

Der HPLC-Tipp im April 2016

Modernes HPLC/UHPLC gekauft, dennoch unzufrieden – warum? II

von Dr. Stavros Kromidas, Saarbrücken

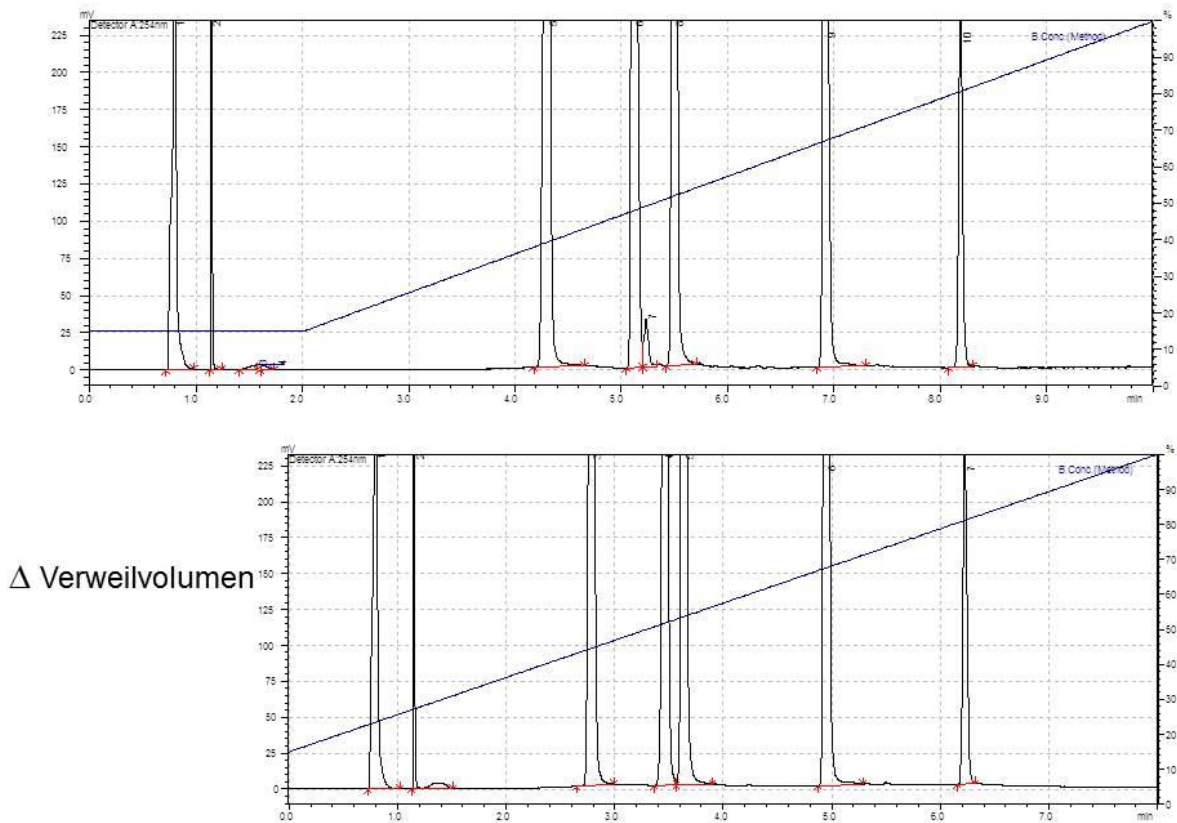
Der Fall

Im letzten Monat haben wir uns darüber unterhalten, dass an einem modernen HPLC/UHPLC-Gerät Peakform, Auflösung und Empfindlichkeit im Vergleich zu einem älteren Gerät womöglich zu wünschen übrig lassen. Heute wollen wir mögliche Gründe für die zwei letztgenannten Fälle ausfindig machen.

Die Lösung

Schlechtere Trennung an modernen Geräten

Moderne HPLC/UHPLC-Geräte weisen im Vergleich zu älteren Geräten ein wesentlich kleineres Verweilvolumen auf, Verweilvolumen = Dwell- oder Delayvolumen: Volumen von der Mischkammer/dem Mischventil bis zum Säulenkopf. Das Verweilvolumen wiederum beeinflusst beim Gradienten u A auch die Auflösung nach dem Motto: Δ Verweilvolumen oft Δ Auflösung. Und hier liegt der „Hund begraben“: Kleines Verweilvolumen bedeutet oft eine bessere Trennung aber eben „oft“, keinesfalls immer. In Abbildung 2 wird gezeigt, dass an einem älteren Gerät mit einem größeren Verweilvolumen (oberes Bild) in *diesem* Fall die Trennung besser ist: Eine Nebenkomponekte wird abgetrennt, was am modernen Gerät mit einem sehr kleinen Verweilvolumen nicht der Fall ist (unteres Bild).



Ein größeres Verweilvolumen ist nicht immer nachteilig...

Abb. 1 Zum Einfluss von Verweilvolumen auf die Trennung, Details, s. Text

Empfindlichkeitsverlust an modernen Geräten

Ein modernes HPLC/UHPLC-Gerät weist neben einem kleinen Verweilvolumen, s. weiter oben, auch ein kleines Totvolumen auf, Totvolumen = „Extra Column Volume“: Volumen vom Autosampler bis einschließlich Detektor – ohne Säule. Mit dem Ziel, ein möglichst kleines Totvolumen zu erreichen werden u A Detektorzellen mit sehr kleinen Volumina verwendet: 1-2 µl oder noch kleiner. Eine kleine (klassische) Zelle bedingt oft auch einen kurzen Lichtweg. Und laut Lambert-Beer-Gesetz hängt die Signalstärke u A eben auch vom Lichtweg ab. In älteren Geräten befinden sich große Zellen mit einem langen Lichtweg. Ferner werden an älteren Geräten üblicherweise nicht nur größere Injektionsvolumina injiziert sondern oft auch recht konzentrierte Lösungen. Die höhere Konzentrationen und der längere Lichtweg könnte der Grund dafür sein, dass an älteren Geräte die Empfindlichkeit besser als an modernen Gerät ist.

Das Fazit

Häufig gilt: Neu ist besser – aber eben: „häufig“...