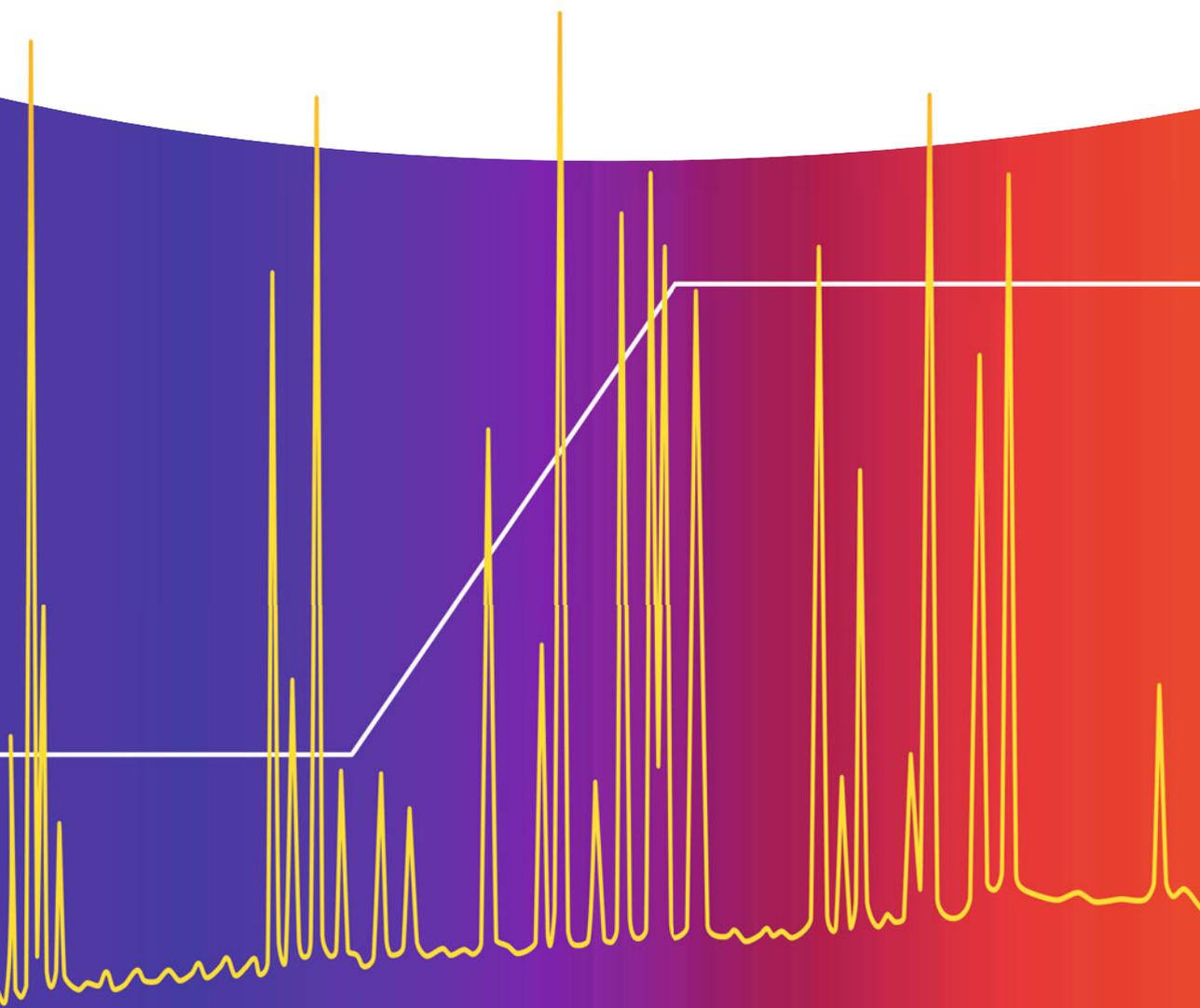


Herausgegeben von Stavros Kromidas

# Der Gradient in der HPLC für Anwender

RP, LC-MS, Ionenanalytik,  
Biochromatographie, SFC, HILIC





**Der Gradient in der HPLC  
für Anwender**



# **Der Gradient in der HPLC für Anwender**

RP, LC-MS, Ionenanalytik, Biochromatographie, SFC, HILIC

*Herausgegeben von  
Stavros Kromidas*

**WILEY-VCH**  
Verlag GmbH & Co. KGaA

Herausgegeben von

*Dr. Stavros Kromidas*  
Consultant  
Breslauer Str. 3  
66440 Blieskastel  
Deutschland

■ Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung.

