

## Eine bessere Auflösung erreichen

DR. DANIELA HELD, PSS

**Problemstellung** In der GPC/SEC werden oftmals Proben mit einer breiten Molmassenverteilung untersucht, die zum Teil multimodal vorliegen und zudem noch Zusatzpeaks, zum Beispiel von Additiven, zeigen.

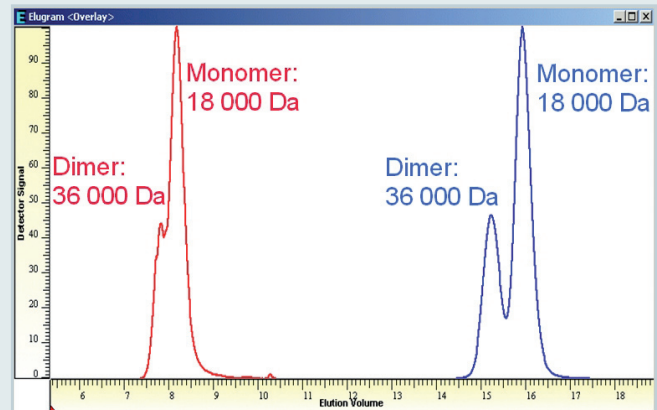
**Frage** Wie kann man die Auflösung verbessern und Peaks besser voneinander separieren?

**Antwort** Anders als in der HPLC kann der Anwender in der GPC/SEC die Auflösung durch Wählen der Chromatographie-Bedingungen nur wenig beeinflussen. Es gibt zum Beispiel keinen Gradienten, der angepasst werden kann, um so eine bessere Trennung zu erreichen. Die Auflösung in der GPC/SEC wird zum größten Teil durch die Steigung der Kalibrationskurve bestimmt. Eine gute Auflösung erreicht man, wenn die Steigung der Kalibrationskurve möglichst flach ist. Für diesen Molmassenbereich erhält der Anwender dann ein hohes zugängliches Porenvolumen.

Die Steigung der Kalibrationskurve kann durch den Einsatz einer zusätzlichen Säule beeinflusst werden, die das gleiche Material, dieselbe Partikelgröße und dieselbe Porosität besitzt. Abbildung 1 zeigt dies am Beispiel der Trennung eines Proteinmonomeren von dessen Dimeren. Auf zwei Trennsäulen ist die Trennung deutlich besser als auf einer Säule. Eine weitere Verbesserung kann man durch Hinzufügen einer dritten Säule erreichen. Die Verbesserung der Auflösung korreliert dabei mit der Wurzel der Länge, das bedeutet, dass eine Verdoppelung der Trennstrecke die Auflösung um den Faktor 1,4 verbessert. Um eine Verdoppelung der Auflösung zu erreichen, muss man zu einer Trennsäule drei weitere hinzufügen.

Bei diesem Ansatz sind natürlich auch Grenzen gesetzt, da mit der Anzahl der Trennsäulen Analysenzeit und Lösungsmittelverbrauch ebenso ansteigen wie der Druck. Typische GPC/SEC-Säulenkombinationen bestehen daher aus zwei bis vier analytischen Trennsäulen zu einer Vorsäule. Für wenige Anwendungen gibt es auch Verfahren mit fünf Trennsäulen, bei denen gegebenenfalls aber die Flussrate angepasst wird, um den Druck zu verringern.

Eine begrenzte Verbesserung der Auflösung ist auch erreichbar, indem man die Flussrate herabsetzt. Dieser Effekt ist bei hochmolekularen Proben ausgeprägter als bei niedermolekularen.



**1** Vergleich der Trennung eines Proteinmonomeren vom Dimeren auf einer (rot) bzw. zwei (blau) PSS Suprema 5 µm 100 Å-Säulen (8 x 300 mm).

GPC/SEC-Säulenkombinationen werden auch eingesetzt, um den Molmassentrennbereich zu erweitern. Hier kombiniert man dann Säulen des gleichen Materials und derselben Partikelgröße mit unterschiedlichen Porositäten. Allerdings muss der Anwender darauf achten, die Säulen so zu kombinieren, dass kein Säulen-Mismatch auftritt. Am besten setzt man die vom Hersteller empfohlene Säulenkombinationen ein.

### Fazit

- Die Auflösung in der GPC/SEC wird durch die Steigung der Kalibrationskurve bestimmt.
- Eine Verbesserung der Auflösung kann durch die Kombination von Säulen mit derselben Porosität erreicht werden.
- Eine Vergrößerung des Molmassen-Trennbereichs kann durch die Kombination von Säulen unterschiedlicher Porosität erzielt werden.
- Die Gefahr des Säulenmismatches wird durch die Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Säulenkombinationen minimiert.

Alle bisher erschienenen Tipps&Tricks finden Sie online unter [www.laborpraxis.de/tippsandtricks](http://www.laborpraxis.de/tippsandtricks).

+49 (0) 61 31 / 9 62 39 - 0

Thema der nächsten Ausgabe: Wie erkennt man Systempeaks?