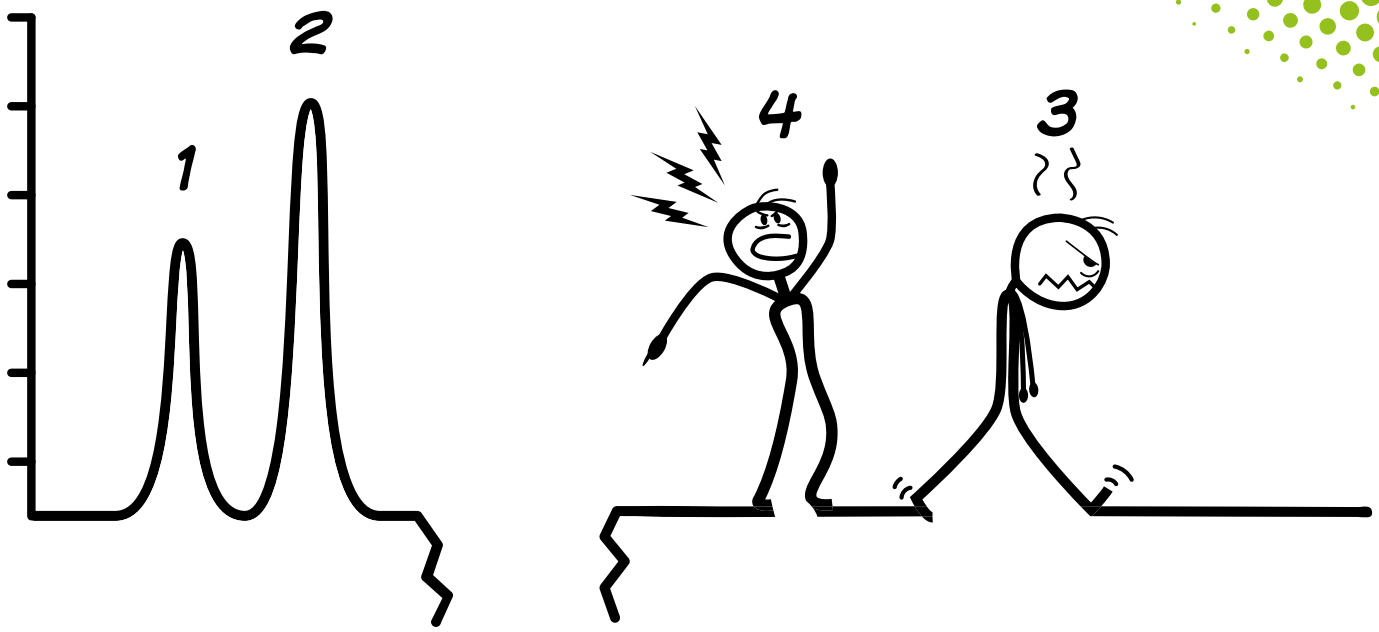
Wenn Retentionszeiten spazieren gehen

Stabile mobile Phase ohne Gradientensteuerung?
Einfache Lösungen für ein komplexes Problem.



Die Mischung macht's!

Wer seine HPLC oder UHPLC mit **Lösungsmittelgemischen** fährt, steht früher oder später vor dem Problem der **Verdunstung**. Das Mischungsverhältnis beeinflusst die Auflösung des Analyten, Trennleistung und Selektivität. Verdunstung ändert die Mischung, und Ihre Retentionszeiten machen einen kleinen „Spaziergang" durch das Chromatogramm. Manchmal auch einen großen, je nach Auflösung Ihrer Zeitachse.

Damit Ihre Peaks beim Durchzählen auch dort stehen, wo sie sollen, wurden **Gradientensysteme** erfunden. Die Gradientensteuerung passt während des Laufs kontinuierlich das Mischungsverhältnis des Lösungsmittelgemischs an, um die Trennung und Auflösung zu optimieren.

Herausforderungen der Gradientenmethode

Allerdings birgt diese Errungenschaft auch einige Risiken, und die Entscheidung über „kann" oder „muss" eines Gradientensystems will wohl überlegt sein.

Hoher Aufwand: Gradientensysteme erfordern umfangreiche **Kalibrierung** und Optimierung, um die beste **Mischkurve** zu finden - und konsequente Überwachung, wenn man sie einmal gefunden hat. Das erhöht den technischen und zeitlichen Aufwand.