**Bibliografische Information der  
Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,  
Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

**Print ISBN** 978-3-527-34404-8  
**ePDF ISBN** 978-3-527-81271-4  
**ePub ISBN** 978-3-527-81273-8  
**oBook ISBN** 978-3-527-81270-7

**Umschlaggestaltung** Formgeber, Mannheim  
**Satz** le-tex publishing services GmbH, Leipzig

Gedruckt auf säurefreiem Papier.

## Inhaltsverzeichnis

**Vorwort** IX

**Zum Aufbau des Buches** XI

**Zu den Autoren** XIII

**Beitragsautoren** XVII

**Teil 1 Die Grundsätze der Gradientenelution** 1

**1 Aspekte der Gradienten-Optimierung** 3

*Stavros Kromidas*

- 1.1 Einführung 3
- 1.2 Besonderheiten des Gradienten 3
- 1.3 Einige chromatographische Größen und Formeln 5
- 1.4 Nachweisgrenze, Peakkapazität, Auflösung – Möglichkeiten der Optimierung 8
  - 1.4.1 Nachweisgrenze 8
  - 1.4.2 Peakkapazität und Auflösung 10
- 1.5 Gradienten-„Mythen“ 14
- 1.6 Beispiele zur Optimierung von Gradientenläufen: ausreichende Auflösung in einer adäquaten Zeit 16
- 1.7 Gradienten-Aphorismen 38

**2 Apparative Einflüsse auf die Qualität von Gradienten-Methoden und deren Übertragung zwischen unterschiedlichen Geräten** 43

*Frank Steiner*

- 2.1 Arten der technischen Umsetzung der Gradientenelution und die jeweiligen Charakteristika 43
  - 2.1.1 Die niederdruckseitige und die hochdruckseitige Gradientenerzeugung – Zwei technisch grundlegend verschiedene Prinzipien 43

- 2.1.2 Die Rolle der Mischvorrichtung bei HPG- und LPG-Systemen vor dem Hintergrund der verschiedenen Prinzipien der Gradientenformung 45
- 2.1.3 Die Arbeitsweise von Mischvorrichtungen und die systematische Charakterisierung von deren Effektivität 49
- 2.1.4 Auswirkungen der Volumenkontraktion beim Mischen von Wasser und organischen Lösemitteln bei Gradientensystemen 62
- 2.1.5 Auswirkungen kleinster Leckraten von Pumpenköpfen bei sensiblen Applikationen und HPG-Synchronisierungs-Techniken zu deren Korrektur 68
- 2.2 Die Bestimmung und Bedeutung des Gradientenverzögerungsvolumens der Apparatur 70
  - 2.2.1 Die Bestimmung des GDV und seine Abhängigkeit von den Betriebsbedingungen des Systems 71
  - 2.2.2 Der Einfluss des GDV auf die chromatographischen Ergebnisse 82
  - 2.2.3 Möglichkeiten der GDV-Beeinflussung und seiner Auswirkung durch den Anwender 83
- 2.3 Die Übertragung von Gradientenmethoden zwischen unterschiedlichen HPLC-Systemen 86
  - 2.3.1 Praktische Tipps zum Umgang mit abweichenden GDVs und Gegenmaßnahmen 86
  - 2.3.2 Was ist bezüglich Druckabhängigkeit des GDV zu beachten? 89
  - 2.3.3 Auswirkung einer zu großen Elutionsstärke des Probelösemittels im schwachen Laufmittel des Gradientenstarts 91
- 2.4 Einfluss von Schwankungen der Eluentenzusammensetzung auf die Qualität der Detektion 94
  - 2.4.1 Einfluss eines Referenzkanals auf die Basislinie bei den Diodenarray-Detektoren 95
  - 2.4.2 Die spezielle Herausforderung bei Methoden mit UV-absorbierenden retardierten Additiven wie TFA (Trifluoressigsäure) in der mobilen Phase 96
- 2.5 Weitere Arten der praktischen Anwendung von Gradientensystemen in der HPLC 103
  - 2.5.1 Alternative und kombinierte Gradienten-Modi in der HPLC 103
  - 2.5.2 Vorteile bei der Umsetzung isokratischer Methoden mit Gradientenapparaturen 104
  - 2.5.3 Nutzung von Gradientensystemen bei der Methodenentwicklung und Methodenoptimierung 106

