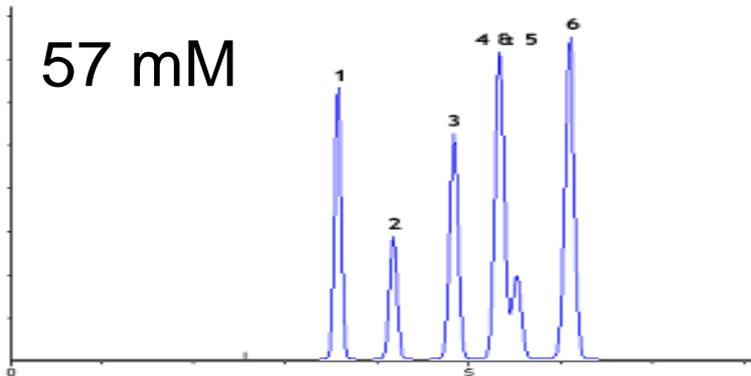
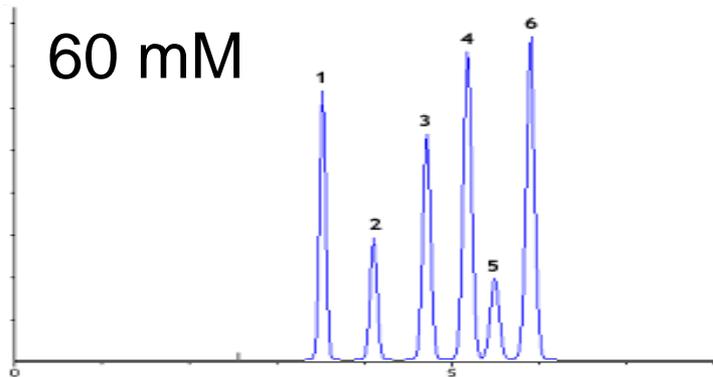
## • Ursache

- pH-Wert der mobilen Phase ist verändert

## • Prävention

- Geeigneten Puffer für den pH-Bereich auswählen
- pH-Wert der mobilen Phase kontrollieren
- Pufferstärke in der wässrigen Phase beibehalten
- Temperatur konstant halten

# Pufferkonzentration der mobilen Phase



- Symptome

- Retentionszeiten verschoben
- Auflösungsverlust

- Ursache

- Pufferstärke in der mobilen Phase hat sich verändert

- Prävention

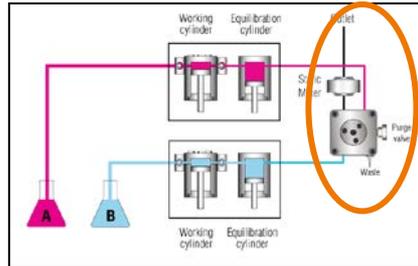
- Pufferstärke in der wässrigen Phase beibehalten
- Temperatur konstant halten
- Filtrieren der Lösungsmittel

## Pumpe



## HPG

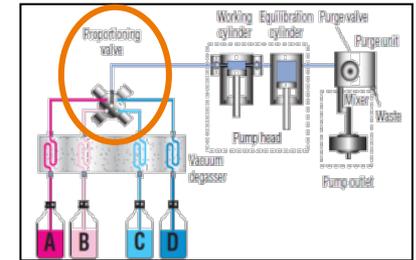
- binär
- High Pressure Gradient
- 2 Pumpenblöcke
- Mischung der Eluenten *nach* den Pumpenblöcken



→ Gradientenformung im T-Stück/Mischer  
→ Pumpenkopf trägt nicht zum GDV bei

## LPG

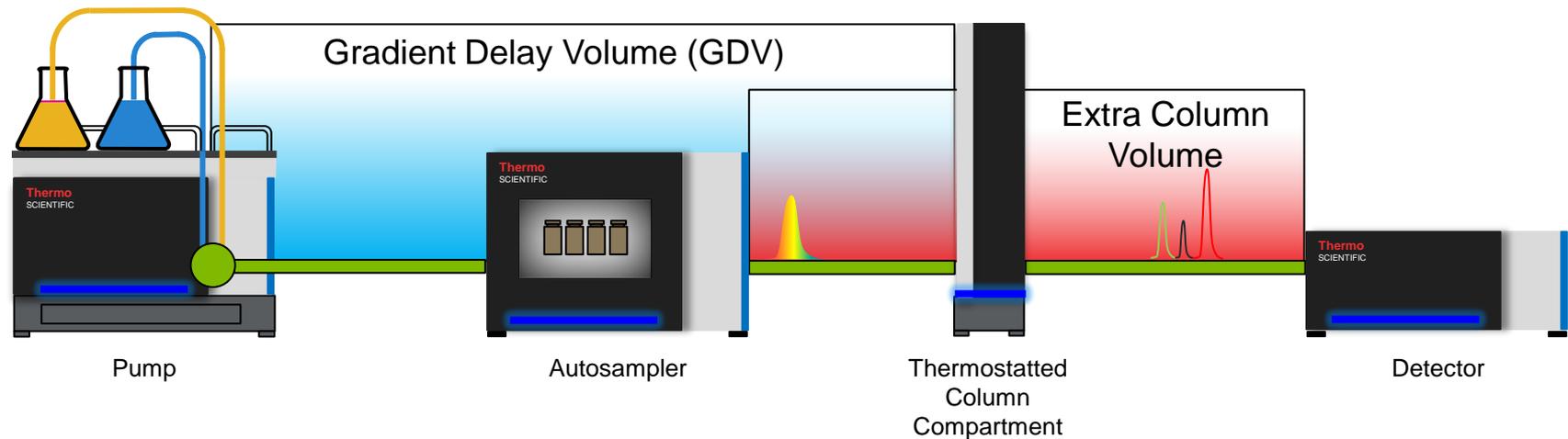
- quaternär
- Low Pressure Gradient
- 1 Pumpenblock
- Mischung der Eluenten *vor* den Pumpenblöcken



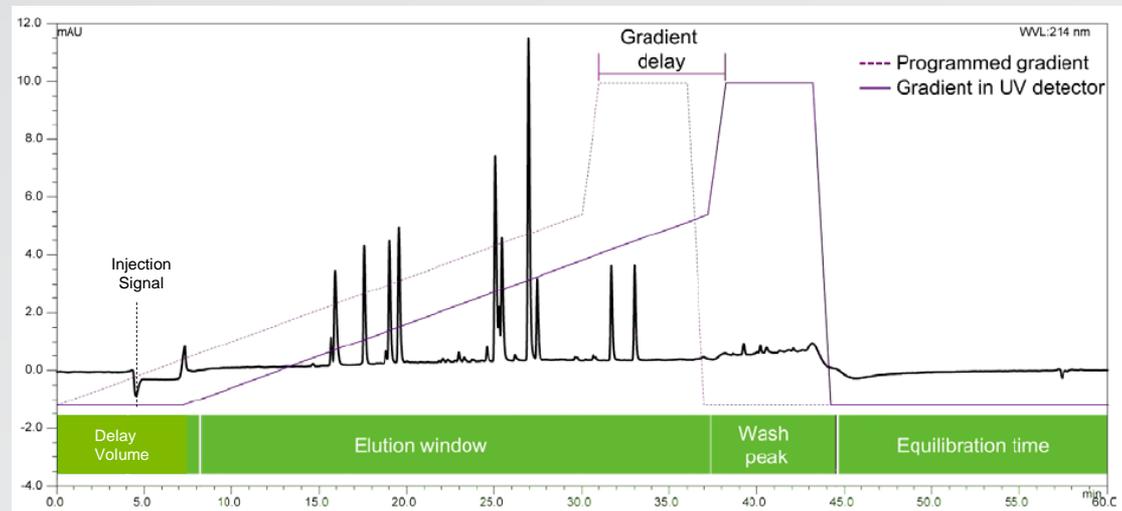
→ Gradientenformung im Proportionierventil  
→ Pumpenkopf trägt zum GDV bei

***Das Gradient Delay Volume (GDV) von quaternären Systemen ist aufgrund des Mischprinzips der Pumpen generell größer als das von binären Systemen***

# Gradientenverzögerungsvolumen und Extrasäulenvolumen



- **Gradient Delay Volume (GDV):**  
Fluidisches Volumen vom Punkt der Mischung des Gradienten bis zum Säulenkopf
- **Extra Column Volume (ECV):**  
Fluidisches Volumen von der Injektion der Probe bis zur Mitte der Detektorflusszelle



# Das umfassende Mischerportfolio

- Großer Bereich an statischen Mixern zur Anwendung für LC/MS-Applikationen mit sehr niedrigem GDV bis zu hochsensitiven TFA-Eluenten-Anwendungen

