

## 1

## Aspekte der Gradienten-Optimierung

Stavros Kromidas

### 1.1 Einführung

Gradienten sind vielfältig einsetzbar und finden daher eine breite Anwendung. So sind beispielsweise Gradienten bei der Methodenentwicklung von unbekannten Proben ebenso unverzichtbar, wie für die Quantifizierung im Spurenbereich. Der theoretische Hintergrund der Gradientelution ist recht komplex, denn: Das Geschehen in der Säule während einer Gradientelution wird im Vergleich zu isokratischen Trennungen von mehr Faktoren beeinflusst, diese wirken darüber hinaus teilweise entgegengesetzt oder multiplikativ. Im vorliegenden Beitrag werden wir ausschließlich einige Aspekte der Optimierung von Gradiententrennungen in der RP-Chromatographie in bewusst einfacher Form vorstellen. Weitere wichtige Gesichtspunkte des Gradienten wie Theorie, Apparatives und Troubleshooting sind anderen Quellen vorbehalten [1–4]. Zunächst erfolgt eine kurze Beschreibung des Wirkens eines Gradienten in der Säule, anhand einiger Grundformeln wird anschließend auf die Charakteristika/Besonderheiten des Gradienten eingegangen. Darauf aufbauend werden Möglichkeiten der Optimierung für folgende Zielsetzungen aufgezeigt: niedrige Nachweisgrenze, hohe Peakkapazität, ausreichende Auflösung sowie möglichst kurze Retentionszeiten. Zum Schluss erfolgt eine Zusammenfassung mit einigen Grundregeln und Empfehlungen.

### 1.2 Besonderheiten des Gradienten

In der HPLC herrschen üblicherweise während der Trennung unterschiedlich starke Wechselwirkungen zwischen den Analyten einerseits sowie den Eluentenbestandteilen andererseits und der stationären Phase. Bei isokratischen Trennungen liegt eine vorgegebene, konstante Eluentenzusammensetzung vor, die Konsequenz lautet: Während des Chromatographielaufs findet eine konstante, gleichstarke Wechselwirkung der Eluentenmoleküle mit dem Phasenmaterial statt.

Was passiert nun beim Gradienten? Bei Gradiententrennungen nimmt die Elutionsstärke der mobilen Phase zu, ihre Wechselwirkung mit der stationären Phase nimmt im Gradientenverlauf somit ebenfalls zu. In der RP-Chromatographie gilt: Je organischer, apolarer/hydrophober der Eluent im Laufe der Trennung wird

(immer mehr % B, ACN oder MeOH), umso stärker wird seine Wechselwirkung mit der organischen, apolaren Oberfläche eines RP-Materials – es gilt ja „Gleiches mit Gleichem“, d. h. die apolaren ACN- oder MeOH-Moleküle „mögen“ naturgemäß z. B. apolare C<sub>18</sub>-Alkylgruppen.

Die Substanzmoleküle bekommen nun im Gradientenverlauf aufgrund der immer stärker werdenden Konzentration an ACN/MeOH-Molekülen eine gebührende Konkurrenz bei ihren Wechselwirkungen mit den C<sub>18</sub>-Alkylgruppen. Sie werden dadurch immer stärker gezwungen, die stationäre Phase schneller zu verlassen, gelangen früher in die mobile Phase und eluieren somit auch früher im Vergleich zu isokratischen Trennungen. Bei 100 % MeOH bzw. ACN am Ende des Gradienten eluieren sogar die sehr hydrophoben Komponenten der Probe, evtl. auch hartnäckige organische Verunreinigungen, die sich womöglich an der Oberfläche der stationären Phase angesammelt haben mögen – die Säule wird nebenbei gespült.

Beim Gradienten haben wir mit Fokus auf die Peakform zwei entgegengesetzte Tendenzen: Je später die Peaks eluieren, umso stärker unterliegt einerseits die Substanzzone Dispersionsvorgängen in der Säule und somit nimmt zunächst auch die Bandenverbreiterung zu – analog zu isokratischen Trennungen. Andererseits wird im gleichen Maße die Beschleunigung der wandernden Substanzzone immer stärker, da ja die Elutionsstärke des Eluenten von Anfang bis Ende permanent zunimmt. Ergebnis: Diese Effekte kompensieren sich und wir erhalten beim Gradienten in der Regel schmale Peaks. Merke: Beim Gradienten ergibt sich eine stete Aufkonzentrierung der Elutionsbande und damit eine geringe Bandenverbreiterung im Vergleich zu isokratischen Trennungen, was in der Konsequenz niedrige Nachweisgrenzen zur Folge hat.

Das trifft sowohl für den vorderen als auch für den hinteren Teil des Chromatogramms zu, im idealen Fall bleibt die Peakbreite konstant. Aus diesem Grunde ist im Zusammenhang mit dem Gradienten nicht statthaft, von einer „Bodenzahl“ zu sprechen: Die Bodenzahl, ein Maß für die Bandenverbreiterung, ist nur für isokratische Bedingungen definiert. Das hier beschriebene Phänomen bedeutet u. A. für die Praxis, dass eine nachlassende Packungsqualität und eine sub-optimale Hardware (apparative Totvolumina), die bei isokratischen Trennungen zu breiten Peaks führen, sich bei Gradiententrennungen nicht so stark bemerkbar machen: Auch an „schlechten“ Geräten und mit „schlechten“ Säulen sehen Chromatogramme bei einer Gradientelution ordentlich aus, vor allem dann, wenn der Gradient steil ist und ACN als organischer Anteil des Eluenten benutzt wird – eine willkommene Tatsache für Beispielchromatogramme in Herstellerprospekten.

Das Positive aus Anwendersicht: Einfache Gradiententrennungen an 20–50 mm-Säulen an konventionellen Apparaturen erweisen sich in der Regel als unproblematisch, jedenfalls was die Peakform betrifft. Auch der Vorteil von kleineren Korngrößen z. B. 2 oder 3 µm-Teilchen gegenüber 5 µm-Teilchen ist bei zahlreichen Applikationen weniger relevant. So sollte im Falle einer schwierigen Matrix zunächst an 3,5–5 µm-Material gedacht werden. Es sei denn, man hat eine große Zahl von sehr ähnlichen Analyten zu trennen – in diesem Fall kommt die Trennschärfe von sub ≤ 2 µm-Teilchen selbstverständlich auch beim Gradienten zum Tragen. In diesem Zusammenhang sei auch auf folgendes hingewiesen: Da

der Eluent permanent stärker (= apolarer) wird, sind die wandernden Substanzmoleküle am Ende eines Peaks, also an der hinteren Flanke, schneller als am Anfang des Peaks, die später eluierenden Moleküle der Substanzbande werden stets schneller nach „vorne“ geschoben. Diese Tatsache, als „Peakkompression“ bekannt, führt dazu, dass bei Gradiententrennungen selten ein Tailing beobachtet wird. Die Peaksymmetrie ist um ca. 10 % besser im Vergleich zu einem isokratischen Lauf bei äquivalenter Eluentenzusammensetzung (Hans-Joachim Kuss, persönliche Mitteilung).

### 1.3 Einige chromatographische Größen und Formeln

Betrachten wir jetzt einige chromatographische Größen, die aus der Theorie – die übrigens ursprünglich für die GC und wesentlich später für isokratische LC-Trennungen entwickelt worden ist – bekannt sind. Auf das Ableiten der verwendeten Formeln weiter unten wird verzichtet, vielmehr werden sie lediglich benutzt, um die Konsequenzen für die Optimierungspraxis herauszuarbeiten. Für eine detailliertere Diskussion, s. [2–4] und insbesondere [1]. Die Auflösung  $R$  („Resolution“) ist vereinfacht der Abstand zweier Peaks an der Basislinie. Der Retentionsfaktor  $k$  (früher: Kapazitätsfaktor  $k'$ ) ist das Verhältnis der Aufenthaltszeit einer Komponente in/an der stationären Phase und der mobilen Phase, das ist also der Quotient aus der Nettoretentionszeit  $t'_R$  (Aufenthaltszeit an der stationären Phase) und der Durchfluss- oder Tot- oder Mobilzeit  $t_0$  bzw.  $t_m$  (Aufenthaltszeit in der mobilen Phase). Er stellt somit ein Maß für die Stärke der Wechselwirkungen *dieser* Komponente an *dieser* Säule bei *diesen* Bedingungen dar:  $k = t'_R/t_0$ . Der Retentionsfaktor ist allerdings beim Gradienten nicht konstant: sehr groß am Anfang (die Substanzen „kleben“ bei 100 oder 95 % Wasser/Puffer regelrecht am Anfang der stationären Phase), im Laufe der Trennung kleiner werdend und am Ende des Gradienten ist er sehr, sehr klein (bei 90 oder 100 % MeOH oder ACN haben die Substanzmoleküle kaum eine Chance sich auf der stationären Phase aufzuhalten, denn die Konkurrenz um die „Gunst“ der  $C_{18}$ -Gruppen ist nun riesig geworden). Vereinfacht gesagt: Bei einem Gradienten von 100 % Wasser/Puffer auf 100 % MeOH/ACN ist der  $k$ -Wert am Anfang quasi unendlich – in manchen Literaturstellen werden Zahlen zwischen 3500 und 4000 genannt – und am Ende nahezu null. Da sich der  $k$ -Wert während der Gradientelution ändert, wurde mit dem Ziel dieser Besonderheit Rechnung zu tragen, ein  $k^*$ -Wert (oder  $\bar{k}$ ) eingeführt [1]: Das ist der  $k$ -Wert einer Komponente, wenn sie sich gerade in der Mitte der Säule befindet. Obwohl die Notwendigkeit einer derartigen Größe zum Beschreiben des Gradienten hinterfragt werden darf, wird hier der  $k^*$ -Wert verwendet, da er für unsere Betrachtungen Vorteile bringt. Und dass die Wechselwirkung und somit ein Maß für sie, also eine Retentionsgröße, für Optimierungsüberlegungen wichtig ist, leuchtet ein – wie auch immer eine derartige Größe definiert sein mag. Der Trennfaktor  $\alpha$  ist der Quotient aus den Retentionsfaktoren zweier Komponenten, die man trennen möchte,  $k_1$  und  $k_2$ , und stellt die Trennfähigkeit des chromatographischen Systems für diese zwei Komponenten dar. In der Literatur werden für  $R$  und  $k^*$  unterschiedliche Formeln verwendet.

Sie sind jedoch recht ähnlich und führen letzten Endes zu ähnlichen Zahlenwerten und somit zu ähnlichen Aussagen, wenn der Fokus auf die Praxis gerichtet ist. Dazu folgendes Beispiel: In Formel (1.1), s. weiter unten, wird in der Literatur für den zweiten Term (Selektivitätsterm) neben  $(\alpha - 1)$  auch  $\ln \alpha$  bzw.  $\alpha - 1/\alpha$  verwendet. Bei einem angenommenen  $\alpha$ -Wert von 1,05 ergeben sich folgende Zahlenwerte für den Selektivitätsterm: 0,048, 0,049 und 0,050. Diese unterschiedlichen Zahlen beeinflussen jedoch den Wert für die Auflösung lediglich in der zweiten Stelle nach dem Komma. Nachfolgend sind fünf einfache Formeln angegeben. Sie reichen aus, um Schlussfolgerungen für die Optimierungspraxis zu ziehen.

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot (\alpha - 1) \cdot \frac{k}{1 + k} \quad (1.1)$$

$$k^* = \frac{t_G \cdot F}{\Delta \% B \cdot V_m \cdot S} \quad (1.2)$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (1.3)$$

$$k = f \left( \frac{V_D}{V_m} \right) \quad (1.4)$$

$$n_c = \frac{t_{RI} - t_{Re}}{w} \quad \text{oder} \quad n_c = \frac{t_G}{w} \quad (1.5)$$

mit

$R$	Auflösung,
$N$	Bodenzahl, grundsätzlich für isokratische Bedingungen definiert,
$\alpha$	Trennfaktor (früher: Selektivitätsfaktor),
$k$	tatsächlicher (gemessener) Retentionsfaktor einer Komponente,
$k^*$	Retentionsfaktor einer Komponente in der Mitte der Säule,
$t_G$	Gradientendauer,
$F$	Fluss,
$\Delta \% B$	Differenz Anfangs-/Endkonzentration der organischen Komponente der mobilen Phase,
$V_m$	Totvolumen der Säule, auch Durchfluss- oder Mobilvolumen genannt; das ist das Volumen der mobilen Phase in der Säule. Dieses entspricht dem geometrischen Volumen der Säule minus dem Skelettvolumen der stationären Phase und wird manchmal als „effektives Volumen“ der Säule bezeichnet; vereinfacht kann $V_m$ dem Volumen der Säule gleichgesetzt werden,
$S$	Konstante, jene ergibt sich aus der Struktur des Analyten und den chromatographischen Bedingungen,
$V_D$	Verweil- oder Verzögerungsvolumen („Dwell“ oder „Delay Volume“: Volumen zwischen Mischkammer und Säule),
$n_c$	Peakkapazität,
$t_{RI}$	Retentionszeit des letzten Peaks,

$t_{\text{Re}}$	Retentionszeit des ersten Peaks,
$w$	Peakbreite.

Das Produkt aus  $t_{\text{G}} \times F$  wird als Gradientenvolumen bezeichnet.

#### **Bemerkungen zu Gln. (1.2)–(1.4), oder: isokratische vs. Gradiententrennungen**

Gemäß Gl. (1.2) führt eine Änderung der Flussrate und/oder der Säulendimensionen zu einer Änderung des  $k^*$ -Wertes. Merke: Diese Beeinflussung betrifft beim Gradienten den Retentionsfaktor grundsätzlich – unabhängig davon, ob der mittlere,  $k^*$  oder der tatsächlich gemessene  $k$  betrachtet wird. Ferner beeinflussen gemäß Gl. (1.4) das Verweil- sowie das Säulenvolumen ebenso den  $k^*/k$ -Wert. Eine Änderung dieser Faktoren kann nun bei unterschiedlichen Analyten unterschiedlich ausfallen. Da  $\alpha = k_2/k_1$  gilt, kann sich folglich auch die Selektivität ändern!

So verwendet beispielsweise manch ein Anwender im Rahmen einer Methodenentwicklung nach dem erfolgreichen Finden einer geeigneten stationären Phase nun eine längere Säule mit dem identischen Phasenmaterial und wundert sich, dass sich die Selektivität/Elutionsreihenfolge ändert. Oder aber es geht um Methodentransfer: Die verwendeten Geräte sind praktisch identisch, möglicherweise könnten bei identischem Volumen der Mischkammer lediglich sehr kleine Unterschiede im Verweilvolumen z. B. durch ein unterschiedliches Schleifenvolumen im Autosampler vorhanden sein (s. auch Kapitel 2). Auch in diesem Fall sollte nicht nur mit den allgemein bekannten Änderungen wie Retentionszeit, Peakform und Auflösung gerechnet werden, sondern eben auch mit einer etwaigen Änderung der Selektivität oder gar der Elutionsreihenfolge (s. weiter unten), denn – s. Gl. (1.4):  $V_{\text{D}}$  bleibt konstant aber  $V_{\text{m}}$  ändert sich, dies macht sich besonders bei sehr kurzen/dünnen Säulen bemerkbar.

Die hier beschriebenen Probleme werden häufiger beobachtet, wenn in der Probe sogenannte irreguläre Komponenten enthalten sind, s. weiter unten. Ein größeres Totvolumen (= Volumen zwischen Probengeber und Detektor – ohne Säule) führt bei isokratischen Anlagen dagegen „nur“ zu breiteren Peaks und dadurch zu einer Verschlechterung der Auflösung. Analog beeinflusst eine längere Säule bei isokratischen Trennungen die Retentionszeit, die Peakform und die Auflösung. Die Länge der Säule wird – anders als bei Gradiententrennungen! – weder die Selektivität noch die Elutionsreihenfolge verändern können.

Und in diesem Zusammenhang noch ein letztes Beispiel: Nehmen wir an, eine Komponente eluiert im isokratischen Modus bei einem Fluss von 1 ml/min und gegebener Eluentenzusammensetzung bei 10 min. Erhöht sich der Fluss auf 2 ml/min, eluiert die Komponente nach 5 min, denn sie „macht“ die neue Geschwindigkeit mit, ihre Aufenthaltszeit in der Säule ist um Faktor 2 kürzer geworden. Nehmen wir jetzt an, eine Komponente verlässt im Gradientenmodus die stationäre Phase bei einem Anteil von 40 % B im Eluenten, ab dann wandert sie mit der Geschwindigkeit des Eluenten – wie gehabt. Nehmen wir ferner an, der Gradient erreicht diese 40 % B nach 10 min, die Substanz eluiert nach 12 min. Das heißt, die Substanz befindet sich 10 min lang an der stationären Phase und durchwandert die Säule bei einem Fluss von 1 ml/min in 2 min. Bei einer Erhöhung des Flusses auf 2 ml/min verweilt die Substanz weiterhin 10 min lang an der stationären Phase – die geänderte Eluentengeschwindigkeit mit der die Elu-

entenmoleküle nun wandern, beeinflusst die Wechselwirkungen nicht. Die Aufenthaltszeit in der mobilen Phase nimmt selbstverständlich um Faktor 2 ab (von 2 min auf 1 min), die Komponente eluiert nun nach 11 min. Das bedeutet: Ein höherer Fluss bringt die Moleküle schon schneller voran, das Wichtigste jedoch hat bereits die Elutionsstärke bewirkt. Somit ist beim Gradienten die Elutionsstärke, bei der eine Komponente die stationäre Phase verlässt, für die Retentionszeit viel wichtiger als der Fluss.

