

## Der HPLC-Tipp im Juni

Der RP-Gradient – eine „andere“ Welt...

© Dr. Stavros Kromidas, [www.kromidas.de](http://www.kromidas.de)

### Der Fall

Chromatographische Gesetzmäßigkeiten gelten grundsätzlich stets, unabhängig davon, ob es sich um HPLC, IC oder GC handelt. Und natürlich auch, ob isokratische oder Gradiententrennungen vorliegen. Jedoch gibt es bei LC-Gradienten einige Charakteristika, die schon etwas „eigen“ sind und sie man sinnvollerweise im Kopf behalten sollte. Dies hilft im Alltag, Ergebnisse richtig zu deuten und Vorhersagen bei Optimierungsläufen ein wenig sicherer zu treffen. Schauen wir uns nun zwei-drei typische an.

### Die Lösung

Vorbemerkung:

Die weiter unten aufgeführten Hinweise sind mit Hilfe entsprechender Formeln leicht zu belegen. Wir verzichten allerdings an dieser Stelle auf „Mathematik“ und konzentrieren uns lediglich auf die Aussagen selbst und die daraus resultierenden Konsequenzen. Interessierten Lesern sei auf (1) verwiesen.

#### *Abnahme der Retentionszeit*

1. Isokratischer Modus  
Eine Halbierung der Säulenlänge bzw. eine Verdoppelung der Flussrate führt zu einer Abnahme der Retentionszeit um Faktor zwei
2. Gradientenmodus  
Die gleichen Maßnahmen führen selbstverständlich auch beim Gradienten zu einer Abnahme der Retentionszeit, allerdings nicht um Faktor zwei sondern – je nach Mechanismus und Steilheit – lediglich um 10-30%

#### *Beeinflussung der Trennung durch physikalische Parameter*

1. Isokratischer Modus  
Physikalische Parameter wie Totvolumen (Volumen vom Autosampler bis einschließlich Detektor ohne Säule), Säulenvolumen und Fluss beeinflussen bei isokratischen Läufen nur die Retentionszeit und die Peakform. In das Wechselwirkungsgeschehen greifen sie nicht ein, somit ändert sich die Selektivität nicht.
2. Gradientenmodus  
Ändert sich bei Gradientenläufen dagegen das Verweilvolumen (Volumen vom Mischer bis zum Säulenkopf), das Säulenvolumen und der Fluss kann sich im Prinzip „alles“ ändern: Retentionszeit, Peakform, Selektivität, Elutionsreihenfolge.  
Nachfolgend einige mögliche Situationen:

- Sie setzen bei einem isokratischen Lauf eine längere Säule mit identischem Füllmaterial ein – die Peaks eluieren später und sind etwas breiter. Bei einem Gradientenlauf kann durch die längere Säule evtl. die Elutionsreihenfolge sich ändern!
- Sie setzen bei einer isokratischen Methode eine dünnere Säule ein und passen den Fluss dabei an – die Peaks sind schärfer, die Empfindlichkeit nimmt dadurch zu, die Auflösung ändert sich jedoch nicht. Dieser Griff bei einer Gradientenmethode kann dagegen zu einer Veränderung (oft Verbesserung) der Auflösung führen
- Eine Veränderung des Schleifenvolumens im Autosampler führt bei isokratischen Methoden ggf. zu einer Peakverbreiterung. Bei einem Gradienten, evtl. zu einer Verschiebung der Retentionszeit (und noch mehr...)

### Wichtigkeit des Totvolumens der Anlage und der Säulenlänge

#### 1. Totvolumen

Wenn das Volumen der Säule klein ist (kurze und/oder dünne Säule), ferner die Teilchengröße sub 2  $\mu\text{m}$  beträgt und die Peaks früh eluieren, verliert man enorm an Peaksymmetrie/Auflösung, sollte die Apparatur ein Totvolumen aufweisen. Bei gleicher Apparatur sehen die Peaks im Gradientenmodus dagegen hervorragend aus. Ein Eliminieren des Totvolumens liefert anschließend auch im isokratischen Modus scharfe Peaks, siehe Abbildung 1, entnommen aus (2).