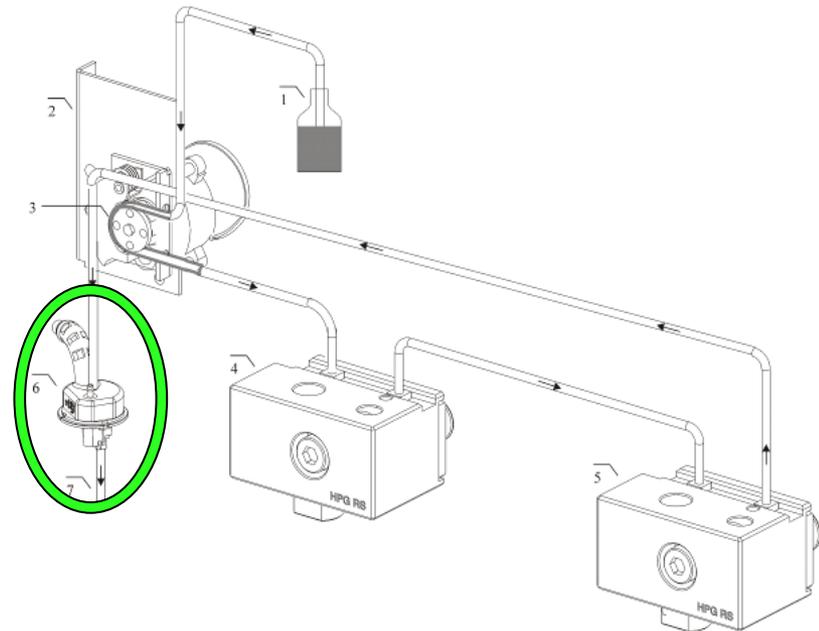


# Aktive Hinterkolbenspülung

- Hinterkolbenspülung verlängert die Lebensdauer der Pumpendichtung (bildet "Gleitfilm", Auskristallisieren von Salzen wird unterbunden)
- Wenn die Pumpe keine Waschlösung bekommt, sollte sie nicht anlaufen
- Tropfenzähler mit doppelter Diagnosefunktion
  - 1) Warnung bei beginnender Undichtigkeit
  - 2) Warnung bei leerem Reservoir



Tropfenzähler

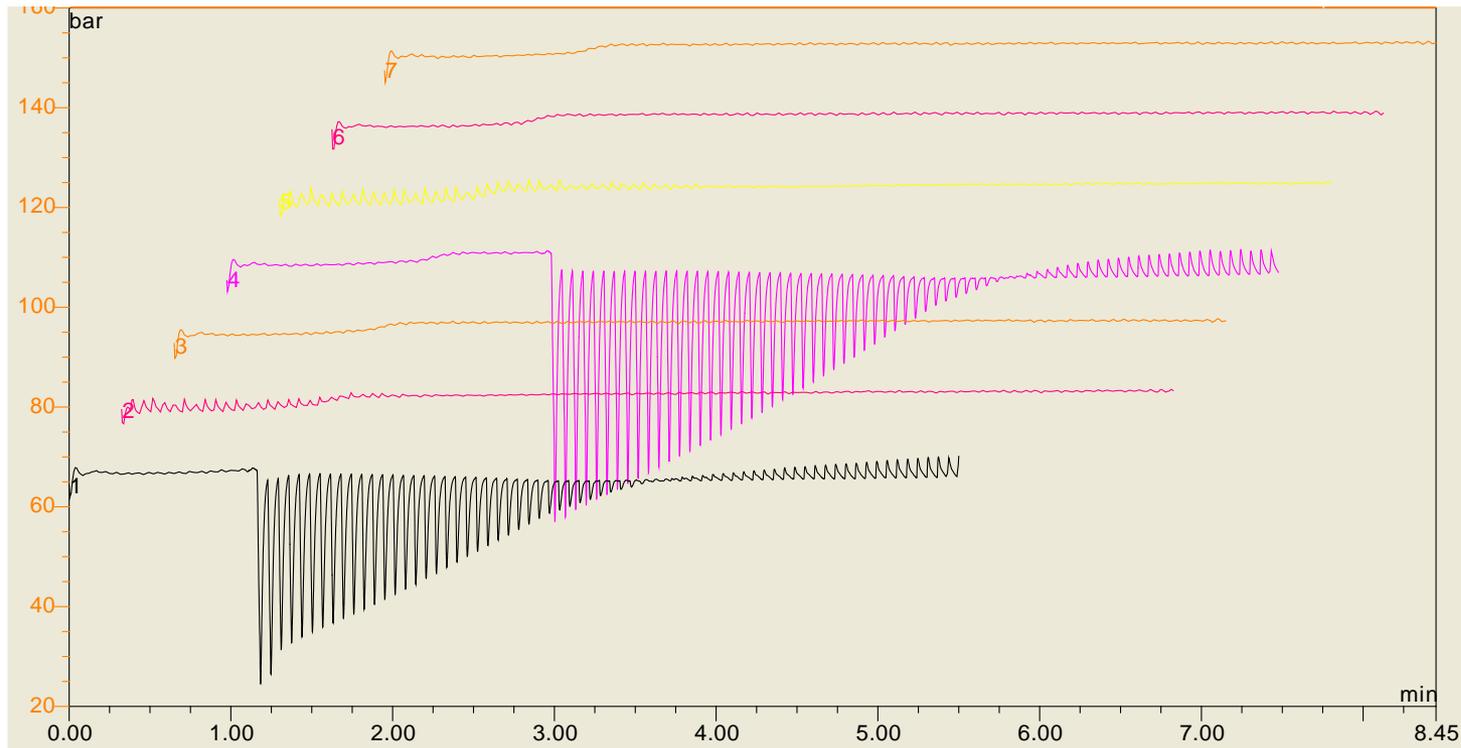


# Pumpen: sonstige Tipps und Tricks

- Druckspur aufzeichnen → wichtige Diagnosefunktion bei Troubleshooting
- Unteres Drucklimit  $\neq 0$  (Pumpe stoppt wenn Eluent leer)
- Eluentenfilter verwenden
- Degasser verwenden – falls nicht vorhanden, Entgasen z.B. in einem Ultraschallbad für mind. 5 Minuten
- Prinzip der Gradienten-Mischung und damit der Pumpentyp sollte bei Methodentransfer z.B. von Standard-HPLC zu UHPLC beibehalten werden

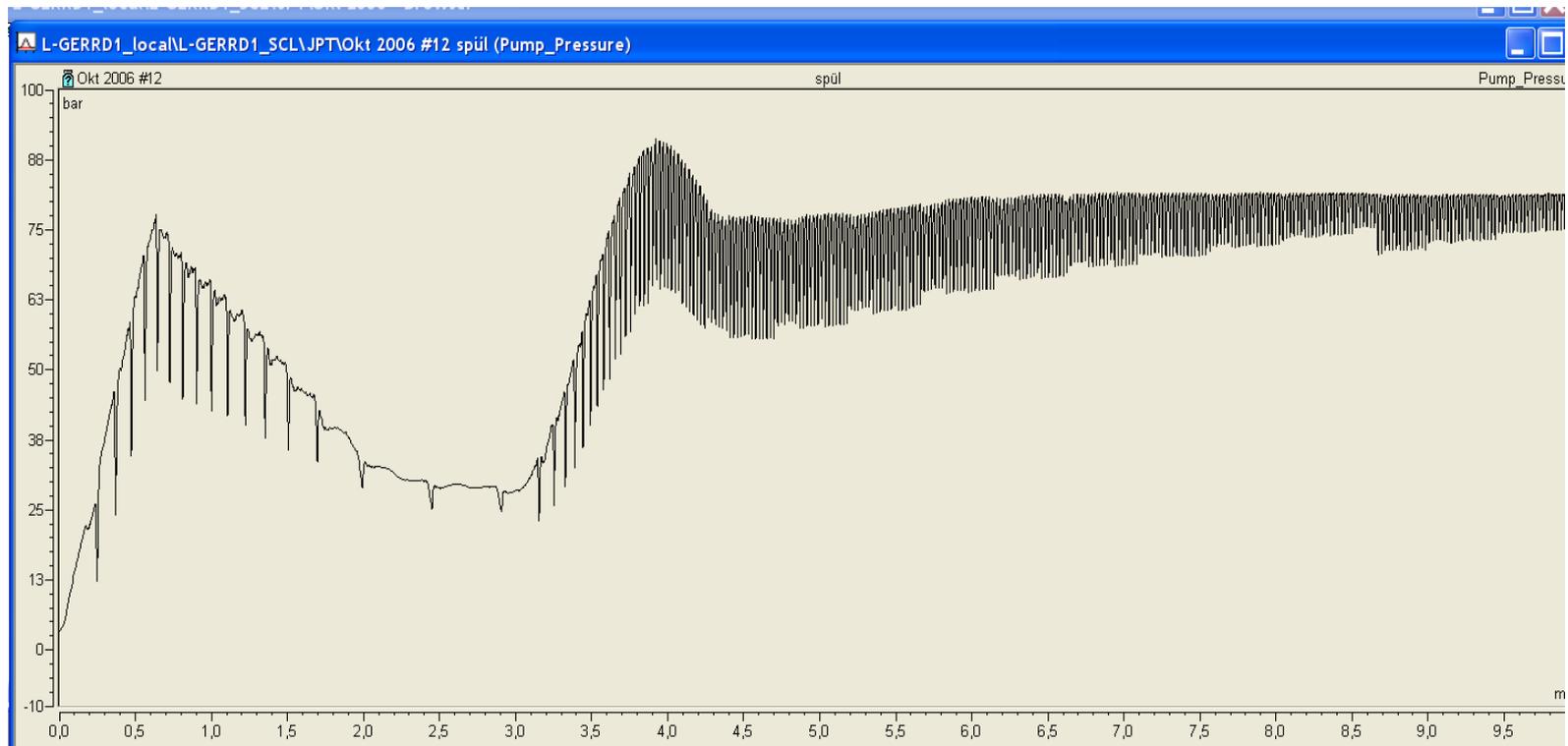
# Fehlerbilder: Luftblase im Pumpenblock (LPG Pumpe)

- Eintrag der Luftblasen erfolgt in unregelmäßigen Abständen
- Problem im Pumpenblock (Ein- oder Auslassventil, Dichtung) ergibt ein regelmäßiges und reproduzierbares Fehlerbild
- Ursache bzw. Entstehung der Luftblasen: Füllstand Flaschen, Degasser, Vakuum usw.



