

Der HPLC-Tipp im März

Sehr kleine Peaks – was kann ich tun?

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Der Fall

Nehmen wir an, Sie müssen Komponenten in einer extrem geringen Konzentration quantifizieren – die Peaks sind einfach sehr klein. Es geht also im vorliegenden Fall vordergründlich nicht um eine gute Auflösung, es geht um eine gute Detektierbarkeit. Leider stehen Ihnen weder ein FLD noch eine LC/MS zur Verfügung, Sie müssen mit einem DAD arbeiten. Nehmen wir ferner an, es handelt sich um eine Gradientenmethode. Welche Möglichkeiten gibt es nun, einigermaßen auswertbare Peaks zu erhalten?

Die Lösung

Nachfolgend stichwortartig einige Lösungswege:

- Kleines Säulenvolumen: Möglichst kurze und dünne Säulen, z. B. 30-50 x 2,1 mm
- Möglichst schwache Probelösung, die Peakform wird verbessert, das bedeutet für ein RP-System: Die Probelösung sollte Wasser-reicher als der Eluent/der Anfangsgradient sein (Die Polarität der Probelösung kann zusätzlich durch Zugabe von Puffer oder Neutralsalz wie KCl oder NaCl erhöht werden). Im Klartext: Einfach verdünnen, evtl. ein wenig Kochsalz dazu geben, und mehr injizieren
- Kurzer, steiler Gradient, der bei möglichst „viel“ % B startet und bei möglichst „viel“ % B endet
- Wenn machbar, Acetonitril verwenden und bei erhöhter Temperatur messen (Herabsetzen der Viskosität)
- Zelle mit heißem Wasser/Isopropanol spülen
- Als Bandbreite („Bandwidth“) und Spalt („Slit“) 16 nm, als Zeitkonstante („Response Time“, „Time Constant“) 50 ms wählen
- Etwas aufwendiger, ggf. überlegenswert: „Bessere“ Zelle kaufen, Totvolumina minimieren, Vorheizer (UHPLC) verwenden

Das Fazit

- Mit relativ einfach umzusetzenden Maßnahmen kann das Peakvolumen erniedrigt und damit die Konzentration von Analyten erhöht werden, was für konzentrationsempfindliche Detektoren wie UV/DAD, FLD, RI sehr hilfreich ist
- Bezüglich apparativen Möglichkeiten sollte neben einem kleinen Säulenvolumen die Detektorzelle (Design, Volumen etc.) im Fokus stehen – sprechen Sie mit Ihrem Geräteelieferanten, die meisten Anbieter offerieren spezielle Zellen für den Spurenbereich

- Je früher die Peaks eluieren und je kleiner sie sind, umso wichtiger werden Einstellparameter