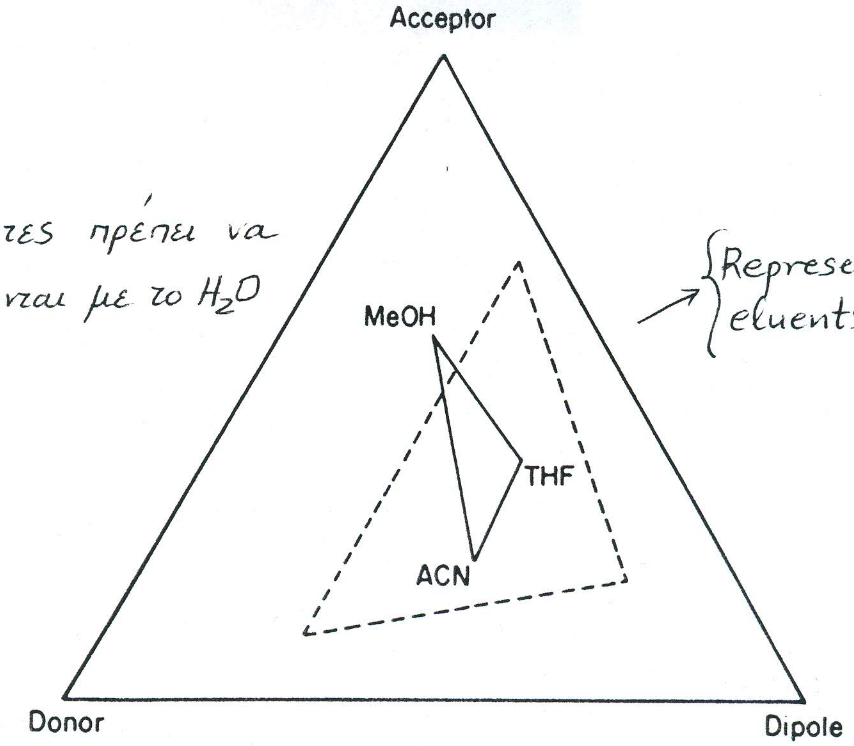
(*) Localization effects are not important
(Επίδραση εντοπισμού είναι αμελητέα)

Problem. — REVERSED PHASE HPLC

A sample mixture with reasonable k' values is eluted with 45% methanol in water, but the resolution is unsatisfactory. What other solvent mixtures should be tested?

→ Οι διαλύτες πρέπει να αναμιγνύονται με το H_2O



→ {Representative eluents

Representatives of selectivity property (dashed line related to adsorption chromatography).

P': προσαρμόζονται
Θεωρ. $P'_{H_2O} = 0$
{ MeOH: 2.6
ACN: 3.2
THF: 4.5

Solution

$$P'_{\text{mixture}} = P'_1\varphi_1 + P'_2\varphi_2$$

$$P'_{\text{mixture}} = P'_{\text{MeOH}} \times \varphi_{\text{MeOH}}(+P'_{\text{water}} \times \varphi_{\text{water}};\ \text{this component is zero})$$
$$= 2.6 \times 0.45$$
$$= 1.17$$

Acetonitrile–water:

$$\varphi_{\text{ACN}} = \frac{P'_{\text{mixture}}}{P'_{\text{ACN}}} = \frac{1.17}{3.2} = 0.37$$
$$= 37\%\ \text{ACN in water}$$

Tetrahydrofuran–water:

$$\varphi_{\text{THF}} = \frac{P'_{\text{mixture}}}{P'_{\text{THF}}} = \frac{1.17}{4.5} = 0.26$$
$$= 26\%\ \text{THF in water}$$

GRADIENT ELUTION

ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ

(ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΗ: το μίγμα των διαλυτών είναι σταθερής συστάσεως, άρα και εκλουστικής ικανότητας)

→ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ: η σύσταση του εκλουστικού μέσου μεταβάλλεται με διάφορους τρόπους

⤳ Επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί

Όμως χρησιμοποιείται μόνο όταν έχουμε πολύπλοκα δείγματα(*) / μεγάλο χρόνο έκλουσης με συστατικά που εκλούονται σε αραιά χρονικά διαστήματα

Οι κύριοι λόγοι είναι: ακριβή οργανολογία, επί πλέον χρόνος που απαιτείται για την επανεξισορρόπηση της στήλης πριν από τη λήψη του επόμενου χρωματογραφήματος, δημιουργία φυσαλλίδων στο σύστημα, όχι πάντοτε καλή ανάμιξη, θορυβώδης γραμμή βάσης κλπ

(*) Εφ' όσον υπάρχει είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση της βέλτιστης κινητής φάσης (αφού αποφεύγεται η ξεχωριστή παρασκευή πολλών αναλογιών κινητής φάσης)

Περιορισμοί βαθμιδωτής έκλουσης

- Απαιτεί οργανολογία με δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης
- Η μεταφορά και επικύρωση μεθόδου πιο προβληματική από ισοκρατική
- Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης
- Η κινητή φάση πρέπει να απαερώνεται on-line γιατί δημιουργούνται φυσαλίδες κατά την ανάμιξη νερού με οργανικό διαλύτη
- Η γραμμή βάσης αλλάζει κατά τη διάρκεια της έκλουσης, όταν χρησιμοποιούνται "modifiers" στην ΚΦ που απορροφούν στο UV