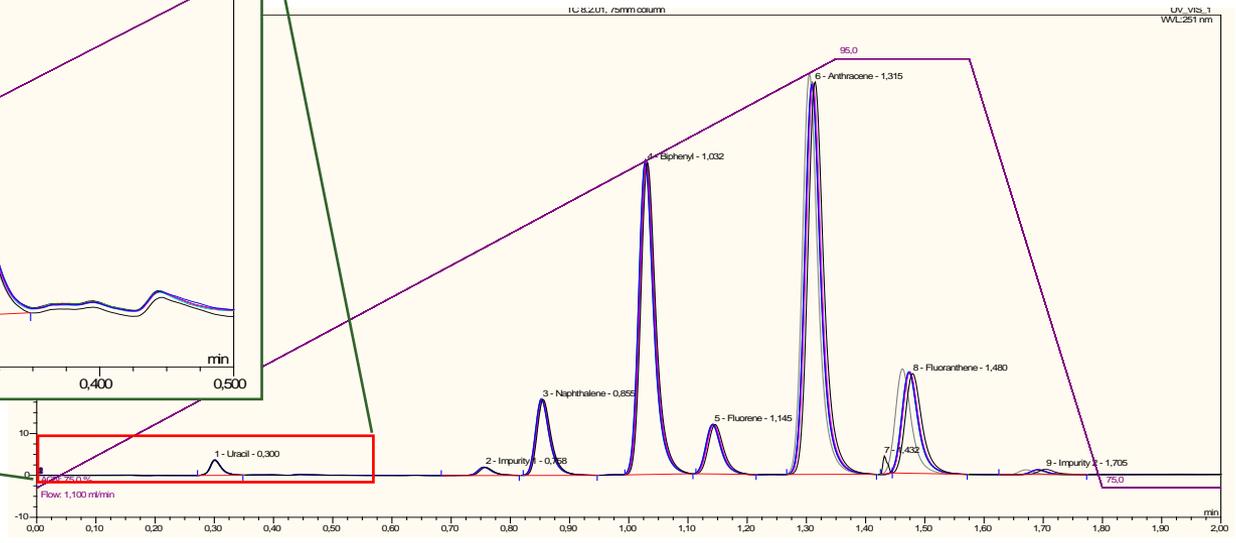
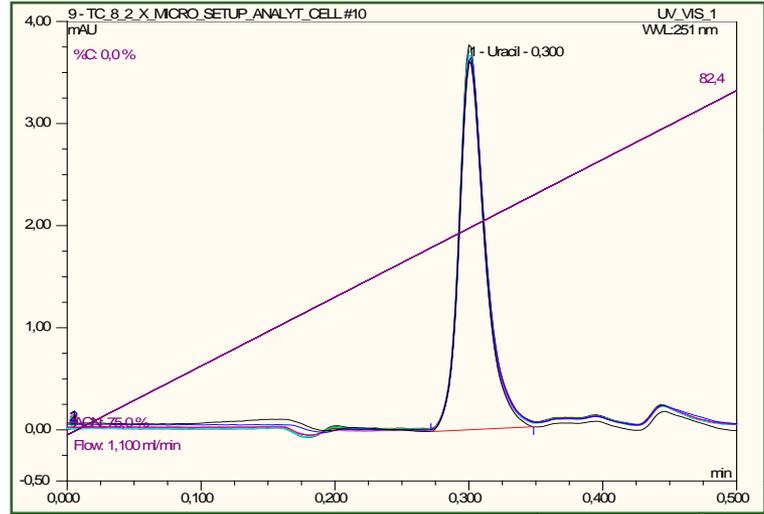
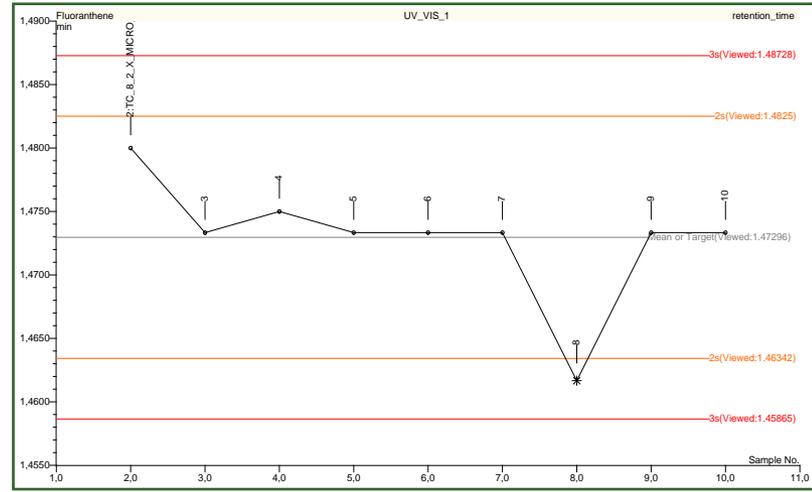
# Fehlerbilder: Luftblase im Pumpenblock A (HPG-Pumpe)

- Problem im Pumpenblock A, Pumpenblock B in Ordnung
- Verkürzung der Druckeinbrüche mit steigendem Gradienten (Erhöhung %B)



# Fehlerbilder: Fluss-Schwankungen

- Bei den Retentionszeiten sind deutliche Schwankungen erkennbar
- Besondere Auswirkung auf Injektionspeak bzw. Totzeitmarker
- Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ CDS Trendplot zur Visualisierung



## Autosampler



# Routinebetrieb des Autosamplers

- **Optimaler Betriebszustand**

- Waschflüssigkeit frisch & entgast
- Fluidik des Autosamplers einwandfrei gespült (Luft in der Spritze?)
- Carry Over minimiert („Inject Wash“ Option)
- Nadel, Nadelsitz & Injektionsventil in einwandfreiem Zustand



**Start Up**

Prime Syringe

2 Cycles

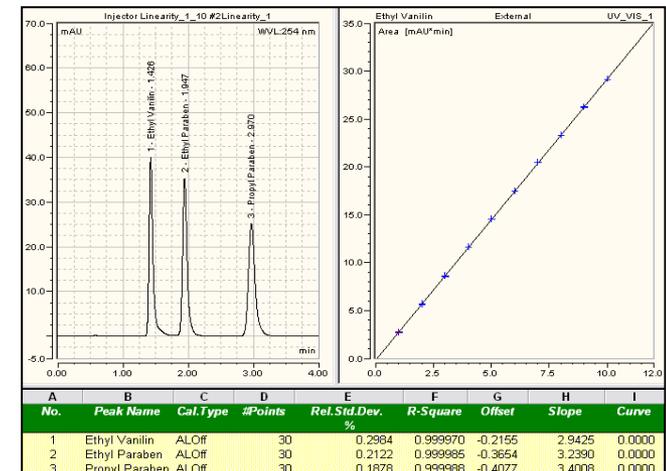
Wash Buffer Loop  
(300 µl)

Wash Needle Externally

100,000 [µl]

- **Autosamplertests / Qualifizierung**

- Linearitätstest mit unterschiedlichen Injektionsvolumina
- Reproduzierbarkeit bei Wiederhol-Injektionen (Standardabweichung)



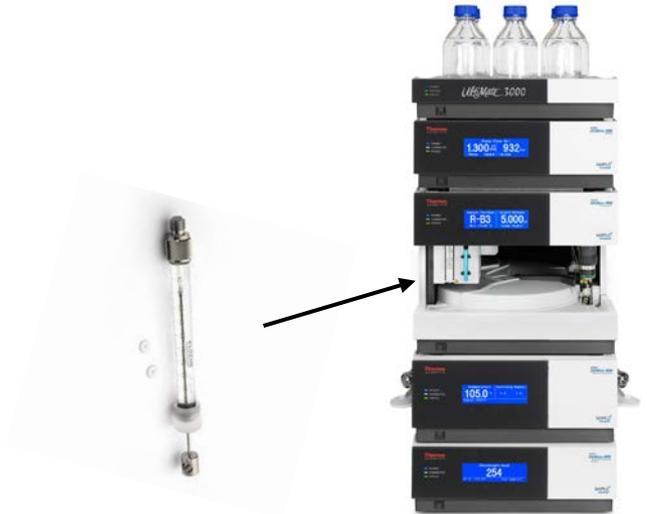
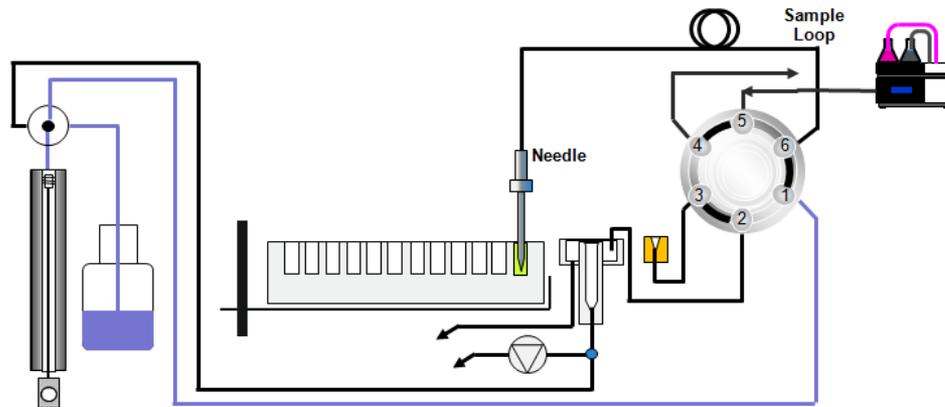
# Waschflüssigkeit des Autosamplers – UltiMate 3000