Bei isokratischen Trennungen ist der Fluss die treibende Kraft, bei Gradiententrennungen ist es dessen Steilheit, letzten Endes % B/ml. So führt eine Erhöhung des Flusses um Faktor 2 – bei sonst konstanten Bedingungen – je nach Gradientensteilheit zu einer Abnahme der Retentionszeit um lediglich ca. 5–15 %. Diese Überlegungen bzgl. Retentionszeit gelten analog auch für die Säulenlänge: Eine kürzere Säule führt bei sonst konstanten Bedingungen – anders als bei isokratischen Trennungen – nur zu einer unwesentlich kürzeren Gradientendauer, s. Beispielchromatogramme weiter unten. Und schließlich: Da sowohl  $k^*$ - und  $k_e$ -Werte ( $k_e = k$ -Wert im Moment der Elution aus der Säule) als auch die Peakbreiten für die frühen/späten Peaks im idealen Fall jeweils konstant bleiben bzw. sehr ähnlich sind, bedeutet dies Folgendes: Anders als bei isokratischen Trennungen ist die Auflösung bei den frühen Peaks des Chromatogramms nicht per se schlechter als bei den späteren Peaks. Die einfache Formel „frühe Peaks, schlechte Auflösung“ gilt beim Gradienten nicht – die Auflösung ist bei Gradiententrennungen eine Größe, die sich sehr „individuell“ verhalten kann.

#### **Merke:**

Bei isokratischen Trennungen beeinflussen physikalische Parameter wie Fluss, Säulensimulationen und Totvolumina die Retentionszeit und über die Peakform auch die Auflösung; in das Wechselwirkungsgeschehen („Chemie“) greifen diese Parameter nicht ein. Bei Gradiententrennungen können sich jedoch darüber hinaus auch die Selektivität und die Elutionsreihenfolge ändern; diese Änderungen können des Weiteren am Anfang des Gradienten anders ausfallen als am Ende.

## **1.4 Nachweisgrenze, Peakkapazität, Auflösung – Möglichkeiten der Optimierung**

### **1.4.1 Nachweisgrenze**

Die drei wichtigsten Ziele bei einer Optimierung sind: niedrige Nachweisgrenze, „gute“ Trennung und nicht zuletzt schnelle Trennung. Wir beginnen mit der Nachweisgrenze. Möglicherweise ist diese Aufgabe die Einfachste – zumindest, was die Umsetzung der möglichen Maßnahmen betrifft. Mit dem Ziel nun einer niedrigen Nachweisgrenze gilt – analog isokratischen Trennungen – auch hier:

- Optimale Wellenlänge aber auch optimale Einstellparameter – sehr wichtig insbesondere für kleine, frühe Peaks, z. B.: kleine Zeitkonstante („Rise Time“, „Time Constant“, „Filter Time“, „Response Time“, „Dwell Time“), große Datenrateaufnahme („Sample Rate“, „Sampling Time“), große Bandbreite („Bandwidth“), großer Spalt („Slit“) und „passende“ Referenzwellenlänge beim DAD.

- Kleines Totvolumen, d. h. kurze und vor allem dünne Kapillaren, kleines Zellvolumen – allerdings bei einem möglichst langen Lichtweg im Falle eines UV-Detektors.
- Man sollte für ein günstiges Peak/Rauschen-Verhältnis sorgen, z. B.: empfindlicher messen (das Peak/Rauschen-Verhältnis wird günstiger), optimaler Zustand von Detektorteilen, wie: kein Belag in der UV-Zelle, keine „blinden“ Spiegel, keine korrodierten Platinen, keine Ablagerungen am MS-Interface, saubere Elektrodenoberfläche beim elektrochemischen Detektor usw. Bei Bedarf sollte das elektronische Rauschen von AD-Wandlern und sonstigen Interfaces durch Verwendung von elektronischen Dämpfern reduziert werden.
- Man sollte für eine Aufkonzentrierung/Fokussierung der Substanzzone am Säulenkopf sorgen („On Column Concentration“), die Probenlösung sollte schwächer – also polarer – als der Anfangseluent sein: Probenlösung mit Wasser verdünnen bzw. mit Neutralsalz oder Puffer versetzen.
- Miniaturisierung nutzen: kürzere und vor allem dünnere Säulen verwenden – auf mögliche Überladung durch den Hauptpeak/die Matrix achten – kleinere Teilchen/Fused Core Materialien einsetzen.
- Temperatur erhöhen (wichtig!)

Und nun in aller Kürze speziell beim Gradienten:

1. Kleines Gradientenvolumen
2. a) Bei sehr frühen, chemisch ähnlichen Peaks: Mit „viel“ Wasser/Puffer beginnen, um eine „On Column Concentration“ zu erreichen.  
b) Bei einfachen Trennungen und nicht allzu polaren Komponenten mit 50–60 % B starten.
3. Einen kurzen, steilen Gradienten mit großer Endkonzentration an % B fahren. Je steiler der Gradient, desto früher bringt der Eluent die Komponenten zum Säulenausgang und desto geringer wird das dafür benötigte Volumen an mobiler Phase.

Durch diese Maßnahmen eluieren die Peaks früh, sie sind schmal und hoch. Merke: Je steiler der Gradient, umso ähnlicher die Peakbreiten und umso ähnlicher und geringer die Bandenverbreiterung. Ein steiler Gradient bedeutet allerdings – abhängig von der Wellenlänge bei einem UV-Detektor und den verwendeten Lösemitteln und Eluentadditiven – oft eine merkliche Drift, was sich kontraproduktiv auswirken kann. Hier gilt, einen vernünftigen Kompromiss zwischen Anfangs-% B, Wellenlänge und Steilheit zu finden. Die Steilheit des Gradienten stellt dagegen bei der LC-MS-Kopplung selten ein ernstes Problem dar (s. Kapitel 8), bei den Aerosol-Detektoren ist ein steiler Gradient für die Nachweisgrenze sogar vorteilhaft. Unter Umständen wäre schließlich an ein konkaves bzw. konvexes Gradientenprofil zu denken, wenn die Nachweisgrenze bestimmter Peaks gezielt im hinteren bzw. im vorderen Teil des Chromatogramms verbessert werden soll.

### 1.4.2 Peakkapazität und Auflösung

#### Peakkapazität

Als Peakkapazität wird üblicherweise die Anzahl der Peaks pro Zeiteinheit definiert, s. Gl. (1.5). Die Peakkapazität als Trennkriterium erweist sich dann als wichtig, wenn sehr ähnliche Komponenten getrennt werden sollen, z. B. Bestandteile einer homologen Reihe wie Oligomere, in diesem Fall erwartet man äquidistante Abstände der Peaks. Bei ähnlichen Komponenten können wir nur schwerlich unterschiedliche Wechselwirkungen und damit eine gute Selektivität erwarten. Ähnlich verhält es sich im Falle von komplexen Mischungen und/oder einer schwierigen Matrix. Auch hier kommen wir via Selektivität realistischerweise nicht weiter. Eine Trennung wird hier möglich sein, wenn man die vielen (ähnlichen?) Komponenten als schmale Peaks über das gesamte Chromatogramm verteilt eluieren kann. Umgekehrt, je unterschiedlicher die Komponenten sind, umso mehr gerät die Peakkapazität in den Hintergrund und die „Chemie“ in den Vordergrund, denn: Hier hätten wir zumindest die Chance, unterschiedliche Wechselwirkungen herbeizuführen und damit die Selektivität und folglich sehr effektiv die Auflösung zu verbessern. Vereinfacht: Bei ähnlichen Komponenten und somit geringer Selektivität gerät der (wichtige) Selektivitätsterm in Gl. (1.1) in den Hintergrund, die gewünschte Auflösung kann nur durch Erhöhung des Effizienzterms erreicht werden – vernünftig starke Wechselwirkungen vorausgesetzt. Wie kann nun die Peakkapazität erhöht werden? Die drei Hauptfaktoren sind: möglichst großes Gradientenvolumen, möglichst steile Gradienten (bei konstant gehaltenem Gradientenvolumen!), möglichst schmale Peaks; was wiederum zunächst Folgendes bedeutet: lange Säule, langer Gradient plus hoher Fluss, hoher End-% B. Je effizienter die Säule (hohe Bodenzahl, d. h. lange Säule gefüllt mit kleinen Teilchen), umso länger sollte der Gradient sein, um eine gute Peakkapazität zu erhalten. Je kürzer die Säule, umso unwichtiger wird die Gradientendauer: Es lohnt sich nicht, bei kurzen Säulen lange Gradienten zu fahren. Merke: Ein langer Gradient bewirkt wenig; ein doppelt so langer Gradient führt zu einer Erhöhung der Peakkapazität um nur ca. 20 %, denn die Komponenten eluieren bei einer geringeren Elutionsstärke, die Peaks werden breiter – und die Peakbreite wird ja von % B bestimmt, bei dem die Komponente eluiert. Merke: Der Nutzen eines längeren Gradienten wird immer schwächer, je größer das Verhältnis Gradientenvolumen zu Säulenvolumen,  $V_G/V_m$ , wird. In der Praxis lohnt es sich kaum über Faktor 30 zu gehen.

Wenn UHPLC zur Verfügung steht, lautet ergänzend die Empfehlung: Verwende eine lange Säule gefüllt mit sub 2  $\mu\text{m}$ -Teilchen – denke evtl. auch an Core Shell oder Monolithen, fahre einen steilen Gradienten und erhöhe zusätzlich die Temperatur. Ein Trick der bei vielen ähnlichen Komponenten oft zu guter Auflösung *und* schmalen Peaks führt: Fange mit hohem % B an und fahre einen relativ flachen Gradienten.

#### Auflösung

Wenden wir uns nun dem Ziel „gute“ Auflösung zu. Dies ist mit Abstand der schwierigste Fall. Halten wir zunächst wie folgt fest: Gute Auflösung bedeutet vereinfacht, einen großen Abstand zwischen zwei Peaks an der Peakbasis. Es

kann allerdings sein, dass nicht nur ein oder zwei kritische(s) Paar(e) existier(t)en, sondern ganze kritische Regionen im Chromatogramm. Der Fokus bei der Optimierung liege dann auf einer guten Auflösung in diesem Bereich des Chromatogramms. Wenn ich „alles“ gut trennen muss (kritisch hinterfragen, ob dies wirklich notwendig ist), dann wird die Summe aller Auflösungen zum maßgeblichen Trennkriterium und wir sind wieder bei der Peakkapazität, s. weiter oben. Gl. (1.1) ist zu entnehmen, dass die Auflösung von einem Effizienz-, einem Selektivitäts- und einem Retentionsterm beeinflusst wird. Eine Verbesserung der Auflösung wird durch eine Erhöhung der Werte der drei Terme erreicht: d. h. eine möglichst große Bodenzahl, eine gute Selektivität – unterschiedlich starke Wechselwirkungen der mich interessierenden Komponenten an der stationären Phase – sowie überhaupt starke Wechselwirkungen.

#### **Bodenzahl – Effizienzterm**

Eine gute Effizienz, also eine hohe Bodenzahl ist generell wünschenswert. Doch ist eine solche im Gradientenmodus für „normale“ Trennungen eher zweitrangig: Erstens befindet sich die Bodenzahl unter der Wurzel, eine Erhöhung der Bodenzahl sogar um Faktor zwei (z. B. von einer üblichen Bodenzahl von 10 000 auf eine – in der UHPLC in der Praxis noch realisierbare – Bodenzahl von 20 000) führt zu einer Erhöhung der Auflösung um  $\sqrt{2}$  also lediglich um Faktor 1,4 – dies unter isokratischen Bedingungen! Und zweitens spielt die „Bodenzahl“ gerade beim Gradienten eine untergeordnete Rolle: Wie weiter oben dargelegt, sind die Peaks durch die permanent zunehmende Elutionsstärke stets schmal, die „Bodenzahl“ ist groß und im idealen Fall konstant. Ist dennoch eine höhere Trennschärfe notwendig? In diesem Fall sollte dies eher durch die Verwendung von kleineren Teilchen als durch eine längere Säule angestrebt werden. Es sei denn, man hat es mit einer sehr schwierigen Matrix zu tun und/oder die Robustheit steht im Vordergrund und nicht die Zeit. An dieser Stelle sei eine kurze Erläuterung erlaubt. Sowohl für isokratische als auch für Gradiententrennungen gilt: Die Chromatographie ist ein Verdünnungsprozess, es findet stets eine Verbreiterung der Substanzzone statt, einen Beitrag dazu steuert die Diffusion der Moleküle bei. Jener Beitrag ist bei einem ähnlichen Molekulargewicht der Analyte praktisch konstant, ferner aus den weiter oben dargestellten Gründen beim Gradienten sehr klein. Darüber hinaus muss im Falle einer langsamen Kinetik mit einem weiteren – zuweilen beträchtlichen – Beitrag zur Peakverbreiterung gerechnet werden: Aufgrund beispielsweise von zusätzlichen ionischen Wechselwirkungen – aber auch Komplexbildung oder Verschiebung von Gleichgewichten durch einen ungewollten pH-Wert-Gradienten während des Laufs – können auch bei Gradientenläufen breite/taulende Peaks erhalten werden. Zu der Peakverbreiterung wegen einer langsamen Kinetik, s. weiter unten.

#### **Trennfähigkeit – Selektivitätsterm**

Bei realen Fragestellungen haben wir mit  $\alpha$ -Werten zwischen ca. 1,02 und 1,1, im Falle von stark unterschiedlichen Komponenten vielleicht von 1,2 zu tun. Selektivität ist mit Abstand die empfindlichste Funktion für die Auflösung, auch eine minimale Verbesserung des  $\alpha$ -Wertes führt zu einer dramatischen Zunahme der Auflösung. Kehren wir zum Gradienten zurück: Es gilt  $\alpha = k_2/k_1$ , d. h.

alle Faktoren, die den Retentionsfaktor beeinflussen (Gl. (1.2)), können auch die Selektivität beeinflussen – und die Auflösung sowieso. Weiter unten werden wir wieder darauf zurückkommen.

### Stärke der Wechselwirkungen – Retentionsterm

Der Wert dieses Terms nähert sich asymptotisch der Zahl 1. So hätte beispielsweise bei einem  $k^*$ -Wert von 5 der Retentionsterm einen Wert von 0,84 und bei einem  $k^*$ -Wert von 20 einen Wert von 0,95.

Beschäftigen wir uns jetzt etwas näher mit Gl. (1.2), manch interessante Schlussfolgerung für den Alltag kann dadurch abgeleitet werden. Im Abschn. 1.6 werden einige Beispielchromatogramme gezeigt, die diese Erkenntnisse illustrieren.

$$k^* = \frac{t_G \cdot F}{\Delta \% B \cdot V_m \cdot S}$$

Wie bei jedem Bruch erhöht sich hier der  $k^*$ -Wert, wenn der Zähler zu- oder der Nenner abnimmt. Was heißt das nun konkret?

- Der  $k^*$ -Wert und folglich die Auflösung nehmen zu, wenn das Gradientenvolumen zunimmt. Eine Erhöhung des Gradientenvolumens über den Fluss (konstante Gradientendauer, Erhöhung der Flussrate) hat den großen Charme, dass bei gleichbleibender Retentionszeit die Auflösung besser werden kann. Bin ich mit der Auflösung dagegen zufrieden? In diesem Fall gilt es zu prüfen, ob ich z. B. bei einem um Faktor 2 kürzeren Gradienten und einem um ebenso Faktor 2 höheren Fluss ungefähr die gleiche Auflösung erhalte – allerdings in der Hälfte der Zeit (konstantes Gradientenvolumen). Der hier besprochene Zusammenhang führt auch zu folgender Aussage: Je kürzer der Gradient, umso höher sollte der Fluss sein, sonst erreicht man ja kein genügend großes Gradientenvolumen, das möglicherweise für die Trennung notwendig ist. Nachteile bei einer Erhöhung des Flusses wären womöglich die Folgenden: Bezüglich Quantifizierung: Abnahme der Peakfläche bei konzentrationsempfindlichen Detektoren (DAD, FLD usw.). Durch die Flusserhöhung eluieren die Komponenten bei einer geringeren Elutionsstärke, das Peakvolumen nimmt zu, so auch die Verdünnung, die Konzentration am Peakmaximum wird geringer.

Bezüglich Auflösung: bei größeren Teilchen wie z. B. 5  $\mu\text{m}$  und/oder Methanol/Wasser wg. der Viskosität eventuell, bei multiplen Mechanismen wie im Falle von EPG- oder Mixed Mode Phasen, HILIC, geladenen Molekülen, Isomeren etc. wahrscheinlich, Peakverbreiterung und dadurch Abnahme der Auflösung: In beiden Fällen arbeitete man im C-Term der Van-Deemter-Gleichung, die langsame Kinetik führte schon zu breiten Peaks, die einem sogar im Gradientenmodus schwer zu schaffen machen könnten. Der in diesem Zusammenhang immer wieder genannte Nachteil, nämlich die Verkürzung der Lebensdauer der Säule durch den erhöhten Druck bei höheren Flussraten wird oft überschätzt: Erstens sind die Säulen auf Kieselgelbasis robuster als manchmal befürchtet, zweitens steht in der Regel der Zeitgewinn in keinem Verhältnis zu dem Preis einer Säule und vor allem drittens: Das was zählen

sollte, wäre nicht die Lebensdauer der Säule absolut, sondern die Anzahl der Injektionen pro Zeiteinheit – und die bleibt (theoretisch) konstant, z. B.: In der Hälfte der Zeit (Lebensdauer der Säule wg. eines um Faktor 2 erhöhten Druckes jetzt um Faktor 2 gesunken) habe ich die gleiche Anzahl an Injektionen durchgeführt. Zum Schluss die berechnete Frage: „Alles schön und gut, soll ich mich nun für einen längeren Gradienten oder für einen höheren Fluss entscheiden?“ Die vereinfachte Antwort lautet: Steht die ultimative Auflösung im Vordergrund und spielt die Laufzeit eine untergeordnete Rolle? Hat man darüber hinaus eine kleine Differenz % B? Wenn „ja“, sollte man in diesem Fall die Gradientendauer erhöhen. Liegt kein so schwieriges Trennproblem vor? Man sollte hier den Fluss erhöhen, die evtl. minimale Abnahme der Auflösung wird wahrscheinlich kaum ins Gewicht fallen, man ist jedoch schneller fertig. Denken Sie in diesem Zusammenhang an folgende Analogie: Die Gradientendauer beim Gradienten entspricht dem wässrigen Anteil bei isokratischen Trennungen. Hier wie dort führt eine Erhöhung zu kleinen, breiten Peaks, längeren Retentionszeiten, besserer Gesamtauflösung (Summe der Auflösung zwischen allen Peaks).