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ

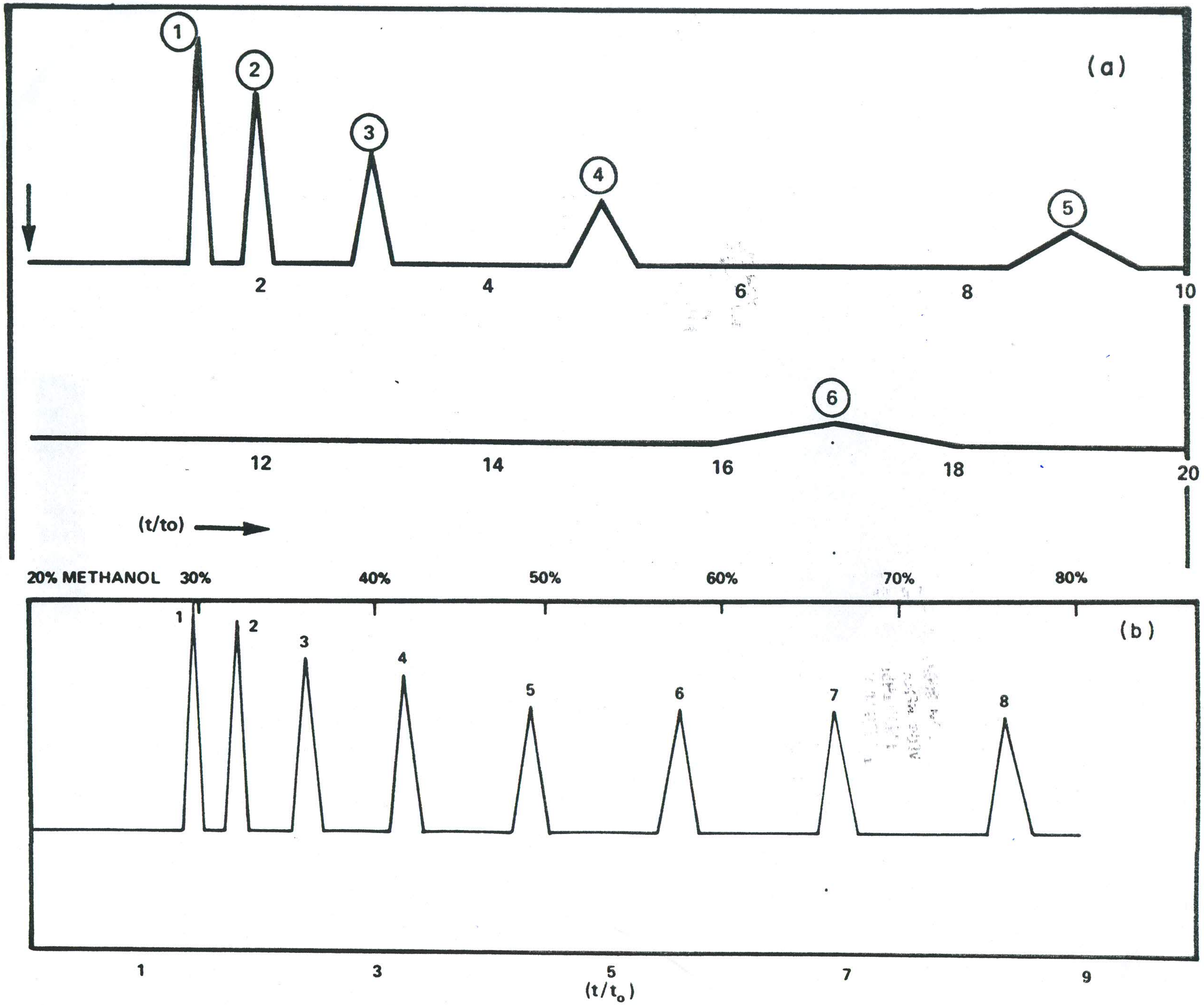
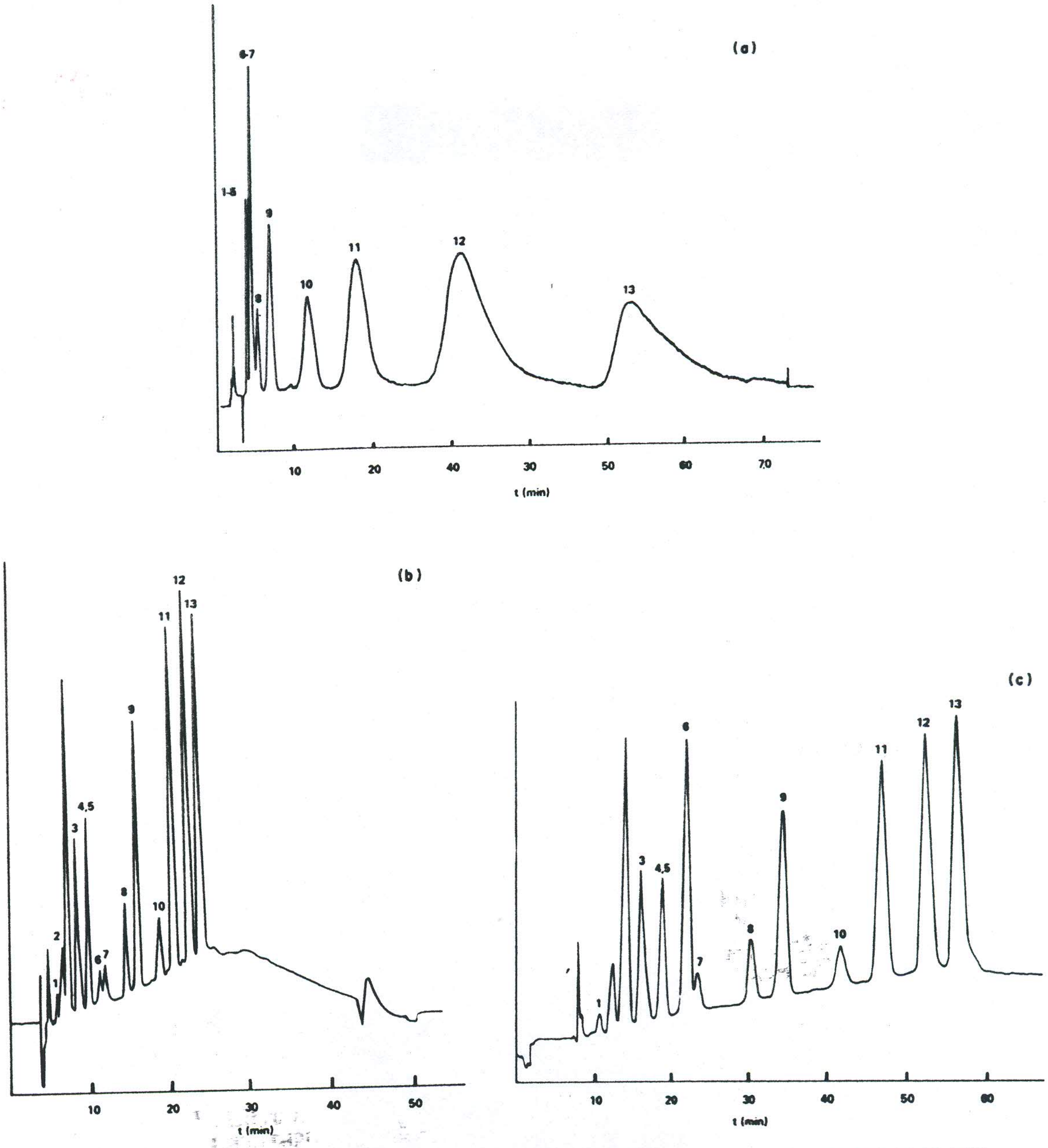


FIG. 5. (a) Calculated isocratic separation of 8-component sample by reverse-phase LC. Conditions: 20 vol% methanol/water mobile phase; N = 1000; k' values for bands #1–8 are 0.5, 1.0, 2.0, . . . , 64. (b) Same as (a), except gradient elution from 20 to 80 vol% methanol/water, with b = 0.2.

23

Παραδείγματα
Ισοκρατικής και Βαθμιδωτής Έκλουσης



(a) Isocratic ion-exchange separation: mobile phase contains 0.055 M $NaNO_3$. (b) By gradient elution: mobile phase gradient from 0.01 to 0.1 M $NaNO_3$ at 5%/min. (c) GE with less steep gradient (2%/min). Separation of carboxylic acid mixture. Bands (acids: 1 *o*-toluic; 2, benzoic; 3, maleic; 4, phthalic; 5, fumaric; 6, terephthalic; 7, isophthalic; 8, 1,2-3-tricarboxybenaene; 9, 1,2,4-tricarboxybenzene; 10, 1,3,5-tricarboxybenzene; 11, 1,2,4,5-tetracarboxybenzene; 12, pentacarboxybenzene; 13, hexacarboxybenezene. Column, Du-Pont SAX Permaphase; mobile phase, 0.01 M borate buffer at pH 9.7 in water; ambient; UV, 254 nm; 5-μl sample, 1% each compound.