Kontamination und Reinigung: Gradientenwechsel können zu **Schichtbildung** im System führen. Die Folgen sind Verunreinigungen und eine aufwändige Säuberung.

Kosten: Gradientensysteme sind in der Anschaffung und im Betrieb wesentlich **teurer**, da spezielle Pumpen, Mischer, Detektoren und komplexe Steuerungssoftware benötigt werden.

Retentionszeit-Variabilität: Die Anpassung des Mischungsverhältnisses bietet zwar einiges an Flexibilität, um die Auflösung zu optimieren - jedoch bedeutet diese Flexibilität auch Varianzen in den Retentionszeiten selbst. Besonders die Vergleichbarkeit von Analysenergebnissen wird dadurch erschwert.

Der Glücksfaktor

Nehmen wir mal an, wir hätten all diese Faktoren unter Kontrolle, und Kosten spielten keine Rolle. Das alles setzt voraus, dass um unser Lösungsmittel herum **permanent absolut identische Bedingungen** herrschen. Wer sich schon einmal zu 100% auf die Wettervorhersage verlassen hat, weiß: das geht nicht immer gut.

Beim Wetter dürfen wir gelegentlich auf das Glück hoffen. Werden wir einmal nass, ist es auch kein Weltuntergang. Wer jedoch Verantwortung in der Analytik trägt, sollte niemals auf den Glücksfaktor setzen.

Ein Experiment: Geht es auch ohne Gradientenkontrolle?

Da es in der HPLC oft um **organische** Verbindungen geht, haben wir für unseren Test das Verhalten einiger PAKs **(polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe)** unter die Lupe genommen. Ziel war es, herauszufinden, ob und wie sich ein Methanol-Wasser-Gemisch als Lösungsmittel auf die Analyse auswirkt, wenn es einige Zeit lang „sich selbst überlassen" bleibt.

Rahmenbedingungen

Für unseren Test haben wir folgende HPLC-Konfiguration gewählt:

HPLC-System: VWR HITACHI LaChrom Elite® mit Diodenarraydetektor. Isokratische Pumpenbedingungen mit vorgemischter mobiler Phase. Steuerungssoftware: EZChrom Elite™.

HPLC-Säule: Purospher® RP-18e (5 µ), 125 x 4 mm.

Prozedur

1. Vier Flaschen (A bis D) wurden mit der **identischen** Methanol-Wasser-Mischung (80/20) als Lösungsmittel befüllt.

2. Zu Beginn wurde mit der Mischung aus Flasche A ein Referenzchromatogramm mit Proben der drei PAKs **Chrysen, Naphthalin und Pyren** aufgenommen.

3. Sofort danach wurde Flasche A als **Referenzmischung** komplett **verschlossen**. Verwendet wurde die mitgelieferte GL45-Schraubkappe mit PTFE-Dichtung.

