

# Äquilibration – *So viel wie nötig, so wenig wie möglich*

Beim Äquilibrieren und Spülen einer Säule kommt häufig folgende Frage auf: Wie lange muss die Säule gespült werden? Ist die (Re-)Äquilibrationsdauer zu kurz, riskiert man nicht reproduzierbare Ergebnisse z.B. durch Retentionszeitverschiebung. Im Zweifel gilt es, besser längere Spülzeiten anzuwenden. Spült man jedoch länger als nötig, werden Zeit und vor allem bei präparativen Ansätzen auch Lösemittel verschwendet.

## Ein Praxisbeispiel

Eine YMC-Triart C8-Säule (TO12S03-1546WT, Säulenvolumen 2,5 mL) wurde vor jedem Testzyklus mit 50 mL Acetonitril gespült. Ein Pflanzenextrakt wurde unter vier Bedingungen injiziert:

- ohne Äquilibration
- Äquilibration mit einfachem Säulenvolumen
- Äquilibration mit 5 Säulenvolumina
- Äquilibration mit 10 Säulenvolumina

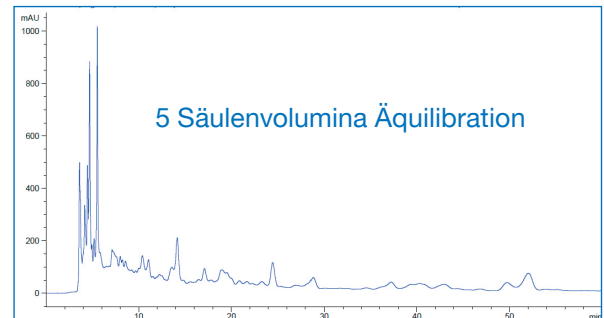
Die Äquilibration und isokratische Trennung erfolgte mit dem Eluenten: Wasser/Acetonitril (80/20).

Das Verweilvolumen der Anlage betrug 130 µL.

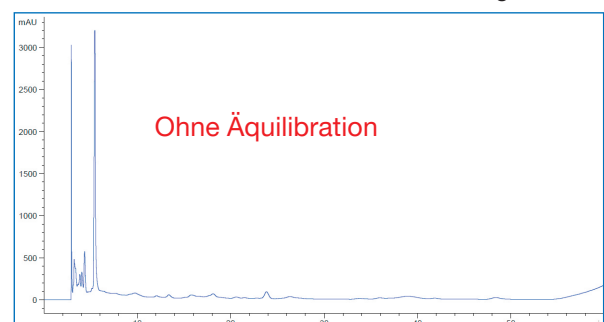
## Ergebnis

Es ist deutlich zu erkennen, dass ohne ausreichende Äquilibration die Retention deutlich zu kürzeren Zeiten verschoben ist. Äquilibriert man mit 5 oder 10 Säulenvolumina, sind die Ergebnisse dieser Applikation reproduzierbar. Eine Äquilibration mit 5 Säulenvolumina ist am effektivsten.

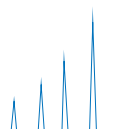
1. So sieht die Anwendung aus:



2. Bei unzureichender Äquilibration kommt es zur Retentionszeitverschiebung:



3. Hier wurde ausreichend ääquilibriert, aber länger als notwendig:



Wie kann eine optimale Äquilibrationsdauer abgeschätzt werden?

## Mit Hilfe des Säulenvolumens!

### Berechnung des Säulenvolumens:

$$\text{Geometrisches Säulenvolumen [mL]} = \text{Länge [cm]} \times (\text{Radius [cm]})^2 \times \pi$$

#### Beispiel:

Säule: YMC-Triart C18; TA12S03-2546WT  
 Säulendimension: 250 mm Länge; 4,6 mm Innendurchmesser  
 Säulenvolumen =  $25 \text{ cm} \times (0,23 \text{ cm})^2 \times 3,14$   
 = 4,2 mL

Und sonst?

#### Verweilvolumen

- Volumen des Systems bevor das Lösungsmittel die Säule erreicht
- systemabhängig\*

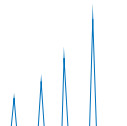
Wie kann die Äquilibrationsdauer verkürzt werden?

Während der Äquilibration die Flussrate erhöhen – umso schneller ist das notwendige Volumen erreicht. Hier muss die Drucklimitierung von Hardware und stationärer Phase berücksichtigt werden\*.

### Übersicht über geometrische Säulenvolumina [mL] für ausgewählte Dimensionen:

L [mm] \ Ø [mm]	50	75	100	150	250	300
2,0	0,2	0,2	0,3	0,5	0,8	0,9
3,0	0,4	0,5	0,7	1,1	1,8	2,1
4,6	0,8	1,2	1,7	2,5	4,2	5,0
6,0	1,4	2,1	2,8	4,2	7,1	8,5
8,0	2,5	3,8	5,0	7,5	12,6	15,1
10,0	3,9	5,9	7,9	11,8	19,6	23,6
20,0	15,7	23,6	31,4	47,1	78,5	94,2
30,0	35,3	53,0	70,7	106,0	176,7	212,1
50,0	98,2	147,3	196,3	294,5	490,9	589,0

\* Fragen Sie hier Ihren Hersteller



Wenn mit ähnlichen Eluenten gearbeitet wird (z.B. 10% ACN auf 90% ACN) sind zehn Säulenvolumina ausreichend. Nach einem Gradientenlauf kann die Äquilibrationsdauer kürzer gewählt werden. Hier wird die prozentuale Änderung von Laufmittel B eingerechnet. Wenn während der Analyse der Anteil von Laufmittel B z. B. von 20 auf 60% erhöht wird, wird folgendes gerechnet:  $10 \text{ Säulenvolumen} \times 0,4$ .

Wenn die Eluenten sehr unterschiedlich sind (z.B. von Methanol auf Acetonitril, Einsatz von Ionenpaarreagenzien) und bei Normalphasen-Anwendungen ist mit mindestens 20 bis 30 Säulenvolumina zu spülen – so auch bei der Reinigung und Regeneration von Säulen. Sollte dennoch keine stabile Basislinie bzw. kein stabiler Rückdruck erreicht werden, muss die Spüldauer erhöht werden.

### Fazit

Das geometrische Säulenvolumen ist ein sehr hilfreiches Mittel zur Abschätzung des notwendigen Lösungsmittel-Volumens für Spül- und Äquilibrationsschritte in der HPLC – eine wichtige Voraussetzung für reproduzierbare und valide Ergebnisse.