TABLE

Some Useful Solvent Pairs for Gradient Elution

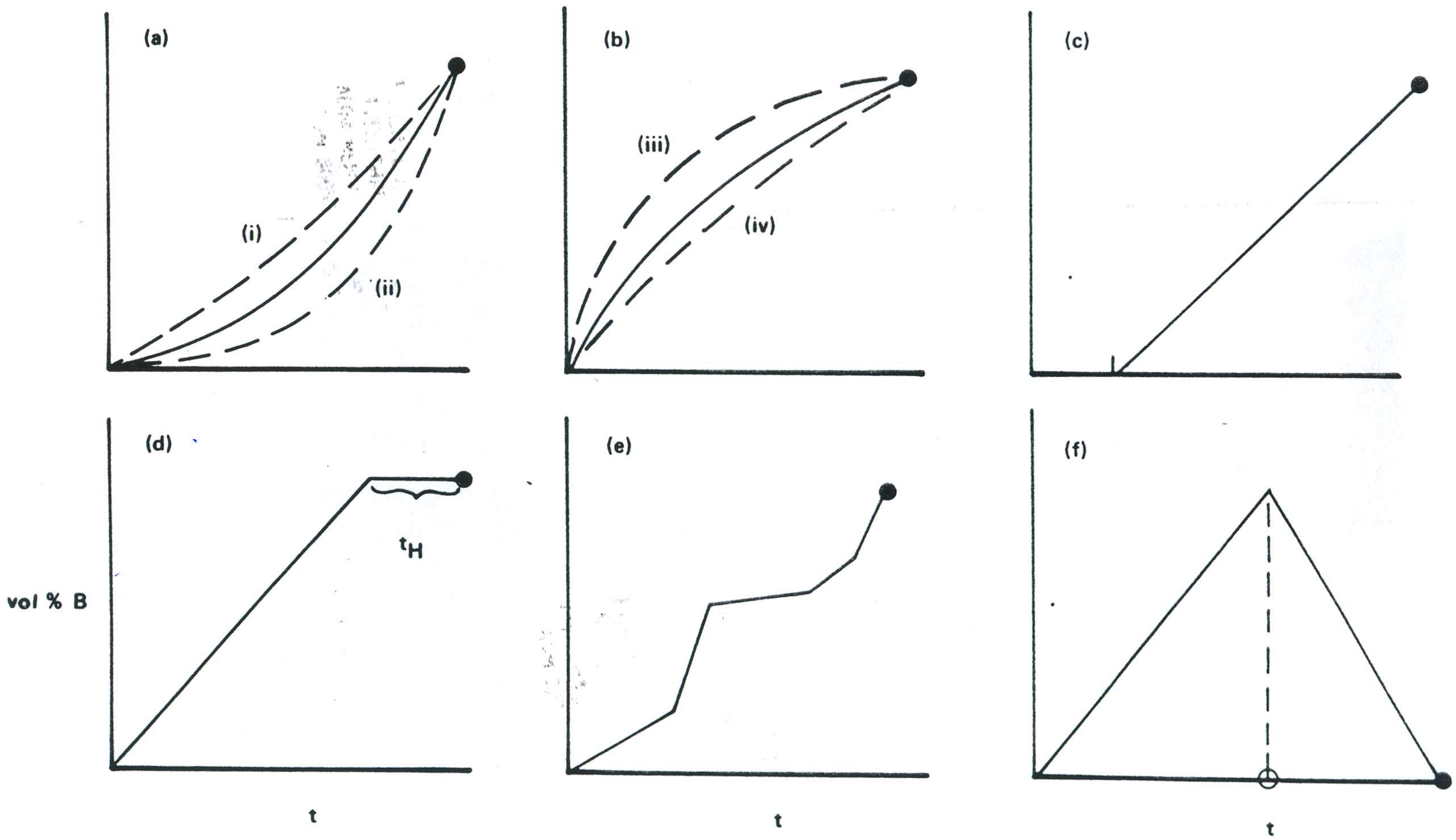
Method	Solvents A	Solvents B	$S_b - S_a$[a]	M_x increases with[b]	t_G/t_0[c]	Gradient shape
Reverse-phase BPC	Water	Methanol	3.0	Increase in sample MW ($M_x > 1$ if MW > 200); also increase in k' for some systems (methanol, THF)	15	Linear
		Acetonitrile	3.0		15	
		Ethanol	3.6		18	
		Tetrahydrofuran (THF)	4.4		22	
	Acetonitrile[d]	THF	1.4		7	
		Ethyl ether	2.5		13	
Normal-phase BPC	Hexane	Ethyl ether	1.1	Same: Increase in sample MW ($M_x > 1$ if MW > 200)	6	Linear
		Trimethyl phosphate	2.5		12	
		Ethanol	1.7		9	
		Methylene chloride	1.2		6	
		Chloroform	1.6		8	
Liquid–solid	Hexane	Isopropyl ether	3.4	Molecular size (except alkyl groups); increasing k'	17	Concave
		Methylene chloride	3.2		16	
		Chloroform	2.6		13	
	1-Chlorobutane	Acetonitrile	3.0		15	
		Methanol	5.0		25	
Ion-exchange	0.005 *M* $NaNO_3$[e]	0.5 *M* $NaNO_3$	2.0	Increasing charge on molecule	10	Concave
Cation-exchange	pH 2	pH 6	4.0	Same	20	Linear
Anion-exchange	pH 8	pH 2	6.0	Same	30	Linear

BPC = Bonded Phase Chromatography

[a] For typical samples [$M_x = 1$ in Eq. (13a)].
[b] Equation (13a).
[c] Gradient steepness optimized for $b = 0.2$.
[d] So-called nonaqueous reverse-phase system.
[e] Or any univalent salt.