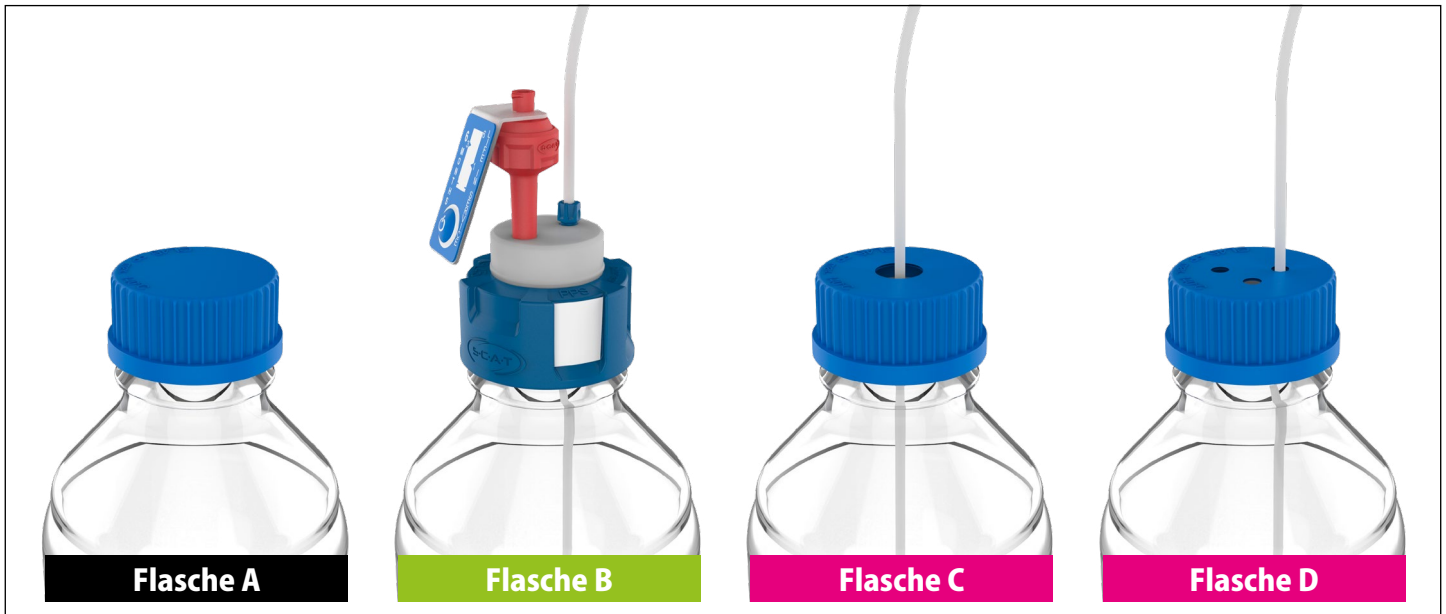
4. Alle Flaschen wurden gewogen, um Masseveränderungen nachverfolgen zu können.

5. Flasche B, C und D wurden auf **unterschiedliche Weise** mittels Kapillare an die HPLC angeschlossen (Durchmesser außen: 3.2mm, innen: 1.6 mm). Dabei wurde nur bei Flasche B ein **hermetisch geschlossenes System** (SCAT Safety Caps) verwendet. Die übrigen Flaschen wurden mit **herkömmlichen** Methoden verschlossen (siehe Abb. 1).

6. Die Flaschen blieben für **31 Tage** unter Laborbedingungen bei Raumtemperatur (22°C) an die HPLC angeschlossen. Ausgenommen Flasche A, die als Referenzmischung permanent verschlossen blieb.

7. Nach 31 Tagen wurden die Flaschen erneut gewogen, und die Trennung der drei PAKs unter **identischen HPLC-Bedingungen** wiederholt, mit Verwendung der mobilen Phasen aus den Flaschen B, C und D.

Abb. 1: *Setup der Lösungsmittelflaschen im Test*

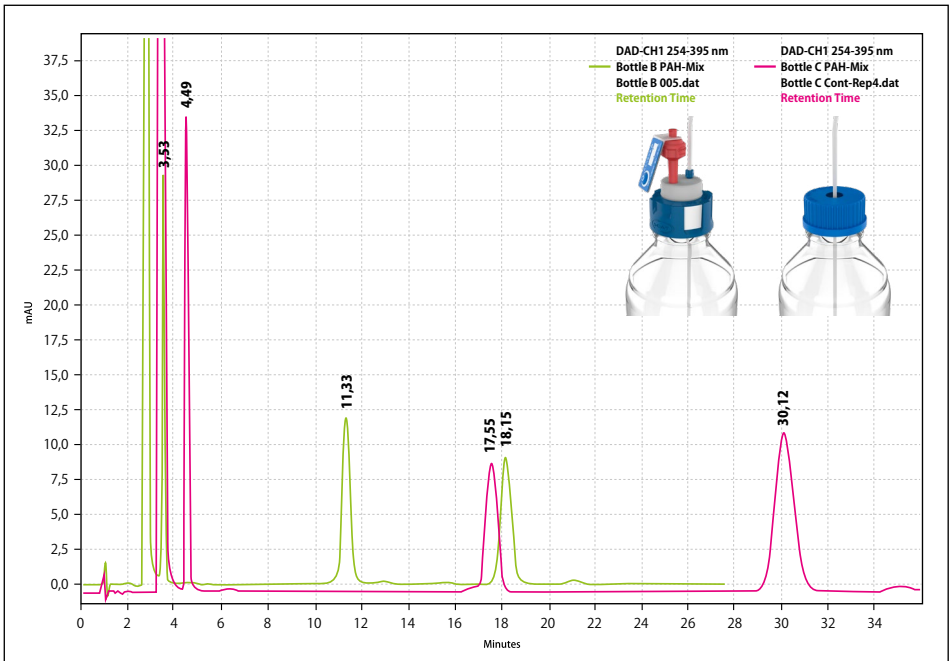


Flasche A wurde als **Referenzmischung** nach Aufnahme des Referenzchromatogramms zu Beginn des Versuchs komplett verschlossen.