- 3 Optimierung einer „Reversed-Phase“-Gradiententrennung mit EXCEL 111**  
*Hans-Joachim Kuss*
- Teil 2 Die Spezifika des Gradienten in einzelnen Trennmodi 119**
- 4 Die Gradientelution ionischer Verbindungen 121**  
*Joachim Weiss*
- 4.1 Einführung 121
- 4.2 Theoretische Aspekte 122
- 4.3 Gradientenarten in der Ionenchromatographie 124
- 4.4 Wahl des Eluenten 128
- 4.4.1 Möglichkeiten zur Optimierung von Konzentrationsgradienten 134
- 4.5 Gradientelution von Anionen an Anionenaustauschern 135
- 4.6 Gradientelution von Kationen an Kationenaustauschern 146
- 4.6.1 pH-Gradienten für die Trennung monoklonaler Antikörper 154
- 4.7 Gradientelution von Anionen und Kationen an Mixed-mode-Phasen 160
- 5 Der Gradient in der Biochromatographie 173**  
*Oliver Genz*
- 5.1 Biomoleküle 173
- 5.2 Biochromatographie 173
- 5.3 Der Gradient in der Biochromatographie 174
- 5.3.1 Ein Gradient, den man unbedingt vermeiden sollte 175
- 5.4 Gradienten bei unterschiedlichen Biochromatographietechniken 176
- 5.4.1 Gelfiltration, Size-Exclusion-Chromatography (SEC) 176
- 5.4.2 Ionenaustauschchromatographie 177
- 5.4.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) 181
- 5.4.4 Umkehrphasenchromatographie von Biomolekülen 183
- 5.4.5 Affinitätschromatographie (AC) 184
- 5.5 Zusammenfassung 186
- 6 Spezifika der Gradientenelution in der HILIC 187**  
*Thomas Letzel*
- 7 Spezifika der Gradientenelution in der SFC 197**  
*Stefan Bieber und Thomas Letzel*
- 7.1 Arten von Gradienten in der SFC 197
- 7.1.1 Lösungsmittelgradienten 197
- 7.1.2 Druckgradienten 199
- 7.1.3 Temperaturgradienten 199
- 7.2 Effekte von Gradienten 200

<b>8</b>	<b>Der Gradient in LC-MS-Messungen</b>	<b>203</b>
	<i>Markus M. Martin</i>	
8.1	Bedeutung der Gradientelution für LC-MS	203
8.2	Technische Aspekte des Einsatzes von Gradientelution zur LC-MS-Analytik	207
8.2.1	Technische Einflüsse der LC-Anlage: Systemdispersion, Proportionierungspräzision und ihre Bedeutung für MS-Messungen	207
8.2.2	Technische Einflüsse des Massenspektrometers: der LC-Gradient und die Signalerzeugung im MS	212
8.2.3	Quantifizierung im Massenspektrometer innerhalb einer Gradientelution: Matrixeinflüsse und ihre Kompensation	219
8.2.4	MS-Auslastung in der Gradientelution – Säulenäquilibrierung als Durchsatzvernichter	222
8.2.5	Gradientenverzögerung, Flussrate und Säulendimension – wieviel hilft Downsizing bei Gradiententrennungen in der LC-MS?	224
8.3	Fazit	227
8.4	Abkürzungen	227
<b>9</b>	<b>Zusätzliche Werkzeuge zur Methodenverbesserung: Fluss- und Temperaturgradienten</b>	<b>231</b>
	<i>Egidijus Machtejevas</i>	
9.1	Einleitung	231
9.2	Temperaturgradienten	231
9.3	Flussgradienten	232
9.3.1	Kombination von Fluss- und Temperaturgradienten	233
9.3.2	Fallbeispiele	233
9.4	Schlussfolgerung	236
	<b>Stichwortverzeichnis</b>	<b>239</b>

