

Der HPLC-Tipp im Oktober

Generische Gradienten in der RP-HPLC I

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Der Fall

Gradientelution ist den Königsweg bei der Methodenentwicklung einer unbekannt Probe in der RP-HPLC. Ein Gradientenlauf ist ferner der erste – und mangels Zeit oft auch der einzige - Schritt, wenn es um eine schnelle Information geht, so beispielsweise bei der Reaktionskontrolle. Vielerorts haben sich nun sogenannte generische Gradienten etabliert: Ein generischer Gradient ist ein Gradient, der sich für *meine*, immer wieder zu analysierenden, recht ähnliche Substanzen und *meine* Zielsetzung als geeignet erwiesen hat. So ist beispielsweise „0,1-0,05% TFA/ACN“ für viele Fragenstellungen ein bewährter Gradient. Über solche Gradienten und Faustregeln, die sich in der Praxis als praktikabel erwiesen haben, wollen wir uns in diesem und im nächsten Monat unterhalten.

Die Lösung

Nachfolgend werde ich einige typische Situationen skizzieren und dazu „passende“ Gradienten vorstellen, die sich im Rahmen mehrerer Projekte als hilfreich heraus gestellt haben. Beim nächsten HPLC-Tipp werde ich zu den nachfolgenden Ausführungen einige Beispiel-Chromatogramme zeigen.

Vorbemerkung

Besondere Umstände wie regulatorische Zwänge, schwierige Matrices, längst eingeführte, „nicht-zu-rüttelnde“ Praktiken und Auffassungen bleiben hier naturgemäß außen vor.

Empfehlungen und Faustregeln, die für die Erstellung von eigenen generischen Gradienten hilfreich sein könnten:

1. Anzahl der Peaks, Gradientenvolumen, Säulenlänge und Gradientendauer

- Für bis zu ca. 10 Peaks empfohlenes Gradientenvolumen (Gradientendauer x Fluss) $V_{Gr} \leq$ ca. 10 ml, Säulenlänge 50 mm, Gradientendauer ca. 5 min
- Für ca. 10-20 Peaks, V_{Gr} ca. 15-20 ml, Säulenlänge 100 mm, Gradientendauer ca. 10 min
- Für \geq ca. 25-30 Peaks, V_{Gr} ca. 25-30 ml, Säulenlänge 125-150 mm, Gradientendauer ca. 15 min – größere Gradientenvolumina und längere Säulen verlängern unnötig die Gradientendauer
- Für UHPLC-Anwender: Sie verwenden wohl häufig kurze Säulen und Ihre Gradienten sind demnach ebenfalls kurz bis hin zu den „ballistischen“ Gradienten (Gradientendauer ca. 1-2 min). Merke folgende Faustregel: $V_G \geq 2 \times V_d$ (V_d : Dwell Volume); z. B. 1 min Gradientendauer x 0,5 ml/min, somit $V_G = 0,5$ ml, also hier „erlaubtes“ $V_d = 250 \mu\text{l}$. Nachdem nun alle moderne UHPLC-Anlagen (auch die Niederdruckgradienten) ein Dwell Volume von kaum mehr

als ca. 200-230 μl aufweisen, stellen solche schnelle Gradienten kein Problem dar

2. Notwenige und meist ausreichende Gradientendauer: Ca. $10-15 \times t_0$ (t_0 : Totzeit)

3. Anfangs- und End% B

Mit so viel % B starten, dass die ersten interessierenden Peaks nach ca. $2-3 \times t_0$ eluieren. Bei so viel % B aufhören, dass die letzten Peaks von der Säule eluieren – nicht zwangsläufig den Gradienten bis 100 % B fahren, sonst auch hier: Unnötige Verlängerung der Gradientendauer. Nach der Elution der letzten Peaks soll natürlich der Gradient „schnell“ (z. B. innerhalb 0,1 min) auf 100 % B gebracht werden, um die Säule zu spülen. Das schnelle Hochfahren auf 100 % B stellt in diesem Fall – nachdem also alle interessierten Peaks eluiert worden sind – kein Problem dar.

4. Faustregeln zur Steilheit

- Nimm´ einen „vernünftigen“ Anfangs % B ($2-3$ fache Totzeit für die ersten interessierenden Peaks) und variiere bei Bedarf zunächst nur die Steilheit – dies kann bereits zum Erfolg führen. Merke ferner:
- Je steiler der Gradient, umso geringer der Einfluss der Säulenlänge auf die Auflösung, umso niedriger die Nachweisgrenze, s. November-Tipp
- Je steiler der Gradient, umso unwichtiger wird der Fluss
- Anfangs % B ist für die erste Gradientenhälfte wichtiger als die Gradientensteilheit
- Je höher % B zu Beginn, umso geringer fällt der Vorteil eines beispielsweise 20 min gegenüber eines 10 min langen Gradienten aus

Das Fazit

Es folgen für zwei Situationen zwei Beispiele, die das weiter oben dargelegte zusammenfassen:

1. \leq ca. 10 Peaks und eine relativ saubere Probe? Kurze Säule, hoher Fluss, steiler, mit ca. 30-40% B beginnender, kurzer Gradient
2. \geq ca. 30-40 Peaks und UHPLC vorhanden? 125-150 x 3 mm-Säule, steiler Gradient, Gradientenvolumen, ca. 25-30 ml. Liegt eine schwierige Matrix vor und/oder wird eine robuste Methode angestrebt? Statt die in der UHPLC üblichen ca. $2 \mu\text{m}$ -Teilchen verwenden, ruhig an die robusteren $3,5 \mu\text{m}$ - oder gar $5 \mu\text{m}$ -Teilchen denken.

Letzte Bemerkung

Das hat zwar mit generischen Gradienten nichts zu tun, ist allerdings in meinen Augen wichtig, deswegen hier eine kurze Erwähnung: Auch unter Zeitdruck würde ich bei einer unbekanntem (und wichtigen) Probe nicht nur einen Acetonitril- sondern auch einen Methanol-Gradienten (oder wenigstens 50% ACN, 50% MeOH) fahren, denn: Sollten Sie (auch) polare Komponenten in Ihrer Probe haben, wäre Methanol bzgl. Selektivität evtl. von Vorteil.