Flasche B wurde mit einer SCAT Safety Cap **hermetisch verschlossen**. Luftdichte Kapillarverbindung und Belüftungsventil zum Druckausgleich.

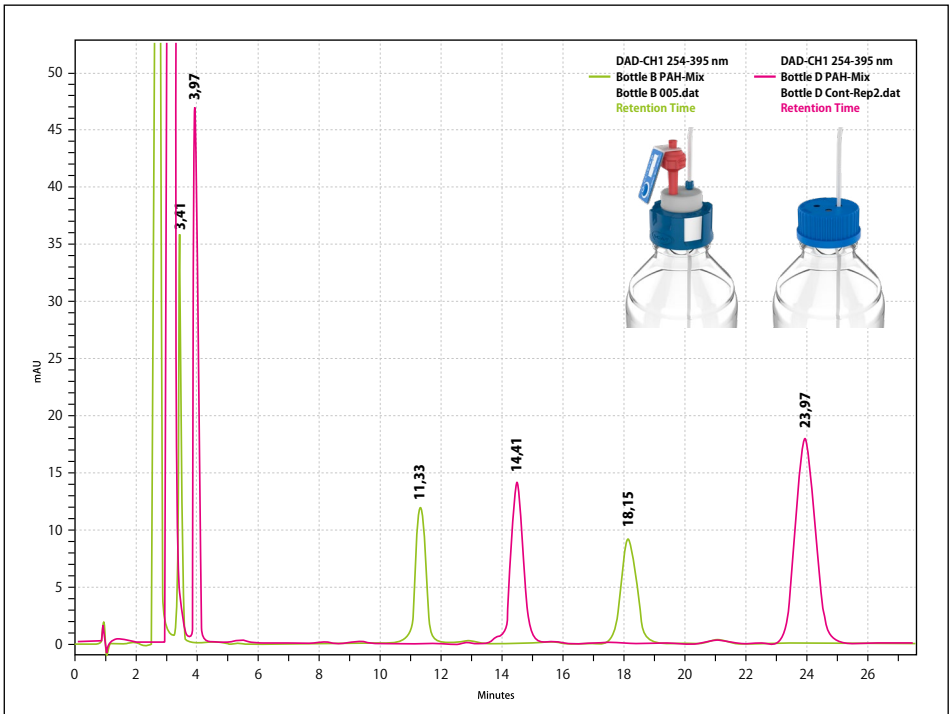
Bei Flasche C wurde die Kapillare durch eine normale **Bohrung** (10 mm) in einer Standard-Verschlusskappe geführt. Es entstand ein offener Bereich von ca. 0,785 cm^2.

Bei Flasche D wurden **3 Bohrungen** (je 3,2 mm) vorgenommen. Durch Bohrung 1 wurde die Anschlusskapillare geführt. Bohrungen 2 und 3 blieben offen. Es entstand ein offener Bereich von ca. 0,212 cm^2.



Tag 31	Napthalin	Pyren	Chrysen
Referenz / Flasche B	3,530	11,330	18,150
Flasche C	4,490	17,550	30,120
Änderung (min.)	**+ 0,960**	**+ 6,220**	**+ 11,970**
Interpoliert: Änderung pro Tag (Minute)	**+ 0,031**	**+ 0,201**	**+ 0,386**

Abb. 2: *Retentionszeitenverschiebung mit Eluent aus Flasche C nach 31 Tagen*



Tag 31	Napthalin	Pyren	Chrysen
Referenz / Flasche B	3,410	11,330	18,150
Flasche D	3,970	14,410	23,970
Änderung (Minute)	**+ 0,560**	**+ 3,080**	**+ 5,820**
Interpoliert: Änderung pro Tag (Minute)	**+ 0,018**	**+ 0,099**	**+ 0,188**

Abb. 3: *Retentionszeitenverschiebung mit Eluent aus Flasche D nach 31 Tagen*

Ergebnisse

Massenveränderungen (Tabelle 1)