- $\Delta \% B$  und  $V_m$  sollten klein sein, was zunächst einen flachen Gradienten sowie eine kurze Säule bedeutet. Auch wenn man intuitiv zur Verbesserung der Auflösung stets eine längere Säule verwenden würde: Beispiele mit Proteinen aber auch mit kleineren Molekülen, die hier nicht gezeigt werden, belegen, dass in der Tat eine kürzere Säule zu einer möglichen Verbesserung der Auflösung führen kann. Denn laut Gl. (1.2) führt eine längere Säule zu einer Abnahme von  $k^*$ , andererseits bedeutet eine längere Säule eine höhere Bodenzahl. Wie weiter oben ausgeführt, spielt die „Bodenzahl“ beim Gradienten eine untergeordnete Rolle, der Vorteil einer per se höheren Bodenzahl kann den erstgenannten Nachteil nur teilweise aufheben. Merke: Das Säulenvolumen ist beim Gradienten unwichtiger im Vergleich zum Gradientenvolumen. Zahlreiche Messungen haben ergeben, dass für bis ca. 20–25 Peaks in der Regel eine 125 mm-Säule lang genug ist – oft reicht für eine übliche Fragestellung sogar eine 50 mm-Säule vollkommen aus.

Fassen wir den eben besprochenen Einfluss vom Zähler und vom Nenner auf den  $k^*$ -Wert bei Gl. (1.2) in Form folgender – sicherlich nicht für alle Fälle zu verallgemeinernden – Aussagen noch einmal zusammen:

- Bei kurzen Gradienten und großem  $\Delta \% B$  (ab ca. 60 % B, oft der Fall bei generischen Übersichtsgradienten) wäre zunächst ein hoher Fluss anzuraten, d. h. ein notwendiges Gradientenvolumen sollte über den Fluss und nicht über die Gradientendauer erzielt werden.
- Je flacher der Gradient (kleiner  $\Delta \% B$ ), umso geringer fällt der Vorteil eines erhöhten Flusses aus; der Gradient wird „isokratischer“, die Zunahme der Peakbreiten im Falle von komplexen Gemischen kann zu einer Abnahme der Auflösung führen. Hat man sich nun für einen flachen Gradienten entschieden und herrscht darüber hinaus z. B. durch sekundäre Gleichgewichte noch eine langsame Kinetik, so wäre es in *diesem* Fall nicht empfehlenswert, sich durch Erhöhung der Flussrate unnötig eine Zunahme der Bandenverbreiterung einzuhandeln.

- c) Ebenso: Je flacher der Gradient, umso unwichtiger wird die Gradientendauer. Kleiner  $\Delta \% B$  im Nenner bedeutet einen genügend großen  $k^*$ -Wert, ein großes Gradientenvolumen – eben durch einen langen Gradienten – ist gar nicht so notwendig.
- d) Je größer  $\Delta \% B$  umso kleiner wird der  $k^*$ -Wert – damit auch Abnahme der Auflösung. Gegensteuerung ist durch Flusserhöhung möglich. Dazu auch folgender Aspekt: Wenn der Fluss erhöht wird, nimmt die Retentionszeit der Peaks ab, so auch die Totzeit,  $t_0$ . Der Quotient jedoch  $t_{R1}/t_0$  nimmt zu, d. h. der erste Peak kann besser von der Front abgetrennt werden.
- e) Ähnliche Betrachtung: Wenn eine lange Säule verwendet wird (wie soeben bei  $\Delta \% B$ , würde  $V_m$  im Nenner zunehmen), sollte der Fluss erhöht werden. Bis auf die weiter oben erwähnten Fälle, also langsame Kinetik etc., überwiegt der Vorteil der Erhöhung des Gradientenvolumens über den Fluss dem Nachteil der Abnahme der „Bodenzahl“. Da das Säulenvolumen klein sein sollte ( $V_m$  im Nenner!), sollten gerade bei Gradiententrennungen möglichst kurze Säulen verwendet werden, s. Beispiele weiter unten.
- f) Wenn steile Gradienten gefahren werden, ist es ebenso kontraproduktiv, eine lange Säule zu verwenden: Der  $k^*$ -Wert der Komponenten tendiert schnell gegen null, die Länge der Säule wird gar nicht genutzt, es ergibt sich zwar eine eher kleine aber dennoch unnötige Bandenverbreiterung.

Schnelle Trennungen werden oft angestrebt. Eine einfache Möglichkeit in der Praxis ist die Erhöhung der Flussrate, jedenfalls eher als eine kürzere Säule einzubauen, die – falls tatsächlich vorhanden – erst eingespült werden muss, usw. Deswegen sei erlaubt, hier abschließend erneut auf die Flusserhöhung einzugehen. Der Fluss sollte in folgenden Fällen erhöht werden: große Differenz  $\% B$ ,  $\leq 3 \mu m$ -Teilchen, lange Säule, langer Gradient, schnelle Kinetik. Kritisch zu hinterfragen wäre diese Maßnahme in folgenden Fällen: Bei bestimmten LC-MS-Modi (s. Kapitel 8), im Spurenbereich mit DAD/FLD-Detektion, multiple Wechselwirkungen und dadurch langsame Kinetik – die Verwendung von  $\geq 5 \mu m$ -Teilchen dürften für analytische Trennungen heute eher die Ausnahme darstellen. Durch Erhöhung der Flussrate erhöht sich das Gradientenvolumen und dadurch kann sich zunächst ebenfalls die Auflösung erhöhen. Aber: Die später eluierenden Moleküle befinden sich länger im schnelleren Eluenten im Vergleich zu den früh eluierenden Molekülen. Diese Tatsache in Kombination mit einer langsamen Kinetik kann dazu führen, dass bei einer Erhöhung der Flussrate die Auflösung im vorderen Bereich des Chromatogramms besser, im hinteren jedoch schlechter wird. Das haben wir bei EPG- und Mixed Mode Phasen sowie bei Experimenten bei niedrigen Temperaturen beobachtet.

## 1.5 Gradienten-„Mythen“

Im Laboralltag haben sich bei Gradienten-Trennungen Praktiken eingebürgert und Meinungen gebildet, die allerdings in dieser Form nicht immer zweckdienlich sind bzw. nicht immer der Realität entsprechen. Nachfolgend werden einige

dieser „Mythen“ genannt und kurz kommentiert. Entsprechende Beispiele folgen weiter unten.

- *„Ein guter Übersichtsgradient („generischer Gradient“) bei einer neuen Methode ist z. B. von 5–10 % B auf 90–100 % B“*  
Nein, sicherlich nicht immer. In mehreren Fällen haben wir festgestellt, dass sowohl die Auflösung an bestimmten Stellen des Chromatogramms als auch die Peakkapazität insgesamt besser wird, wenn man mit ca. 30–40 % B startet. Eine gezielte Literatursuche bei neueren Veröffentlichungen hat diesen Befund bestätigt. Die merkliche Elutionsstärke einer derartigen Anfangsmischung führt offensichtlich zu einer frühen Differenzierung der Probenkomponenten: Ihre möglicherweise unterschiedlichen Eigenschaften und damit die unterschiedlich starken Wechselwirkungen mit dem Phasenmaterial kommen bei ca. 30–40 % B zum Vorschein, während bei ca. 95 % Wasser/Puffer nahezu alle Komponenten am Säulenkopf „sitzen“ und dadurch eine Trennung von relativ frühen Peaks erschwert wird.
- *„Für Proben mit einer großen Anzahl an Komponenten sollte man schon einen langen Gradienten fahren“*  
Die Verbesserung der Trennung durch einen langen Gradienten hält sich in Grenzen. Bei kürzeren Gradienten eluieren die Peaks zwar früher, die Peakbreite ist aber dafür kleiner. Die langen Gradienten führen oft nur bei den spät eluierenden Peaks zu einer signifikant besseren Auflösung.
- *„Nimm mehr % B zu Beginn, damit das Ganze schneller wird“*  
Natürlich richtig, die Auflösung kann sich allerdings auch ändern.
- *„Eine isokratische Stufe zu Beginn verbessert die Auflösung“*  
Das kann, muss aber nicht sein, s. weiter unten. Merke: Während der isokratischen Stufe wandert der Peak ein wenig, der Gradient wirkt also quasi in einer „kürzeren“ Säule.
- *„Ein flacher Gradient verbessert die Auflösung“*  
Auch hier: Das kann, muss aber nicht sein. So erhöht ein flacherer Gradient in der Tat die mittlere Auflösung, d. h. die Summe aller Auflösungen nimmt zu. An bestimmten Stellen im Chromatogramm kann sie allerdings zu- oder abnehmen. Was wirklich im konkreten Fall passieren wird, kann im Vorfeld nur durch (mindestens) zwei Läufe vorhergesagt werden, s. Kapitel 3.
- *„Mischventile mit kleinen Volumina bedingen ein kleines „Dwell Volume“ – und das ist gut, solange die Mischungsqualität gewährleistet ist“*  
Auch wenn es langsam langweilig wird: Das kann, muss aber nicht sein. Merke: Anderes „Dwell Volume“ bedeutet evtl. eine Änderung im Chromatogramm, d. h. es kann z. B. eine Änderung der Elutionsreihenfolge, der Selektivität, der Peakform oder der Auflösung auftreten. Und Änderung heißt eben „Änderung“, jene kann je nach Fall positiv oder negativ sein.
- *„Im Falle einer komplexen Mischung wählt man eine lange Säule, einen langen Gradienten und einen langsamen Fluss“*  
Hinter diese Aussage gehört im Falle von irregulären Komponenten, s. weiter unten, mindestens ein dickes Fragezeichen, s. auch Ausführungen weiter oben.

## 1.6 Beispiele zur Optimierung von Gradientenläufen: ausreichende Auflösung in einer adäquaten Zeit

### Über irreguläre Komponenten

Bevor wir auf die Beispiele zu den einzelnen Optimierungsparametern zu sprechen kommen, soll an dieser Stelle ein wichtiger Hinweis erfolgen, denn die nicht Beachtung dieses Tatbestands kann im Alltag zu enormem Kopfzerbrechen und zu Frustrationen führen. Als irregulär werden Substanzen bezeichnet, die sich chemisch unterscheiden und die sich vor allem chromatographisch unterschiedlich verhalten, also deutlich unterschiedlich starke Wechselwirkung mit der stationären Phase eingehen [1]. Dieser Fall kann eintreten, wenn in der Probe z. B. Stellungen-/Doppelbindungs-Isomere, ionische/neutrale, kleine/große, aliphatische/aromatische usw. Komponenten enthalten sind. Bei solchen Proben kann im Zuge einer Optimierung ein geänderter Parameter die Auflösung im Chromatogramm „hier“ verbessern, „dort“ aber verschlechtern, denn: Ein/mehrere Peak(s) kann/können schneller/langsamer nach vorne/nach hinten wandern und manch einer reagiert scheinbar kaum auf diese Änderung. Anders formuliert: Eine Änderung z. B. der Säulenlänge, des Flusses oder der Temperatur führt bei regulären Komponenten (chemisch ähnliche Substanzen) lediglich zu einer Änderung der  $k^*/k$ -Werte, die Selektivitäten bleiben in der Regel gleich. Es ergibt sich je nachdem eine Verbesserung/Verschlechterung der Auflösung, die man entsprechend den Formeln und den daraus abgeleiteten Regeln recht trefflich vorhersagen kann. Bei irregulären Komponenten ergeben sich Kreuzungspunkte für die Retentionszeiten, die sich übrigens abhängig vom Material auch verschieben können. So ähnelt keines der  $\ln k/\% B$ -Diagramme der übrigen Säulen, die wir aufgenommen haben, dem Bild von SunFire, s. Kapitel 3. Auch die Krümmungen der Kurven können sich stark unterscheiden. Das Ergebnis kann lauten: Koelution, Verschlechterung „hier“, Verbesserung „dort“.

### Vorbemerkungen, Rahmenbedingungen

In letzter Zeit haben wir viele Gradiententrennungen durchgeführt, um die Gradientelution besser zu verstehen. Die größte Anzahl der Messungen wurden von Hans-Joachim Kuss in München durchgeführt. Mit dem Ziel, möglichst allgemeingültige Gesetzmäßigkeiten zu finden, aber auch die Theorie der Gradientelution in der Praxis zu verifizieren, haben wir recht unterschiedliche chromatographische Rahmenbedingungen gewählt. Nachfolgend kurz die Wichtigsten:

- Gerätschaften: Einmal eine UHPLC-Anlage, dann einen modernen Niederdruckgradienten und schließlich auch einen bewusst alten Hochdruckgradienten aus Anfang der 1990er Jahre mit beträchtlichem Tot- und „Dwell-Volumen“.
- Säulen: Lange (z. B.  $150 \times 4,6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ), mittlere (z. B.  $50 \times 4$  mm,  $3,5 \mu\text{m}$ ) und kurze Säulen (z. B.  $20 \times 20$  mm,  $\leq 2 \mu\text{m}$ )
- Füllmaterial: klassische C18-Säulen (z. B. Symmetry C18, SunFire), Monolithen (z. B. Chromolith Performance und HR), Hybridmaterialien (z. B. XBridge C18/Shield, Gemini/NX), Fused Core (z. B. Kinetex, Accucore, AscentisExpress), Mixed Mode Phases (z. B. Primesep C, Obelisc N/R)

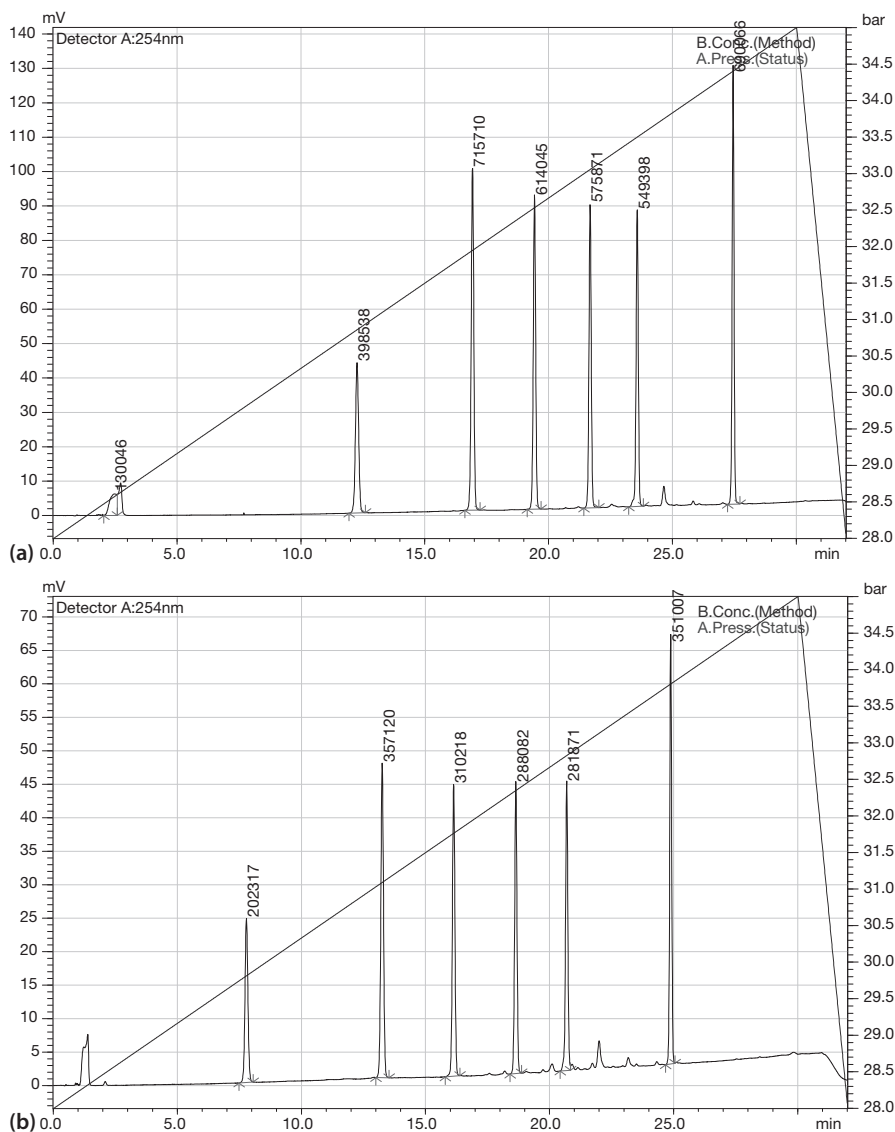
- Mobile Phase: diverse ACN/MeOH-Mischungen, teilweise mit Modifizier
- Proben: Mischungen mit regulären/irregulären Komponenten, von recht neutralen Alkylbenzolen über schwach-polaren/ionischen Komponenten wie Phenol bis hin zu sehr stark polaren Forschungssubstanzen

Es versteht sich von selbst, dass die Vorstellung der Ergebnisse inkl. Beispielen den hier beabsichtigten Umfang bei weitem sprengen würde. Daher folgen weiter unten die nach unserer Auffassung wichtigsten Ergebnisse in verdichteter Form. Einige Beispielchromatogramme sollen jene Befunde veranschaulichen. Dass an der UHPLC bzw. Fast-LC-Anlage schmale Peaks und schnelle Trennungen erhalten werden konnten, ist trivial. Wir zeigen hier nur Beispiele mit dem alten Gerät. Unsere Intention ist zu belegen, dass bei nicht sehr anspruchsvollen Trennungen diverse, auch „schwierige“ Gradienten an Geräten mittlerer Qualität durchaus möglich sind. Auch moderne, kurze Säulen können dort ihre Dienste leisten. Doch zunächst noch einmal folgende Bemerkung: Die Gradientelution ist komplex; betrachten Sie bitte nachfolgende Aussagen lediglich als Empfehlungen, die zwar mit der Theorie vereinbar sind und durch Cross-Experimente wiederholt bestätigt worden sind, jedoch keinesfalls als eine allgemeingültige „to-do-Liste“ aufzufassen sind. So kann beispielsweise eine komplexe Matrix manch unerwartetes Ergebnis beschieren, auch ein ungewollter pH-Wert-Gradient kann sein Übriges beisteuern ...