## Vorwort

Etwa 80 % der flüssigchromatographischen Methoden sind Gradientenmethoden. Wir haben im vorliegenden Buch versucht, die „ganze“ Welt des Gradienten ausführlich und praxisnah zu beleuchten. So kommt der Einsatz von Gradienten außer in klassischen Einsatzgebieten wie RP und LC-MS-Kopplung auch in der Ionenanalytik und in der Biochromatographie zur Sprache: der Salz- und der pH-Wert-Gradient. Neuere Trenntechniken wie HILIC und SFC sowie Fluss- und Temperaturgradienten runden die Diskussion ab. Das Buch ist für den erfahrenen Anwender und den praxisorientierten Laborleiter gedacht. Es geht zwar an vielen Stellen in die Tiefe, jedoch war unser Bestreben, die Praxis stets im Blick zu behalten. Wir hoffen, der Leser findet umsetzbare Informationen und Tipps zu diesem breit eingesetzten Trennmodus. Ich danke Wiley-VCH und speziell Stefanie Volk und Frank-Otmar Weinreich für die gute und vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Blieskastel, im Januar 2019

*Stavros Kromidas*



## Zum Aufbau des Buches

Das Buch besteht aus zwei Teilen: Im Teil 1 wird die Gradiententechnik aus unterschiedlicher Sicht beleuchtet, es geht um grundsätzliche Informationen. Im Teil 2 werden die Spezifika des Gradienten in einzelnen Modi und Trenntechniken vorgestellt.

### Teil 1: Die Grundsätze der Gradientenelution

Im Kapitel 1 (*Aspekte der Gradienten-Optimierung in der RP-Chromatographie*) bespricht Stavros Kromidas in kompakter Form, worauf es bei der Gradienten-Optimierung ankommt und stellt einfache To-do-Regeln vor. Frank Steiner erläutert im Kapitel 2 (*Apparative Einflüsse auf die Qualität von Gradienten-Methoden und deren Übertragung zwischen unterschiedlichen Geräten*) unter anderem, inwieweit auch kleinste apparative Unterschiede zwischen HPLC-Anlagen die Chromatographie stark beeinflussen können. Teil 1 wird mit Kapitel 3 von Hans-Joachim Kuss beendet (*Optimierung einer „Reversed-Phase“-Gradiententrennung mit EXCEL*). Hier wird eine Möglichkeit gezeigt, wie mithilfe von EXCEL Gradienten vorhergesagt werden können.

### Teil 2: Die Spezifika des Gradienten in einzelnen Trennmodi

Kapitel 4 und 5 handeln von der Trennung ionischer bzw. ionisierbarer Komponenten. Im Kapitel 4 (*Die Gradientenelution ionischer Verbindungen*) geht Joachim Weiss sowohl auf die Trennung von kleinen Molekülen wie anorganischen Ionen als auch auf die Trennung von großen Molekülen wie monoklonalen Antikörpern ein und zeigt die Spezifika von pH-Wert- und Salzgradienten auf. Oliver Genz befasst sich im Kapitel 5 (*Der Gradient in der Biochromatographie*) mit den unterschiedlichen Trennmodi in der Biochromatographie, ferner was speziell hier bei Gradientenläufen zu beachten wäre. Im Kapitel 6 (*Spezifika der Gradientenelution in der HILIC*) diskutiert Thomas Letzel alle anwendbaren Gradienten in der HILIC, so auch Temperaturgradienten. Stefan Bieber und Thomas Letzel legen im Kapitel 7 (*Spezifika der Gradientenelution in der SFC*) die drei Möglichkeiten der Gradientenelution in der SFC verdichtet dar. Im Kapitel 8 (*Der Gradient in LC-MS-Messungen*) setzt sich Markus Martin ausführlich mit Gradienten bei der LC-MS-Kopplung auseinander. Hier werden sowohl apparative Aspekte des LC- und des MS-Teils als auch das Problem der Quantifizierung bei Gradi-

enten erörtert. Im Kapitel 9 schließlich beschäftigt sich Egidijus Machtejevas mit etwas seltenen Gradientenmodi (*Zusätzliche Werkzeuge zur Methodenverbesserung: Fluss- und Temperaturgradienten – sind jene eine Option?*)

Das Buch muss nicht linear gelesen werden. Die einzelnen Kapitel wurden so verfasst, dass sie abgeschlossene Module darstellen – ein „Springen“ ist jederzeit möglich. Damit haben wir versucht, dem Charakter des Buches als Nachschlagewerk gerecht zu werden. Der Leser möge davon profitieren.

## Zu den Autoren

### **Stavros Kromidas**

Studium der Chemie und Promotion an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken über die Entwicklung von chiralen Phasen für die HPLC. Verkaufsleiter Norddeutschland bei Waters, 1989 Gründung der NOVIA GmbH und Geschäftsführung bis 2001. Seit 2001 Fachbuchautor, Berater und Referent für HPLC und Validierung. Schwerpunktthemen seiner Tätigkeit in den letzten Jahren sind Vergleich und Auswahl von stationären Phasen, Gradientenoptimierung und der Einsatz von moderner HPLC/UHPLC im Alltag.