1. Flaschen A (Referenz-Eluent) und B (mit SCAT Safety Cap) zeigten **keine signifikanten Massenveränderungen**.

2. Bei Flaschen C und D trat ein **signifikanter Massen-/Flüssigkeitsverlust** auf. Da Flüssigkeit weder entnommen noch hinzugefügt wurde, ist dieser Verlust auf **Verdunstung** zurückzuführen, wobei der Lösungsmittelanteil der Gemische erfahrungsgemäß schneller verdunstet als der wässrige. Das Verhältnis von Wasser und Methanol im Dampf variierte möglicherweise über den Testzeitraum, da Mischungen aus Wasser und Methanol Azeotrope bilden.

	Massenveränderungen (g)			
	A	**B**	**C**	**D**
Tag 1	457,45	539,26	724,14	715,08
Tag 31	457,43	539,26	672,45	687,36
+/- (g)	**- 0,02**	**0,00**	**- 51,69**	**- 27,72**
+/- (%)	**- 0,004**	**0,000**	**- 7,138**	**- 3,876**

Tabelle 1: *Massenveränderungen*

Veränderung der Retentionszeiten (Abb. 2 und 3)

1. Der Eluent aus Flasche B (mit SCAT Safety Cap) führt im Vergleich zum Referenzchromatogramm zu annähernd **identischen** Retentionszeiten der PAK-Testverbindungen **ohne** signifikante Verschiebungen.

2. Der Eluent aus den Flaschen C und D liefert eine **deutliche Verschiebung** bzw. Erhöhung der Retentionszeiten im Vergleich zum Referenzchromatogramm. Eine rein retentionszeitenbasierte Identifikation der Verbindungen wäre in diesem Fall **unmöglich**.

Bei Annahme eines **linearen** Verlaufs der Verdunstung der mobilen Phase wird deutlich, dass sogar nach **eintägiger** Verwendung von teilweise offenen Flaschen mit **Änderungen der Retentionszeit** zu rechnen ist.