Über die „Bodenzahl“ haben wir uns weiter oben unterhalten, sie wird hier keine Rolle mehr spielen. Wir werden uns eher mit Wechselwirkungen beschäftigen, also mit dem Selektivitäts- und dem Retentionsterm in Gl. (1.1). Das Ziel lautet: ausreichende Auflösung. Den Einfluss der wichtigen Parameter Lösungsmittel (ACN vs. MeOH), pH-Wert und Temperatur auf die Selektivität werden ausführlich in diversen HPLC-Werken behandelt, es wird hier auf diese verwiesen. Auch Ansätze für ein systematisches pH-Wert-, Säulen-, Temperatur- und Eluentenscreening durch Automatisierung der Experimente (AutoChromSword, DryLab, ACDLabs) bleiben hier unberücksichtigt, s. dazu [5, 6]. Vielmehr konzentrieren wir uns auf die Gradienten-Spezifika, s. Gl. (1.2): Gradientendauer und Fluss – also Gradientenvolumen – sowie Anfangs- und End-% B. Aus letzteren und der Gradientendauer ergibt sich die Steilheit. Des Weiteren effektives Volumen der Säule, in der Praxis bedeutet dies letztlich die Länge der Säule. Ferner auch eine isokratische Stufe zu Beginn – entweder bewusst eingebaut oder aus dem vorhandenen „Dwell Volume“ vorgegeben. Die Konstante  $S$  ergibt sich aus der Substanzstruktur und den chromatographischen Bedingungen und ist somit nur indirekt beeinflussbar.

### Gradientendauer und Fluss

- Fall 1 Die Gradientendauer bleibt konstant und man erhöht den Fluss. Dabei erfolgt immer eine Abnahme der Retentionszeit. Was die Auflösung betrifft, bleibt die Trennung bei regulären Komponenten in etwa gleich, s. Abb. 1.1. Im Falle von irregulären Komponenten sind leider die unterschiedlichsten Fälle denkbar: Es tritt Elutionsumkehr auf; die Auflösung wird bei gleicher Elutionsreihenfolge besser; die Auflösung wird nur hinten bes-



**Abb. 1.1** Einfluss der Flussrate, (a) XBridgeShield 150 × 4,6 mm, 5 µm, 0–100 % B, 1 ml/min,  $t_G = 30$  min, (b) 0–100 % B, 2 ml/min,  $t_G = 30$  min.

ser, die Auflösung nimmt vorne im Chromatogramm zu, hinten etwas ab, s. Abb. 1.2.

**Fall 2** Die Gradientendauer wird halbiert und der Fluss um Faktor 2 erhöht. In diesem Fall bleibt das Gradientenvolumen konstant. Im idealen Fall ergibt sich exakt das gleiche Chromatogramm (gleiche Auflösung), allerdings in der Hälfte der Zeit, s. Abb. 1.3. Häufig wird die Auflösung ein wenig schlechter, der Verlust an Auflösung hält sich allerdings im Falle von schneller Kinetik eher in Grenzen.

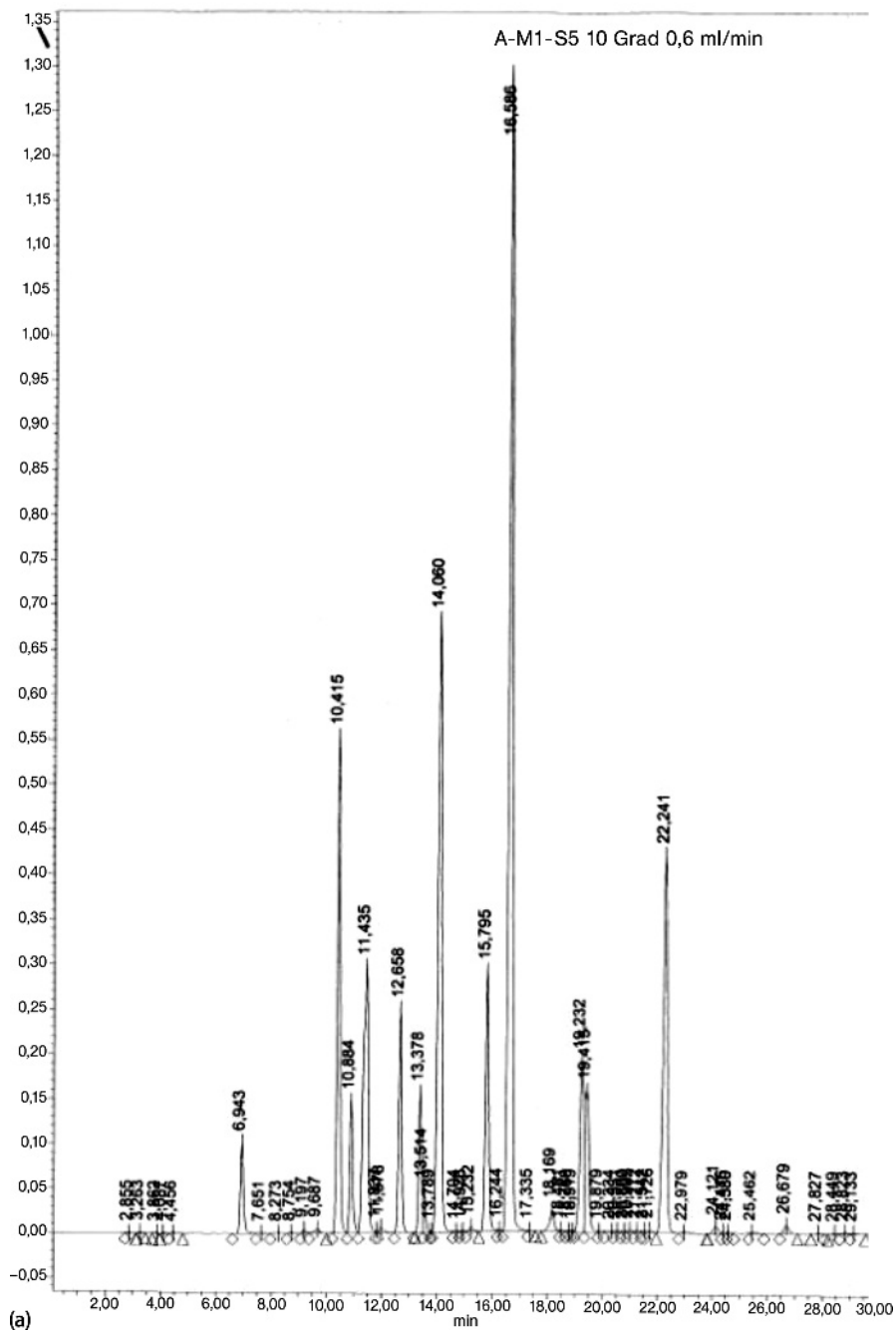


Abb. 1.2 Einfluss der Flussrate, (a) 0,6 ml/min, 10 °C, (b) 1 ml/min, 10 °C.

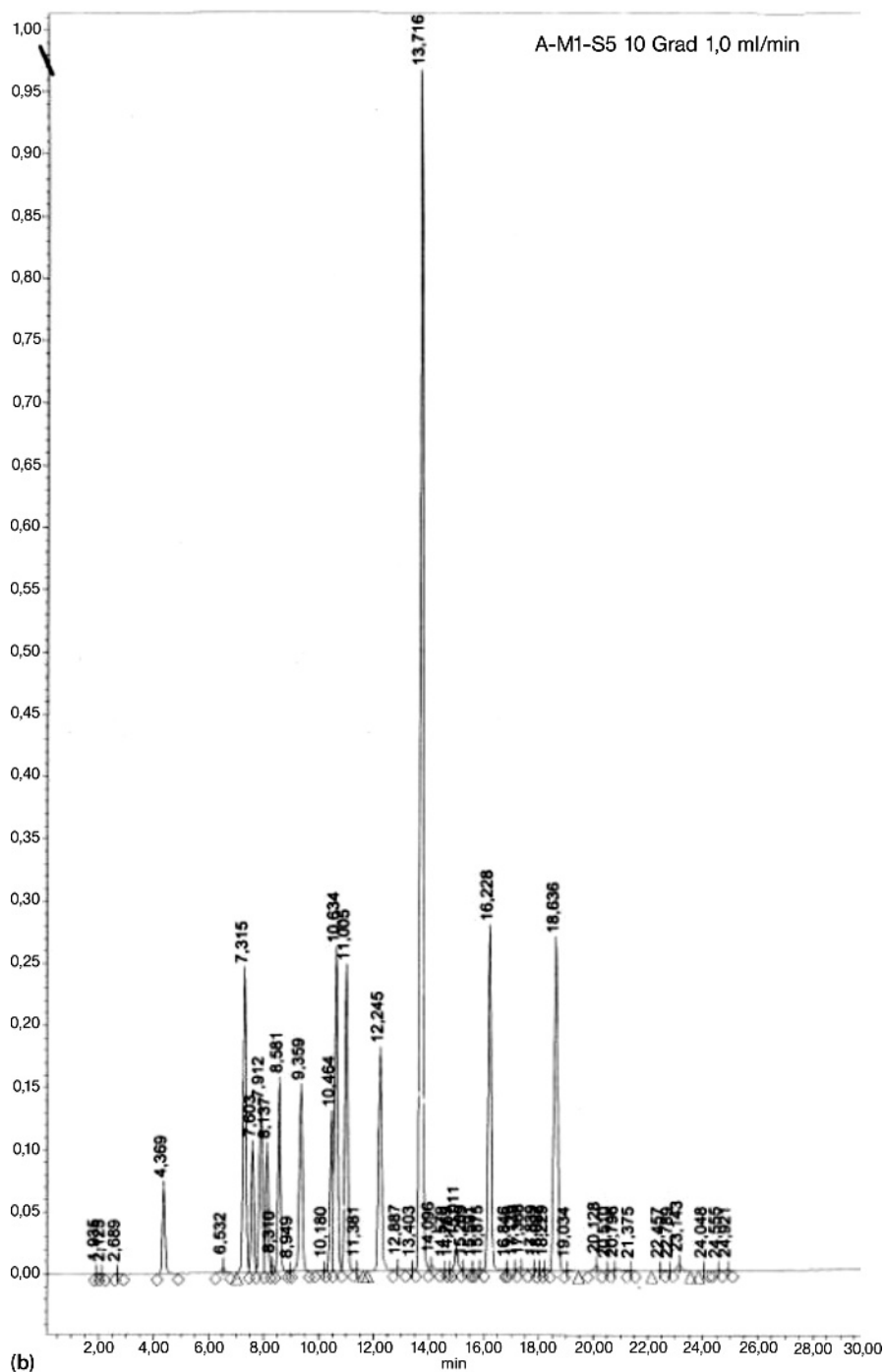
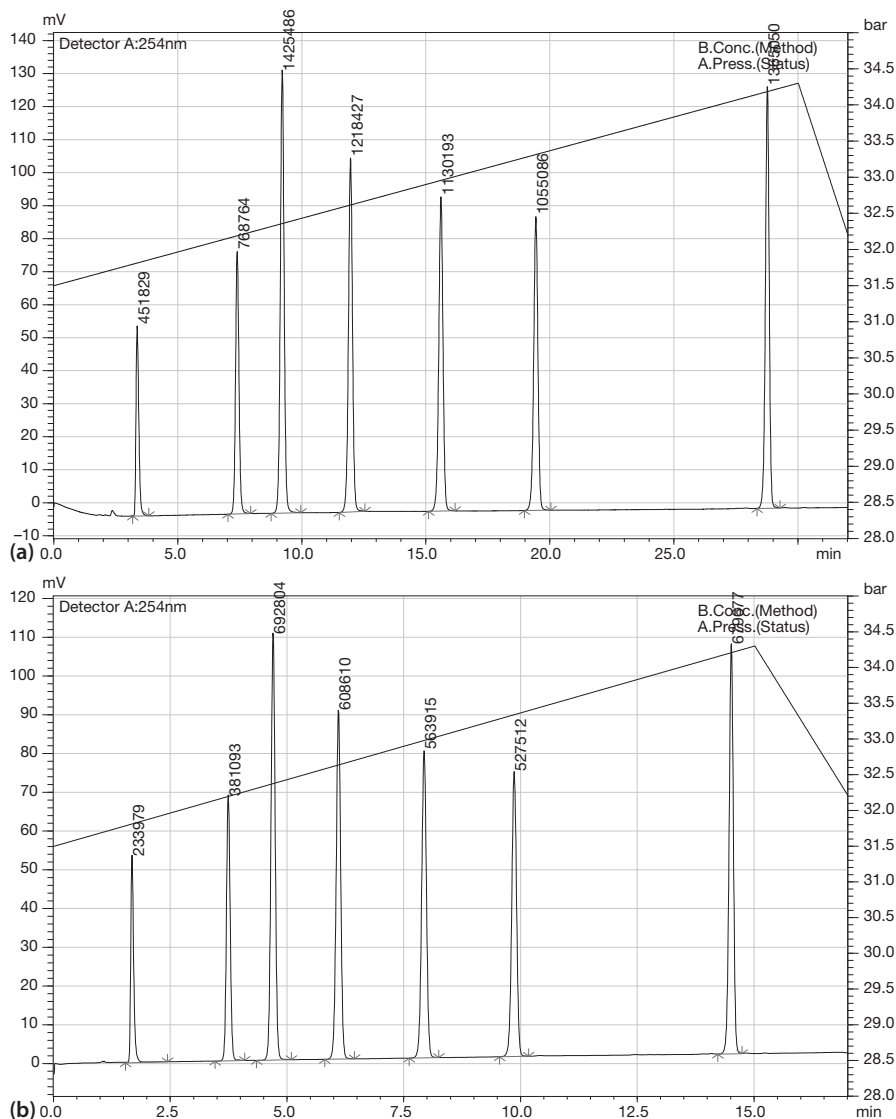


Abb. 1.2 (Fortsetzung).

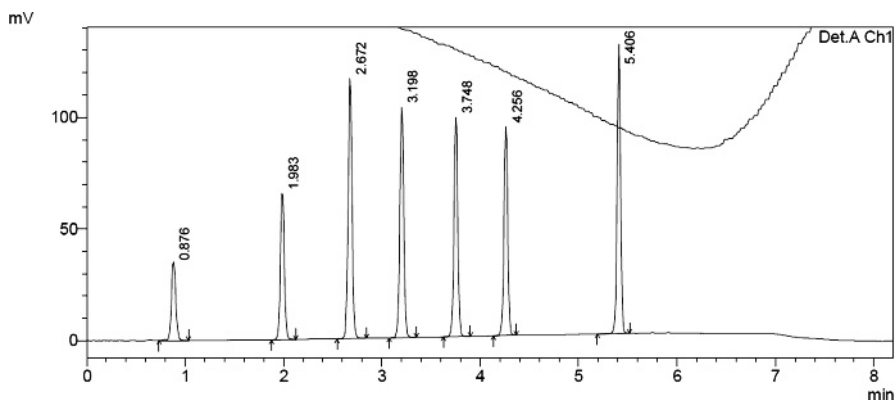


**Abb. 1.3** Einfluss der Flussrate, (a) XBridgeShield,  $150 \times 4,6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ , 50–90 % B, 0,5 ml/min,  $t_G = 30$  min, (b) 50–90 % B, 1 ml/min,  $t_G = 15$  min.

Die Gradientendauer ist nicht so wichtig wie allgemein angenommen. Für sechs bis acht Peaks ist ein längerer Gradient als ca. 5–7 min selten notwendig, s. Abb. 1.4.

#### Anfangs- und End-% B, Steilheit

Wie weiter oben bereits erwähnt: Die häufige Praxis bei der Methodenentwicklung einer unbekannten Probe, mit einem Gradienten von z. B. 5 % auf 100 % B zu starten, erweist sich selten als sinnvoll. Oft fangen die ersten interessieren-



**Abb. 1.4** Zur notwendigen Gradientendauer; Zorbax SB C8,  $150 \times 4,6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ , 40–90 % B,  $t_G = 5$  min, 2 ml/min.