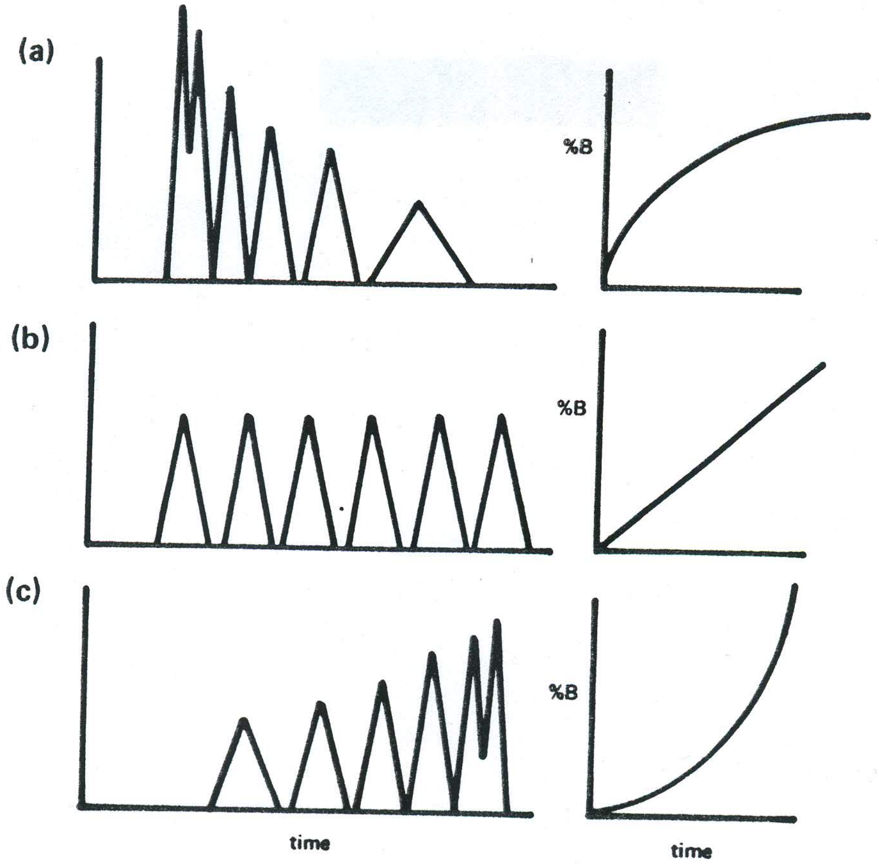
b: gradient steepness parameter

ΤΥΠΟΙ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ

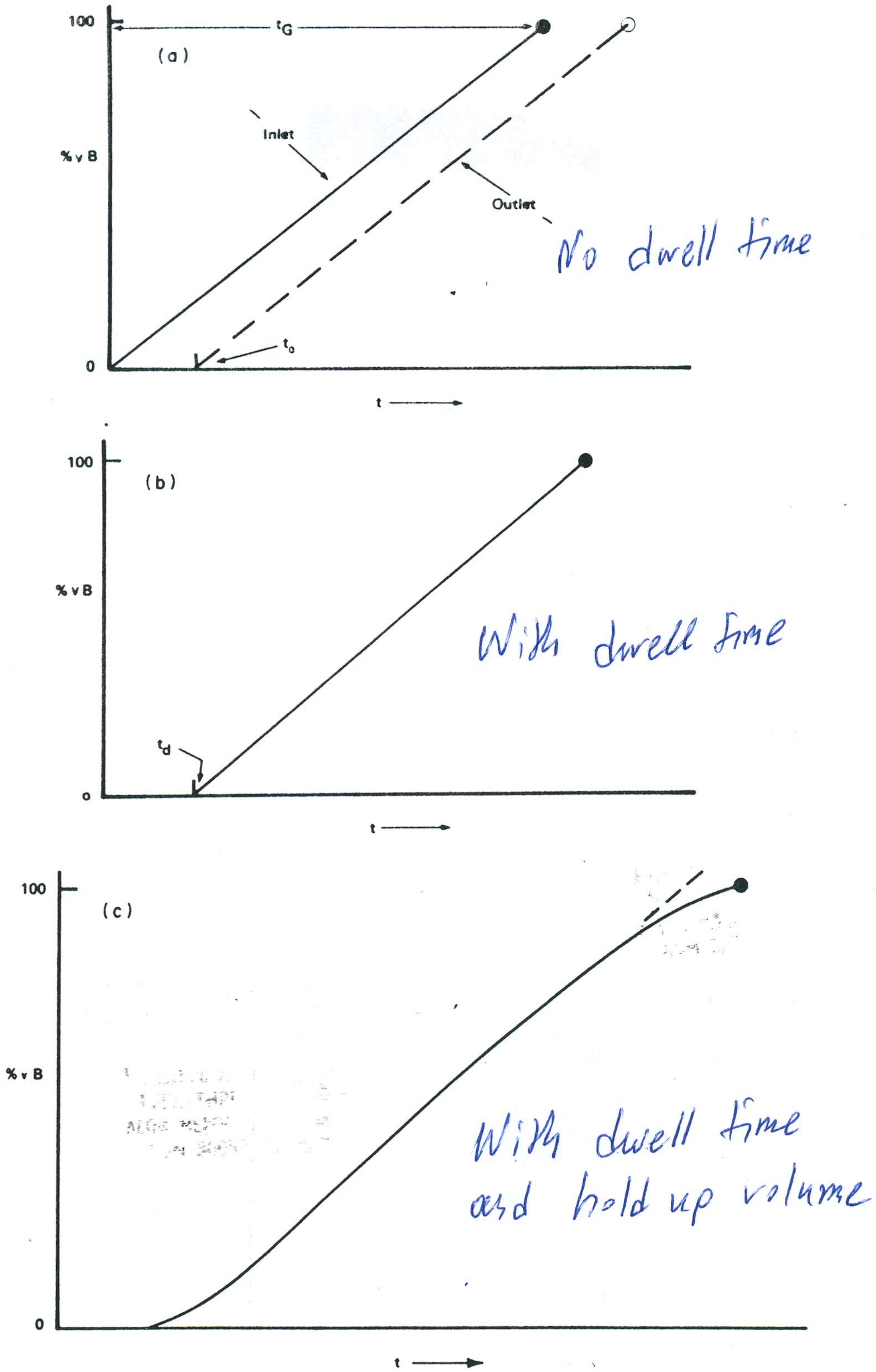


Gradients of various shapes (see text).

Σχήμα βαθμιδωτής έκλουσης

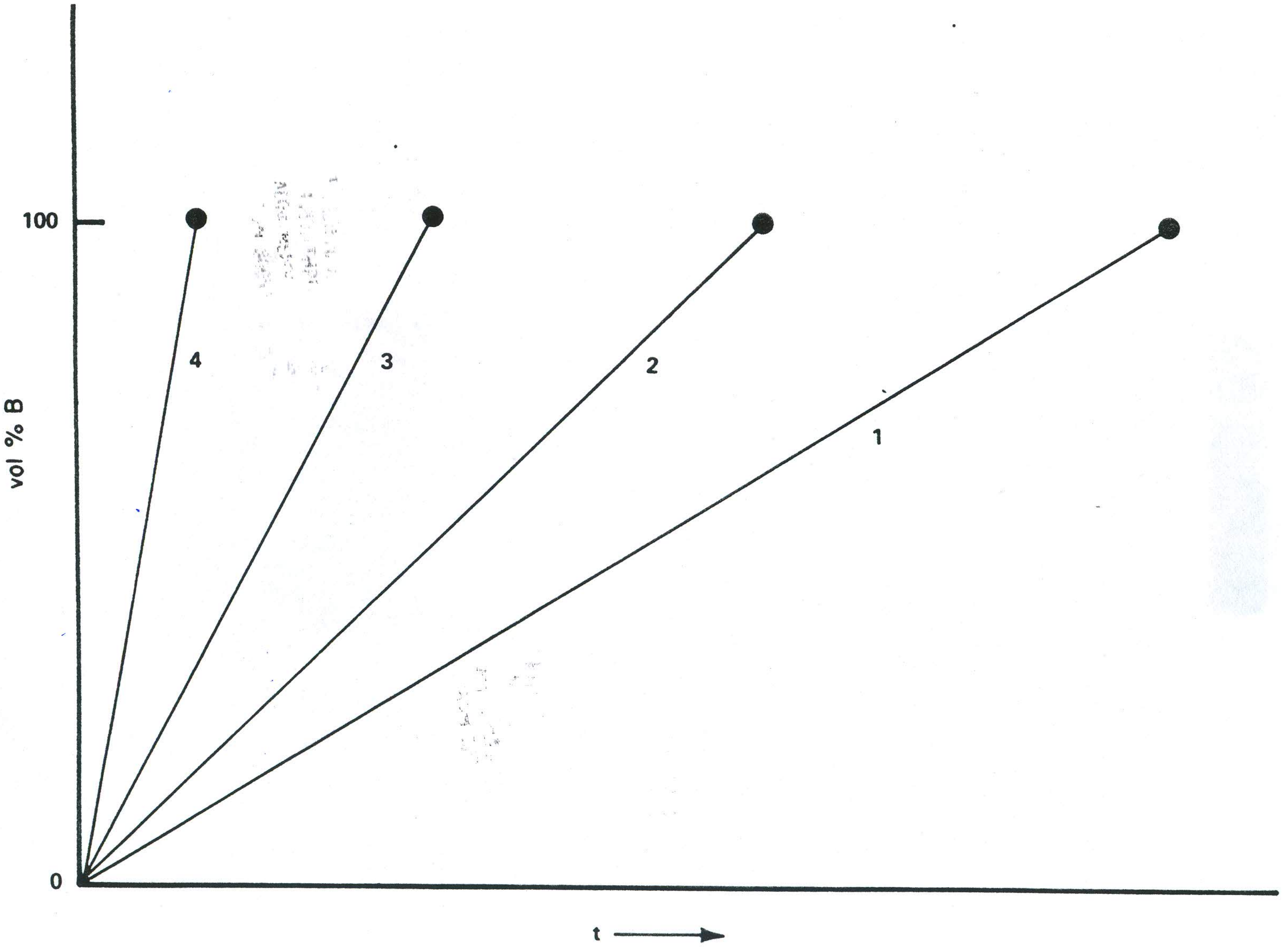


Γραμμική Βαθμιδωτή Εκλουση



Hypothetical solvent gradient. Linear %B change with time: (a) no dwell time between gradient mixer and column inlet; (b) same as (a), but with dwell time t_d; (c) same as (b), but with rounding of gradient shape owing to holdup volume between gradient mixer and column inlet.