#### 1 mm-Säule

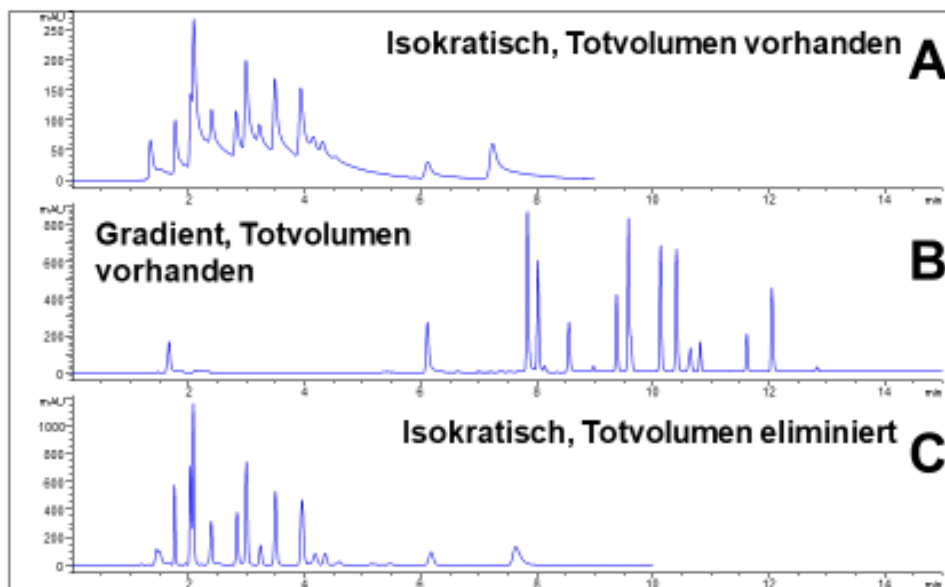


Abb. 1: Zum Einfluss des Totvolumens auf die Trennung, Details, siehe Text: (A) Isokratische Trennung (40% ACN), (B) Gradiententrennung (10 -90 % ACN in 15 min), (C) wie A, nach Eliminierung des Totvolumens

## 2. Säulenlänge

Durch eine Verlängerung der Säulenlänge ergibt sich eine höhere Bodenzahl. Eine solche kann bei isokratischen Trennungen die Auflösung merklich verbessern. Im Gradientenmodus spielt die Säulenlänge eine untergeordnete Rolle: An einer 20-50 mm-Säule sind 10-15 Peaks in der Regel gut zu trennen, siehe Abbildung 2, entnommen aus (1).

### Totvolumina im Gradientenmodus: Nicht so tragisch... Säulenlänge im Gradientenmodus: Nicht so wichtig...

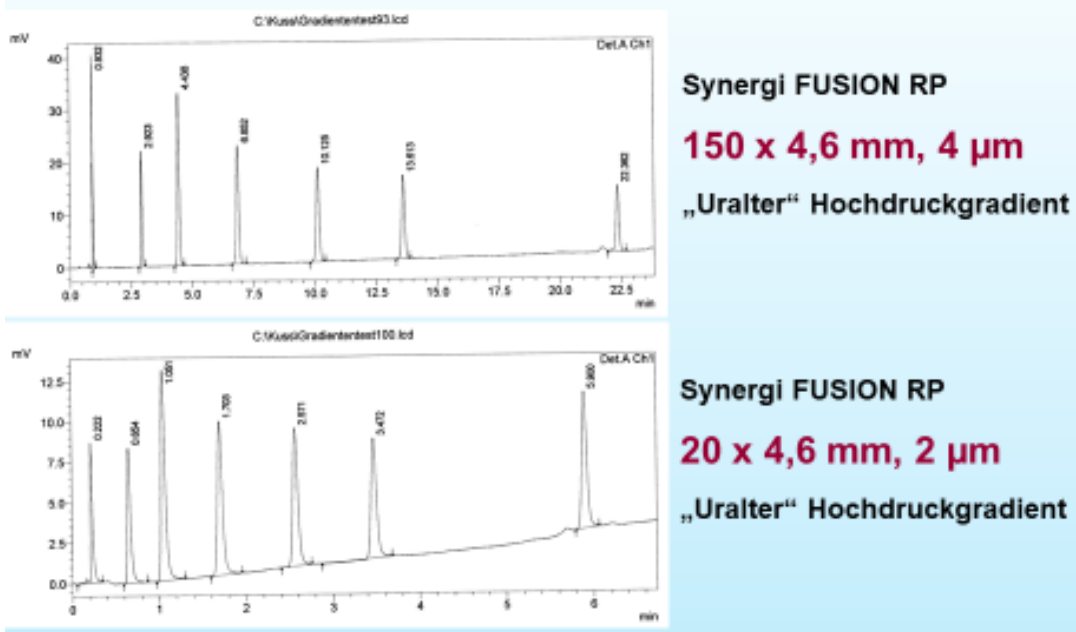


Abb. 2: Zum Einfluss der Säulenlänge im Gradientenmodus, Details, siehe Text

Trotz einer Verkürzung der Säulenlänge von 150 auf lediglich 20 mm und trotz Verwendung eines älteren Gerätes mit einem merklichen Totvolumen, sind 5-10 Peaks auch ohne weitere Optimierungsschritte problemlos zu trennen. Bemerkung zu der „Drift“ der Basislinie bei der 20 mm-Säule: Die Skalierung der Y-Achse ist unterschiedlich, also es handelt sich nicht um eine stärkere Drift.

## Das Fazit

Merke bzgl. Gradiententrennungen im Falle von 10-15 Peaks und keiner besonders schwierigen Matrix: Länge der Säule, Packungsqualität und Korngröße sind von untergeordneter Bedeutung, Steilheit sowie Anfangs- und End%B sind wesentlich wichtigere Optimierungstools. Physikalische Parameter wie Fluss und Säulenvolumen können – anders als im isokratischen Modus – die Selektivität und die Elutionsreihenfolge beeinflussen, diese Veränderung kann im Chromatogramm „vorne“ anders ausfallen als „hinten“.

- (1) Stavros Kromidas (Hrsg.) Der Gradient in der HPLC für Anwender, Wiley-VCH Verlag, ISBN 3-527-34291-5
- (2) Monika Dittmann, „Das Problem der externen Bandenverbreiterung in einer HPLC/UHPLC-Anlage“, in Stavros Kromidas (Hrsg.) Der HPLC-Experte II – so nutze ich meine HPLC/UHPLC optimal!, Wiley-VCH Verlag, ISBN 978-3-527-33838-2