- **Funktionen**

- „Fluidische Verbindung“ zwischen **Spritze** und **Nadel**
- Spülflüssigkeit für Fluidik und Nadelaußenseite

- **Anforderungen**

- Waschflüssigkeit muss mit Eluenten und Proben kompatibel sein
- Gemisch aus reinem Wasser und Lösemittel – keine Pufferzusätze!
- Entgasung ist notwendig – Luftblasen führen zu entsprechenden Abweichungen beim injizierten Volumen

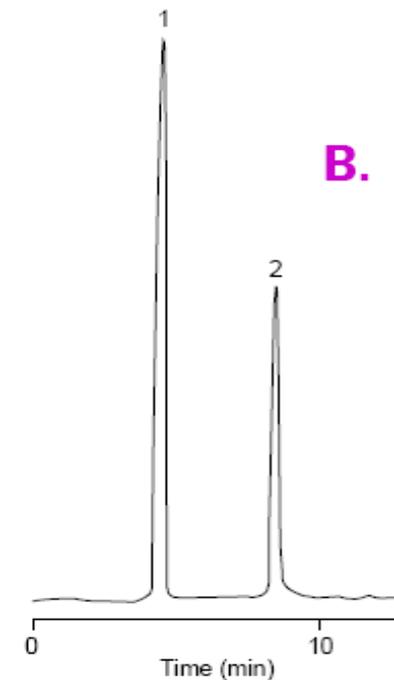
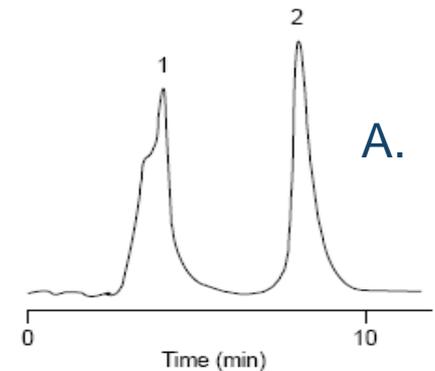


# Wichtige Parameter „DrawSpeed“ und „DrawDelay“

- **DrawSpeed:** Geschwindigkeit, wie schnell die Probe aufgezogen wird.
- **DrawDelay:** Verweilzeit der Nadel im Probengefäß nach Aufziehen der Probe
- Aufziehvorgang sollte mind. 3 bis 4 s dauern (analytische Volumina)
- Beispiel (Angaben gelten für normale Viskosität):
  - Für 10 µL z.B. DrawSpeed 2 bis 3 µL/s wählen
  - Für 2 µL z.B. DrawSpeed 0,2 bis 0,3 µL/s wählen
  - DrawDelay: Standardeinstellung 3000 ms
- Anpassung der Parameter bei viskoserer Proben und Eluenten
  - DrawSpeed: herabsetzen → längere Aufziehzeit
  - DrawDelay: erhöhen → längere Verweildauer der Nadel in der Probe
- Bei falschen Einstellungen kommt es zu Problemen bei der Flächenreproduzierbarkeit

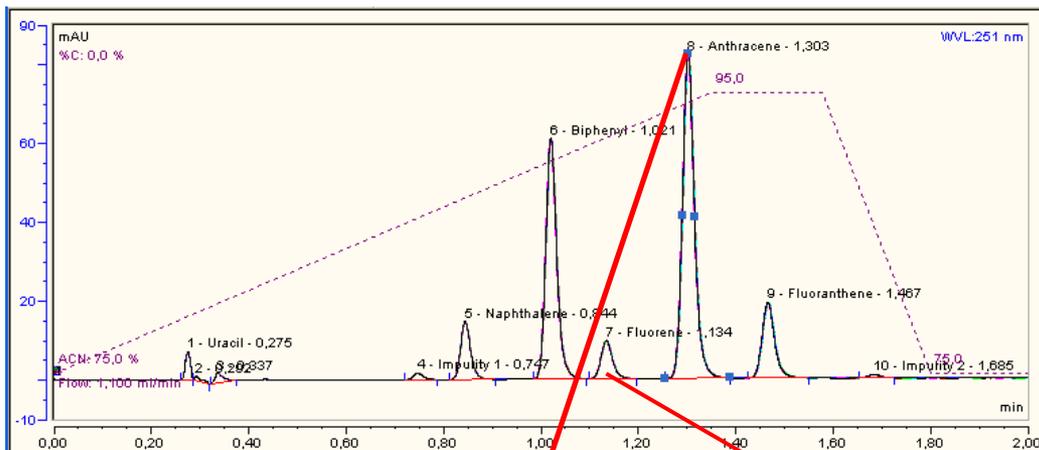
# Lösungsmittel für die Proben

- Anpassen der Injektionsvolumina und der Lösemittelstärke
  - Ideal: kein Einfluss des Probenlösungsmittel auf chromatographische Trennung
  - Große Injektionsvolumina können einen eigenen Elutionspfropfen erzeugen, die Peakform stören und Retentionszeiten ändern
  - Bei starkem Probenlösungsmittel → kleinstmögliches Injektionsvolumen verwenden
  - Probe bewegt sich in starkem Lösemittel schneller durch die mobile Phase → gestörte Peakformen / Peak-Splitting sind die Folge (Bsp. Chromatogramm A)



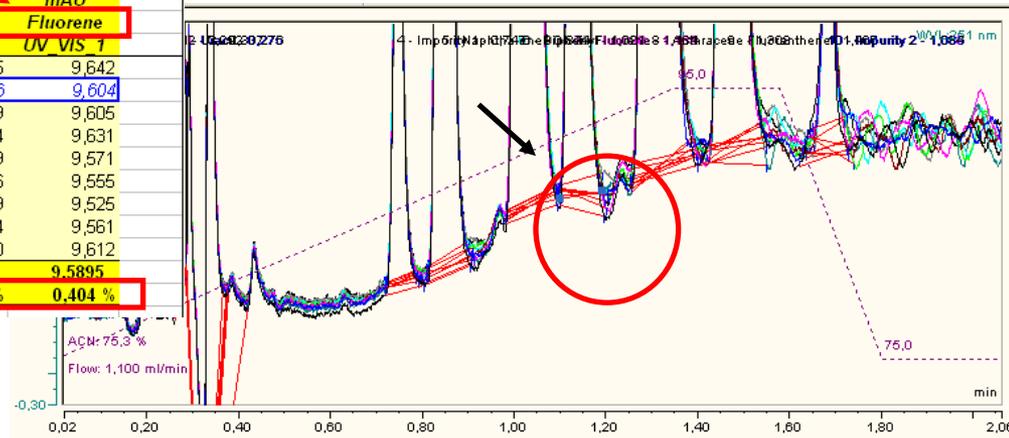
# Fehlerbilder: Ungenügende Flächenpräzision / 1

- Integration der Chromatogramme unterschiedlich?