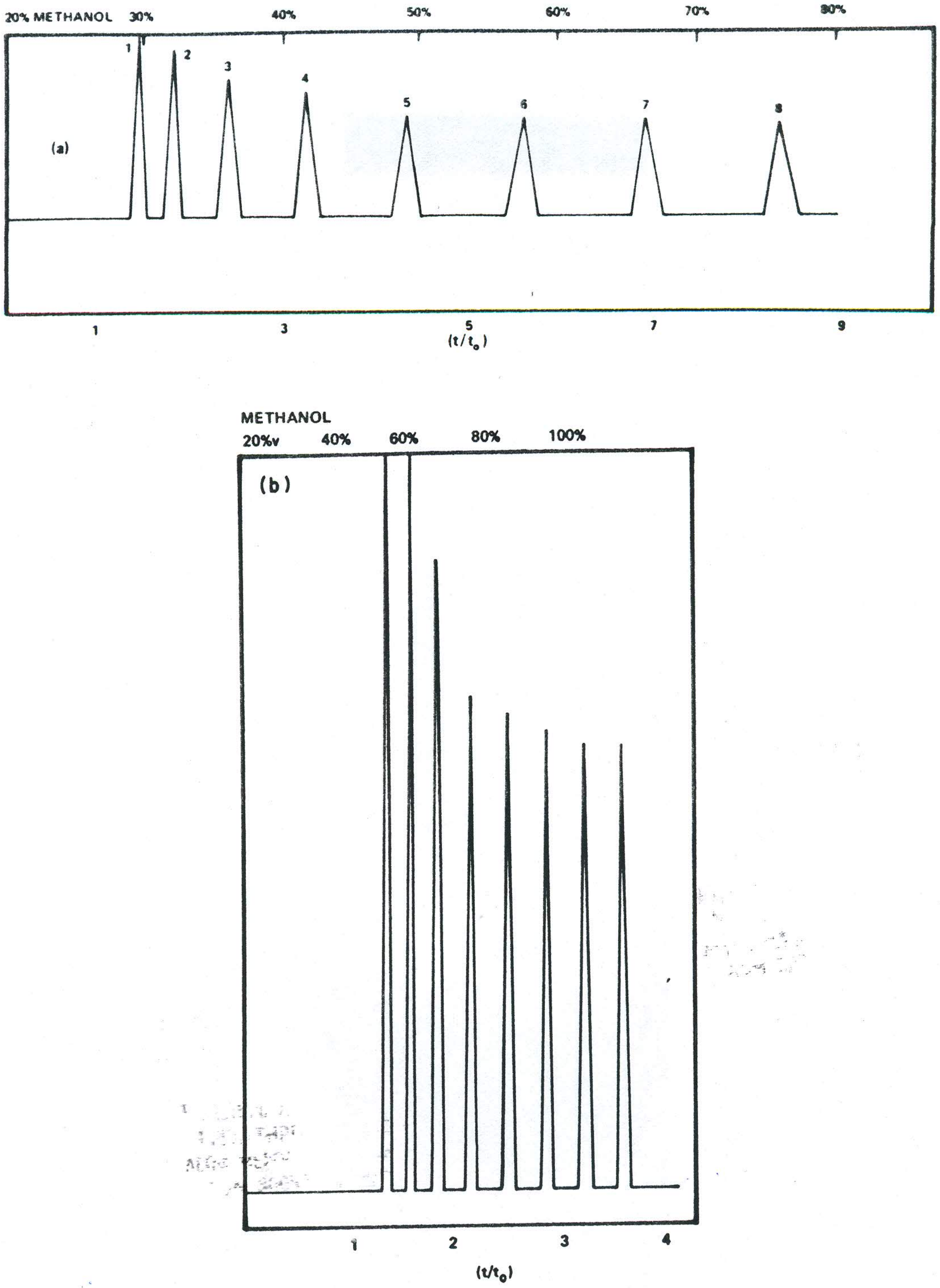
Γραμμική Βαθμιδωτή Έκλουση μεταβαλλόμενης κλίσης



Linear gradients of varying steepness.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ "ΚΛΙΣΗΣ" ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΣΤΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ

Gradient Elution



Effect of gradient steepness on separation in gradient elution (same conditions as for Fig. 12): (a) $b = 0.2$; (b) $b = 0.8$.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΛΙΣΗΣ ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΣΤΟ ΥΨΟΣ ΤΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ

↗ αύξηση

Changes in Resolution and Peak Height with Change in Gradient Steepness[a]

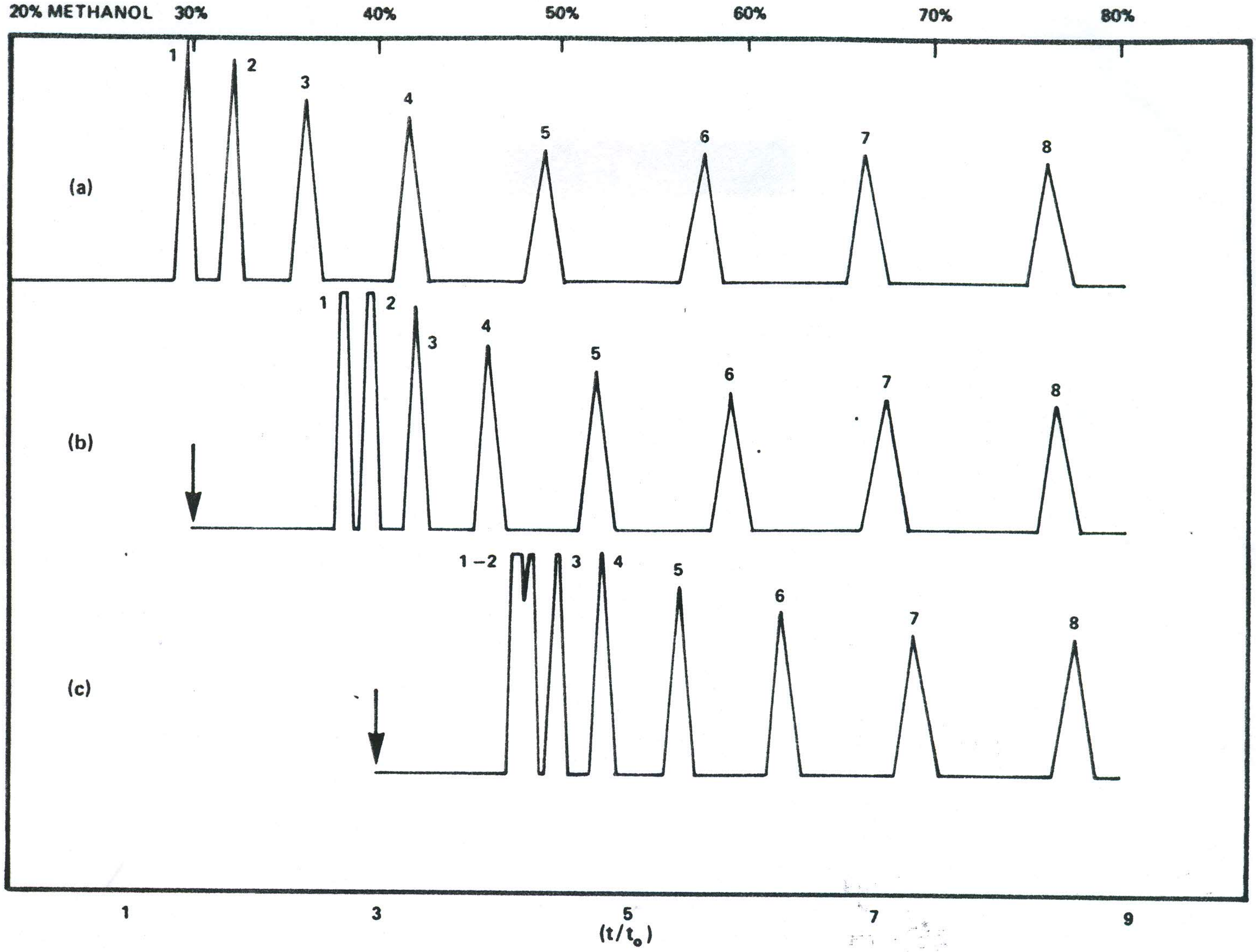
Relative t_G	Relative R_s	Relative peak height
10	1.23	0.1
4	1.19	0.2
2	1.12	0.5
(1)	(1.00)	(1.0)
0.5	0.83	1.5
0.3	0.71	2.0
0.2	0.55	2.5
0.1	0.37	3.2

[a] Initial value of $b = 0.2$.