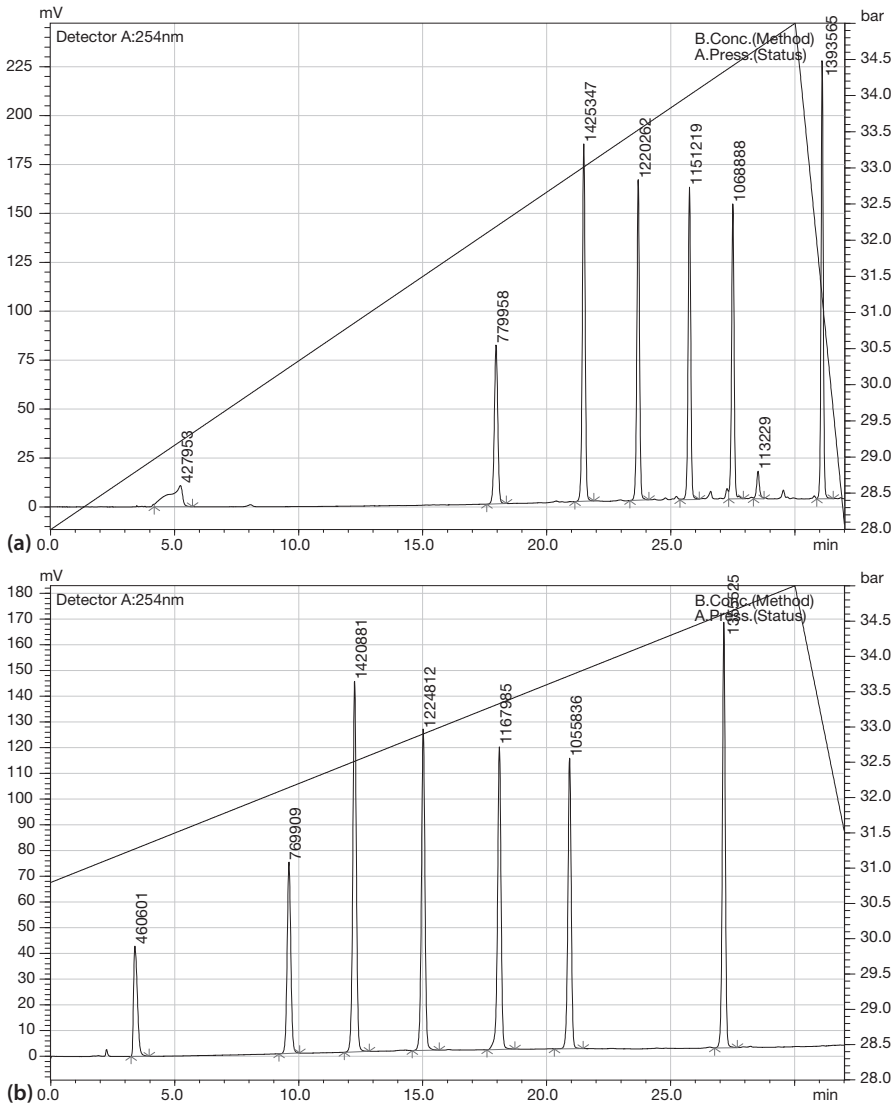
den Peaks relativ spät an zu eluieren. Weiterer Nachteil: Verunreinigungen aus dem Wasser erscheinen als kleine Störpeaks („Geisterpeaks“). Ein Start bei ca. 40 % B bringt oft folgende Vorteile: Die Peaks sind über das ganze Chromatogramm gleichmäßig(er) verteilt, kleine Störpeaks tauchen kaum auf, die Peaks eluieren früher, sind schmäler und höher, s. Abb. 1.5. Aus unserer Sicht macht ein Start mit 0–5 % B nur dann Sinn, wenn stark polare Komponenten an C18-Säulen getrennt werden sollen, also Peaks direkt an der Totzeit erwartet werden. Ähnlich verhält es sich mit einer isokratischen Stufe zu Beginn: Nur im Falle von frühen Peaks und bei einem Gradientenstart mit hohem wässrigen Anteil ist eine Verbesserung der Trennung zu erwarten.

Ist die Anzahl der Peaks bekannt, kann man mit dem Ziel einer besseren Nachweisgrenze ruhig bei noch höherem % B starten, s. Abb. 1.6.

#### Merke:

Der Anfangs-% B ist recht unwichtig für die Elution der letzten Peaks, ebenso eine isokratische Stufe zu Beginn. Vereinfacht gesagt: Was „vorne“ passiert, interessiert die hinteren Peaks kaum. Umgekehrt beeinflusst der End-% B kaum das Geschehen im ersten Drittel des Chromatogramms Also: Anfangs-% B wichtig für „vorne“, End-% B für „hinten“. Des Weiteren erniedrigt ein steiler Gradient die Nachweisgrenze, ein flacher Gradient führt oft nur im hinteren Teil des Chromatogramms zu einer Verbesserung der Auflösung. Vergleichen wir Abb. 1.7, dort sind folgende zwei Gradienten abgebildet: 40 auf 100 % B bzw. 50 auf 90 % B: Bei nahezu gleicher Gradientendauer ist bei 50–90 % B die Peakhöhe in der ersten Chromatographenhälfte groß, die Auflösung klein; bei 40–100 % B genau umgekehrt. Man kann also durch die Wahl von Anfangs-% B sowie Steilheit sowohl Auflösung als auch Nachweisgrenze gezielt im vorderen/hinteren Bereich des Chromatogramms beeinflussen.

Merke im Falle von irregulären Komponenten: Eine Verlängerung der Gradientendauer und/oder Änderung der Anfangs-% bzw. End-% B – und somit der Steilheit – kann zu Elutionsumkehr, Koelution sowie Verbesserung der Auflösung führen, s. Abb. 1.8: Von 45 % über 60 % zu 70 % B als Startbedingungen

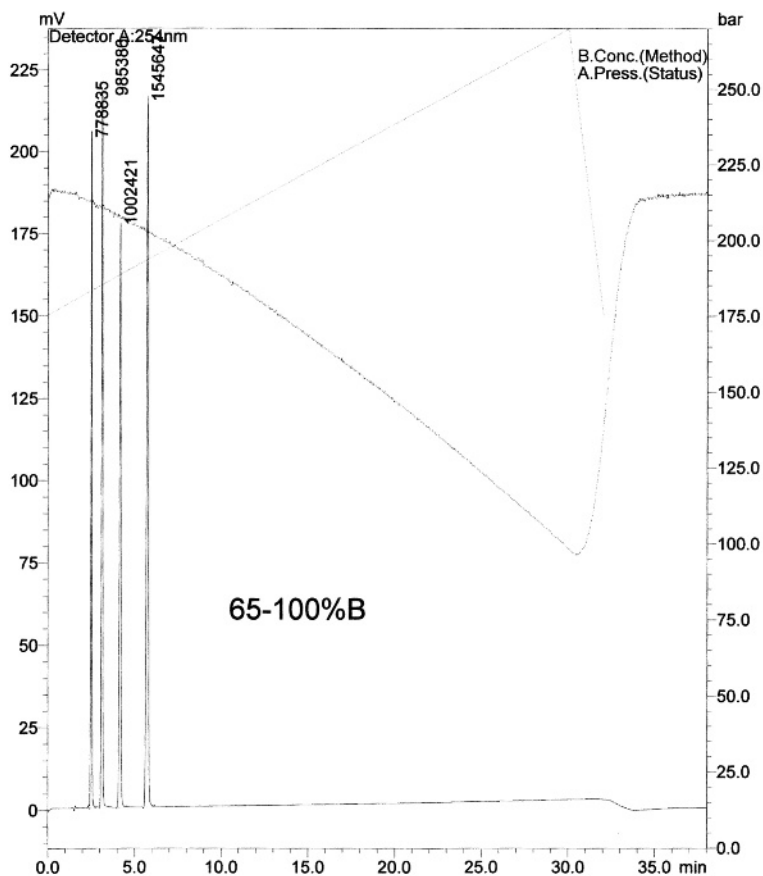


**Abb. 1.5** Einfluss von Anfangs-% B, (a) XBridgeShield,  $150 \times 4,6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ , 0–100% B, 0,5 ml/min,  $t_G = 30$  min, (b) 40–100% B, 0,5 ml/min,  $t_G = 30$  min.

wird die Trennung vorne immer schlechter, hinten jedoch von „einigermaßen“ und neun Peaks, über „schlecht“ und sechs Peaks zu „recht gut“ und neun Peaks.

Erste, vereinfachte Regeln für den Start:

- Nimm einen „vernünftigen“ Anfangs-% B und variere bei Bedarf zunächst nur die Steilheit – dies kann bereits zum Erfolg führen.
- konstante Steigung und Änderung von  $\Delta \% B$ , also parallele Gradientenprofile: ähnliches Chromatogramm.



**Abb. 1.6** Zu den Startbedingungen bei einer kleinen Anzahl an Peaks: GeminiNX, 50 × 4 mm, 3 µm, 65–100 % B.

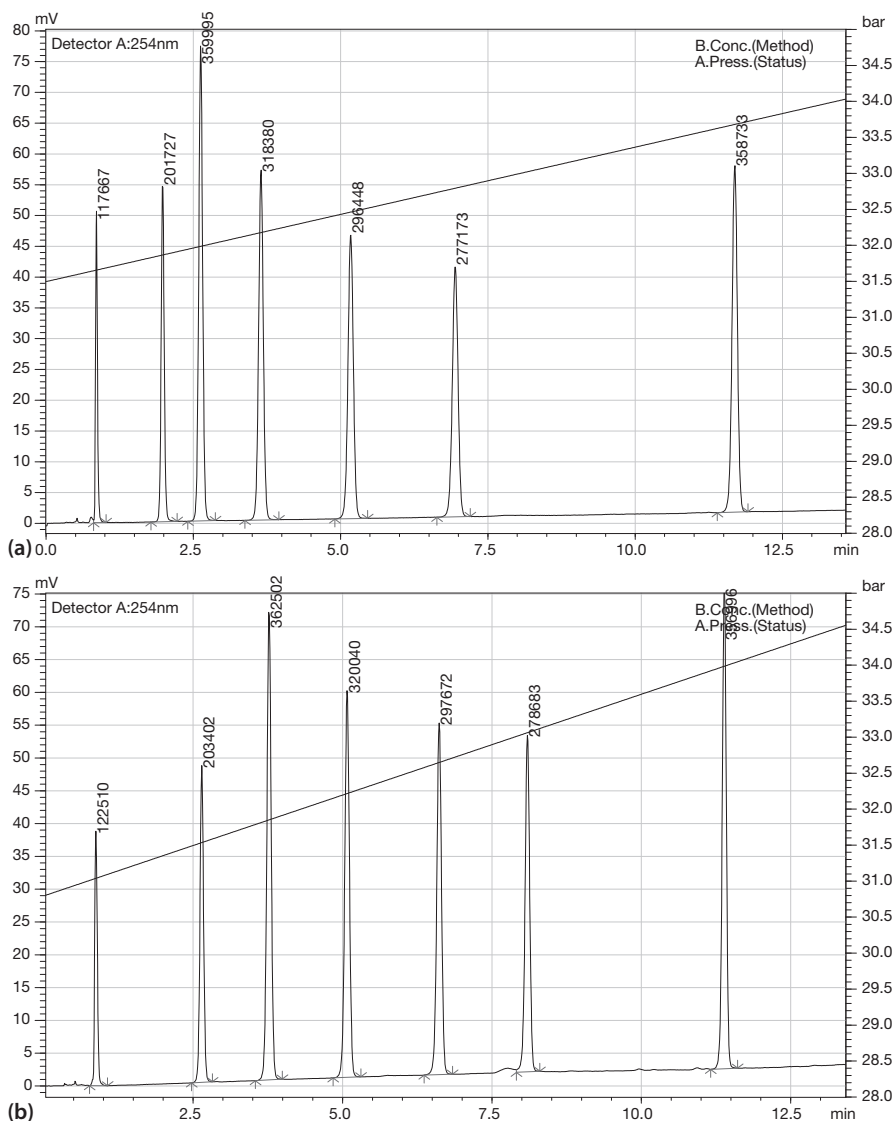
- konstante  $\Delta \% B$  und Änderung der Steigung: wahrscheinlich unterschiedliches Chromatogramm.

#### Anfangs- und End-% B sowie Gradientendauer – sie bestimmen die Steilheit – bzw. Säulenlänge und Fluss

Wie weiter oben erwähnt, sind die zwei wichtigsten Parameter für die Auflösung % B/min (genauer eigentlich % B/ml) und das Gradientenvolumen.

Betrachten wir folgende zwei Fälle:

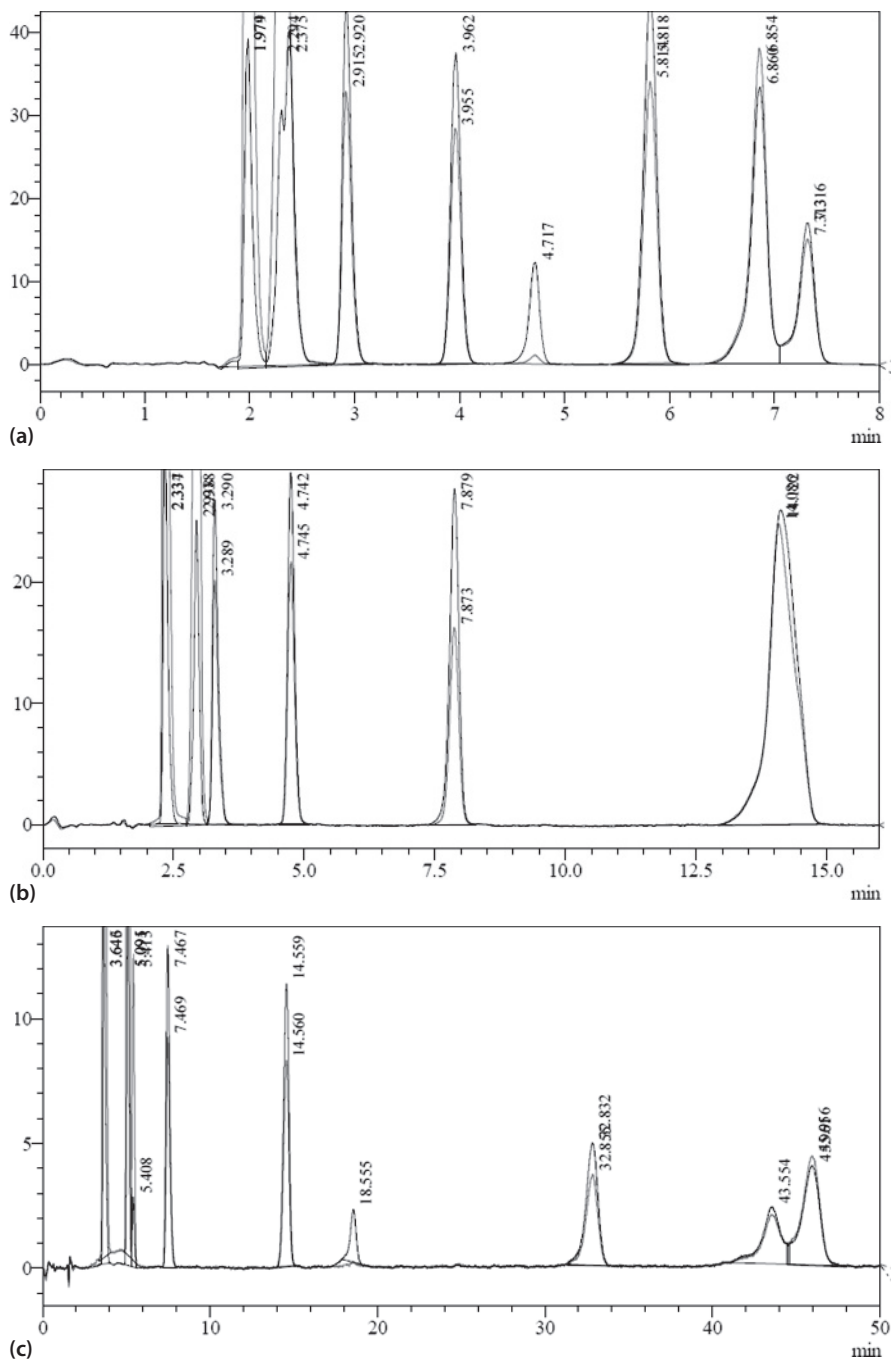
1. Bei drei Gradientenläufen, von 10 % auf 100 % B in 30 min bzw. von 10 % auf 50 % B in 13 min bzw. von 10 % auf 40 % B in 10 min, bleibt % B/min nahezu konstant (ca.  $\Delta 3 \% B/min$ ), es ergibt sich die gleiche Auflösung bei allerdings unterschiedlicher Gradientendauer.
2. Bei drei Gradientenläufen, alle von 10 % auf 90 % B in 20 min, eluiert der letzte Peak bei 0,5 ml/min in 16 min, bei 1 ml/min in 8 min und bei 2 ml/min in 4 min. Auch hier bleibt % B/min konstant, es ergibt sich die gleiche Auflösung