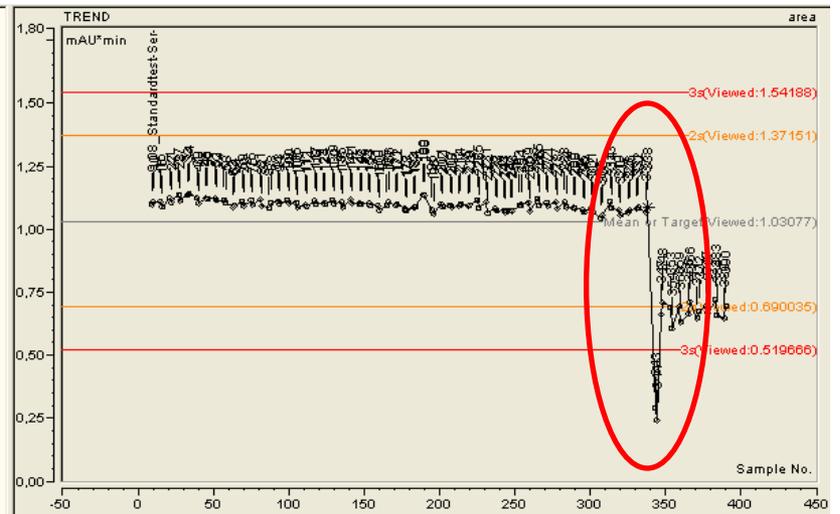
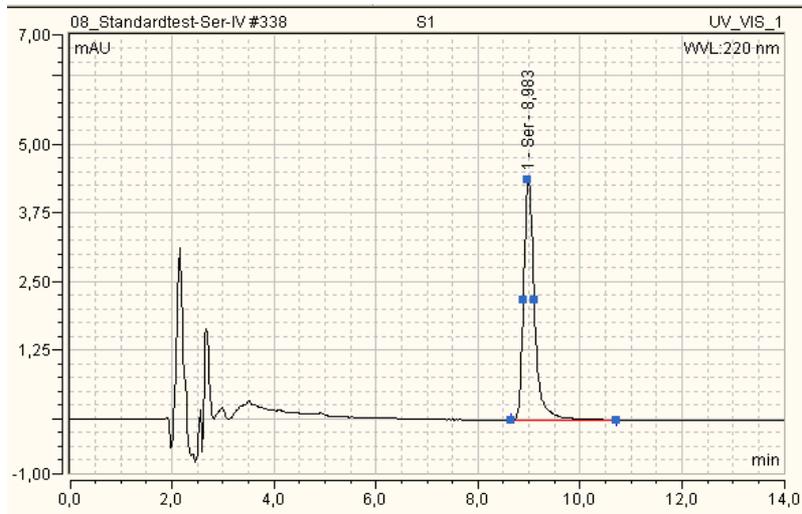
A	B	C	D	E	F	G	H	I
Sample No.	Sample Name	Ret.Time min	Area mAU*min	Height mAU	Ret.Time min	Area mAU*min	Height mAU	
		Anthracene	Anthracene	Anthracene	Fluorene	Fluorene	Fluorene	
		UV VIS 1	UV VIS 1	UV VIS 1	UV VIS 1	UV VIS 1	UV VIS 1	
45	TC 8.2.03, 75mm col.	1,303	2,3690	82,6270	1,1342	0,2655	9,642	
46	TC 8.2.03, 75mm col.	1,303	2,3609	82,2716	1,1342	0,2616	9,604	
47	TC 8.2.03, 75mm col.	1,302	2,3616	82,1649	1,1333	0,2649	9,605	
48	TC 8.2.03, 75mm col.	1,303	2,3633	82,2270	1,1342	0,2644	9,631	
49	TC 8.2.03, 75mm col.	1,303	2,3623	82,1487	1,1342	0,2629	9,571	
50	TC 8.2.03, 75mm col.	1,303	2,3659	81,9317	1,1342	0,2636	9,555	
51	TC 8.2.03, 75mm col.	1,303	2,3662	82,1707	1,1358	0,2599	9,525	
52	TC 8.2.03, 75mm col.	1,303	2,3591	81,8263	1,1342	0,2614	9,561	
53	TC 8.2.03, 75mm col.	1,303	2,3597	82,1791	1,1350	0,2650	9,612	
<b>Average:</b>		1,303	2,3631	82,1719	1,1344	0,2632	9,5895	
<b>Rel.Std.Dev.:</b>		0,032 %	0,140 %	0,271 %	0,061 %	0,725 %	0,404 %	

Nur einzelne Peaks sind betroffen!



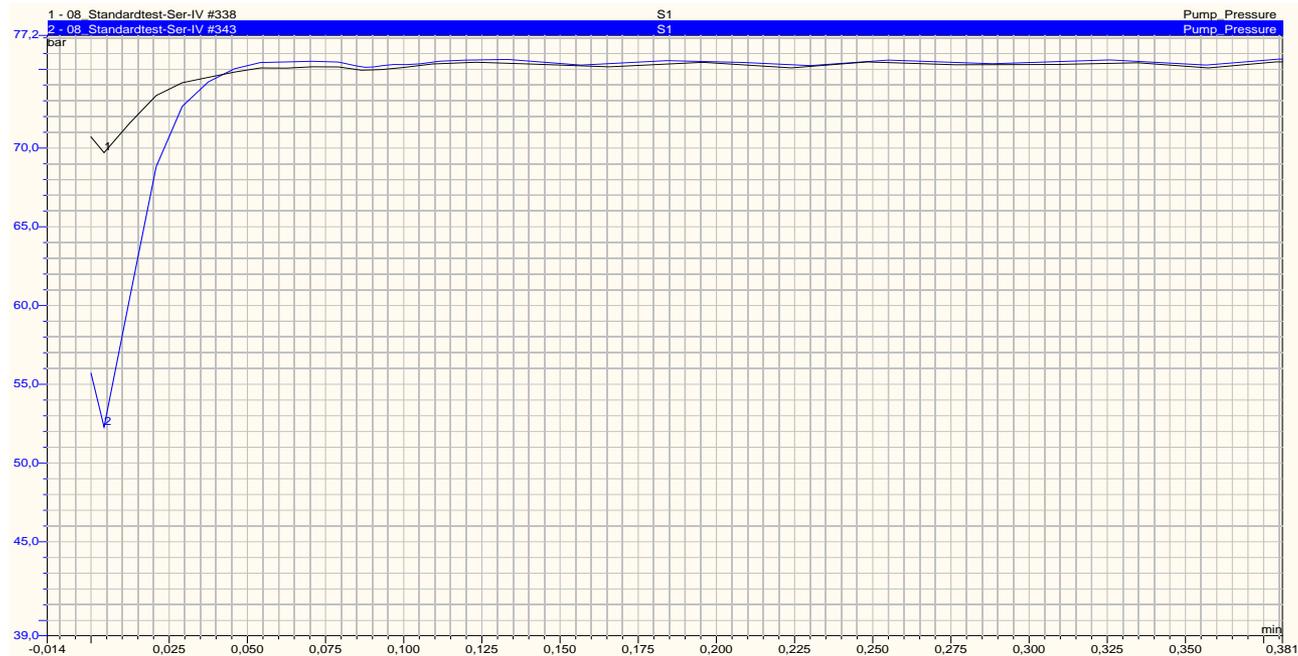
# Fehlerbilder: Ungenügende Flächenpräzision / 2

- Überprüfung der Sequenz auf Abweichungen („Trendplot“)



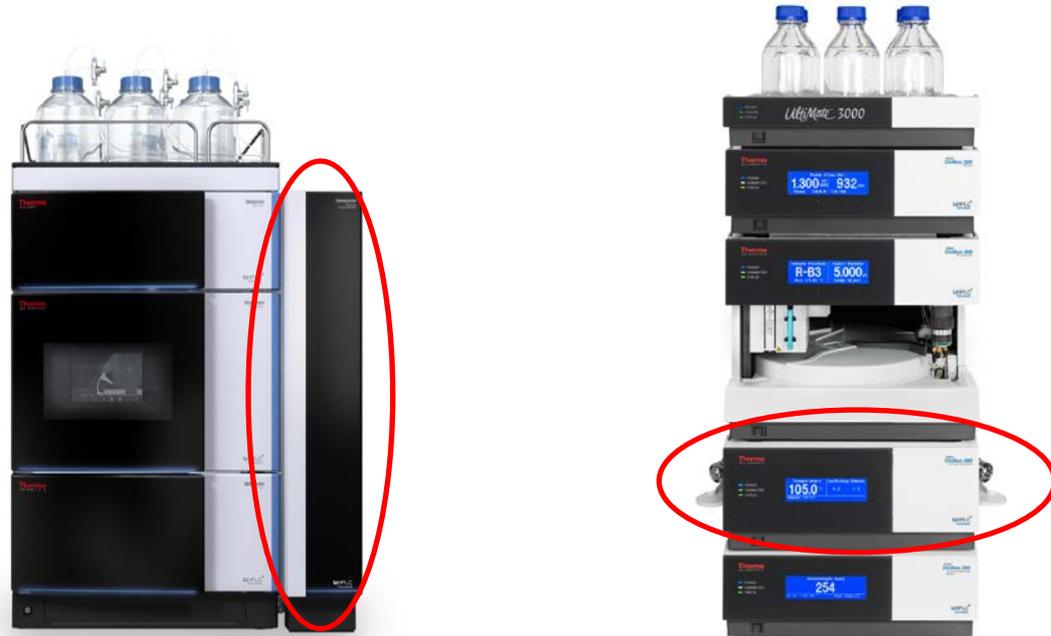
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Sample No.	Sample Name	Ret.Time min Ser	Area mAU*min Ser	Height mAU Ser	Amount µg/ml Ser	Type Ser	Plates (EP) Ser								
		UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1								
365	S1	8,950	0,6634	2,7226	0,2545	BMB	9395								
366	S1	8,950	0,7115	2,8594	0,2709	BMB	9225								
371	S1	8,950	0,6473	2,6280	0,2491	BMB	9281								
372	S1	8,950	0,6735	2,6974	0,2580	BMB	9197								
377	S1	8,950	0,6955	2,8144	0,2654	BMB	9086								
378	S1	8,950	0,6677	2,6604	0,2560	BMB	9100								
383	S1	8,950	0,7208	2,8576	0,2740	BMB	9211								
384	S1	8,950	0,6579	2,6841	0,2527	BMB	9410								
389	S1	8,950	0,6451	2,6394	0,2483	BMB	9253								
390	S1	8,950	0,6956	2,7719	0,2655	BMB	9018								
<b>Average:</b>		<b>8,983</b>	<b>1,0308</b>	<b>4,1785</b>	<b>0,3794</b>		<b>9674</b>								
<b>Rel.Std.Dev:</b>		<b>0,166 %</b>	<b>16,528 %</b>	<b>16,515 %</b>	<b>15,266 %</b>		<b>2,069 %</b>								

- Vergleich von Druckspuren nach der Injektion



- Stärkerer Druckeinbruch nach Injektion
  - Partielle Verstopfung der Probennadel
  - Das Aufziehen der Probe wird verlangsamt
  - Beim Herausziehen der Nadel wird Luft angesaugt ( => Druckeinbruch)

