

Der HPLC-Tipp im November

Generische Gradienten in der RP-HPLC II

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Der Fall

Im letzten Monat hatte ich Ihnen einige Faustregeln und Erfahrungswerte vorgestellt, mit deren Hilfe man eigene, der Fragenstellung passend generische Gradienten entwickeln kann. Heute möchte ich Ihnen einige Beispiele zeigen, bei Bedarf folgt eine kurze Erläuterung. Diese Chromatogramme stammen im Wesentlichen aus umfangreichen Untersuchungen, die Hans-Joachim Kuss durchgeführt hat.

Die Lösung

Die ausgesuchten Beispiele befassen sich mit den Fragen „Start % B“ und „Steilheit“

Die oft angewandte Praxis, mit „viel“ Prozent Wasser/Puffer zu starten, ist selten zweckdienlich, denn: Ein Starten mit hohem wässrigen Anteil führt dazu, dass alle Peaks auf der stationären Phase quasi „festgehalten“ und im Chromatogramm nach hinten „verschoben“ werden. Ferner ist die Peakform der früh eluierenden Peaks nicht immer optimal, schließlich reichern sich organische Verbindungen aus dem wässrigen Anteil der mobilen Phase am Säulenkopf an und erscheinen gegen Ende des Laufs als Geisterpeaks („Systempeaks“). Ein Starten dagegen mit 30-40% B führt zu einer „homogeneren“ Verteilung der Peaks im Chromatogramm (und damit bessere Auflösung insgesamt), die Peakform - vor allem der früh eluierenden Peaks - wird signifikant verbessert, was zur Verbesserung der Nachweisgrenze führt, schließlich hat man in der Regel weniger mit Geisterpeaks zu kämpfen. Abbildung 1 zeigt einen Gradientenlauf von 100% A auf 100 % B, Abbildung 2 von 40 % B auf 100 % B, die das weiter oben Gesagte demonstrieren.

Abb.1

Abb.1 Zum „richtigen“ Anteil an Start % B beim Gradienten, Details, s. Text

Abb. 2

Abb. 2 Zum „richtigen“ Anteil an Start % B beim Gradienten, Details, s. Text

Als Erklärung für eine „homogene“ Verteilung der Peaks und folglich bessere Trennung aller Komponenten im Fall 2 kann man folgende einfache Rechnung aufstellen: Die Differenz End % B - Start % B lautet im ersten Fall: 100 %B in 30 min; Damit ergibt sich eine Differenz von ca. 3,4% B pro Minute. Im zweiten Fall haben wir eine Differenz von 60 % B in 30 min und somit 2% B pro Minute, d. h. im zweiten Fall „sehen“ die Moleküle weniger % B pro Minute, sie werden in einer wässrigeren Umgebung stärker auseinander gezogen, die Trennung wird besser.

Wenn bekannt ist bzw. damit zu rechnen ist, dass in der Probe sehr polare Komponenten enthalten sein können, gilt nach wie vor: Mit „viel“ Wasser/Puffer starten, die Geisterpeaks gegen Ende des Laufs muss man inkauf nehmen, s. Abbildung 3, linkes Chromatogramm

Abb. 3

Abb. 3 Zum „richtigen“ Anteil an Start % B beim Gradienten, Details, s. Text

Wenn die Anzahl der Peaks „überschaubar“ ist, wäre ein Start mit hohem % B empfehlenswert, Ergebnis: Sehr scharfe, hohe Peaks, genügend gute Auflösung, s. Abbildung 4 (65% B als Startbedingung)

Abb. 4

Abb. 4 Zum „richtigen“ Anteil an Start % B beim Gradienten, Details, s. Text

Jetzt betrachten wir folgende zwei Fälle:

1. In der Probe sind viele, sehr ähnliche Komponenten, eine Verbesserung der Selektivität ist de facto nicht möglich. In diesem Fall muss man sich der zweitbesten Möglichkeit für eine gute Trennung widmen, nämlich Verbesserung der Effizienz, sprich: Generierung möglichst scharfer Peaks (hohe Bodenzahl). Eine Möglichkeit wäre folgende: Man startet ebenfalls mit „viel“ % B – um scharfe Peaks zu erhalten – und fährt dann einen relativ flachen Gradienten um die – ähnliche – Peaks etwas auseinander zu ziehen. Weder ein konkaves Gradientenprofil noch der übliche Gradient 5 % B auf 100 % B sind hier erfolgreich, s. Abbildung 5.

Abb. 5

Abb. 5 Zum „richtigen“ Anteil an Start % B sowie Steilheit im Falle von ähnlichen Molekülen, Details, s. Text

2. Es zeigt sich oft, dass ein flacher Gradient zu einer guten Auflösung eher im hinteren Bereich des Chromatogramms führt, s. Abbildung 6: So kann ich abhängig von meinen Wünschen die Steilheit so wählen, wie ich sie brauche: Möchte ich eine gute Trennung *aller* Peaks erreichen, verwende ich einen relativ steilen Gradienten mit ca. 40 % B beginnend. Somit erreiche ich die beste Auflösung für alle Peaks (wiedergegeben als Summe aller Auflösungen, R_s), in Abbildung 6, oben links $R_s=72$. Interessiert mich dagegen gezielt eine gute Trennung zweier Peaks im hinteren Teil des Chromatogramms, wähle ich einen eher flachen Gradienten. Ich verzichte zwar auf eine gute Gesamtauflösung, die zwei Peaks werden jedoch optimal getrennt, s. Abbildung 6, unten rechts: Bei mäßiger Gesamtauflösung eine sehr gute Trennung der zwei letzten Peaks.

Abb. 6

Abb. 6 Zur „richtigen“ Steilheit abhängig von der Fragenstellung, Details, s. Text

Das Fazit

Man sollte nicht unbedingt herrschenden Meinungen und Gewohnheiten nach dem Motto „wir machen das immer so“ stets folgen. Speziell beim Gradienten existieren immer noch recht viele Mythen, z. B.: „Man fängt mit viel Puffer an und hört mit viel Acetonitril auf“, „ein flacher Gradient verbessert immer die Trennung“, „sehr steile Gradienten schafft die Säule nicht“, „lieber langer Gradient statt hoher Fluss“, „eine 150 mm lange Säule sollte sicherheitshalber schon sein“. Ich wünsche Ihnen für Ihre Gradiententrennungen genügend freien Spielraum, Mut und kreative Einfälle.

© Dr. Stavros Kromidas