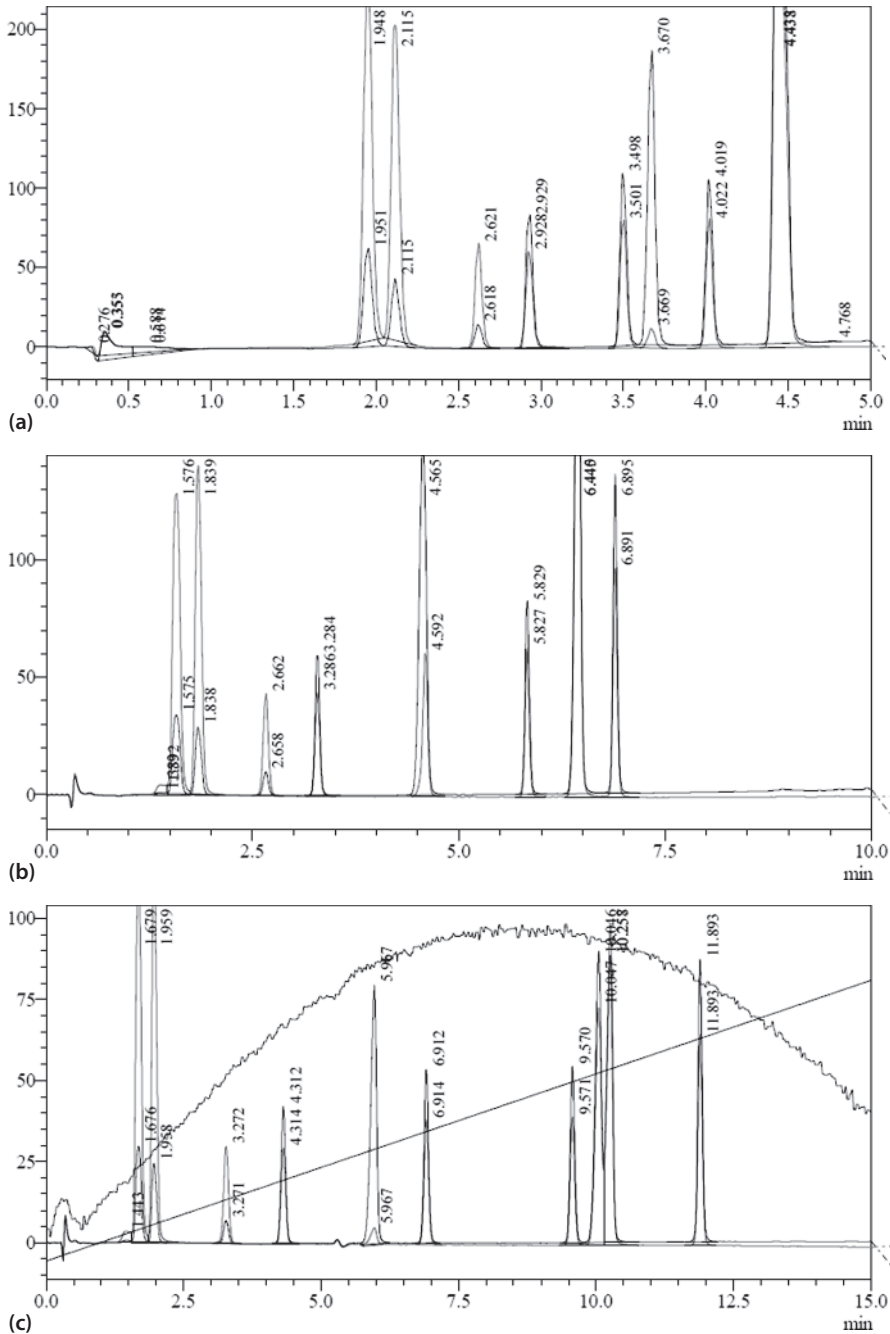
**Abb. 1.7** Einfluss von Anfangs-% B und Steilheit, (a) XBridgeShield, 150 × 4,6 mm, 5 µm, 40–100 % B, 2 ml/min,  $t_G = 15$  min, (b) 50–90 % B, 2 ml/min,  $t_G = 15$  min.

(das Gradientenvolumen bleibt mit 8 ml konstant) bei allerdings immer kürzer werdender Retentionszeit für den letzten Peak.

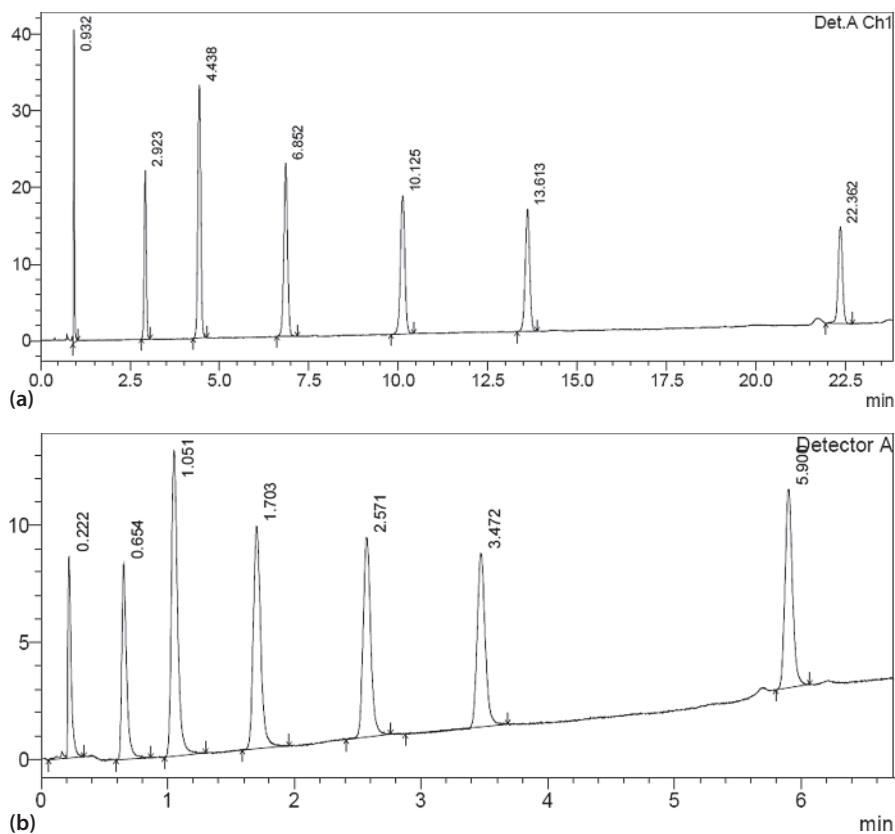
Bei einer Änderung der Steilheit durch Änderung von Anfangs-% B und/oder der Gradientendauer sollte man im Falle von irregulären Analyten sowohl mit einer Änderung der Elutionsreihenfolge als auch mit einer Verbesserung/Verschlechterung der Auflösung rechnen, s. Abb. 1.9. Halten wir Folgendes fest: Der Gradient wird flacher und länger, das ergibt eine Steilheit von  $\Delta 16\%$  B/min über  $\Delta 7\%$  B/min zu  $\Delta 3,3\%$  B/min. Was fällt auf? Trotz dieser großen Unterschiede



**Abb. 1.8** Einfluss von Anfangs-% B und Steilheit, (c) Symmetry C18 150  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m, Anfangs-% B 45 %, (b) 60 %, (a) 70 %; End-% B in allen Fällen: 100 %.



**Abb. 1.9** Einfluss von Anfangs-% B und Gradientendauer auf Elutionsreihenfolge und Auflösung, (c) AscentisExpress C18, 50 × 3 mm, 2,7 µm, 20–70 % B,  $t_G = 15$  min, (b) 20–90 % B,  $t_G = 10$  min, (a) 10–90 % B,  $t_G = 5$  min.

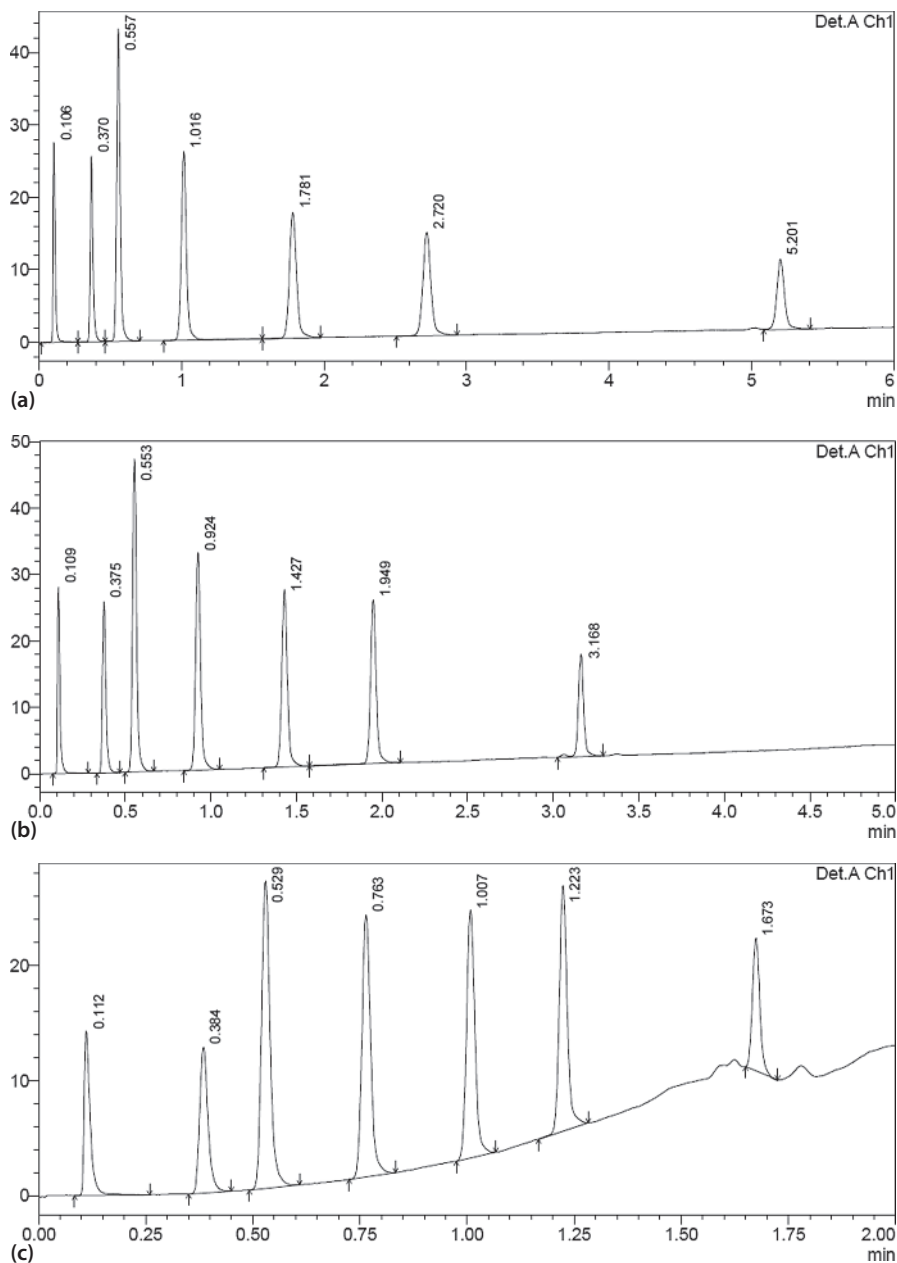


**Abb. 1.10** Einfluss der Säulenlänge, (b) Synergi FUSION RP, 150 × 4,6 mm, 4 µm, (a) Synergi FUSION RP, 20 × 4,6 mm, 2 µm.

wird die Trennung der ersten vier Peaks nur wenig beeinflusst. Erst ab dem 4. Peak ändert sich das Chromatogramm merklich: Elutionsumkehr und Änderung der Auflösung (8 vs. 10 Peaks).

Noch einmal: Gradientendauer und Säulenlänge sind beim Gradienten im Falle von nicht besonders schwierigen Trennungen nicht so wichtig, s. Abb. 1.10 und Abb. 1.11. Weiß ich, dass ich nur diese 7 Peaks erwarte, ist eine 20 × 4,6 mm, 2 µm-Säule ausreichend, eine 150 × 4,6 mm, 4 µm-Säule beschert unweigerlich unnötig lange Retentionszeiten. Abbildung 1.11 (Säule: 20 × 4 mm, 2 µm) demonstriert das weiter oben bereits Formulierte: Erstens sehen die Peaks trotz einem kleinen Säulenvolumen einerseits und einem beträchtlichen Totvolumen der Apparatur andererseits brauchbar aus, die Peakbreite bleibt konstant. Zweitens reicht für diese kleine Anzahl an Peaks eine 2 cm-Säule vollkommen aus. Und drittens ist ein 2 min-Gradient gegenüber einem 10 min-Gradienten ebenso ausreichend (die Drift im unteren Bild und die breiter erscheinenden Peaks sollten nicht weiter stören, die Skalierungen sind unterschiedlich).

Selbstverständlich haben wir bei  $\leq 2$  µm-Teilchen und/oder 20 mm-Säulen, Fused Core-Materialien, High Throughput-Säulen sowie Chromolith HR aufgrund



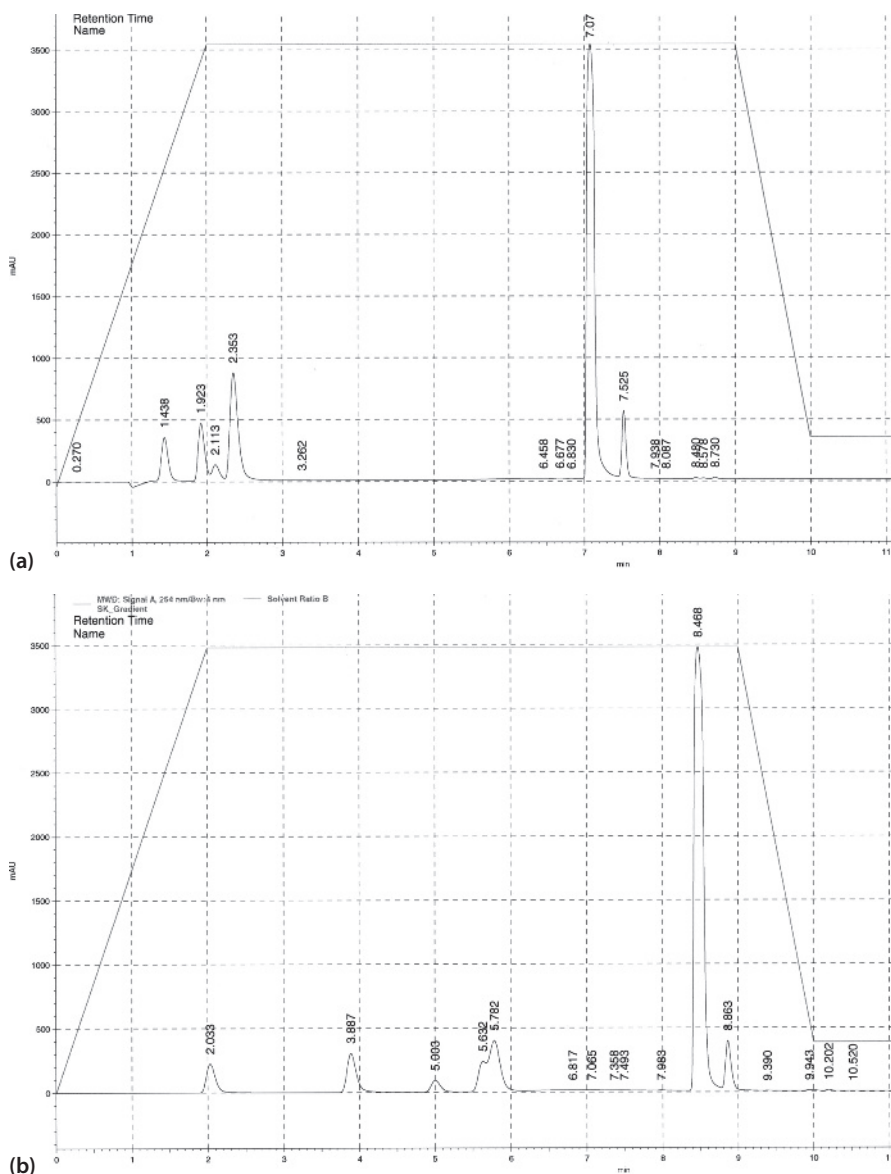
**Abb. 1.11** Einfluss der Gradientendauer, (c) Synergi MAX RP 20 × 4 mm, 2 µm Gradientendauer, 2 min, (b) 5 min, (a) 10 min.

der apparativen Totvolumina vor allem bei den frühen Peaks Tailing und Peakverbreiterung festgestellt – übrigens auch bei den modernen Geräten! –, aber: Der Verlust von 20–40 % an Effizienz ist für einfache Trennungen zu verschmerzen, denn ob ein Peak eine Peakbreite von beispielsweise 3 oder 4 s aufweist, wird vom

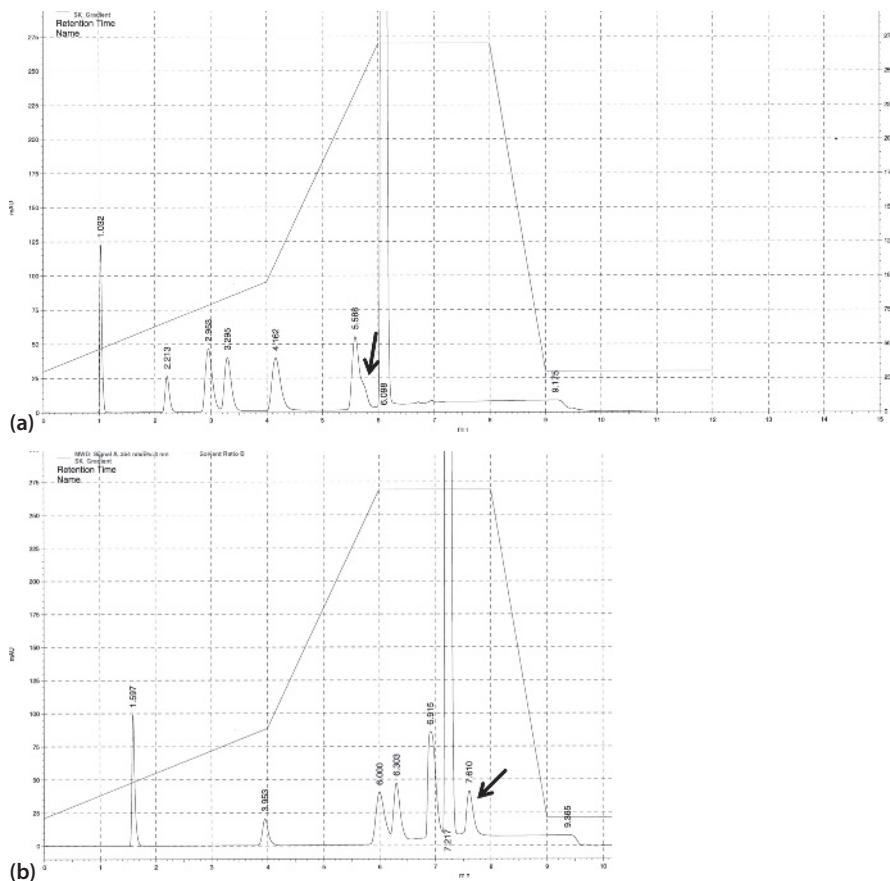
Anwender ob der schmalen Peakform und einer zufriedenstellenden Trennung in der Regel gar nicht als Nachteil registriert – und dann stört es auch nicht.