## Säulenthmostat



## Lagerung

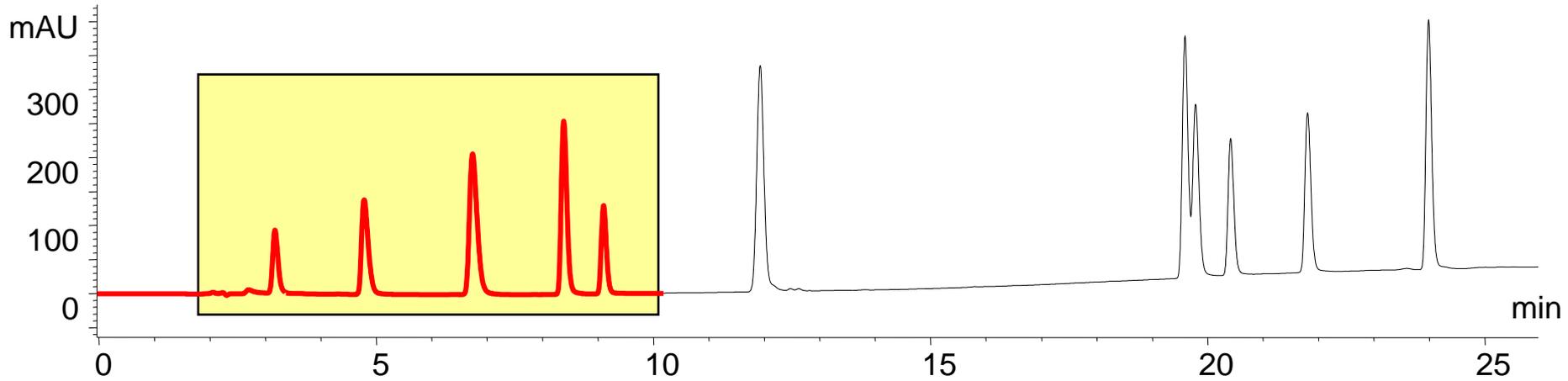
- Säulenhandbuch beachten!!!
- Eine geeignete Lagerflüssigkeit wird das mikrobielle und Algenwachstum verhindern, z.B.
  - RP --- Acetonitril oder Methanol (pur oder gemischt mit max. 50% Wasser)
  - NP --- Hexane (pur oder gemischt)
- Die Säulenenden bitte verschließen, um ein Austrocknen zu verhindern

## Äquilibration

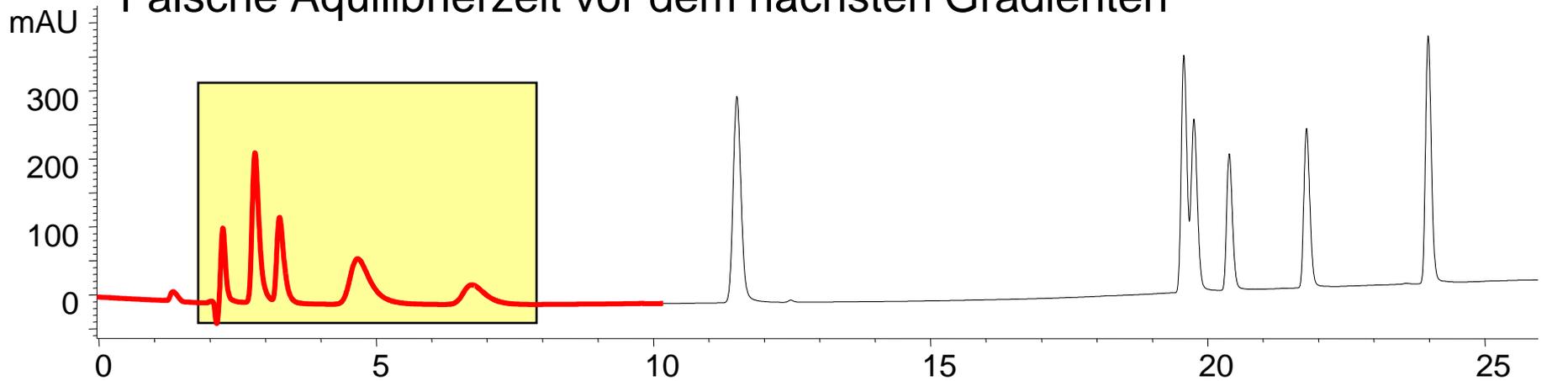
- Typischerweise werden 10 Säulenvolumina benötigt
  - Dies setzt voraus, dass keine zurückgehaltenen Peaks von der ersten Injektion vorhanden sind
  - Mehr Volumen wird bei stark retardierenden Säulen (z.B. HyperCarb oder bei HILIC und NP Phasen benötigt)
- Kürzere Äquilibration wird bei Gradienten mit engerem Bereich benötigt
  - Weniger Differenz bei der Menge Organik, die herausgespült werden muss.

# Äquibrierzeit

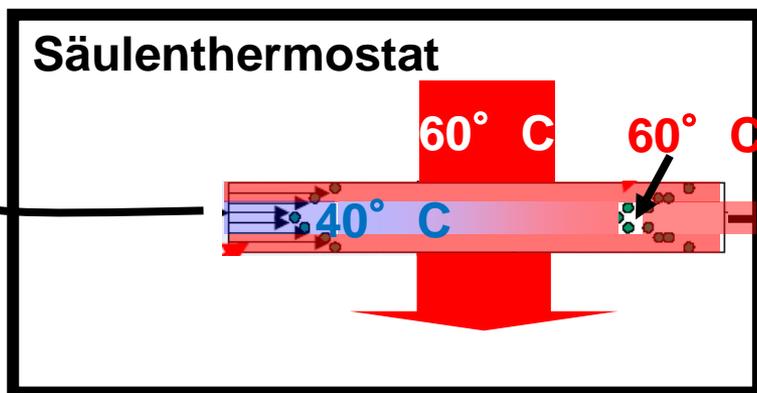
## Korrekte Äquibrierzeit vor dem nächsten Gradienten



## Falsche Äquibrierzeit vor dem nächsten Gradienten

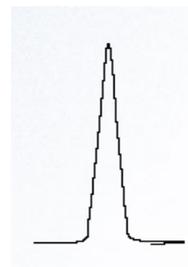
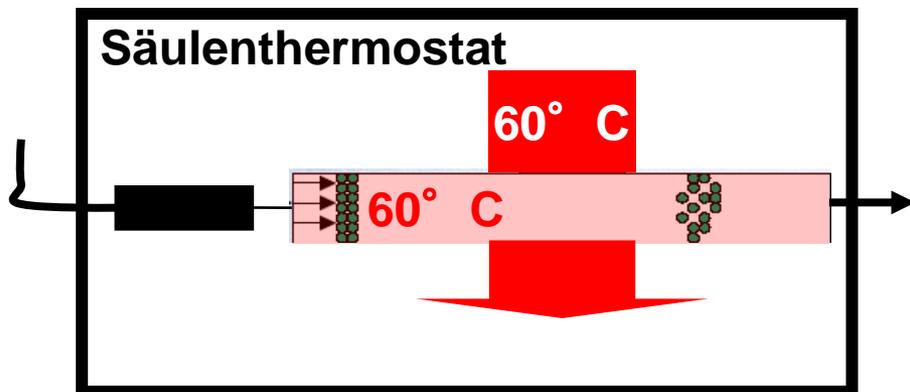


# Positiver Einfluss der Eluentenvorheizung (I)



- **Ohne Eluentenvorheizung**

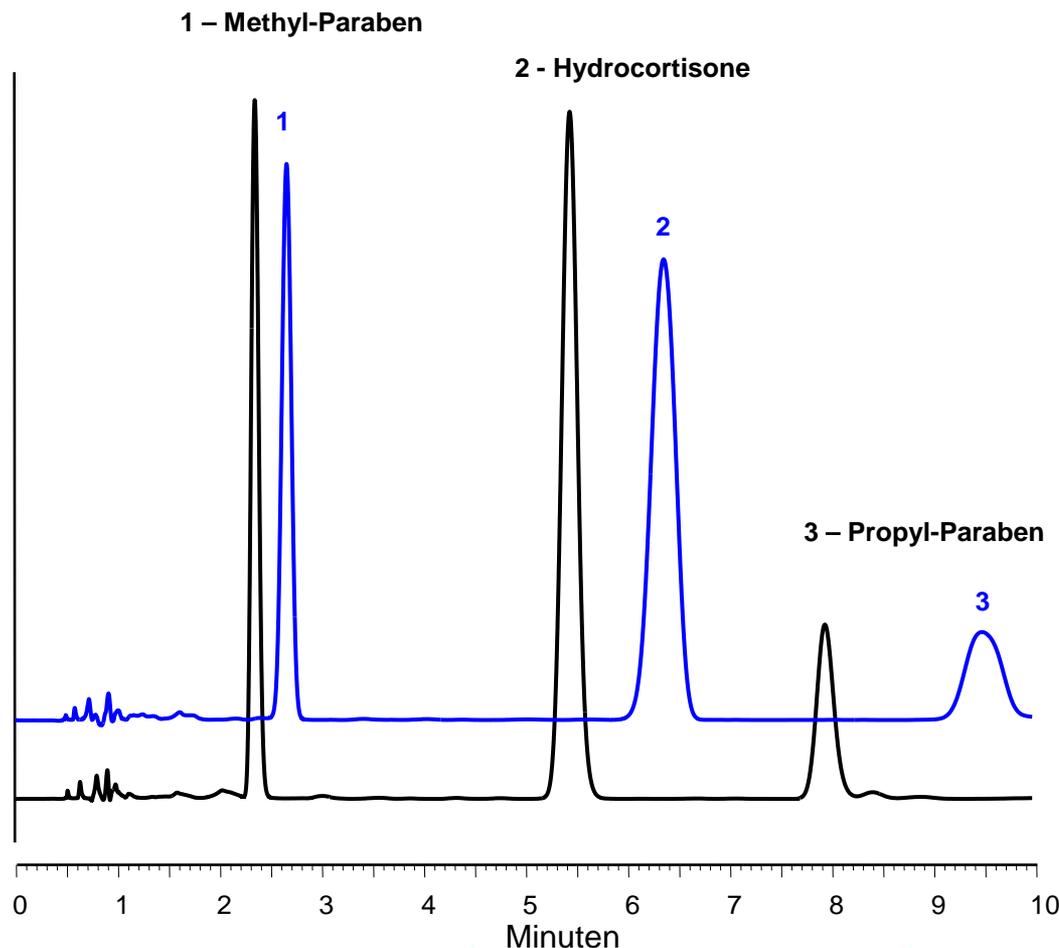
- Radialer Temperaturgradient am Säuleneingang
- Tiefere Temperatur im Inneren
- Viskositätsunterschiede ergeben unterschiedliche lineare Geschwindigkeiten
- Peakverbreiterung als Folge