### **Markus M. Martin**

Markus M. Martin arbeitet als Manager, Product Management UHPLC Systems bei Thermo Fisher Scientific in Germering bei München. Er begann seine dortige Laufbahn im Jahr 2010 bei der vormaligen Dionex Corporation, nun Teil von Thermo Fisher Scientific, als Solutions Manager für LC/MS, wo er im Solutions Marketing für UHPLC und LC/MS arbeitete. Martin promovierte im Jahr 2004 in Analytischer Chemie bei Prof. Heinz Engelhardt an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken mit Arbeiten zur Kapillarelektrophorese von synthetischen Polyelektrolyten. Vor seinem Eintritt bei Thermo Fisher Scientific arbeitete er als Laborleiter Analytik bei Sanofi-Aventis und als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität des Saarlandes. Der Schwerpunkt seiner fachlichen Arbeiten liegt bis heute auf Techniken der UHPLC, HPLC-MS, CE und CE-MS sowie der integrierten Probenvorbereitung.

### **Joachim Weiss**

Nach Abschluss seines Chemie-Studiums an der Technischen Universität Berlin im Jahre 1979 arbeitete er am Hahn-Meitner Institut in Berlin auf dem Gebiet der Gas- und Flüssigkeitschromatographie. Im Jahre 1982 schloss er diese Arbeiten mit der Promotion in Analytischer Chemie an der Technischen Universität Berlin ab. Im Jahre 2000 berief ihn Prof. Guenther Bonn als Gastprofessor an die Leopold-Franzens Universität in Innsbruck (Österreich), wo er sich im Jahre 2002 in Analytischer Chemie habilitierte.

Seine berufliche Laufbahn startete Weiss im Jahre 1982 als Applikationschemiker bei der Dionex Corporation in Deutschland, nun ein Teil von Thermo Fisher Scientific. Seine augenblickliche Position ist die des Internationalen Technischen Direktors für Dionex-Produkte innerhalb der Chromatographie- und Massen-

spektrometrie-Division (CMD) von Thermo Fisher Scientific am Standort Dreieich (Deutschland). Joachim Weiss ist international als Experte auf dem Gebiet der Flüssigkeits- und Ionenchromatographie anerkannt. Die 4. Auflage seines *Handbook of Ion Chromatography* erschien im Jahre 2016.

#### **Thomas Letzel**

Thomas Letzel ist ein habilitierter analytischer Chemiker mit fast 20 Jahren Erfahrung im Bereich der Analytischen Screening-Techniken unter Nutzung von HPLC, GC, sowie SFC in Kopplung mit MS. Er ist Leiter der Analytischen Forschungsgruppe am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München (TUM) und lehrt an der TUM Analytische Chemie und Bioanalytik. Er widmete sich eingehend der massenspektrometrischen Analyse verschiedenster Forschungsbereiche, darunter zählen Projekte aus der Umwelt- und Lebensmittelanalytik, aber auch aus der Pharmazeutischen Analytik und Bioanalytik. Dabei sind neue „polaritätserweiterte“ Trenntechniken wie die RPLC-HILIC-MS und SFC-MS ein besonderer Schwerpunkt, ebenso wie die Verknüpfung der Identifizierung von Molekülen mit deren funktionellen Eigenschaften. Thomas Letzel ist Autor von mehr als 150 Artikeln, Buchbeiträgen sowie von vier Büchern.

#### **Stefan Bieber**

Stefan Bieber studierte Bioprozesstechnik und Pharmazeutische Bioprozesstechnik an der Technischen Universität München. Er promovierte am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der TU München über organische Spurenstoffe in der aquatischen Umwelt und geeignete Nachweisverfahren. Seit 2018 ist er Geschäftsführer der AFIN-TS GmbH. In seiner Forschung beschäftigt er sich hauptsächlich mit trennungsmechanistischen Grundlagen der SFC. Hierdurch soll besseres Verständnis der Technik erzielt und die Anwendbarkeit der SFC erhöht werden.