### Temperatur

Eine Erniedrigung der Temperatur führt häufig zu einer Verbesserung der Trennung, mindestens jedoch zu einer Veränderung, und dies meist am stärksten im vorderen Bereich des Chromatogramms (Elution von polaren Komponenten).



**Abb. 1.12** Gradiententrennung bei 35 °C (a) und 15 °C (b) an LUNA Omega PS; die größte Selektivitätsdifferenz ergibt sich bei den polaren Komponenten, Details s. Text.



**Abb. 1.13** Gradiententrennung bei 35 °C (a) und 15 °C (b) an Primasep C; am Mixed Mode-Material wird Elutionsumkehr festgestellt, Details s. Text.

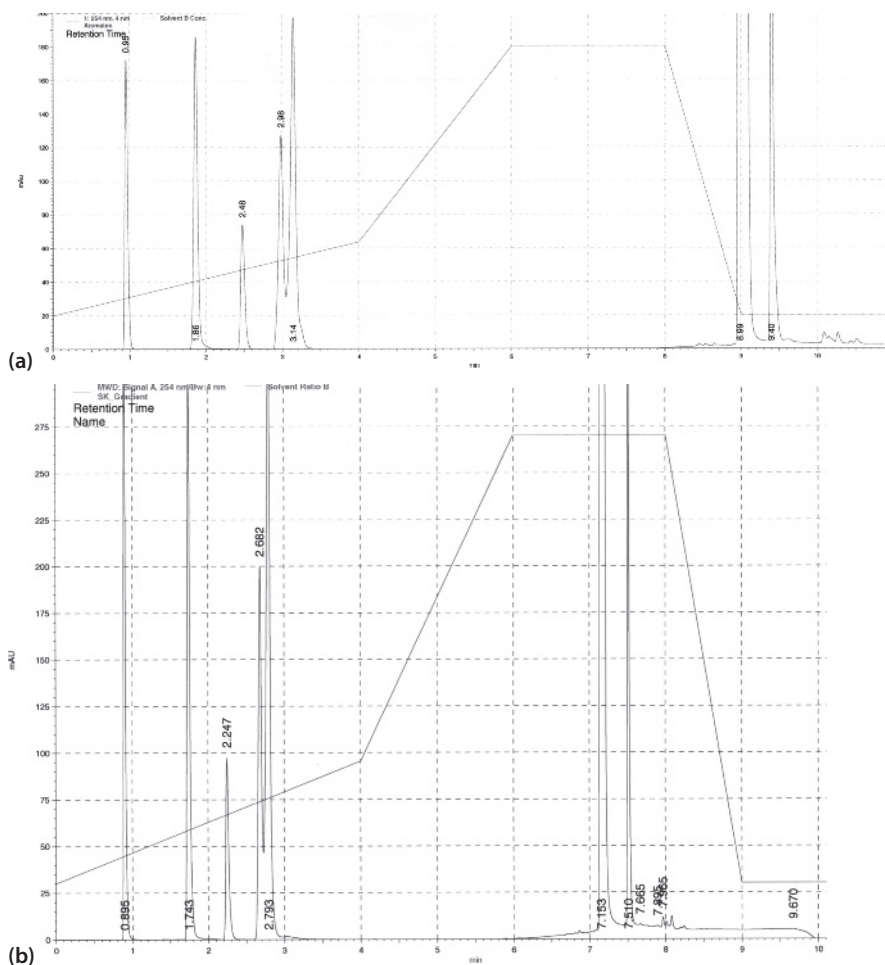
Die Gesamt-Retentionszeit ändert sich dagegen bei RP-Läufen verhältnismäßig wenig. In einer Reihe von Experimenten konnte ferner bestätigt werden, dass Temperaturunterschiede die Trennung an stationären Phasen mit einem zusätzlichen polaren Charakter stärker beeinflussen als an hydrophoben Materialien, siehe dazu zwei Beispiele: In Abb. 1.12a und b werden Trennungen bei unterschiedlichen Temperaturen an LUNA Omega PS gezeigt, das ist ein C18-Material mit einer zusätzlichen positiven Ladung auf der Oberfläche. In Abb. 1.13a und b werden Trennungen an Primasep C, einem Mixed Mode-Material mit einer Komplex-fähigen Gruppe wiedergegeben, hier wird Elutionsumkehr beobachtet.

### Verweilvolumen

Das Verweilvolumen (Volumen vom Ort der Mischung bis zum Säulenkopf) sowie die Mischungsart und die Mischungsqualität sind bei Gradiententrennungen entscheidende Faktoren. Die Zusammenhänge werden ausführlich im Kapitel 2 behandelt. Nachfolgend werden kurz die Ergebnisse aus drei Experimenten vorgestellt. Hier haben wir Methanol/Wasser-Gradienten verwendet, der Grund:

Etwaige, mögliche Unterschiede werden mit Methanol als organischem Lösungsmittel häufig stärker sichtbar als mit Acetonitril.

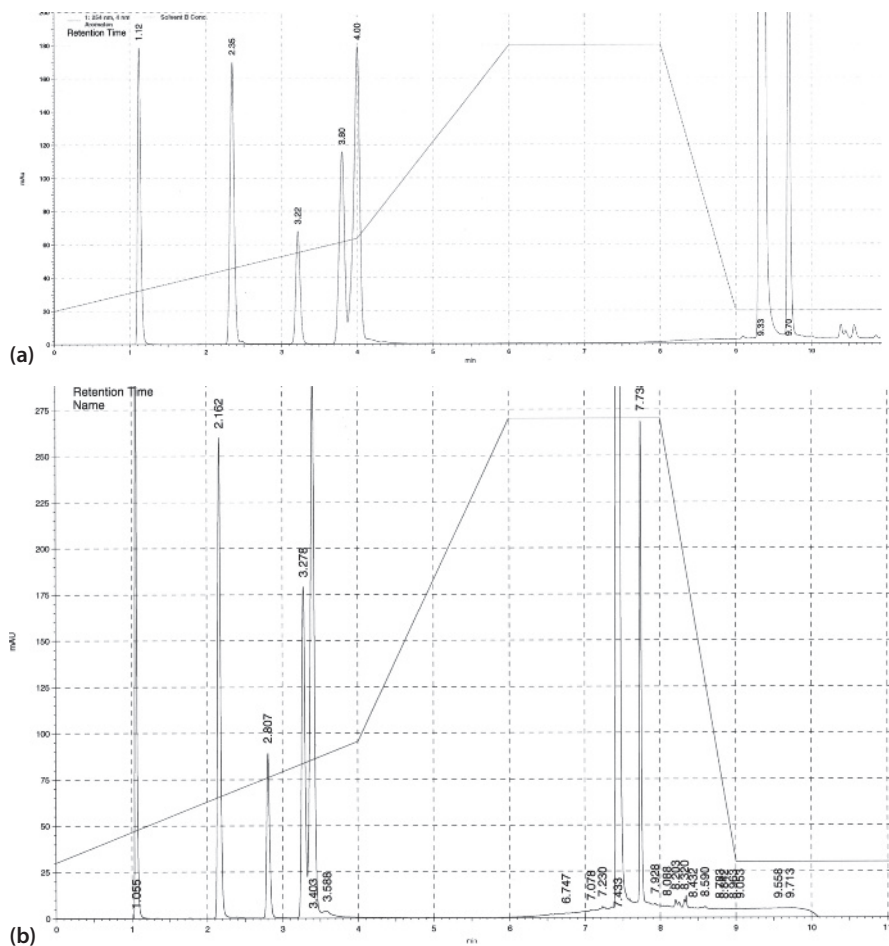
1. Wenn das Verweilvolumen zweier Anlagen unterschiedlich ist, muss wirklich mit „*allem*“ gerechnet werden. Ein Tatbestand, der Methodentransfer nicht gerade erleichtert: Identische Trennung, Verbesserung/Verschlechterung der Trennung sowie Änderung von Retentionszeit, Peakform, Selektivität, Elutionsreihenfolge. Auch das Säulenmaterial kann das Resultat beeinflussen. Wir haben an einer Shimadzu LC 20- (Niederdruckgradient) und an einer Agilent 1200-Anlage (Hochdruckgradient) bei identischen chromatographischen Bedingungen Säulen unterschiedlichen Charakters vermessen. Nachfolgend einige Befunde:
  - Vergleiche Abb. 1.14a und b (Cortecs C18) sowie Abb. 1.15a und b (Poroshell EC 120-C18), beide sind hydrophobe, endcappede Core Shell Mate-



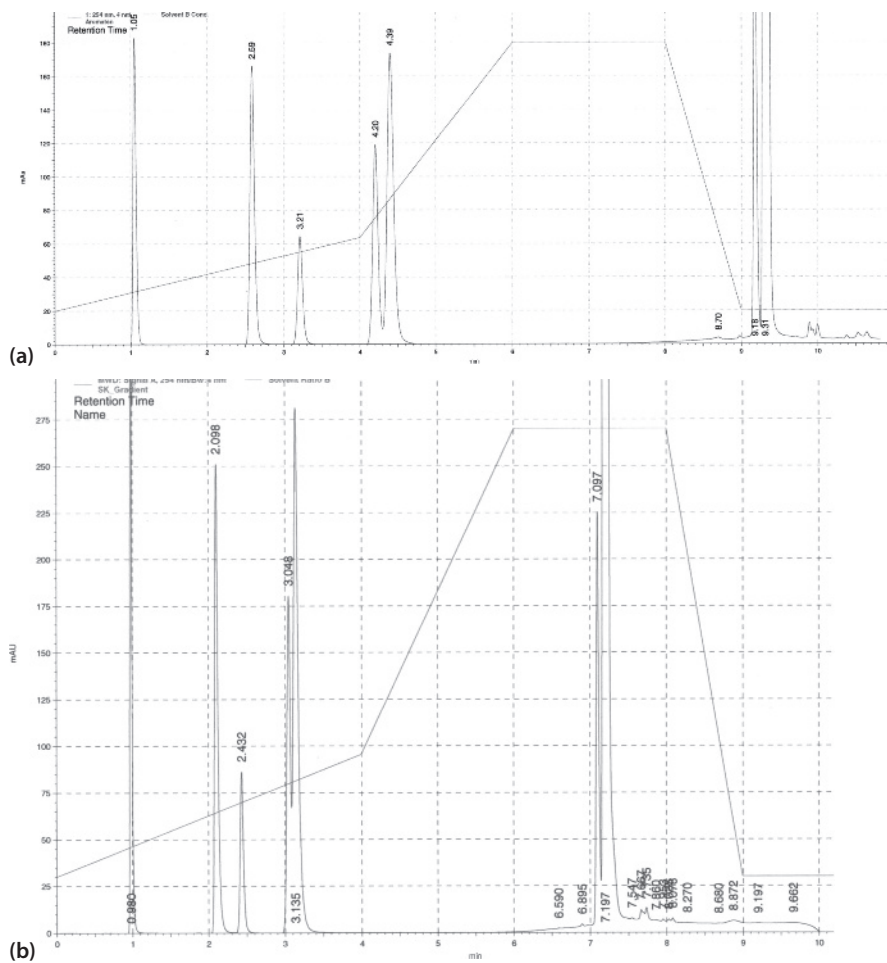
**Abb. 1.14** Gradiententrennung an Cortecs C18 an zwei Anlagen mit unterschiedlichem Verweilvolumen; es wird kaum ein Unterschied festgestellt, Details s. Text.

rialien. An der Agilent-Anlage (Abb. 1.14b und 1.15b) mit dem kleineren Verweilvolumen eluieren die Peaks etwas früher, die Trennung als solche ist kaum merklich anders.

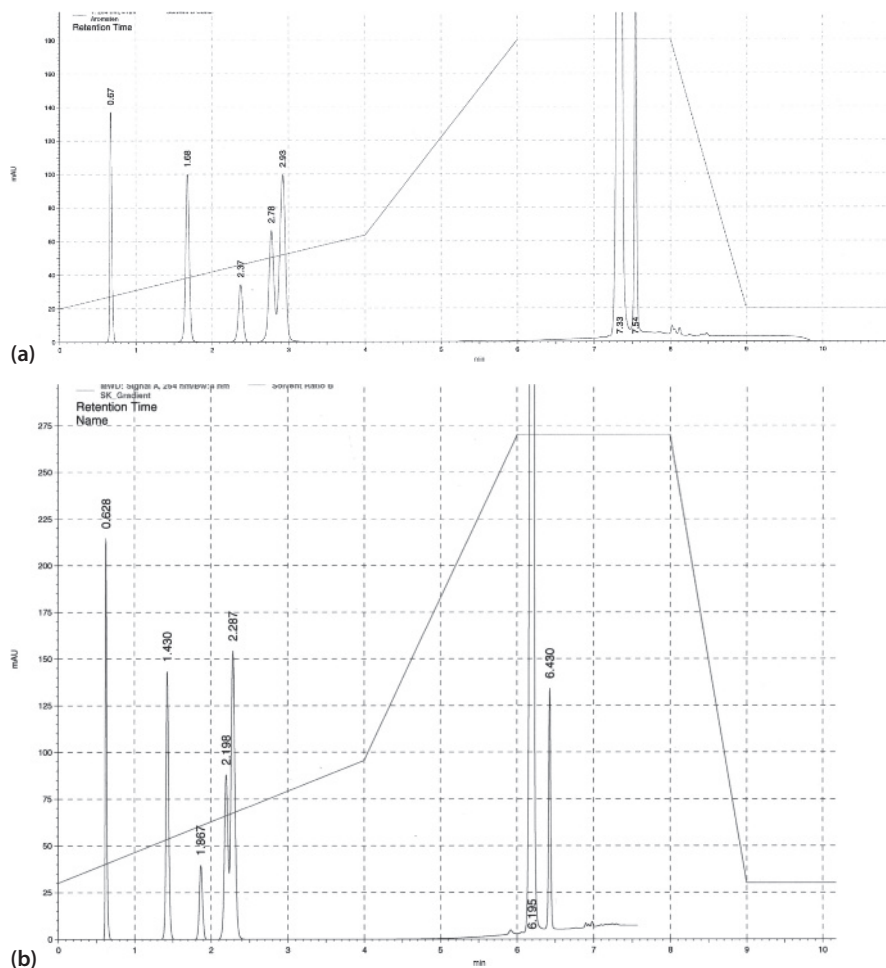
- In Abb. 1.16a und b werden Chromatogramme mit Cortecs Phenyl gezeigt. An einer Phenylphase, als recht polare stationäre Phase, sind RP-Wechselwirkungen schwach. Das größere Verweilvolumen an der Shimadzu-Anlage (Abb. 1.16a) führt nicht nur zu einer längeren Retentionszeit, die isokratische Stufe zu Beginn beschert den Substanzmolekülen eine wasserreichere Umgebung, die Trennung wird besser.
- Vergleiche Abb. 1.17a und b, die Säule ist hier Atlantis T3; an der Agilent-Anlage (Abb. 1.17b) werden die früh eluierenden Peaks etwas schlechter, die spät Eluierenden etwas besser getrennt.
- An Primesep C, einem Mixed Mode-Material mit einer Komplex-fähigen Gruppe, wird sogar Elutionsumkehr festgestellt, vgl. Abb. 1.18a und b.



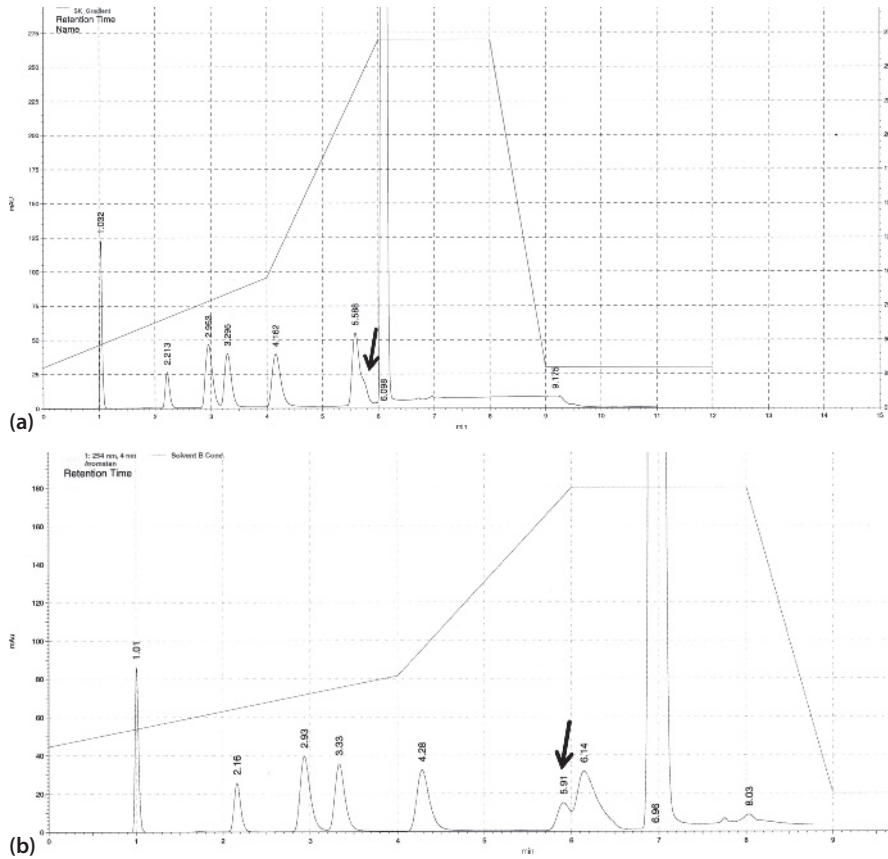
**Abb. 1.15** Gradiententrennung an Poroshell EC 120-C18 an zwei Anlagen mit unterschiedlichem Verweilvolumen; es wird kaum ein Unterschied festgestellt, Details s. Text.