↳ "κλίση" της βαθμιδωτής έκλουσης

* t_G : ο συνολικός χρόνος έκλουσης του χρωματογραφήματος κατά τη βαθμιδωτή έκλουση

Εφαρμογή Γραμμικής Βαθμιδωτής Έκλουσης
με διαφορετικό αρχικό ποσοστό διαλυτών



Αλλαγή λόγω διαφοράς της αρχικής συγκέντρωσης MeOH

(a) το προηγούμενο (b) gradient elution from 20 to 80 %
(b,c) " " 30 " "
40 " "

33

Επίδραση της αρχικής σύστασης της κινητής φάσης στη Βαθμιδωτή Έκλουση

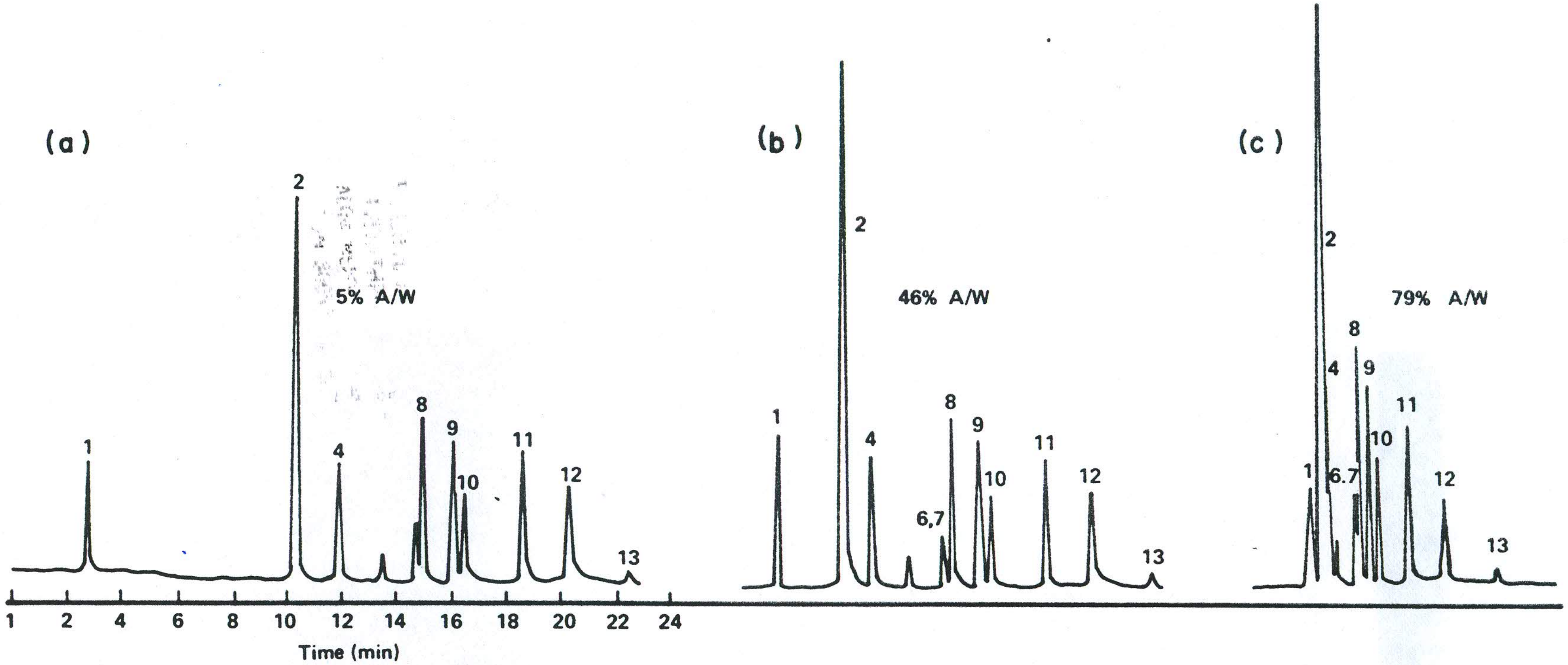


FIG. 8. Influence of initial mobile phase composition on gradient chromatogram. Solutes: 1, uracil; 2, phenol; 3, *p*-nitrophenol; 4, *p*-cresol; 5, 2,5-xylenol; 6, anisole; 7, methylbenzoate; 8, benzene; 9, phenetole; 10, toluene; 11, anthracene; 12, butylbenzoate; 13, benzanthracene. All gradients ϕ_0 95% acetonitrile(AN)/water, $b = 0.28$, $F = 1$ ml/min. (a) $\phi_0 = 5\%$ AN, $t_G = 20$ min; (b) $\phi_0 = 46\%$ AN, $t_G = 12$ min; (c) $\phi_0 = 79\%$ AN, $t_G = 4$ min.

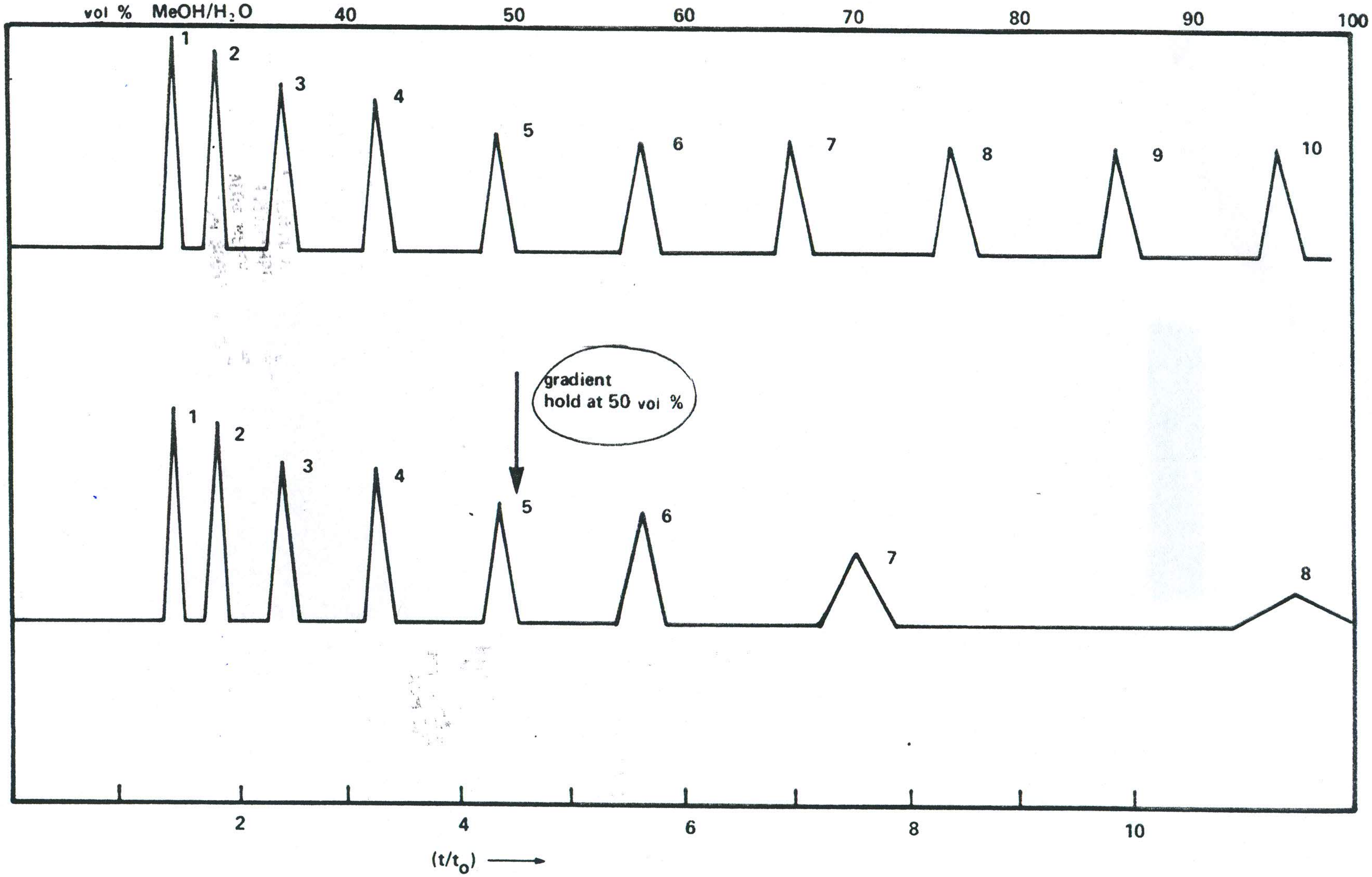
$\phi' =$ (change in volume fraction B)/time $= \frac{1}{t_G}$ → μήκος του gradient