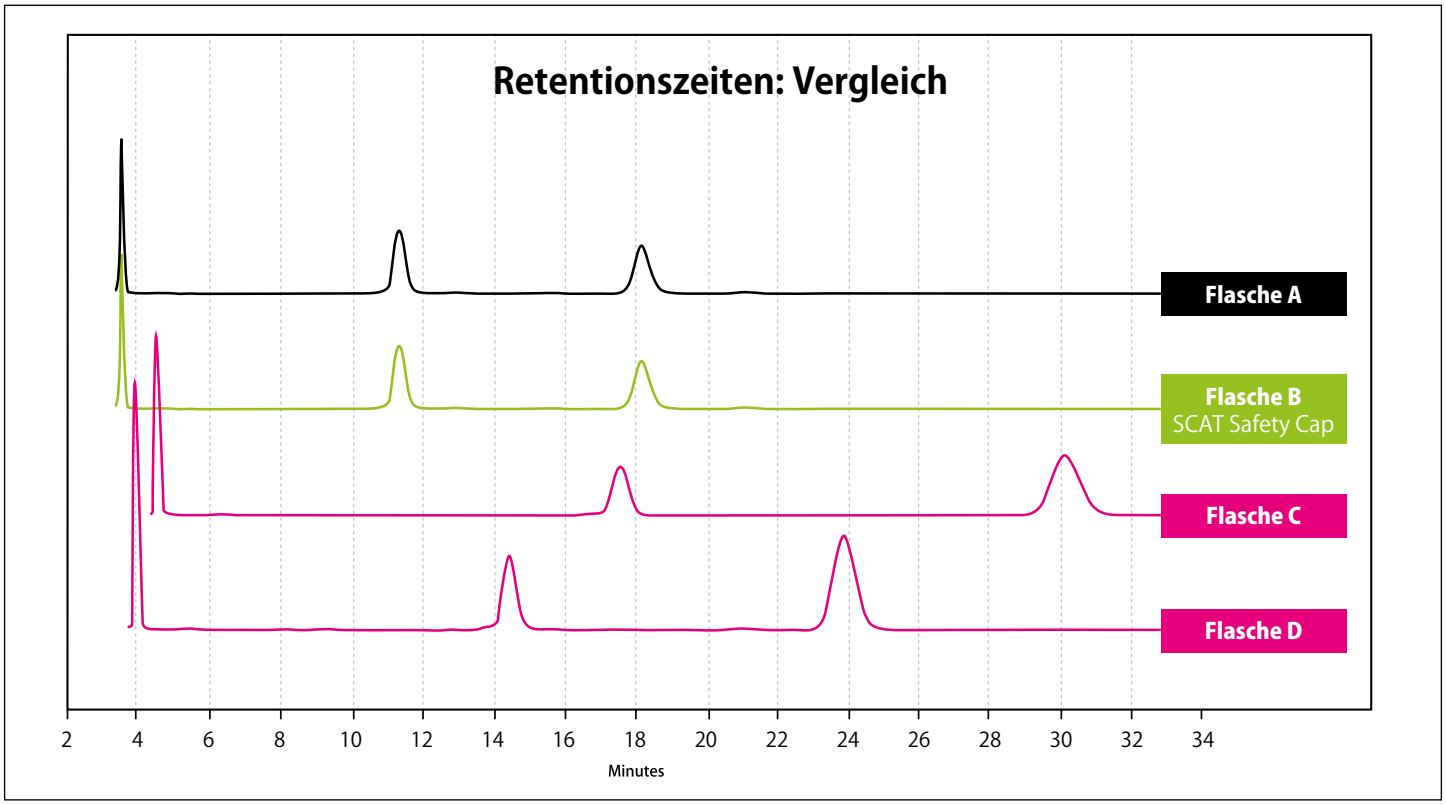


Abb. 4: *Vergleich aller Retentionszeiten nach 31 Tagen*

Vorteile hermetisch verschlossener Eluenten

Reproduzierbarkeit und Konstanz: Ein hermetisch verschlossener Eluent verhindert Verdunstung und gewährleistet damit konsistente Mischungsverhältnisse. Dadurch bleiben die Retentionszeiten über verschiedene Analysen hinweg konstant und die Ergebnisse sind reproduzierbarer.

Stabilität: Änderungen der Umgebungsbedingungen, wie Temperatur und Druck, haben keinen Einfluss auf das Mischungsverhältnis, was insgesamt zu stabileren Analysen führt.

Geringere Komplexität der Methode: Ein fester Eluent erfordert weniger technische Einrichtung, Kalibrierung und Wartung im Vergleich zu Gradientensystemen.

Reduzierte Probenvorbereitung: Durch die konstanten Retentionszeiten entfällt die Notwendigkeit, diese für jede Analyse neu zu bestimmen, was Zeit und Aufwand spart.

Bessere Vergleichbarkeit: Die konsistenten Retentionszeiten erleichtern den Vergleich von Ergebnissen über verschiedene Zeitpunkte hinweg, was in Langzeitstudien oder Qualitätskontrollen besonders wichtig ist.

Ausnahmen

Es kann natürlich vorkommen, dass Sie **in jedem Fall** eine Gradientensteuerung für Ihre Analytik benötigen. Zum Beispiel dann, wenn **andere Faktoren** als der Eluent das Verhalten Ihrer Probe im Analysenverlauf beeinflussen. Die Wechselwirkung zwischen dem Analyten und der Säule hängt schließlich von sehr vielen Bedingungen ab.

Ein hermetisch verschlossener Eluent erspart Ihnen jedoch viele Überlegungen, und **entlastet** Ihre Gradientensteuerung um einen **kritischen Faktor.** So bleibt mehr Zeit für eine perfekte Anpassung der anderen Parameter Ihrer Methode.

Fazit

Um es kurz zu machen: ja, eine stabile mobile Phase erreicht man auch **ohne** Gradientenkontrolle, mit wesentlich **geringerem Aufwand** und **niedrigeren Kosten**.

Während Gradientensysteme die Flexibilität bieten, das Mischungsverhältnis an die Probe anzupassen, haben **hermetisch verschlossene** Eluenten klare Vorteile hinsichtlich Reproduzierbarkeit, Stabilität und geringerem Aufwand. Insbesondere in Labors, die auf hohe **Präzision** und **Reproduzierbarkeit** angewiesen sind, führt die Verwendung eines festen Eluenten zu genaueren und verlässlicheren Ergebnissen.

Autor. Jan Rittgasser
Lab Safety Specialist
SCAT Europe GmbH