#### **Frank Steiner**

Frank Steiner leitet das Marketing-Applikationslabor in der HPLC-Organisation von Thermo Fisher Scientific und hat außerdem die Funktion des Scientific Advisors. In dieser koordiniert er die wissenschaftliche Zusammenarbeit mit externen Partnern zur grundlegenden Weiterentwicklung der UHPLC-Technologie. Nach seiner Promotion an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken bei Prof. Dr. Dr. Heinz Engelhardt und einem Postdoc-Aufenthalt am Kernforschungszentrum Saclay in Frankreich habilitierte er sich 2003 an der Universität des Saarlandes über elektroseparative Techniken und deren Kopplung mit der MS. 2005 wechselte er zur Dionex Softron GmbH in Germering, die heute zu Thermo Fisher Scientific gehört. Dort arbeitete er in verschiedenen Rollen im technischen Marketing stets mit einem wissenschaftlichen Fokus und begleitete die Entwicklung der UltiMate 3000 HPLC Plattform und des Vanquish UHPLC Systems.

**Oliver Genz**

Oliver Genz studierte Biologie und Chemie in Krefeld, Mainz und Freiburg. Nach dem Studium mehrere Jahre tätig bei Pharmacia Biotech (heute GE Healthcare) in den Bereichen Verkauf, technischer Support, Applikationslabor und zuständig für die Durchführung internationaler Kundenschulungen in den Bereichen analytische, präparative und Prozess-Biochromatographie. Danach mehrere Jahre tätig in Vertrieb, Marketing und technischem Support von Geräten für die präparative und Prozesschromatographie und stationäre Phasen, unter anderem bei YMC, Grace Davison (heute Grace) und Labomatic.

Seit 2006 Referent für Biochromatographie, Verfasser zahlreicher Artikel zum Thema präparative und Prozesschromatographie und Berater für die Bereiche präparative und Prozesschromatographie, Biochromatographie und Downstream Processing.

**Hans-Joachim Kuss**

Nach dem Studium der Chemie in Karlsruhe Promotion auf dem Gebiet der Spektroskopie. Er arbeitete 34 Jahre lang an der Universität München in den Bereichen HPLC, GC und GC-MS. Hans-Joachim Kuss hielt mehrere Hundert Chromatographiekurse, speziell auch zu Excel-Anwendungen zur gewichteten Regression, der Vorhersage von Gradienten und Integrationsproblemen.

**Egidijus Machtejevas**

Egidijus Machtejevas studierte Organische Chemie und Biotechnologie an der Kaunas University of Technology, Litauen. Er promovierte in der Analytischen Chemie mit der Arbeit „Design of chiral adsorbents and enantioseparations by means of HPLC“. Anschließend arbeitete er als Postdoc bei Professor Klaus Unger an der Universität Mainz. 2008 wechselte er zur Merck KGaA in Darmstadt und beschäftigte sich fortan u. a. mit monolithischen Säulen. Egidijus Machtejevas schrieb mehr als 20 Publikationen und 10 Buchkapitel. Seine Forschungsschwerpunkte in den letzten Jahren waren multidimensionale Trennungen, Proteomics und Entwicklung von monolithischen Materialien.



## Beitragsautoren

***Stefan Bieber***

AFIN-TS GmbH  
Am Mittleren Moos 48  
86167 Augsburg  
Deutschland

***Oliver Genz***

Bioprocess Chromatography  
Consulting  
In den Schliermatten 19  
79219 Staufen im Breisgau  
Deutschland

***Hans-Joachim Kuss***

Neubibergerstr. 54  
85640 Putzbrunn  
Deutschland

***Stavros Kromidas***

Breslauer Str. 3  
66440 Blieskastel  
Deutschland

***Thomas Letzel***

TU München  
LS Siedlungswasserwirtschaft  
Am Coulombwall 3  
85748 Garching  
Deutschland

***Egidijus Machtejevas***

Merck KGaA  
Frankfurter Str. 250, D042/208  
64293 Darmstadt  
Deutschland

***Markus Martin***

Thermo Fisher Scientific  
Dornierstraße 4  
82110 Germering  
Deutschland

***Frank Steiner***

Thermo Fisher Scientific  
Dornierstr. 4  
82110 Germering  
Deutschland

***Joachim Weiß***

Thermo Fisher Scientific  
Im Steingrund 4–6  
63303 Dreieich  
Deutschland



## Teil 1

### Die Grundsätze der Gradientenelution



# 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 unbekanntem 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.

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

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

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

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

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

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,
$t_{Rl}$	Retentionszeit des letzten Peaks,