↓

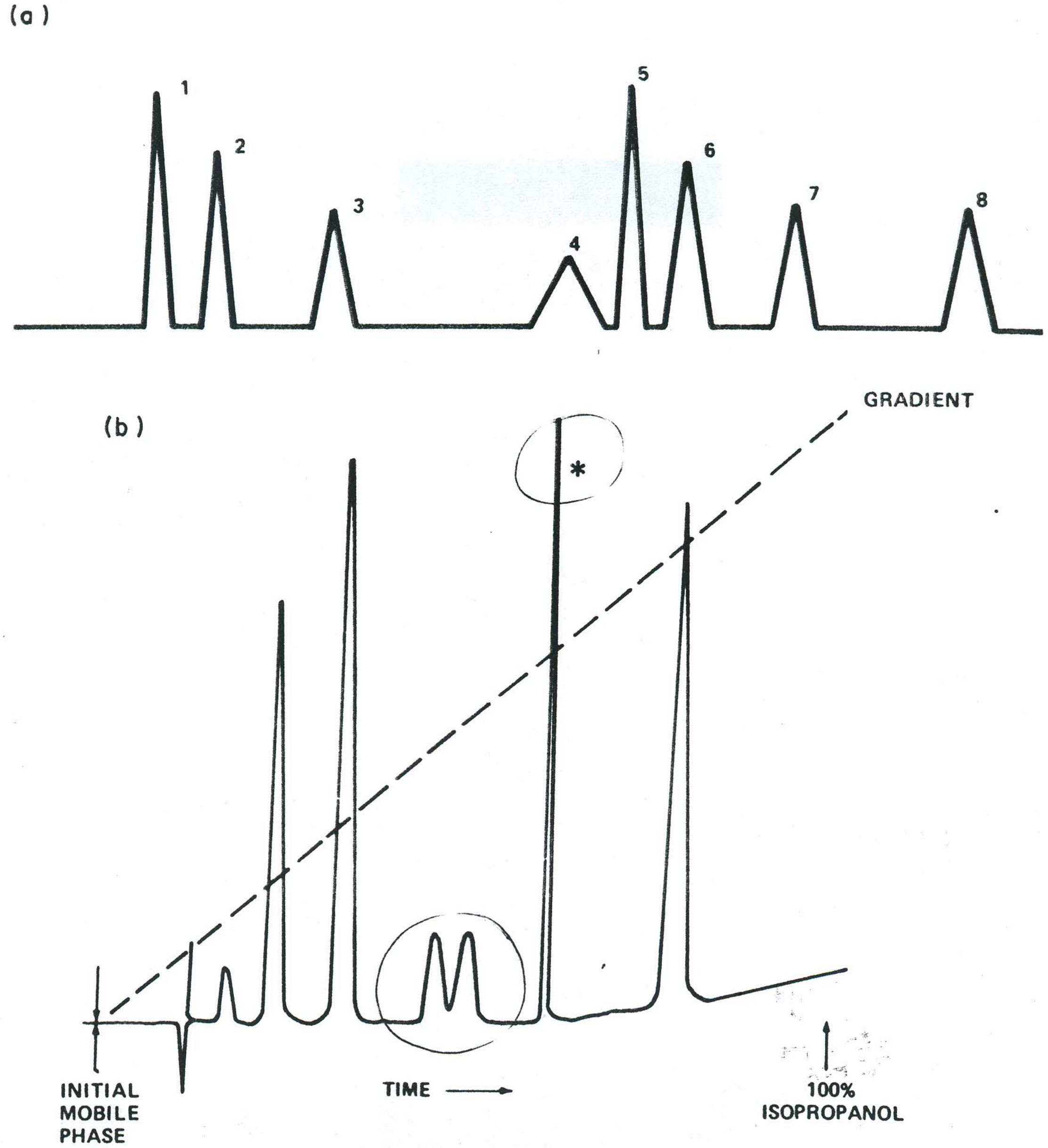
gradient steepness

34

Εφαρμογή συνδυασμένου σχήματος βαθμιδωτής Έκλουσης



SOLVENT DEMIXING



Effect of solvent demixing during gradient elution. (a) Calculated for separation of Fig. 5b. (b) Separation of unknown compounds on silica. Column, 25 × 0.32-cm Zorbax-SIL; mobile phase, gradient from 0.1 vol% isopropanol/hexane to isopropanol; ambient; Reprinted courtesy of J. J. Kirkland.

→ Αν η εκλουστική δύναμη των διαλυτών Α κ Β είναι πολύ... διαφορετική, οι μικρές συγκεντρώσεις του Β στην αρχή του διαχωρισμού προσροφώνται στη Σ.Φ. και ο διαχωρισμός στην αρχική φάση γίνεται μόνο από τον Α.

Γίνεται αντιληπτό α) από ενωμένες κορυφές στο κέντρο

b) ξαφνική ελάττωση του πλάτους των κορυφών

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΣΧΕΣΕΩΝ ΠΟΥ ΙΣΧΥΟΥΝ:

α) στην Ισοκρατική Έκλουση

β) " Βαθμιδωτή "

Corresponding Relationships in Isocratic and Gradient Elution (LSS Gradients)

	Variable	Isocratic	Gradient
1.	Retention time	$t_R = t_0(1 + k')$	$t_g = (t_0/b)\log(2.31k_0b + 1) + t_0$
2.	Capacity factor	$k' = (t_R - t_0)/t_0$	$k_g = (1/b)\log(2.3k_0b + 1)$
3.	Separation time	$t_s = t_0(1 + k_s)$	$t_{g,s} = (t_0/b)\log(2.31k_{0,s}b + 1) + t_0 = t_G + t_0$
4.	Resolution: $R_s/\frac{1}{4}N(\alpha - 1) = Q$	$k'/(1 + k')$	$\bar{k}/(1 + \bar{k})$; $\bar{k} = 1/1.15b$
5.	k' at elution; k_f	k'	$k_f = 1/(2.3b + 1/k_0)$
6.	Bandwidth	$t_w = (4/\sqrt{N})t_0(1 + k')$	$t_w = (4/\sqrt{N})t_0(1 + k_f)G$
7.	Relative peak height	$1/t_w$	$1/t_w$
8.	Optimum mobile phase (Fig. 14b)	$2 \leq k' \leq 5$	$0.1 \leq b \leq 0.3$