- **Mit Eluentenvorheizung**

- Temperatur-Gleichgewicht ab Säuleneingang
- Optimale Trennleistung
- Geringfügig höheres „Extra Column Volume“

# Positiver Einfluss der Eluentenvorheizung (II)



ohne Eluentenvorheizung  
mit Eluentenvorheizung

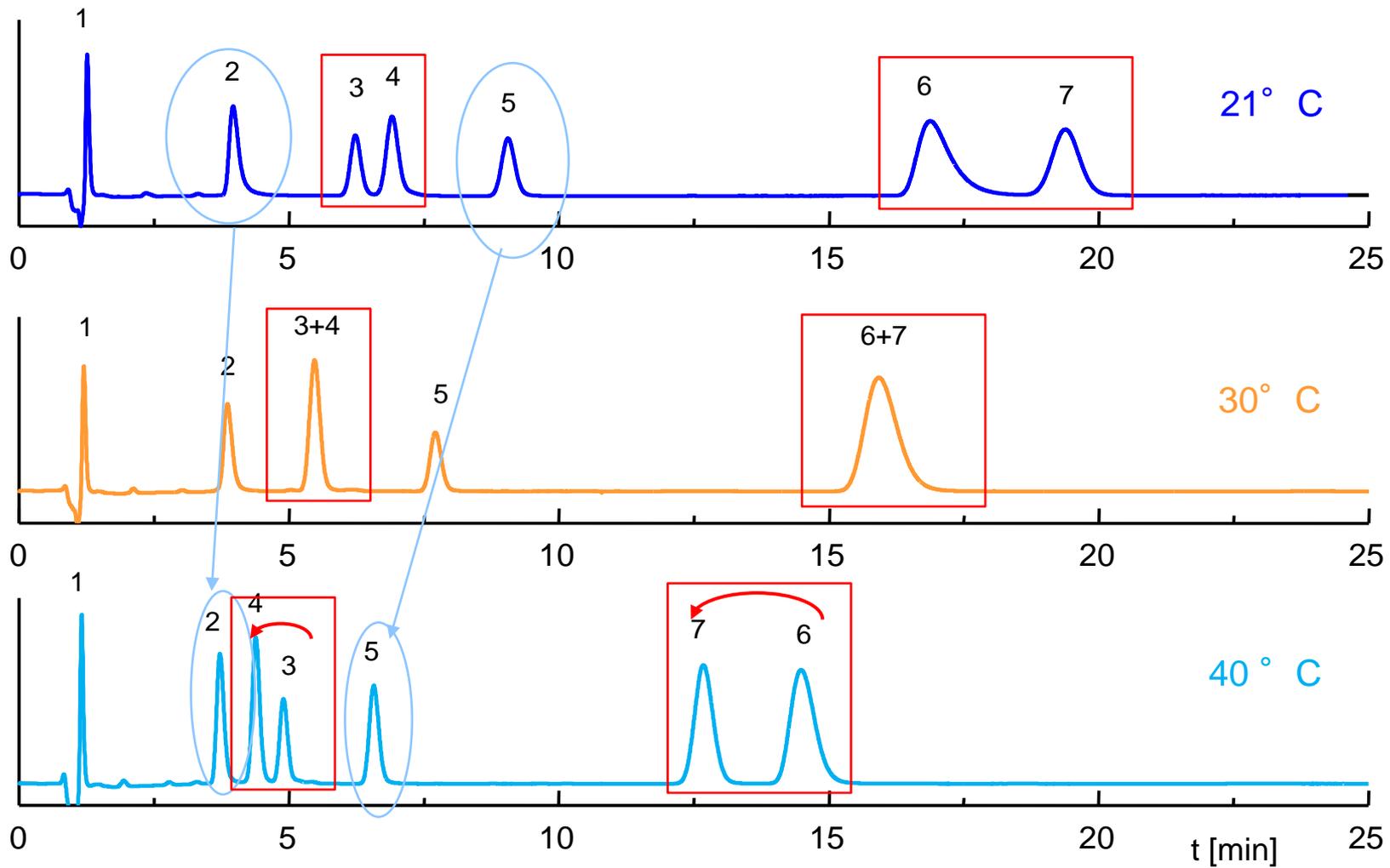
- **Chromatogramm**

- Säulentemperatur **50 °C**
- Trennsäule 4,6 mm ID

- **Ohne Eluentenvorheizung**

- Der Temperaturgradient führt zu längeren Retentionszeiten
- Die Breite von Peak # 2 steigt um 67 %
- Die Breite von Peak # 3 steigt um 97 %
- Generell negativer Einfluss auf die Peakform

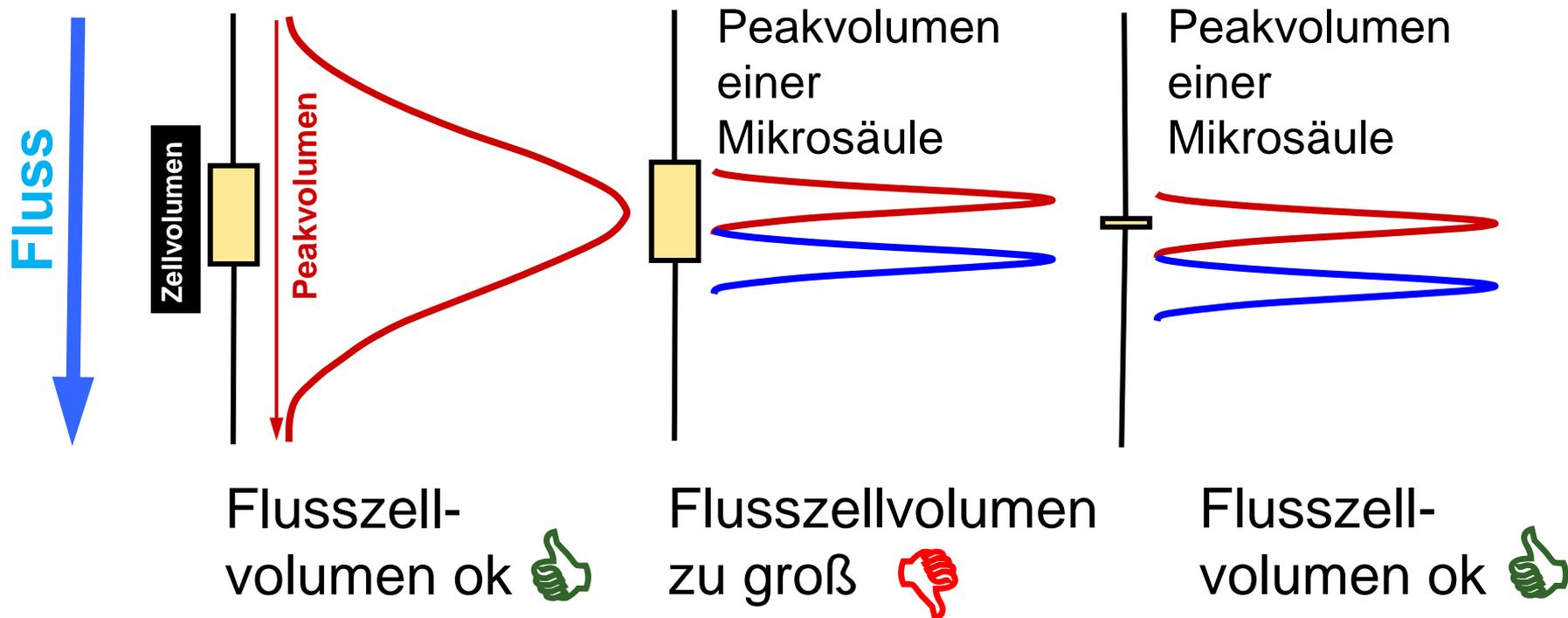
# Temperatureinfluss auf die Elutionsreihenfolge