**Abb. 1.16** Gradiententrennung an Cortec Phenyl an zwei Anlagen mit unterschiedlichem Verweilvolumen; an der Anlage mit dem größeren Verweilvolumen (a) wird eine bessere Trennung festgestellt.



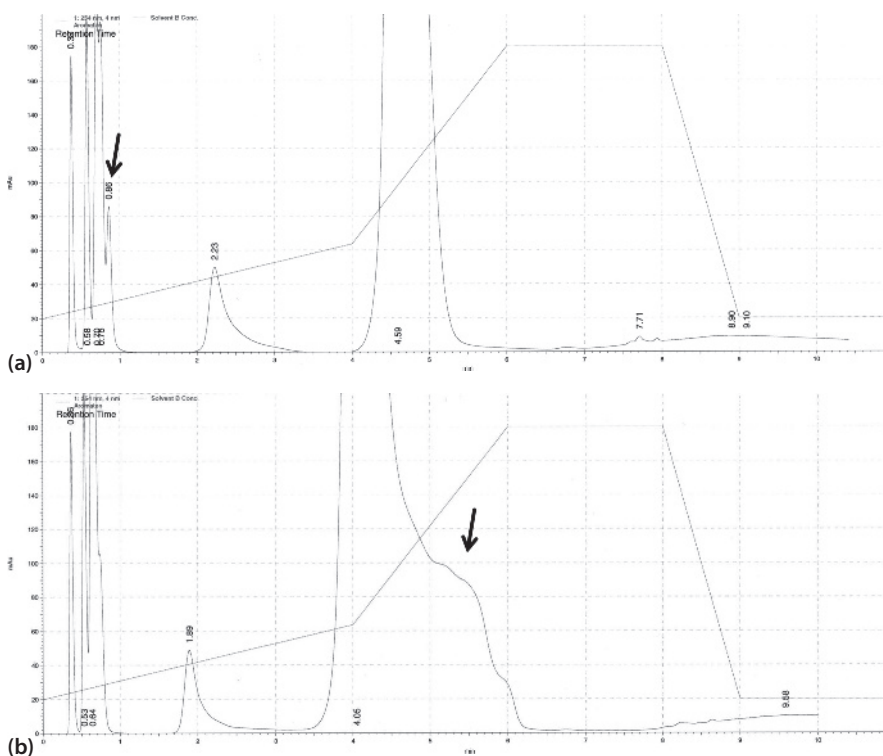
**Abb. 1.17** Gradiententrennung an Atlantis T3 an zwei Anlagen mit unterschiedlichem Verweilvolumen; das kleinere Verweilvolumen (a) führt zu einer schlechteren Trennung bei den früh eluierenden Peaks und zu einer besseren bei den spät Eluierenden.



**Abb. 1.18** Gradiententrennung an Primasep C an zwei Anlagen mit unterschiedlichem Verweilvolumen; das größere Verweilvolumen (b) führt nicht nur zu einer Zunahme der Retentionszeit, es wird auch Elutionsumkehr festgestellt.

2. In einem weiteren Experiment haben wir an einer Anlage (Shimadzu) die übliche Mischkammer mit einem Volumen von 1,7 ml gegen eine mit einem Volumen von 2,6 ml ersetzt, auch hier wurden mehrere Säulen mit unterschiedlichen Eigenschaften getestet. Wie weiter oben erwähnt, führt ein unterschiedliches Verweilvolumen – hier bedingt durch das Volumen der Mischkammer – evtl. zu einer veränderten Trennung, die an unterschiedlichen Phasen auch unterschiedlich ausfallen kann. Die Komponenten eluieren aufgrund der größeren Mischkammer bei allen Säulen zunächst erwartungsgemäß etwas später. Es ergeben sich allerdings bzgl. Auflösung je nach Säule recht große Unterschiede:

- An Cortecs C18 und Poroshell EC 120 ergibt sich mit der größeren Mischkammer eine bessere Trennung bei den früh eluierenden Peaks.
- An Atlantis T3 wurde kaum ein Unterschied festgestellt.
- An Cortecs-Phenyl war die Trennung mit der größeren Mischkammer im gesamten Chromatogramm besser.
- An Primesep C ist die Trennung im vorderen Teil des Chromatogramms gleich geblieben, im hinteren Teil ist sie besser geworden.
- An Obelisc R, einem Mixed Mode-Material, war die Trennung mit der kleineren Mischkammer im vorderen Bereich (Abb. 1.19a), mit der grö-



**Abb. 1.19** Ein unterschiedliches Volumen der Mischkammer kann einen unterschiedlichen Einfluss auf den vorderen Bereich und auf den hinteren Bereich des Chromatogramms haben, Details s. Text.

ßeren Mischkammer im hinteren Bereich des Chromatogramms besser (Abb. 1.19b)

3. Wir haben an der Hochdruckgradienten-Anlage Agilent 1200 den Einfluss des Mischers auf das Chromatogramm überprüft: Der Original-Agilent-Mischer mit einem Volumen von 400 µl – der sich nach der Mischkammer befindet – wurde gegen einen LEE TCMA-Mischer, der zwar nur 10 µl Volumen aufweist aber nach dem Düsenprinzip arbeitet und eine hervorragende Mischungseffektivität aufweist, ausgetauscht. Es konnte kaum ein Unterschied festgestellt werden, siehe Abb. 1.20a und b (Poroshell EC 120): Bei einem Hochdruckgradienten erweist sich der zusätzliche Mischer im Falle von nichtextremen Gradienten und keinen extrem kleinen Säulen als von untergeordneter Rolle, siehe auch Kapitel 2.

Es folgen zum Schluss einige Aphorismen zum Gradienten als komprimierte „take-home message“, manch eine Wiederholung aus dem vorangegangenen Text wird in Kauf genommen.

## 1.7 Gradienten-Aphorismen

### Fluss

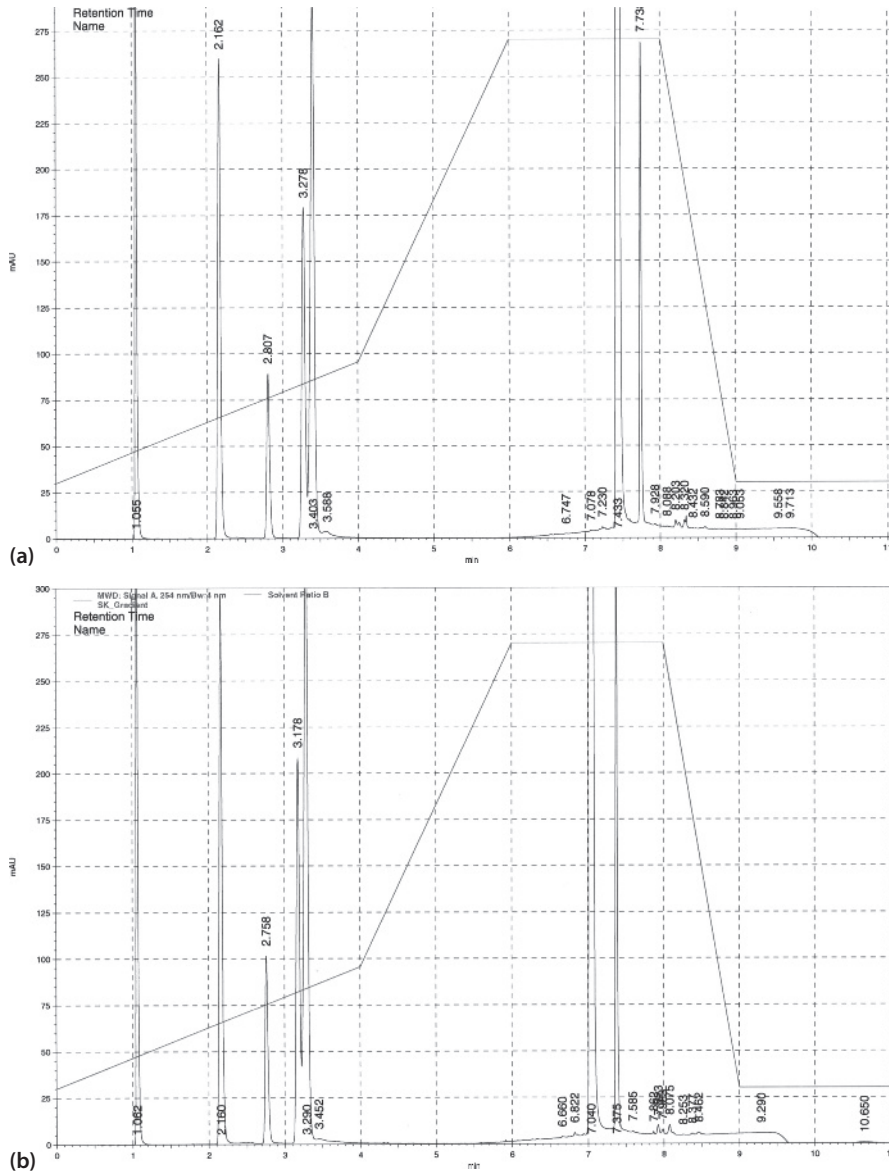
- Die Auflösung bei spät eluierenden Peaks wird durch eine Flusserhöhung eher stärker negativ beeinflusst als bei früh eluierenden Peaks.
- Durch Flusserhöhung kann sich die Selektivität/Auflösung ändern.
- Nimm einen hohen Fluss bei kleinen Teilchen und „einfachen“ Wechselwirkungen.
- Nimm einen kleinen Fluss bei  $\geq 5 \mu\text{m}$ -Teilchen aber auch im Falle von multiplen Wechselwirkungen, also wenn eine langsame Kinetik erwartet wird.
- Versuche es zunächst mit einem hohen Fluss, wenn  $\Delta \% B \geq \text{ca. } 60 \%$  beträgt.

### Gradientendauer

- Die Gradientendauer ist nicht so wichtig wie allgemein angenommen wird. Merke als Faustregel: Gradientendauer, ca. 10–15 Mal die Totzeit.
- Wenn du einen langen Gradienten nimmst, erhöhe wenigstens den Fluss.

### Anfangs- und End-% B, $\Delta \% B$

- Grundsätzlich:  $\Delta \% B$  und Gradientenvolumen sind die wichtigsten Faktoren bzgl. Optimierung; in der Praxis wird – nicht immer zweckmäßigerweise – häufig statt des Flusses die Gradientendauer geändert. Somit ergeben sich als wesentliche Optimierungs-Parameter:  $\Delta \% B$  sowie Gradientendauer und daraus die Steilheit.
- Bei unterschiedlichen Komponenten ist ein  $\Delta \% B \geq \text{ca. } 40$  notwendig.
- Die Elutionsstärke ist wichtiger als der Fluss: Bei gleicher Gradientendauer und doppeltem Fluss eluieren die Peaks nur um ca. 10 % früher.
- Starte z. B. mit 30–40 % B, fahre zunächst auf 100 % B und warte ein paar Minuten, um sicher zu gehen, dass alle Peaks während des Gradienten und nicht



**Abb. 1.20** Mischer unterschiedlichen Volumens ((a) 400 µl, (b) 10 µl) in einem Hochdruckgradienten; es wird kein merklicher Unterschied festgestellt, Details s. Text.

in der Spülphase eluieren. Anschließend solltest du den Gradienten flacher machen, um zu testen, ob die Auflösung besser wird. Merke als generelle Regel: Wähle Anfangs-% B so, dass die ersten interessierenden Peaks nach ca. der 2–3 fachen Totzeit eluieren – fang nicht ohne Not mit höherem wässrigen Anteil an. Wähle End-% B so, dass alle zu trennenden Peaks tatsächlich eluieren – wähle keinesfalls einen höheren End-% B, sonst dauert der Gradient unnötig lang und in dieser Zeit passiert ja weiter nichts. Nach der Elution der letzten

Komponente solltest du den organischen Anteil natürlich (schnell, steil) auf 100 % B erhöhen, um die Säule zu spülen. Die Spüldauer ist abhängig von der Matrix, den sonstigen organischen Verunreinigungen sowie den Zusätzen im Eluenten und beträgt in der Regel 5–10 Säulenvolumina.

### Länge der Säule

- 20–30 mm für ca. 5–8 Peaks
- 50 mm für ca. 8–12 Peaks
- 100–125 mm für ca. 20–25 Peaks

Annahme: keine zusätzlichen Peaks z. B. aus einer schwierigen Matrix

- Gradientenvolumen (*und*  $\Delta$  % B): viel wichtiger als Säulenvolumen
- Kurze Säule (und kleine Teilchen)? Kurzer Gradient
- Lange Säule? Langer Gradient plus hoher Fluss
- Kurzer Gradient? Länge der Säule recht unwichtig

### Gradienten-Steilheit und ...

- Je steiler der Gradient, umso geringer der Einfluss der Säulenlänge auf die Auflösung.
- Je steiler der Gradient, umso unwichtiger wird der Fluss.
- Anfangs-% B ist für die erste Gradientenhälfte wichtiger als die Gradienten-Steilheit.
- Je höher % B zu Beginn, umso geringer fällt der Vorteil eines beispielsweise 30 min gegenüber eines 20 min langen Gradienten aus.

### Generelles

- Je kürzer die Säule, umso früher eluieren die Peaks, sie können sogar eluieren, bevor sie den gesamten Gradienten „gesehen“ haben. Eine isokratische Stufe zu Beginn beeinflusst hier die Trennung merklich.
- Je später die Peaks eluieren, umso wichtiger wird der Gradient, sie „erleben“ den Beschleunigungseffekt stärker als die früh eluierenden Peaks.
- Die früh eluierenden Peaks „sehen“ wie bei einer kurzen Säule weniger Gradient (sprich: erfahren eine geringere Beschleunigung), auch hier ist für deren Trennung der isokratische Anteil des Laufs, d. h. die isokratische Stufe, zu Beginn wichtig.
- Hohe Peakkapazität heißt nicht automatisch gute Auflösung insgesamt.
- Der Gradient egalisiert Totvolumina in der Apparatur sowie eine schlechte Packungsqualität. Eine hohe Bodenzahl erweist sich nur bei wirklich schwierigen Trennungen als signifikant.
- Das lineare Gradientenmodell ist manchmal unzureichend, so z. B. oft ab ca. 80 % B – hier speziell bei Acetonitril – und im Falle von zusätzlichen ionischen Wechselwirkungen, s. Kapitel 3.

Zeige „Mut“, wenn du  $\leq$  ca. 10 Peaks und eine relativ saubere Probe hast, gehe hier wie folgt vor: kurze Säule, hoher Fluss, steiler, mit ca. 30–40 % B beginnender, kurzer Gradient.

Sei konsequent, wenn du  $\geq$  ca. 30–40 Peaks erwartest und über eine UHPLC verfügst: verwende eine ca.  $150 \times 3$  mm,  $2\text{ }\mu\text{m}$ -Säule, fahre einen steilen Gradienten und Sorge dafür, dass du ein Gradientenvolumen von ca. 25–30 ml erzeugst. Fahre anschließend bei zwei um ca.  $30^\circ\text{C}$  unterschiedlichen Temperaturen zwei Gradienten, einen langen bei einem niedrigen Fluss und einen kurzen bei einem hohen Fluss – und behalte das Gradientenvolumen im Auge. Für 30–40 Peaks ist ein Gradientenvolumen größer ca. 30 ml für dieses Säulenvolumen in der Regel nicht notwendig. Erwartest du diese Anzahl an Peaks allerdings in einer wirklich schwierigen Matrix und strebst du darüber hinaus noch eine robuste Methode an? Denk in diesem Fall an  $3,5$  oder sogar an  $5\text{ }\mu\text{m}$ -Teilchen, evtl. auch an eine 4 oder sogar  $4,6$  mm-Säule.

## Literatur

- 1 Snyder, L.R. und Dolan, J.W. (2007). *High-Performance Gradient Elution*, John Wiley & Sons.
- 2 Wang, J., Ji, J., Aubry, A., Arnold, M. und Jemal, M. (2011). *Journal of Chromatography B* 879: 1917–1926.
- 3 Boswell, P.G., Schellenberg, J.R., Carr, P.W., Cohen, J.D. und Hegeman, A.D. (2011). *Journal of Chromatography A* 1218: 6742–6749.
- 4 Neue, U.D. und Kuss, H.-J. (2010). *Journal of Chromatography A* 1217: 3794.
- 5 Vogel, F. und Galushko, S. (2013). *International Labmate* 38: March.
- 6 Molnar, I. und Rieger, H.-J. (2013). *International Labmate* 38: April.