37

Χαρακτηριστικά διαφόρων εμπορικά διαθεσίμων συστημάτων βαθμιδωτής έκλουσης

TABLE

Some Characteristics of Commercial Gradient Systems

System	Type (see Fig. 23)	Gradient options[a]	Mixer[b]	Other comments[c]
Analabs				
Anasol-20	E	Cv steps	Dy (50)	Up to 16 solvents can be combined in gradient
Beckman (Altex)				
Altex 420	B	All[d]	Dy (2.0)	Accurate gradient from 0–100% due to novel programmer approach[i]
DuPont				
830	A	Cn, Cv, L	St (0.4)[e]	See text
850	B	All	Dy (1.0)	Mixer before pump; 2 solvents (A,B) only
Hewlett-Packard				
HP 1084B	B	All[d]	Dy (0.4)	Limited gradient range[f]
Laboratory Data Control				
1601	B	All[d]	Dy (0.1)	Limited gradient range[f]
Micromeritics				
7000B	B	Cn, Cv, L[g]	Dy (1.0)	Accurate gradient from 0–100% B, due to novel pump design
7500	F	All	Dy (1.0)	Same, but three-solvent (A,B,C) capability
Perkin Elmer				
Series 22	B	L	Dy (2.5)[h]	Limited gradient range; recommend 10–90% maximum
Series 3	B	All	Dy (2.5)[h]	Limited gradient range; recommend 10–99% maximum; gradient choices more versatile and/or convenient than other systems

(συνέχεια του προηγούμενου Πίνακα)

Spectra-Physics				
3500	B	All	Dy (1.0)	No restrictions on gradient range
8000	F	All	Dy (1.2)	Three-solvent standard, any combination possible (A/B/C)
Tracor				
980A	F	All[i]	Dy (1.5)[j]	Three-solvents standard, any combination possible (A/B/C); applicable to any reciprocating pump (positive pumping of solvents from PV to high-pressure pump); gradient shape (Cn, Cv) continuously variable (any value of *n*)
Varian				
5020	F	All[d]	St (0.7)	Two-solvent (A,B) standard, three (A, B, C) optional; can only deliver two solvents at one time (A/B, A/C, or B/C)
Waters Associates				
660	B	All[i]	St[k]	Limited accuracy at extremes of gradient range

[a] Automatic features only (some additional capabilities available by manual intervention): Cn (concave), Cv (convex), L (linear), D (gradient delay), H (gradient hold), Cm (complex), R (gradient reversal).

[b] Dy (dynamic), St (static); volume of mixer (ml) in parentheses, but note that total volume of LC system is often *much* larger.

[c] Remarks apply to pump/gradient–former combination sold by manufacturer.

[d] Standard gradients [Eqs. (17a)–(17c)] must be entered as linear segments by operator for each new gradient (inconvenient).

[e] Packed bed.

[f] Each pump must deliver at least 0.1 ml/min; therefore, for 1.0-ml/min total flow, gradient cannot exceed 10–90% B; for 2.0 ml/min, range is 5–95% B; etc.

[g] D and H available if microprocessor attachment for 7000B is purchased (CSI-Super-Grator-3).

[h] Use of dynamic mixer is optional; system also includes a 1.8-m (1 mm i.d.) line as static mixer.

[i] Gradient reversal requires manual intervention.

[j] Mixing occurs in low-volume pump between proportioning valve and high-pressure pump.

[k] Solvent lines join at low-volume tee, with mixing in line from tee.

[l] At low flow rates for one pump (e.g., <0.1 ml/min), programmer generates flow pulses rather than continuous pumping.

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΜΒΑΔΩΝ ΤΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΣΤΗ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ

Reproducibility of DuPont 850 Low-Pressure-Mixing Gradient Elution System

Run No.[a]	Toluene		Naphthalene		Pyrene	
	Peak ret. (sec)	Peak area	Peak ret. (sec)	Peak area	Peak ret. (sec)	Peak area
1	767.3	683108	1056.2	2089019	1148.9	636621
2	771.1	673524	1058.5	2088637	1150.9	637075
3	767.0	664605	1058.0	2089744	1151.0	637810
4	768.9	677585	1058.7	2089511	1152.0	638330
5	770.0	678742	1058.0	2091480	1151.0	637744
6	769.8	694546	1058.7	2078851	1151.4	636658
7	771.1	675945	1060.0	2083292	1153.3	636350
8	768.9	683368	1058.2	2082769	1151.2	634730
9	768.7	682251	1057.3	2099405	1150.0	640320
10	767.8	685802	1058.3	2105269	1151.6	638731
11	769.7	677411	1056.4	2098244	1149.4	637408
12	767.5	689698	1057.1	2097557	1149.8	638853
13	767.9	678344	1057.3	2098752	1150.3	640414
14	769.0	679578	1055.9	2096177	1148.3	638338
15	767.6	692272	1057.3	2073854	1150.0	633351
16	768.1	681833	1057.7	2070294	1148.7	634385
17	768.0	675445	1054.2	2068797	1146.6	634050
18	766.2	688577	1054.5	2074871	1147.2	634646
N =	18	18	18	18	18	18
$\bar{X}$ =	768.5	681257	10572	2087586	11500	636989
σ =	13.59	7266	15.22	10076	17.01	2090
CV(%) =	0.18	1.0	0.14	0.48	0.15	0.33

[a] Column, 25 × 0.46-cm Zorbax-ODS; mobile phase CH_3OH/H_2O; flowrate, 1 ml/min.; automatic injection; computer data reduction. With permission from DuPont Instruments Products Division (*43*).

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ
ΜΕ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ

Designing a Gradient Separation: A Brief Summary of Section IV

1. Select conditions (method, column, etc.) as for isocratic separation, except for mobile phase.
2. Select a gradient from Table I.
3. Vary starting %A or final %B to speed up separation, improve resolution near t_0, or to elute all bands before end of gradient; vary t_G at same time to keep ϕ' constant.
4. If peak width varies regularly from one end of the run to the other, change gradient shape (see Fig. 18).
5. Vary t_G (other variables constant) for modest increase in resolution, for sharper (more easily detected) bands, or for further decrease in separation time (see Table V).[a]
6. Increase column efficiency (N) for improved resolution by varying F and/or L according to scheme offered in Snyder (*46*); adjust t_G at same time according to Table VI or Eq. (18).[b]
7. Vary separation selectivity for improved α_s values by changing the B solvent (as in different gradients shown in Table I); select a solvent from an "extreme" group in Fig. 27 (I, II, V, or VIII) where possible; for fine tuning of α_s values, use binary solvents for the B solvent as in Fig. 28.
8. For minor changes in selectivity, examine the effect of a change in t_G (other variables constant) on sample values; a different t_G value may provide improved relative retention of sample bands.
9. Correct other problems as they arise: band tailing, solvent demixing, etc.

[a] Or simply increase sample volume.
[b] Or skip to Step 7 if R_s increase as in Snyder (*46*) appears impractical.

Appendix D. Solvent Miscibility Table

The Solvent Miscibility Table is displayed below.

NAME	NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Acetic acid	1																								
Acetone	2																								
Acetonitrile	3								■	■						■	■		■						
Benzene	4																								■
Butyl alcohol	5																								■
Carbon tetrachloride	6																								■
Chloroform	7																								■
Cyclohexane	8			■									■					■							■
Cyclopentane	9			■									■					■							■
Dichloroethane	10																								■
Dichloromethane	11																								■
Dimethylformamide	12								■	■						■	■		■						
Ethylacetate	13																								■
Ethyl alcohol	14																								
Heptane	15			■									■												■
Hexane	16			■									■												■
Methyl alcohol	17								■	■															
Pentane	18			■									■												■
I-Propyl alcohol	19																								
Tetrachloroethane	20																								■
Tetrahydrofuran	21																								
Toluene	22																								■
Trichloroethane	23																								■
Water	24				■	■	■	■	■	■	■	■		■		■	■		■		■		■	■	
NAME	NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

☐ Miscible (Αναμείξιμα)

■ Immiscible (Μη Αναμείξιμα)