## UV-Detektoren

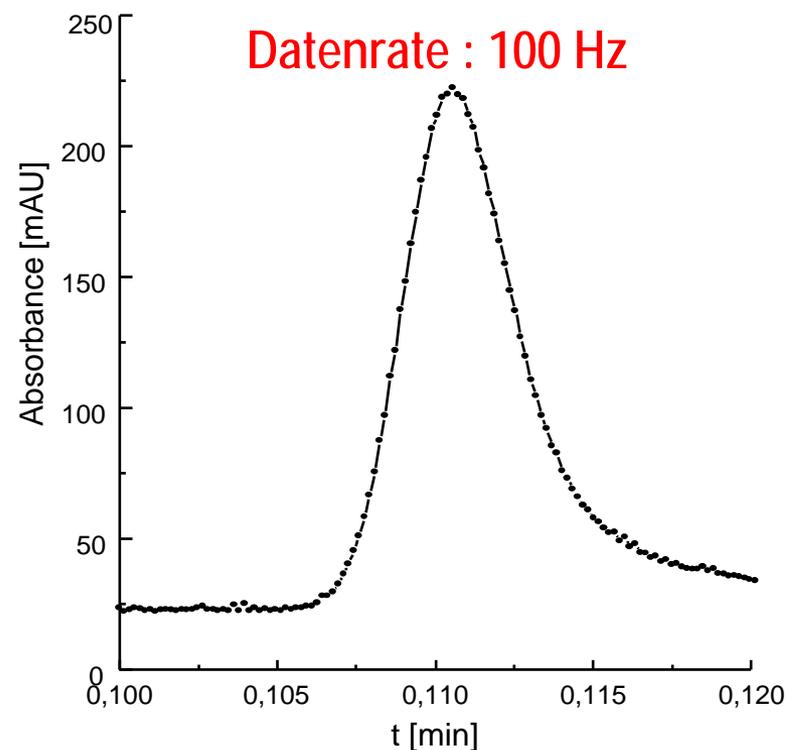
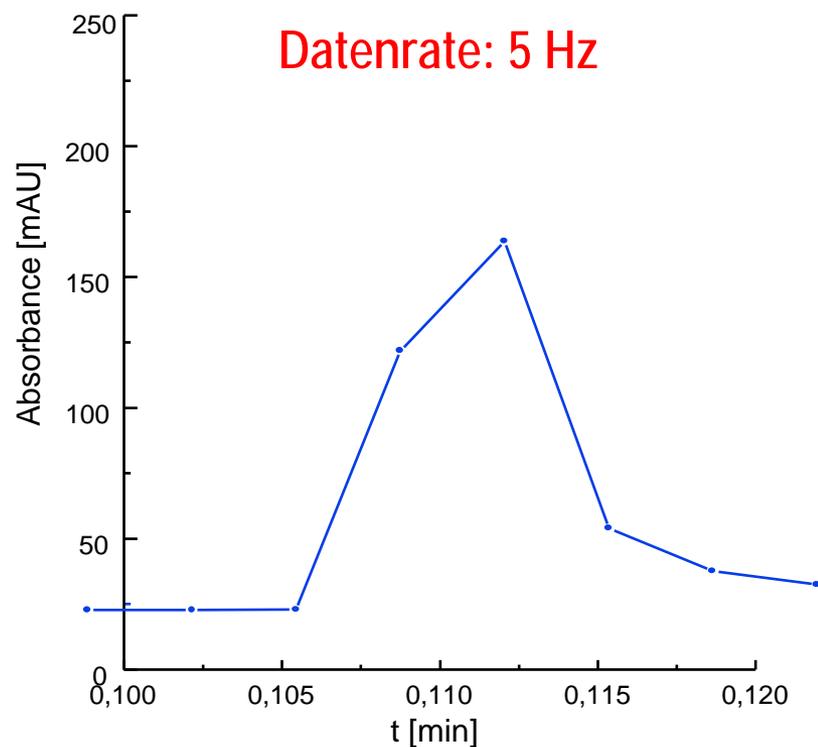


# Wie groß darf eine geeignete Detektorzelle sein?



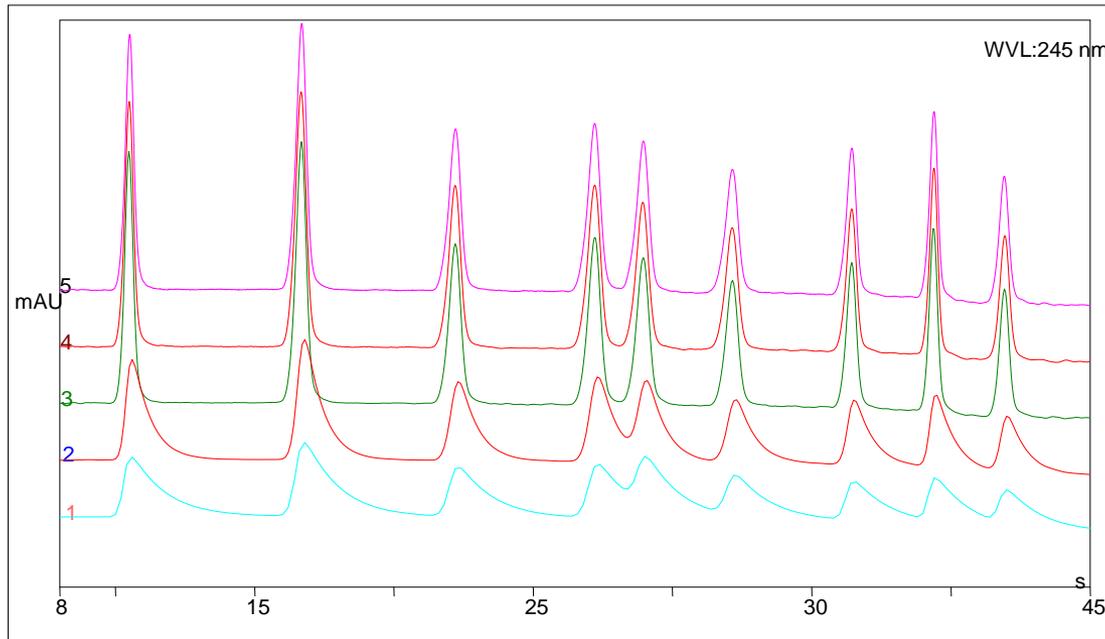
- Ist das Zellvolumen deutlich größer als das Peakvolumen, werden getrennte Peaks in der Messzelle zusammen und nicht separat erfasst.
- Das Volumen der Messzelle sollte höchstens 1/10 des kleinsten Peakvolumens betragen

# Empfohlene Parameter: Datenaufnahmerate



- Ein Peak sollte optimalerweise aus 30 – 40 Datenpunkten bestehen
- Zu wenig Datenpunkte haben negativen Einfluss auf die chromatographischen Ergebnisse (Peakform, Flächenpräzision, Reproduzierbarkeit usw.)

# Was passiert, wenn ich die Detektoreinstellungen variiere?



Data Collection Rate	Time Constant
100 Hz	0.01 s
50 Hz	0.02 s
25 Hz	0.025 s
10 Hz	0.5 s
5 Hz	1 s

- **Anforderungen bzgl. „Data Collection Rate“ und „Time Constant“**

- Der Parameter „Time Constant“ (Reaktionszeit des Detektors auf Signaländerung) und die Datenaufnahmerate müssen an die Peakbreite angepasst werden
- Falsche Werte führen zu einer „elektronischen“ Peakverbreiterung
- Chromeleon ermöglicht auf einfache Weise, die exakte Kombination zu ermitteln
- Response Time sollte dem Kehrwert der optimalen Datenrate mal 5 entsprechen ( $(1/DCR) \cdot 5 = \text{Response Time} = 2,2 \cdot \text{Zeitkonstante}$ )

# Zusammenfassung

- **Mobile Phase:** Qualität d. Eluenten/Additive beachten; Blank Injektionen für Troubleshooting; Puffer filtern, regelmäßig erneuern und prüfen (pH, Ionenstärke)
- **Pumpe:** Pumpentyp bei Methodentransfer möglichst beibehalten; statische Mischer zur Anpassung des Gradientenverzögerungsvolumens (GDV); Hinterkolbenspülung erhöht die Lebensdauer der Dichtungen/Kolben; Druckspur aufzeichnen (Troubleshooting); unteres Drucklimit  $\neq 0$  (Pumpe stoppt wenn Eluent leer)
- **Autosampler:** Fluidik vor Beginn der Messung spülen; Linearität und Flächenreproduzierbarkeit prüfen; „DrawSpeed“ und „DrawDelay“ anpassen; geeignete Probenlösungsmittel und Injektionsvolumen verwenden
- **Säulenthermostat:** Säulentemperatur beeinflusst Retentionszeit, Peakform und Selektivität; Äquilibrierzeit sollte 10 Säulenvolumen oder mehr entsprechen; Eluentenvorheizungen vermeiden radiale Temperaturgradienten auf der Säule und können die Peakform verbessern
- **UV Detektoren:** Volumen der Detektormesszelle sollte höchstens 1/10 des kleinsten Peakvolumens betragen; Datenrate und Response Time / Time Constant sollte auf den schmalsten Peak abgestimmt sein

**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit**

Bitte wenden Sie sich mit Fragen an

[analyze.eu@thermofisher.com](mailto:analyze.eu@thermofisher.com)